

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2020-170010

(P2020-170010A)

(43) 公開日 令和2年10月15日(2020.10.15)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 27/62 (2006.01)	GO 1 N 27/62 V	2 GO 4 1
GO 1 N 33/50 (2006.01)	GO 1 N 27/62 X	2 GO 4 5
GO 1 N 30/72 (2006.01)	GO 1 N 33/50 D	
	GO 1 N 30/72 C	

審査請求 有 請求項の数 10 O L (全 119 頁)

(21) 出願番号	特願2020-110227 (P2020-110227)	(71) 出願人	598063203
(22) 出願日	令和2年6月26日 (2020.6.26)		パーデュー・リサーチ・ファウンデーション
(62) 分割の表示	特願2017-561885 (P2017-561885) の分割		PURDUE RESEARCH FOUNDATION
原出願日	平成28年5月27日 (2016.5.27)		アメリカ合衆国 47906 インディアナ州, ウェスト ラファイエット, スイート 2500, ファウンドリー ドライブ 101
(31) 優先権主張番号	62/168,033	(74) 代理人	100078282
(32) 優先日	平成27年5月29日 (2015.5.29)		弁理士 山本 秀策
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国 (US)	(74) 代理人	100113413
			弁理士 森下 夏樹
(特許庁注: 以下のものは登録商標)		(74) 代理人	100181674
1. MATLAB			弁理士 飯田 貴敏

最終頁に続く

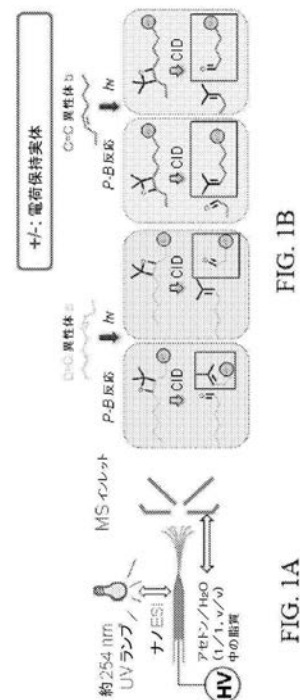
(54) 【発明の名称】 組織サンプルを分析するための方法

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】 分離不要で区別できない構造の特徴付けおよび定量を可能にする、組織サンプルを分析するための方法を提供する。

【解決手段】 不飽和化合物を含む組織サンプルを得る工程、不飽和化合物内の炭素-炭素二重結合を標的にするラジカル反応を組織サンプルにおいて行う工程であって、複数の化合物異性体を生成する工程、複数の化合物異性体を質量分析に供する工程であって、不飽和化合物内の炭素-炭素二重結合の位置を特定する工程、および正常組織と罹患組織とを識別するために複数の化合物異性体を定量する工程を含む方法を提供する。特に、ラジカル反応（例えば、パターノ・ビューチ反応）をタンデム質量分析と連結することによって、組織における脂質C=C異性体の包括的な特徴付けおよび定量を可能にする。

【選択図】 図1 A B



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

組織サンプルを分析するための方法であって、該方法は、
ホスホコリンおよび脂肪酸を含む組織サンプルを得る工程；
該ホスホコリンおよび脂肪酸のそれぞれの炭素－炭素二重結合を標的にするラジカル反応を該組織サンプルにおいて行うことにより、複数のホスホコリンおよび脂肪酸の異性体を生成する工程；
該複数のホスホコリンおよび脂肪酸の異性体を質量分析に供する工程であって、該ホスホコリンおよび脂肪酸のそれぞれの炭素－炭素二重結合の位置を特定する工程；および
正常組織と罹患組織とを識別するために該複数のホスホコリンおよび脂肪酸の異性体を定量する工程
を含む、方法。

10

【請求項 2】

前記罹患組織が、癌性組織である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記ラジカル反応が、前記ホスホコリン、脂肪酸および該ラジカル反応用の試薬を紫外線に曝露する工程を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

前記ホスホコリンおよび脂肪酸が質量分析プローブ内に存在している間に、前記ラジカル反応が行われる、請求項 3 に記載の方法。

20

【請求項 5】

前記質量分析プローブの少なくとも一部が紫外線に対して透過性である、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 6】

前記質量分析プローブが、およそ 200 nm の波長の紫外線に対して透過性である材料から構成される、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 7】

前記ラジカル反応が容器内で行われ、該反応の後、前記ホスホコリンおよび脂肪酸の異性体が質量分析プローブに移される、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 8】

前記ラジカル反応が、高圧液体クロマトグラフィーシステムと関連して行われ、該ラジカル反応用の試薬が、溶出溶媒中に存在する、請求項 1 に記載の方法。

30

【請求項 9】

前記ラジカル反応が、パターン・ビューチ（PB）反応である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 10】

前記パターン・ビューチ（PB）反応が、アセトンを含む溶媒混合物中で行われる、請求項 8 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

40

【0001】

関連出願

本願は、2015 年 5 月 9 日に提出された米国仮出願第 62/168,033 号の優先権の利益を主張し、その内容全体が、本明細書中に参照によって援用される。

【0002】

政府援助

本発明は、米国国立衛生研究所によって授与された GM106016、および米国国立科学財団によって授与された CHE1308114 のもとの政府援助によって行われた。政府は、本発明において一定の権利を有する。

【0003】

50

発明の分野

本発明は、概して、組織サンプルを分析するための方法に関する。

【背景技術】

【0004】

背景

脂質は、種々の異なる頭部基、骨格および疎水性アシル鎖からなるという点において構造的に多様な分子である。脂質は、原形質膜の基本単位として働き、生体系のシグナル伝達およびエネルギー貯蔵において重要な役割を果たす。脂質の頭部基、アシル鎖長および不飽和度が様々であることは、膜の特性および機能（例えば、粘度、脂質-タンパク質相互作用および脂質-脂質相互作用（これらのすべてが正常な細胞機能にとって重要である））の調節に利用される。同様に、全脂質組成の変化は疾患に結びつくため、脂質プロファイルは、実際の診断において病状を探索するためのマーカーとしてますます使用されるようになっている。

10

【0005】

しかしながら、質量分析を用いた脂質プロファイリングの場合、異性体のおよび／または同重体の脂質は、単一ピークとして現れることから、スペクトルの解釈および詳細な組成情報（例えば、ある組成に含まれている脂質種の量）の取得が困難である。既存の研究によって、脂質のアシル鎖におけるC=Cの数および位置が生物学的に重要であることが示されているので（Groegerら、Nat Chem Biol 6, 433-441 (2010)；Lombardら、Nat Rev Micro 10, 507-515 (2012)；およびBlanksbyら、Annual Review of Analytical Chemistry 3, 433-465 (2010)）、上記のことには、大きな意義がある例えば、オメガ-6およびオメガ-3脂肪酸アシルを有するリン脂質（PL）は、インビボにおいて、逆の生物学的活性を有する化合物に変換され得る（Groegerら、Nat Chem Biol 6, 433-441 (2010)）。

20

【0006】

ガスクロマトグラフィー（GC）および液体クロマトグラフィー（LC）は、脂質（および／またはそれらのC=C異性体）の定量を可能にする従来の方法である。しかしながら、退屈なサンプル調製、専用のGCカラムおよび時間のかかるクロマトグラフ条件最適化が必要である。リピドームにおける多数かつ様々なタイプの脂質を考慮すると、分離不要で区別できない構造の特徴付けおよび定量を可能にする方法が非常に望ましい。質量分析（MS）は、優れた感度および特異性を提供することから、現在、脂質分析において最適な方法になっているが、MS法を全リピドームの完全な構造の特徴付け（「トップダウン」リピドミクス）と定量を同時に行うことに拡大することは、実現が難しいままである。飽和脂質のプロファイリングと比べて、不飽和脂質の分析は、2つの点：C=Cの数および位置の特定、ならびに脂質C=C異性体の定量において課題に直面している。過去20年間で、化学誘導体化ベースの方法が継続的に発展し、それらの方法は脂質C=C異性体の特徴付けに成功した。しかしながら、これらの異性体の定量を試みたものはそれらのうちのいくつかしかなかった。

30

40

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0007】

【非特許文献1】Groegerら、Nat Chem Biol 6, 433-441 (2010)

【非特許文献2】Lombardら、Nat Rev Micro 10, 507-515 (2012)

【非特許文献3】Blanksbyら、Annual Review of Analytical Chemistry 3, 433-465 (2010)

【非特許文献4】Groegerら、Nat Chem Biol 6, 433-441

50

(2010)

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0008】

要旨

不飽和脂質は、生物内の全脂質の大部分を構成しており、それらの物理的特性、化学反応性および生体内変換は、種々の生理学的機能および生理化学的機能と密接な関係がある。しかしながら、脂質C=C異性体、特に、複雑な混合物由来の脂質C=C異性体の同定と定量を同時に行うことは、現在のところ困難である。本発明は、ラジカル反応（例えば、パターノ・ビューチ反応）をタンデム質量分析と連結することによって、組織における脂質C=C異性体の包括的な特徴付けおよび定量を可能にする方法を提供する。それらの方法を用いて、ラットにおいて、脂肪酸（FA）18：1およびC18：1含有リン脂質がすべて、2つのC=C異性体：C18：1 n-7およびC18：1 n-9として存在し、しかしながら、それらの相対比は、脂質および組織タイプによって異なるすることが実証された。マウスの正常乳房組織と癌性乳房組織との間で、FA18：1およびC18：1含有ホスホコリンの異性体組成の有意差が観察された。特許請求される方法は、定量的ショットガンリピドミクスに適しており、基礎をなす不飽和脂質の精密定量による高度な生物学的研究に寄与する。

10

【0009】

他の態様において、本発明の方法は、ショットガンリピドミクスに応用され得る。脂質は、組織サンプルから抽出され、次いで、PB試薬を含む溶媒に移される。その溶媒は、ナノESIチューブに移される。適切な波長のUV光が提供されることにより、反応が促進される。溶媒に印加される高電圧などのスプレーイオン化条件は確立されており、PB反応生成物に対してイオンが生成され、続いてそれらがMSおよびタンデムMS分析によって質量分析される。

20

【0010】

ある特定の実施形態において、本発明の方法は、オンラインHPLC-MSに使用され得る。PB試薬が、HPLCの溶出液に混合される。HPLCとMSを接続しているキャピラリーの一部が、適切な波長のUV光に曝露されることにより、反応が可能になる。次いで、溶液中の生成物が、MSおよびタンデムMSを用いた分析に向けてイオン化される。

30

【0011】

上で論じられたように、本発明の方法は、定量分析に使用され得る。特徴的なフラグメントイオンが、脂質のPB生成物イオンのCID、すなわち、PB試薬のニュートラルロスから得られ、C=C診断用イオンが、定量のために使用される。アセトンが、PB試薬として使用されるとき、58Daのニュートラルロスキャン（NLS）が、C-C二重結合からなる脂肪酸、グリセロール脂質およびステロール脂質の定量のために使用される。脂質C=C異性体を定量する場合、C=C診断用イオンのイオン強度が、相対定量または絶対定量のために使用される。

【0012】

ある特定の実施形態において、本発明の方法は、インビボ組織の分析に使用され得る。針を用いて組織サンプルに触れ、次いで、溶媒およびPB試薬を含むナノESIチューブに挿入する。針によってサンプリングされた脂質が、溶媒に溶解される。適切な波長の光が提供されることにより、PB反応が可能となり、反応生成物をイオン化するスプレー条件が確立され、続いて、その反応生成物がMSおよびタンデムMSを用いて分析される。そのような方法は、例えば、Purdue Research Foundationに対する国際特許出願公開番号WO2014/120411（その内容の全体が、参照により本明細書中に援用される）に記載されている抽出スプレー（extraction spray）に基づき得る。

40

【0013】

50

本発明の方法は、MSイメージングにも使用され得る。MALDI-MSでは、反応試薬は、MALDIマトリックス中で混合され得るか、または別々に組織上にスプレーされ得る。その反応は、MALDI用のUVレーザーが脱離イオン化のために適用されると、可能になり得る。MALDIレーザーに加えて、別個の光源もPB反応のためだけに提供され得る。上に記載された方法は、表面分析のためのレーザーアブレーション、例えば、レーザーアブレーションエレクトロスプレーイオン化(LAESI, Methods Mol Biol. 2010; 656: 159-71. doi: 10.1007/978-1-60761-746-4_9) およびエレクトロスプレーレーザー脱離イオン化(Rapid Commun Mass Spectrom. 2005; 19(24): 3701-4)を用いるアンビエントMS法に適用される。ナノDESI(Anal Chem. 2012 Jan 3; 84(1): 141-8. doi: 10.1021/ac2021322)または液体抽出表面分析(LESA, Rapid Commun Mass Spectrom. 2011 Dec 15; 25(23): 3587-96. doi: 10.1002/rcm.5274)などの方法を用いる表面分析のためのアンビエントMS。これらの方法では、1つのチャンネル(チャンネルI)が、化学的化合物を抽出するための溶媒を送達するために使用され、別のチャンネル(チャンネルII)が、分析種を含む溶媒をMSインレットに向かって移動させるために使用され、ここで、抽出された分析種をイオン化するためのイオン化条件は、確立されている。PB試薬を抽出溶媒に混合し、チャンネルII内の溶媒を適切な波長のUV光に曝露することによって、PB反応が実行され得る。

10

20

【0014】

ある特定の態様において、本発明は、組織サンプルを分析するための方法を提供し、その方法は、不飽和化合物を含む組織サンプルを得る工程を含む。その組織サンプル上で、不飽和化合物内の炭素-炭素二重結合を標的にするラジカル反応を行うことにより、複数の化合物異性体を生成する。それらの複数の化合物異性体を質量分析に供することにより、不飽和化合物内の炭素-炭素二重結合の位置を特定する。次いで、正常組織と罹患組織とを識別するために、複数の化合物異性体を定量する。本発明の方法は、数多くの異なるタイプの不飽和化合物に対して行うことができる。例示的な不飽和化合物としては、脂質または脂肪酸が挙げられる。

【0015】

その反応が不飽和化合物内の炭素-炭素二重結合を標的にする限り、数多くの異なるタイプのラジカル反応を本発明の方法とともに用いることができる。ある特定の実施形態において、ラジカル反応は、不飽和化合物およびラジカル反応用の試薬を紫外線に曝露する工程を含む。ある特定の実施形態において、ラジカル反応は、パターン・ビューチ(PB)反応である。そのような実施形態では、パターン・ビューチ(PB)反応は、アセトンを含む溶媒混合物中で行われ得る。

30

【0016】

ラジカル反応は、不飽和化合物が質量分析プローブ内に存在している間に行われ得る。そのような実施形態では、質量分析プローブの少なくとも一部は、紫外線に対して透過性であり得る。例えば、質量分析プローブは、およそ200nmの波長の紫外線に対して透過性である材料から構成され得る。他の実施形態において、ラジカル反応は、容器内で行われ、その反応の後、化合物異性体が質量分析プローブに移される。他の実施形態において、ラジカル反応は、高圧液体クロマトグラフィーシステムと関連して行われ、そのラジカル反応用の試薬は、溶出溶媒中に存在する。

40

【0017】

本発明の他の態様は、組織サンプルを分析するための方法を提供し、その方法は、不飽和化合物がサンプリングプローブ上に保持されるように、不飽和化合物を含む組織にサンプリングプローブを接触させる工程を含む。そのサンプリングプローブを中空体に挿入し、ここで、ラジカル反応用の試薬が、中空体内に存在し、そのラジカル反応は、不飽和化合物内の炭素-炭素二重結合を標的にする。ラジカル反応を中空体内で行うことにより、

50

反応生成物を生成する。反応生成物を、中空体の遠位端から放出させる。次いで、不飽和化合物内の炭素－炭素二重結合の位置を特定するために、放出された反応生成物を、質量分析計において分析する。本発明の方法は、数多くの異なるタイプの不飽和化合物に対して行うことができる。例示的な不飽和化合物としては、脂質または脂肪酸が挙げられる。

【0018】

サンプルプローブにとって数多くの配置が可能であり、遠位端を有する分析プローブが本発明の方法に適合している。ある特定の実施形態において、サンプリングプローブは、針を備える。

【0019】

その反応が不飽和化合物内の炭素－炭素二重結合を標的にする限り、数多くの異なるタイプのラジカル反応を本発明の方法とともに用いることができる。ある特定の実施形態において、ラジカル反応は、不飽和化合物およびラジカル反応用の試薬を紫外線に曝露する工程を含む。ある特定の実施形態において、ラジカル反応は、パターノ・ビューチ（PB）反応である。そのような実施形態では、パターノ・ビューチ（PB）反応は、アセトンを含む溶媒混合物中で行われ得る。

10

【0020】

ラジカル反応は、不飽和化合物が質量分析プローブ内に存在している間に行われ得る。そのような実施形態では、不飽和化合物は、その反応が行われている間に、中空体を通して得る。そのような実施形態では、質量分析プローブの少なくとも一部は、紫外線に対して透過性であり得る（例えば、すべての中空体の少なくとも一部が、石英ガラスまたは溶融石英から構成され得る）。例えば、質量分析プローブは、およそ200nmの波長の紫外線に対して透過性である材料から構成され得る。

20

【0021】

本発明の他の態様は、組織サンプルをイメージングするための方法を提供する。そのような方法は、不飽和化合物を含む組織にラジカル反応用の試薬を導入する工程を含み得、ここで、そのラジカル反応は、不飽和化合物内の炭素－炭素二重結合を標的にする。ラジカル反応を行うことにより、反応生成物を生成する。反応生成物が時間分解的に脱離され、イオン化されるように、組織を走査する。脱離され、イオン化された反応生成物を質量分析計において分析する。分析工程の結果に基づいて、組織のイメージを生成する。ある特定の実施形態において、ラジカル反応を行う工程と走査する工程は、同時に行われる。他の実施形態において、それらの工程は、連続的に行われる。

30

【0022】

ある特定の実施形態において、走査は、組織上の複数の異なる位置において脱離エレクトロスプレーイオン化プローブを用いて脱離エレクトロスプレーイオン化法を行うことを含む。ラジカル反応用の試薬は、脱離エレクトロスプレーイオン化プローブを介して組織に導入され得、その組織に紫外線が適用され得る。ある特定の実施形態において、ラジカル反応を行う工程と走査する工程は、同時に行われる。他の実施形態において、それらの工程は、連続的に行われる。

【0023】

他の実施形態において、導入工程は、MALDIマトリックス中のラジカル反応用の試薬を組織に適用する工程を含む。そのような実施形態では、走査は、組織上の複数の異なる位置においてMALDIソースを用いてMALDI法を行うことを含む。ある特定の実施形態において、ラジカル反応を行う工程と走査する工程は、同時に行われる。他の実施形態において、それらの工程は、連続的に行われる。

40

【0024】

ある特定の実施形態において、脂質および組織の分析は、小型質量分析計の使用を含む。適切な波長のLEDまたはLEDアレイが、PB反応に必要な光を提供するために使用され得る。PB反応イオン化源は、タンデムMSの能力を有するDAPIMS機器と組み合わされ得る。

【0025】

50

当該分野で公知の任意のタイプの質量分析計が、本発明の方法とともに使用され得る。例えば、質量分析計は、標準的なベンチトップ質量分析計であり得る。他の実施形態において、質量分析計は、小型質量分析計である。例示的な小型質量分析計は、例えば、Gaora (Z. Anal. Chem. 2006, 78, 5994-6002) (この内容の全体が参照により本明細書中に援用される) に記載されている。小型質量分析計は通常、数千ワットの電力を用いるラボスケールの機器に使用されるポンピングシステムと比較して、それより小さいポンピングシステム、例えば、Gaoraに記載されているシステム用の、わずか5 L/分 (0.3 m³/時) の隔膜ポンプおよび11 L/sのターボポンプを備える18 Wポンピングシステムを有する。他の例示的な小型質量分析計は、例えば、Gaora (Anal. Chem., 80:7198-7205, 2008)、Hou (Anal. Chem., 83:1857-1861, 2011) およびSokol (Int. J. Mass Spectrom., 2011, 306, 187-195) (これらの各内容の全体が参照により本明細書中に援用される) に記載されている。小型質量分析計は、例えば、Xu (JALA, 2010, 15, 433-439); Ouyang (Anal. Chem., 2009, 81, 2421-2425); Ouyang (Ann. Rev. Anal. Chem., 2009, 2, 187-214); Sanders (Euro. J. Mass Spectrom., 2009, 16, 11-20); Gaora (Anal. Chem., 2006, 78 (17), 5994-6002); Mulligan (Chem. Com., 2006, 1709-1711); およびFico (Anal. Chem., 2007, 79, 8076-8082) (これらの各内容の全体が参照により本明細書中に援用される) にも記載されている。

10

20

【0026】

本発明の方法は、必要に応じて、不連続なインターフェースの使用を含み得、中性分子のイオン化が、不連続なインターフェースの操作と同期され得る。そのようなシステムおよび方法は、例えば、Ouyang (米国特許第8,304,718号) およびOuyang (米国特許第8,785,846号) (これらの各内容の全体が参照により本明細書中に援用される) に記載されている。

特定の実施形態において、例えば以下の項目が提供される：

(項目1)

組織サンプルを分析するための方法であって、該方法は、
不飽和化合物を含む組織サンプルを得る工程；
該不飽和化合物内の炭素-炭素二重結合を標的にするラジカル反応を該組織サンプルにおいて行うことにより、複数の化合物異性体を生成する工程；
該複数の化合物異性体を質量分析に供する工程であって、該不飽和化合物内の該炭素-炭素二重結合の位置を特定する工程；および
正常組織と罹患組織とを識別するために該複数の化合物異性体を定量する工程を含む、方法。

30

(項目2)

前記不飽和化合物が、脂質または脂肪酸である、項目1に記載の方法。

(項目3)

前記ラジカル反応が、前記不飽和化合物および該ラジカル反応用の試薬を紫外線に曝露する工程を含む、項目1に記載の方法。

40

(項目4)

前記不飽和化合物が質量分析プローブ内に存在している間に、前記ラジカル反応が行われる、項目3に記載の方法。

(項目5)

前記質量分析プローブの少なくとも一部が紫外線に対して透過性である、項目4に記載の方法。

(項目6)

前記質量分析プローブが、およそ200 nmの波長の紫外線に対して透過性である材料

50

から構成される、項目 5 に記載の方法。

(項目 7)

前記ラジカル反応が容器内で行われ、該反応の後、前記化合物異性体が質量分析プローブに移される、項目 3 に記載の方法。

(項目 8)

前記ラジカル反応が、高圧液体クロマトグラフィーシステムと関連して行われ、該ラジカル反应用の試薬が、溶出溶媒中に存在する、項目 1 に記載の方法。

(項目 9)

前記ラジカル反応が、パターノ・ビューチ (PB) 反応である、項目 1 に記載の方法。

(項目 10)

前記パターノ・ビューチ (PB) 反応が、アセトンを含む溶媒混合物中で行われる、項目 8 に記載の方法。

(項目 11)

組織サンプルを分析するための方法であって、該方法は、
不飽和化合物がサンプリングプローブ上に保持されるように、該不飽和化合物を含む組織に該サンプリングプローブを接触させる工程；

該サンプリングプローブを中空体に挿入する工程であって、ここで、ラジカル反应用の試薬が、該中空体内に存在し、該ラジカル反応は、該不飽和化合物内の炭素-炭素二重結合を標的にする、工程；

該ラジカル反応を該中空体内で行う工程であって、反応生成物を生成する工程；

該反応生成物を該中空体の遠位端から放出する工程；および

該不飽和化合物内の該炭素-炭素二重結合の位置を特定するために、放出された反応生成物を質量分析計において分析する工程

を含む、方法。

(項目 12)

前記不飽和化合物が、脂質または脂肪酸である、項目 11 に記載の方法。

(項目 13)

前記サンプリングプローブが、針を備える、項目 11 に記載の方法。

(項目 14)

前記ラジカル反応が、前記不飽和化合物および前記ラジカル反应用の試薬を紫外線に曝露する工程を含む、項目 13 に記載の方法。

(項目 15)

前記反応が行われている間に、前記不飽和化合物を前記中空体に通過させる、項目 14 に記載の方法。

(項目 16)

前記中空体の少なくとも一部が、紫外線に対して透過性である、項目 15 に記載の方法。

(項目 17)

前記中空体が、およそ 200 nm の波長の紫外線に対して透過性である材料から構成される、項目 16 に記載の方法。

(項目 18)

前記中空体が、石英ガラスまたは溶融石英から構成される、項目 17 に記載の方法。

(項目 19)

前記ラジカル反応が、パターノ・ビューチ (PB) 反応である、項目 11 に記載の方法。

(項目 20)

前記パターノ・ビューチ (PB) 反応が、アセトンを含む溶媒混合物中で行われる、項目 19 に記載の方法。

(項目 21)

組織サンプルをイメージングするための方法であって、該方法は、

10

20

30

40

50

不飽和化合物を含む組織にラジカル反应用の試薬を導入する工程であって、ここで、該ラジカル反応は、該不飽和化合物内の炭素－炭素二重結合を標的にする、工程；
 該ラジカル反応を行う工程であって、反応生成物を生成する工程；
 該反応生成物が時間分解的に脱離され、イオン化されるように、該組織を走査する工程；
 該脱離され、イオン化された反応生成物を質量分析計において分析する工程；および
 該分析工程の結果に基づいて該組織のイメージを生成する工程
 を含む、方法。

(項目 2 2)

走査が、前記組織上の複数の異なる位置において脱離エレクトロスプレーイオン化プローブを用いて脱離エレクトロスプレーイオン化法を行うことを含む、項目 2 1 に記載の方法。

10

(項目 2 3)

前記ラジカル反应用の前記試薬が、前記脱離エレクトロスプレーイオン化プローブを介して前記組織に導入され、紫外線が、該組織に適用される、項目 2 2 に記載の方法。

(項目 2 4)

前記ラジカル反応を行う工程と前記走査する工程が同時に行われる、項目 2 3 に記載の方法。

(項目 2 5)

前記導入する工程が、MALDI マトリックス中のラジカル反应用の試薬を前記組織に適用する工程を含む、項目 2 1 に記載の方法。

20

(項目 2 6)

走査が、前記組織上の複数の異なる位置においてMALDI ソースを用いてMALDI 法を行うことを含む、項目 2 5 に記載の方法。

(項目 2 7)

前記ラジカル反応を行う工程と前記走査する工程が同時に行われる、項目 2 6 に記載の方法。

【図面の簡単な説明】

【0027】

【図 1 A B】図 1 A～B は、不飽和脂質を同定および定量するための光化学誘導体化－タンデムMS の原理を示している。図 1 A は、P－B 反応とナノESI－MS とを連結する例示的な構成を示している。図 1 B は、異なる脂質C＝C 異性体に特異的な異なる診断用イオンの生成を図示しているスキームである（右）。＋／－は、正／負電荷を表す。電荷を有するフラグメントだけが診断用イオンとして検出可能である。図 1 C は、FA 18：1 n－9 と FA 18：1 n－7 との 4：1 混合物の P－B 反応スペクトルであり、ここで、P－B 反応生成物の形成が観察された（m/z 339. 3）。図 1 D は、インタクトな FA 18：1 n－9 の CID 質量スペクトルである。C＝C の位置情報を取り出せない。図 1 E は、CID において、FA 18：1 混合物の P－B 反応生成物が、m/z 171. 1 / 197. 2 および m/z 199. 1 / 225. 2 という 2 つの異なる診断用イオン対を放出することを示している質量スペクトルであり、2 つの FA 18：1 n－9 および n－7 異性体の存在を明らかに示している。図 1 F は、等モルの PC 18：1 n－9 / 18：1 n－9 および PC 18：1 n12 / 18：1 n12（m/z 786. 6）の反応質量スペクトルである。図 1 G は、C＝C の位置情報を取り出せないインタクトな PC（m/z 786. 6）のインタクトな CID 質量スペクトルである。図 1 H は、上記 PC 混合物からの P－B 反応生成物（m/z 844. 6）の CID 質量スペクトルである。各 PC 異性体における C＝C の位置に対応する 2 対の診断用イオン（m/z 634. 5 / 660. 5 および m/z 676. 6 / 702. 6）が高い存在比で形成された。

30

40

【図 1 C D E】図 1 A～B は、不飽和脂質を同定および定量するための光化学誘導体化－タンデムMS の原理を示している。図 1 A は、P－B 反応とナノESI－MS とを連結する例示的な構成を示している。図 1 B は、異なる脂質C＝C 異性体に特異的な異なる診断用イオンの生成を図示しているスキームである（右）。＋／－は、正／負電荷を表す。電

50

荷を有するフラグメントだけが診断用イオンとして検出可能である。図1Cは、FA18:1 n-9とFA18:1 n-7との4:1混合物のP-B反応スペクトルであり、ここで、P-B反応生成物の形成が観察された(m/z 339.3)。図1Dは、インタクトなFA18:1 n-9のCID質量スペクトルである。C=Cの位置情報を取り出せない。図1Eは、CIDにおいて、FA18:1混合物のP-B反応生成物が、m/z 171.1/197.2およびm/z 199.1/225.2という2つの異なる診断用イオン対を放出することを示している質量スペクトルであり、2つのFA18:1 n-9およびn-7異性体の存在を明らかに示している。図1Fは、等モルのPC18:1 n-9/18:1 n-9およびPC18:1 n12/18:1 n12(m/z 786.6)の反応質量スペクトルである。図1Gは、C=Cの位置情報を取り出せないインタクトなPC(m/z 786.6)のインタクトなCID質量スペクトルである。図1Hは、上記PC混合物からのP-B反応生成物(m/z 844.6)のCID質量スペクトルである。各PC異性体におけるC=Cの位置に対応する2対の診断用イオン(m/z 634.5/660.5およびm/z 676.6/702.6)が高い存在比で形成された。

【図1FGH】図1A~Bは、不飽和脂質を同定および定量するための光化学誘導体化ータンデムMSの原理を示している。図1Aは、P-B反応とナノESI-MSとを連結する例示的な構成を示している。図1Bは、異なる脂質C=C異性体に特異的な異なる診断用イオンの生成を図示しているスキームである(右)。+/-は、正/負電荷を表す。電荷を有するフラグメントだけが診断用イオンとして検出可能である。図1Cは、FA18:1 n-9とFA18:1 n-7との4:1混合物のP-B反応スペクトルであり、ここで、P-B反応生成物の形成が観察された(m/z 339.3)。図1Dは、インタクトなFA18:1 n-9のCID質量スペクトルである。C=Cの位置情報を取り出せない。図1Eは、CIDにおいて、FA18:1混合物のP-B反応生成物が、m/z 171.1/197.2およびm/z 199.1/225.2という2つの異なる診断用イオン対を放出することを示している質量スペクトルであり、2つのFA18:1 n-9およびn-7異性体の存在を明らかに示している。図1Fは、等モルのPC18:1 n-9/18:1 n-9およびPC18:1 n12/18:1 n12(m/z 786.6)の反応質量スペクトルである。図1Gは、C=Cの位置情報を取り出せないインタクトなPC(m/z 786.6)のインタクトなCID質量スペクトルである。図1Hは、上記PC混合物からのP-B反応生成物(m/z 844.6)のCID質量スペクトルである。各PC異性体におけるC=Cの位置に対応する2対の診断用イオン(m/z 634.5/660.5およびm/z 676.6/702.6)が高い存在比で形成された。

【0028】

【図2A】図2A~Dは、脂質C=C異性体の相対定量および絶対定量の原理を示している。図2Aは、定量のための診断用イオンを生成するための、P-B反応とタンデムMSとの連結のスキームである。図2Bは、モル比と、対応する強度比:PC C=C異性体(左)およびFA C=C異性体(右)との間の直線関係を示している。図2Cは、C18:1 n-6(IS、22.70 μM)を用いたときの、FA18:1 n-9またはn-7の絶対定量のための検量線を示している。図2Dは、この研究において開発された2つの絶対定量方法の性能の検証を示している。

【図2B】図2A~Dは、脂質C=C異性体の相対定量および絶対定量の原理を示している。図2Aは、定量のための診断用イオンを生成するための、P-B反応とタンデムMSとの連結のスキームである。図2Bは、モル比と、対応する強度比:PC C=C異性体(左)およびFA C=C異性体(右)との間の直線関係を示している。図2Cは、C18:1 n-6(IS、22.70 μM)を用いたときの、FA18:1 n-9またはn-7の絶対定量のための検量線を示している。図2Dは、この研究において開発された2つの絶対定量方法の性能の検証を示している。

【図2CD】図2A~Dは、脂質C=C異性体の相対定量および絶対定量の原理を示して

いる。図 2 A は、定量のための診断用イオンを生成するための、P-B 反応とタンデム MS との連結のスキームである。図 2 B は、モル比と、対応する強度比：PC C=C 異性体（左）および FA C=C 異性体（右）との間の直線関係を示している。図 2 C は、C 18 : 1 n-6 (IS、2.70 μM) を用いたときの、FA 18 : 1 n-9 または n-7 の絶対定量のための検量線を示している。図 2 D は、この研究において開発された 2 つの絶対定量方法の性能の検証を示している。

【0029】

【図 3 A B】図 3 A ~ F は、ラット脳における不飽和脂質の相対定量を示している。図 3 A は、16 ~ 22 個の炭素の範囲の鎖長を有する、MUFA (FA 16 : 1、FA 18 : 1、FA 19 : 1、FA 20 : 1 および FA 22 : 1) および PUFA (FA 18 : 1、FA 20 : 4) の異性体組成を示している。図 3 B は、C 18 : 1 含有 PL の異性体組成を示している。図 3 C は、リゾ PE 20 : 1 の異性体組成を示している。図 3 D は、PC 1 : 0 / 16 : 1 の異性体組成を示している。図 3 E は、C 18 : 2 含有 PL の異性体組成を示している。図 3 F は、リゾ PE 22 : 5 の異性体組成を示している。図 3 G は、C 22 : 4 含有 PL の異性体組成を示している。図 3 H は、C 20 : 4 含有 PL の異性体組成を示している。図 3 I は、C 22 : 6 含有 PL の異性体組成を示している。異性体組成は、全異性体由来の診断用イオンの総強度に対する、1 つの異性体に対する診断用イオンの総強度のパーセンテージとして表される。

【図 3 C D】図 3 A ~ F は、ラット脳における不飽和脂質の相対定量を示している。図 3 A は、16 ~ 22 個の炭素の範囲の鎖長を有する、MUFA (FA 16 : 1、FA 18 : 1、FA 19 : 1、FA 20 : 1 および FA 22 : 1) および PUFA (FA 18 : 1、FA 20 : 4) の異性体組成を示している。図 3 B は、C 18 : 1 含有 PL の異性体組成を示している。図 3 C は、リゾ PE 20 : 1 の異性体組成を示している。図 3 D は、PC 1 : 0 / 16 : 1 の異性体組成を示している。図 3 E は、C 18 : 2 含有 PL の異性体組成を示している。図 3 F は、リゾ PE 22 : 5 の異性体組成を示している。図 3 G は、C 22 : 4 含有 PL の異性体組成を示している。図 3 H は、C 20 : 4 含有 PL の異性体組成を示している。図 3 I は、C 22 : 6 含有 PL の異性体組成を示している。異性体組成は、全異性体由来の診断用イオンの総強度に対する、1 つの異性体に対する診断用イオンの総強度のパーセンテージとして表される。

【図 3 E F G】図 3 A ~ F は、ラット脳における不飽和脂質の相対定量を示している。図 3 A は、16 ~ 22 個の炭素の範囲の鎖長を有する、MUFA (FA 16 : 1、FA 18 : 1、FA 19 : 1、FA 20 : 1 および FA 22 : 1) および PUFA (FA 18 : 1、FA 20 : 4) の異性体組成を示している。図 3 B は、C 18 : 1 含有 PL の異性体組成を示している。図 3 C は、リゾ PE 20 : 1 の異性体組成を示している。図 3 D は、PC 1 : 0 / 16 : 1 の異性体組成を示している。図 3 E は、C 18 : 2 含有 PL の異性体組成を示している。図 3 F は、リゾ PE 22 : 5 の異性体組成を示している。図 3 G は、C 22 : 4 含有 PL の異性体組成を示している。図 3 H は、C 20 : 4 含有 PL の異性体組成を示している。図 3 I は、C 22 : 6 含有 PL の異性体組成を示している。異性体組成は、全異性体由来の診断用イオンの総強度に対する、1 つの異性体に対する診断用イオンの総強度のパーセンテージとして表される。

【図 3 H I】図 3 A ~ F は、ラット脳における不飽和脂質の相対定量を示している。図 3 A は、16 ~ 22 個の炭素の範囲の鎖長を有する、MUFA (FA 16 : 1、FA 18 : 1、FA 19 : 1、FA 20 : 1 および FA 22 : 1) および PUFA (FA 18 : 1、FA 20 : 4) の異性体組成を示している。図 3 B は、C 18 : 1 含有 PL の異性体組成を示している。図 3 C は、リゾ PE 20 : 1 の異性体組成を示している。図 3 D は、PC 1 : 0 / 16 : 1 の異性体組成を示している。図 3 E は、C 18 : 2 含有 PL の異性体組成を示している。図 3 F は、リゾ PE 22 : 5 の異性体組成を示している。図 3 G は、C 22 : 4 含有 PL の異性体組成を示している。図 3 H は、C 20 : 4 含有 PL の異性体組成を示している。図 3 I は、C 22 : 6 含有 PL の異性体組成を示している。異性体組成は、全異性体由来の診断用イオンの総強度に対する、1 つの異性体に対する診断用イオン

の総強度のパーセンテージとして表される。

【0030】

【図4AB】図4A～Bは、ラット器官（脳、脂肪、腎臓、肝臓および筋肉を含む）およびマウス乳癌組織におけるC18：1含有PCおよびFA18：1異性体の異性体組成のばらつきを示している。図4Aは、ラット器官におけるPC16：0／18：1異性体の組成を示している。図4Bは、ラット器官におけるFA18：1異性体の組成を示している。

【図4CDEF】図4C～Fは、正常（WT）マウス乳房組織と癌性マウス乳房組織との間のFA18：1およびC18：1含有PC（PC16：0／18：1、PC18：0／18：1、PC18：1／18：1）の異性体組成の比較を示している。（図4C）FA18：1。（図4D）PC16：0／18：1。（図4E）PC18：0／18：1。（図4F）PC18：1／18：1。

【0031】

【図5A】図5A～Bは、プリカーサーイオン注入時間が、異なる逆P-B反応チャネルに対して無視できる影響を及ぼすことを示している（診断用イオンの生成に至るもの、およびアセトンのニュートラルロスに起因するm/z281に至るもの）。図5Aは、イオン注入時間（10～200ミリ秒）に対する、プリカーサーイオン（m/z339）、58Daニュートラルロスに起因するイオン（m/z281）および診断用イオン（m/z171／197）の絶対強度を示している。図5bは、注入時間（10～200ミリ秒）の関数としての、ニュートラルロスフラグメントおよび診断用イオンの相対強度を示している。診断用イオン（m/z171および197）およびニュートラルロスフラグメント（m/z281）の相対量は、10ミリ秒から200ミリ秒まで20倍の増加を経たイオン注入時間とは無関係であった。

【図5B】図5A～Bは、プリカーサーイオン注入時間が、異なる逆P-B反応チャネルに対して無視できる影響を及ぼすことを示している（診断用イオンの生成に至るもの、およびアセトンのニュートラルロスに起因するm/z281に至るもの）。図5Aは、イオン注入時間（10～200ミリ秒）に対する、プリカーサーイオン（m/z339）、58Daニュートラルロスに起因するイオン（m/z281）および診断用イオン（m/z171／197）の絶対強度を示している。図5bは、注入時間（10～200ミリ秒）の関数としての、ニュートラルロスフラグメントおよび診断用イオンの相対強度を示している。診断用イオン（m/z171および197）およびニュートラルロスフラグメント（m/z281）の相対量は、10ミリ秒から200ミリ秒まで20倍の増加を経たイオン注入時間とは無関係であった。

【0032】

【図6】図6は、254nmのUV照射下でアセトンを用いたPC18：1／18：1（2つのC=C異性体の混合物）の間のP-B反応の動態を示している。速い反応速度が観察された：0.4分以内に反応が安定になった。その後、各異性体に対する診断用イオン間の比は一定になり、定量分析の基礎を築く（時点1、2および3における3つのタンデムスペクトルを参照のこと）。

【0033】

【図7AB】図7A～Dは、オレイン酸／cis-パクセン酸混合溶液（種々のモル比）のP-B反応生成物のCID質量スペクトルである。

【図7C】図7A～Dは、オレイン酸／cis-パクセン酸混合溶液（種々のモル比）のP-B反応生成物のCID質量スペクトルである。

【図7D】図7A～Dは、オレイン酸／cis-パクセン酸混合溶液（種々のモル比）のP-B反応生成物のCID質量スペクトルである。

【0034】

【図8A】図8A～Cは、脂質C=C異性体の絶対定量を可能にする3つの方法を示している。原理を実証する一例としてFA18：1異性体を使用した。IS：内部標準。

【図8B】図8A～Cは、脂質C=C異性体の絶対定量を可能にする3つの方法を示して

いる。原理を実証する一例としてFA18:1異性体を使用した。IS:内部標準。

【図8C】図8A~Cは、脂質C=C異性体の絶対定量を可能にする3つの方法を示している。原理を実証する一例としてFA18:1異性体を使用した。IS:内部標準。

【0035】

【図9A】図9A~Bは、ポジティブおよびネガティブモードでのCIDによるPLの相対定量を示している(PC18:0/18:1およびリゾPE18:1を例として使用)。図9Aは、PC18:0/18:1を示している:インタクトなPCのCIDは、 m/z 184.1のシグニチャイオンを生成するが、C=Cの位置情報を伴わない。P-B反応およびタンデムMSの後、2対の診断用イオンが生成された(m/z 678.5/704.6および706.6/732.6)ことから、PC18:0/18:1 n_9 およびPC18:0/18:1 n_{11} の存在が示唆された。図9Bは、リゾPEの場合、アシル鎖情報(C18:1、 m/z 281.3)も、脱プロトン化イオンのCIDによって取得できることを示している。興味深いことに、P-B反応の後、P-B反応生成物のCIDは、誘導体化された(*derivatized*)脂肪酸アシル(m/z 339.3)を診断用イオンなしに放出する。C=Cの位置情報を取得するために、別の段階のフラグメンテーションを、 m/z 339.3に適用する必要がある、情報価値のある診断用イオンを生成する。実際に、MS3-CIDの後、2対の診断用イオン(m/z 171.0/197.0および199.0/225.1)が観察されたことから、リゾPE18:1が、リゾPE18:1 n_9 およびリゾPE18:1 n_{11} の混合物として存在することが示唆される。使用されたPC18:0/18:1およびリゾPE18:1は、それぞれラット脳および腎臓に由来した。

10

20

【図9B】図9A~Bは、ポジティブおよびネガティブモードでのCIDによるPLの相対定量を示している(PC18:0/18:1およびリゾPE18:1を例として使用)。図9Aは、PC18:0/18:1を示している:インタクトなPCのCIDは、 m/z 184.1のシグニチャイオンを生成するが、C=Cの位置情報を伴わない。P-B反応およびタンデムMSの後、2対の診断用イオンが生成された(m/z 678.5/704.6および706.6/732.6)ことから、PC18:0/18:1 n_9 およびPC18:0/18:1 n_{11} の存在が示唆された。図9Bは、リゾPEの場合、アシル鎖情報(C18:1、 m/z 281.3)も、脱プロトン化イオンのCIDによって取得できることを示している。興味深いことに、P-B反応の後、P-B反応生成物のCIDは、誘導体化された(*derivatized*)脂肪酸アシル(m/z 339.3)を診断用イオンなしに放出する。C=Cの位置情報を取得するために、別の段階のフラグメンテーションを、 m/z 339.3に適用する必要がある、情報価値のある診断用イオンを生成する。実際に、MS3-CIDの後、2対の診断用イオン(m/z 171.0/197.0および199.0/225.1)が観察されたことから、リゾPE18:1が、リゾPE18:1 n_9 およびリゾPE18:1 n_{11} の混合物として存在することが示唆される。使用されたPC18:0/18:1およびリゾPE18:1は、それぞれラット脳および腎臓に由来した。

30

【0036】

【図10】図10は、ラット脂肪組織におけるFA18:2のP-B反応生成物のMS2イオントラップCID質量スペクトルを示している。 m/z 171.0/197.1および211.0/237.1の2対の診断用イオンが検出された。その2対の間の40Daの質量差は、FA18:2における2つのC=Cがメチレンによって分断されていることを示唆する。

40

【0037】

【図11A】図11A~Dは、ラット腎臓におけるFA20:4の構造の特徴付けを示している。図11Aは、1%(wt)LiClが加えられたラット腎臓FA抽出物の+ナノESI質量スペクトルを示している。図11Bは、同じサンプルのUV照射後の+ナノESI質量スペクトルを示している。図11Cは、リチウム化されたFA20:4のP-B反応生成物(m/z 311.3)のフラグメンテーションが、アラキドン酸(*archi*

50

donic acid) (FA20:4 n6) の4つのC=Cに対応する4対の診断用イオン (m/z 123/149、163/189、203/229、243/269、青色) を生成することを示している。図11Dは、20:4 n3を同じFA抽出物サンプルに加えたとき、別の異なる診断用イオンのセットが m/z 165/191、205/231、245/271および285/311に出現することを示しており、これらは、FA20:4異性体の定量のために使用され得る。図11Eは、 Ω -6アラキドン酸および Ω -3アラキドン酸の診断用イオンを示している。

【図11B】図11A～Dは、ラット腎臓におけるFA20:4の構造の特徴付けを示している。図11Aは、1% (wt) LiClが加えられたラット腎臓FA抽出物のナノESI質量スペクトルを示している。図11Bは、同じサンプルのUV照射後のナノESI質量スペクトルを示している。図11Cは、リチウム化されたFA20:4のP-B反応生成物 (m/z 311.3) のフラグメンテーションが、アラキドン酸 (archidonic acid) (FA20:4 n6) の4つのC=Cに対応する4対の診断用イオン (m/z 123/149、163/189、203/229、243/269、青色) を生成することを示している。図11Dは、20:4 n3を同じFA抽出物サンプルに加えたとき、別の異なる診断用イオンのセットが m/z 165/191、205/231、245/271および285/311に出現することを示しており、これらは、FA20:4異性体の定量のために使用され得る。図11Eは、 Ω -6アラキドン酸および Ω -3アラキドン酸の診断用イオンを示している。

【図11C】図11A～Dは、ラット腎臓におけるFA20:4の構造の特徴付けを示している。図11Aは、1% (wt) LiClが加えられたラット腎臓FA抽出物のナノESI質量スペクトルを示している。図11Bは、同じサンプルのUV照射後のナノESI質量スペクトルを示している。図11Cは、リチウム化されたFA20:4のP-B反応生成物 (m/z 311.3) のフラグメンテーションが、アラキドン酸 (archidonic acid) (FA20:4 n6) の4つのC=Cに対応する4対の診断用イオン (m/z 123/149、163/189、203/229、243/269、青色) を生成することを示している。図11Dは、20:4 n3を同じFA抽出物サンプルに加えたとき、別の異なる診断用イオンのセットが m/z 165/191、205/231、245/271および285/311に出現することを示しており、これらは、FA20:4異性体の定量のために使用され得る。図11Eは、 Ω -6アラキドン酸および Ω -3アラキドン酸の診断用イオンを示している。

【図11D】図11A～Dは、ラット腎臓におけるFA20:4の構造の特徴付けを示している。図11Aは、1% (wt) LiClが加えられたラット腎臓FA抽出物のナノESI質量スペクトルを示している。図11Bは、同じサンプルのUV照射後のナノESI質量スペクトルを示している。図11Cは、リチウム化されたFA20:4のP-B反応生成物 (m/z 311.3) のフラグメンテーションが、アラキドン酸 (archidonic acid) (FA20:4 n6) の4つのC=Cに対応する4対の診断用イオン (m/z 123/149、163/189、203/229、243/269、青色) を生成することを示している。図11Dは、20:4 n3を同じFA抽出物サンプルに加えたとき、別の異なる診断用イオンのセットが m/z 165/191、205/231、245/271および285/311に出現することを示しており、これらは、FA20:4異性体の定量のために使用され得る。図11Eは、 Ω -6アラキドン酸および Ω -3アラキドン酸の診断用イオンを示している。

【図11E】図11A～Dは、ラット腎臓におけるFA20:4の構造の特徴付けを示している。図11Aは、1% (wt) LiClが加えられたラット腎臓FA抽出物のナノESI質量スペクトルを示している。図11Bは、同じサンプルのUV照射後のナノESI質量スペクトルを示している。図11Cは、リチウム化されたFA20:4のP-B反応生成物 (m/z 311.3) のフラグメンテーションが、アラキドン酸 (archidonic acid) (FA20:4 n6) の4つのC=Cに対応する4対の診断用イオン (m/z 123/149、163/189、203/229、243/269、青

10

20

30

40

50

色)を生成することを示している。図11Dは、 $20:4\ n3$ を同じFA抽出物サンプルに加えたとき、別の異なる診断用イオンのセットが $m/z\ 165/191$ 、 $205/231$ 、 $245/271$ および $285/311$ に出現することを示しており、これらは、FA $20:4$ 異性体の定量のために使用され得る。図11Eは、 $\Omega-6$ アラキドン酸および $\Omega-3$ アラキドン酸の診断用イオンを示している。

【0038】

【図12】図12は、 $cFA\ 20:4\ n6/cFA\ 20:4\ n3$ に対するIFA $20:4\ n6/IFA\ 20:4\ n3$ の直線関係を図示している検量線を示している。

【0039】

【図13】図13は、 $C18:2$ が、 $PC18:0/18:2$ において $C18:2\ n6$ の形態で純粋であることを示している。 $PC36:2$ のアシル鎖情報が、 $[PC36:2 + C1]^-$ のCIDを介して取得された。この場合、 $PC36:2$ (ラット肝臓由来)は、 $PC18:0/18:2$ と特徴付けられた。 $P-B$ 反応およびタンデムMSの後、 $C18:2$ における $C=C$ の位置を、 $9Z$ および $12Z$ に存在すると割り当てることができる。

10

【0040】

【図14A】図14A~Bは、 $PE16:0/20:4$ における $C20:4$ 脂肪酸アシルが、 $C20:4\ n6$ の形態で純粋であることを示している。図14Cは、 $PC16:0/20:4\ n6$ に対する診断用イオンの化学構造を示している。

【図14B】図14A~Bは、 $PE16:0/20:4$ における $C20:4$ 脂肪酸アシルが、 $C20:4\ n6$ の形態で純粋であることを示している。図14Cは、 $PC16:0/20:4\ n6$ に対する診断用イオンの化学構造を示している。

20

【図14C】図14A~Bは、 $PE16:0/20:4$ における $C20:4$ 脂肪酸アシルが、 $C20:4\ n6$ の形態で純粋であることを示している。図14Cは、 $PC16:0/20:4\ n6$ に対する診断用イオンの化学構造を示している。

【0041】

【図15】図15は、 $PC16:0/22:6$ 内の $C22:6$ 脂肪酸アシルが $C22:6\ n3$ の形態で純粋であることを示している。

【0042】

【図16】図16は、ラット組織におけるオレイン酸および cis -パクセン酸に対する生合成経路を示している。

30

【0043】

【図17A】図17A~Dは、ラット組織由来の複雑な脂質抽出物サンプルの代表的なPISおよびNLS質量スペクトルを示している。

【図17B】図17A~Dは、ラット組織由来の複雑な脂質抽出物サンプルの代表的なPISおよびNLS質量スペクトルを示している。

【図17C】図17A~Dは、ラット組織由来の複雑な脂質抽出物サンプルの代表的なPISおよびNLS質量スペクトルを示している。

【図17D】図17A~Dは、ラット組織由来の複雑な脂質抽出物サンプルの代表的なPISおよびNLS質量スペクトルを示している。

40

【0044】

【図18A】図18A~Fは、 $C16:0$ 、 $C18:1$ 、 $C18:0$ 、 $C20:4$ 、 $C22:6$ または $C22:4$ を含む脂質の集団が示されたPIS質量スペクトルを示している。

【図18B】図18A~Fは、 $C16:0$ 、 $C18:1$ 、 $C18:0$ 、 $C20:4$ 、 $C22:6$ または $C22:4$ を含む脂質の集団が示されたPIS質量スペクトルを示している。

【図18C】図18A~Fは、 $C16:0$ 、 $C18:1$ 、 $C18:0$ 、 $C20:4$ 、 $C22:6$ または $C22:4$ を含む脂質の集団が示されたPIS質量スペクトルを示している。

50

【図18D】図18A～Fは、C16:0、C18:1、C18:0、C20:4、C22:6またはC22:4を含む脂質の集団が示されたPIS質量スペクトルを示している。

【図18E】図18A～Fは、C16:0、C18:1、C18:0、C20:4、C22:6またはC22:4を含む脂質の集団が示されたPIS質量スペクトルを示している。

【図18F】図18A～Fは、C16:0、C18:1、C18:0、C20:4、C22:6またはC22:4を含む脂質の集団が示されたPIS質量スペクトルを示している。

【0045】

10

【図19】図19は、ラット脳において同定されたPLおよびそれらのC=C異性体の要約を提供している円グラフのセットである。それらのグラフは、同定されたリン脂質の数およびタイプの本方法（左）と文献報告（右）との比較を示している。

【0046】

【図20】図20は、ラット腎臓、肝臓および筋肉におけるC18:1含有PLの異性体組成を示している。

【0047】

【図21】図21は、P-B反応の前（上）および後（下）のラット脳由来のFA抽出物サンプルのナノESI質量スペクトルを示している。

【0048】

20

【図22】図22は、FA18:1のP-B反応生成物（ m/z 339.3）のタンデムMSによるFA18:1異性体の相対定量を示している（ラット脳、肝臓、筋肉、脂肪および腎臓）。

【0049】

【図23AB】図23A～Dは、正常マウス乳房組織（WT）の結果と比べて、マウス乳癌組織においてFA18:1 $n-7$ およびC18:1 $n-7$ 含有PCの一貫した増加が観察されたことを示している。正常組織（各パネルの左）および癌性組織（各パネルの右）由来の、（図23A）FA18:1、（図23B）PC34:1、（図23C）PC36:1および（図23D）PC36:2のP-B反応生成物のCID質量スペクトル。（図23D）では、PC18:0/18:2の相対量の減少も同様に、明らかに観察された。PC18:0/18:2の同定をもたらす診断用イオンは、 m/z 678.5/704.5および718.5/744.6であった。

30

【図23CD】図23A～Dは、正常マウス乳房組織（WT）の結果と比べて、マウス乳癌組織においてFA18:1 $n-7$ およびC18:1 $n-7$ 含有PCの一貫した増加が観察されたことを示している。正常組織（各パネルの左）および癌性組織（各パネルの右）由来の、（図23A）FA18:1、（図23B）PC34:1、（図23C）PC36:1および（図23D）PC36:2のP-B反応生成物のCID質量スペクトル。（図23D）では、PC18:0/18:2の相対量の減少も同様に、明らかに観察された。PC18:0/18:2の同定をもたらす診断用イオンは、 m/z 678.5/704.5および718.5/744.6であった。

40

【0050】

【図24】図24は、光化学的生成物の形成の速度を調べるために使用された不連続なUV曝露反応の構成の描写を示している。

【0051】

【図25AB】図25A～Eは、7:3アセトン:H₂O 1%酢酸中のN₂をバージされた5 μ M PC16:0_18:1 ($n-9Z$)を含む溶液へのUV曝露を描写している質量スペクトルおよび時系列グラフを示している。図25Aは、UV曝露前の m/z 760.6のプリカーサーシグナルを示しているMS1スペクトルを示している。図25Bは、6秒間の累積UV曝露の定常状態反応条件（N₂バージ溶液）を示しており、ここで、 m/z 818.6がP-B反応生成物である。図25Cは、 m/z 650.6および6

50

76. 6のC=C診断用イオンを示す m/z 818. 6のビーム型CIDを示している。図25Dは、6秒間の定常状態UV曝露の前、その間およびその後の m/z 760. 6および818. 6のXICクロマトグラムを示している。図25Eは、4. 5 μ L/分の流速でUV累積曝露時間を延長したときのプリカーサー (m/z 760. 6) およびP-B反応生成物 (m/z 818. 6) イオンの強度を示している。

【図25CDE】図25A~Eは、7:3アセトン:H₂O 1%酢酸中のN₂をパージされた5 μ M PC16:0_18:1 (n-9Z)を含む溶液へのUV曝露を描写している質量スペクトルおよび時系列グラフを示している。図25Aは、UV曝露前の m/z 760. 6のプリカーサーシグナルを示しているMS1スペクトルを示している。図25Bは、6秒間の累積UV曝露の定常状態反応条件 (N₂ パージ溶液) を示しており、こ
10
ここで、 m/z 818. 6がP-B反応生成物である。図25Cは、 m/z 650. 6および676. 6のC=C診断用イオンを示す m/z 818. 6のビーム型CIDを示している。図25Dは、6秒間の定常状態UV曝露の前、その間およびその後の m/z 760. 6および818. 6のXICクロマトグラムを示している。図25Eは、4. 5 μ L/分の流速でUV累積曝露時間を延長したときのプリカーサー (m/z 760. 6) およびP-B反応生成物 (m/z 818. 6) イオンの強度を示している。

【0052】

【図26ABC】図26A~Dは、図24の実験装置を用いて、7:3アセトン:H₂O 1%NH₄OH中のN₂をパージされた5 μ Mオレイン酸 (n-9Z) に適用されたオンラインP-B反応を示している。図26Aは、UV前のオレイン酸のMS1スペクトル
20
(m/z 281. 2) を示している。図26Bは、 m/z 339. 3にP-B生成物を示している、6秒間のUV曝露の場合のMS1反応スペクトルを示している。図26Cは、 m/z 339. 3のビーム型CIDが m/z 170. 1および197. 1の診断用イオンに加えて一不飽和オレイン酸イオン (m/z 281. 2) を示していることを示している。図26Dは、累積UV曝露の関数として m/z 281. 2および339. 3の相対強度を描写している時系列グラフを示している。

【図26D】図26A~Dは、図24の実験装置を用いて、7:3アセトン:H₂O 1%NH₄OH中のN₂をパージされた5 μ Mオレイン酸 (n-9Z) に適用されたオンラインP-B反応を示している。図26Aは、UV前のオレイン酸のMS1スペクトル (m/z 281. 2) を示している。図26Bは、 m/z 339. 3にP-B生成物を示して
30
いる、6秒間のUV曝露の場合のMS1反応スペクトルを示している。図26Cは、 m/z 339. 3のビーム型CIDが m/z 170. 1および197. 1の診断用イオンに加えて一不飽和オレイン酸イオン (m/z 281. 2) を示していることを示している。図26Dは、累積UV曝露の関数として m/z 281. 2および339. 3の相対強度を描写している時系列グラフを示している。

【0053】

【図27A】図27Aは、流速を徐々に高めた5秒間のUV曝露を用いたときの、7:3アセトン:H₂O 1%酢酸中のN₂をパージされた5 μ M PC16:0_18:1 (n-9Z) に対する、プリカーサーとP-B生成物との強度比を示している。図27Bは、
40
70:15:15アセトン:H₂O:溶媒1%酢酸から構成された5 μ M PC16:0_18:1 (n-9Z) 溶液に対する6秒間のUV曝露後のP-B収率を示しており、ここで、溶媒が、棒グラフのx軸に示されている。最後のカラムのデータでは酢酸の代わりにギ酸アンモニウム (AF) (2 mM) を使用した。

【図27B】図27Aは、流速を徐々に高めた5秒間のUV曝露を用いたときの、7:3アセトン:H₂O 1%酢酸中のN₂をパージされた5 μ M PC16:0_18:1 (n-9Z) に対する、プリカーサーとP-B生成物との強度比を示している。図27Bは、
50
70:15:15アセトン:H₂O:溶媒1%酢酸から構成された5 μ M PC16:0_18:1 (n-9Z) 溶液に対する6秒間のUV曝露後のP-B収率を示しており、ここで、溶媒が、棒グラフのx軸に示されている。最後のカラムのデータでは酢酸の代わりにギ酸アンモニウム (AF) (2 mM) を使用した。

【0054】

【図28A】図28A～Eは、負イオン化モードで分析された、商業的に購入した酵母極性脂質抽出物への直接注入P-B反応の適用を示している。図28Aは、UV前のMS1スペクトルを示している。図28Bは、UVの間のMS1反応スペクトルを示している（P-B生成物は赤色で示されている）。図28Cは、異性体PE16:0_18:1 (n-9) およびPE18:0_16:1 (n-7) に対するP-B生成物 (m/z 774.5) のMS2ビーム型CIDを示している。図28Dは、図28Bのm/z 339.2のMS3イオントラップCIDを示している。図28Eは、図28Bのm/z 311.2のMS³イオントラップCIDを示している。

【図28BC】図28A～Eは、負イオン化モードで分析された、商業的に購入した酵母極性脂質抽出物への直接注入P-B反応の適用を示している。図28Aは、UV前のMS1スペクトルを示している。図28Bは、UVの間のMS1反応スペクトルを示している（P-B生成物は赤色で示されている）。図28Cは、異性体PE16:0_18:1 (n-9) およびPE18:0_16:1 (n-7) に対するP-B生成物 (m/z 774.5) のMS2ビーム型CIDを示している。図28Dは、図28Bのm/z 339.2のMS3イオントラップCIDを示している。図28Eは、図28Bのm/z 311.2のMS³イオントラップCIDを示している。

【図28DE】図28A～Eは、負イオン化モードで分析された、商業的に購入した酵母極性脂質抽出物への直接注入P-B反応の適用を示している。図28Aは、UV前のMS1スペクトルを示している。図28Bは、UVの間のMS1反応スペクトルを示している（P-B生成物は赤色で示されている）。図28Cは、異性体PE16:0_18:1 (n-9) およびPE18:0_16:1 (n-7) に対するP-B生成物 (m/z 774.5) のMS2ビーム型CIDを示している。図28Dは、図28Bのm/z 339.2のMS3イオントラップCIDを示している。図28Eは、図28Bのm/z 311.2のMS³イオントラップCIDを示している。

【0055】

【図29A】図29A～Bは、抽出スプレーとP-B反応とを組み合わせ、組織中の脂質のC=C結合の位置を直接特定することの模式的な全体像を示している。図29Aは、ステンレス鋼プローブ（外径200 μm）による組織サンプリングおよび脂質のキャピラリー内抽出に続く、ナノESIおよびUV光（λ=254 nm）によるMS分析を示している。図29Bは、アセトンと脂肪酸との間のバターノ・ビューチ（P-B）反応を、二重結合の位置を特定するための逆P-B反応において生成され得るフィンガープリントフラグメントイオンと関連して、示している。

【図29B】図29A～Bは、抽出スプレーとP-B反応とを組み合わせ、組織中の脂質のC=C結合の位置を直接特定することの模式的な全体像を示している。図29Aは、ステンレス鋼プローブ（外径200 μm）による組織サンプリングおよび脂質のキャピラリー内抽出に続く、ナノESIおよびUV光（λ=254 nm）によるMS分析を示している。図29Bは、アセトンと脂肪酸との間のバターノ・ビューチ（P-B）反応を、二重結合の位置を特定するための逆P-B反応において生成され得るフィンガープリントフラグメントイオンと関連して、示している。

【0056】

【図30A】図30A～Iは、オンラインP-B反応と抽出スプレー質量分析との組み合わせによる直接脂質分析を示している。図30A～Cは、ナノESIのUV照射によって誘起されるP-B反応の前および後の、抽出スプレーによる、ラット脳、腎臓および肝臓からサンプリングされた脂質の質量スペクトルを示している。図30Dは、頭部基およびアシル鎖長を特定するためのm/z 778.5のPS18:0-18:1のMS2CIDを示している。図30E～Fは、化学的ノイズを差し引く（deduction）ための、P-B反応の前の、不飽和脂質のP-B反応生成物と同じm/z値のバックグラウンドピークのMS2CIDを示している（FA18:1、m/z 339.3；PS18:0-18:1、m/z 846.5）。図30G～Hは、P-B反応後の不飽和脂質のP-B

反応生成物のMS2CIDを示している。腎臓におけるFA18:1の二重結合は、新しく生成されたフィンガープリントピーク(n-9に対してm/z171.0および197.0;n-7に対してm/z199.0および225.1)に従って、n-9およびn-7と直接特定できる。PS18:0-18:1の場合、不飽和アシル鎖18:1のP-B反応生成物が形成され、m/z339.3のスペクトルとして現れた。図30Iは、PS18:0-18:1のP-B反応生成物からのm/z339.3のMS3CIDを示しており、n-9およびn-7における二重結合の位置を示唆している。

【図30B】図30A~Iは、オンラインP-B反応と抽出スプレー質量分析との組み合わせによる直接脂質分析を示している。図30A~Cは、一ナノESIのUV照射によって誘起されるP-B反応の前および後の、抽出スプレーによる、ラット脳、腎臓および肝臓からサンプリングされた脂質の質量スペクトルを示している。図30Dは、頭部基およびアシル鎖長を特定するためのm/z778.5のPS18:0-18:1のMS2CIDを示している。図30E~Fは、化学的ノイズを差し引く(deduction)ための、P-B反応の前の、不飽和脂質のP-B反応生成物と同じm/z値のバックグラウンドピークのMS2CIDを示している(FA18:1、m/z339.3;PS18:0-18:1、m/z846.5)。図30G~Hは、P-B反応後の不飽和脂質のP-B反応生成物のMS2CIDを示している。腎臓におけるFA18:1の二重結合は、新しく生成されたフィンガープリントピーク(n-9に対してm/z171.0および197.0;n-7に対してm/z199.0および225.1)に従って、n-9およびn-7と直接特定できる。PS18:0-18:1の場合、不飽和アシル鎖18:1のP-B反応生成物が形成され、m/z339.3のスペクトルとして現れた。図30Iは、PS18:0-18:1のP-B反応生成物からのm/z339.3のMS3CIDを示しており、n-9およびn-7における二重結合の位置を示唆している。

【図30C】図30A~Iは、オンラインP-B反応と抽出スプレー質量分析との組み合わせによる直接脂質分析を示している。図30A~Cは、一ナノESIのUV照射によって誘起されるP-B反応の前および後の、抽出スプレーによる、ラット脳、腎臓および肝臓からサンプリングされた脂質の質量スペクトルを示している。図30Dは、頭部基およびアシル鎖長を特定するためのm/z778.5のPS18:0-18:1のMS2CIDを示している。図30E~Fは、化学的ノイズを差し引く(deduction)ための、P-B反応の前の、不飽和脂質のP-B反応生成物と同じm/z値のバックグラウンドピークのMS2CIDを示している(FA18:1、m/z339.3;PS18:0-18:1、m/z846.5)。図30G~Hは、P-B反応後の不飽和脂質のP-B反応生成物のMS2CIDを示している。腎臓におけるFA18:1の二重結合は、新しく生成されたフィンガープリントピーク(n-9に対してm/z171.0および197.0;n-7に対してm/z199.0および225.1)に従って、n-9およびn-7と直接特定できる。PS18:0-18:1の場合、不飽和アシル鎖18:1のP-B反応生成物が形成され、m/z339.3のスペクトルとして現れた。図30Iは、PS18:0-18:1のP-B反応生成物からのm/z339.3のMS3CIDを示しており、n-9およびn-7における二重結合の位置を示唆している。

【図30DE】図30A~Iは、オンラインP-B反応と抽出スプレー質量分析との組み合わせによる直接脂質分析を示している。図30A~Cは、一ナノESIのUV照射によって誘起されるP-B反応の前および後の、抽出スプレーによる、ラット脳、腎臓および肝臓からサンプリングされた脂質の質量スペクトルを示している。図30Dは、頭部基およびアシル鎖長を特定するためのm/z778.5のPS18:0-18:1のMS2CIDを示している。図30E~Fは、化学的ノイズを差し引く(deduction)ための、P-B反応の前の、不飽和脂質のP-B反応生成物と同じm/z値のバックグラウンドピークのMS2CIDを示している(FA18:1、m/z339.3;PS18:0-18:1、m/z846.5)。図30G~Hは、P-B反応後の不飽和脂質のP-B反応生成物のMS2CIDを示している。腎臓におけるFA18:1の二重結合は、新しく生成されたフィンガープリントピーク(n-9に対してm/z171.0および19

7. 0 ; n - 7 に対して m / z 1 9 9 . 0 および 2 2 5 . 1) に従って、n - 9 および n - 7 と直接特定できる。P S 1 8 : 0 - 1 8 : 1 の場合、不飽和アシル鎖 1 8 : 1 の P - B 反応生成物が形成され、m / z 3 3 9 . 3 のスペクトルとして現れた。図 3 0 I は、P S 1 8 : 0 - 1 8 : 1 の P - B 反応生成物からの m / z 3 3 9 . 3 の M S 3 C I D を示しており、n - 9 および n - 7 における二重結合の位置を示唆している。

【図 3 0 F G】図 3 0 A ~ I は、オンライン P - B 反応と抽出スプレー質量分析との組み合わせによる直接脂質分析を示している。図 3 0 A ~ C は、一ナノ E S I の U V 照射によって誘起される P - B 反応の前および後の、抽出スプレーによる、ラット脳、腎臓および肝臓からサンプリングされた脂質の質量スペクトルを示している。図 3 0 D は、頭部基およびアシル鎖長を特定するための m / z 7 7 8 . 5 の P S 1 8 : 0 - 1 8 : 1 の M S 2 C I D を示している。図 3 0 E ~ F は、化学的ノイズを差し引く (d e d u c t i o n) ための、P - B 反応の前の、不飽和脂質の P - B 反応生成物と同じ m / z 値のバックグラウンドピークの M S 2 C I D を示している (F A 1 8 : 1 、 m / z 3 3 9 . 3 ; P S 1 8 : 0 - 1 8 : 1 、 m / z 8 4 6 . 5) 。図 3 0 G ~ H は、P - B 反応後の不飽和脂質の P - B 反応生成物の M S 2 C I D を示している。腎臓における F A 1 8 : 1 の二重結合は、新しく生成されたフィンガープリントピーク (n - 9 に対して m / z 1 7 1 . 0 および 1 9 7 . 0 ; n - 7 に対して m / z 1 9 9 . 0 および 2 2 5 . 1) に従って、n - 9 および n - 7 と直接特定できる。P S 1 8 : 0 - 1 8 : 1 の場合、不飽和アシル鎖 1 8 : 1 の P - B 反応生成物が形成され、m / z 3 3 9 . 3 のスペクトルとして現れた。図 3 0 I は、P S 1 8 : 0 - 1 8 : 1 の P - B 反応生成物からの m / z 3 3 9 . 3 の M S 3 C I D を示しており、n - 9 および n - 7 における二重結合の位置を示唆している。

【図 3 0 H】図 3 0 A ~ I は、オンライン P - B 反応と抽出スプレー質量分析との組み合わせによる直接脂質分析を示している。図 3 0 A ~ C は、一ナノ E S I の U V 照射によって誘起される P - B 反応の前および後の、抽出スプレーによる、ラット脳、腎臓および肝臓からサンプリングされた脂質の質量スペクトルを示している。図 3 0 D は、頭部基およびアシル鎖長を特定するための m / z 7 7 8 . 5 の P S 1 8 : 0 - 1 8 : 1 の M S 2 C I D を示している。図 3 0 E ~ F は、化学的ノイズを差し引く (d e d u c t i o n) ための、P - B 反応の前の、不飽和脂質の P - B 反応生成物と同じ m / z 値のバックグラウンドピークの M S 2 C I D を示している (F A 1 8 : 1 、 m / z 3 3 9 . 3 ; P S 1 8 : 0 - 1 8 : 1 、 m / z 8 4 6 . 5) 。図 3 0 G ~ H は、P - B 反応後の不飽和脂質の P - B 反応生成物の M S 2 C I D を示している。腎臓における F A 1 8 : 1 の二重結合は、新しく生成されたフィンガープリントピーク (n - 9 に対して m / z 1 7 1 . 0 および 1 9 7 . 0 ; n - 7 に対して m / z 1 9 9 . 0 および 2 2 5 . 1) に従って、n - 9 および n - 7 と直接特定できる。P S 1 8 : 0 - 1 8 : 1 の場合、不飽和アシル鎖 1 8 : 1 の P - B 反応生成物が形成され、m / z 3 3 9 . 3 のスペクトルとして現れた。図 3 0 I は、P S 1 8 : 0 - 1 8 : 1 の P - B 反応生成物からの m / z 3 3 9 . 3 の M S 3 C I D を示しており、n - 9 および n - 7 における二重結合の位置を示唆している。

【図 3 0 I】図 3 0 A ~ I は、オンライン P - B 反応と抽出スプレー質量分析との組み合わせによる直接脂質分析を示している。図 3 0 A ~ C は、一ナノ E S I の U V 照射によって誘起される P - B 反応の前および後の、抽出スプレーによる、ラット脳、腎臓および肝臓からサンプリングされた脂質の質量スペクトルを示している。図 3 0 D は、頭部基およびアシル鎖長を特定するための m / z 7 7 8 . 5 の P S 1 8 : 0 - 1 8 : 1 の M S 2 C I D を示している。図 3 0 E ~ F は、化学的ノイズを差し引く (d e d u c t i o n) ための、P - B 反応の前の、不飽和脂質の P - B 反応生成物と同じ m / z 値のバックグラウンドピークの M S 2 C I D を示している (F A 1 8 : 1 、 m / z 3 3 9 . 3 ; P S 1 8 : 0 - 1 8 : 1 、 m / z 8 4 6 . 5) 。図 3 0 G ~ H は、P - B 反応後の不飽和脂質の P - B 反応生成物の M S 2 C I D を示している。腎臓における F A 1 8 : 1 の二重結合は、新しく生成されたフィンガープリントピーク (n - 9 に対して m / z 1 7 1 . 0 および 1 9 7 . 0 ; n - 7 に対して m / z 1 9 9 . 0 および 2 2 5 . 1) に従って、n - 9 および n - 7 と直接特定できる。P S 1 8 : 0 - 1 8 : 1 の場合、不飽和アシル鎖 1 8 : 1 の P - B

反応生成物が形成され、 m/z 339. 3のスペクトルとして現れた。図30Iは、PS 18:0-18:1のP-B反応生成物からの m/z 339. 3のMS3CIDを示しており、 $n-9$ および $n-7$ における二重結合の位置を示唆している。

【0057】

【図31AB】図31A～Eは、オンラインP-B反応と抽出スプレー質量分析との組み合わせによる直接脂質分析を示している。UV照射によって誘起されるP-B反応の前（図31A）および後（図31B）の負イオンモードにおける抽出スプレーによるラット腎臓からサンプリングされた脂質の質量スペクトル。図31Cは、腎臓におけるFA 18:1の二重結合を決定するための m/z 339. 3のP-B反応生成物のMS2CIDを示している。図31Dは、頭部基およびアシル鎖長を特定するための m/z 778. 5のPS 18:0-18:1のMS2CIDを示している。図31Eは、PS 18:0-18:1のP-B反応生成物からの m/z 339. 4のMS3CIDを示している。

【図31C】図31A～Eは、オンラインP-B反応と抽出スプレー質量分析との組み合わせによる直接脂質分析を示している。UV照射によって誘起されるP-B反応の前（図31A）および後（図31B）の負イオンモードにおける抽出スプレーによるラット腎臓からサンプリングされた脂質の質量スペクトル。図31Cは、腎臓におけるFA 18:1の二重結合を決定するための m/z 339. 3のP-B反応生成物のMS2CIDを示している。図31Dは、頭部基およびアシル鎖長を特定するための m/z 778. 5のPS 18:0-18:1のMS2CIDを示している。図31Eは、PS 18:0-18:1のP-B反応生成物からの m/z 339. 4のMS3CIDを示している。

【図31D】図31A～Eは、オンラインP-B反応と抽出スプレー質量分析との組み合わせによる直接脂質分析を示している。UV照射によって誘起されるP-B反応の前（図31A）および後（図31B）の負イオンモードにおける抽出スプレーによるラット腎臓からサンプリングされた脂質の質量スペクトル。図31Cは、腎臓におけるFA 18:1の二重結合を決定するための m/z 339. 3のP-B反応生成物のMS2CIDを示している。図31Dは、頭部基およびアシル鎖長を特定するための m/z 778. 5のPS 18:0-18:1のMS2CIDを示している。図31Eは、PS 18:0-18:1のP-B反応生成物からの m/z 339. 4のMS3CIDを示している。

【図31E】図31A～Eは、オンラインP-B反応と抽出スプレー質量分析との組み合わせによる直接脂質分析を示している。UV照射によって誘起されるP-B反応の前（図31A）および後（図31B）の負イオンモードにおける抽出スプレーによるラット腎臓からサンプリングされた脂質の質量スペクトル。図31Cは、腎臓におけるFA 18:1の二重結合を決定するための m/z 339. 3のP-B反応生成物のMS2CIDを示している。図31Dは、頭部基およびアシル鎖長を特定するための m/z 778. 5のPS 18:0-18:1のMS2CIDを示している。図31Eは、PS 18:0-18:1のP-B反応生成物からの m/z 339. 4のMS3CIDを示している。

【0058】

【図32AB】図32A～Eは、脂質抽出のための溶媒の最適化を示している。70%アセトン+10%H₂O+20%X（X=（図32A）H₂O、（図32B）イソプロパノール（Isopropanol）（IPA）、（図32C）アセトニトリル（ACN））を含む配合において直接抽出された脂質のMSスペクトル。図32D～Eは、FA 18:0〔（M-H）⁻、 m/z 283. 3〕、FA 18:1〔（M-H）⁻、 m/z 281. 3〕およびPS 18:0-18:1〔（M-H）⁻、 m/z 788. 5〕のシグナル強度に対する溶媒の影響を示している。

【図32C】図32A～Eは、脂質抽出のための溶媒の最適化を示している。70%アセトン+10%H₂O+20%X（X=（図32A）H₂O、（図32B）イソプロパノール（Isopropanol）（IPA）、（図32C）アセトニトリル（ACN））を含む配合において直接抽出された脂質のMSスペクトル。図32D～Eは、FA 18:0〔（M-H）⁻、 m/z 283. 3〕、FA 18:1〔（M-H）⁻、 m/z 281. 3〕およびPS 18:0-18:1〔（M-H）⁻、 m/z 788. 5〕のシグナル強度に

対する溶媒の影響を示している。

【図 3 2 D E】図 3 2 A～E は、脂質抽出のための溶媒の最適化を示している。70% アセトン + 10% H₂O + 20% X (X = (図 3 2 A) H₂O、(図 3 2 B) イソプロパノール (Isopropanol) (IPA)、(図 3 2 C) アセトニトリル (ACN)) を含む配合において直接抽出された脂質の MS スペクトル。図 3 2 D～E は、FA 18 : 0 [(M-H)⁻、m/z 283. 3]、FA 18 : 1 [(M-H)⁻、m/z 281. 3] および PS 18 : 0 - 18 : 1 [(M-H)⁻、m/z 788. 5] のシグナル強度に対する溶媒の影響を示している。

【0059】

【図 3 3 A B】図 3 3 A～C は、脂質およびアセトンの P-B 反応のための溶媒の最適化を示している。図 3 3 A は、FA 18 : 1 [(M-H)⁻、m/z 281. 3、反応生成物イオン、m/z 339. 3] の反応時間に対する溶媒の影響を示している。図 3 3 B は、FA 18 : 1 および PS 18 : 0 - 18 : 1 [(M-H)⁻、m/z 788. 5、反応生成物イオン、m/z 339. 3] の反応収率に対する溶媒の影響を示している。図 3 3 C は、FA 18 : 1 および PS 18 : 0 - 18 : 1 [(M-H)⁻、m/z 788. 5、反応生成物イオン、m/z 339. 3] の反応収率に対する溶媒の影響を示している。

【図 3 3 C】図 3 3 A～C は、脂質およびアセトンの P-B 反応のための溶媒の最適化を示している。図 3 3 A は、FA 18 : 1 [(M-H)⁻、m/z 281. 3、反応生成物イオン、m/z 339. 3] の反応時間に対する溶媒の影響を示している。図 3 3 B は、FA 18 : 1 および PS 18 : 0 - 18 : 1 [(M-H)⁻、m/z 788. 5、反応生成物イオン、m/z 339. 3] の反応収率に対する溶媒の影響を示している。図 3 3 C は、FA 18 : 1 および PS 18 : 0 - 18 : 1 [(M-H)⁻、m/z 788. 5、反応生成物イオン、m/z 339. 3] の反応収率に対する溶媒の影響を示している。

【0060】

【図 3 4 A】図 3 4 A～B は、脂質およびアセトンの P-B 反応のためのランプ条件の最適化を示している。UV ランプ (λ = 254 nm) の予熱あり (図 3 4 A) またはなし (図 3 4 B) での FA 18 : 1 [(M-H)⁻、m/z 281. 3] およびその P-B 反応生成物イオン [(M+58-H)⁻、m/z 339. 3] の全イオン電流。

【図 3 4 B】図 3 4 A～B は、脂質およびアセトンの P-B 反応のためのランプ条件の最適化を示している。UV ランプ (λ = 254 nm) の予熱あり (図 3 4 A) またはなし (図 3 4 B) での FA 18 : 1 [(M-H)⁻、m/z 281. 3] およびその P-B 反応生成物イオン [(M+58-H)⁻、m/z 339. 3] の全イオン電流。

【0061】

【図 3 5 A】図 3 5 A～C は、分析された脂質のダイナミックレンジを示している。図 3 5 A は、全脂肪酸のうち、特定された脂肪酸のモルパーセントを示している。図 3 5 B は、全脂質のうち、特定されたリン脂質のモルパーセントを示している。図 3 5 C は、m/z 381. 3 の FA 21 : 1 の MS 2 C I D スペクトルを示しており、図 3 5 D は、二重結合の位置を決定するためのラット脳における m/z 339. 3 の PG 34 : 2 の MS 3 C I D スペクトルを示している。

【図 3 5 B】図 3 5 A～C は、分析された脂質のダイナミックレンジを示している。図 3 5 A は、全脂肪酸のうち、特定された脂肪酸のモルパーセントを示している。図 3 5 B は、全脂質のうち、特定されたリン脂質のモルパーセントを示している。図 3 5 C は、m/z 381. 3 の FA 21 : 1 の MS 2 C I D スペクトルを示しており、図 3 5 D は、二重結合の位置を決定するためのラット脳における m/z 339. 3 の PG 34 : 2 の MS 3 C I D スペクトルを示している。

【図 3 5 C D】図 3 5 A～C は、分析された脂質のダイナミックレンジを示している。図 3 5 A は、全脂肪酸のうち、特定された脂肪酸のモルパーセントを示している。図 3 5 B は、全脂質のうち、特定されたリン脂質のモルパーセントを示している。図 3 5 C は、m/z 381. 3 の FA 21 : 1 の MS 2 C I D スペクトルを示しており、図 3 5 D は、二重結合の位置を決定するためのラット脳における m/z 339. 3 の PG 34 : 2 の MS

10

20

30

40

50

3 C I D スペクトルを示している。

【0062】

【図36】図36は、下丘（左および右）、運動皮質（m o t e r c o r t e x）（左および右）、小脳および脳幹を含む、5つのラット脳の6つの領域におけるP A 1 8 : 1 - 1 8 : 1 の異性体比（n - 9 対 n - 7）（± S D、N = 5）を示している。

【0063】

【図37AB】図37A～Dは、負イオンモードでの反応抽出スプレー質量分析によるラット脳および腎臓における脂質の2D異性体比（± S D、N = 3）のイメージを示している。（図37A）インタクトなラット脳および（図37B）腎臓に分布するF A 1 8 : 1 の2D異性体比イメージ（n - 9 対 n - 7）。インタクトなラット脳に分布する（図37C）L P A 1 8 : 1（n - 9 対 n - 7）および（図37D）P A 1 8 : 1 - 1 8 : 1（n - 9 対 n - 7）の2D異性体比（± S D、n = 3）イメージ。

10

【図37CD】図37A～Dは、負イオンモードでの反応抽出スプレー質量分析によるラット脳および腎臓における脂質の2D異性体比（± S D、N = 3）のイメージを示している。（図37A）インタクトなラット脳および（図37B）腎臓に分布するF A 1 8 : 1 の2D異性体比イメージ（n - 9 対 n - 7）。インタクトなラット脳に分布する（図37C）L P A 1 8 : 1（n - 9 対 n - 7）および（図37D）P A 1 8 : 1 - 1 8 : 1（n - 9 対 n - 7）の2D異性体比（± S D、n = 3）イメージ。

【0064】

【図38AB】図38A～Dは、負イオンモードでの反応抽出スプレー質量分析によるラット脳における不飽和脂質の2次元異性体比イメージを示している。（図38A）背側のラット脳および（図38B）ラット腎臓切片の機能領域の模式図。図38Cは、ラット脳におけるP A 1 8 : 1 - 1 8 : 1 の2次元異性体比（± S D、N = 3～9）イメージを示している。図38Dは、50回のサンプリングの前および後のラット脳の写真のセットである。

20

【図38CD】図38A～Dは、負イオンモードでの反応抽出スプレー質量分析によるラット脳における不飽和脂質の2次元異性体比イメージを示している。（図38A）背側のラット脳および（図38B）ラット腎臓切片の機能領域の模式図。図38Cは、ラット脳におけるP A 1 8 : 1 - 1 8 : 1 の2次元異性体比（± S D、N = 3～9）イメージを示している。図38Dは、50回のサンプリングの前および後のラット脳の写真のセットである。

30

【0065】

【図39A】図39A～Dは、ラット脳の前頭前皮質および脳幹における脂肪酸およびリン脂質の不飽和を示している。

【図39BC】図39A～Dは、ラット脳の前頭前皮質および脳幹における脂肪酸およびリン脂質の不飽和を示している。

【図39D】図39A～Dは、ラット脳の前頭前皮質および脳幹における脂肪酸およびリン脂質の不飽和を示している。

【0066】

【図40】図40は、脂質の不飽和に対する凍結および解凍の影響を示している。新鮮なラット脳および-20℃で14日間凍結され、解凍された脳の6つの解剖領域（左および右の下丘、左および右の運動皮質、小脳ならびに脳幹を含む）におけるP A 1 8 : 1 - 1 8 : 1 の異性体比。

40

【0067】

【図41】図41は、P - B 反応が光化学反応であることを示している。

【0068】

【図42】図42は、小型質量分析計を用いて組織分析するために用いられる例示的な構成を示している。

【0069】

【図43AB】図43A～Eは、脂質プロファイリングの結果を示している。

50

【図 4 3 C D】図 4 3 A～E は、脂質プロファイリングの結果を示している。

【図 4 3 E F】図 4 3 A～E は、脂質プロファイリングの結果を示している。

【0 0 7 0】

【図 4 4】図 4 4 は、ホスホコリンの C I D を示している。

【0 0 7 1】

【図 4 5】図 4 5 は、標準的な化合物を用いときのオンライン P－B 反応を示している。

【0 0 7 2】

【図 4 6】図 4 6 は、ラット脳サンプルを用いたときのオンライン P－B 反応を示している。

【0 0 7 3】

10

【図 4 7 A】図 4 7 A は、C＝C を決定するための P B－M S / M S の構成および原理を示している。図 4 7 B は、1 % N H 4 O H が加えられた 1 : 1 アセトン : H 2 O 中の 1 0 μ M の F A 1 8 : 1 (9 Z) のナノ E S I を示している。図 4 7 C は、U V 光を点灯したときの P B 反応スペクトルを示している。図 4 7 D は、P B 生成物 (m / z 3 3 9 . 3) の M S 2 C I D が、m / z 1 7 1 および 1 9 7 に C＝C 診断用イオンの形成をもたらすことを示している。

【図 4 7 B C】図 4 7 A は、C＝C を決定するための P B－M S / M S の構成および原理を示している。図 4 7 B は、1 % N H 4 O H が加えられた 1 : 1 アセトン : H 2 O 中の 1 0 μ M の F A 1 8 : 1 (9 Z) のナノ E S I を示している。図 4 7 C は、U V 光を点灯したときの P B 反応スペクトルを示している。図 4 7 D は、P B 生成物 (m / z 3 3 9 . 3) の M S 2 C I D が、m / z 1 7 1 および 1 9 7 に C＝C 診断用イオンの形成をもたらすことを示している。

20

【図 4 7 D】図 4 7 A は、C＝C を決定するための P B－M S / M S の構成および原理を示している。図 4 7 B は、1 % N H 4 O H が加えられた 1 : 1 アセトン : H 2 O 中の 1 0 μ M の F A 1 8 : 1 (9 Z) のナノ E S I を示している。図 4 7 C は、U V 光を点灯したときの P B 反応スペクトルを示している。図 4 7 D は、P B 生成物 (m / z 3 3 9 . 3) の M S 2 C I D が、m / z 1 7 1 および 1 9 7 に C＝C 診断用イオンの形成をもたらすことを示している。

【0 0 7 4】

【図 4 8 A B】図 4 8 A～D は、P S 1 6 : 1 (9 Z) / 1 8 : 1 (9 Z) における二重結合の位置の解明を示している。図 4 8 A は、P S 1 6 : 1 (9 Z) / 1 8 : 1 (9 Z) の構造および観察された開裂部位を示している。図 4 8 B は、m / z 8 1 6 . 5 における P S の P－B 反応生成物の M S 2 C I D を示している。図 4 8 C は、P S の P－B 反応生成物からの m / z 3 3 9 . 4 の M S 3 C I D を示している。図 4 8 D は、P S の P－B 反応生成物からの m / z 3 1 1 . 3 の M S 3 C I D を示している。

30

【図 4 8 C D】図 4 8 A～D は、P S 1 6 : 1 (9 Z) / 1 8 : 1 (9 Z) における二重結合の位置の解明を示している。図 4 8 A は、P S 1 6 : 1 (9 Z) / 1 8 : 1 (9 Z) の構造および観察された開裂部位を示している。図 4 8 B は、m / z 8 1 6 . 5 における P S の P－B 反応生成物の M S 2 C I D を示している。図 4 8 C は、P S の P－B 反応生成物からの m / z 3 3 9 . 4 の M S 3 C I D を示している。図 4 8 D は、P S の P－B 反応生成物からの m / z 3 1 1 . 3 の M S 3 C I D を示している。

40

【0 0 7 5】

【図 4 9】図 4 9 A は、7 0 : 3 0 アセトン / H 2 O 中に 5 μ M で調製された P C 1 6 : 0 / 1 8 : 1 の P B 反応 M S スペクトルを示している。図 4 9 B は、インタクトな P C イオン (m / z 7 6 0 . 6) およびその P B 生成物 (m / z 8 1 8 . 6) の X I C を示している。

【0 0 7 6】

【図 5 0 A B】図 5 0 A は、P B 反応のための直接注入の構成を示している。図 5 0 B は、5 秒間の U V 曝露のための流速 4 . 5 μ L / 分での 5 μ M P C 1 6 : 0 / 1 8 : 1 (9 Z) (7 : 3 のアセトン : 1 % 酢酸を含む H 2 O) の P B 反応 M S スペクトルを示して

50

いる。挿入図は、インタクトなPCおよびそのPB生成物のXIDを示している。図50Cは、UV曝露時間の関数としてインタクトなPCおよびPB生成物のプロットを示している。図50Dは、PB反応のためのフロー注入の構成を示している。ランプをキャピラリーから0.5cm離して置いている。

【図50CD】図50Aは、PB反応のための直接注入の構成を示している。図50Bは、5秒間のUV曝露のための流速4.5μL/分での5μM PC16:0/18:1(9Z)(7:3のアセトン:1%酢酸を含むH₂O)のPB反応MSスペクトルを示している。挿入図は、インタクトなPCおよびそのPB生成物のXIDを示している。図50Cは、UV曝露時間の関数としてインタクトなPCおよびPB生成物のプロットを示している。図50Dは、PB反応のためのフロー注入の構成を示している。ランプをキャピラリーから0.5cm離して置いている。

10

【0077】

【図51AB】図51Aは、Norris Type I反応、および脂質の酸化を含むその後のラジカル反応を示している。PB反応収率の改善のために溶媒系からO₂を排除する:PC16:0/18:1(9Z)の10秒間のPB反応のMSスペクトル。図50Bは、N₂パージなしを示している。図50Cは、N₂パージありを示している。

【図51C】図51Aは、Norris Type I反応、および脂質の酸化を含むその後のラジカル反応を示している。PB反応収率の改善のために溶媒系からO₂を排除する:PC16:0/18:1(9Z)の10秒間のPB反応のMSスペクトル。図50Bは、N₂パージなしを示している。図50Cは、N₂パージありを示している。

20

【0078】

【図52A】図52Aは、351nmのUV照射下でPB試薬としてベンズアルデヒドを用いたときのPC18:1(6Z)/18:1(6Z)のPB反応を示している。図52Bは、PB生成物のMS2CIDがm/z648.4および722.5にC=C診断用イオンを生成することを示している。

【図52B】図52Aは、351nmのUV照射下でPB試薬としてベンズアルデヒドを用いたときのPC18:1(6Z)/18:1(6Z)のPB反応を示している。図52Bは、PB生成物のMS2CIDがm/z648.4および722.5にC=C診断用イオンを生成することを示している。

【0079】

【図53】図53Aは、FA18:1(9Z)および(11Z)の予測されるC=C診断用イオンを示している。図53Bは、FA18:1(9Z)および(11Z)混合物のPB生成物のMS2CIDを示している。

30

【0080】

【図54】図54は、内部標準としてFA17:1(10Z)を用いてFA18:1(9Z)を定量するためのNL58スキャンを示している。挿入図:検量線。

【0081】

【図55A】図55Aは、定量のためのC=C診断用イオン強度の使用を示している。図55Bは、FA18:1(9Z)および(11Z)混合物のMS2CIDスペクトルを示している。図55Cは、モル比に対するC=C診断用イオン強度比からの相対定量を示している。図55Dは、FA18:1(9Z)および(11Z)に対する内部標準としてFA18:1(6Z)を使用した絶対定量を示している。

40

【図55BC】図55Aは、定量のためのC=C診断用イオン強度の使用を示している。図55Bは、FA18:1(9Z)および(11Z)混合物のMS2CIDスペクトルを示している。図55Cは、モル比に対するC=C診断用イオン強度比からの相対定量を示している。図55Dは、FA18:1(9Z)および(11Z)に対する内部標準としてFA18:1(6Z)を使用した絶対定量を示している。

【図55D】図55Aは、定量のためのC=C診断用イオン強度の使用を示している。図55Bは、FA18:1(9Z)および(11Z)混合物のMS2CIDスペクトルを示している。図55Cは、モル比に対するC=C診断用イオン強度比からの相対定量を示し

50

ている。図 5 5 D は、F A 1 8 : 1 (9 Z) および (1 1 Z) に対する内部標準として F A 1 8 : 1 (6 Z) を使用した絶対定量を示している。

【 0 0 8 2 】

【図 5 6】図 5 6 は、ショットガン分析に適用された P B - M S / M S から C = C が特定された酵母極性抽出物由来の G P を示している。

【 0 0 8 3 】

【図 5 7】図 5 7 は、ポストカラム分離および E S I - M S における P B の連結のスキームを示している。

【 0 0 8 4 】

【図 5 8 A】図 5 8 A ~ C は、ラット脳からの (図 5 8 A) F A 、 G P (図 5 8 B) および (図 5 8 C) C = C 異性体の組成を示している。図 5 8 D は、種々の組織タイプ間の F A 1 8 : 1 および P C 1 6 : 0 / 1 8 : 1 の C = C 異性体の分布を示している。

10

【図 5 8 B C】図 5 8 A ~ C は、ラット脳からの (図 5 8 A) F A 、 G P (図 5 8 B) および (図 5 8 C) C = C 異性体の組成を示している。図 5 8 D は、種々の組織タイプ間の F A 1 8 : 1 および P C 1 6 : 0 / 1 8 : 1 の C = C 異性体の分布を示している。

【図 5 8 D】図 5 8 A ~ C は、ラット脳からの (図 5 8 A) F A 、 G P (図 5 8 B) および (図 5 8 C) C = C 異性体の組成を示している。図 5 8 D は、種々の組織タイプ間の F A 1 8 : 1 および P C 1 6 : 0 / 1 8 : 1 の C = C 異性体の分布を示している。

【 0 0 8 5 】

【図 5 9 A】図 5 9 A ~ F は、F A 1 7 : 1 (1 0 Z) および F A 1 8 : 1 (9 Z) の等モル混合物 (0 . 1 % N H 4 O H が加えられたアセトン / H 2 O = 5 0 / 5 0 、 v / v 中でそれぞれ 3 . 5 μ M) の負イオンモードナノ E S I 質量スペクトルを示している：図 5 9 A は、アセトンによる光化学的タギングの前を示しており、図 5 9 B は、後を示している。図 5 9 C は、タグ化された F A 1 7 : 1 (m / z 3 2 5) の M S 2 ビーム型 C I D を示している。タグのロスは、主なフラグメンテーションチャンネルである。ヒト血漿由来の F A 抽出物の負イオンモードナノ E S I - M S : 図 5 9 D は、アセトンタギングの前を示しており、図 5 9 E は、後を示している。図 5 9 F は、アセトンタギング後の 5 8 D a ニュートラルロススキャン (N L S) を示している。F A の注釈における「*」記号の数は、F A に対するアセトンタギングの数を表す (s t a n d a r d s f o r) 。

20

【図 5 9 B C】図 5 9 A ~ F は、F A 1 7 : 1 (1 0 Z) および F A 1 8 : 1 (9 Z) の等モル混合物 (0 . 1 % N H 4 O H が加えられたアセトン / H 2 O = 5 0 / 5 0 、 v / v 中でそれぞれ 3 . 5 μ M) の負イオンモードナノ E S I 質量スペクトルを示している：図 5 9 A は、アセトンによる光化学的タギングの前を示しており、図 5 9 B は、後を示している。図 5 9 C は、タグ化された F A 1 7 : 1 (m / z 3 2 5) の M S 2 ビーム型 C I D を示している。タグのロスは、主なフラグメンテーションチャンネルである。ヒト血漿由来の F A 抽出物の負イオンモードナノ E S I - M S : 図 5 9 D は、アセトンタギングの前を示しており、図 5 9 E は、後を示している。図 5 9 F は、アセトンタギング後の 5 8 D a ニュートラルロススキャン (N L S) を示している。F A の注釈における「*」記号の数は、F A に対するアセトンタギングの数を表す (s t a n d a r d s f o r) 。

30

【図 5 9 D E】図 5 9 A ~ F は、F A 1 7 : 1 (1 0 Z) および F A 1 8 : 1 (9 Z) の等モル混合物 (0 . 1 % N H 4 O H が加えられたアセトン / H 2 O = 5 0 / 5 0 、 v / v 中でそれぞれ 3 . 5 μ M) の負イオンモードナノ E S I 質量スペクトルを示している：図 5 9 A は、アセトンによる光化学的タギングの前を示しており、図 5 9 B は、後を示している。図 5 9 C は、タグ化された F A 1 7 : 1 (m / z 3 2 5) の M S 2 ビーム型 C I D を示している。タグのロスは、主なフラグメンテーションチャンネルである。ヒト血漿由来の F A 抽出物の負イオンモードナノ E S I - M S : 図 5 9 D は、アセトンタギングの前を示しており、図 5 9 E は、後を示している。図 5 9 F は、アセトンタギング後の 5 8 D a ニュートラルロススキャン (N L S) を示している。F A の注釈における「*」記号の数は、F A に対するアセトンタギングの数を表す (s t a n d a r d s f o r) 。

40

【図 5 9 F】図 5 9 A ~ F は、F A 1 7 : 1 (1 0 Z) および F A 1 8 : 1 (9 Z) の等

50

モル混合物（0.1% NH₄OHが加えられたアセトン／H₂O＝50／50、v／v中でそれぞれ3.5 μM）の負イオンモードナノESI質量スペクトルを示している：図59Aは、アセトンによる光化学的タギングの前を示しており、図59Bは、後を示している。図59Cは、タグ化されたFA17：1（m／z 325）のMS2ビーム型CIDを示している。タグのロス、主なフラグメンテーションチャンネルである。ヒト血漿由来のFA抽出物の負イオンモードナノESI-MS：図59Dは、アセトンタギングの前を示しており、図59Eは、後を示している。図59Fは、アセトンタギング後の58Daニュートラルロスキャン（NLS）を示している。FAの注釈における「＊」記号の数は、FAに対するアセトンタギングの数を表す（standards for）。

【0086】

10

【図60A】図60A～Bは、25倍希釈の後の2 μLのラット血液由来のFA抽出物の負イオンモードナノESI質量スペクトルを示している：図60Aは、タギングの前を示しており、図60Bは、タギング後のNLS（58Da）を示している。「#」記号は、化学的干渉を示している。

【図60B】図60A～Bは、25倍希釈の後の2 μLのラット血液由来のFA抽出物の負イオンモードナノESI質量スペクトルを示している：図60Aは、タギングの前を示しており、図60Bは、タギング後のNLS（58Da）を示している。「#」記号は、化学的干渉を示している。

【0087】

20

【図61A】図61Aは、光化学反応中の、インタクトなおよびアセトンでタグ化されたFA17：1およびFA18：1の抽出イオンクロマトグラムを示している。

【図61B】図61Bは、タグ化されたFA17：1およびFA18：1のNLS（58Da）を示している。挿入図は、NLSに基づくFA18：1（9Z）に対する検量線を示している（FA17：1（10Z）をISとして使用した）。

【図61C】図61Cおよび61Dは、異なる反応溶媒条件を用いたときのFA20：4（5Z、8Z、11Z、14Z）の光化学反応MSスペクトルを示している：図61Cでは、アセトン／水（50／50、v／v）を使用し、図61Dでは、エタノール／アセトン／水（40／30／30、v／v／v）を使用している。

【図61D】図61Cおよび61Dは、異なる反応溶媒条件を用いたときのFA20：4（5Z、8Z、11Z、14Z）の光化学反応MSスペクトルを示している：図61Cでは、アセトン／水（50／50、v／v）を使用し、図61Dでは、エタノール／アセトン／水（40／30／30、v／v／v）を使用している。

30

【0088】

【図62A】図62A～Eは、ヒト血漿由来のFA C＝C位置の異性体の分析を示している。図62Aは、タグ化されたFA18：1（m／z 339.3）のPB-MS/MSを示している。Δ9およびΔ11位にC＝Cを有する2つの異性体が検出される。図62Bは、FA18：1 Δ9およびΔ11異性体の相対定量のための検量線を示している。図62Cは、91.5% Δ9および8.5% Δ11異性体からなるFA18：1混合物の58Da NLSに基づいて全FA18：1を定量するための検量線を示している。図62Dは、ω-3およびω-6 FA18：3異性体（リチウム化されたm／z 343.3）の等モル混合物のPB-MS/MSを示している。各異性体のC＝C診断用イオンが明らかに検出される。図62Eは、ヒト血漿由来のFA18：3のC＝C診断用イオンに対する拡大された領域のPB-MS/MSを示している。ω-6 FA18：3が、ω-3異性体よりも大量である。

40

【図62BC】図62A～Eは、ヒト血漿由来のFA C＝C位置の異性体の分析を示している。図62Aは、タグ化されたFA18：1（m／z 339.3）のPB-MS/MSを示している。Δ9およびΔ11位にC＝Cを有する2つの異性体が検出される。図62Bは、FA18：1 Δ9およびΔ11異性体の相対定量のための検量線を示している。図62Cは、91.5% Δ9および8.5% Δ11異性体からなるFA18：1混合物の58Da NLSに基づいて全FA18：1を定量するための検量線を示している。図

50

6 2 D は、 $\omega-3$ および $\omega-6$ F A 1 8 : 3 異性体 (リチウム化された m/z 3 4 3 . 3) の等モル混合物の P B - M S / M S を示している。各異性体の C = C 診断用イオンが明らかに検出される。図 6 2 E は、ヒト血漿由来の F A 1 8 : 3 の C = C 診断用イオンに対する拡大された領域の P B - M S / M S を示している。 $\omega-6$ F A 1 8 : 3 が、 $\omega-3$ 異性体よりも大量である。

【図 6 2 D E】図 6 2 A ~ E は、ヒト血漿由来の F A C = C 位置の異性体の分析を示している。図 6 2 A は、タグ化された F A 1 8 : 1 (m/z 3 3 9 . 3) の P B - M S / M S を示している。 $\Delta 9$ および $\Delta 1 1$ 位に C = C を有する 2 つの異性体が検出される。図 6 2 B は、F A 1 8 : 1 $\Delta 9$ および $\Delta 1 1$ 異性体の相対定量のための検量線を示している。図 6 2 C は、9 1 . 5 % $\Delta 9$ および 8 . 5 % $\Delta 1 1$ 異性体からなる F A 1 8 : 1 混合物の 5 8 D a N L S に基づいて全 F A 1 8 : 1 を定量するための検量線を示している。図 6 2 D は、 $\omega-3$ および $\omega-6$ F A 1 8 : 3 異性体 (リチウム化された m/z 3 4 3 . 3) の等モル混合物の P B - M S / M S を示している。各異性体の C = C 診断用イオンが明らかに検出される。図 6 2 E は、ヒト血漿由来の F A 1 8 : 3 の C = C 診断用イオンに対する拡大された領域の P B - M S / M S を示している。 $\omega-6$ F A 1 8 : 3 が、 $\omega-3$ 異性体よりも大量である。

【0 0 8 9】

【図 6 3 A】図 6 3 A は、ヒト血漿中の不飽和 F A の定量を示している。

【図 6 3 B】図 6 3 B は、R W P E 1 および P C 3 細胞における主要な不飽和 F A 量の比較を示している。(d) R W P E 1 および P C 3 細胞における F A 1 8 : 1 の $\Delta 9$ および $\Delta 1 1$ 異性体の量。図 6 3 A および B において、エラーバーは、標準偏差、 $n = 3$ を表す。R W P E 1 細胞における F A と P C 3 細胞における F A との差を、両側スチューデント t 検定を用いて統計的有意性について評価した ($*** p < 0.0005$)。

【0 0 9 0】

【図 6 4】図 6 4 は、上部において、M S / M S の間の P B 反応および逆 P B 反応の反応スキームを示している。図 6 4 の下部は、N L S によって不飽和 F A を定量するために A B S c i e x Q t r a p 4 0 0 0 M S においてナノ E S I - M S / M S と P B 反応を連結する実験の構成を示している。

【0 0 9 1】

【図 6 5】図 6 5 は、ヒト血漿中の F A の回収率を推定する原理を図示している (L I P I D - M A P S F A 抽出プロトコルを用いる)。

【0 0 9 2】

【図 6 6】図 6 6 A ~ C は、異なる溶媒条件下での P B 反応によるアラキドン酸 (F A 2 0 : 4 (5 Z、8 Z、1 1 Z、1 4 Z)) の光化学的タギングを示している。図 6 6 A は、溶媒としてアセトン / 水 (5 0 / 5 0、v / v) を用いたときの F A 2 0 : 4 の P B 反応質量スペクトルを示している。図 6 6 B は、溶媒としてエタノール / アセトン / 水 (4 0 / 3 0 / 3 0、v / v) を用いたときの F A 2 0 : 4 の P B 反応質量スペクトルを示している。図 6 6 C は、 m/z 3 6 1 . 3 での F A 2 0 : 4 の P B 生成物の C I D スペクトルを示しており、ここで、主なフラグメンテーションチャネルは、5 8 D a (アセトン) および 4 4 D a (C O 2) のニュートラルロスである。

【0 0 9 3】

【図 6 7】図 6 7 は、各異性体の 2 つの診断用イオンの相対強度による F A 1 8 : 1 C = C 異性体組成の測定を示している。挿入図は、診断用イオンに対する質量範囲の拡大図および診断用イオン強度比を異性体組成に変換する検量線である。

【0 0 9 4】

【図 6 8 A】図 6 8 A は、純粋なオレイン酸 (F A 1 8 : 1 (9 Z)) および c i s - パクセン酸 (F A 1 8 : 1 (1 1 Z)) に対する検量線を示している。各異性体のタグ化された生成物が、異なる程度のタグロスを示すので、これらの 2 つの検量線が、互いと重なり合わないことに注意されたい。

【図 6 8 B】図 6 8 B は、8 0 % F A 1 8 : 1 (9 Z) と 2 0 % F A 1 8 : 1 (1 1 Z)

10

20

30

40

50

との混合物の検量線を示している。

【0095】

【図69】図69A～Bは、ヒト血漿中のPUFA（FA18：3およびFA20：4）の分析を示している。図69Aは、ISとして7.5 μM FA17：1を加えたFA抽出物のナノESI-MSスペクトルを示している。図69Bは、PB反応後のNLSスペクトルを示している。乾燥させたFA抽出物（20 μLのヒト血漿由来）を、7.46 μM ISを加えた400 μLの溶媒で再構成した。

【0096】

【図70AB】図70A～Dは、ヒト血漿中のFA18：3がω-3（FA18：3（9Z、12Z、15Z）、α-リノール酸、ALA）異性体とω-6（FA18：3（6Z、9Z、12Z）、γ-リノール酸、GLA）異性体の混合物である場合を示している。FA18：3は、PUFAであるので、MS/MSにおける大量の診断用イオンは、より優勢な44Daロス（負イオンモードにおける）に起因して、タギング後に生成され得ない。ゆえに、本発明者らは、塩化リチウム（5mM）を加えることによって、+ナノESI-MSによるFA18：3の分析を可能にした。大量の診断用イオンがしかるべく生成され得、44Daニュートラルロスが抑制される。図70Aは、5mM LiClを加えた後のFA抽出物のナノESI-MSスペクトルを示している。溶媒は、アセトン/水（50/50、v/v）中の10%エタノールである。図70Bは、光化学的タギング後のFA抽出物のナノESI-MSスペクトルを示している。赤色で標識されたピークは、FA18：3（m/z 343.5）、FA18：2（m/z 345.5）およびFA18：1（m/z 347.5）のタグ化された生成物である。図70Cは、m/z 343.3のバックグラウンドイオンのCIDスペクトルを示している。図70Dは、タグ化されたFA18：3（m/z 343.3）のCIDスペクトルを示している。

【図70CD】図70A～Dは、ヒト血漿中のFA18：3がω-3（FA18：3（9Z、12Z、15Z）、α-リノール酸、ALA）異性体とω-6（FA18：3（6Z、9Z、12Z）、γ-リノール酸、GLA）異性体の混合物である場合を示している。FA18：3は、PUFAであるので、MS/MSにおける大量の診断用イオンは、より優勢な44Daロス（負イオンモードにおける）に起因して、タギング後に生成され得ない。ゆえに、本発明者らは、塩化リチウム（5mM）を加えることによって、+ナノESI-MSによるFA18：3の分析を可能にした。大量の診断用イオンがしかるべく生成され得、44Daニュートラルロスが抑制される。図70Aは、5mM LiClを加えた後のFA抽出物のナノESI-MSスペクトルを示している。溶媒は、アセトン/水（50/50、v/v）中の10%エタノールである。図70Bは、光化学的タギング後のFA抽出物のナノESI-MSスペクトルを示している。赤色で標識されたピークは、FA18：3（m/z 343.5）、FA18：2（m/z 345.5）およびFA18：1（m/z 347.5）のタグ化された生成物である。図70Cは、m/z 343.3のバックグラウンドイオンのCIDスペクトルを示している。図70Dは、タグ化されたFA18：3（m/z 343.3）のCIDスペクトルを示している。

【0097】

【図71】図71は、ヒト血漿中のFA18：3異性体の同定および定量を示している。図71は、FA18：3 ω-3/ω-6異性体の1：1混合物のCIDスペクトルを示している。赤色のピークは、ω-6異性体に属し、青色のピークは、ω-3異性体に属する。同じピークセットが下に拡大されており、FA18：3 ω-3/ω-6異性体の存在を示し、それらの相対強度を定量のために使用した。

【0098】

【図72】図72A～Bは、AMPP法を用いたときのヒト血漿中の不飽和FAの定量を示している。図72Aは、AMPP誘導体化後のヒト血漿のFA抽出物のナノESI-MSスペクトルを示している。図72Bは、AMPP誘導体化後の同じ抽出物のm/z 183.1のプリカーサーイオンキャンスペクトルを示している。回収率を評価するために、抽出前にFA18：2-d11およびFA18：1-d17を加えた。

【0099】

【図73】図73A～Bは、正常および癌性前立腺細胞のFAプロファイルを示している。図73Aは、正常前立腺細胞（RWPE1細胞）におけるFAのナノESI-MSスペクトルを示している。図73Bは、癌性前立腺細胞（PC3細胞）におけるFAのナノESI-MSスペクトルを示している。FA17:1(10Z)をISとして使用した。

【0100】

【図74】図74A～Bは、正常および癌性ヒト前立腺細胞におけるFA18:1が9Zおよび11Z異性体の混合物であることを示している。図74Aは、正常前立腺細胞におけるFA18:1のPB反応生成物(m/z339.3)のトラップCIDスペクトルを示している。図74Bは、前立腺癌細胞におけるFA18:1のPB反応生成物のトラップCIDスペクトルを示している。図74A～BにおけるトラップCIDの条件は、以下であった：Q3エントリーバリア(entry barrier)、2V；活性化時間、200ミリ秒；AF2（フラグメンテーションエネルギー）、50（任意単位）。m/z171.1/197.2の診断用イオンは、Δ9異性体に特有であり、m/z199.2/225.2の診断用イオンは、Δ11異性体に特有である。Δ9異性体の相対量は、前立腺癌細胞において多い。

10

【0101】

【図75】図75は、不飽和脂肪酸を高度に選択的に定量するための方法が、光化学反応およびタンデム質量分析の使用を必要とすることを図示している。このような方法は、ショットガンリピドミクスアプローチにおいて、複雑な生体サンプル中の脂肪酸の分析に直接適用できる。

20

【発明を実施するための形態】

【0102】

詳細な説明

本発明の方法は、光化学誘導体化をタンデム質量分析と組み合わせたものであり（PCD-MSⁿ）、これによって、ショットガンリピドミクスアプローチにおいて、複雑な脂質混合物由来の脂質C=C異性体の包括的な特徴付けおよび定量が可能になる。本発明の方法は、ラジカル反応（例えば、パターノ・ビューチ（P-B）反応）を使用することにより、不飽和脂質の中のC=Cの位置を正確に指摘する。作動原理は、3つの主要コンポーネントを含む（図1A）：（1）まず、254nmのUV照射下でのアセトン（ナノESI溶媒としても同様に使用される）を用いたP-B反応を介して、C=C結合をそれらの対応するP-B反応生成物に変換する。（2）次いで、反応生成物を連続的に単離し、CIDによって断片化することにより（タンデムMS）、元のC=C結合に形成されたオキセタン環が破壊されて、異性体特異的診断用イオン（診断用イオン）が選択的に生成される。（3）次いで、診断用イオンの相対存在比を用いることにより、様々な脂質種のC=C異性体の相対定量および絶対定量が可能な強力な方法が開発される。本発明の方法は、PCD-MSⁿが、脂質標的化を改善し、ラット脳における脂質C=C異性体を含む96個のユニークな脂質種を同定し、35個の不飽和脂質を定量したことを示す。それは、ラット器官における不飽和脂質の異性体組成の不均一性も明らかにした。癌性組織では、FA18:1およびC18:1含有ホスホコリン（PC）のC=C異性体の相対量の有意な変化が検出されたことから、診断方法、例えば、癌の診断方法としての本発明の方法の有用性が実証された。脂質C=C異性体の産生に関与する種々の生合成経路を考慮すると、本方法は、細胞生物学および疾患診断法などの脂質C=C異性体に関わる研究分野における広範な応用を提供する。

30

40

【0103】

ある特定の実施形態において、本発明の方法は、（1）ラット脳におけるFAおよびPLのC=C異性体の組成の定量；（2）種々のラット組織におけるPLの異性体組成の測定および比較；（3）正常組織と癌性組織との間のPLの異性体組成の比較に使用され得る。ナノESI-MS/MSと連結されたP-B反応が、大量の異なる診断用イオンを介して脂質C=C異性体の効率的で信頼性の高い特徴付けを可能にすることが本明細書中で

50

示される。この方法論は、診断用イオンの相対強度を比較することによる脂質 C = C 異性体の精密定量に拡張され得る。

【0104】

タンデム MS と連結される光化学誘導体化のストラテジーの原理

P-B 反応がナノESI-MS と連結される実験装置の概略図が、図1Aに図示されている。UV源として主に254nmを発光する低圧水銀 (LP-Hg) ランプをP-B反応のために使用した。³⁵ 0.3~0.5分後に安定状態に達するという点において反応動力学は速い (下記の実施例を参照のこと)。1つのC=Cを含む脂質の場合、アセトンの中のUVによって活性化されるカルボニルがその脂質におけるC=Cに付加されるとき、位置選択性が存在しないので、反応生成物は、2つのオキセタン位置異性体の混合物である。その結果、CIDにおいて、P-B反応生成物は、それぞれが1つの位置異性体由来する2つの診断用イオンを生成する (図1B)。CIDの後に大量のC=C特異的診断用イオンが選択的に形成されることは、フラグメンテーション抵抗性のC=Cの反応生成物として、CID感受性の高エネルギーのオキセタン環の恩恵を受ける。さらに、診断用イオン対の中の特徴的な26Daの質量差が、特に干渉が存在する場合、診断用イオンの同定において有用である。脂質C=C異性体の混合物の分析に対するPCD-MSⁿの能力を実証するために、オレイン酸 (C18:1 n-9) とcis-バクセン酸 (C18:1 n-7) との4:1模擬 (mock) 混合物を調製し、分析した。m/z 281のインタクトなFAの (if) フラグメンテーション (脱プロトン化型) は、C=Cの位置を正確に指摘するのに有用な情報価値のあるイオンを生成しない。対照的に、P-B反応およびタンデムMSの後、2つの異なる診断用イオン対が、m/z 171.1/197.2 (FA 18:1 n-9) およびm/z 199.1/225.1 (FA 18:1 n-7) に現れる (図1E)。各診断用イオン対は、それらの特定の脂質C=C異性体に特有であるので、PCD-MSⁿは、無限の数の異性体を同時に分析できる。

【0105】

続いて、PCD-MSⁿを、+ナノESIによって極性脂質を構造的に特徴付けるために拡張した。一例として、2つのPC C=C異性体、すなわち、1,2-ジペトロセレンオイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン (PC 18:1 n-12/18:1 n-12) と1,2-ジオレオイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン (PC 18:1 n-9/18:1 n-9) との等モル混合物を調製した。各PCが、2つの同一のアシル鎖、C18:1 n-12またはn-9を含む。不飽和FAと同様に、インタクトなPCのCIDの後に、m/z 184のシグニチャイオン (PCまたはスフィンゴミエリンにおけるホスホコリン頭部基、図1G) 以外の診断用イオンは形成され得ない。P-B反応およびタンデムMSの後、m/z 634.5/702.6およびm/z 676.5/702.6の2つの診断用イオン対が生成され、これは、各PC 18:1/18:1種におけるC18:1 n-12およびC18:1 n-9と一致した。ゆえに、例としてFA (+ナノESI) およびPC異性体 (+ナノESI) を使用したとき、本発明の方法は、それらが有する電荷に関係なくすべての極性脂質を分析でき、このような利点がP-B反応のラジカルの性質に帰することが実証された^{36, 37}。さらに、P-B反応が、異なる位置におけるC=Cに非選択的であり、すべてのC=Cが、誘導体化される可能性を有することは、注目に値する。この理由から、1つより多いC=Cを含むPLの場合、第一段階のP-B反応生成物のCID質量スペクトルは、存在するすべてのC=Cの情報を含む。そのようなスペクトルは、後段の反応生成物のスペクトルよりもかなり容易に解釈できるので、タンデムMS分析を容易にするために常に前者を選択した。

【0106】

脂質C=C異性体を定量分析するためのPCD-MSⁿの検証

PCD-MSⁿを、脂質C=C異性体を定量する方法として検証するために、異なるモル比の異性体混合物を調製し、分析 (典型的なCID質量スペクトルのための分析、下記の実施例を参照のこと) に供した。すべてのPC 18:1/18:1またはFA 18:1異性体に対して、異性体のモル比と、対応する診断用イオン間の強度比 (図2A) との間

に優れた線形性が観察された ($R^2 = 0.9992$ および 0.9994) ことから、脂質 $C=C$ 異性体における $PCD-MS^n$ のロバストネスが示唆される (図 2 B)。強度比は、1 つの異性体に対する診断用イオンの強度と別の異性体に対する診断用イオンの強度との比、すなわち、

【数 1】

$$\text{強度比} = \frac{\sum_1 \text{異性体1由来の診断用イオンの強度}}{\sum_2 \text{異性体2由来の診断用イオンの強度}}$$

と定義される。

10

【0107】

精度は、 $PC18:1/18:1$ および $FA18:1$ の相対定量においてそれぞれ 90 % および 95 % (mol) を超える。反応質量スペクトルによると、不飽和脂質は、対応する反応生成物に完全に変換されなかった。しかしながら、いったん反応が安定になると、診断用イオン対の間の強度比も安定になる (下記の実施例を参照のこと)。PCD-MSⁿ のそのようなユニークかつ極めて有用な特徴は、 $C=C$ に対する P-B 反応の高い特異性のおかげであり、それによって、脂質 $C=C$ 異性体の迅速かつ再現性のある定量分析が可能になる。

【0108】

FA $C=C$ 異性体の絶対定量

20

$C=C$ 異性体の相対定量の基礎が確立されたら、絶対定量のための方法が開発された。2 つの異性体 (オレイン酸および *cis*-パクセン酸) を定量する必要がある、かつ第 3 の異性体 (ペトロセレン酸、 $FA18:1\ n12$) が利用可能である場合、絶対定量のために 2 つの検量線 (オレイン酸および *cis*-パクセン酸に対する) が作成できる (図 2 C)。ここでは、 $FA18:1\ n12$ を共通の内部標準 (IS) として使用した。IS 濃度を一定 ($22.7\ \mu M$) に維持しつつ、オレイン酸または *cis*-パクセン酸の濃度を $1.4 \sim 45.4\ \mu M$ の範囲で変化させることによって、検量線を作成した。IS は、両方の FA と混合されるので、オレイン酸と *cis*-パクセン酸が共存することが定量の性能に影響するかを調べることは重要である。*cis*-パクセン酸/IS およびオレイン酸/IS の検量線から計算された傾き ($0.3587/0.2075 = 1.729$ 、図 2 D) を、*cis*-パクセン酸/オレイン酸混合物を用いて直接計測された傾き ($A = 1.694$) (図 2 B) と比較した。これらの 2 つの傾きは一致することが見出された。ゆえに、複数の異性体の共存は、それらの互いの量的相互関係に対して検出可能な影響を及ぼさないと結論付けられた。この特徴のおかげで、PCD-MSⁿ が、無限の数の脂質 $C=C$ 異性体の特徴付けることおよび定量することが可能である。

30

【0109】

第 3 の異性体を利用可能でない場合、絶対定量のための代替方法を開発することができ。これらは、PCD-MSⁿ による相対定量と組み合わせられたナノESI における標準物質の添加 (下記の実施例を参照のこと) および IS の使用を含む (下記の実施例を参照のこと)。これらの 3 つの方法の分析性能は、4:1 のモル比の $FA18:1\ n-9/n-7$ の模擬混合物 ($c_{FA18:1\ n-7} = 0.0032\ mg/mL$) およびラット脳由来の FA 抽出物の分析を通じて実証された。PCD-MSⁿ 法の定量能力は、FA 異性体を定量する際の異なる方法の間での一貫性およびその精度によって証明される。全体的に見て、最初の 2 つの方法の分析性能 (実験誤差 < 7 %、s. e. < 15 %) が、第 3 の方法より良好であり、これはおそらく後者におけるイオン化効率のばらつきに起因する。

40

【0110】

ラット脳における FA および PL $C=C$ 異性体の相対定量

確立されたら、PCD-MSⁿ を、ラット脳由来の複雑な FA および PL 抽出物由来の脂質 $C=C$ 異性体を定量するために応用した。オゾン誘起解離 (OZID) などの $C=C$

50

の位置を特定できる方法とクロマトグラフィーを組み合わせることによって P L 種の C = C 異性体の存在を報告した論文は、最近までほとんどなかった。脂質 C = C 異性体の特徴付けに加えて、本発明の方法は、相対定量によって脂質 C = C 異性体の組成情報も提供できる。いかなるクロマトグラフィー分離も行わずに、P C D - M S ⁿ をショットガンリピドミクスとつなげることによって、分析を行った。不飽和 F A の場合、それらには、モノ不飽和脂肪酸 (M U F A) およびポリ不飽和脂肪酸 (P U F A) が含まれる。F A 20 : 4 を除いては、それらの P - B 反応生成物のフラグメンテーションは、大量の診断用イオンを放出する。ラット脳における不飽和 F A のうち、F A 16 : 1、18 : 2 および 20 : 4 が、F A 16 : 1 n - 7、F A 18 : 2 n - 6 および F A 20 : 4 n - 6 の形態で純粋であることが見出された。対照的に、F A 19 : 1 は、n - 8 および n - 10 異性体の混合物であり、F A 18 : 1 および 20 : 1 も、n - 7 および n - 9 異性体の混合物であり、F A 22 : 1 は、3 つの n - 7、n - 9 および n - 11 異性体からなる (図 3 A)。F A 20 : 4 の P - B 反応収率は高いが、しかしながら、P U F A およびそれらの反応生成物の C I D の際の主な C O₂ ロス (-44 Da) に起因して、診断用イオンは生成されなかった。この問題を回避するために、L i⁺ を電荷担体として使用したところ、[P U F A + L i]⁺ 付加体を形成することによって、C O₂ ロスの抑制に成功した。このような戦略は、P C D - M S ⁿ とも適合し、P U F A C = C 異性体の定量を可能にする (下記の実施例を参照のこと)。リチウム化された F A 20 : 4 の P - B 反応生成物の C I D によって、4 対のリチウム化された診断用イオンが大量に放出される (下記の実施例を参照のこと)。続いて、ホスファチジルコリン (P C)、リゾ P C (L P C)、ホスファチジルエタノールアミン (P E)、リゾ P E (L P E)、ホスファチジルイノシトール (P I)、リゾ P I (L P I)、ホスファチジルセリン (P S) およびリゾ P S (L P S) を含む、検出されたすべての不飽和 P L の包括的分析を行った。ネガティブ C I D による不飽和 P L 異性体の定量原理は、下記の実施例 (ポジティブ C I D による定量原理については図 1 G に言及している) で詳述されている。F A 18 : 1 n - 7 および n - 9 異性体が共存することと一致して、ラット脳におけるすべての C 18 : 1 含有 P L も、n - 7 および n - 9 異性体の混合物に特定される。これは、他の F A および対応する脂肪酸アシルを含むそれらの対応する P L (C 18 : 2、C 20 : 1、C 20 : 4 および C 22 : 6) にとって普遍的真実である (図 3 A および下記の実施例)。このような知見は、遊離 F A が基質として使用される良く確立した P L 合成機構に基づく。

【0111】

ラット組織における脂質 C = C 異性体の不均一組成

種々のラット器官における脂質 C = C 異性体の異性体組成を調査し、比較するために、5 つのラット器官の組織由来の F A および P L 抽出物を分析した。すべての器官に共通の大量の P C 種、P C 16 : 0 / 18 : 1 を本発明の方法の最初の標的とした。その P - B 反応生成物のタンデム M S は、P C 16 : 0 / 18 : 1 n - 7 および n - 9 異性体の存在を強く示唆する 2 対の診断用イオン (m / z 650. 5 / 676. 6 および 678. 5 / 704. 5) を生成する (図 4 A ~ B)。驚いたことに、P C 16 : 0 / 18 : 1 の異性体組成は、ラット器官において大きなばらつきを示した。このばらつきは、脳と筋肉の間で最も有意であり：脳では、n - 9 異性体の診断用イオンは、n - 7 異性体の診断用イオンよりも大量であったのに対して、筋肉ではその逆であった。分析されたすべてのラット器官における P C 16 : 0 / 18 : 1 n - 7 の相対量は、脳 < 脂肪 < 腎臓 < 肝臓 < 筋肉の順序に従う。このデータは、遊離 F A と P L における対応する脂肪酸アシルとの間に相関関係があることを示している。F A 18 : 1 および C 18 : 1 含有 P L を分析した。脳以外のすべての器官において、脂肪、腎臓、肝臓から筋肉まで、F A 18 : 1 n - 9 および C 18 : 1 n - 9 含有 P L の相対量の一貫した増加が観察された。脳、筋肉、腎臓および肝臓は 24 ~ 26 %、脂肪は 13 % の F A 18 : 1 n - 7 を含む。これらの結果から、F A 異性体の組成が、原形質膜の主要な構成要素であって正常なタンパク質の機能に不可欠な P L の異性体組成の測定において役割を果たすことが実証される。ラット腎臓、肝臓および筋肉において、各器官由来の 3 セットの C 18 : 1 含有 P L の異性体組成

に関して、不均一性が観察された（下記の実施例を参照のこと）。概して、 $n-7$ 異性体は、脳、腎臓、肝臓から筋肉において相対量の増加が見られたが、多くの PL は、3 つすべての器官において検出できなかった。

【0112】

癌性組織における PL $C=C$ 異性体の組成の変化

種々のラット器官における脂質 $C=C$ 異性体の組成の変化が確認された後、正常細胞／組織と癌性細胞／組織との間に同様の差異が存在し得るかに関して調査した。マウス乳癌を研究のモデルとして選択し、正常なマウス乳房組織をコントロール（野生型、WT）として使用することによって、本発明の方法を検証した。すべての極性脂質抽出物から、PC が、+ ナノESI によって検出された最も多い脂質種であった。ゆえに、次いで、 $C18:1$ を含む PC（ $PC16:0/18:1$ 、 $PC18:0/18:1$ 、 $PC18:1/18:1$ を含む）を P-B 反応およびタンデム MS に供することにより、異性体組成を測定した（下記の実施例を参照のこと）。異なるプロトコルを用いて FA を抽出し、 $FA18:1$ の異性体を定量して、 $C18:1$ 含有 PC と比較した。

【0113】

予想のとおり、調べたすべての $C18:1$ 含有 PC および $FA18:1$ が、 $n-9$ および $n-7$ 異性体からなる（下記の実施例を参照のこと）。最も興味深いのは、図 4 C～F が示すような、 $FA18:1$ $n-7$ および $C18:1$ $n-7$ 含有 PC の相対量がラット乳癌組織において増加した現象である（ $PC16:0/18:1$ を除く）。最も有意な $n-7$ 異性体の増加は、 $FA18:1$ および $PC18:1/18:1$ において見られた。 $PC18:1/18:1$ の場合、別の異性体、すなわち、 $PC18:0/18:2$ $n-6$ も観察された。 $FA18:1$ $n-7$ および $C18:1$ $n-7$ 含有 PC とは反対に、 $PC18:0/18:2$ $n-6$ の相対量は、乳癌組織において激しく下方制御された（下記の実施例を参照のこと）。これらの知見の根底にある考えられる機序は、癌細胞における FA および PL $C=C$ 異性体の合成、変換および代謝の変化であり得る。そのような差異は、脂質 $C=C$ 異性体組成などの詳細な脂質組成情報に焦点を当てることによって、悪性疾患および病状を特定するための新しい展望をもたらす。

【0114】

定量方法

本明細書中のデータは、複雑な組織抽出物中の脂質 $C=C$ 異性体の効率的かつ正確な定量に対する PC D-MSⁿ ストラテジーの能力を示す。この方法は、以下の理由から、不飽和脂質を定量分析するための日常的な手法として使用できる：（1）この方法は、構造の特徴付けと異性体定量の両方の能力を有することにより、無限の数の脂質 $C=C$ 異性体の分析が可能である。（2）定量分析にとって極めて望ましい非常に高い信号雑音比（S/N）を、診断用イオンに対して達成できる。第 1 に、CID が適用されて、診断用イオンが生成され、この間に MS1 におけるほとんどの干渉が除去された。第 2 に、オキセタン環は、選択的に開裂されて大量の診断用イオンを生成し得る高エネルギー構造である。（3）P-B 反応は、 $C=C$ に対して非常に選択的であるが $C=C$ の位置に関係ない、ラジカルに基づく反応であるので、すべてのタイプの不飽和脂質が、誘導体化され得、ポジティブモードとネガティブモードの両方において分析され得る。（4）診断用イオンは、タンデム MS において生成されたので、それらは、それらのプリカーサー脂質に容易にマッピングされ得ることから、複雑な混合物の直接的な分析が可能になる。ゆえに、PC D-MSⁿ は、大規模な定量分析のためのショットガンリピドミクスに適合しており、それと容易に組み合わせることができ、前段のクロマトグラフィーによる分離または後段の機器による修飾が不要である。

【0115】

細胞によって進化されたセンサーおよび伝達経路のネットワークによって維持される脂質 $C=C$ 異性体組成は、一連の細胞プロセスに不可欠な膜ホメオスタシス（membrane homeostasis）にとって重大である。しかしながら、頑健かつ高感度な方法がないゆえ、脂質 $C=C$ 異性体組成の体系的なモニタリングおよびプロファイリングは

、非常に困難である。本方法は、生化学的研究において解き明かされていない問題、例えば、器官における脂質 C=C 異性体組成の不均一性を維持するために用いられている根本的な機序は何か？、脂質の C=C 異性体の相対量の変化は、細胞の代謝にどのように影響するか、およびどのように病原に関係するか？、C=C 異性体組成は、疾患診断法に利用できるのか、または外来性の脂質 C=C 異性体は、疾患の進行を妨害する、停止するまたは逆行させる治療薬として使用できるのか？に対して重要な証拠を与えることができる、そのような分析のための好適なアプローチを提供する。PCD-MSⁿ およびショットガンリピドミクスから得られた結果はすでに、FA および PL の異性体組成が、正常細胞／組織と癌性細胞／組織との間で有意に異なることを示している。ゆえに、PCD-MSⁿ に基づくリピドミクスは、疾患診断に向けたバイオマーカーを発見するのと同様に生物学的プロセスにおける脂質 C=C 異性体の役割を調べるための新しい機会を提供する。

10

【0116】

参照による援用

他の文書（例えば、特許、特許出願、特許公報、学術誌、書籍、論文、ウェブコンテンツ）に対する参照および引用は、本開示全体を通して行われる。そのような文書はすべて、あらゆる目的のためにそれらの全体が参照により本明細書中に援用される。

【0117】

等価物

本明細書中に示されるおよび記載されるものに加えて、本発明およびその多くのさらなる実施形態の様々な改変は、本明細書に引用される科学文献および特許文献への言及を含む本文書の全内容から当業者に明らかになるだろう。本明細書中の主題は、様々な実施形態およびそれらの等価物において本発明の実施に適応され得る重要な情報、例証および指針を含む。

20

【実施例】

【0118】

実施例 1：材料および方法

脂肪酸抽出プロトコル：1 mL の MeOH および 25 mM HCl (1% v) を 50 mg の組織に加えた後、ガラス管の中でサンプルを均質化した。次いで、そのサンプルを 30 秒間ボルテックスした後、2700 rpm で 10 分間遠心した。その後、上清を除去し、乾燥するまで蒸発させた。

30

【0119】

リン脂質抽出プロトコル：50 mg の組織に、300 μ L の脱イオン水を加えた後、ガラス管の中でサンプルを均質化した。抽出溶媒であるクロロホルム／メタノール (1/1; v/v) (溶媒 A) ならびに 10 および 50 nM LiCl 溶液を調製する。クロロホルムを VWR (IL, USA) から入手し、LiCl を Alfa Aesar (MA, USA) から入手した。均質化の後、4 mL の溶媒 A を抽出のためにガラス管に加え、水相の最終体積が 2 mL になるように適切な体積の 50 mM LiCl を加えた。次いで、その管にふたをかぶせ、サンプルを 20 秒間ボルテックスした。その後、サンプルを 2700 rpm で 10 分間遠心する。下層を新しいハウケイ酸ガラス管に回収し、2 mL のクロロホルムを、上層が残留している個々のガラス管に加えた。次いで、管にふたをかぶせ、20 秒間ボルテックスした。サンプルを再度、2700 rpm で 10 分間遠心した。下層を回収し、最後の工程で回収されたものと合わせた。合わせた下層を、完全に乾燥するまで、窒素エバポレーターを用いて窒素気流下で蒸発させた。個々の残渣を 4 mL の溶媒 A に懸濁した後、2 mL の 10 mM LiCl を加えた。管にふたをかぶせ、20 秒間ボルテックスし、次いで、2700 rpm で 10 分間遠心した。上記の 2 工程を繰り返した。個々の脂質抽出残渣を溶媒 A に再懸濁した。最後に、脂質抽出物に窒素を流し、それにふたをかぶせ、MS 分析のために -20 °C で保管した。

40

【0120】

GC-MS 分析：まず、脂肪酸サンプルを減圧下で乾燥させ、次いで、酢酸エチルで再構成した。

50

【0121】

GC-MS分析の前に、25 uLのサンプルを25 uLの誘導体化試薬と混合した。次いで、0.5 uLの最終溶液を10:1の分割比で注入した。

【0122】

ナノESI-MS、オンラインバターン・ビューチ反応およびタンデムMS分析：MS分析の前に、FA (Sigma-Aldrich, MO, USA)、PL (Sigma-Aldrich, MO, USA) およびラット組織抽出物をすべて、50/50 (v/v) アセトン/水に溶解した。ナノESIによるFAの検出を容易にするために、0.5% NH₄OHをサンプルに加えた。アセトンとC=Cとの間のP-B反応のために、254 nmで発光する低圧水銀 (LP-Hg) ランプ (Model No.: 80-1057-01, BHK, Inc., CA, USA) を使用した。すべてのMS実験を、4000 QTRAP三連四重極/リニアイオントラップ (LIT) ハイブリッド質量分析計 (Applied Biosystems/Sciex, Toronto, Canada) において行った。この機器は、論文に記載されているように、PISおよびNLSが可能である。使用した機器パラメータは、以下のとおりである：ESI電圧、±1200~1800 V；カーテングス、10 psi；インターフェースヒーター温度、40 C；デクラスタリング電位：±20。プリカーサーイオン選択幅 (isolation width) を1.0 Thに設定した。イオン注入時間を10~200ミリ秒以内に維持することによって、プリカーサーイオン強度をMS/MSに対しておよそ4×10⁶ カウントで維持した。P-B反応生成物に対して使用した衝突エネルギーは、35 V (ビームCID) または50 a.u. (トラップCID) であった。

【0123】

実施例2：タンデムMS後の診断用イオンの相対強度に対するイオン注入時間の影響

図5A~Bおよび表1におけるデータは、イオン注入時間が長くなる (10~200ミリ秒) に従って、プリカーサーイオン (P-B反応生成物)、58 Daニュートラルロス後のイオンおよびDIのすべての絶対強度が同様に上昇したことを例証している。しかしながら、DIおよび58 Daニュートラルロス後のイオンの相対強度は、注入時間が20倍長くなっても非常に安定している。DIおよびニュートラルロスイオンの生成は、2つの逆P-B反応経路であるので、これらの結果は、その2つの逆経路の間の分岐が注入時間に依存しないことを示唆している。このような重要な特徴は、CID分析のためのイオントラップに入れられるプリカーサーイオンの量を慎重に調節することを不要にする。

【表1】

表1

イオン注入 時間(ミリ秒)	診断用イオン (m/z171/197) の%	ニュートラル ロスイオン (m/z281)の%
10	0.14	0.86
20	0.14	0.86
50	0.14	0.86
100	0.14	0.86
200	0.15	0.85

【0124】

実施例3：P-B反応動態

PC18:1 n9/18:1 n9と18:1 n12/18:1 n12との混合物を用いて、ナノESIによってP-B反応動態を研究した。P-B反応生成物の量をそれらの抽出イオン電流 (EIC) によって表した。LP-Hgランプが温まったら、反応生成物の量の急増が観察された。この反応は、約0.3~0.5分後に安定になり、プラトーに達した。

【0125】

図6は、254nmのUV照射下においてアセトンを用いたPC18:1/18:1（2つのC=C異性体の混合物）のP-B反応の動態を示している。速い反応速度が観察された：0.4分以内に反応は安定になった。その後、各異性体に対する診断用イオン間の比は、一定になり、これは、定量分析の基礎を築く（時点1、2および3における3つのタンデムスペクトルを参照のこと）。

【0126】

不飽和脂肪酸に対して同様の結果がナノESIによって観察された。cis-バクセン酸溶液のP-B反応生成物（m/z 339.3）のEIC、ならびにEICの拡大図（P-B反応開始後の3分間）が、図7A～Dに示されている。

10

【0127】

実施例4：P-B反応およびタンデムMSに基づいて脂質C=C異性体の絶対定量を可能にする3つの方法の原理

方法1：ISとして第3の異性体を使用する絶対定量：定量されるべきものとは異なる1つのC=C異性体を内部標準（IS）として使用した。次いで、ISの診断用イオンとサンプル中の分析されるべきC=C異性体由来の診断用イオンとの比が、計算され得る。C=C異性体の絶対量は、そのISを用いて各異性体に対して作成された検量線から求めることができる。

【0128】

方法2：標準添加法：既知量の1つの異性体（分析用サンプル中に存在するもの、例えば、FA18:1 n11）を混合物に加えた。標準添加法の結果として、2対の診断用イオン間の強度比は、変化し得る。

20

以下のパラメータを以下のとおり定義する：

I_1 ：標準添加法の前の2対の診断用イオン間の強度比

I_2 ：標準添加法の後の2対の診断用イオン間の強度比

Δc ：異性体濃度の増加（この場合、FA18:1 n11の濃度）

c_1 ：FA18:1 n11の濃度

c_2 ：FA18:1 n9の濃度。

C18:1 n11とC18:1 n9との間の検量線は、 $I = 1.6942x - 0.017$ （ x は、濃度比（FA18:1 n11対FA18:1 n9）である）であるので、以下が導かれる：

30

【数2】

$$\frac{c_1}{c_2} = \frac{I_1 + 0.017}{1.6942}$$

$$\frac{\Delta c + c_1}{c_2} = \frac{I_2 + 0.017}{1.6942}$$

40

ゆえに、FA18:1 n11およびFA18:1 n9の元の濃度を容易に求めることができる。

【数 3】

$$c_1 = \frac{I_1 + 0.017}{I_2 - I_1} \Delta c$$

$$c_2 = \frac{1.6942}{I_2 - I_1} \Delta c$$

【0129】

10

方法3（P-B反応／タンデムMSを介する相対定量と組み合わせられたナノESIによる総濃度の絶対定量）：異なる数の炭素を含む内部標準（IS）（例えば、FA17：1）をFA18：1異性体の混合物に加える。定量されるべきFAの絶対定量のためにナノESI-MS分析を行う。（1．予め検量線を作成する必要がある。2．FA C=C異性体は、等しいイオン化効率を有すると仮定する）。C18：1異性体の総濃度を計算する。各FA異性体の相対量は、P-B反応／タンデムMSによって測定され、その後、各異性体の絶対濃度が測定され得る。

【0130】

実施例5：種々のタイプのリン脂質のC=C異性体の相対定量

PL頭部基の極性に依りて、PLは、正または負イオンモードで分析され得る。したがって、PCは、+ナノESIによって分析し、PA、PI、PEおよびPSは、-ナノESIによって分析した。ここで、本発明者らは、2つの例（PC18：0／18：1およびリゾPE18：1）を用いて、P-B反応／タンデムMSを用いたPLの相対定量を実証する。PLにおけるアシル鎖情報は、それらの脂肪酸付加体、酢酸付加体または塩素付加体の（-）CIDを介して得ることが出来る（図9A～Bを参照のこと）。

20

【0131】

実施例6：PUFAの構造の特徴付けおよび定量

すべてのラット器官におけるFA18：2について、そのP-B反応生成物のCIDは、C9およびC12におけるメチレンによって分断された2つのC=Cと一致する2対の診断用イオンを放出する（FA18：2 n6）。図10を参照のこと。

30

【0132】

しかしながら、それよりはるかに多い数のC=Cを含むPUFAの場合、インタクトなPUFAとそれらのP-B反応生成物の両方のフラグメンテーションの間のCO₂ロス（-44Da）のフラグメンテーション経路が優勢になる。他のフラグメンテーション経路は抑制されるようになり、結局、C=Cの位置の割り当てが困難になる。この問題を回避するために、リチウムを故意に付加して、FAを[FA+Li]⁺として+ナノESIによって検出可能にする。図11A～Dに示されているように、リチウム化されたP-B反応生成物のタンデムMSは、CO₂ロスがここで完全に抑制された状態で大量の診断用イオン（リチウム化された形態）を生成した。このような戦略は、PUFA異性体の汎用性のある効果的な特徴付けおよび定量を可能にする。

40

【0133】

図12は、IFA20：4 n6／IFA20：4 n3 対 cFA20：4 n6／cFA20：4 n3の直線関係を例証している検量線を示している。下記の表2にデータも示す。

【表 2】

表 2

診断用イオン (m/z)	163	189	203	229	243	269
+2Da同位体 に対する寄与	0.0062 (165)	0.0065 (191)	0.0065 (205)	0.0107 (231)	0.0107 (245)	0.016 (271)

【0134】

実施例 7：PL における多価不飽和脂肪酸アシル（C18：2、C20：4、C22：6 など）は、ラット器官において純粋な n6 異性体として存在する 10

ラット器官からの PL 抽出物を分析したところ、それらの結果は、多価不飽和脂肪酸アシルが、純粋な異性体として存在するという結論に至り（C18：2 および C20：4 は C18：2 n6 および C20：4 n6 として；ならびに C22：6 は C22：6 n3 として）、これは、以前に特定された PUFA と一致する。

【0135】

C18：2 脂肪酸アシル（図 13）： m/z 786.6（+ナノESI）のイオンは、PC18：0/18：2 であると特定された（[PC+C1]⁻のナノESI-MS/MS を介して）。二重結合の位置は、対応する P-B 反応生成物のフラグメンテーションの後に特定された。PC18：0/18：2 は、2 つの C=C を有するので、2 対の診断用イオンが、 m/z 678.5/704.6 および m/z 718.5/744.6 に観察された。その 2 対の間の 40 Da の質量差は、四角の中に示されているように、メチレンによって分断された 2 つの C=C の存在を示唆する。さらに、他の任意の診断用イオン対が存在しないことによって、PC18：0/18：2 の他の異性体が存在しないことが確認される。 20

【0136】

C20：4 脂肪酸アシル： m/z 782.6（+ナノESI）のイオンが、PC16：0/20：4 と PC18：2/18：2（少量）の混合物として特定された。脂肪酸アシルの情報は、[PC+C1]⁻の MS/MS を介して得られた。PC16：0/20：4 に対して、C20：4 に 4 つの C=C が存在することと一致する 4 対の診断用イオンが観察された。PC18：2/18：2 に対する 2 対の診断用イオンは、674.6/692.6 および 714.6/740.6 における、PC16：0/20：4 n6 に対する 4 対のうちの 2 対と偶然重複する。したがって、PC18：2/18：2 における C18：2 は、PC18：0/18：2 の中の C18：2 について特徴付けられた異性体と同様異性体である C18：2 n6 であると特定された。実際に、多価不飽和脂肪酸アシル（ここでは C20：4 によって例証された）の場合、たといかなるタイプの PL 種が存在していたとしても、同じ純粋な異性体である（他の多価不飽和脂肪酸アシルについてのデータ示さず）。 30

【0137】

PC16：0/20：4 n6（ラット脳；図 14A）：左のパネル：[PC36：4 + CH₃COO]⁻の CID 質量スペクトルから、2 つの PC 種、PC16：0/20：4 および PC18：2/18：2 の存在が明らかに示唆される。右のパネル：PC36：4 の P-B 反応生成物の CID 質量スペクトル。診断用イオンを用いることによって、各 PC 種における二重結合の位置を容易に割り当てることができる。図 14C は、PC16：0/20：4 n6 に対する診断用イオンの化学構造を示している。 40

【0138】

PC16：0/20：4 n6（ラット肝臓；図 14B）：同様の分析によって、PE16：0/20：4 における C20：4 脂肪酸アシル（ラット肝臓由来）も、C20：4 n6 として特徴付けられた。

【0139】

50

C 2 2 : 6 脂肪酸アシル : m / z 8 0 6 . 6 (+ ナノ E S I) のイオンは、P C 1 6 : 0 / 2 2 : 6 であると特定された (ここで、脂肪酸アシルの情報は、[P C + C H 3 C O O] - 付加体の - M S / M S を介して得られた)。同様に、C = C の位置は、対応する P - B 反応生成物の + ナノ E S I - M S / M S によって推定され得る。本発明者らは、C 2 2 : 6 における 6 つの C = C の存在と一致する 6 対の診断用イオンを観察した。これらの 6 対の診断用イオンの質量電荷比 (5 8 0 . 5 / 6 0 6 . 6 、 6 2 0 . 5 / 6 4 6 . 6 、 6 6 0 . 4 / 6 8 6 . 6 、 7 0 0 . 5 / 7 2 6 . 6 、 7 4 0 . 5 / 7 6 6 . 6 、 7 8 0 . 6 / 8 0 6 . 6 ; 奇数の m / z を有する共存イオンは、おそらく P C 1 6 : 0 / 2 2 : 6 以外の P L 由来のフラグメントであった) を用いることにより、その 6 つの C = C の位置が 4、7、10、13、16 および 19 に存在すると明確に割り当てることができる。ゆえに、C 2 2 : 6 は、C 2 2 : 6 n 3 の形態で純粋である。

10

【0140】

P C 1 6 : 0 / 2 2 : 6 n 3 (ラット脳 ; 図 1 5) : 左のパネル : C 2 2 : 6 が P C 3 8 : 6 内の s n - 2 位に存在し、C 1 6 : 0 が s n - 1 位に存在することを示している、[P C 3 8 : 6 + C H 3 C O O] - の C I D 質量スペクトル。右のパネル : P C 1 6 : 0 / 2 2 : 6 の P - B 反応生成物の C I D 質量スペクトル。

【0141】

実施例 8 : 複雑な混合物中のある特定のタイプの脂質のプリカーサーイオンスキャン (P I S) およびニュートラルロススキャン (N L S) のスピード分析 (s p e e d a n a l y s i s)

20

図 1 6 は、ラット組織におけるオレイン酸および c i s - バクセン酸の生合成経路を示している。ラット組織由来の P L 抽出物の組成上の複雑さを考慮して、特定のクラスに属する P L およびそれらの脂肪酸アシルの特定を速めるために、プリカーサーイオンスキャン (P I S) およびニュートラルロススキャン (N L S) を利用することができる。例えば、m / z 1 8 4 (+ M S / M S における) のイオンを用いることにより、すべての P C、リゾ P C および S M の情報ははっきり限定して抽出することができ、m / z 2 4 1 (- M S / M S における) のイオンを用いることにより、複雑な脂質混合物由来のすべての P I の情報を抽出することができる。1 8 7 D a および 1 4 1 D a のニュートラルロスは、それぞれ P S および P E に特徴的である。ラット脳の代表的な P I S および N L S スペクトルを図 1 7 A ~ D に示す。

30

【0142】

P L の脂肪酸アシル組成は、- M S / M S によって得ることができる。このプロセスをより効率的にするために、共通の各脂肪酸アシルの m / z の P I S を行うことにより、走査された脂肪酸アシルを含むすべての P L のプロファイルを得ることができる。C 1 6 : 0、C 1 8 : 1、C 1 8 : 0、C 2 0 : 4、C 2 2 : 6 および C 2 2 : 4 の P I S 質量スペクトルを図 1 8 A ~ F に示す。各 P L は、2 つの脂肪酸アシルを含むので、これらのスペクトルの 2 つに共通の m / z シグナルが現れる場合、P L 内の 2 つの脂肪酸アシルを容易に特定できる。

【0143】

図 1 9 および下記の表 3 は、ラット脳から特定された P L 異性体の数および構造の要旨を提供する。

40

【表 3 - 1】

表 3

リン脂質	異性体の数	異性体の構造
リゾPCおよびPC		
リゾ PC 18:1	2	リゾ PC 18:1 (n7); リゾ PC 18:1 (n9)
リゾ PC 20:4	1	リゾ PC 20:4 (n6)
リゾ PC 22:6	1	リゾ PC 22:6 (n6)
PC 16:0/16:1	1	PC 16:0/16:1 (n7)
PC 16:0/18:1	2	PC 16:0/18:1 (n7); PC 16:0/18:1 (n9)
PC 16:0/20:4	1	PC 16:0/20:4 (n6)
PC 18:1/18:1	4	PC 18:1 (n7)/18:1 (n7); PC 18:1 (n9)/18:1 (n7); PC 18:1 (n7)/18:1 (n9); PC 18:1 (n9)/18:1 (n9)
PC 18:0/18:1	2	PC 18:0/18:1 (n7); PC 18:0/18:1 (n9)
PC 16:0/22:6	1	PC 16:0/22:6 (n6)
PC 16:0/22:4	1	PC 16:0/22:4 (n6)
PC 18:0/22:6	1	PC 18:0/22:6 (n6)
リゾPEおよびPE		
リゾ PE 18:1	2	リゾ PE 18:1 (n7); リゾ PE 18:1 (n9)
リゾ PE 20:4	1	リゾ PE 20:4 (n6)
リゾ PE 20:1	2	リゾ PE 20:1 (n7); リゾ PE 20:1 (n9)
リゾ PE 22:6	1	リゾ PE 22:6 (n6)
リゾ PE 22:4	1	リゾ PE 22:4 (n6)
PE 16:0/18:1	2	PE 16:0/18:1 (n7); PE 16:0/18:1 (n9)
PE 16:0/20:4	1	PE 16:0/20:4 (n6)
PE 18:1/18:1	4	PE 18:1 (n7)/18:1 (n7); PE 18:1 (n9)/18:1 (n7); PE 18:1 (n7)/18:1 (n9); PE 18:1 (n9)/18:1 (n9)

10

20

30

40

【表 3 - 2】

PE 18:0/18:1	2	PE 18:0/18:1 (n7); PE 18:0/18:1 (n9)
PE 16:0/22:6	1	PE 16:0/22:6 (n6)
PE 18:0/20:4	1	PE 18:0/20:4 (n6)
PE 18:1/22:6	2	PE 18:1 (n7)/22:6 (n6); PE 18:1 (n9)/22:6 (n6)
PE 18:0/22:6	1	PE 18:0/22:6 (n6)
PE 18:0/22:4	1	PE 18:0/22:4 (n6)
PE 22:4/22:6	1	PE 22:4 (n6)/22:6 (n6)
リゾPS およびPS		
リゾ PS 22:6	1	リゾ PS 22:6 (n6)
PS 16:1/18:1	1	PS 16:1 (n7)/18:1
PS 16:0/18:1	2	PS 16:0/18:1 (n7); PS 16:0/18:1 (n9)
PS 18:1/18:1	4	PS 18:1 (n7)/18:1 (n7); PS 18:1 (n9)/18:1 (n7); PS 18:1 (n7)/18:1 (n9); PS 18:1 (n9)/18:1 (n9)
PS 18:0/18:1	2	PS 18:0/18:1 (n7); PS 18:0/18:1 (n9)
PS 16:0/22:6	1	PS 16:0/22:6 (n6)
PS 18:0/20:4	1	PS 18:0/20:4 (n6)
PS 18:1- 20:1	4	PS 18:1 (n7)/20:1(n7); PS 18:1 (n9)/20:1 (n7); PS 18:1 (n7)/20:1(n9); PS 18:1 (n9)/20:1 (n9)
PS 20:1/18:1	2	PS 20:1/18:1 (n7) ;PS 20:1/18:1 (n9)
PS 18:0/22:6	1	PS 18:0/22:6 (n6)
PS 18:1/22:4	2	PS 18:1 (n7)/22:4 (n6); PS 18:1 (n9)/22:4 (n6)
リゾPI およびPI		
リゾ PI 18:1	2	リゾ PI 18:1 (n7); リゾ PI 18:1 (n9)
リゾ PI 20:4	1	リゾ PI 20:4 (n6)
PI 16:0/20:4	1	PI 16:0/20:4 (n6)
PI 18:1/18:1	4	PI 18:1 (n7)/18:1 (n7); PI 18:1 (n9)/18:1 (n7); PI 18:1 (n7)/18:1 (n9); PI 18:1 (n9)/18:1 (n9)
PI 18:0/18:1	2	PI 18:0/18:1 (n7); PI 18:0/18:1 (n9)
PI 18:1/20:4	2	PI 18:1 (n7)/20:4 (n6); PI 18:1 (n9)/20:4 (n6)
PI 18:0/20:4	1	PI 18:0/20:4 (n6)
リゾPA およびPA		
リゾ PA 18:1	2	LPA 18:1 (n7); LPA 18:1 (n9)
PA 16:0/18:1	2	PA 16:0/18:1 (n7); PA 16:0/18:1 (n9)

10

20

30

40

【表 3 - 3】

PA 18:1/18:1	4	PA 18:1 (n7)/18:1 (n7); PA 18:1 (n9)/18:1 (n7); PA 18:1 (n7)/18:1 (n9); PA 18:1 (n9)/18:1 (n9)
リゾ PG		
リゾ PG 18:1	2	リゾ PG 18:1 (n7); リゾ PG 18:1 (n9)

【0144】

実施例 9：種々のラット組織における PL C = C 異性体組成の変化

10

本明細書中のデータは、分析されたすべてのラット組織における PC 16 : 0 / 18 : 1 の異性体組成が種々の器官の間で様々であることを示している。問うべき当然の疑問は、PC 16 : 0 / 18 : 1 に対して観察された傾向は他の PL に当てはまるのか？である。この疑問に答えるために、腎臓、肝臓および筋肉をはじめとした他のラット組織における C 18 : 1 含有 PL を分析した。PL 抽出物のナノ ESI 質量スペクトルから証明されたように、これらの組織における脂質組成は異なるので（図 20）、調べた器官に共通する大量の PL 種は、ほとんどなかった。しかしながら、この事実は、種々の器官における PL 異性体組成の不均一性を見抜くことを妨げない。各器官において最も大量だった C 18 : 1 含有 PL を選択したところ、それらの異性体組成が似ていると見られることが観察された。より興味深いことに、PL 異性体組成の器官間のばらつきは、明白であり、図 20 に示されているように、PC 16 : 0 / 18 : 1 の異性体組成（図 4）と一致する。C 18 : 1 n 7 異性体の相対量は、筋肉で最も多く、腎臓で最も少なかったとみられる。

20

【0145】

図 21 は、ラット器官における FA 18 : 1 異性体の組成を示している。図 22 は、FA 18 : 1 の P-B 反応生成物（m/z 339. 3）のタンデム MS による FA 18 : 1 異性体の相対定量を示している（ラット脳、肝臓、筋肉、脂肪および腎臓）。

【0146】

実施例 10：正常および癌性マウス乳房組織の分析

図 23 に示されているように、正常マウス乳房組織（WT）の結果と比べて、FA 18 : 1 n 7 および C 18 : 1 n 7 含有 PC の一貫した増加がマウス乳癌組織において観察された。正常組織（各パネルの左）および癌性組織（各パネルの右）由来の（図 23 A）FA 18 : 1、（図 23 B）PC 34 : 1、（図 23 C）PC 36 : 1 および（図 23 D）PC 36 : 2 の P-B 反応生成物の CID 質量スペクトル。（図 23 D）では、PC 18 : 0 / 18 : 2 の相対量の減少も同様に明らかに観察された。PC 18 : 0 / 18 : 2 の特定に導く診断用イオンは、m/z 678. 5 / 704. 5 および 718. 5 / 744. 6 であった。下記の表 4～5 も参照のこと。

30

【表 4】

表 4

脂質種	診断用イオンの強度 (C18:1 n9, a.u.)		診断用イオンの強度 (C18:1 n7, a.u.)		WT
FA 18:1	171	197	199	225	比 _{n7:n9}
サンプル #1	130000	240000	18000	23000	0.111
サンプル #2	140000	240000	20000	30000	0.132
サンプル #3	130000	250000	20000	25000	0.118
サンプル #4	116000	210000	16000	22000	0.117
サンプル #5	115000	220000	18000	23000	0.122
				平均	0.120
				STD	0.008
PC 16:0/18:1	650	676	678	704	比 _{n7:n9}
サンプル #1	19000	18000	6500	4599	0.300
サンプル #2	25000	24000	10000	4500	0.296
サンプル #3	16000	15000	6951	2913	0.318
サンプル #4	18000	17000	5000	4808	0.280
サンプル #5	20000	18000	5398	3977	0.247
				平均	0.288
				STD	0.027
PC 18:0/18:1	678	704	706	732	比 _{n7:n9}
サンプル #1	23000	22000	7000	3906	0.242
サンプル #2	22000	18000	7661	3500	0.279
サンプル #3	48000	40000	20000	4375	0.277
サンプル #4	59000	50000	18000	6000	0.220
サンプル #5	49000	38000	20567	3800	0.280
				平均	0.260
				STD	0.027
PC 18:1/18:1	676	702	704	730	比 _{n7:n9}
サンプル #1	14130	12000	61000	1800	0.150
サンプル #2	10340	8880	60000	2289	0.258
サンプル #3	14000	10000	69000	2174	0.217
サンプル #4	15990	19999	80000	2120	0.106
サンプル #5	16000	25000	75000	2100	0.084
				平均	0.163
				STD	0.073

10

20

30

40

【表 5】

表 5

脂質種	診断用イオンの強度 (C18:1 n9, a.u.)		診断用イオンの強度 (C18:1 n7, a.u.)		乳癌
FA 18:1	171	197	199	225	比 _{n7:n9}
サンプル #1	60000	107000	20000	51000	0.425
サンプル #2	78000	140000	39000	57000	0.440
サンプル #3	110000	210000	58000	84000	0.444
サンプル #4	160000	300000	77000	110000	0.407
サンプル #5	116000	250000	58000	90000	0.404
				平均	0.424
				STD	0.018
PC 16:0/18:1	650	676	678	704	比 _{n7:n9}
サンプル #1	51000	49000	14000	13000	0.270
サンプル #2	50000	48000	13000	16000	0.396
サンプル #3	170000	160000	44000	40000	0.255
サンプル #4	240000	230000	61000	59000	0.255
サンプル #5	230000	220000	63000	60000	0.273
				平均	0.270
				STD	0.017
PC 18:0/18:1	678	704	706	732	比 _{n7:n9}
サンプル #1	66000	50000	28000	16000	0.379
サンプル #2	79000	58000	26000	20000	0.336
サンプル #3	98000	100000	45000	30000	0.379
サンプル #4	93000	78000	34000	22000	0.327
サンプル #5	92500	79000	33000	24000	0.332
				平均	0.351
				STD	0.026
PC 18:1/18:1	676	702	704	730	比 _{n7:n9}
サンプル #1	22000	36000	34000	19000	0.528
サンプル #2	27000	43000	31000	17000	0.395
サンプル #3	76000	92000	70000	50000	0.543
サンプル #4	25000	35000	36000	15000	0.429
サンプル #5	28000	34000	32100	15800	0.465
				平均	0.472
				STD	0.063

【0147】

実施例 11：パターン・ビューチ反応と直接注入 ESI-MS との連結

ソフトイオン化と連結されたタンデム質量分析 (MSⁿ、ここで、n は質量分析工程の数である) は、脂質分析のための好ましいプラットフォームとして登場している。すでに論じたように、C=C 結合の位置を明確に決定することは、分析上の難題であり続けている。上記のことは、パターン・ビューチ (P-B) 反応 (UV によって励起されたアセトンと不飽和脂質中の C=C 結合との間の付加環化) の変法をオンラインナノエレクトロスプレーイオン化 (ナノ ESI) MSⁿ に適用することによって、複雑な混合物中のリン脂

質および脂肪酸に対する $C=C$ 結合の位置が、高い信頼性で決定できることを例証している。P-B 反応は、ボロシリケートナノ ESI エミッターの UV 照射およびスプレーブルームを介して実施され得る。この実施例では、ESI の前にその反応を溶融石英キャピラリーである「マイクロリアクター」において実施することによって、上記方法を改変した。シリンジポンプによって、長い光化学反応時間にわたって、溶液がコイル状のキャピラリーを通して加圧送液された。パラメトリック研究から、 $4.5 \mu\text{L}/\text{分}$ での 6 秒以内の UV 曝露において、7:3 アセトン: H_2O 1% モディファイヤー溶媒条件において、PC 16:0—18:1 (n-9 Z) およびオレイン酸 (n-9 Z) に対してそれぞれ 50% および 40% P-B 反応収率が達成されたことが示された。この反応は、 $0.1 \sim 4.5 \mu\text{L}/\text{分}$ の流速範囲にわたって首尾良く実行され、脂質溶液における種々の LC 溶媒とも適合した。最後に、この方法が生物学的抽出混合物に適用できることを実証するために、酵母極性脂質抽出物を分析することによって、この方法の有用性を試験し、合計 35 個の不飽和リン脂質に対して $C=C$ の位置が明らかにされた。

10

【0148】

緒言

脂質は、疎水性の特色を有する多様な分子であり、脂質は、主要な生体分子脂質として、細胞膜の形成、細胞のシグナル伝達およびエネルギーの貯蔵などの重要な生物学的機能を果たす。生体系における脂質の理解を深めるために、生体系における脂質種の構造同定、空間的および時間的分布に関して完全に特徴付けることを目的に、リビドミクスという分野が強力なツールとして登場した。最先端の脂質分析は、タンデム MS (MS^n 、こ

20

【0149】

MS 脂質分析の 1 つの応用法は、例えば、II 型糖尿病および自閉症に対する、疾患バイオマーカーの発見におけるものである。より効果的なバイオマーカーの探索が進歩するにつれて、最小のサンプル調製での高レベルの脂質構造情報の必要がますます重要になり、分析化学者にとって難しい問題を生み出している。例えば、脂肪酸アシル (FA) 上の $C=C$ 結合の位置が、リン脂質 (PL) とコレステロールとの相互作用およびタンパク質結合において絶対必要な因子 (integral factor) として登場しているが、最も商業的に入手可能な MS プラットフォームは、飽和度に対するデータを提供できるが、 $C=C$ の位置は、仮定されることが多く、報告されないことが多い。

30

【0150】

MS 法を用いて $C=C$ の位置を決定するための方法は、いくつか存在し、タンデム MS または化学誘導体化の利用のように広くカテゴリー化され得る。タンデム MS の例としては、高エネルギー CID ($>1 \text{ keV}$) タンデム飛行時間型 (TOF)、リニアイオントラップ (LIT) タンデム MS および LC-イオン移動度タンデム MS が挙げられる。化学誘導体化戦略は、 $C=C$ 結合を直接特定するために使用される結合特異的反応を必要とする。文献における卓越した方法は、オゾン反応を必要とし、ここで、LC 分離後の液相オゾン分解、エレクトロスプレーブルーム内でのオゾン分解 (OZEI)、お

40

よびオゾン誘起解離 (OZID) と呼ばれる、減圧下での質量選択イオンをはじめとしたいくつかの変法が報告されている。

【0151】

本明細書中の本発明の方法は、不飽和 FA および PL の $C=C$ 結合の分析のために、ある形態のパターノ・ビューチ (P-B) 反応を用いる、オンライン誘導体化を必要とし得る。その P-B 反応は、ナノ ESI プルームの紫外線 (約 250 nm の UV 照射)、およびその後の光励起したアセトンと脂肪酸アシルのオレフィン官能基との間での分子間の [2+2] 付加環化 (cycladdition) によって実施されて、オキセタン生成物を生成し得る。そのオキセタン反応生成物に対する低エネルギー CID によって、元の $C=C$ の位置に 26 ダルトン (Da) の間隔をあけて 2 つの診断用フラグメントイオンが生

50

成された（反応の概略図のスキーム 1 を参照のこと）。

【0152】

この実施例は、連続フロー型光化学マイクロリアクターを用いて本発明の方法を実行することに焦点を当てる。分析化学では、光化学反応容器は、液体クロマトグラフィーにおけるカラム後の反応を介した電気化学的検出における感度および選択性を高めるために広範に使用されてきた。フロー型の光化学は、有機合成における発展途上の分野でもあり、そのフロー型の光化学では、従来のバッチ反応容器を、溶液を主に内径<1mmのキャピラリーに連続的に流すことに置き換えるか、またはそれによって高められる。分子間の光付加に加えて、分子内の[2+2]連続フロー型光化学反応のフロー型化学の文献に例がいくつかある。連続的な溶液流をマイクロリアクターの寸法と組み合わせることにより、溶液のUV曝露を正確に制御できるようになり、過度のまたは不均一なUV曝露による望まれない副生成物を減少させることによって、生成物の収率を上昇させることができる。

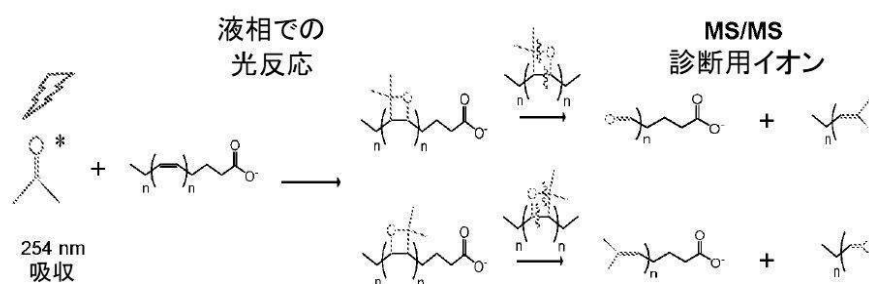
【0153】

この実施例では、一不飽和ホスファチジルコリン(PC) 16:0_18:1(n-9Z)を、曝露時間、流速および溶媒組成を含む種々の実験条件下で反応収率を調査するためのモデル系として使用した。6秒間の累積UV曝露および4.5μL/分のフローにおいて、7:3アセトン:H₂O 1%酢酸中の5μM PC 16:0_18:1(n-9Z)で、50%という最大収率が達成された。酢酸の代わりにNH₄OHを含む塩基性条件下の負イオン化モードにおいて、オレイン酸(n-9Z)およびホスファチジン酸(PA) 18:0_18:1(n-9Z)に対する比較収率も得た。さらに、この反応は、0.1~4.5μL/分の流速範囲およびPLの液体クロマトグラフィー分離にとって妥当な種々の溶媒条件下で首尾良く実行された。最後に、このP-B反応を、商業的に購入した酵母極性脂質抽出物の複雑な混合物の分析に適用したところ、ESIタンデムMSを介して35個の不飽和PLに対してC=Cの位置が特定された。

【0154】

下記のスキーム 1 は、UVによって励起したアセトンと一不飽和脂肪酸との間の反応を示している。オキセタン環が形成されて、MS/MSの衝突誘起解離(CID)において診断用イオンが生成され、そのイオンがC=C結合の位置を特定する。

【化1】



スキーム 1

【0155】

脂質命名法: Lipid Maps プロジェクト (Fahyら, J. Lipid Res. 2009, 50, S9) ならびに Blanksby および Mitchell による近著 (S. Anal. Bioanal. Chem. 2015, 1) の簡単な表記法を脂質の構造同定に使用した。PL 標準物質に対して、頭部基、脂肪酸アシルの立体位置、炭素数、不飽和度およびC=C立体配向を特定した。例えば、PC 16:0_18:1(n-9Z)は、グリセロールのsn1およびsn2位にそれぞれ16および18炭素の脂肪酸アシル鎖を有するグリセロホスホコリン頭部基を表す。炭素数の後の「0」および「1」とは、脂肪酸アシルの不飽和度のことを指す。末端の炭素からアシル鎖のエステルに向かって連続した炭素の数を数えることによって、C=C結合の位置を特定した。すなわち、n

－9位のC=C結合は、脂肪酸アシルの炭素9と10の間に配置されている。C=C結合の立体配置に対するZおよびE命名法は、C=Cの位置の識別子の後に続く。酵母抽出物におけるPL分析の場合、sn1およびsn2脂肪酸アシルの位置は、任意に割り当て、アルケンのZおよびE立体配置は、割り当てなかった。

【0156】

化学物質：標準的な脂質および酵母極性抽出物のすべてを、10または25mg/mLのクロロホルム溶液としてAvanti Polar Lipids, Inc. (Alabaster, AL, USA)から購入した。1-パルミトイル-2-オレオイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン(PC16:0_18:1(n-9Z))、1-ステアロイル-2-オレオイル-sn-グリセロ-3-ホスフェート(PA18:0_18:1(n-9Z))およびcis-9-オクタデセン酸(octadenoic acid)(オレイン酸(n-9Z))を標準物質として使用した。クロロホルム溶液の原液をイソプロパノール(LCグレード;Macron Fine Chemicals;Center Valley, PA, USA)で希釈した後、最終的な使用溶液(working solution)に希釈した。ESIの使用溶液において使用した主要な有機溶媒は、すべてLCグレードであり、アセトン(Macron Fine Chemicals)、メタノール(Macron Fine Chemicals)、アセトニトリル(Sigma Aldrich;St. Louis, MO, USA)、ヘキサン(95%n-ヘキサン;Avantor;Center Valley, PA, USA)およびイソプロパノールからなった。超高純度のH₂Oを、0.03μS・cmの精製システム(モデル: CASCADA AN MK2;Pall Life Sciences;Port Washington, NY, USA)から入手した。水酸化アンモニウム(NH₃として28~30%;Macron Fine Chemicals;Center Valley, PA, USA)および氷酢酸(Mallinckrodt Chemicals;Hazelwood, MO, USA)を、それぞれ(respectfully)ネガティブおよびポジティブESIモードにおける脂質のイオン化を高めるために溶液改質剤(solution modifiers)として使用した。

【0157】

P-B反応および直接注入ESI:185nmの発光がフィルタリングされる、20mA、2.54cmのランプ長、0.95cm直径の二重管低圧水銀(LP Hg)ランプ(モデル番号:80-1057-01;BHK, Inc.;Ontario, CA)を使用して、PB反応を惹起した。製造者からのランプの仕様書には、20cmの距離における254nmの主要な発光強度は60μW/cm²であると記載されている。

【0158】

シリンジポンプ(ポンプ11 Elite;Harvard Apparatus;Holliston, MA, USA)を用いて、脂質溶液で満たされたシリンジ(気密シリンジ、1700シリーズ;Hamilton Company;Reno, NV, USA)を注入した。フッ素化エチレンプロピレン(FEP)管、FEP管のスリーブ、ポリエーテルエーテルケトン(PEEK)付属品およびPEEKジャンクション(IDEX Health and Science;Oak Harbor, WA, USA)を用いて、シリンジと溶融石英とを接続し、次いで、それをESI源に接続した。溶融石英(part1068150140;外径363μm、内径100μm;Polymicro Technologies/Molex;Phoenix, AZ, USA)は、製造者が提供する仕様書によると、310nmにおいて>10%のUV透過率を可能にするフルオロポリマーコーティングからなった。≥1μL/分の流速を用いる実験には市販のESI源を使用した(Turbo VTM;Applied Biosystems/Sciex;Toronto, Canada)。ガス1、ガス2およびインターフェースヒーターをすべての実験でゼロに設定した。<1μL/分の流速のために、チップ内径が8μmの溶融石英ナノESIチップ(New Objective;Woburn, MA;USA)を使用した。ステンレス鋼ユニオン(Valco;Houston, TX, USA)を用

いて、溶融石英ナノESIチップとUV透過性溶融石英とをつなぎ、それは、印加される高電圧DCに対する位置でもあった。溶液の調製およびMSの条件のさらなる詳細は、補足情報に見られる。

【0159】

結果

不連続な曝露を介するP-B反応とオンラインESI MSnを実施するためのこの実施例での構成を図24に示す。この配置は、UV曝露の程度を変動させるときの実験条件に対する妨げが最小であることに起因して探索的研究に最適であると考えられた。表面積：体積比が20,000 m²/m³（マイクロリアクター寸法）である、フルオロポリマーでコーティングされた溶融石英キャピラリー（内径100 μm）をESI源に接続し、UV透過性材料として利用した。溶融石英を、直径2.5 cmの高密度ポリエチレンチューブに巻きつけ、一巻きに対して1 cmの長さがランプに曝露されるように、アルミニウム箔を用いて、その溶融石英を永久に覆った。それぞれの露出部分から0.5 cmの距離にランプを配置し、不連続な部分をアルミニウム箔で覆う／覆わないことによって、累積曝露時間を制御した。UVに曝露される溶融石英管の総容積をサンプルの流速で除算することによって、累積曝露時間を決定した。

【0160】

図24における構成を用いてP-B生成物の形成速度を調べるために、7：3アセトン：H₂O 1%酢酸中に5 μM一不飽和PC16：0_18：1（n-9Z）を含むN₂パージ溶液をモデル系として使用した。各曝露時間に対して、反応を数分間実施し、定常状態の反応条件から平均されたスペクトルから、報告されたイオン強度を得た。生成物およびプリカーサーに対して同じイオン化効率を仮定して、反応中のP-Bの強度を反応前のプリカーサー強度で除算することによって、反応収率を推定した。サンプルをUV光に曝露する前のMS¹スペクトルは、m/z 760.6にプリカーサーシグナルを示し（図25A）、6秒間の累積UV曝露を行うと、m/z 816.6にP-B反応生成物が、主要な反応生成物として観察された（図25B）。m/z 816.6のビーム型CIDは、m/z 650.6および676.5におけるC=Cの位置推定のための診断用イオンに加えて、m/z 184.136のホスホコリン頭部基を明らかにした（図25C）。これらの診断用イオンは、アセトンからのアルデヒド（m/z 650.6）またはC（CH₃）₂（m/z 676.5）で置換された一不飽和脂肪酸アシルからC₉H₁₈が失われることに対応する。これらのイオンは、C=Cの位置が18 C脂肪酸アシル上の9炭素と10炭素との間に存在することを明らかに示している。

【0161】

MS¹反応スペクトルでは、m/z 100～300の低存在比の化学ノイズに加えて、比較的低い強度の副反応が、m/z 802.6および876.6に観察された。m/z 802.6は、アセトンの光誘起ホモリテック開裂に起因するNorris型反応およびその後の脂肪酸鎖におけるC=C結合との共有結合性の反応と関連すると考えられる。m/z 876.6の反応生成物は、現在のところ不明であるが、P-B生成物に対する非共有結合性のアセトン付加体由来するかもしれない。観察された反応現象が、図24における実験装置に起因しなかったことを確かめるために、連続的なUV曝露のための実験構成を実行した。約9秒間の反応に対する不連続なUV曝露と連続的なUV曝露との間のMS¹スペクトルの比較によって、同様の反応現象が明らかにされたことから、それらの副反応が、不連続なUV曝露の人為的結果ではなかったことが確認された。

【0162】

バッチ条件と比べたときのフロー型光化学の利点の1つは、サンプルのUV曝露を高度に制御できる点であり、それは、望まれない副反応を最小限に抑えることができ、長時間にわたって一定したイオン強度を維持できる。これは、低存在比のイオンシグナルを平均する目的で長い注入時間が必要とされることが多いショットガンリピドミクス研究に対して重要な意味を持つ。フロー型光化学の構成の長い反応時間に対する能力が、6秒間の累積曝露の場合のプリカーサーおよびP-B生成物のピーク面積の抽出イオンクロマトグラ

ム (XIC) を介して図 25D に示される。図 24 における装置を用いる典型的な実験の場合、UV 曝露の点から MS インレットまでの総滞留時間は、 $4.5 \mu\text{L}/\text{分}$ の流速において約 1.2 分であった。ゆえに、光子が PB 反応を惹起し、ランプを消すことでクエンチされることを確認する反応生成物のタイミングが、予測できた。いったん P-B 反応生成物が観察されると、定常状態反応条件に達するのに約 1 分が必要であり、これは、6 秒間の不連続なサンプル曝露に対する全ループ内におけるおよその総滞留時間であった。定常状態の反応条件における約 2 分間のイオン電流のゆらぎが小さいことは、低存在比のイオンシグナルを平均するための長い分析時間の実行可能性を実証する。

【0163】

UV 曝露の関数としての P-B 生成物形成の限界を調べるために、プリカーサーおよび P-B 生成物の強度を約 1 秒の増分で記録した (図 25E)。1 分を超える定常状態反応条件について平均された反応スペクトルのピーク高さから強度の値を得た。それらの条件では、P-B 反応収率の線形増加が、4 秒まで観察され、7 秒後にプラトーが 50% 反応収率で観察されるまで、傾きが減少し始めた。同様のアセトン系に対する収率は、過剰なアセトンおよび長い反応時間 (> 2 時間) において、シクロペンテン (28%) およびシクロヘキセン (8%) について報告された。したがって、オレフィン生成に対する本明細書中の収率が、文献における以前の報告と比べて妥当であったことが見出された。

【0164】

酸性条件下の正イオン化に加えて、多くの脂質が、リン酸の容易な脱プロトン化に起因して、塩基性溶液条件下の負イオン化 ESI-MS で分析される。負イオン化において P-B 反応を調べるために、オレイン酸 (n-9 Z) を、図 24 と同じ実験構成を用いて、7:3 アセトン:H₂O 1% NH₄OH (5 μM) の N₂ パージ溶液中のモデル化合物として使用した。図 26A は、 m/z 281.2 のプリカーサーシグナルを示している MS¹ スペクトルであり、図 26B は、6 秒間の累積 UV 曝露後の MS¹ 反応スペクトルであった。 m/z 323.3、395.3 および 397.3 における小さいピークに加えて、 m/z 339.3 に大量の P-B 生成物が観察された。P-B 反応生成物 (m/z 339.3) に対するビーム型 CID は、FA 上の炭素 9 と炭素 10 との間に C=C 結合を位置づける m/z 170.1 および 197.1 の C=C 診断用イオンを示した。それらの m/z 値は、アセトンからのアルデヒド (m/z 170.1) または C(CH₃)₂ (m/z 197.1) で置換された一不飽和脂肪酸アシルから C₉H₁₈ が失われることに対応する。所与の実験条件に対するオレイン酸および P-B 生成物の強度の時系列グラフの知見は、P-B 生成物が約 6 秒間の UV 曝露において 40% 収率でプラトーに達することを明らかにした (図 26D)。さらに、PA 18:0-18:1 (n-9 Z) を用いた負イオン化実験も、40% の収率をもたらした。このことから、一不飽和 PL および FA に対する P-B 反応収率が、関連する溶液の pH およびイオン化極性とは無関係であることが実証される。

【0165】

P-B 生成物の収率を上げるために、直接注入の前に溶液に N₂ をパージした。N₂ パージは、溶液から酸素を排除するための確立された方法であり、蛍光の定量的測定において日常的に用いられている。溶液中の基底状態の分子状酸素は、エネルギーの衝突移動を介する効率的な 3 重項ラジカスカベンジャーであり、蛍光強度の測定値を低下させる。溶液中に酸素が存在することが、P-B 反応収率も低下させると立証されている。7:3 アセトン:H₂O 1% 酢酸中の 5 μM PC 16:0-18:1 (n-9 Z) に N₂ パージを行わないと、低 m/z 値に観察される化学ノイズに加えて、 m/z 650.4、622.4 および 606.4 に副反応ピークが観察される。P-B 反応収率は、約 2 秒の曝露時間の後に約 10% という最大値に達する。このデータは、オンライン P-B 反応を実施する前に酸素の溶液をパージすることが、所与の実験条件下での P-B 収率を最大にする際に重要であることを示している。

【0166】

連続フロー型 P-B 反応の実験構成の性能をさらに調べるために、曝露時間を 5 秒に固

10

20

30

40

50

定したときの流速の関数として収率を測定した（図 27A）。絶対イオン強度が流速とともに変化するがゆえに同じグラフ内で直接比較できないので、定常状態の条件の反応中における強度比 $[P-B \text{ 強度} / (P-B \text{ 強度} + \text{プリカーサー強度})]$ を y 軸に使用した。同じグラフにおいて、溶融石英ナノESIチップ（内径 $8 \mu\text{m}$ ）を $100 \sim 750 \text{ nL} / \text{分}$ のために使用し、それより速い流速では市販のESI源を使用した。強度比の極値は、 $0.4 \sim 0.6$ の範囲であるが、しかしながら、大部分は $0.45 \sim 0.55$ であり、これは、ほぼ2桁の流速範囲にわたって一貫したP-B生成物形成と良く一致する。

【0167】

上記データにおいて観察された1つの傾向は、各源に対して、より遅い流速を用いたときの強度比のわずかな低下である。この低下は、以前にP-B収率を低下させると実証された、より遅い流速では大気中の酸素が溶液ラインに多く拡散する結果であると推測される。さらに、2つのイオン化源の間で異なる強度比が観察され、これは、実験装置および条件の差、例えば、曝露の長さおよびランプの位置によって生じ得る。それにもかかわらず、上記データは、ほぼ2桁の流速範囲にわたって強度比が比較的一定であることを示し、これは、分析応用の可能性の範囲を拡大する。

【0168】

これまで、7:3アセトン:H₂O 1%酢酸という固定された溶媒条件で反応条件を探索してきた。しかしながら、実際には、種々の溶媒条件がESI MS脂質分析に使用される。CHCl₃は、生物学的抽出のための溶媒として使用されるので、最も一般的な直接注入脂質溶媒であり、良好な脂質イオン化効率も提供する。残念なことに、CHCl₃の存在は、P-B反応収率には有害であるので、他の妥当な溶媒系を調べた。

【0169】

本明細書中に報告される体系的調査は、70:15:15アセトン:H₂O:溶媒 1%酢酸および6秒間のUV曝露において、 $5 \mu\text{M}$ PC16:0_18:1 (n-9Z) に溶媒としてメタノール、イソプロパノール、アセトニトリルおよびヘキサンの添加を含んだ（図 27B）。すべての溶媒が、リン脂質の順相および逆相LC分離の両方にとって妥当であり、ギ酸アンモニウム（酢酸の代わりに使用した）が、共通のLC-MS移動相の塩である。結果から、より小さいおよびより極性の溶媒、例えば、アセトニトリルおよびメタノールが、H₂Oおよびアセトンを含むPL溶液に加えられたとき、約10%の収率をもたらした、より大きいおよびより極性の低い溶媒（IPAおよびヘキサン）と比べて、より高いP-B収率（25%）をもたらしたことが示された。IPAおよびヘキサンを用いたとき観察された低い収率は、脂肪酸アシル鎖の溶媒和のためのアセトンとの競合に影響を与え、したがって、励起したアセトンがオレフィン官能基と反応する確率が低下すると推測される。さらに、UVによって励起したアセトンを用いたときに、ヘキサンからの水素引き抜きなどの競合する反応経路が生じ、ゆえにP-B収率が低下することが知られている。最小のアセトン溶媒比に関する調査から、1:1 H₂O:アセトニトリル1%酢酸中の1%アセトンに対して10%のP-B収率が明らかになった。モディファイヤーを含んで<1のアセトン:H₂O比の場合、PC16:0_18:1 (n-9Z) に対するイオン化効率は悪かったが、アセトニトリルを加えると、イオン化効率は大幅に上昇した。これらの実験は、P-B反応をLC溶媒と連結する実行可能性を実証し、それは、P-B反応をオンラインLC-MSと連結することを可能にする。

【0170】

この実施例におけるP-B反応の観察は、これまで、制御された条件下で標準的な脂質を用いて行われてきた。生物学的サンプルのリピドミクス応用において、顕著な方法は、ほとんどサンプル調製せずに脂質抽出物を質量分析計に直接注入することである。生物学的材料の脂質抽出物は、P-B反応の有効性を潜在的に低下させ得る、標準液と比べて数桁高い化学的複雑さを有する。しかしながら、P-B反応の利点は、タンデムMS中に診断用イオンが生成される点であり、これによって、個々のPL種におけるC=Cの特定における高い選択性および感度が可能になる。

【0171】

10

20

30

40

50

P-B反応が生物学的抽出物に適用できることを、7:3アセトン:H₂O 1%酸/塩基モディファイヤー(0.1mg/ml)に希釈された、商業的に購入した酵母極性脂質抽出物の直接注入によって実証した。製造者に従って、アセトンおよびジエチルエーテルを、ジエチルエーテル相中のPL内容物とともに、クロロホルム:メタノールの全抽出物に加え、それを濃縮し、クロロホルムに溶解した。PLの分析のために、まず、三連四重極プリカーサーイオンスキャンおよびニュートラルロススキャンを用いて、特徴的なフラグメンテーション経路によってPL種の頭部基を特定した。次いで、LIT MS³走査を利用して、脂肪酸アシル鎖の長さおよび飽和度を特定した。最後に、サンプルを6秒間のUV照射に曝露し、不飽和脂質のP-B生成物に対して予測されるm/zを、C=C診断用イオンの検出のためにLIT MS³走査に供した。

10

【0172】

負イオン化の場合の酵母脂質抽出物に対するMS¹LITスペクトルを図28A~Bに示す。UVへの曝露の前に、PL種に対する大量のシグナルが観察され(図28A)、UV照射中に、赤色フォントで示されるスペクトルにおいていくつかのP-B反応ピークが観察される(図28B)。MS¹反応スペクトルにおいて明らかに観察されなかった反応生成物は、三連四重極およびプロダクトイオンの走査からのPLの同定に基づいて、P-B反応生成物に対するm/z予測値によってさらに分析できた。例えば、図28C~Eは、P-B反応生成物m/z 774.5における異性体PE18:0_16:1(n-7)およびPE16:0_18:1(n-9)に対するタンデムMSスペクトルを示している。m/z 774.5のビーム型CIDは、飽和および一不飽和脂肪酸アシルのフラグメントイオン(それぞれm/z 283.2、255.2および281.2、253.2)に加えて、m/z 311.2および339.2のフラグメントイオンを生成した(図28C)。図28Bのm/z 339.2のMS³イオントラップCIDは、m/z 171.0および197.1の診断用イオンとともに、18-C一不飽和脂肪酸アシルのフラグメントイオン(m/z 281.2)を示したことから、n-9位におけるC=C結合が示唆された(図28D)。さらに、図28Bからのm/z 311.2のMS³イオントラップCIDは、m/z 171.0および197.1の診断用イオンとともに、16-C一不飽和脂肪酸アシルのフラグメントイオン(m/z 253.2)を示したことから、n-7位におけるC=C結合が示唆された(図28E)。表6は、記載されたように分析された酵母極性抽出物中でC=Cの位置が特定された35個の不飽和PLの要旨である。これらの結果は、C=C診断用イオンの高感度の検出をもたらす、バックグラウンドノイズの減少におけるMS³CIDの能力を示している。

20

30

【表 6】

表 6

リン脂質	モノアイソトピック質量
PC 16:0_16:1(<i>n</i> -7)	731.6
PC 16:1(<i>n</i> -7)/16:1(<i>n</i> -7)	729.5
PC 16:1(<i>n</i> -7)/18:1(<i>n</i> -9)	757.6
PC 16:0_18:1(<i>n</i> -9)	759.6
PC 18:0_16:1(<i>n</i> -7)	759.6
PC 18:1(<i>n</i> -9)/18:1(<i>n</i> -9)	785.6
PE 16:1(<i>n</i> -7)/16:1(<i>n</i> -7)	687.5
PE 18:0_16:1(<i>n</i> -7)	717.5
PE 16:0_18:1(<i>n</i> -9)	717.5
PE 16:1(<i>n</i> -7)/18:1(<i>n</i> -9)	715.5
PI 16:0_16:1(<i>n</i> -7)	808.5
PI 16:1(<i>n</i> -7)/16:1(<i>n</i> -7)	806.5
PI 16:1(<i>n</i> -7)/18:1(<i>n</i> -9)	834.5
PI 16:0_18:1(<i>n</i> -9)	836.5
PI 18:0_16:1(<i>n</i> -7)	836.5
PI 18:0_18:1(<i>n</i> -9)	864.6
PI 18:1(<i>n</i> -9)/18:1(<i>n</i> -9)	862.6
PA 16:0_16:1(<i>n</i> -7)	646.5
PA 16:1(<i>n</i> -7)/16:1(<i>n</i> -7)	644.4
PA 16:0_18:1(<i>n</i> -9)	674.5
PA 16:1(<i>n</i> -7)/18:1(<i>n</i> -9)	672.5
PS 16:0_16:1(<i>n</i> -7)	705.5
PS 16:1(<i>n</i> -7)/16:1(<i>n</i> -7)	703.4
PS 18:0_16:1(<i>n</i> -7)	733.5
PS 16:0_18:1(<i>n</i> -9)	733.5
PS 16:1(<i>n</i> -7)/18:1(<i>n</i> -9)	731.5
LPC 16:1(<i>n</i> -7)	493.3
LPC 18:1(<i>n</i> -9)	522.4
LPE 16:1(<i>n</i> -7)	451.3
LPE 18:1(<i>n</i> -7)	479.3
LPI 16:1(<i>n</i> -7)	570.3
LPI 18:1(<i>n</i> -9)	598.3
LPA 18:1(<i>n</i> -9)	436.3
LPS 16:1(<i>n</i> -7)	495.3
LPS 18:1(<i>n</i> -9)	523.3

10

20

30

【0173】

結論

不飽和脂質における C = C 結合の位置を特定するために、代表的な [2 + 2] パターンのビュッチ反応をオンライン ESI-MSⁿ に結合するための方法を示した。流速、溶媒組成および UV 曝露時間をはじめとした一連の ESI-MS 条件について、反応の限界を探索した。50% という最高収率が、7 : 3 アセトン : H₂O = 1% 酢酸において 6 秒間の累積 UV 曝露を用いたとき、5 μM PC 16 : 0_18 : 1 (n-9 Z) で達成された。負イオンモードにおけるオレイン酸および PA 18 : 0_18 : 1 (n-9 Z) の塩基性溶液で、40% という収率が得られた。溶液中に分子状酸素が存在すると P-B 反応収率が低下したので、分析の前に溶液に N₂ をパージした。その反応は、0.1 ~ 4.5 μL/分の流速範囲において首尾良く実行され、比較的一定した反応生成物の形成を示し

40

50

た。さらに、LC分離において日常的に使用される、アセトニトリル、メタノール、イソプロパノールおよびヘキサンなどの代替溶媒を加えることによっても、P-B反応を行った。最後に、酵母極性抽出物の複雑な混合物のオンライン分析へのこの方法の適用が実証された。反応環境が、上記モデル系と比べてかなり複雑であったにもかかわらず、合計35個の不飽和リン脂質のC=Cの位置が特定された。このような研究から、本明細書中の本発明が、複雑な混合物中の脂質のC=Cの決定のために、カラム分離後のティー接合部を介して、P-B反応をオンラインLC-MSと連結することを達成することが可能になる。

【0174】

実施例12：組織中の不飽和脂質のプロファイリング

単純な手順を用いた質量分析(MS)による直接組織分析は、リピドミクス分析、特に、異性体脂質の不飽和に関する研究のためのリピドミクス分析を加速させる際に鍵となる工程である。この実施例では、まず、組織由来の不飽和脂質の異性体構造を、体系的な構造プロファイルを用いて、オンラインのパターノ・ビューチ(P-B)反応および抽出スプレー質量分析によって実行されたアンビエント質量分析によって単一工程で直接決定した。大きな塊の組織にステンレス鋼ワイヤを刺し、次いで、ESI-MSによる抽出、反応および検出のための溶媒が予め充填されたナノESIキャピラリーに浸漬することによって、脂質を直接抽出した。UV光($\lambda = 254\text{ nm}$)を用いてP-B反応を促進することにより、元のC=C結合(bound)の位置にオキセタン環が付加された反応生成物イオン(+58 Da)が形成され、それはその後、CIDによって開裂されて、特徴的なフラグメントイオンが生成する。広範なダイナミックレンジの濃度(ラット脳における全脂質の0.0013%~0.5%)の脂質の不飽和が、良好な再現性で特定され得る(検出される脂質の異性体比: RSD<10%、1つの組織の同じ領域においてサンプリング; RSD<21%、同じタイプの組織の同じ領域においてサンプリング)。本方法のサンプル消費は、10 μg /サンプルという少なさで達成され得るので、不飽和脂質の異性体比を、まず、ラット脳および腎臓に対してマッピングした。リゾホスファチジン酸(lysophosphatidic acid)(LPA) 18:1およびホスファチジン酸(phosphatidic acid)(PA) 18:1-18:1の異性体比の有意差が、ラット脳の異なる領域において観察されたが、脂肪酸(fatty acid)(FA) 18:1の異性体比は、ラット脳および腎臓の両方において比較的安定していた。

【0175】

本研究は、まず、パターノ・ビューチ反応と抽出スプレー質量分析との統合によって、C=C結合の位置とともに、組織由来の脂質の構造を直接決定した。サンプル消費が、約10 μg という少なさであるので、小領域(0.5 mm×0.5 mm)における脂質の異性体を迅速に測定することができ、まず、脳および腎臓における異性体比の2次元(2D)マップとしてプロファイルできる。この手法は、組織の生物学的機能、生合成経路およびそれによる組織の病状に対する脂質の不飽和の影響を理解するために不飽和脂質をモニターするための有力なプラットフォームを提供する。

【0176】

諸言

脂質は、細胞膜の発生、エネルギーの産生および貯蔵、ホルモンの産生、疎水性環境における膜タンパク質の隔離および保護、ならびにそれらの自己集合および集団的挙動を介した細胞のシグナル伝達プロセスにおいて緊急の物理化学的特性を示す天然に存在する分子群である。脂質の不飽和、すなわち、C=C結合の数および位置は、脂質の形状を決定する重要なパラメータの1つとして、膜透過性、膜貫通構造および酵素作用との関連において細胞膜の湾曲に影響することによって組織の生物学的機能および病状と密接に関係する。例えば、膜内の秩序化は、C=C結合がアシル鎖の中央に位置するとき、最も弱いと見出されたので、膜の流動性を高める。さらに、脂質のメチル末端から3番目に位置するシグニチャC=C結合とともに18~22個の炭素を含むオメガ-3脂肪酸が、脳の発達において重要であること、ならびに冠動脈心疾患の一次および二次予防の試験(tr

ils)の両方において心保護機能を発揮することが見出された。しかしながら、C=Cの位置の特定は、なおも大きな難題であり、分子構造をプロファイルするためおよび脂質の異性体を考えられる多くのものと識別するための信頼できる分析プラットフォームが必要とされている。

【0177】

対照的に、質量分析(MS)は、詳細な分子情報を提供できるので、その高感度、選択性および広い質量範囲に起因して、個々の脂質の同一性の判断および量の測定において広く使用されている。MS分析の前に高エネルギーの衝突誘起解離(CID)による脂質の直接的なフラグメンテーションまたは化学誘導体化を用いてC=C結合を測定するための、MSに基づく一連の方法が開発された。通常、脂質は、MS分析の前にいくつかの工程において抽出、分離および精製される必要があり、それには、最大1日にわたる研究室での集中的な作業が必要であり得る。このタイプの多工程の手順は、大きなバッチのサンプルの分析ではうまくいく。一方、一工程ベースの戦略としてのアンビエントイオン化質量分析は、標的の分析種を分析する際に望ましい成績を示した。

【0178】

アンビエントイオン化質量分析では、分析種は、最小のサンプル調製で、その本来の状態のサンプルから直接イオン化され、MS分析のための気相に送られる。多くのアンビエントイオン化法(例えば、脱離エレクトロスプレーイオン化質量分析(DESI)、マトリックス支援二次イオン質量分析、プローブエレクトロスプレーイオン化(PESI)、マトリックス支援レーザー脱離エレクトロスプレーイオン化(MALDESI)、簡単なアンビエントソニックスプレーイオン化(easy ambient sonic-spray ionization)(EASI)、大気圧赤外マトリックス支援レーザー脱離イオン化(AP IR-MALDI)、ペーパースプレー、ならびに針生検およびスプレーイオン化)が開発され、直接脂質分析、ならびに組織上の分布の2次元(2D)イメージングに応用された。二重結合の位置の決定におけるアンビエントイオン化質量分析の適用は、低温プラズマイオン化質量分析(LTP-MS)によって細菌サンプル由来の微生物の脂肪酸エチルエステル混合物において最初に達成された。しかしながら、組織サンプル中の二重結合の直接的な位置特定にほとんど前進しなかった。加えて、脂質濃度の分布が、多くの強力なイメージングプラットフォームによって高分解能で首尾よくプロファイルされたが、異性体脂質の比率と組織の領域との関係性は明らかにならないままであった。

【0179】

この実施例では、組織サンプル由来の不飽和脂質の異性体構造を、アンビエント質量分析によって、体系的な構造プロファイルを用いて初めて直接決定し、これは、抽出スプレーおよびオンラインのパターノ・ビューチ(P-B)反応によって実行された。また、脂質の異性体比の空間分布を初めてラット脳および腎臓においてイメージングした。

【0180】

サンプルの回収：ラットをHarlan Laboratory (Indianapolis, IN, USA)から入手して収容し、呼吸停止時に断頭した。すべての手術を、Purdue University Animal Care and Use CommitteeガイドラインおよびARRIVEガイドラインに従って行った。脳、腎臓および肝臓を含む組織を身体から取り出し、直ちに-80℃で凍結した。分析の前に、組織を-20℃の冷凍庫内、次いで4℃でそれぞれ1時間、徐々に解凍した。次いで、組織をスライドガラス上に移し、実験で使用するためにアイスボックス内で保管した。

【0181】

脂質のサンプリング、抽出およびイオン化：図29Aに示されているように、組織の直接分析のために抽出スプレーを実行した。組織生検と類似の手順を用いて、ステンレス鋼ワイヤ(外径200μm)を組織に約2mmの深さまで挿入し、次いで、ナノESI用のプルドチップ(pulled tip)を用いてガラスキャピラリー(外径1.5mmおよび内径0.86mm)内の20μLの溶媒に浸漬した。溶媒を、リン脂質にはアセトン：

アセトニトリル：水（ $v : v : v = 70 : 20 : 10$ ）として、脂肪酸にはアセトン：水（ $v : v : v = 70 : 30$ ）として調製した。次いで、サンプリングされた脂質をその溶媒に移し、そのワイヤに 1.8 kV DC を印加して、ナノESIを行った。

【0182】

質量分析法：すべての質量スペクトルを、QTrap 4000 三連四重極／リニアイオントラップハイブリッド質量分析計（Applied Biosystems／Sciex, Toronto, Canada）によって記録した。通常、その4000 QTRAP MSの機器の構成は、以下のとおりであった：カーテングス、 8 psi ；デクラスタリング電位、 $\pm 20 \text{ V}$ ；インターフェースヒーター温度、 40°C ；および走査速度、 1000 Da/s 、リニアイオントラップとしてQ3を使用した。

10

【0183】

タンデム質量分析によって不飽和脂肪酸上の $\text{C}=\text{C}$ 結合の位置を特定するために、パターン・ビューチ（P-B）反応生成物の脂質をQ1四重極アレイによって単離し、次いで、オン共鳴活性化（on-resonance activation）（イオントラップCID）のためにQ3リニアイオントラップに送った。励起エネルギー（AF2）を、各脂肪酸に応じて $30 \sim 70 \text{ V}$ の範囲で設定した。不飽和リン脂質の場合、脂質またはそれらのP-B反応生成物をQ1四重極アレイによって単離し、次いで、ビーム型衝突誘起解離（CID）のためにQ2四重極アレイに向かって加速させた。衝突エネルギー（CE）は、種々の分子種において $25 \sim 50 \text{ V}$ で様々であった。リン脂質の $\text{C}=\text{C}$ の位置の決定は、プロダクトイオンのフラグメントの1つがビーム型（beam-type）CIDによって形成され、Q2において単離され；次いで、 $30 \sim 70 \text{ V}$ のAF2を印加することによってさらなるフラグメンテーションがQ3リニアイオントラップにおいて行われるMS3CIDにおけるスペクトルに従った。

20

【0184】

脂質の同定：報告された文献とタンデムMSスペクトルパターンを比較することによって、脂質の同定を行った。

【0185】

パターン・ビューチ（P-B）反応：低圧水銀ランプ（BHK Inc., Ontario, CA）を用いて、 254 nm のUV照射を適用することにより、不飽和脂質とアセトンとの間のパターン・ビューチ反応を促進した。その低圧水銀ランプは、 $0.5 \sim 1.0 \text{ cm}$ の距離でナノESIチップに対して直交的に配置された。脂質および反応生成物をQTrap 4000によって分析した。

30

【0186】

結果

デザインおよび手順を図29Aに示した。大きな塊の組織にステンレス鋼ワイヤを刺し、次いで、抽出および反応のための溶媒が予め充填されたナノESIキャピラリーに浸漬することによって、脂質を直接抽出した。そのワイヤに高電圧を印加して、ナノESIを行った。 254 nm のUV光の低圧水銀ランプを用いて、元の $\text{C}=\text{C}$ 結合の位置にオキセタン環が付加された反応生成物イオン（ $+58 \text{ Da}$ ）を形成させるためのP-B反応を促進し、その後、その反応生成物イオンをCIDによって開裂させて、特徴的なフラグメントイオンを生成した（図29B）。

40

【0187】

組織からの脂質の抽出プロセスは、ラットの脳、腎臓および肝臓組織における実証として、抽出スプレーによって非常に効率的であることが示された。脂肪酸およびリン脂質は、ESIチップに高電圧を印加したとき、 $m/z 200 \sim 900$ の質量範囲にすぐに現れ、20秒以内に強度平衡に達した。従来の脂質抽出物のスペクトルと同様のMSピークパターンについても、脂質抽出の良好な信頼性が立証された。一方、MSピークパターンは、多様な組織タイプで異なる（図30A～I）。各リン脂質または各リゾリン脂質の頭部基およびアシル鎖は、タンデム質量分析によって容易に特定され得る（図31A～E）。有機溶媒の選択は、極めて重要である。有機溶媒は、脂質に対する良好な溶解度を有する

50

必要があり、エレクトロスプレーに適する必要がある、脂質の高い反応効率を保証する必要がある。溶媒のいくつかの配合を試験した（図32A～E）。70%アセトン：30% H_2O （v：v）ならびに70%アセトン：20%ACN：10% H_2O （v：v：v）の溶媒が、それぞれ脂肪酸およびリン脂質の分析にとって最適な成績を提供すると見出された。

【0188】

脂質の各アシル鎖における個々の二重結合の位置を特定するために、P-B反応を行った。図31A～Bに示されているように、UV光の照射後、不飽和脂肪酸またはリン脂質の強度は、有意に低下したが、多くの新しいピークがP-B反応のプロダクトイオンとして出現した。イオントラップ質量分析法におけるCIDによる逆P-B反応から誘導されたフィンガープリントフラグメントに従って二重結合の位置が示唆された。P-B反応における脂肪酸（FA）18：1のプロダクトイオンとしての m/z 339.3の MS^2 CID質量スペクトルを、図31Cに示した。P-B反応の前および後の MS^2 スペクトルの比較において、 m/z 171.0および197.1ならびに m/z 199.0および225.1の2対の新しく生成されたフラグメントに基づいて、二重結合が、それぞれ脂質のメチル末端から9番目（ $n-9$ ）または7番目（ $n-7$ ）の炭素に存在すると指摘された。切断された不飽和アシル鎖に対するP-B反応のプロダクトイオンの MS^3 CIDスペクトルに基づいて、ホスファチジルセリン（PS）18：0-18：1のアシル鎖18：1においても同じ結果が得られた（図31E）。メタノール（MeOH）またはアセトニトリル（ACN）の添加は、リン脂質の抽出を助けたが、P-B反応生成物の収率は、MeOHまたはACNがUVを吸収して254nmと類似の波長においてラジカルを形成することに起因して様々な程度で減衰した（図33A～C）。興味深いことに、光強度および波長の最適条件をより速く達成させるためにランプを予熱することによって、P-B反応生成物の半増加時間（half growth time）は、1.5分から0.5分に加速した（図34A～B）。

【0189】

反応抽出スプレーは、広範なダイナミックレンジの濃度の不飽和脂質の分析において良好な成績を示した。表7～8に示されるように、ラット脳における3桁にわたる濃度の31個の不飽和脂質が、異性体比について良好な再現性で分析された（ $RSD < 10\%$ 、1つの組織の同じ領域においてサンプリング、 $N = 3$ ）。

10

20

30

【表 7】

表 7

分子名	P-B反応 前後のm/z		脳における 脂肪酸の 分布	異性体 (n=3)				前頭前皮質 (右)(左/右) における 異性体比	脳幹 (左/右) における 異性体比
	前	後							
FA 16:1	253.2	311.2	3.53%	n-7					
FA 17:1	267.3	325.3	0.65%	n-8	n-6			1.7±0.1	0.9±0.1
FA 18:2	279.3	337.3	81.87%	n-9	n-6				
FA 18:1	281.3	339.3		n-9	n-7			2.8±0.06	2.4±0.1
FA 19:1	295.3	353.3	0.34%	n-10	n-8			1.2±0.04	0.8±0.05
FA 20:1	309.4	367.4	4.42%	n-9	n-7			1.5±0.03	1.6±0.1
FA 21:1	323.3	381.3	0.14%	n-12	n-10	n-9	n-8	54.4%:24.2%: 11.4%:10.0%	25.2%:49.1 %:10.0%:15. 7%
FA 22:1	337.4	395.4	0.47%	n-13	n-11	n-9		58.3%:18.6%: 23.1%	37.9%:20.0 %:42.1%
FA 24:1	365.4	423.4	5.20%	n-13	n-11			1.3±0.2	1.5±0.2
FA 26:1	393.4	451.4	1.45%	n-17					

10

20

【表 8】

表 8

分子名	P-B反応 前後のm/z		脳における リン脂質の 分布	異性体 (n=3)		前頭前 皮質(右) における 異性体比 (n-9 / n-7)	脳幹に おける 異性体比 (n-9 / n-7)
	前	後					
LPA 18:1	435.3	493.3	1.75±0.38 nmol/g	n-9	n-7	5.4±0.4	4.6±0.3
cLPA 18:1	417.2	475.2	N/A	n-9	n-7	2.2±0.04	1.7±0.02
LPG 18:1	509.3	567.3	1.70±0.06 pmol 血清中	n-9	n-7	2.1±0.2	1.4±0.04
LPI 18:1	597.3	655.3	5.0±2.2 nmol/g	n-9	n-7	2.4±0.1	2.3±0.04
LPE 18:1	480.3	538.3	0.026%±0.002%	n-9	n-7	3.2±0.3	1.8±0.2
PA 18:1-18:1	699.4	757.4	0.047%±0.002%	n-9	n-7	4.7±0.3	2.3±0.06
PA 18:2-18:0				n-9	n-7		
PA 18:0-18:1	701.4	759.4	0.111%±0.004%	n-9	n-7	6.8±0.2	8.4±0.3
PA 16:0-18:1	673.4	731.4	0.126%±0.007%	n-9	n-7	3.0±0.1	2.6±0.1
PA 16:1-18:0				n-9			
PS (18:1)- 16:1	758.4	816.4	0.002%±0.000%	n-9	n-7	3.7±0.04	3.1±0.1
PS 18:1- (16:1)				n-9			
PS 18:1-16:0	760.3	818.3	0.065%±0.005%	n-9	n-7	4.6±0.01	3.9±0.2
PS 18:1-18:0	788.5	846.5	0.556%±0.018%	n-9	n-7	11.5±0.5	9.5±0.8
PS 18:1-18:1	786.5	844.5	0.144%±0.011%	n-9	n-7	5.3±0.2	3.1±0.1
PS 18:2-18:0				N/A			
PS (20:1)- 18:1	814.5	872.5	0.030%±0.002%	n-9	n-7	2.3±0.2	2.5±0.1
PS 20:1- (18:1)				n-9	n-7		
PS 20:0-18:1	816.5	874.5	N/A	n-9	n-7	4.4±0.2	3.0±0.04
PS 20:1-18:0				n-9	n-7		
PI 18:0-18:1	863.3	921.3	0.125%±0.002%	n-9	n-7	3.0±0.3	1.9±0.1
PI 18:1-18:1	861.3	919.3	0.025%±0.001%	n-9	n-7	2.2±0.2	1.7±0.04
PG 18:0-18:1	775.5	833.5	0.0090%±0.0005 %	n-9	n-7	1.2±0.03	1.7±0.1
PG 18:1-18:1	773.5	831.5	0.0152%±0.0004 %	n-9	n-7	3.1±0.1	2.1±0.2
PG 18:2-18:0				N/A			
PG (18:1)- 16:1				n-9	n-7		
PG 18:1- (16:1)	745.5	803.5	0.0013%±0.0001 %	n-7			
PG 18:2-16:0				N/A			
PE 18:0-18:1	744.5	802.5	0.405%±0.011%	n-9	n-7	3.4±0.01	3.2±0.01
PE 18:1-18:1	742.5	800.5	0.248%±0.008%	n-9	n-7	4.8±0.1	2.9±0.1
PE 18:2-18:0				N/A			

【0190】

さらに、微量レベルの不飽和脂質も、良好な信号雑音比で分析できる。FA 21:1 の場合の全脂肪酸の 0.14% およびホスファチジルグリセロール (PG) 34:2 の場合の全脂質の 0.0013% のように、最も低い存在比の脂質が、ラット脳の直接分析において分析された (図 35A~D)。図 35C~D は、P-B 反応後に二重結合を決定するための FA 21:1 および PG 34:2 の典型的な CID スペクトルを示した。フィンガープリントピークに従って、FA 21:1 の可能性のある 4 つの位置 (n-8、n-9、n-10 および n-12) および可能性のある 2 つの位置 (n-7 および n-9) が見出された。

10

20

30

40

50

【0191】

高感度に加えて、小さなサンプリング面積 (0.04 cm^2) および少ないサンプル消費 (約 $10 \mu\text{g}$) という注目すべき利点の恩恵を受けて、不飽和脂質の異性体比が初めてラットの脳および腎臓に対してマッピングされた。2Dイメージングを行うために、インタクトなラット脳または切開された腎臓を、 $500 \mu\text{m}$ の分解能の方眼紙上に置いた。次いで、サンプリングプローブを、正確な座標位置を用いてその組織に約 2 mm の深さまで挿入した。代表的な異性体比を得るために、各領域の1~3ヶ所から1ヶ所につき3つつサンプリングした。ホスファチジン酸 (PA) $18:1-18:1$ 、リゾホスファチジン酸 (LPA) $18:1$ および FA $18:1$ を、それらの周知のメッセンジャー機能、およびグリセロール-3-リン酸アシルトランスフェラーゼまたはリゾホスファチジン酸アシルトランスフェラーゼ (lysophosphatidyl transferase) が連係して働く分子合成における密接な関係に起因して、標的分子として選択した。ラット脳イメージングのために、選択された14の解剖学的領域 (脊髄、脳幹、小脳、傍片葉 (左および右)、下丘 (左および右)、松果体、頭頂皮質 (左および右)、運動皮質 (motor cortex) (左および右) および嗅覚神経 (左および右) を含む) における上記3つの脂質を対称的に特定し、定量的にマッピングした (図36および37A~D)。PA $18:1-18:1$ のより網羅的なマップを、ラット脳の26の領域における異性体比を用いて図38Cに提供した。少ないサンプル消費のおかげで、50回サンプリングされた後も、脳は良好な状態で維持された (図38D)。

【0192】

興味深いことに、LPA $18:1$ および PA $18:1-18:1$ の異性体比の有意差が、ラット脳の種々の領域において観察されたが、FA $18:1$ の異性体比は、調査中のラット脳と腎臓の両方において比較的安定していた。同様の条件であるが異なるバッチ由来の5つの脳の選択された6つの解剖領域の間で比較したとき、RSDがすべて21%未満であったので、PA $18:1-18:1$ の異性体比の分布の良好な一貫性が実証された。さらに、31種の脂質の特有の異性体比も、同じラット脳の右前頭前皮質と脳幹との間で様々な程度で異なると観察された (図39A~Dおよび表7~8)。この結果は、PA $18:1-18:1$ および LPA $18:1$ を合成するための異性体 FA $18:1$ の選択が、ランダムなプロセスでなく、組織の領域と密接に関係することを示唆し得る。経路は明らかでないが、本プラットフォームは、それを明らかにする大きな可能性をもたらし、組織の機能に対する脂質の不飽和の影響を理解するための裏付けとなるプラットフォームも提供する。さらに、3つの新鮮なラット脳と、 -20°C で14日間凍結された別の3つのラット脳との間のPA $18:1-18:1$ の異性体比を比較することによって、脂質の不飽和に対するサンプル貯蔵の影響も調査した (図40)。下丘 (左および右)、運動皮質 (左および右)、小脳および脳幹を含むラット脳の6つの領域を選択した。サンプルを -20°C で短時間凍結したとき、PA $18:1-18:1$ の安定かつ一貫した不飽和が実証された。

【0193】

結論として、抽出スプレーとP-B反応との組み合わせによって、組織内の不飽和脂質をより網羅的に特徴付けるために、不飽和FA鎖の中の二重結合の位置を直接特定することが可能になった。研究室において複雑な設定が定期的に必要な多工程でのサンプル前処理が、たった1工程のナノスプレーチップに単純化され得る。広範なダイナミックレンジの濃度の複数のタイプの不飽和脂質が、RSD $< 10\%$ という良好な異性体比の再現性でプロファイルされ得る。より重要なことには、小さなサンプリング面積および少ないサンプル消費という注目すべき利点の恩恵を受けて、不飽和脂質の異性体比が初めて2次元でプロファイルされた。反応抽出スプレーは、組織の生物学的機能および病状に対する不飽和脂質の影響を研究するための強力なイメージングプラットフォームを提供する。

【0194】

実施例13：小型質量分析計を用いた直接組織分析および不飽和脂質の特徴付け

ヒト疾患に対するバイオマーカー発見のための有望な分野としてリピドミクスが登場し

た。分子情報が提供され得る直接組織分析は、臨床診断において利用可能であり得る。生物組織由来の脂肪酸および脂質をプロファイリングするために、この実施例では、ポイントオブケア適用のために設計された卓上用のMini12を、直接サンプリングイオン化とともに使用した。脂質の不飽和異性体の相対存在比を定量するために、パターン・ビューチ(PB)反応を用いた光化学誘導体化も実行した。

【0195】

P-B反応は、カルボニルおよびアルケンから4員のオキセタン環を形成する光化学反応である。それは、多くの天然有機物に対して広く使用されている(図41)。図42は、この実施例において組織分析のために使用された設定を示している。直接的なラット組織分析は、抽出スプレー法を用いた。ナノESIスプレー溶媒は、100%メタノールである。* P-B反応スプレー溶媒としてH₂O:アセトン=1:1。

10

【0196】

図45は、標準的な化合物を使用したときのオンラインP-B反応を示している。図46は、ラット脳サンプルを使用したときのオンラインP-B反応を示している。脂質プロファイリングの結果を図43A~Eに示す。図43A、43Cおよび43Eは、3つのラット器官サンプルにおける脂肪酸の脂質プロファイルを示している。図43B、図43Dおよび図43Eは、リン脂質に対する脂質プロファイルを示している。それらの両方が、ナノESI(-)モードを使用した。図44は、ホスホコリンのCIDを示している。そのデータは、脂質プロファイリングが、疾患に対する潜在的なバイオマーカーの特定を支援できることを示している。この抽出スプレー法は、サンプル調製および減圧環境を用いない脂質プロファイリングを発見し得る。

20

【0197】

ヒトの身体において、全脂質の40%が不飽和である。ミニMSシステムと組み合わされたP-B反応は、ラット脳組織の脂肪酸におけるC=C二重結合の位置を高い信頼性で効率的に決定できる。

【0198】

実施例14: 定性的および定量的な脂質分析のために、C=Cの位置の特異性を用いた質量分析法

この実施例は、脂質における炭素-炭素二重結合(C=C)の位置を決定するための方法の開発ならびに定性的および定量的リピドミクスに対するその使用を示す。

30

【0199】

脂質は、構造的に多様かつ複雑な化合物群であり、8つの主要なクラスおよび多くのサブクラスにカテゴリー化され得る(用語はLIPID MAPSに従う)。脂質の構造多様性および細胞、組織または生物における大きなダイナミックレンジに起因して、生物学的サンプルからの完全な脂質組成の分析(リピドーム)は、伝統的に困難であった。MSの進歩、特に、ソフトイオン化法(分離との連係)およびタンデム質量分析(MS/MS)の開発によって、MSベースの脂質分析がリピドミクス研究のための主要なツールになった。注目に値する多くの分析性能指数の中でも、分子構造の高い特異性が、脂質分析のためのMSベースのアプローチの独特の特徴である。例えば、脂質クラス、結合タイプ、脂肪酸アシル/アルキル組成、およびさらに時には脂肪酸アシル/アルキル鎖の位置を含む、脂質のいくつかのレベルの構造情報が、MS/MSから容易に獲得できる。しかしながら、C=C結合の位置およびそれらの配置(cis対trans)の情報は、ほとんどのMSプラットフォームにおけるMS/MSではめったに得られないので、脂質分析に関する科学報告書の大部分において報告も仮定もされない。不飽和脂質は、生物系の全脂質のかなりの割合を占め、それらの物理的特性、化学反応性および生体内変換は、種々の生理学的機能および生理化学的機能と密接に関係する。脂質のC=C結合の位置の異性体が存在し、それが様々な生合成経路を介して生成されるとき、C=Cの位置を決定することができないかまたは不飽和脂質異性体を識別および定量することができないと、C=Cの位置の違いに関連する生化学的および生物学的結果に関する理解が著しく妨害される。

40

【0200】

50

この実施例は、 $C=C$ の位置の特異性、ならびに生物学的サンプル中の広範囲の脂質種に対して不飽和脂質の異性体を定量する能力を提供するMSプラットフォームの開発を例証する。この手法の技術革新は、光化学（パターノ・ビューチ、PB）反応（脂質の $C=C$ に対して高度に特異的な反応性を有する）とESI-MS/MS（ESI：エレクトロスプレーイオン化）とのオンライン連結にある。PB反応生成物が、MS/MSに供されると、 $C=C$ の位置特異的なフラグメントイオンが生成され、それは構造の同定と定量の両方に使用できる。脂質分析のための頑健かつ広く応用可能なプラットフォームを開発するために、オンラインPB-ESIのための強い光反応器のデザイン、脂質の構造分析のための網羅的なMS/MS手順の開発、自動化された同定および定量のためのデータ分析ツール、ならびに小動物由来の種々の組織タイプに対する不飽和脂質の網羅的なデータベースを含む一連の問題が対処される。この実施例は、パターノ・ビューチ（PB）反応とESI-MS/MSとのオンライン連結のための反応/イオン化源の開発および最適化；種々の脂質クラスに対する不飽和脂質の構造決定および定量のためのMS/MS法の開発；ショットガンおよびLC-MS/MSリピドミクス分析のためのPB-ESI-MS/MSワークフローの開発；ならびに種々のラット器官の組織サンプルを用いたリピドミクス分析のための分析プラットフォームの検証を示す。

10

【0201】

本明細書中の研究の成果は、定性的および定量的なショットガンならびにLCベースのリピドミクス分析のための頑健かつ広く応用可能なプラットフォームの確立である。本明細書中で収集されたデータは、種々の器官のラット組織における不飽和脂質アイソフォームの $C=C$ の位置、組成および量に関する情報を含む不飽和脂質の初めてのデータベースに寄与する。この新しい脂質分析の能力は、脂質分子生物学、機能的リピドミクス、メタボロミクスおよびバイオマーカー発見を含むがこれらに限定されない生物科学の多くの分野における研究を前進させる。

20

【0202】

背景

生体分子の重要な1クラスとしての脂質は、エネルギー貯蔵および細胞膜の構成成分に関するこれまで認識されていた役割ならびに制御性のシグナル伝達分子および細胞-細胞シグナル伝達分子として後に確立される役割などの多様な機能を果たす。脂質のこれらの多様な機能は、それらの多様な構造に起因する。約40,000（2015年4月2日現在）のユニークな脂質構造が、LIPID MAPSデータベースによって記述されており、それらは、細胞（すなわち膜）内で、および細胞小器官間で、一様に分布していない。脂質研究の大きな難題の1つは、細胞がどのようにして脂質ホメオスタシスを維持および制御しているかを理解することである。生物学および生物分析ツールが進歩するにつれて、完全な細胞の脂質組成の特徴付け（リピドーム）ならびに脂質-脂質および脂質-タンパク質の相互作用は、いまやシステムレベルでアプローチ可能である。細胞の脂質に対する質量分析ベースの分析は、包括的な脂質の同定および定量を提供するためのリピドミクスにおける主要なツールとして確立されている。このようにして得られた脂質プロファイルは、疾患に結びつく全脂質組成の変化を研究するためにますます使用される。リピドミクスはまだ、比較的初期の段階にあり、高感度、高特異性およびハイスループットの脂質分析ツールの開発が、脂質の多様性および脂質ホメオスタシスの機能的意義に関する研究を大きく押し進め得る。

30

40

【0203】

MSベースのリピドミクスアプローチ：MSの高い感度および分子特異性ならびに液体クロマトグラフィー（LC）などの分離法との連結によって、MSは脂質分析において最も高い頻度で使用される（80%）手法になった。2つのMSアプローチ：ショットガンおよびLC-MSが、包括的脂質分析のためにほぼ等しく使用されている。ショットガンアプローチの場合、通常、エレクトロスプレーイオン化（ESI）をイオン化源として用いて、脂質抽出物を質量分析計に直接注入する。あるいは、脂質抽出物は、MS分析の前にLCによって分離され得る。これらの2つのアプローチのうちの選択は、分析の目的に

50

依存する。ショットガンアプローチは、速度が速いので、正常／罹患サンプル由来の包括的脂質プロファイルの比較による疾患診断法にとって魅力的である。精密な脂質定量または非常に複雑なサンプルからの低存在比の脂質種の同定の場合は、連結型のアプローチが、高い忠実度の構造同定と精密定量の両方を可能にする。ESIと同様に、マトリックス支援レーザー脱離イオン化(MALDI)も、脂質イオン化に使用できるもう1つの効率的な方法である。近年、MALDI-MSは、そのイメージング能力に起因して、ますます研究上の関心を集めている。

【0204】

MS/MSによる脂質の同定および定量：高分解能質量分析計による単純な質量測定は、元素組成を提供するが、しかしながら、多くの分子の同重体種および異性体種が共存する可能性があることに起因して、詳細な構造情報を提供することはできないだろう。タンデム質量分析(MS/MS)は、脂質の同定および定量において用いられる鍵となる手法である。MS/MS実験は、少なくとも3つの鍵となるエレメントを含む：プリカーサーイオンの生成および単離、そのプリカーサーイオンを解離する気相反応、ならびにプロダクトイオンの質量分析。過去30年の度重なる努力から、広範囲の脂質クラスに対する網羅的な(comprehensive)MS/MS法が開発された。これらのMS/MS法の大部分は、低エネルギー衝突誘起解離(CID)を備えたMS機器において確立された。タンデムインスペース(Tandem-in-space)機器、例えば、三連四重極MSまたはハイブリッド(highbred)MSが、連結されたMS/MS実験(ニュートラルロスキャン、プリカーサーイオンキャン、プロダクトイオンキャン)を行うことができ、それらは、複雑な混合物から脂質を迅速に分類すること、ならびに高感度で検出(反応モニタリング)および定量することを可能にする。タンデムインタイム(Tandem-in-time)質量分析計、例えば、四重極(quadrupole)イオントラップMSは、より高い段階のMS/MS実験(すなわち、MS³またはMS⁴)および異なるタイプの活性化を可能にして、詳細な構造の特徴付けを達成する。

【0205】

構造特異的分析における難題：脂質は、8つのクラスおよび多くのサブクラスに分けることができる構造的に多様な分子である。哺乳動物細胞において検出される主な脂質クラスとしては、脂肪酸(FA)、グリセロ脂質(GL)、グリセロールリン脂質(GP)、スフィンゴ脂質(sphingolipid)(SP)およびステロール脂質(ST)が挙げられる。GPはさらに、グリセロールホスホコリン(PC)、グリセロホスホエタノールアミン(PE)、グリセロホスホセリン(PS)、グリセロホスホグリセロール(PG)、グリセロホスホイノシトール(PI)およびグリセリンリン酸(PA)に分けることができる。LIPID MAPSによると、構造の特徴付けには5つの異なるレベルがあり、最も低いレベルから最も高いレベルまで以下のように列挙される：レベル1. 脂質クラス/種の特定；レベル2. 結合タイプ/ヒドロキシル基の特定；レベル3. 脂肪酸アシル/アルキル；レベル4. 脂肪酸アシル/アルキルの位置；およびレベル5. 立体化学および炭素-炭素二重結合(C=C)の位置/幾何学を含む確定した化学構造。現在、脂質構造分析は、脂質中の脂肪酸アシルまたはアルキル(alkyl)の組成を特徴付けるレベル3で日常的に達成され得る。慎重なデータ解釈を用いれば、アシル/アルキル鎖の位置に関するレベル4の情報を引き出すことができる。例えば、759.6 g/molの分子量を有するホスファチジルコリン(PC)は、正イオンモードでのMS/MS CIDによる特徴的なm/z 184 (ホスホコリン)フラグメントイオンの観察結果、ならびにPC酢酸アニオン付加体([PC+CH₃COO]⁻): m/z 257 (16:0、16個の炭素原子を有する飽和アシル鎖)およびm/z 281 (18:1、18個の炭素および1つのC=C)のMS/MS CIDからの脂肪酸アシルアニオンの検出から、PC 16:0/18:1と特定され得る。さらに、sn-2は通常、sn-1アシルアニオンよりも高い強度で生成されるという経験則に従って、16:0および18:1アシル鎖は、それぞれsn-1位およびsn-2位に割り当てることができる。しかしながら、C=Cの位置および配置などのレベル5の特定は、たいていの市販のMSプラットフォームに備わ

る低エネルギーCIDでは得にくい。この難しさは基本的に、C-CまたはC=C結合を切断するためには著しく高い活性化エネルギーが必要である点に原因があり、C=Cの周りにはフラグメントイオンが生成されず、C=Cの位置を決定するための手掛かりが得られない。

【0206】

C=Cを決定するための既存の方法：この問題に対処するために、C=Cを決定するためのMSベースの方法を発展させる際に、2つの異なるアプローチが取られた。1つのアプローチは、MS分析の前のC=C選択的反応（例えば、オゾン分解、アルキルチオ化、メトキシ水銀化、エポキシ化など）を含む。これらの反応は、C=C官能基を、MSまたは低エネルギーCIDによってより容易に分析され得る他の基に変換する。これらのうち、オフラインまたはオンラインオゾン分解が、HPLC、ESIと連結できる点およびより広範なクラスの脂質に適用可能である点に起因して、最も大きな影響を及ぼす。しかしながら、複雑な脂質混合物が分析されたとき、種々の脂質種が同じオゾン分解産物をもたらし得るので、C=Cの位置について決定的でない結果に達することが多い。MS前のC=C誘導体化に代わるものとして、高エネルギーCID（約keV）を用いるインタクトな脂質のチャージリモートフラグメンテーション、ジリチウム化されたりリポ付加イオンの多段階MS/MS CID、およびオゾン誘起解離（OZID）をはじめとしたいくつかのタンデムMSベースの方法が、C=Cの決定のために開発された。これらの方法は、特殊なMS機器を使用する必要性またはイオン化条件に起因して、リポミクス研究に広く適用されていない。

10

20

【0207】

ESI-MS/MSと連結されるオンラインパターン・ビューチ（PB）反応

C=Cのユニークな化学的特性は、ラジカル攻撃を受けやすい点であり、それは、ラジカルが関わるMS分析による研究を促す。本明細書中の実施例は、ESIとMSとのインターフェース領域において脂質のC=Cを標的にするラジカル反応の開発に焦点を当てる。このアプローチには、ESIベースのリポミクスにとって2つの魅力的な特徴がある。第1に、ラジカル反応は、速く（制限された拡散速度）、直接ESI注入法と容易に連結できるか、または分離の後かつESI-MSの前にオンラインで行うことができる。第2に、反応が質量分析計の外で起きるので、その反応は、ESIインターフェースからなる任意のタイプのMSに適用できる。しかしながら、有機化学からC=Cに対して報告された多くのラジカル反応の中でも、脂質分析に対する優れた反応候補は、以下の因子を満たすべきである：1. C=Cに対する高い特異性、2. 妥当な反応収率；3. インタクトな脂質と、さらなる構造分析のために反応によって改変された脂質との間に検出可能な関連があるようなC=Cの直接的な開裂がないこと；脂質のMS分析に対する妨害（例えば、イオン化効率、荷電特性）が最小の反応体。

30

【0208】

古典的な[2+2]光化学反応であるパターン・ビューチ（P-B）反応が、オンラインESI-MS/MSと連結でき、複雑な脂質抽出物からC=Cの位置を高速かつ高感度で決定することが本明細書中で示される。反応機構は、アルデヒドまたはケトン内のカルボニル基からその励起状態へのUV励起を含み、その後、その励起状態は、C=Cに付加して、ジラジカルを形成する。そのジラジカルの閉環によって、4員のオキセタン環が形成される。カルボニルとC=C結合との相対位置に応じて、図47Aに示されているように2つのオキセタン（oxetane）位置異性体（構造1および2）が形成される。PB反応生成物は、安定であり、質量単離され得、CIDに供され得る。予備的研究において、脂質分析種を1:1水/アセトンに溶解する（ここで、アセトンは、PB反応試薬として機能する）。この反応は、単純にナノESI源の領域において実行され、254nmを中心とするUVランプの発光波長によって照射された（構成が図47Aの挿入図に示されている）。図47Cは、ネガティブモードナノESIにおいてオンラインで分析されたオレイン酸であるFA18:1(9Z)(10μM)のPB反応を示している。UV照射を行ったときにだけ、インタクトなFAアニオン(m/z 281)と比べて58Da（アセ

40

50

トンの質量)の質量が増加した大量のPB反応生成物(m/z 339)が観察された(UVをオフにしたときの図47Bと比較のこと)。PB反応生成物(m/z 339, 3)のMS² CIDによって、逆PB反応を促した(図47A)。中性アセトン(58 Da)を失うことによって、 m/z 281のプロダクトイオンが逆PB経路から生じた。 m/z 171のプロダクトイオン(3の構造を有する)および m/z 197のプロダクトイオン(4の構造を有する)が、それぞれP-B反応生成物1および2の中の元のC=OおよびC=C部位で破壊するオキセタン環の逆PB経路から生じた。3および4の構造を有するフラグメントイオンは、元のC=C部位に「C₃H₆」に対して「O」を付加する差に起因して、常に26 Daだけ質量が分離した。したがって、これらのイオンは、C=C診断用イオンと呼ばれる。それらの相補的なフラグメントは、それらが中性としての存在することによって起因して検出されない。

10

【0209】

このPB-MS/MS戦略は、GPなどの他のクラスの脂質、ならびに異なるアシル鎖における個々のC=Cの位置を正確に指摘することにも適用され得る。図48Aは、PS16:1(9Z)/18:1(9Z)(m/z 758, 6の脱プロトン化イオン、図47Dに示される構造)からのC=Cの決定の例を示している。 m/z 816, 5のPB反応生成物のMS² CIDによって、PSに特異的な87 Daのニュートラルロス(NL)ならびに2つの遊離アシル鎖に対応するイオンである m/z 253, 2および281, 2のR₁COO⁻およびR₂COO⁻がもたらされた。PB反応によって改変された2つのアシル鎖も、それぞれ m/z 311, 2および339, 3に観察された。これらのPB反応のプロダクトイオンのMS³ CIDデータを図48Cおよび48Dに示す。C=C診断用イオン3の一般化学式C_nH(2n-3)O₃⁻に基づいて、二重結合が、各アシル鎖に対してC9とC10との間に位置すると高い信頼性で決定できる。アシル鎖の組成情報をまとめると、一方のアシル鎖が、C9とC10との間に二重結合を有するC16であり、他方が、C9とC10との間に二重結合を含むC18鎖であると明白に結論付けられる。上記の手順は、不飽和脂質の構造の特徴付けの基礎となる。

20

【0210】

FAおよびGPのモデルに関する研究からは、異なるクラスの脂質または特定のC=Cの位置もしくは配置に対するアセトンベースのPB反応に対する反応性または選択性の明らかな違いは観察されなかった。この特徴は、それが、不飽和脂質分析のためのより一般的な方法として機能する可能性を有することを示唆する。他の魅力的な特徴としては、「ショットガン」リポミクスと適合性であること、反応のための実験装置が単純かつ低コストであること(UVランプ装置のコストは200ドル未満)、質量分析計を改変する必要がないこと、質量スペクトルが解釈しやすいこと、および安価な再誘導体化(reprivatizing)試薬が挙げられる。これらの点は、PB反応を、ショットガンとLC-MSベースの両方のリポミクスアプローチにとって頑健かつ広く応用可能なツールとしてのさらなる開発にとって理想的な候補にする。

30

【0211】

C=Cの位置特異的なリポミクスツールがないことは、C=C異性体を識別および定量することができないことにつながるため、全脂質のかなりの割合に寄与する不飽和脂質の研究に欠けた部分をもたらす。ゆえに、C=Cの位置の違いに関連する生物学的意義が理解されておらず、病的条件において変化したリポドームを研究する際に正しく評価されない。本明細書中の方法は、C=Cの位置特異性、ならびに生物学的サンプル中の広範囲の脂質種の不飽和脂質の異性体を定量する能力を提供するMSプラットフォームを提供する。本明細書中で論じられるように、ESI-MS/MSと連結されるオンラインPB反応が、これらのニーズを満たす。本明細書中で収集されたデータは、小動物の異なる組織における不飽和脂質アイソフォームのC=Cの位置、組成および量の情報を含む不飽和脂質の初めてのデータベースにも寄与し得る。この新しい脂質分析の能力は、脂質分子生物学、機能的リポミクス、メタボロミクスおよびバイオマーカー発見を含むがこれらに限定されない生物科学の多くの分野における研究を前進させる。

40

50

【0212】

パターノ・ビューチ (PB) 反応をESI-MS/MSとオンライン連結するための反応/イオン化源の最適化

PB反応は、従来、有機合成においてバルク溶液中で行われてきた。このタイプの反応の比較的低い量子収率 (0.01~0.1) を考慮して、有機合成では、高濃度の反応体 (mM~M)、長い反応時間 (3~24時間のUV照射) および無極性溶媒が使用される。これらの条件は、ESI-MS/MSを用いるときの典型的な脂質分析条件とも、PB反応とMS/MSとのオンライン連結の要件とも、直接適合しない。これらの問題に対処するために、オンライン光化学反応ならびにMSによるインサイチュでの反応のモニタリングおよび生成物の分析の実施を可能にする反応容器および方法を開発した。この研究によって、MSによって良好なPB反応収率および高感度の脂質検出を達成するために重要な因子を特徴付けることができた。

10

【0213】

有機合成におけるフロー型光化学は、発展途上の分野であり、そのフロー型光化学では、従来のバッチ反応容器を、溶液を主に内径<1mmのキャピラリー (マイクロリアクター) に連続的に流すことに置き換える。連続的な溶液流をマイクロリアクターの寸法と組み合わせることにより、溶液のUV曝露を正確に制御できるようになり、過度のまたは不均一なUV曝露による望まれない副生成物を減少させることによって、生成物の収率が上昇する。連続フロー型光化学反応を行うための例がいくつかあり、例えば、分子間の光付加および「フットプリンティング」のためのタンパク質を用いたOH反応である。これらの成功例に基づいて、ナノESIエミッターのソース領域およびESIのための分析種の送液ライン (別個の反応およびESI) で行うPB反応を開発した。

20

【0214】

はじめに、さらなる溶媒ポンピングを行わないスタティックナノESI源をPB反応に使用した (図47A)。種々の脂質種のPB反応が実行されたが、しかしながら、典型的には低~中程度の反応収率 (10~40%) であった。例えば、PC16:0/8:1 (9Z) (5μM) のPB反応生成物は、m/z 818.6に約10%の反応収率で生成される (図49A)。さらに、図49Bに示される抽出イオンクロノグラム (extracted ion chromatogram) (XIC) から示されるように、この反応が定常状態に達するためには、通常、30秒から1分のリードタイムが必要である。この現象は、反応のかなりの部分が、およそミリ秒の反応時間 (ソース領域での液滴の寿命) しか許容しないナノESIのブルーム領域以外のナノESIチップ内で起きることを明らかに示唆する。ナノESIスプレーエミッターは、チップ先端の薄壁領域 (100μm未満と推定される) において250nmを部分的に透過するホウケイ酸ガラスからできている。スタティックナノESIの低流速 (10nL/分) を考慮すると、スプレーに起因する分子濃度の変化は、スプレーチップにおいて無視できる (約1μLの体積)。ゆえに、ナノESIチップの内側での反応によって、P-B反応生成物が時間の関数として蓄積し、最終的に、最初の2~3分で定常状態に達する。この仮説は、それよりかなり速い流速を用いたところ (約1~5μL/分)、明らかなP-B反応生成物が観察されなかった実験から正しいと立証される。

30

40

【0215】

PB反応は、主としてナノESIチップにおいて起きるので、反応収率を改善するために、ナノESIチップの材料として石英ガラスまたは溶融石英が使用され得る。これらの2つのタイプの材料は、およそ200nmの波長を通すので、より多くの光子を通過させる。反応収率に対するナノESIチップおよびMSインターフェースとUVランプとの位置の影響も調べた。予備的研究において、主要な発光波長がおよそ254nmの5Wの低圧水銀 (LP-Hg) ランプを使用した。他のタイプのUVランプ (例えば、200~300nmの範囲の著しい光強度を発生するキセノンプラズマフラッシュランプおよび反応領域の小型化を可能にするLED UVランプ) が調査され得る。

【0216】

50

P B 反応を、 $\mu\text{L}/\text{分}$ の範囲の流速での注入型 E S I 源に適合させる目的では、E S I 送液ラインにおいて P - B 反応を行うことがより適している。U V 透過性コーティングを有する溶融石英キャピラリーが、送液ラインとして選択される。反応領域のために、キャピラリーをコイル状にし（直径 3 c m）、U V ランプをキャピラリーから 0. 5 c m 離して中心に配置する（図 5 0 A）。4. 5 $\mu\text{L}/\text{分}$ の溶液の流速の場合、1 c m の曝露は、そのキャピラリーにおける 1. 1 秒間の反応時間に対応する。図 5 0 B は、5 秒間の U V 曝露後の P C 1 6 : 0 / 1 8 : 1 (9 Z) (7 : 3 アセトン : H_2O 、1 % 酢酸中、5 μM) の E S I M S スペクトルを示している。P B 生成物 (m/z 8 1 8. 6) が 4 5 % の収率で形成され、ナノ E S I 源で達成された収率よりもはるかに高かった（図 4 7 A）。さらに、図 5 0 B の挿入図に示される X I C から分かるように、P B 反応生成物のシグナルは、U V がオンの時間中、非常に安定していた。この特徴は、P B 生成物に対する M S / M S で優れた性能を達成するために重要である。この直接注入の設定は、動力学的情報を得ることができるように溶液の流速または U V に曝露されるキャピラリーの長さを変更することによって、U V 曝露時間を変動させることが可能であった。溶媒として 7 : 3 アセトン : H_2O 、1 % 酢酸を用いた P C 1 6 : 0 / 1 8 : 1 (9 Z) の P B 反応は、1 0 秒以内に 6 8 % 収率に達することができたことが見出された。この有望な結果に基づいて、E S I ベースの脂質分析のために一般に使用される範囲の E S I 流速 (1 0 0 n L ~ 5 0 μL) に対して、「直接注入」の設定の配置（ランプの距離、ランプの電力）をさらに最適化しようと計画した。

10

20

30

40

50

【0217】

直接注入の設定の場合、P - B 反応試薬、すなわち、アセトンが、E S I のための共溶媒として使用されるが、しかしながら、アセトンは、順相または逆相 H P L C 分離のための溶出溶媒として通常使用されない。この制限を乗り越えるために、「フロー注入のコンセプト」を用いて、P B 反応試薬を、E S I 源に向かってサンプル輸送ラインを通して T 字形注入 (T e e - i n) し、光化学反応領域をその「T」接合部の後に配置する。この「フロー注入」の模式的な構成を図 5 0 D に示す。このデバイスを、P C 1 6 : 0 / 1 8 : 1 (9 Z) を用いて試験した。この脂質を、順相 L C 分離の通常の溶媒組成であるイソプロパノール / H_2O 、7 0 % / 3 0 % に溶解し、1 $\mu\text{L}/\text{分}$ の流速で E S I 源にポンピングした。アセトンを、別のシリンジポンプによって 1 $\mu\text{L}/\text{分}$ で送達し、脂質送液ラインに T 字形注入した。その溶液の組成は、混合後、アセトン : イソプロパノール : H_2O (5 0 % / 3 5 % / 1 5 %) となる。その後の P - B 反応 (5 秒) は、図 5 0 B と非常によく似たスペクトルを提供した。この設定を、下記に論じるようなオンライン H P L C および E S I - M S / M S との連結についてさらに調べた。

【0218】

図 5 0 D に示される反応の設定を使用し、哺乳動物細胞由来の主要な脂質クラス (F A、G L、G P、S P、S T) の代表であるモデル脂質化合物を用いて、P B 反応の性能ならびに脂質検出にとって重要な実験パラメータを特徴付けた。評価される重要な点としては、副反応を最小限に抑える条件、P B に適切でありかつ脂質の E S I と適合する溶媒系、および異なるタイプのカルボニル化合物を P B 試薬として使用する分析上の有用性が挙げられる。

【0219】

P B 反応を引き起こす U V 励起波長は、N o r r i s h T y p e I 反応も惹起でき、それによって、アセトンの α - 炭素結合の光化学的開裂ならびにアセチルラジカルおよびメチルラジカルの形成がもたらされる（図 5 1 A）。これらの 2 つのラジカルは、有機溶媒および脂質から H 原子を抜き取って、種々の二次ラジカルを形成するかまたは C = C 結合に付加することができる。その溶液が、微量の O_2 からなるとき、二次脂質ラジカルは、十分特徴付けられた脂質過酸化経路を経て、酸化されたおよび分解された脂質生成物を形成する。これは、実際に、調製されたばかりの溶液でさえも観察される。図 5 1 B は、アセトン : 水 (1 : 1) 中の 5 μM P C 1 6 : 0 / 1 8 : 1 (9 Z) の 1 0 秒間の P B 反応を示している。低い m/z 範囲 (1 0 0 ~ 3 0 0) の新しいピーク群は、ラジカル

によって誘導された脂質分解に起因し、それによって脂質イオンシグナルが相当失われたことから、PB反応収率は、たった12% (UV照射前のインタクトな脂質シグナルで正規化された) である。微量の O_2 を除去するために、この脂質溶液の N_2 パージを試みたところ、70%の高いPB反応収率が達成された (図51C)。これらの予備的な結果は、良好なPB反応収率を達成するために、競合する副反応を制御する重要性を意味している。本明細書に含められる実験の場合、 N_2 パージは、PB反応の直前の脂質溶液に対して行われ得る。Norris Type II反応の関与および影響の程度が、種々のクラスのモデル脂質を用いて特徴付けられ得る。副反応の程度に対する有機溶媒の影響が調べられ得る。

【0220】

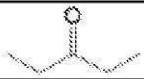
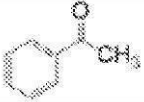
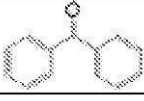
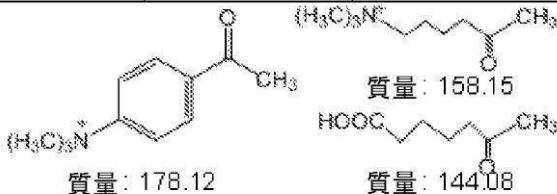
予備的研究において、有機溶媒を使用するとき、PB反応収率を最大にするためおよび生じ得るラジカル副反応を減少させるために50~70%アセトン (容積%) からなる水性溶媒系を使用した。しかしながら、上記の条件は、必ずしもESIによるイオン化および検出にとって最善の条件ではない。さらに、脂質の抽出、分離およびESIでは、通常、 $CHCl_3$ 、ヘキサン、アセトニトリルおよび脂肪族アルコールなどの有機溶媒が使用されるので、P-B反応とESIの両方の性能に対する有機溶媒組成の影響を調べる必要がある。以下の溶媒組成を試験した：アセトン： H_2O ：X=70：15：15 (v：v：v) (ここで、Xは有機溶媒である)。PC16：0/18：1 (9Z) を正イオンモードのESI (「直接注入の設定」) に対するモデル化合物として使用したとき、15%の $CHCl_3$ の条件だけが、PB反応に対して有意な干渉を示し、他のすべての有機溶媒が、6秒間のUV曝露に対して許容され得るPB反応収率 (20~30%) を示した。主要なクラスの標準的な化合物が試験され、PB反応とESI分析の両方にとって好適な溶液組成が決定され得る。鍵となる評価基準としては、PB反応収率、インタクトな脂質およびP-B反応生成物の絶対イオン数 (absolute ion counts)、副反応の程度、LC溶媒との適合性が挙げられる。

【0221】

PB試薬としてのアセトンは、極性および無極性の脂質および溶媒の両方における良好な共溶解度 (co-solubility)、ならびにESI-MS検出を干渉しないという利点を有する。上記の理由から、本発明者らが提案する研究の多くにおいて、方法の開発および最適化のためにアセトンが使用される。脂質分析に対するPB反応の有用性をさらに調べるために、より大きなプールのカルボニル化合物をPB試薬として調査することが有益である。それらの候補が有すべきいくつかの特性としては、高いPB反応選択性、良好な反応収率、PB反応生成物の低エネルギーCIDからの $C=C$ 診断用イオンの優先的形成が挙げられる。種々のタイプの光源が使用できるように、より長い波長 (300~500nm) と適合するPB試薬を探すことも興味深いだろう。表9は、調査され得るいくつかの候補、 $n \rightarrow \pi^*$ 転移の場合のそれらの最大吸収 (maximum absorption) 波長 (λ_{max}) (PB反応に関与する) および $C=C$ 位置決定のための特徴的な診断用イオン対の間の Δ 質量を列挙している。

【表 9】

表 9

試薬/ 質量 (Da)	構造	λ (吸収) (nm)	Δ 質量 (Da) (診断用イオン)
アセトン 58.04		280 ²⁴	26.06
3-ペンタノン 86.07		~280 ²⁴	54.09
ベンズアルデヒド 106.04		330 ²⁵	74.06
アセトフェノン 120.06		319 ²⁴	88.08
ベンゾフェノン 182.07		330 ²⁶	150.09
荷電試薬			

10

20

【0222】

予備的研究は、UV 350 nm ランプを用いたとき、ベンズアルデヒドが妥当な効率で PC 18 : 1 (6 Z) / 18 : 1 (6 Z) と反応できたことを示した (図 5 2 A)。PB 生成物 (m/z 836.6、図 5 2 B) の MS² CID は、74 Da という特徴的な Δ 質量を有する m/z 648.5 および 722.5 の大量の C=C 診断用イオンを生成した。ベンズアルデヒドを用いたとき、PB 試薬としてアセトンを使用した場合と比べて、副反応がより少なく、これは、使用されたより低いエネルギーの UV 光子に関係し得る。表 9 に列挙された試薬は、種々の脂質クラスの代表的なモデル化合物を用いる反応に適用され、不飽和脂質の C=C 分析に対するそれらの性能が調査される。中性の PB 試薬に加えて、本発明者らは、コレステロールおよびグリセロール脂質などの中性脂質に対するイオン化効率を高める目的で、電荷官能化 (charge functioned) ケトンも調べる。

30

【0223】

ある特定の代替の装置では、条件を独立して最適化できるようにするために、PB 反応を ESI-MS から切り離すことができる。例えば、PB 反応のためのコイル状の UV 透過性溶融石英の装置は、フロー型マイクロリアクターとしてオフラインで使用され得る。PB 反応収率を最大にするために、脂質分子が、純粋なアセトンに高濃度で溶解され得る。反応の後、乾燥することによってアセトンが除去され、残った脂質が、ESI にとって適切な溶媒に溶解され得る。

40

【0224】

さらに、本発明の方法は、MALDI を用いて行うことができる。本発明者らが表 9 において調べることを提案した PB 試薬のいくつか (すなわち、ベンズアルデヒド、ベンゾフェノンおよびアセトフェノン) は、UV MALDI 波長 (337 または 355 nm) と重複する UV 吸収帯を有する。これらの試薬は、不飽和脂質分子とマトリックスに同時に溶解される場合、脱離およびイオン化の間に、UV によって励起され得、C=C と反応

50

し得る。このPB反応の能力は、生体MSイメージングにおける多くの応用法のための不飽和脂質の構造の特徴付けを劇的に高め得る。

【0225】

不飽和脂質の構造決定および定量分析のためのMS/MS法の開発

C=Cを決定するためのPB-MS/MSの分析能力は、特定の不飽和脂質のPB反応生成物の気相フラグメンテーション挙動に大いに依存する。種々の脂質クラスの構造多様性を考慮して、本発明者らは、頭部基、アシル鎖、C=C位置の決定を含む、得ることができる構造情報の量を最大にすることに関して、タンデムMS法を特定の各脂質クラスに調整する。本発明者らは、脂質C=C位置の異性体の特徴付けのための方法の開発および確立されたMS/MS条件に基づいてそれらを定量することにも焦点を当てる。主要な脂質クラスの、C=Cの位置が既知である純粋な不飽和脂質を、方法を開発するためのモデルとして使用する。この実施例は、不飽和脂質の構造情報と定量情報の両方を得るためにCIDベースのMS/MSを使用するための標準的なガイドラインを提供する。

10

【0226】

衝突活性化に基づくMS/MS法は、種々のクラスの脂質を分析するために十分確立されている。豊富な構造情報が、クラス/下部構造に特異的なフラグメンテーションチャンネルから規則正しく得られる(MS/MSからのリンク走査と呼ばれる)。ゆえに、多重レベルの構造情報を得ることができるように、これらの既存のMS/MS法にC=Cの位置を決定する能力を追加することは、非常に興味深い。予備的研究において、FAおよびGPの少数セットの標準的な化合物に対するPB-MS/MSを、これらの2つのクラスの脂質に対して確立されたイオン化およびCIDの条件を用いて調べた。通常、C=C診断用イオンの形成のために、2つの現象が観察される：1) 容易なフラグメンテーションチャンネルであり、様々なイオン型の脂質からもたらされ得る；および2) インタクトな脂質イオンに対して確立されたMS/MS条件を用いたとき、構造に関する情報価値のあるフラグメントイオンを干渉しないかまたは抑制しない。確立されたすべての知識がデータの解釈に直接適用され得るので、後者が有益である。PB生成物のイオン型が、実際にC=C診断用イオンの形成に影響することも注目された。正イオンモードにおけるリチウムイオン付加体としての α -リノレン酸、FA 18:3 (9Z、12Z、15Z)のPB生成物(m/z 343.3)のCIDは、3つのC=C結合の3対の診断用イオンを高存在比で生成した。しかしながら、脱プロトン化PB生成物(m/z 335.3)のCIDは、9Z位から1対の診断用イオンしか比較的高い強度で生成しなかった；他の2対は、比較的低い強度で存在するか、または主な58Daロスと重複して存在する。明らかに、リチウム付加体のCIDが、C=Cの特徴付けにとってより好ましい。

20

30

【0227】

これらの実施例において、5つの主要な脂質クラス(FA、GL、GP、SP、ST)およびそれらのサブクラス(表10に列挙される)を代表する脂質を用いて、拡張された研究が試みられた。

【表 10】

表 10

脂質クラス	PB-MS/MS 法 (CID)	PB-MS/MS からの構造情報	
		C=C	他の情報
MUFA 18:1 (9Z)	[FA-H] ⁻ MS ²	✓	NL 58
PUFA 18:3 (9Z, 12Z, 15Z)	[FA+Li] ⁺ MS ²	✓	NL 58
PC, LPC PC 16:0/18:1 (9Z) LPC 18:1 (9Z)	[PC+H] ⁺ MS ² [PC+Ac] ⁻ MS ³	✓ ✓	<i>m/z</i> 184 [RCOO] ⁻
PS, LPS PS 18:0/18:1 (9Z) LPS 18:1 (9Z)	[PS+H] ⁺ MS ² [PS-H] ⁻ MS ³	✓ ✓	NL 185 Da NL 87 Da <i>m/z</i> 153, [RCOO] ⁻
PI, LPI PI 18:0/18:1 (9Z) LPI 18:1 (9Z)	[PI-H] ⁻ MS ³	✓	<i>m/z</i> 241 [RCOO] ⁻
PE, LPE PE 18:0/18:1 (9Z) LPE 18:1 (9Z)	[PE+H] ⁺ MS ² [PE-H] ⁻ MS ³	✓ ✓	NL 141 Da <i>m/z</i> 196, NL 87 Da [RCOO] ⁻
PA, LPA FA 16:0/18:1 (9Z) LPA 18:1 (9Z)	[PA-H] ⁻ MS ³	✓	<i>m/z</i> 153 [RCOO] ⁻
CE 18:1 (9Z), 18:2 (10Z, 12Z)	[CE+Li] ⁺ MS ² , MS ³	✓	NL 58, 368 <i>m/z</i> 369 [RCOOH + Li] ⁺
MG 18:1 (9Z)/0:0/0:0	[MG+Li] ⁺	✓	NL 58
PG 16:0/18:1 (9Z)			
CL (1'-[18:1 (9Z)/18:1 (9Z)] ₃ -[18:1 (9Z)/18:1 (9Z)]) [CL-H] ⁻			
Cer d18:1/18:1 (9Z) [M+H] ⁺			
SM d18:1/18:1 (9Z) [M+H] ⁺ または [M+Li] ⁺			
DG 18:1 (9Z)/0:0/18:1 (9Z) [DG+Li] ⁺			
TG 18:1 (9Z)/18:1 (9Z)/18:1 (9Z) [TG+Li] ⁺			

10

20

30

【0228】

十分に認められたMS/MS条件を用いるPB-MS/MSから得ることができる構造情報（例えば、頭部基、アシル鎖、C=Cの位置）の量を評価した。これらの条件は、イオンの性質、すなわち、イオンの電荷極性（正イオン 対 負イオン）および電荷担体の同一性（例えば、H⁺対Li⁺）を操作することによって、さらに改善され得る。種々のタイプのCID（例えば、ビーム型衝突活性化 対 オン共鳴衝突活性化）が、三連四重極/リニアイオントラップ質量分析計を用いて比較され得る。

【0229】

PB-MS/MSは、C=C結合の位置情報を含む診断用フラグメントイオンを生成するというユニークな特性を有するので、それは、特徴的な診断用イオンの観察に基づいて、各C=C位置異性体の区別を可能にする。予備的研究において、このことを、マウスおよびヒト脳組織分析から観察された、FA 18:1のC=C異性体、すなわち、オレイン酸（9Z）およびcis-パクセン酸（11Z）を用いて試験した。11Zおよび9Zの2:1モル比混合物をPB-MS/MSに供した（*m/z* 339.3、図53A~B）。予想のとおり、11Z（*m/z* 199、225）および9Z（*m/z* 171、197）に対してそれぞれ異なるC=C診断用イオン対が形成されたことから、それらのPB反応生成物がいかなる質量の差を有しなくても、9Zおよび11Z C=C位置異性体の明白な検出が可能だった。このデータセットは、C=C異性体の構造の特徴付けにおけるPB-

40

50

MS/MSの潜在能力を明らかに示す。この実施例では、一連の商業的に入手可能なモデルC=C結合異性体(MUFA (FA 20:1 9 Z対11 Z)、PUFA (FA 20:4 n-6対n-3)およびリン脂質(PC 18:1 (6 Z)/18:1 (6 Z)対PC 18:1 (9 Z)/18:1 (9 Z))を含む)を調べた。ブレイクダウンカーブ法(breakdown curve method)を用いて診断用イオンを形成するためのCID条件および異性体混合物の分析に対するその影響に注意した。各C=C位置異性体が、異なる質量を有する診断用イオンを提供したので、PB-MS/MS法は、混合物中に共存するC=C結合異性体の数によって制限されなかった。それを、FA 18:1 (9 Z)、(11 Z)および(6 Z)異性体混合物を用いて試験した。

【0230】

C=C診断用イオンを生成する能力は、PB-MS/MSを用いたときの不飽和脂質の定量能力も広げる。この実施例は、以下の2つの状況に対する定量方法の開発を実証する：1) C=C位置異性体のない不飽和脂質の絶対定量またはC=C異性体が存在する場合の総定量、および2) C=C位置異性体の相対定量および絶対定量。

【0231】

タンデムMSは、高い分子特異性および高い感度を達成するためにクラスまたはサブクラス特異的フラグメンテーションチャンネル(リンク走査)を用いることによる脂質定量に広く使用されている。主として利用可能なフラグメンテーション法である低エネルギーCIDでは、インタクトなFAイオンから構造に関する情報価値のあるフラグメントイオンを形成することが難しいので、FAを定量するためのMS/MSの開発は、遅れをとっている。FAを定量する場合、GC-MSまたはHPLC-MSが、現在の分析の選択肢である；しかしながら、分析前にオフラインでのサンプルの誘導体化が常に必要である。ゆえに、分析段階でFA混合物を定量するためのMS/MSベースの方法が開発されると、分子の特異性、感度、定量精度および線形のダイナミックレンジが大幅に高まり得る。NL 58 Daは、異なる鎖長を有するMUFAのPB-MS/MSから観察される共通のフラグメンテーションチャンネルであり、総フラグメントイオン強度の60~70%を占める。これらの2つの点は、58 DaのNLが、定量目的の良好な候補であるはずであることを示唆する。内部標準としてFA 17:1 (10 Z)を使用して、FA 18:1 (9 Z)の定量について試験を行った。図54は、FA 18:1 (9 Z) (1.1 μM、m/z 339.4)およびFA 17:1 (m/z 325.3、0.75 μM)のPB生成物の58 DaスペクトルのNLを示している。0.4~6 μMの範囲および0.2 μMという検出限界(LOD)から検量線を得た。この結果は、通常使用されるGC-MS法に十分匹敵する。NL 58 スキャンを、哺乳動物細胞に天然に存在する16~24の範囲の炭素数を有するMUFAおよびPUFAの定量についてさらに評価した。内部標準(鎖長および不飽和度)、衝突エネルギーおよび他のパラメータの選択の影響を、その分析性能指数のために特徴付ける。FA C=C異性体の総定量に対するNL 58 Daの適用可能性を、FA 18:1 (9 Z)および(11 Z)を用いて評価した。

【0232】

異なる診断用イオンが、異なるC=C結合位置の異性体のCIDから形成されることを考慮すれば、直接的なアプローチは、図55Aに示されるような定量のために、計測可能なものとして診断用イオンのイオン強度を使用する。この考えの実行可能性を試験するために、FA 18:1 (9 Z)およびFA 18:1 (11 Z)を使用した。図55Bは、9 Zおよび11 Zの混合物から生じるm/z 339.3スペクトルの拡大したPB-MS² CIDを示している(ここで、総濃度を10 μMで維持したが、しかしながら種々のモル比(C11 Z:C9 Z=4:1~1:4)を用いた)。各診断用イオン対のイオン強度を合計し、イオン強度比(I11 Z:I9 Z)を濃度比(C11 Z:C9 Z)に対してプロットする。そのような検量線を図55Cに示す。線形フィットは、0.9952というR²値および10%未満の相対標準偏差(RSD)を有する。この結果は、診断用イオン強度が、C=C異性体の定量に使用できることを示している。

【0233】

検量線の相対標準偏差における、C I Dに使用された活性化エネルギーおよびC I Dのタイプ（オン共鳴C I D 対 ビーム型C I D）を調べた。それによって、定量分析のための異性体脂質の各群の最適化されたC I D条件が確立された。この知識は、複雑な混合物の分析に直接変換可能である。

【0234】

検量線は、イオン強度比および濃度比から確立されるので、異なる濃度範囲に対して同じ直線関係が保持されるかを評価することが重要である。F A 1 8 : 1 (9 Z) および (1 1 Z) に基づく本発明者らの予備的研究は、0. 1 μ M ~ 1 0 0 μ M の総濃度範囲内において検量線の変動がほとんどないことを示した。異性体比に対する線形のダイナミックレンジの程度も推定した。

10

【0235】

2つの異なるアプローチを試験し、脂質異性体の定量分析のためのそれらの分析性能指数に関して比較した。F A 1 8 : 1 C = C 異性体を方法の開発に使用した。不飽和脂質の定量のためにP B - M S / M Sを用いる原理（図55C）は、C = C 診断用イオンの強度に基づくので、最善の内部標準（I S）は、その系に天然に存在しないC = C 結合異性体であるべきである。ペトロセリン酸F A 1 8 : 1 (6 Z) は、マウスまたはヒト細胞において通常検出されないもので、F A 1 8 : 1 (9 Z) および (1 1 Z) 異性体を定量するための内部標準の良好な選択肢である。6 Z のP B 反応生成物の衝突活性化によって、m / z 1 5 5 および 1 8 1 の診断用イオンが生成される。9 Z / 6 Z および 1 1 Z / 6 Z の診断用イオン強度比に基づいて、図55Dに示されているような9 Z および 1 1 Z に対する2つの検量線を得た（ここで、6 Z の濃度を1 0 μ M で一定に維持し、9 Z および 1 1 Z の濃度を1. 5 ~ 4 5 μ M の範囲で変動させた）。9 Z 異性体と1 1 Z 異性体の両方に対して優れた直線関係が得られた。P B 反応、イオン化およびC I D の効率に起因する実験の変動を回避することによるこのI S法は、有益である。

20

【0236】

利用可能性に応じて、C = C 異性体の1つが、標準添加法のための参照として使用できる。F A 1 8 : 1 9 Z および 1 1 Z 異性体の模擬混合物に対する標準添加法を行うためにF A 1 8 : 1 (1 1 Z) の使用を試験した。標準添加法の前および後で、P B - M S ² C I D を記録した。この情報を使用し、図55Cに記載されている相対検量線（relative calibration curved）を用いることによって、標準添加法の前後の1 1 Z 対 9 Z の濃度比を計算した。上記の情報と標準添加法の既知の量とを組み合わせると、9 Z と 1 1 Z の両方の絶対濃度がそれぞれ良好な精度で測定された。

30

【0237】

リピドミクス研究のためのP B - E S I - M S / M S プラットフォームの開発

M S ベースのリピドミクス分析は、生物学的サンプル由来の脂質抽出物に対して直接行うことができる（いわゆるショットガンリピドミクス）か、またはL C 分離と連結することができる。ショットガン法は、構造情報と定量情報の両方を提供することによってリピドームのハイスループットな包括的プロファイリングを容易にし、バイオマーカーの検出および検証のための強力なツールになる。低存在比の脂質、イオン化効率が低い脂質、ならびに脂質異性体の同定および定量は、高度の複雑さ（2 0 0 ~ 4 0 0 個の脂質種）、異なる化学的・物理的特性、および広範なダイナミックレンジ（4 ~ 6 桁の濃度差）に起因して、生物学的サンプル由来の脂質抽出物を分析する際のショットガンアプローチにとって常に難題である。この課題は、L C などの分離をM S 分析の前にまたはM S 分析とオンラインで行うと、効果的に対処される。現在、ショットガン法およびL C - M S (/ M S) 法は、ほぼ等しい頻度で用いられており、合わせると、リピドミクスに関する科学報告の8 0 % を占める。複雑な脂質混合物の分析によるC = C 特異性を高めるために、これらの2つのプラットフォームの両方においてP B - M S / M S ストラテジーを実施することは、非常に興味深い。

40

【0238】

ナノE S I とE S I の両方の構成を、商業的に入手した酵母由来酵母極性抽出物（A v

50

anti) のショットガン分析のための PB-MS/MS を実施するために使用した。この酵母極性抽出物は、主に、FA および GP からなり、各サブクラスの相対組成は、記述されている。直接注入 ESI の構成と連結された PB-MS/MS は、C=C の位置の決定とともに、PC、PE、PI、PA、PS、LPC、LPE、LPA、LPS を含む 35 個の不飽和 GP 種の同定を可能にした (詳細な分子情報を図 56 に示す)。PB-MS/MS 法は、C=C の絶対配置を提供できないので、C=C をカウントする命名法は、生物学的サンプルから同定された脂質に対する C=C の位置を検出するためにアシル鎖のメチル末端から追跡した (例えば、 $n-7$ または $n-9$)。同定された GP は、 $16:0$ 、 $18:0$ 、 $16:1$ ($n-7$) および $18:1$ ($n-9$) のアシル鎖の組み合わせを含んだ。約 0.1% の mol% を有するいくつかの低濃度種 (例えば、 $LPA\ 18:1$ ($n-9$) および $LPS\ 16:1$ ($n-7$)) を、高い信頼性で同定できることに注意することが重要である。興味深いことに、C=C 位置の異性体は、この系からは観察されなかった。これらの予備的な結果は、オンライン PB-MS/MS をショットガン脂質分析に適用する実行可能性を実証する。

10

20

30

40

50

【0239】

Agilent 1200 HPLC は、TurboESI-QTRAP 4000 MS インターフェース (両方とも PI のラボにおいて利用可能) に連結され得る。PB 試薬 (アセトン) を溶出剤中に T 字形注入する上に記載された「フロー注入デバイス」を用いて、LC 分離の後かつ ESI-MS/MS 分析の前に、PB 反応を実行した。全体の構成の概略図を図 57 に示す。この配置によって、分離プロセスに対する妨害が最小になる。この実施例に対する上に記載された条件を用いることにより、試験するための最初のパラメータを選択する際の指針が提供された。これらには、混合のための脂質溶出剤/アセトン比、そのような溶媒条件下での PB の反応時間 (UV 曝露時間)、および UV 曝露用の溶融石英キャピラリーの必要な長さが含まれる。現行の HPLC システムが管理できる最低流速は、 $250\ \mu\text{L}/\text{分}$ である。この流速は、最適化された溶媒条件下における 10 秒間の UV 曝露時間に対して溶融石英キャピラリーの約 3 m の曝露を必要とする。最初の試験では、HPLC 溶出剤の 24:1 分割を行い、 $10\ \mu\text{L}/\text{分}$ の溶出剤を、曝露のための 20 cm のキャピラリー長に相当する 10 秒間の PB 反応のために、 $5\sim 10\ \mu\text{L}/\text{分}$ のアセトン溶液に T 字形注入した。この条件を、「フロー注入」の構成を用いて模倣した。1 つのシリンジを、 $\text{H}_2\text{O}:\text{ACN}:\text{IPA}$ (43:42:15) に溶解された標準的な PC、5 mM ギ酸アンモニウム (AF)、通常の LC 均一濃度 (isocratic) 分離条件のために、 $10\ \mu\text{L}/\text{分}$ でポンピングした。アセトンを $10\ \mu\text{L}/\text{分}$ で送達したところ、PC の良好な PB 反応収率が達成された。

【0240】

CID ベースの PB-MS/MS 法は、種々のクラスの不飽和脂質に対して C=C 特異的な構造情報および定量情報を提供できる。そのような方法を大規模なリピドミクス研究に応用するために、発見モードと標的化された脂質分析の両方のために、PB 反応生成物のユニークな CID フラグメンテーション化学に基づいて MS/MS データ収集ワークフローを合理的にデザインすることが重要である。

【0241】

その後の MS/MS のための PB 生成物の容易な同定は、C=C 結合の位置情報と定量の両方を得るために重要な工程である。PB 反応が、不飽和脂質からさらなる m/z ピーク (分子種) をもたらすことを考えれば、これはショットガンアプローチに役立つが、生物学的サンプルの脂質抽出物から得られるすでに密集した MS スペクトルをさらに悪くする。この難問に対処するために、58 Da のニュートラルロス (NL58) スキャンおよびデータに依存した PB 探索を含む 2 つの方法を試験した。上記の NL58 スキャンの予備的研究は、NL58 (オキセタン環からのアセトンのロス) が PB 反応生成物に特徴的であり、FA および中性脂質 (すなわち CE、MG) に共通して観察されることを示す。ゆえに、NL58 MS/MS スキャンは、それらの脂質クラスの PB 反応生成物の迅速かつ高感度の発見を可能にするはずである。PB 反応生成物だけが検出されるので、ス

ペクトルは、高感度で非常に単純化される。酵母抽出物をモデル系として使用して、そのNL58スキャンをさらに最適化した。評価は、同定され得る脂質種の数および検出限界に基づいた。NL58が大量のフラグメンテーションチャンネルではない脂質クラス（例えば、GP）のバーチャルな（Virtue）PB探索、本発明者らはまず、負イオンモードで「マルチプルプリカーサーイオンスキャン（multiple precursor ion scattering）（MPIS）」アプローチ（例えば、PIS m/z 279（FA18:2）、281（FA18:1）、301（FA20:5））を用いることによって不飽和アシル鎖からなるGPを標的にする。PB m/zリストは、それらの不飽和脂質種に58Daを付加することによってコンピュータによって生成され、さらにPB-MS/MS分析のために選択される。

10

【0242】

多くのリピドミクス研究の場合、検出および定量のために既知の脂質種を選択を標的にすることが興味深い。これは、典型的には、三連四重極MSなどのタンデムインスペース質量分析計において、選択された反応のモニタリング（MRM（マルチプルリアクションモニタリング）としても知られるSRM）を用いて行われる。親イオンとフラグメントイオンとの間の定義された関係性（「トランジション」という言葉が造られている）が、最終的には、この方法の分析性能指数を決定する。PB反応生成物に関連するユニークなフラグメント、すなわち、C=C診断用イオンNL58Daの形成を考慮すると、それらをトランジションにおいて使用することは単純明快である。特異的かつ高感度の検出のためのトランジションの最適数を決定する目的で、酵母抽出物に加えられた脂質標準物質を標的にすることによって、これらのトランジションを試験した。

20

【0243】

PB反応生成物のCIDスペクトルから自動的にC=Cの位置を決定することを容易にするデータ処理ツールが、開発され得る。そのプログラムは、matlabで書かれ、最初の試験は、モデル脂質種から取得されたデータに対して行われ、次いで、生物学的サンプル由来の脂質抽出物を用いて最適化される。このプログラムは、以下のファンクション層を有し得る：1）診断用イオン選択の法則。標準的な選択アルゴリズム（3×ノイズレベル）に加えて、26Daの質量差（PB試薬としてアセトンを使用したこと起因する）を有するピークが選択され得る。2）C=Cの位置の決定。クラス特異的アルゴリズムをC=C結合の位置を決定するために使用し得る。MUFAおよびGPの場合、負イオンモードで収集されたPB-MS²またはMS³CIDデータを使用する。簡単にするために、診断用イオン対のうちより低い質量ピーク（C_nH（2_n-3）O₃⁻）からC=C結合の位置を計算し得る。数字nは、カルボン酸から数えたときのC=C結合の位置を表す。PUFA、CEおよびGLの場合、電荷担体としてアルカリ金属付加体を用いて正イオンモードで収集されたPB-MS²/MS³CIDデータを使用し、診断用イオンの構造を反映させるためにしかるべくC=Cの決定式を改変する。PUFAの場合、C=Cの決定は、メチレン基で分離されるC=Cに対するシグニチャである、同じシリーズ（series）の診断用イオンの40Da（C₃H₄）のスペーシングによってクロスチェックされる。

30

【0244】

C=Cが特定された種は、脂質標準物質から生成されたMS/MSスペクトルデータベースおよび脂質抽出物から取得され手動で解釈されたデータと比較される。スペクトル類似性スコアが、C=Cの位置とともにスコアリングシステムに報告され、類似性スコアが低いものは、手動で評価される。

40

【0245】

ラット脂質分析に対する検証および適用

PB-MS/MSを行うために最適化されたパラメータに基づいて、ラット組織由来の脂質抽出物を使用し、不飽和脂質分析に対するその有用性を、C=C位置の異性体の検出および定量のユニークな能力に重点を置いて検証した。このタイプの情報は、哺乳動物のリピドームの内在性の多くの脂質クラスで獲得されていないので、さらなる方法の開発、

50

および $C=C$ の決定を可能にする他の分析方法（例えば、OZID）との相互比較のためのベンチマークを形成し得る。このプロジェクトの別の目標は、信頼性の高い $C=C$ 割り当て、ならびに $C=C$ 異性体が存在する場合、その組成を含む、生物学的サンプル由来の不飽和脂質のデータベースを確立することである。このデータベースは、自動的な未知脂質 $C=C$ のためにも使用され得る。

【0246】

上に記載されたナノESIの構成を用いて、ラット脳由来の極性脂質抽出物に対する最初のショットガン脂質分析を行った。脂質抽出を、確立された抽出条件を用いて20～50mgの組織において行った。N₂で乾燥させた抽出物を、正または負イオン化モードでPB-MS/MSを行うために1%酸または塩基を加えた1:1アセトン/H₂O溶液で再構成した。FA16:1 (n-7)、18:2 (n-6) および20:4 (n-6) を除く検出されたすべての遊離FAが、 $C=C$ 位置の異性体を有すると見出された。例えば、FA19:1は、n-8およびn-10異性体の混合物であり、FA18:1および20:1は、n-7およびn-9異性体の混合物であり、FA22:1は、 $C=C$ がn-7、n-9またはn-11に位置する3つの異性体からなる（図58A）。それらの相対組成は、上で論じられた $C=C$ 特異的診断用イオンの強度比に基づいて確立された。PB-MS/MSによって観察された $C=C$ 組成は、ラット脳由来の遊離FAの同定および定量的ためにGC-MSを用いた以前の報告と一致するが、しかしながら、サンプル消費がかなり少なく、分析時間が短いことに注目することが重要である。遊離FA18:1 $C=C$ の異性体組成と一致して、ラット脳におけるすべての18:1含有GPが、n-7およびn-9異性体の混合物であるが、これらの2つの(tow) $C=C$ 異性体の相対比は、異なる種で様々であった。同じアシル鎖を含む遊離FAとGPとの間に $C=C$ 異性体組成の一貫性が広く観察された。ラット脳のGP分析によって、(L)/PS、PE、PC、PI、PAから85個の分子種（それらの50%が少なくとも1つの $C=C$ 異性体型を有する）の完全構造が割り当てられた。これは、生物学的サンプルからの、 $C=C$ 位置ならびに $C=C$ 異性体組成の分子特異性を有する幅広いGPに関する初めての証拠文献である。

【0247】

他のクラスの脂質(CL、GL、CE、SM)の構造の特徴付けを拡張すること、定量分析を行うこと、低存在比の脂質の分析に対する限界を押し広げることを目的に、ラット脳組織の脂質抽出物を用いて、ショットガンリピドミックスのためのPB-MS/MSを、上で特定された条件を用いてさらに検証した。ラット脳の脂質抽出物を、上に記載されたHPLC-PB-MS/MSプラットフォームの検証にも使用した。これらの2つのアプローチから収集されたデータを相互比較し、両方のアプローチから特定された不飽和脂質をプールすることによって、比較的完成した脂質プロファイルを構築する。手動で注釈を付けた質量スペクトルデータを用いて、検索可能なデータベースを構築し、コンピュータによって支援される $C=C$ の決定および $C=C$ 異性体の相対定量を評価または訓練する。ラット脳脂質の分析は、サンプル調製、脂質の抽出、分離、PB-MS/MSおよびデータ解釈という局面を包含する一連のプロトコルの確立ももたらす。

【0248】

このデータは、ショットガンまたは分離ベースのプラットフォームを用いて、PB-MS/MSが、異なるタイプの生物学的サンプル（例えば、血漿および様々な組織タイプ）に適用できることを例証している。このデータは、遊離FA18:1およびPC16:0/18:1のn-7およびn-9 $C=C$ 異性体型が、種々のタイプのラット(rate)組織（例えば、脳、脂肪、腎臓、肝臓および筋肉）で一貫して観察されるが、これらの2つの異性体型の相対比は、異なる組織の間で様々であることを示している（筋肉由来のPC16:0/18:1 (n-7)異性体がある他のものと比べてより高い寄与であることに注意されたい、図58D）。これらの知見は、 $C=C$ 異性体の分布が種々のタイプの組織で同じではなく、それらの局所的環境におけるそれらのユニークな生物学的機能と結びついていることを初めて実証しているので、重要である。

【0249】

実施例15：質量分析法による不飽和脂肪酸の迅速な定量のための光化学的タギング

脂肪酸（FA）のプロファイリングは、表現型情報を提供するので、広範囲の生物学的および生物医学的研究にとってかなり興味深い。不飽和FAの定量、特に、高い信頼性で炭素－炭素二重結合（C=C）の位置を割り当てることを伴う不飽和FAの定量は、従来のガスクロマトグラフィー質量分析を用いるとき、サンプルと時間の両方を消費する。この研究において、本発明者らは、クロマトグラフ分離を頼りにせずに不飽和FAをプロファイリングするための迅速かつ高感度の定量的方法を開発した。この方法は、FAにおけるC=Cの溶液中での光化学的タギングと、その後のニュートラルロススキャンタンドム質量分析による気相デタギング（*de-tagging*）との組み合わせに基づいた。この方法は、生物学的サンプル（血液、血漿および細胞株）由来の一連の不飽和FAの直接的な定量を可能にした。ここで、従来から見過ごされていたFAのC=C位置の異性体の定量情報を得ることができ、正常なヒト前立腺細胞と癌性ヒト前立腺細胞との間のFAの変化の研究に応用できた。

10

【0250】

脂肪酸は、広範囲の生物学的機能において重要な役割を果たすことによって、生存しているすべての生物にとって必須である。脂肪酸は、エネルギーの貯蔵を容易にし、シグナル伝達において必須の役割を果たし、リン脂質、糖脂質、コレステロールエステルなどの複雑な脂質の基本単位である。FAの構造および生物物理的（*biophysical*）特性は、鎖の長さならびに炭素－炭素二重結合（C=C）の数、位置および配置によって規定される。多くの不飽和FAが、C=C位置の異性体を有すると知られており、それらの異性体の各々が、異なる生物学的機能を発揮する。例えば、オメガー6ポリ不飽和脂肪酸（ ω -6 PUFA）は、メチル末端から数えて6番目の炭素に位置に最初のC=Cを有し；それらは、 ω -3のC=C位置の異性体と比べて異なる炎症促進性および抗炎症性の機能を果たすと報告されている。不飽和FAの組成の変化といくつかの慢性疾患の発症および進行との間の相関関係を示す強い証拠がある。

20

【0251】

ガスクロマトグラフィー質量分析法（GC-MS）は、未だにFA分析のための方法の主流であるが、操作が容易であること、速度が速いこと、および複数のクラスについての脂質プロファイルを得ることが可能であることを理由に、ショットガン脂質分析が次第に用いられるようになってきた。ショットガンアプローチでは、粗脂質抽出物中のFAは、エレクトロスプレーイオン化（ESI）によってイオン化され、分離なしでMSによって分析される。正確な質量の測定値から、FAの鎖長および不飽和度などの分子情報が容易に推定できる。残念なことに、定性分析と定量分析の両方にとって強力な手法であると判明しているタンデム質量分析（MS/MS）は、インタクトなFAの分析に直接適用できない。これは、構造に関する情報価値のあるフラグメントイオンが、低エネルギー条件での衝突誘起解離（CID）によってFAアニオンからほとんど生成され得ないことが理由である。この状況は、不飽和FA、特に、一不飽和FA（MUFA）におけるC=C結合の位置を正確に指摘することも不可能にしている。

30

【0252】

代替のアプローチが探索された。FAのカルボン酸官能基の電荷スイッチ（*Charge-switch*）誘導体化が、FA分析においていくつかの利点を有すると示された。第1に、それは、ポジティブESIモードにおけるFAのイオン化効率を大幅に改善することから、分析の感度が改善される。より重要なことには、誘導されたFAイオンのCIDが、大量のシグニチャフラグメントイオンを提供できたことから、不飽和FAの検出および定量が可能になる。適切な誘導体化基を選択することによって、構造に関する情報価値のあるフラグメントイオンが、MS/MSから生成され得、C=C位置の手掛かりを提供し得る。科学文献は、電荷スイッチ誘導体化およびショットガン分析によって、ヒト血漿中に比較的低い濃度で存在したFA 18:3のC=C位置の異性体である α -および γ -リノレン酸（ ω -3および ω -6 FA 18:3とも称されることが多い）の同定を

40

50

報告している。

【0253】

この研究において、本発明者らは、溶液中での光化学的タギングに続いてMS/MSによる気相デタギングを用いることによって、複雑なサンプル中の不飽和FAを釣り上げ、定量する新しいアプローチを探索した。本発明者らの研究は、光化学反応、すなわち、パターン・ビューチ(PB)反応とオンラインMS/MSとの連結によって、様々なクラスの脂質に対するC=Cの位置を高い信頼性で割り当てることを可能にすると最近示した。このアプローチでは、脂肪酸アシル鎖における各C=Cを、エレクトロスプレー(ESI)プロセス中にUV照射において電子的に励起されたアセトンによってタグ化する。次いで、ESIによってイオン化された、アセトンでタグ化された脂質を、C=C結合の位置に特異的なフラグメントイオン(C=C診断用イオンと呼ばれる)を生成するMS/MSによって分析する。C=C診断用イオンのMS測定値は、C=C位置の異性体の同定と定量の両方のための情報を提供する。C=C診断用イオンの生成に加えて、タグのロス(−58Da、すなわちアセトンのロス)が、タグ化された不飽和FAのCIDにおける主なフラグメンテーションチャンネルであることを見出される。このアセトンロスが大量にあることが、C=C診断用イオンの検出に基づくFA分析の感度を制限する。しかしながら、本明細書で報告される新しく開発されたアプローチでは、このアセトンロスフラグメントチャンネルを利用して、複雑な生物学的サンプルから不飽和FAを釣り上げて定量する効果的な手段を導いた。ニュートラルロススキャンを用いることにより、アセトンによって特異的にタグ化された不飽和FAを選択し、それらの定量を容易に行うことができる。

10

20

【0254】

この概念を試験するために、FA18:1(9Z)(オレイン酸)とFA17:1(10Z)(cis-10-ヘプタデセン酸)との等モル混合物を、PB反応を介してアセトン光化学的タギングに供した。図59Aおよび59Bは、それぞれ光化学的タギングの前および後の、そのような混合物の負イオンモードナノESIスペクトルを示している(それぞれ、0.1%NH₄OHを含むアセトン/H₂O(50/50、v/v)中に3.5μM)。m/z325および339に、アセトンでタグ化されたFAの形成が良好な強度で明らかに検出された(それぞれ対応するインタクトなFA(m/z267のFA17:1およびm/z281のFA18:1)から質量が58Da増加していた)。タグ化されたFA、すなわち、タグ化されたFA17:1(m/z325)のMS2CID(PB−MS/MSとも称される)は、主なタグロス(−58Da)およびシグニチャ26Da質量分離を有するC=C診断用イオン対をもたらした(図59C)。この実験セットから、溶液中でのアセトンタギングおよび気相中でのアセトンデタギングのプロセスが効率的であることが実証される。

30

【0255】

次いで、この方法を、ヒト血漿(20μL)由来のFA抽出物の分析に適用した。その抽出物に、FA17:1(10Z)を、ヒト血漿中で無視できる存在比を与える内部標準(IS)として加えた。ナノESI−MSは、その抽出物が、種々の飽和および不飽和FAを含むことを明らかにした(図59D)。主要な種としては、FA14:0(m/z227.3)、16:1(m/z253.3)、16:0(m/z225.4)、18:2(m/z279.3)、18:1(m/z281.3)、18:0(m/z283.3)および20:4(m/z303.3)が挙げられた。光化学的タギングの後(図59E)、不飽和FAの相対強度は有意に低下し、同時に、タグ化されたFAが出現した(「*」で示されている、例えば、FA16:1に対するm/z311.4、FA18:2に対するm/z337.5および395.5、FA18:1に対するm/z339.3、ISに対するm/z325.2)。タギング反応(PB反応)は、100%の収率ではないので、込み入ったスペクトルを導く。しかしながら、CIDを介したニュートラルロススキャンを活用することによって、反応スペクトルは、大幅に単純化され、混合物から不飽和FAだけが検出された(図59F)。飽和FAが、NLS(58Da)スペクトル(図59F)に全く現れないことは注目に値し、これは、不飽和FAに対するPB反応によるタギ

40

50

ングが高い選択性であることの証拠である。

【0256】

分析ワークフローにMS/MSを組み込むと、MSのみの分析と比べて、不飽和FAの検出および同定が、より高感度かつ特異的になる。図60AおよびBは、2μLのラット全血サンプルを分析した場合のそのような比較を要約している。FA抽出物に対して25倍希釈を行ったところ、m/z 255および283などのMSスペクトルにおける最も大量のピークが、実際にバックグラウンドの化学的干渉に起因した（図60Aにおいて「#」で注釈）。m/z 253、279、281および303における低い強度ピークは、FA 16:1、18:2、18:1および20:4と質量が一致したが、しかしながら、正確な質量測定がなければ、それらの同一性は疑わしかった。58DaのNLSを適用することによって、図60Bに示されているように、タグ化されたFA 16:1、18:2および18:1が明らかに特定された。そのタギングおよびデタギングのプロセスが不飽和FAに特異的であるので、これらのFAに対する同一性の割り当てに対する信頼性は高い。

【0257】

不飽和FAに対する選択的検出の達成により、本発明者らは、定量分析へのその適用をさらに評価した。タギングは、PB反応におけるアセトンの量子収率によって制限されるので、MUF Aの場合、30～60%収率でしか達成できない。この状況下において、比較的一定のタギング効率を維持することは、定量分析にとって重要である。図61Aは、FA 18:1（9Z）と17:1（10Z）との等モル混合物に対するインタクトなFAおよびタグ化されたFAの抽出イオンクロマトグラムを示している。両方のFAが、同様の動態で反応したことが明らかである：タギングは、30秒間のUV照射の間にプラトーに達し、タグ化されたFAシグナルは、分析時間中（10～20分）、安定していた。興味深いことに、FA 17:1（10Z）は、FA 18:1（9Z）（約50%）よりもわずかに高い反応収率（約58%）を有した。58DaのNLS（図61B）に基づき、FA 17:1（10Z）をIS（7.5μM）として用いてFA 18:1（9Z）に対する検量線を得た。それは、優れた線形性（R²=0.9999）と高感度の検出（検出限界、LOD=15nM）の両方を示し、これは、従来のGC-MS分析に匹敵する。良好な線形性および検出限界を有する検量線は、16～24個の炭素のMUF Aに対して一貫して得られた（表11を参照のこと）。

【表11】

表 11

脂肪酸	検量線	R ²	LOD (μM)	LOQ (μM)
パルミトレイン酸 (FA 16:1)	$y = 0.1007x + 0.0262$	0.9972	0.039	0.39
リノール酸 (FA 18:2)	$y = 0.1116x + 0.0149$	0.9948	0.071	0.36
オレイン酸/cis-バクセン酸 ^[a] (FA 18:1)	$y = 0.1274x + 0.0324$	0.9996	0.035	0.35
アラキドン酸 ^[b] (FA 20:4)	$y = 0.2774x - 0.0621$	0.9961	0.33	0.66
α-リノール酸 (FA 18:3)	$y = 0.1887x - 0.0416$	0.9912	0.10	0.31

【0258】

FA 18:1のモル組成は、91.5%オレイン酸および8.5% cis-バクセン酸であると予め定め、それを用いて、FA 18:1に対する検量線を作成するための標準液を調製した。FA 16:1、FA 18:1およびFA 18:2に対する溶媒条件は、アセ

トン／H₂O中の5%エタノールである。FA 18 : 2、18 : 3および20 : 4に対する溶媒条件：アセトン／H₂O中の40%エタノール。

【0259】

アセトン／水（50／50、v／v）は、反応速度が速いことに起因して、MUFAをタギングするための良好な反応溶媒系である。しかしながら、この条件は、PUFAにおける複数のC=Cを連続的にタグ化する。例えば、アラキドン酸（FA 20 : 4（5Z、8Z、11Z、14Z））は、4つのC=Cを有するので、図61Cに示されているように、4つのアセトンタグ化生成物（m／z 361、419、477、535）が形成され得る。しかしながら、この過剰な程度の反応は、構造同定にとって最も有用な、1つだけタグ化された生成物の量を減少させるので、望ましくない。さらに、副反応、例えば、Norris Type I 反応（m／z 347、405、463、519のイオンを形成する）が、より競合的であると見出され、不飽和FAの検出および定量を干渉した。エタノールは、電子的に励起されたアセトンの光還元によってPB反応を減速させると示されている。本発明者らは、反応溶媒系へのエタノールの添加、すなわち、エタノール／アセトン／水（40／30／30、v／v／v）が、PUFAに対して、単一のアセトンでタグ化された生成物を最大に見出した。図61Dに示されているように、FA 20 : 4の単一のアセトンでタグ化された生成物（m／z 361）が、タグ化された全生成物の約80%を占め、その絶対強度は、アセトン／水（50／50）を使用した図61Cと比べて約5倍上昇した。この生成物（m／z 361）のMS2CIDは、主なタグロスおよびPUFAに対して共通して観察された小さな連続的な44Daロスを示した（図66）。ISとしてFA 17 : 1（10Z）を用いたときのFA 20 : 4の定量は、良好な線形性を有する58DaのNLSおよびエタノール／アセトン／水（40／30／30、v／v／v）の溶媒条件を用いて得られた80nMのLODで達成された。

10

20

【0260】

哺乳動物のリピドームにおいて、多くの不飽和FAは、C=C位置の異性体の混合物として存在することから、C=C位置の各異性体の定量を達成する強力な分析方法が必要とされる。光化学的タギングおよび58DaのNLSによって、C=C位置の異性体の総量が、より高感度で定量できる。C=C位置の異性体のモル比は、本発明者らが以前確立した方法を用いて、PB-MS/MSデータからC=C診断用イオン強度比を計測することによって得ることができる。次いで、各異性体に対する定量は、C=C位置の異性体のモル比の情報と総量を組み合わせることによって、達成され得る。このアプローチは、FA 18 : 1 Δ⁹およびΔ¹¹異性体の一連の混合物に対して行われた実験で成功したと見出された。C=C位置の異性体が、同じCID条件下において種々の程度のタグロスを有し得ることは注目に値する。ゆえに、純粋な異性体に対する検量線は、互いに重なり合わない（図68）。この現象は、FA C=C位置の異性体の混合物の定量に対して良好な精度を達成するために、校正用溶液が、真のサンプルから検出されるものと同じ異性体組成を用いて調製されるべきであることを示唆している。

30

【0261】

ヒト血漿中の不飽和FA分析

光化学的タギングに続く58Da NLSの方法を、ヒト血漿（20 μL）におけるFA分析に適用した。FA 17 : 1（10Z）（7.5 μM）をISとして抽出物に加えた。ナノESI-MSからのFAのプロファイルは、図59Dに示され、一方、不飽和FAのプロファイルは、58DaのNLSから見出すことができる（図59F）。C=Cの位置を決定するためおよびC=C位置の任意の異性体の存在を判定するために、定量的研究の前に、PB-MS/MSを各個別の不飽和FA（単一のアセトンでタグ化されたFA）に適用した。本発明者らは、FA 16 : 1（9）、18 : 2（9、12）および20 : 4（5、8、11、14）が、純粋な形態として存在することを見出した（ここで、括弧内の数字はC=Cの位置を示している）。次いで、これらのFAの定量を58Da NLSから得、以下のとおり測定された：28.9 ± 1.6 μMのFA 16 : 1、193 ± 20

40

50

μM のFA 18 : 2 および 18 : 1 $\pm 2.3 \mu\text{M}$ のFA 20 : 4 (図 6 9)。PB-MS / MS は、FA 18 : 1 および FA 18 : 3 が、C = C 位置の異性体からなることを明らかにした。図 6 2 A に示されているように、タグ化された FA 18 : 1 (m / z 339) の MS / MS CID が、m / z 171、197 および m / z 199、225 に 2 対の診断用イオンを生成した。これらの診断用イオンの検出は、それぞれ $\Delta 9$ および $\Delta 11$ における C = C 位置の異性体の存在を明らかに示唆した。それらの 2 つの異性体の C = C 診断用イオン強度比 ($\Delta 11 / \Delta 9 = 0.0662$) および確立されたモル比検量線 (図 6 2 B) に基づいて、FA 18 : 1 は、91.5% $\Delta 9$ および 8.5% $\Delta 11$ 異性体からなることを見出された。

【0262】

同じ組成の C = C 位置の異性体からなるが総濃度が異なる校正用溶液のセットを調製し、図 6 2 C に示されているような 58 Da NLS の検量線の作成に使用した。FA 18 : 1 の総濃度は、 $276 \pm 36 \mu\text{M}$ であることを見出され、これは、 $253 \pm 33 \mu\text{M}$ $\Delta 9$ 異性体および $23 \pm 3 \mu\text{M}$ $\Delta 11$ 異性体に対応する。PB-MS / MS は、FA 18 : 3 が、 $\omega - 3$ ($\Delta 9$ 、12、15 に C = C) および $\omega - 6$ ($\Delta 6$ 、9、12 に C = C) 異性体の混合物であることを示した (図 7 0)。ヒト血漿中の存在量が比較的少ないこと ($7.5 \pm 1.5 \mu\text{M}$) によって制限されるので、これらの 2 つの異性体間のモル比を正確に測定することは困難だった。それにもかかわらず、FA 18 : 3 $\omega - 3$ および $\omega - 6$ 標準物質の 1 : 1 (モル比) 混合物から観察された C = C 診断用イオン (図 6 2 D) をヒト血漿由来のもの (図 6 2 E) と比較することによって、 $\omega - 3$ 異性体が、 $\omega - 6$ 異性体よりも大量に存在することが見出された (図 7 1)。この知見は、文献における以前の報告と一致する。

【0263】

ヒト血漿中の不飽和 FA の主要 6 種の定量的データを図 6 3 A に要約する。文献に報告された電荷スイッチ法を、相互検証のために、同じセットのヒト血漿サンプルにも適用した。これらの 2 つの方法は、10% 以内の相対誤差で一致した定量測定値を提供した (図 7 2)。しかしながら、オンライン光化学的タギングと 58 Da NLS とを連結した方法は、不飽和 FA およびそれらの C = C 位置の異性体を高い信頼性で同定および定量できるという明確な利点を提供した。例えば、FA 18 : 1 C = C 位置の異性体は、FA 18 : 1 における $\Delta 11$ 異性体の濃度が比較的低いこと ($< 10\%$) におそらく起因して、電荷スイッチ法によって報告されなかった。

【0264】

正常および癌性ヒト前立腺細胞における不飽和 FA の定量

癌生物学の研究を助けるために、脂肪酸などの代謝産物の変化の定量的モニタリングが、ますます用いられる。FA のプロファイルは、細胞代謝の変化に起因して、正常細胞から癌 (cancer) 細胞に有意に変化することが示された。しかしながら、不飽和 FA の同一性は、代表的には、C = C の位置特異性のレベルで測定されない；ゆえに、異性体における個々の C = C の位置の変化は、未知である。光化学的タギングに続く 58 Da NLS という本発明者らの方法を用いることによって、不飽和 FA に対して高い分子特異性で定量することが可能であった。正常ヒト前立腺細胞 (RWPE1) および癌性ヒト前立腺細胞 (PC3 細胞) を比較研究のためのモデル系として使用した。主要な FA 種は、FA 16 : 0、16 : 1、18 : 0、18 : 1 および 18 : 2 を含むことを見出された (図 7 3 に要約された 2 つの細胞株の FA プロファイル)。FA 16 : 1 および FA 18 : 2 は、本発明者らの方法を用いて純粋であると判定され、両方の細胞株で C = C が、それぞれ $\Delta 9$ および $\Delta 9$ 、12 に位置し、FA 18 : 1 は、 $\Delta 9$ および $\Delta 11$ 異性体からなった (図 7 4)。

【0265】

不飽和 FA (16 : 1、18 : 1 および 18 : 2) の量の有意な増加が、前立腺癌細胞において検出され (PC3、図 6 3 B)、文献の報告と一致した。詳細には、両方の細胞株における最も大量の不飽和 FA 種として、PC3 細胞における FA 18 : 1 の総量は、

RWPE1細胞における総量の 6.0 ± 1.7 倍である(図63C)。FA16:1およびFA18:2も、それぞれ、RWPE1細胞と比べてPC3細胞において 3.4 ± 0.5 および 3.7 ± 0.7 倍増加した。興味深いことに、FA18:1の $\Delta 9$ および $\Delta 11$ 異性体の絶対量は、両方ともPC3細胞において増加したが、FA18:1における $\Delta 11$ 異性体の相対的寄与は、低下した。図63Bの挿入図の円グラフに示されているように、 $\Delta 11$ 異性体の%組成は、RWPE1細胞における $48.0 \pm 1.3\%$ から、PC3細胞における $31.0 \pm 0.9\%$ に低下した。FA18:1の $\Delta 9$ および $\Delta 11$ 異性体は、FA16:0(パルミチン酸)からではあるが、鎖の伸長と不飽和化が逆の順序で、生合成される。正常から癌性前立腺癌細胞へのFA18:1 C=C位置の異性体の絶対量と相対濃度の両方の有意な変化は、2つの細胞株間のFA18:1の生合成経路または代謝経路の変化を示唆する。

10

【0266】

溶液中での光化学的タギングとオンラインタンデムMS(58Da L S)との組み合わせを利用して、不飽和FAおよびそれらのC=C位置の異性体の迅速かつ高感度の定量を可能にする新しい方法が開発される。この方法は、生物学的サンプル由来の複雑なFA混合物を分析するためのショットガンリピドミクスのワークフローに適合する。この方法を用いて、不飽和FAの定量が、従来のGC-MS法および電荷スイッチ誘導体化法に匹敵する性能で、ヒト血漿およびヒト細胞株に対して達成された。より重要なことには、ここで、FA C=C位置の異性体分析は、高い信頼性で行うことができる。ここで、不飽和FA異性体の組成および相対的存在量などの情報は、それぞれFA18:1およびFA18:3 $\omega-3/\omega-6$ を用いて実証されるように、生物学的研究のために容易に入手可能であり得る。疾患研究のためのこの方法の適用は、脂質バイオマーカーの発見に至り得る、FA異性体を制御する生物学的プロセスの別のレベルの理解をもたらすと予想される。

20

【0267】

脂肪酸標準物質、ラット全血およびヒト血漿サンプルを、商業的供給業者から購入した。FAの抽出は、LIPID-MAPSプロトコル(<http://www.lipidmaps.org/protocols/PP0000005301.pdf>)に従って行った。254nmにおける主要な発光バンドを有する低圧水銀ランプをナノESIエミッターから1.0cm離して置いて、光化学反応を惹起した。すべてのMS実験を4000 QTRAP三連四重極/リニアイオントラップ質量分析計(Sciex)において行った。

30

【0268】

化学物質および材料

すべてのFAおよびジュウテリウムで標識されたFA標準物質をCayman Chemical(Ann Arbor, MI)から購入し、さらに精製せずに使用した。プールされたヒト血漿(抗凝固薬としてLiヘパリン)をInnovative Research(Novi, MI)から購入した。他の化学物質は、Sigma Aldrich(St. Louis, MO)から購入した。

【0269】

細胞培養

すべての細胞を、 37°C の湿度恒温器内において5%CO₂供給で培養した。前立腺癌PC3細胞を、10%ウシ胎児血清(FBS)、100単位/mLペニシリンおよび100 $\mu\text{g/mL}$ ストレプトマイシンが補充されたF-12K培地中で維持した。正常な前立腺上皮RWPE1細胞を、30 $\mu\text{g/mL}$ ウシ下垂体抽出物および0.2 ng/mLヒト組換え上皮成長因子(Invitrogen, Carlsbad, CA)が補充されたケラチノサイト無血清培地中で培養した。

【0270】

ヒト血漿およびヒト細胞からFAを抽出するためのプロトコル

以下の方法を用いて、ヒト血漿からFAを抽出した。

50

【0271】

16 mm×125 mmガラス管内の20 µLのヒト血漿に30 µLのdPBSを加えた後、60 µLのメタノールを加える。次いで、その混合物を、25 mMの最終濃度に達するように1 M HClで酸性化する。

【0272】

0.1 mLのイソオクタンを加えた後、サンプルをボルテックスし、3000 gで1分間遠心して、層を分離する。上層を取り出し、10 mm×75 mmガラス管に移す。

【0273】

工程2を一度繰り返す。

【0274】

有機層を合わせる。抽出物を減圧下でまたは窒素流を用いて乾燥させる。

以下の方法を用いて、細胞からFAを抽出した：

【0275】

16 mm×125 mmガラス管内の1 mLのH₂O中の500万個の細胞を3000 rpmで2分間遠心した後、上層の水層を廃棄した。

【0276】

細胞に300 µLのdPBSを加えた後、600 µLのメタノールを加えた。細胞懸濁液を、25 mMの最終濃度に達するようにHClで酸性化した。

【0277】

1 mLのイソオクタン（2, 2, 4-トリメチルペンタン）を加えた後、サンプルをボルテックスし、3000 gで1分間遠心して、層を分離した。上層を取り出し、10 mm×75 mmガラス管に移した。

【0278】

工程3を繰り返す。

【0279】

有機層を合わせる。抽出物を減圧下または窒素流下で乾燥させる。

【0280】

光化学的タギングおよびタンデムMS分析

定量に向けて、MS分析の前に、MUF_Aをアセトン／水（50／50 v／v）中の5 %エタノールに溶解し、一方、PUF_Aをアセトン／水（50／50 v／v）中の40 %エタノールに溶解した。ネガティブモードナノESI-MSによるFAの検出を容易にするために、0.5 %（v／v）NH₄OH（NH₃として28 %～30 %）をすべてのFA溶液に加えた。ホウケイ酸ガラスキャピラリーチップ（外径1.5 mmおよび内径0.86 mm）を用いて、P-1000 Flaming／Brownマイクロピペットプレー（Sutter Instrument, Novato, CA, USA）によって、外径が約10 µmのナノESIチップを引き延ばして作製した。そのホウケイ酸ガラスチップの後ろの開口部から脂質溶液を充填した。電気接点として働くそのチップにステンレス鋼ワイヤを挿入し、ナノESIチップをMSサンプリングオリフィスと整列させた。PB反応1を介した光化学的タギングを惹起するために、低圧水銀（LP-Hg）ランプ（254 nm, Model No. : 80-1057-01, BHK, Inc., CA, USA）をナノESIエミッターから1.0 cmに配置した。すべてのMS実験を4000 Q TRAP三連四重極／リニアイオントラップ（LIT）ハイブリッド質量分析計（Applied Biosystems／Sciex, Toronto, Canada）において行い、その概略図を図64に示す。機器のパラメータは、以下のとおりであった：ESI電圧、-1200～1800 V；カーテングス、10 psi；インターフェースヒーター温度、40 °C；デクラスタリング電位：-20 V。選択されたPB反応生成物のMS／MS分析のために、単離幅を1.5 Thに設定し、プリカーサー強度をおよそ4×10⁶ カウントで維持した。イオン注入時間は、10～200 ミリ秒であった。FAのPB反応生成物のために使用した衝突エネルギー（CE）は、35 V（ビーム型CID）または50 a.u.（共鳴トラップCID）であるように最適化された。ニュートラルロススキャ

10

20

30

40

50

ン（NLS）の場合、35VのCEを使用した。

【0281】

ヒト血漿中の遊離FAの分析

図65に示すスキームに従って、FA抽出効率を推定した（同位体で標識された内部標準を用いて）。結果を表12に示す。

【表12】

表12

抽出前に加えた 標準物質	比 (D/H)	抽出後に加えた 標準物質	比 (D/H)	回収率(%)
C16:1-d14/C16:1	6.43	C16:1-d14/C16:1	8.09	79.53
C18:1-d17/C18:1	0.84	C18:1-d17/C18:1	1.05	80.19
C18:2-d11/C18:2	1.27	C18:2-d11/C18:2	1.62	78.19
C20:4-d8/C20:4	1.61	C20:4-d8/C20:4	2.00	80.51

10

【0282】

図66に示されているように、PUFAのタギングの条件を最適化した。FA C=C異性体組成を以下のとおり測定した。診断用イオンの質量電荷比を用いることにより、各FA C=C異性体におけるC=Cの位置を正確に決定することができる。さらに、本発明者らの最近の研究は、診断用イオンの総強度を用いることによっても、脂質C=C異性体を定量することができることを示した2。図66は、プールされたヒト血漿中のFA 18:1のPB生成物のCID質量スペクトル（ m/z 339.3）を示しており、2対の診断用イオン（ m/z 171、197および m/z 199、225）が、2つのFA 18:1 C=C異性体（ $\Delta 9$ および $\Delta 11$ ）の存在を明らかに示唆する。2対の診断用イオン間の比を検量線に入力することによって（図66における挿入図）、本発明者らは、プールされたヒト血漿中のFA 18:1が、91.5%の $\Delta 9$ 異性体および8.5%の $\Delta 11$ 異性体からなることを明らかにした。

20

【0283】

低存在比のPUFAおよびそれらの異性体を、図69～72に示されているように定量した。

【0284】

FAの電荷スイッチ（charged-switched）AMPP誘導体化によって、相互検証を行った。AMPP誘導体化は、脂肪酸に対する検出感度を改善するための効果的な方法として開発された。この研究において、本発明者らは、この戦略をヒト血漿中の脂肪酸の定量のために用いて、内部標準としてリノール酸-d11およびオレイン酸-d17を使用して、開発されたPB/NLS法を検証した。アイソトポログ（isotopologue）は、対応する脂肪酸と同じイオン化効率を有する。誘導体化の後、すべての脂肪酸および内部標準を、ポジティブナノESI-MSによって高感度で検出でき、AMPPによって誘導体化された各脂肪酸は、CIDにおいて m/z 183.3に特徴的なイオンを生成する（図70）。プリカーサーイオンスキャン（PIS）スペクトルにおいて脂肪酸と対応するアイソトポログとの間のピーク比を比較することによって、ヒト血漿中のFA 18:1およびFA 18:2の濃度が、254 μ Mおよび180 μ Mであると測定され、PB/NLS法によって得られた結果（276.4 $\pm$ 35.6 μ Mおよび193.3 $\pm$ 20.3 μ M）と一致した。

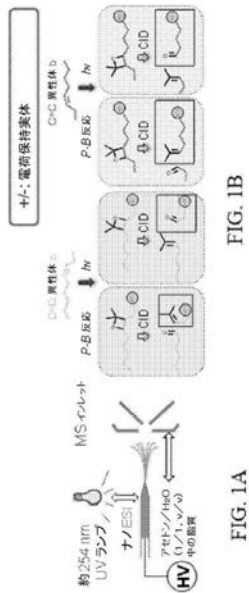
30

40

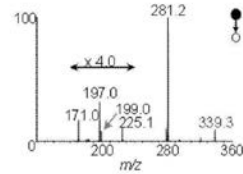
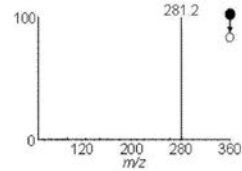
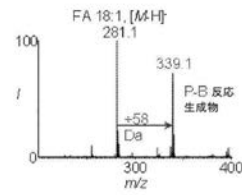
【0285】

図73および74に示されているように、正常前立腺細胞および癌性前立腺細胞における不飽和FAを分析した。

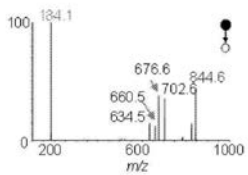
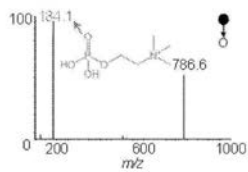
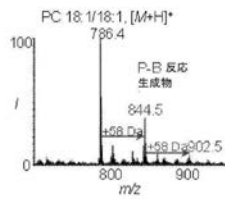
【図 1 A B】



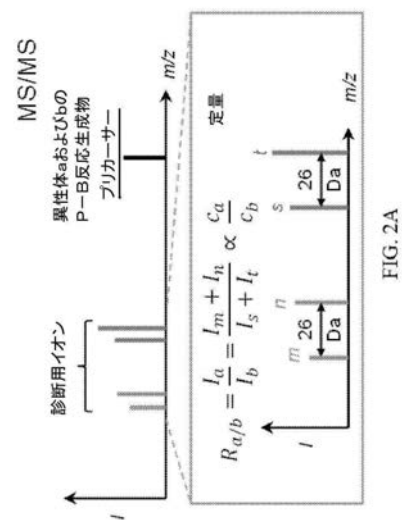
【図 1 C D E】



【図 1 F G H】



【図 2 A】



【図 2 B】

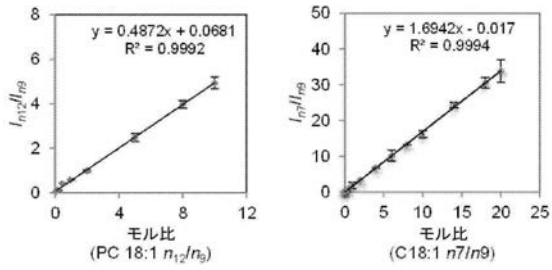


FIG. 2B

【図 2 C D】

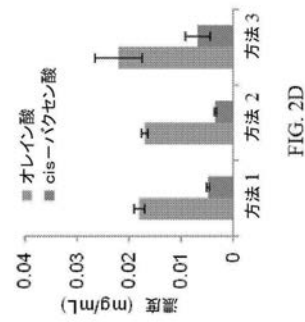


FIG. 2D

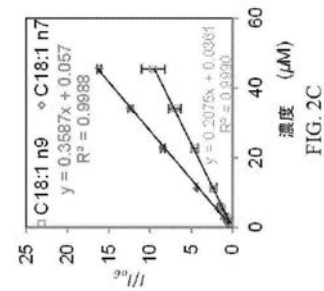


FIG. 2C

【図 3 A B】

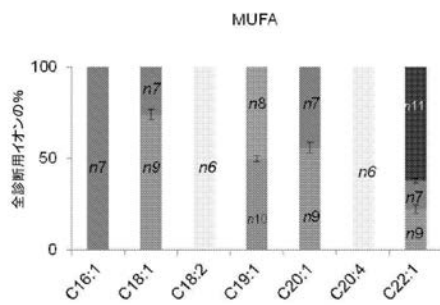


FIG. 3A

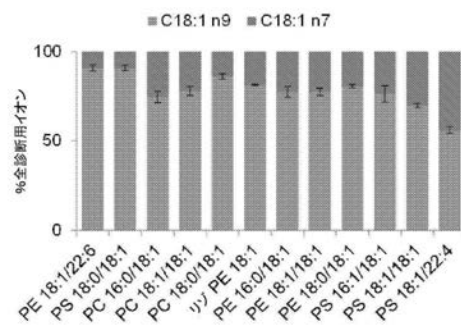


FIG. 3B

【図 3 C D】

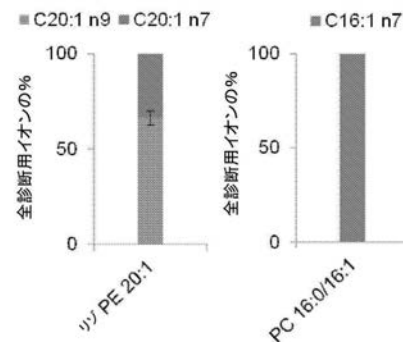


FIG. 3C

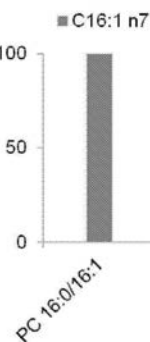


FIG. 3D

【図 3 E F G】

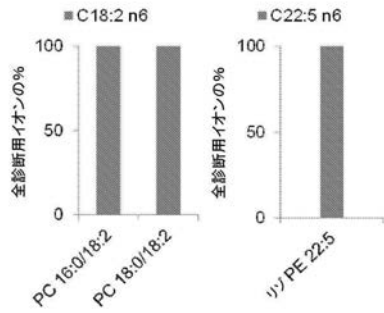


FIG. 3E

FIG. 3F

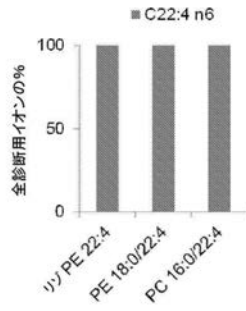


FIG. 3G

【図 3 H I】

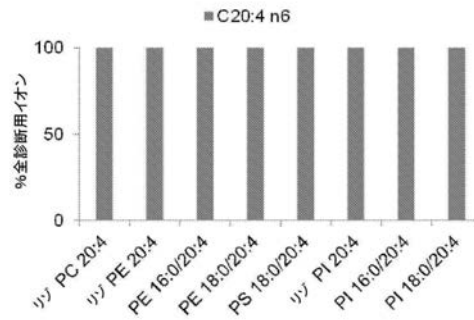


FIG. 3H

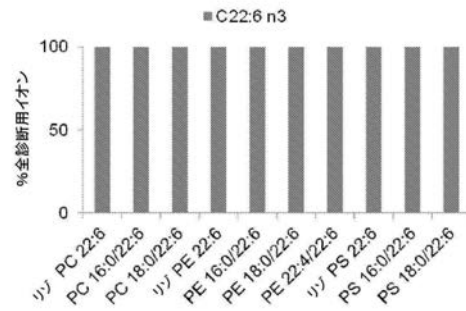


FIG. 3I

【図 4 A B】

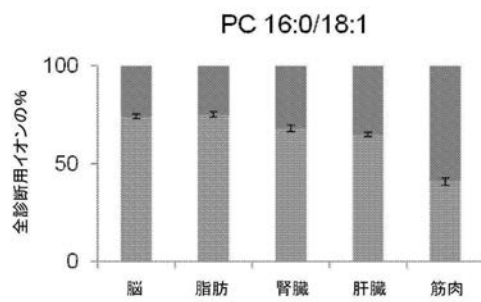


FIG. 4A

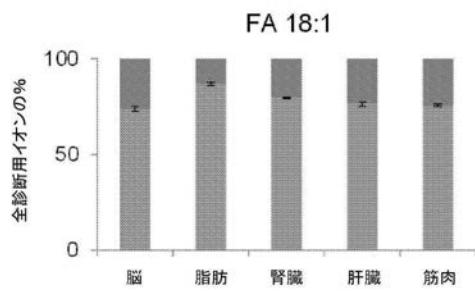


FIG. 4B

【図 4 C D E F】

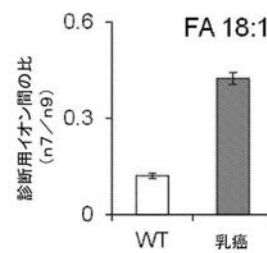


FIG. 4C

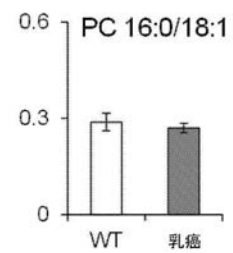


FIG. 4D

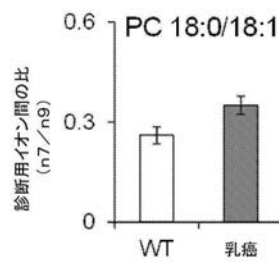


FIG. 4E

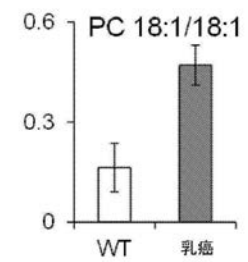


FIG. 4F

【図 5 A】

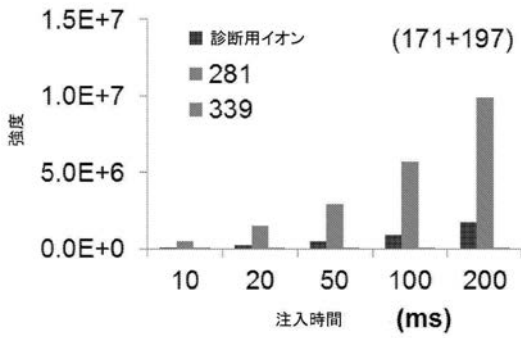


FIG. 5A

【図 5 B】

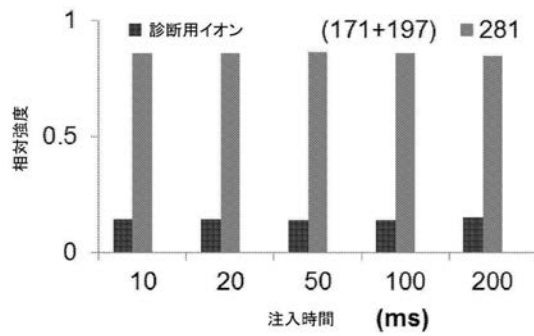


FIG. 5B

【図 7 A B】

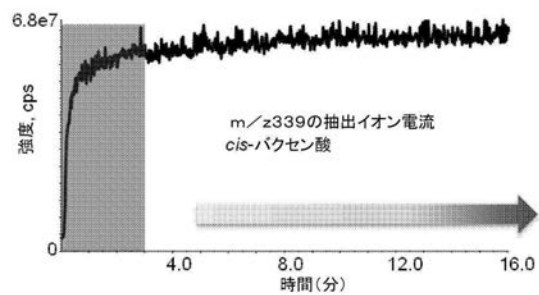


FIG. 7A

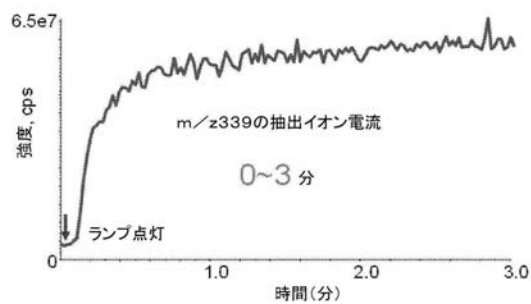


FIG. 7B

【図 6】

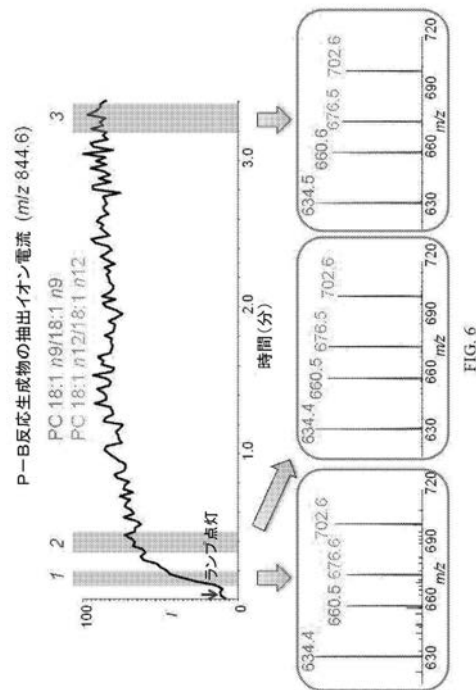


FIG. 6

【図 7 C】

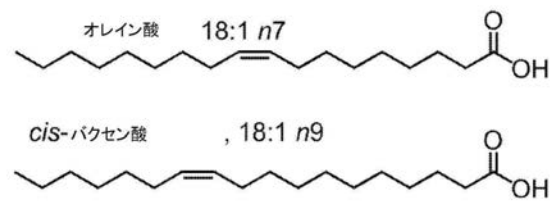


FIG. 7C

【図 7 D】

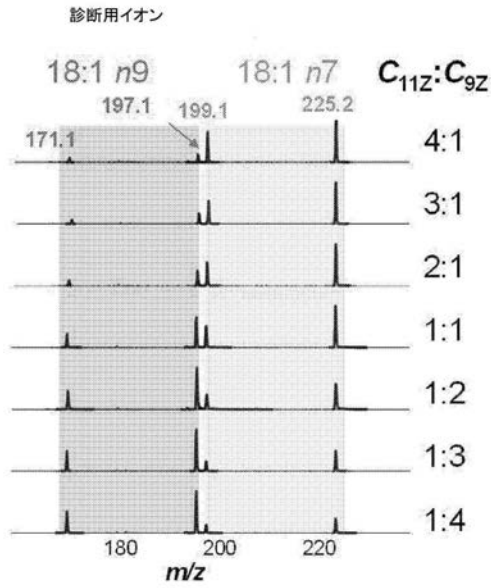
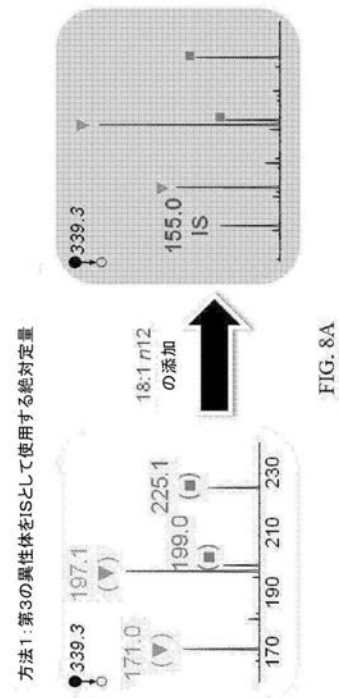
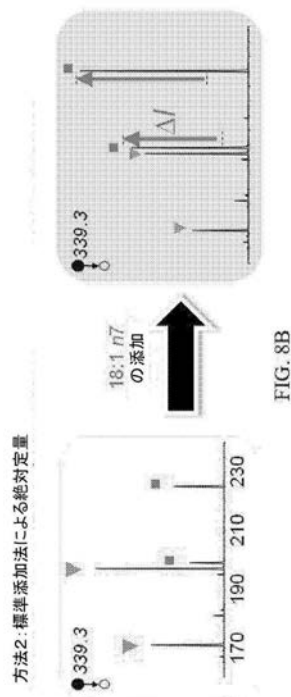


FIG. 7D

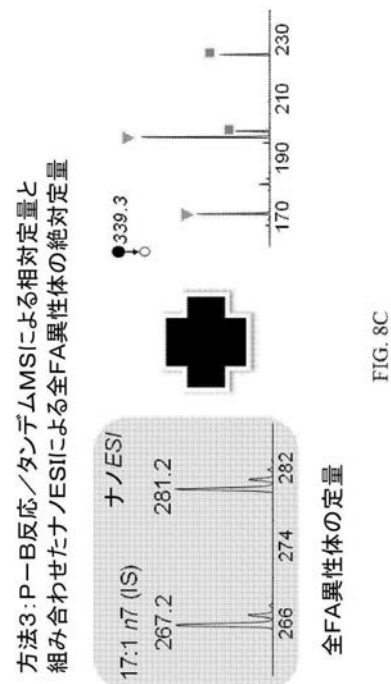
【図 8 A】



【図 8 B】



【図 8 C】



【図 9 A】

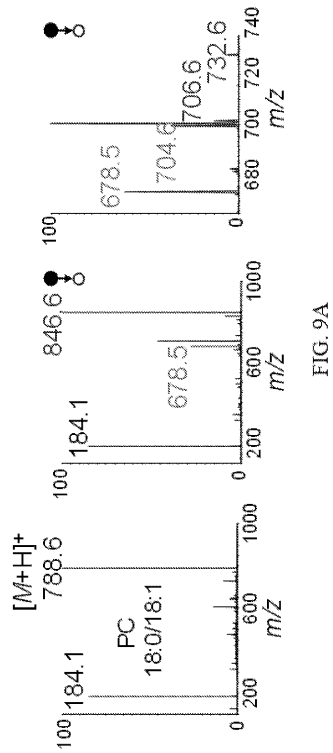


FIG. 9A

【図 9 B】

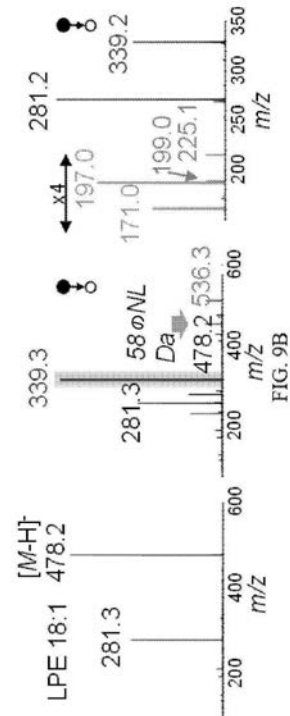


FIG. 9B

【図 10】

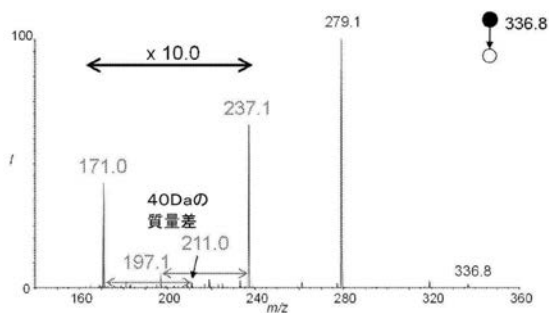


FIG. 10

【図 11 B】

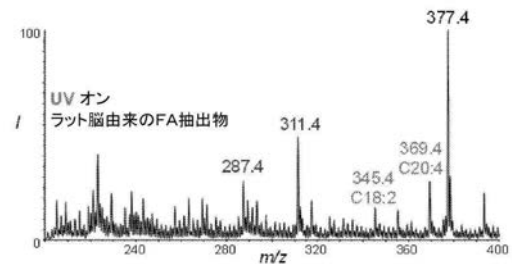


FIG. 11B

【図 11 A】

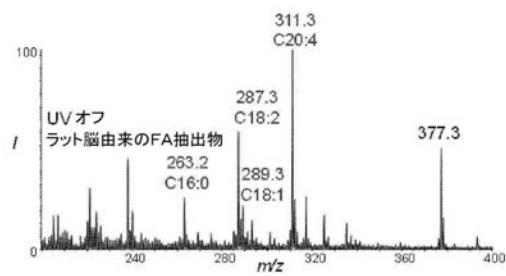
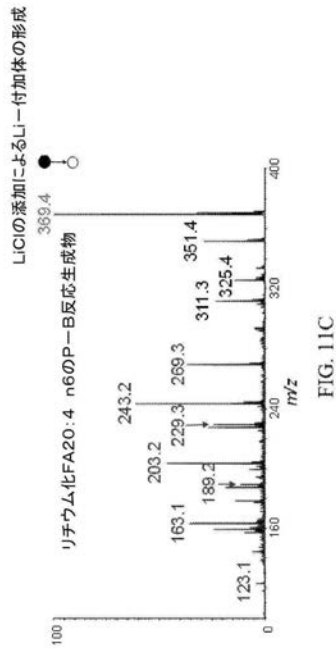
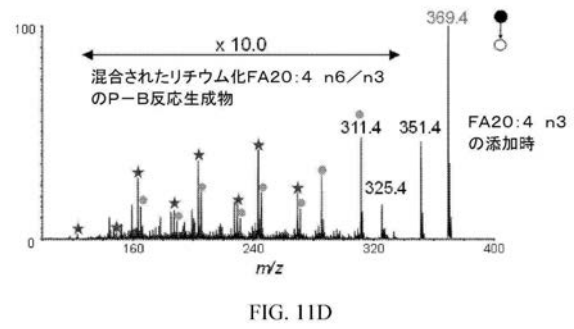


FIG. 11A

【図 1 1 C】



【図 1 1 D】



【図 1 1 E】

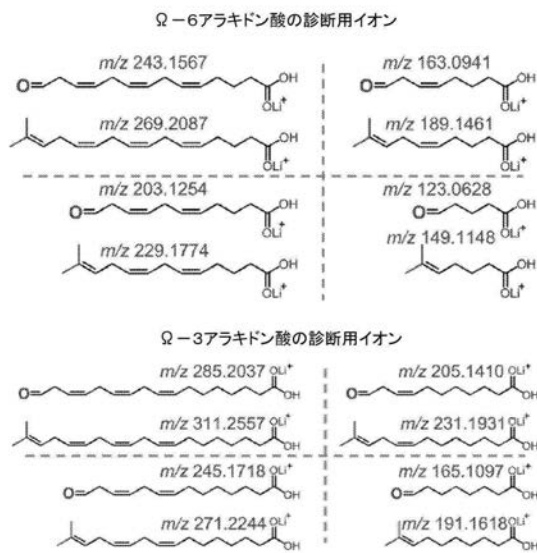
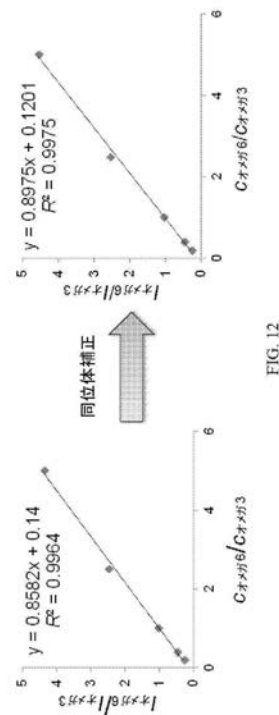
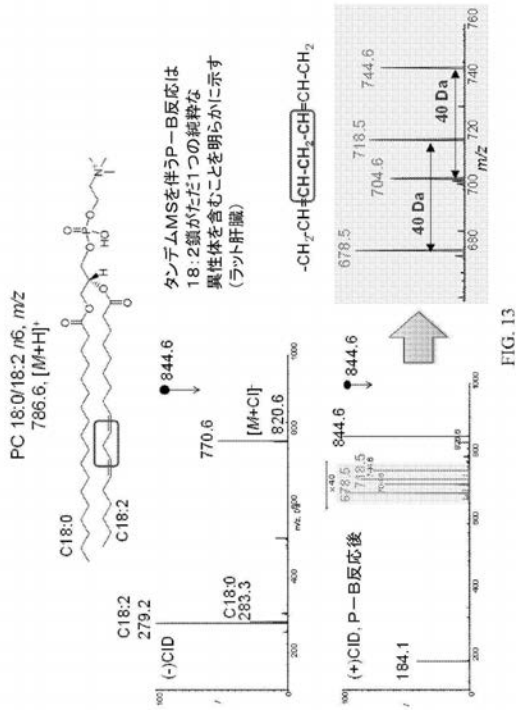


FIG. 11E

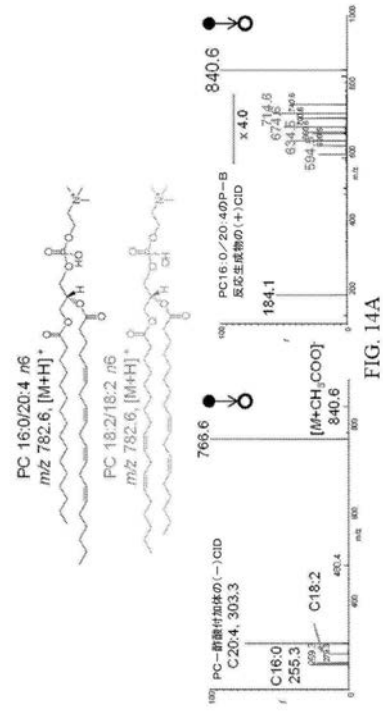
【図 1 2】



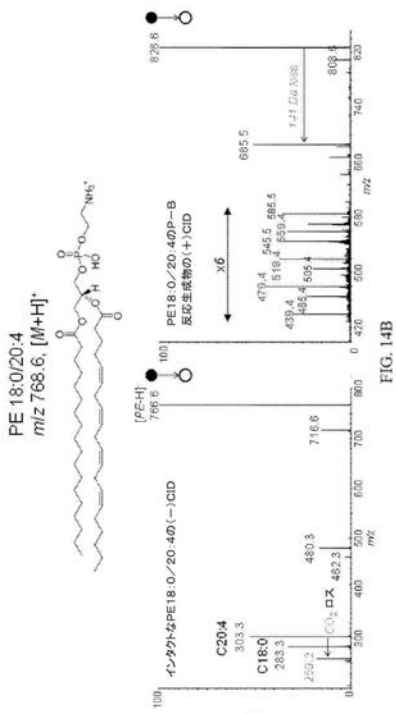
【図 13】



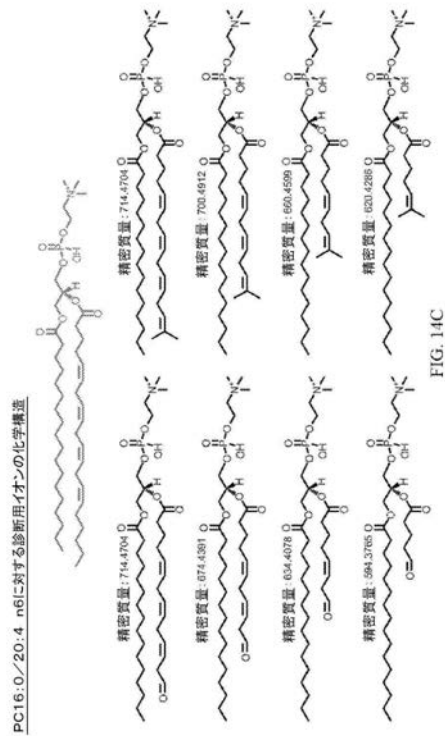
【図 14 A】



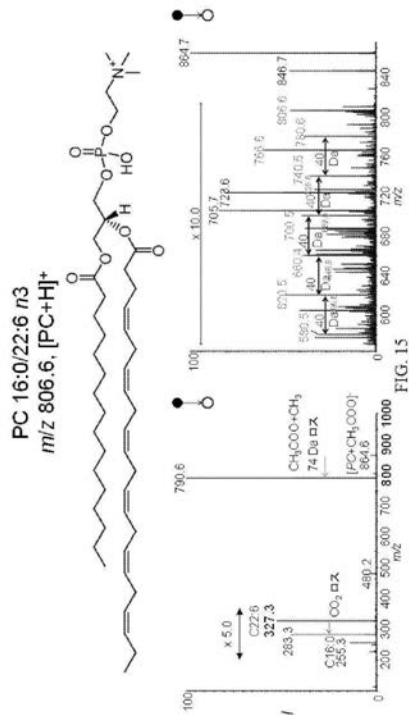
【図 14 B】



【図 14 C】



【図 15】



【図 16】

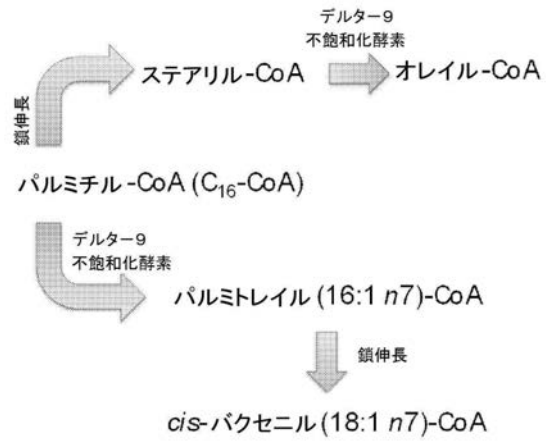
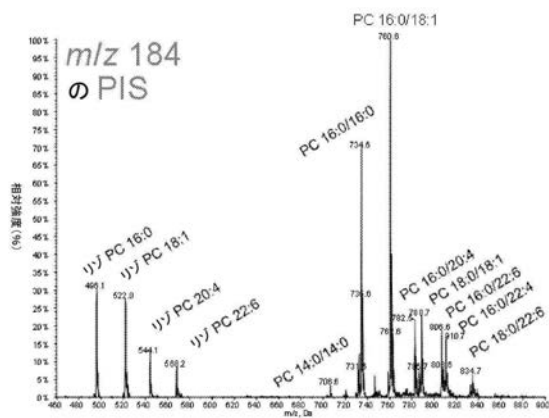


FIG. 16

【図 17 A】



【図 17 C】

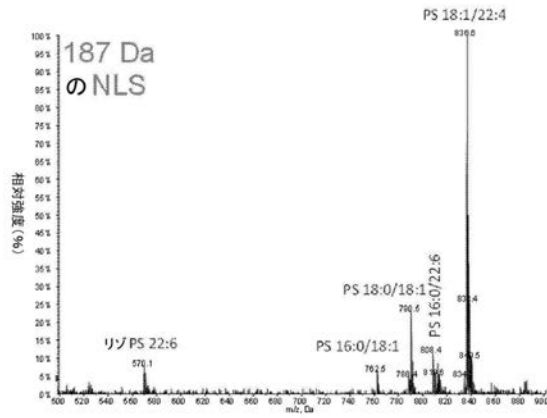


FIG. 17C

【図 17 D】

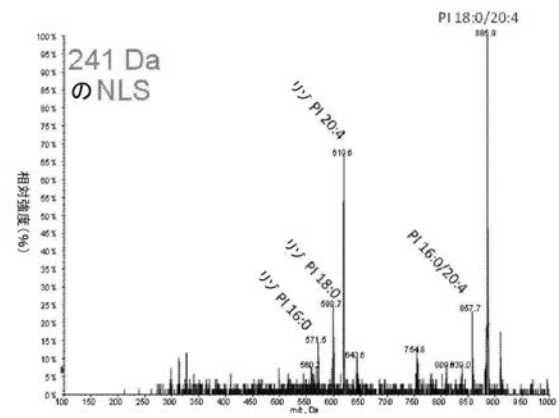


FIG. 17D

【図 18 A】

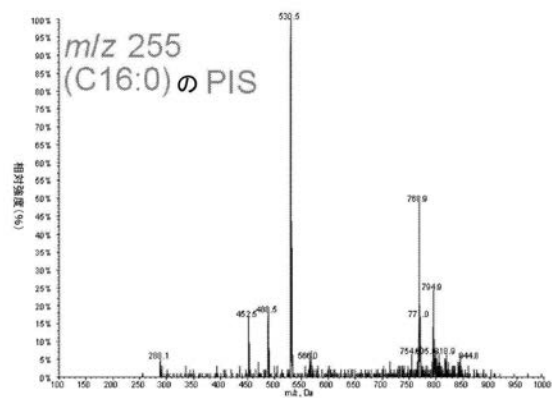


FIG. 18A

【図 18 B】

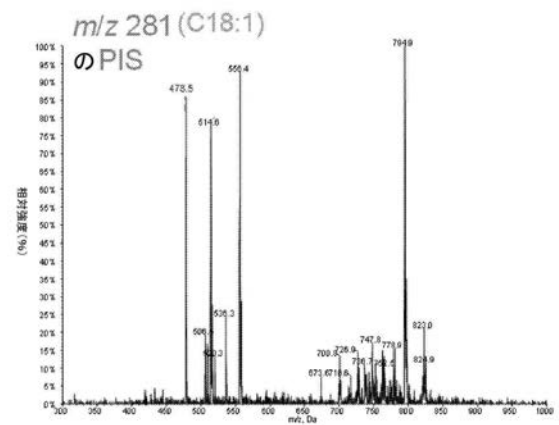


FIG. 18B

【図 18 C】

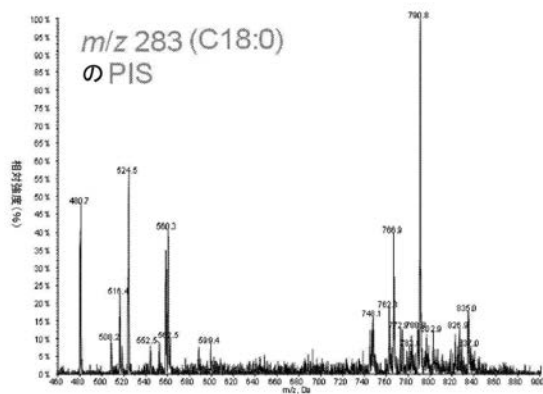


FIG. 18C

【図 18 D】

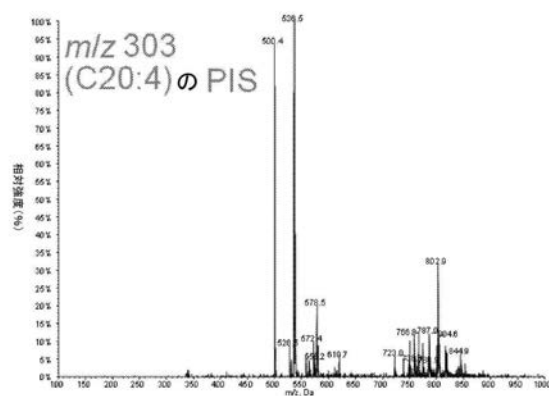


FIG. 18D

【図 18 E】

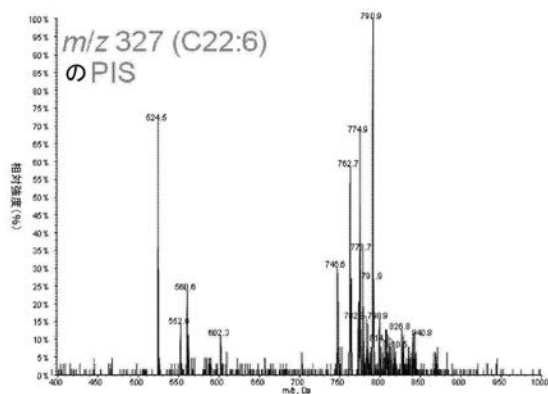


FIG. 18E

【図 18 F】

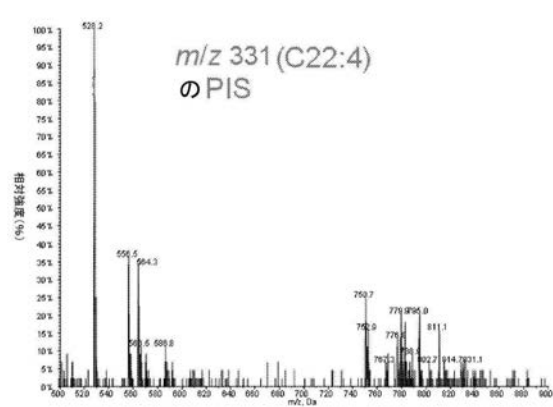


FIG. 18F

【図 2 3 A B】

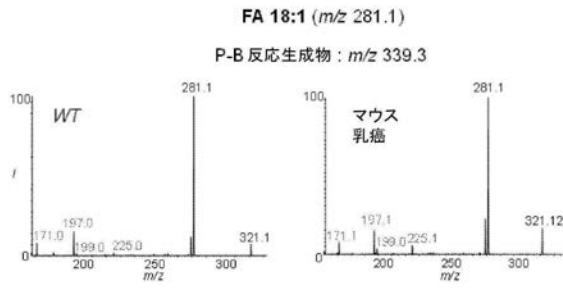


FIG. 23A

【図 2 3 C D】

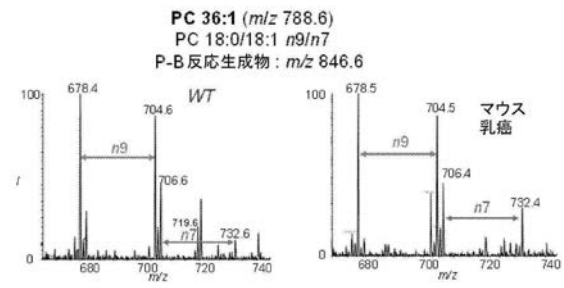


FIG. 23C

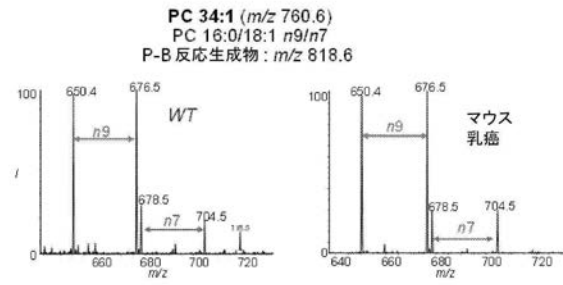


FIG. 23B

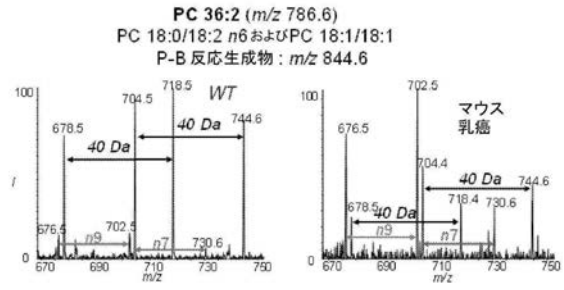


FIG. 23D

【図 2 4】

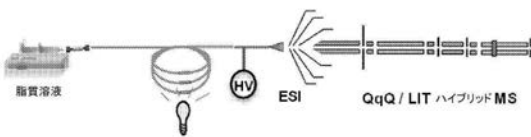


FIG. 24

【図 2 5 C D E】

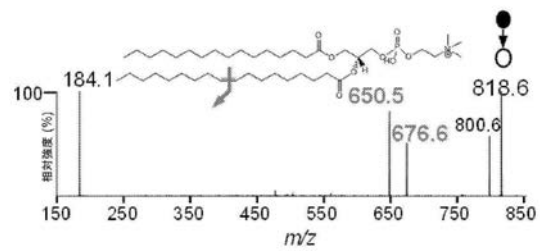


FIG. 25C

【図 2 5 A B】

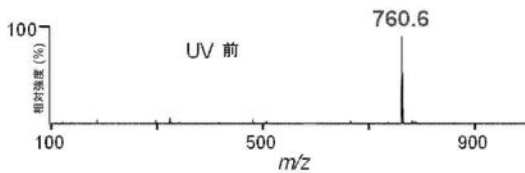


FIG. 25A

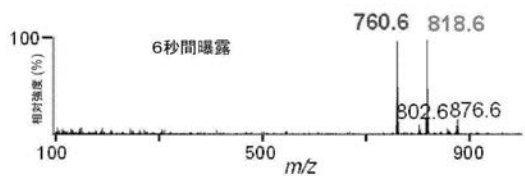


FIG. 25B

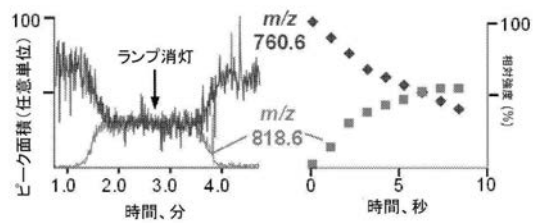


FIG. 25D

FIG. 25E

【図 26 A B C】

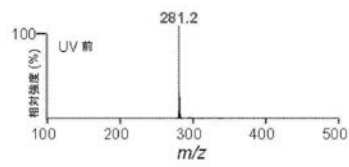


FIG. 26A

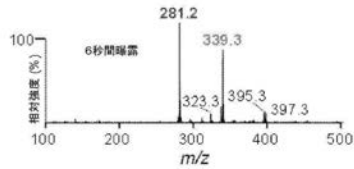


FIG. 26B

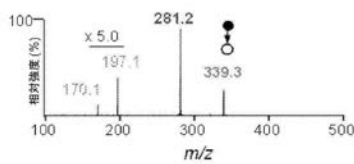


FIG. 26C

【図 26 D】

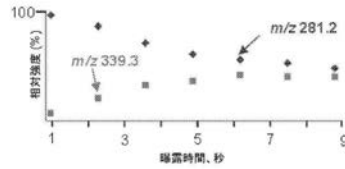


FIG. 26D

【図 27 A】

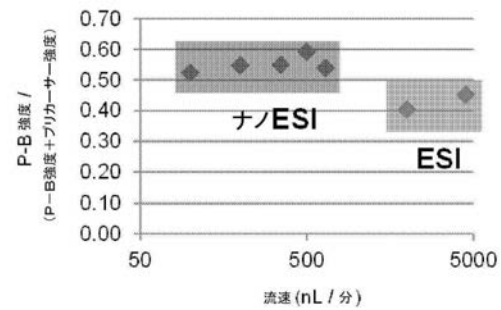


FIG. 27A

【図 27 B】

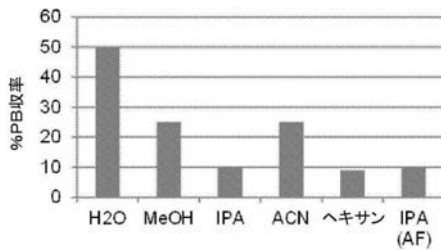


FIG. 27B

【図 28 B C】

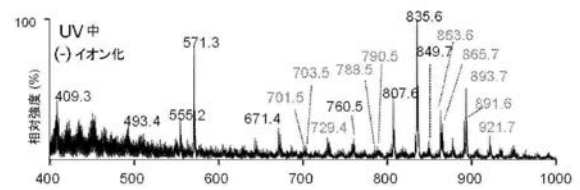


FIG. 28B

【図 28 A】

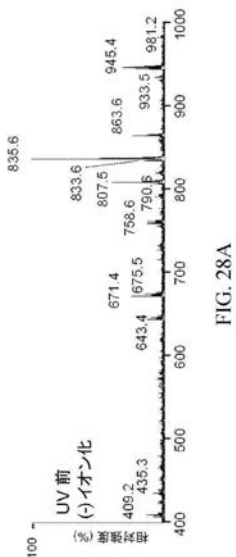


FIG. 28A

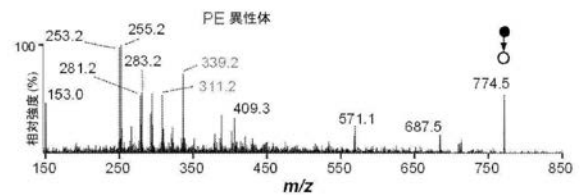


FIG. 28C

【図 28 D E】

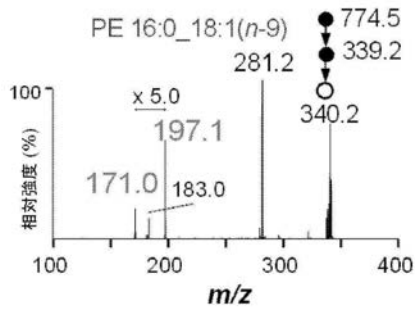


FIG. 28D

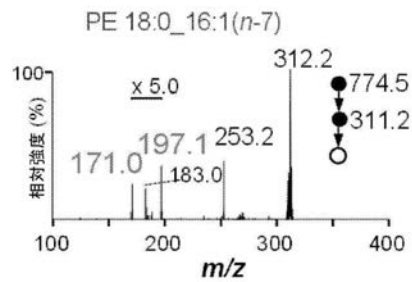


FIG. 28E

【図 29 A】

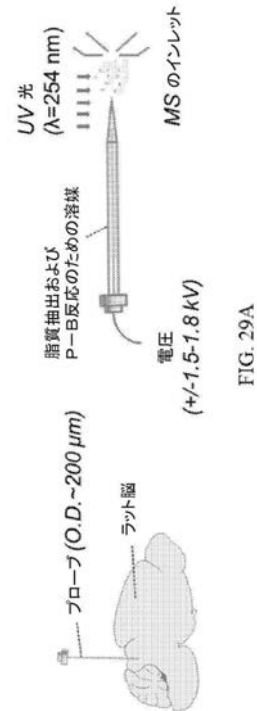
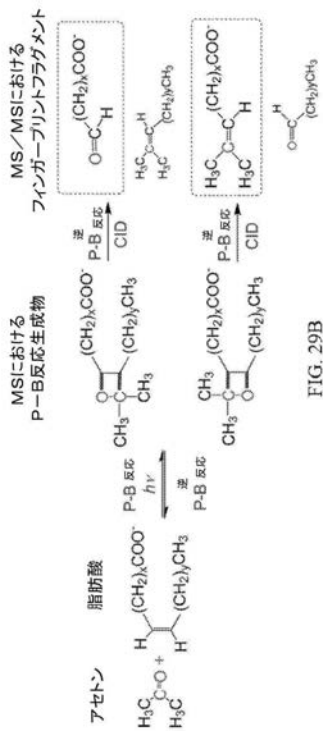


FIG. 29A

【図 29 B】



【図 30 A】

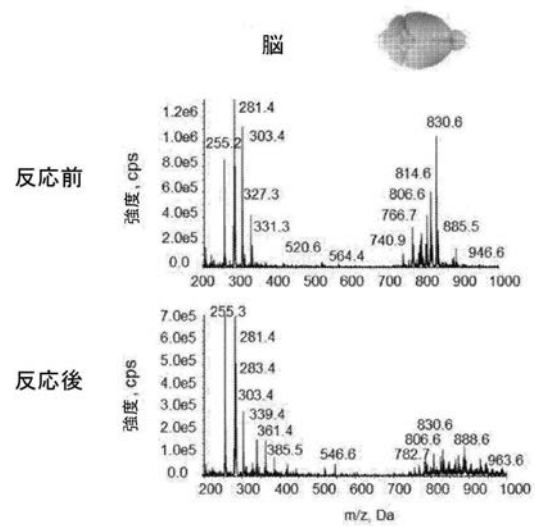


FIG. 30A

【図 30 B】

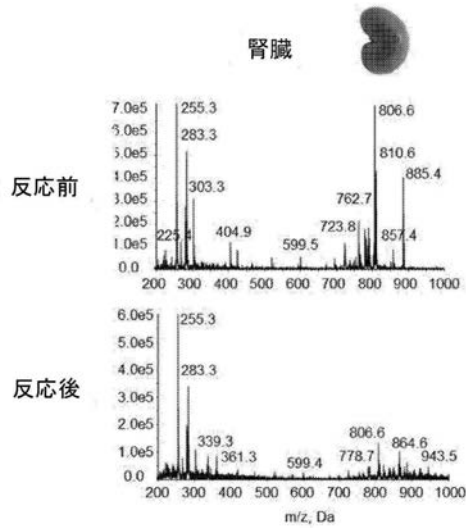


FIG. 30B

【図 30 C】

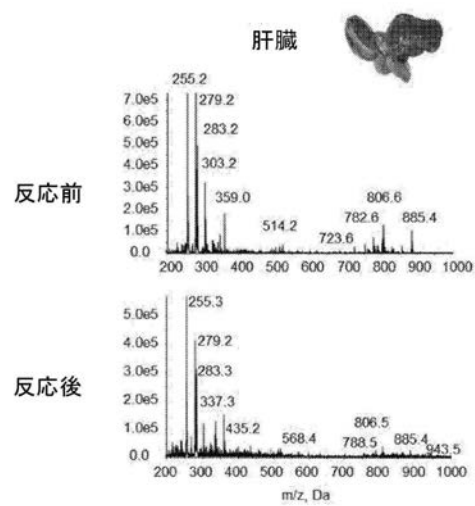


FIG. 30C

【図 30 D E】

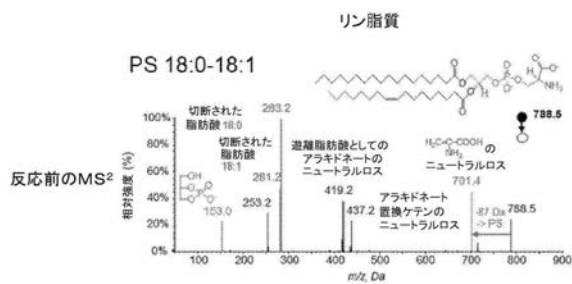


FIG. 30D

【図 30 F G】

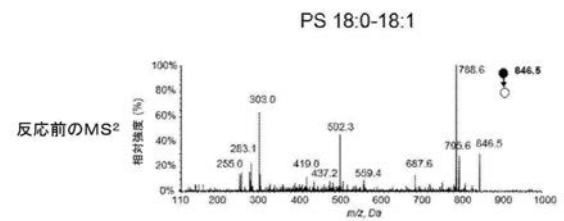


FIG. 30F

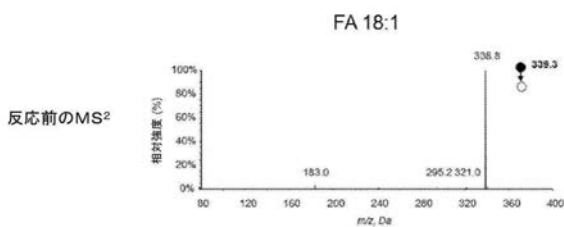


FIG. 30E

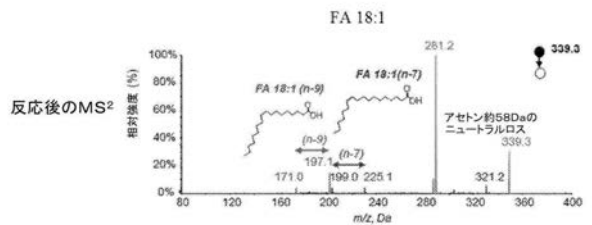
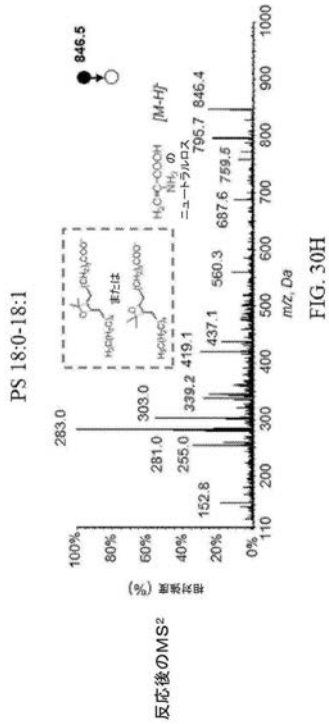
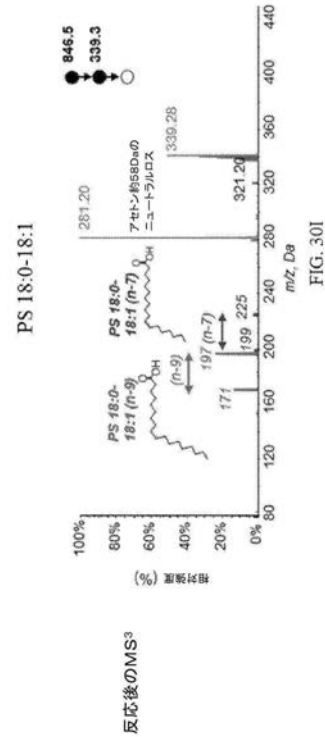


FIG. 30G

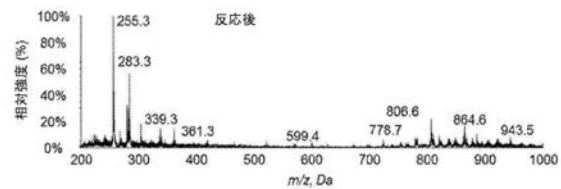
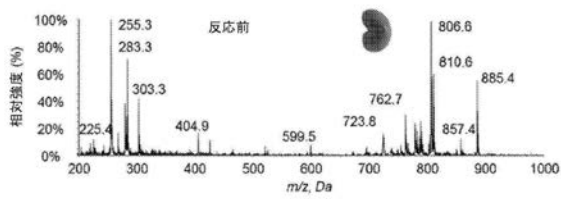
【図 30H】



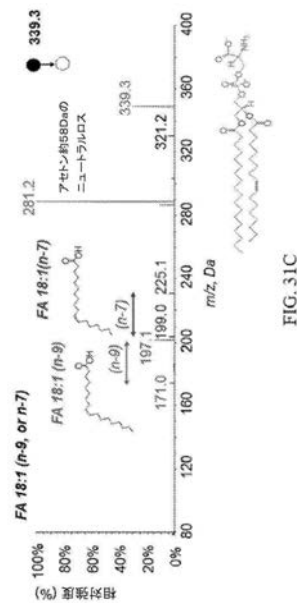
【図 30I】



【図 31A B】



【図 31C】



【図 3 1 E】

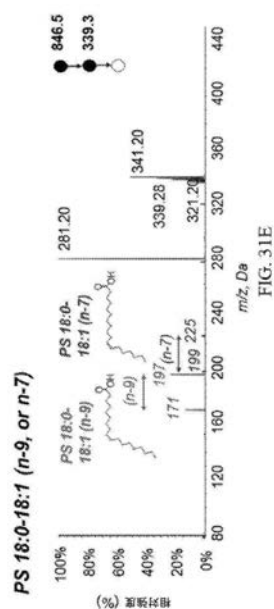


FIG. 31E

【图 3 2 C】

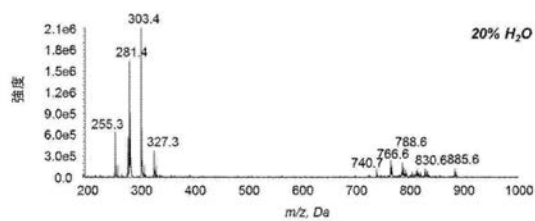


FIG. 32A

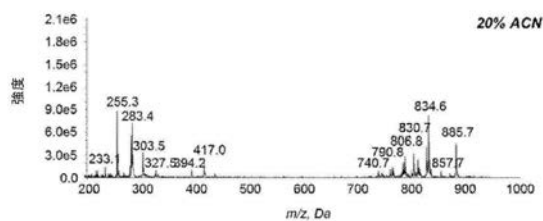


FIG. 32C

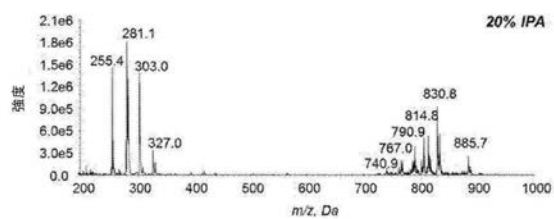


FIG. 32B

【図 3 2 D E】

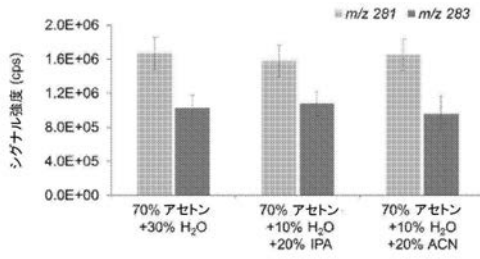


FIG. 32D

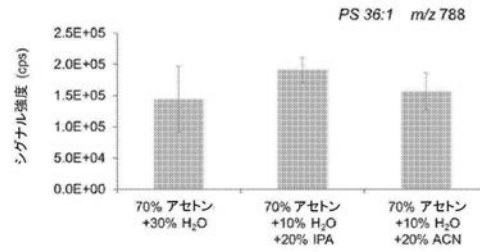


FIG. 32E

【図 3 3 A B】

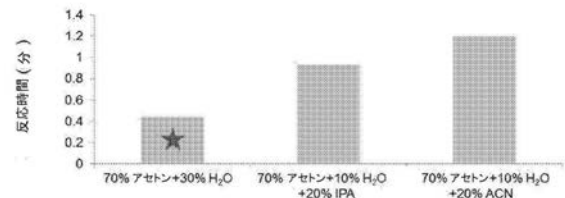


FIG. 33A

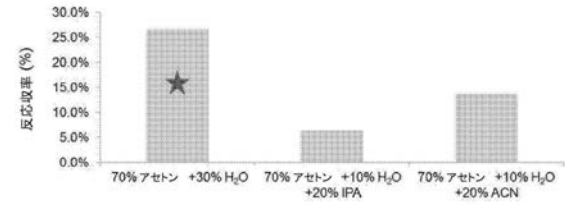


FIG. 33B

【図 3 3 C】

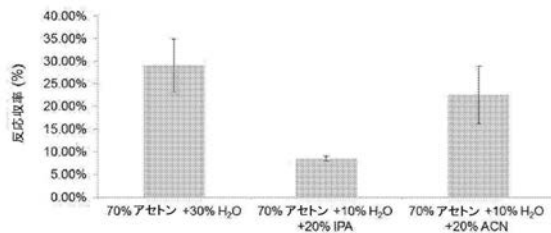


FIG. 33C

【図 3 4 A】

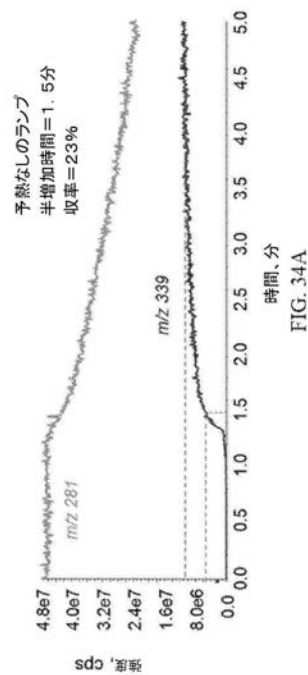
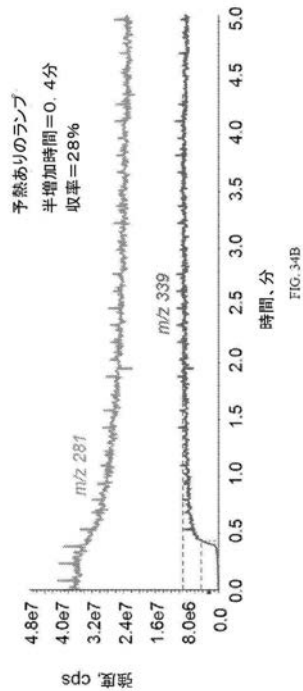


FIG. 34A

【図 3 4 B】



【図 3 5 A】

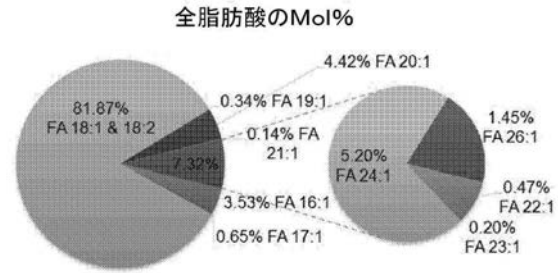


FIG. 35A

【図 3 5 B】

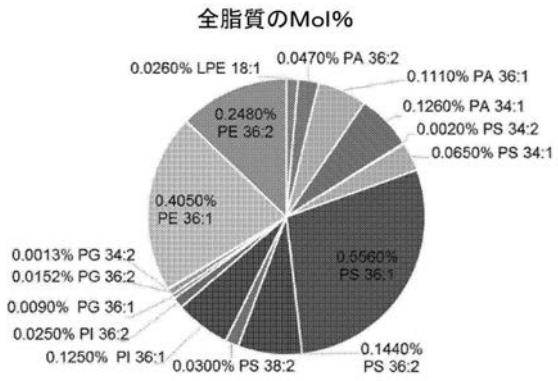
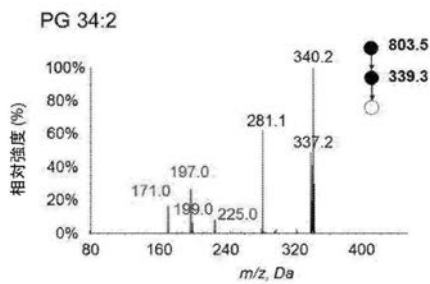
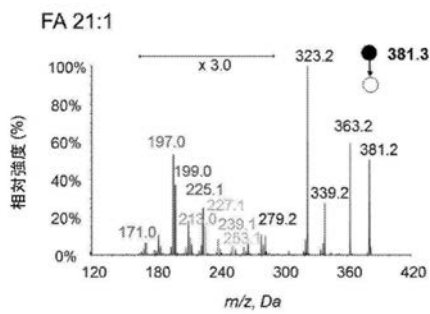


FIG. 35B

【図 3 5 C D】



【図 3 6】

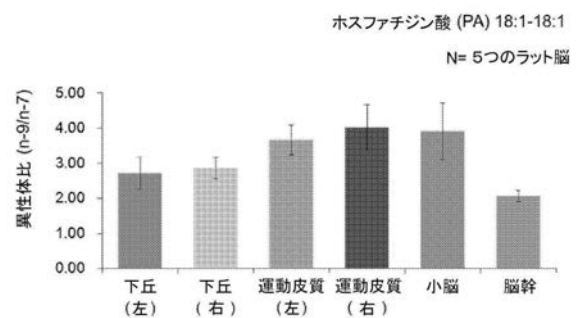


FIG. 36

【図 3 7 A B】

脳における脂肪酸 (FA) 18:1 (n-9/n-7)

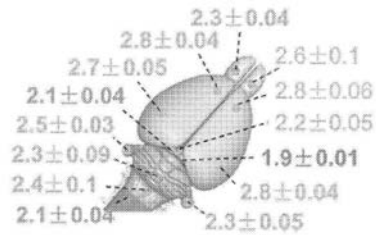


FIG. 37A

腎臓における FA 18:1 (n-9/n-7)

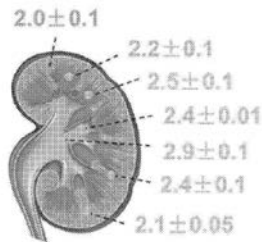


FIG. 37B

【図 3 7 C D】

脳におけるリゾホスファチジン酸 (LPA) 18:1 (n-9/n-7)

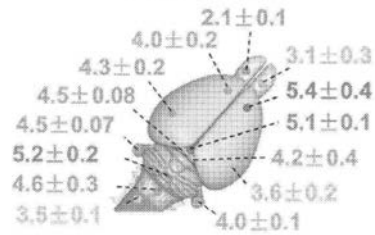


FIG. 37C

脳におけるホスファチジン酸 (PA) 18:1 (n-9/n-7)

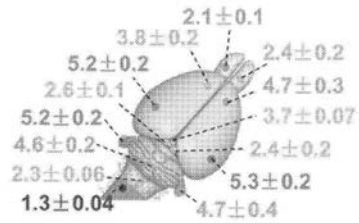


FIG. 37D

【図 3 8 A B】

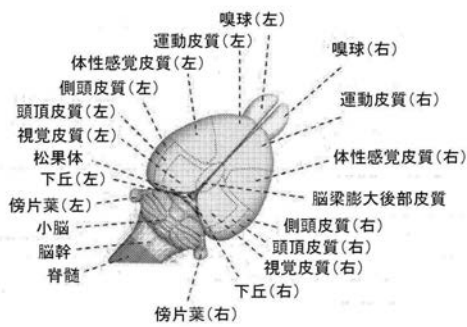


FIG. 38A

【図 3 8 C D】

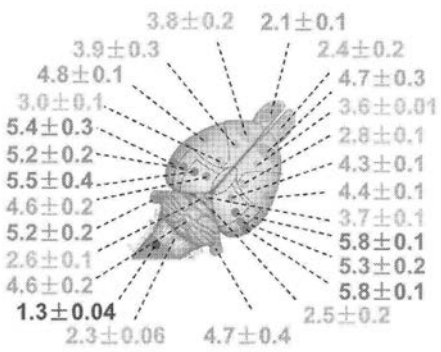


FIG. 38C

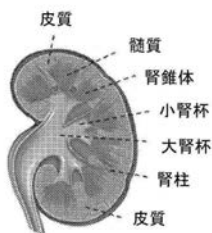
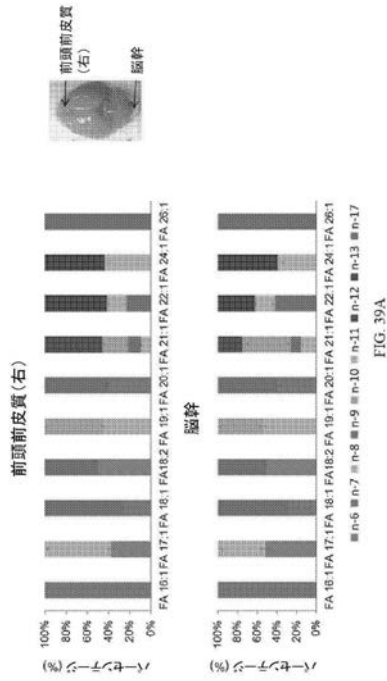


FIG. 38B

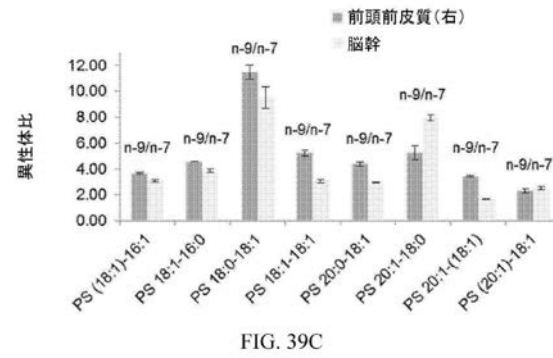
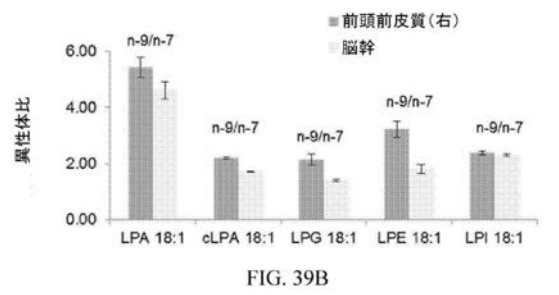


FIG. 38D

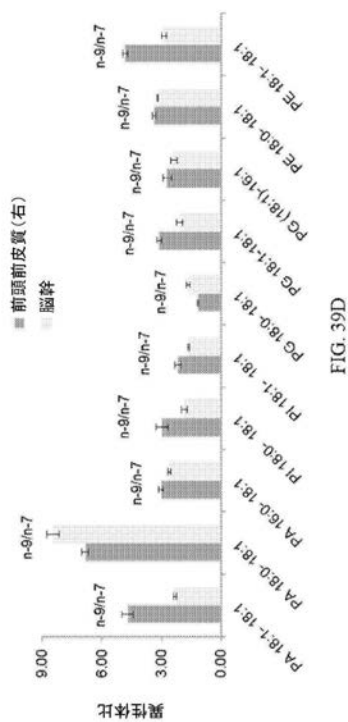
【図 39 A】



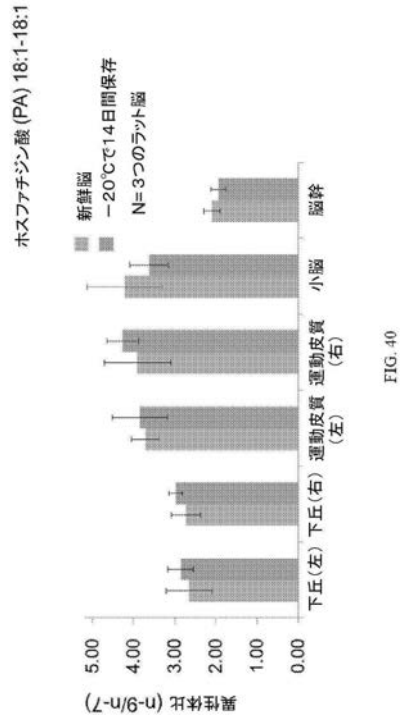
【図 39 B C】



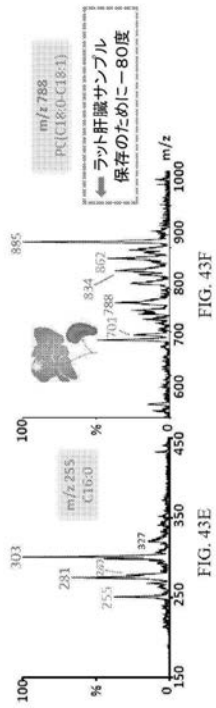
【図 39 D】



【図 40】



【図 4 3 E F】



【図 4 4】

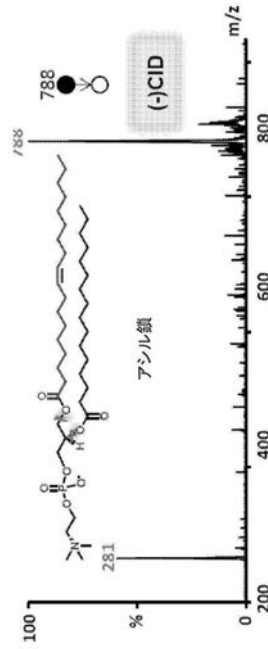
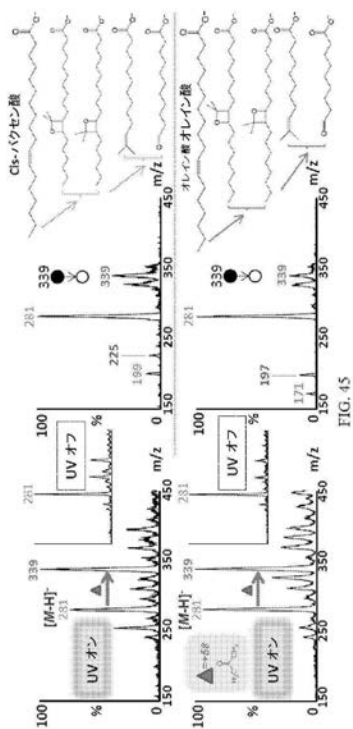


FIG. 44

【図 4 5】



【図 4 6】

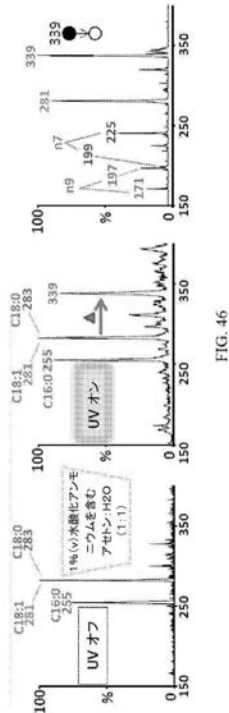
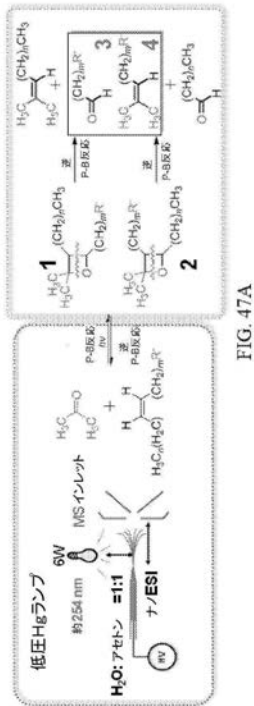
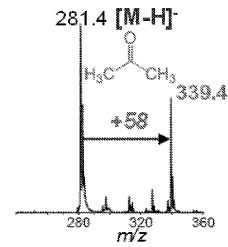
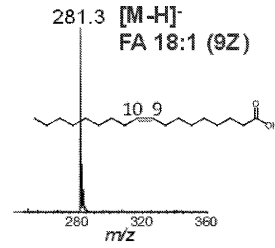


FIG. 46

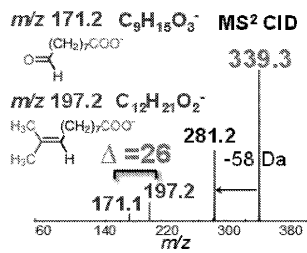
【図 4 7 A】



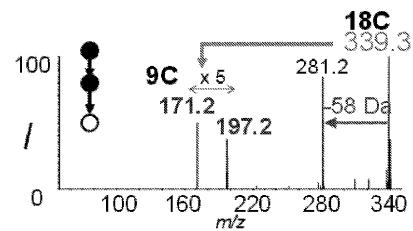
【図 4 7 B C】



【図 4 7 D】

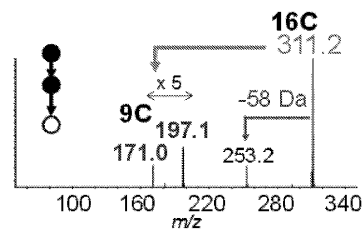
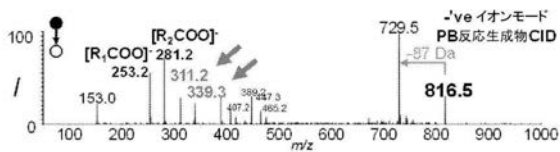
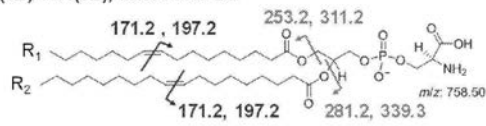


【図 4 8 C D】



【図 4 8 A B】

PS 16:1(9Z)/18:1(9Z), MW: 759.5 Da



【図 4 9】

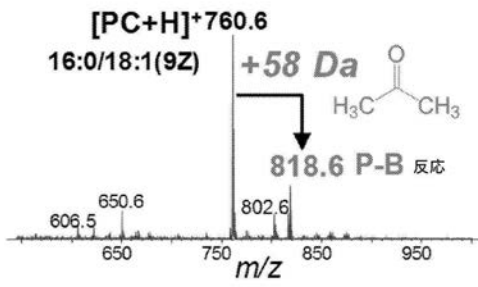


FIG. 49A

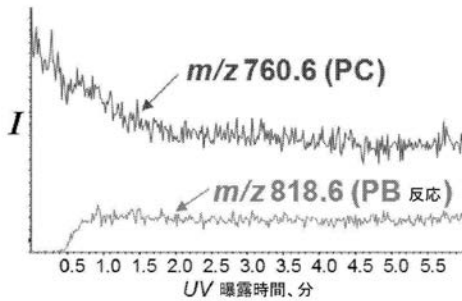


FIG. 49B

【図 5 0 A B】

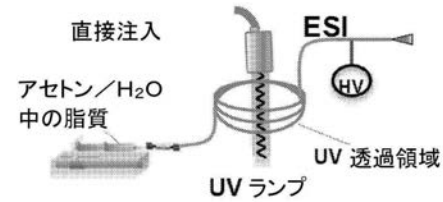


FIG. 50A

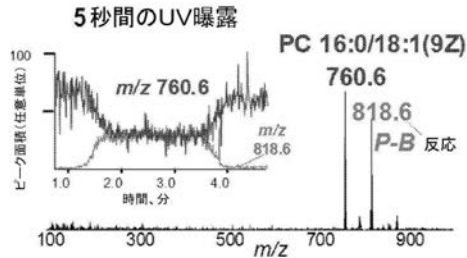


FIG. 50B

【図 5 0 C D】

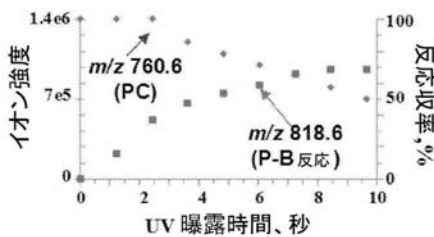


FIG. 50C

フロー注入

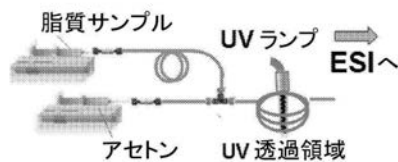


FIG. 50D

【図 5 1 A B】

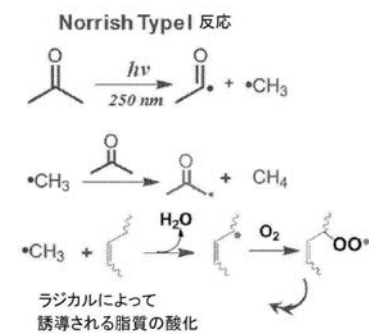


FIG. 51A

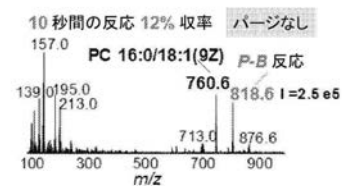


FIG. 51B

【図 5 1 C】

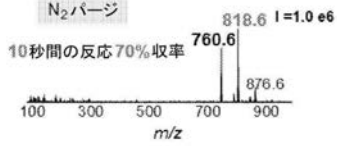


FIG. 51C

【図 5 2 A】

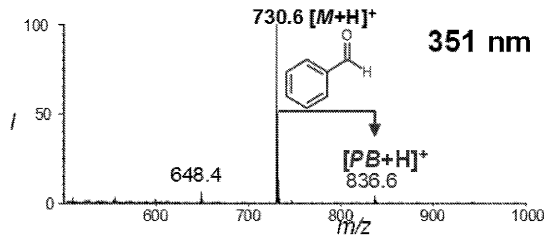


FIG. 52A

【図 5 2 B】

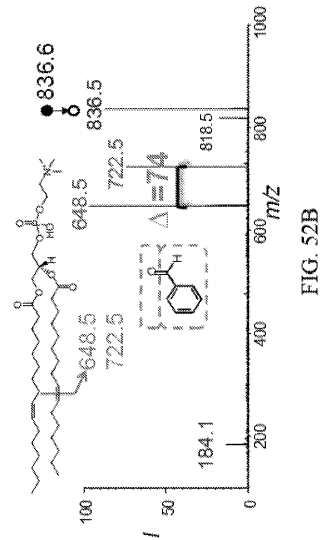


FIG. 52B

【図 5 3】

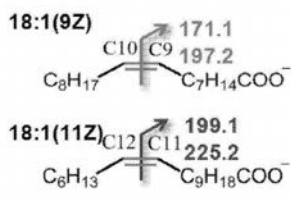


FIG. 53A

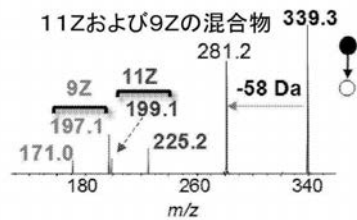


FIG. 53B

【図 5 4】

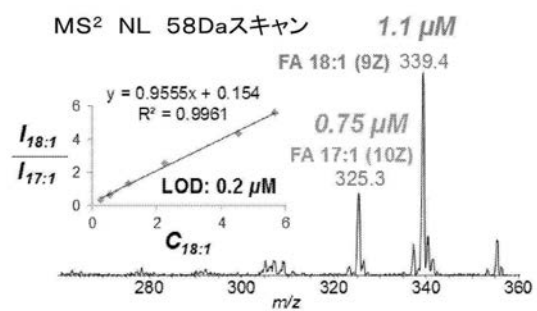


FIG. 54

【図 5 5 A】

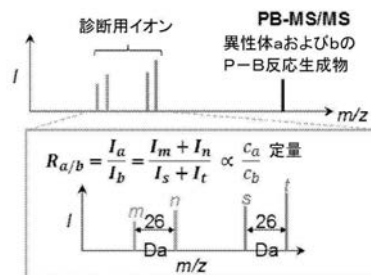


FIG. 55A

【図 5 5 B C】

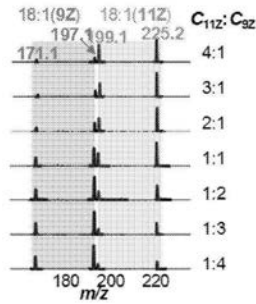


FIG. 55B

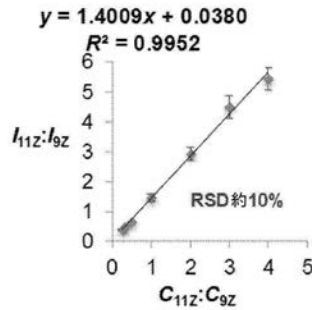


FIG. 55C

【図 5 5 D】

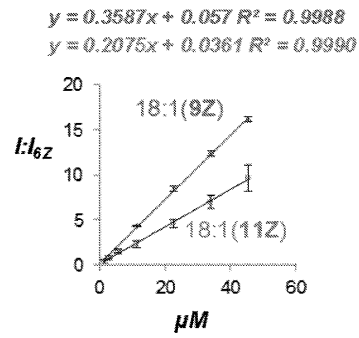


FIG. 55D

【図 5 6】

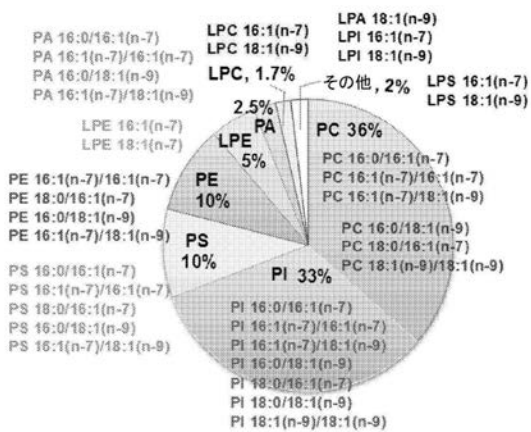


FIG. 56

【図 5 8 A】

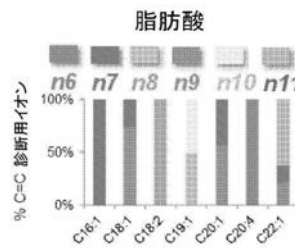


FIG. 58A

【図 5 7】

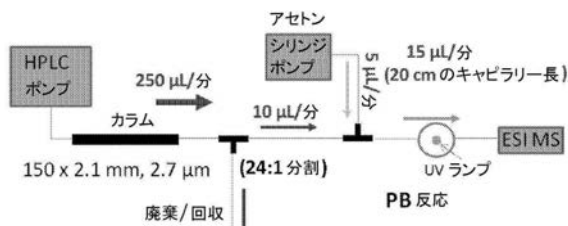


FIG. 57

【図 5 8 B C】

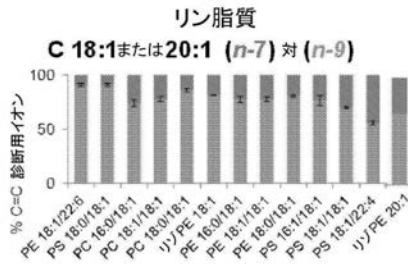


FIG. 58B

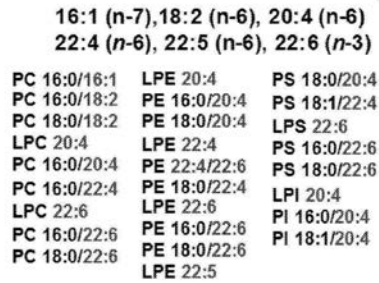


FIG. 58C

【図 5 8 D】

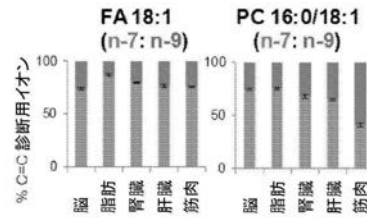


FIG. 58D

【図 5 9 A】

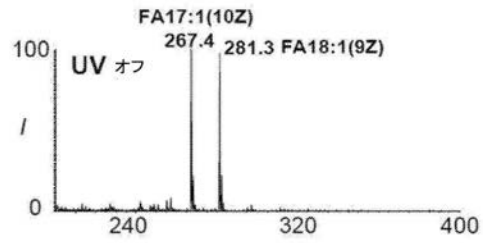


FIG. 59A

【図 5 9 B C】

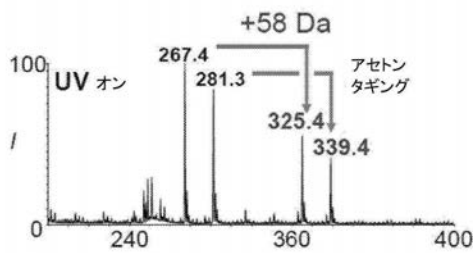


FIG. 59B

【図 5 9 D E】

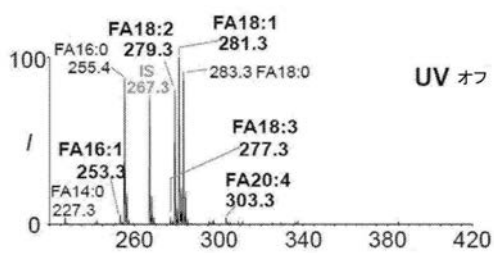


FIG. 59D

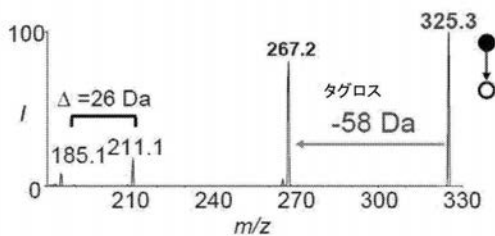


FIG. 59C

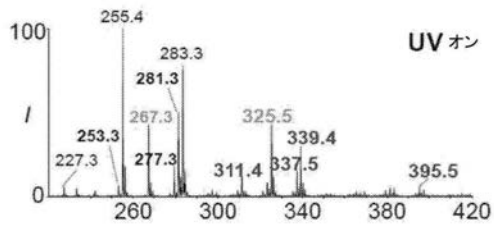


FIG. 59E

【図 59 F】

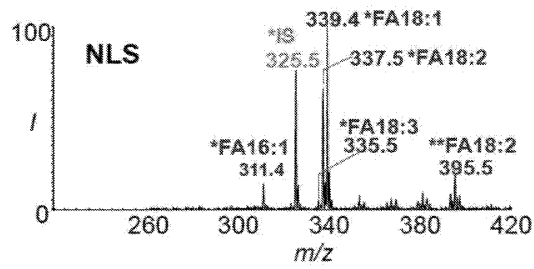


FIG. 59F

【図 60 A】

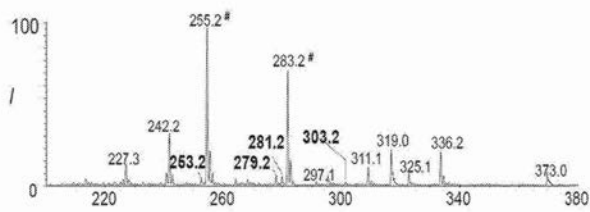


FIG. 60A

【図 60 B】

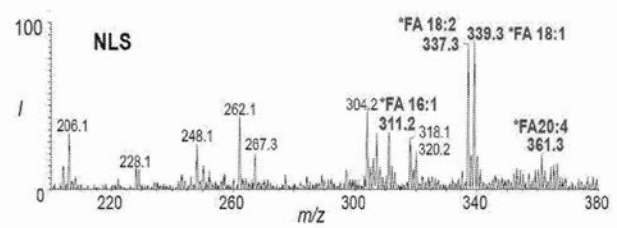


FIG. 60B

【図 61 A】

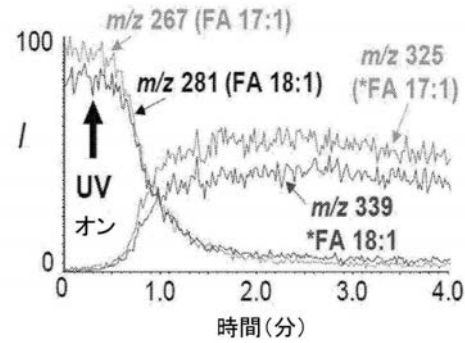


FIG. 61A

【図 61 B】

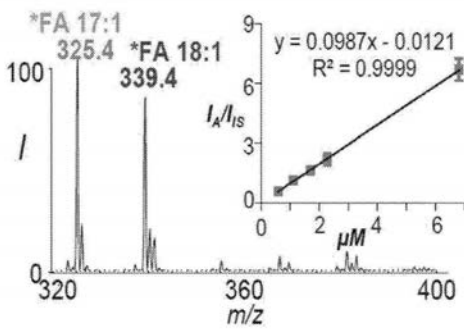


FIG. 61B

【図 61 D】

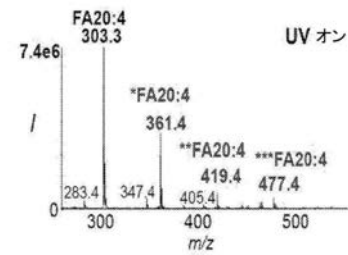


FIG. 61D

【図 61 C】

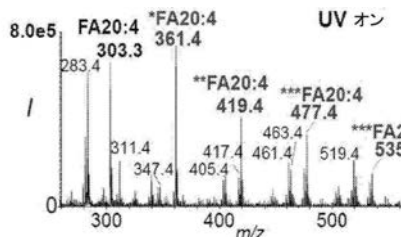


FIG. 61C

【図 62 A】

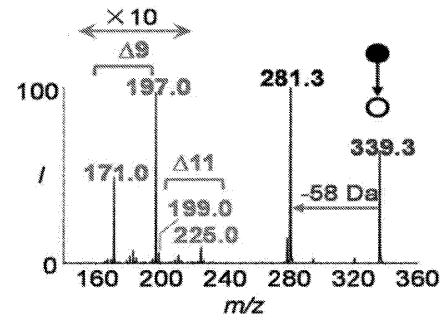
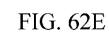
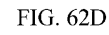


FIG. 62A

【図 6 2 D E】



脂肪酸種別	濃度 (μM, プラズマ)
FA 16:1	28.9
18:3	7.5
18:2	193.3
18:1 (Δ19 + Δ9)	276.4
20:4	18.2

FIG. 63A

【図 6 5】

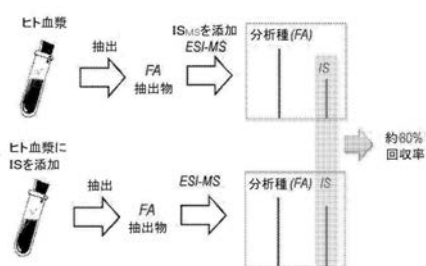


FIG. 65

【图 6 4】

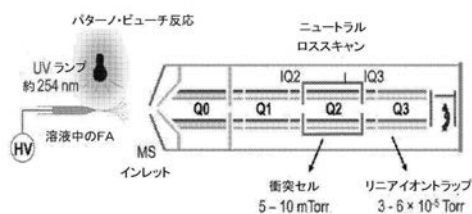
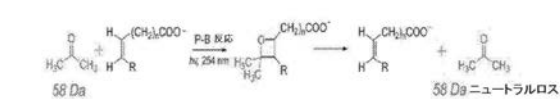


FIG. 64

【図 6 6】

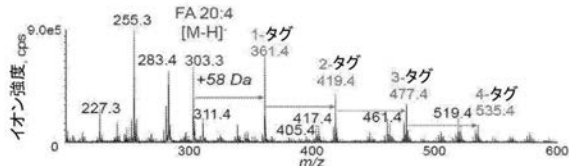


FIG. 66A

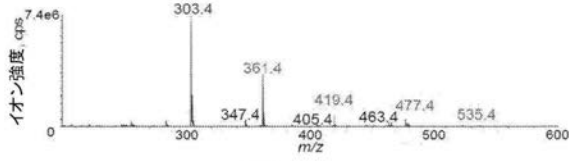


FIG. 66B

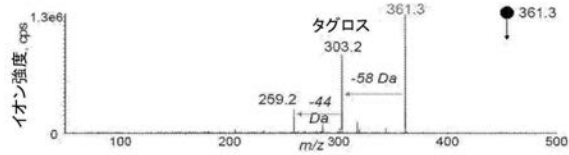


FIG. 66C

【図 6 7】

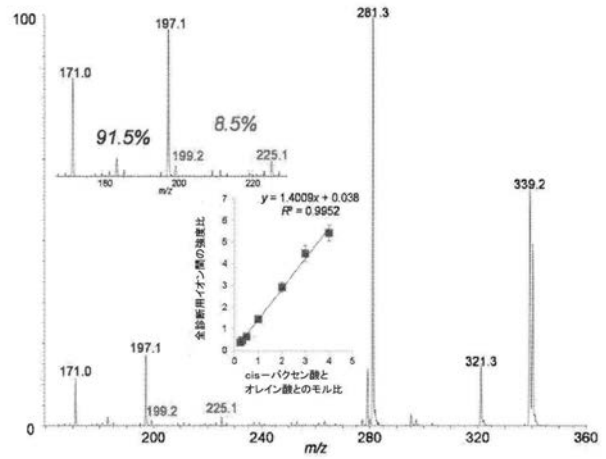


FIG. 67

【図 6 8 A】

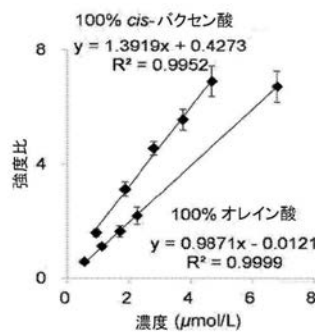


FIG. 68A

【図 6 9】

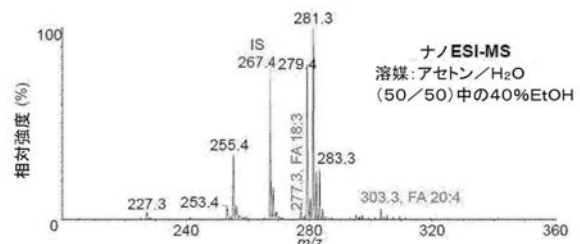


FIG. 69A

【図 6 8 B】

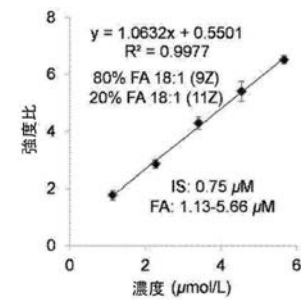


FIG. 68B

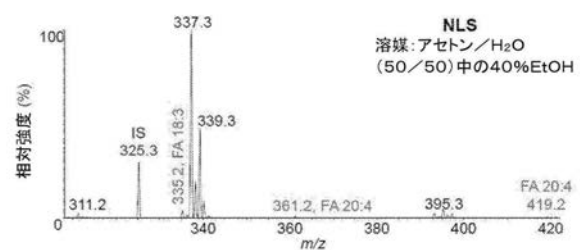


FIG. 69B

【図 70 A B】

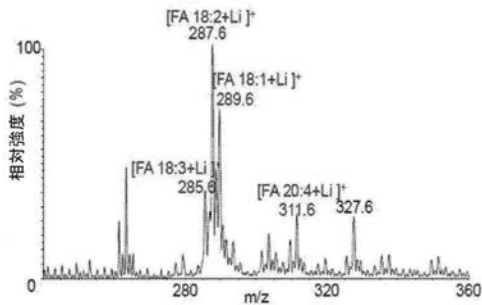


FIG. 70A

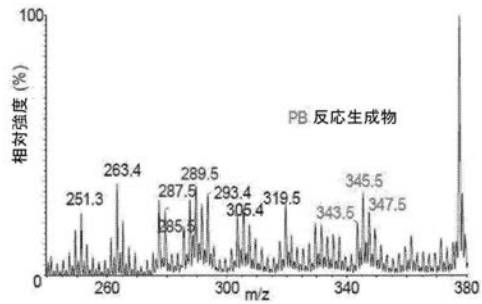


FIG. 70B

【図 70 C D】

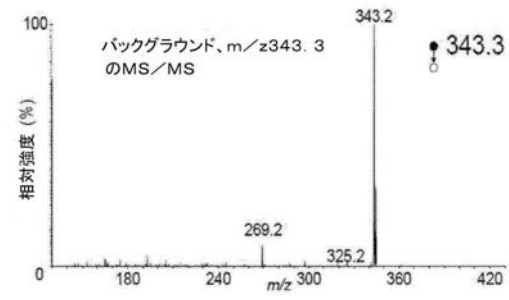


FIG. 70C

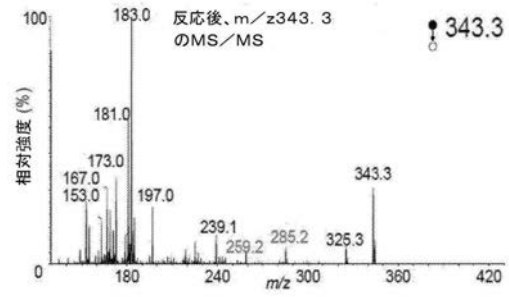


FIG. 70D

【図 71】

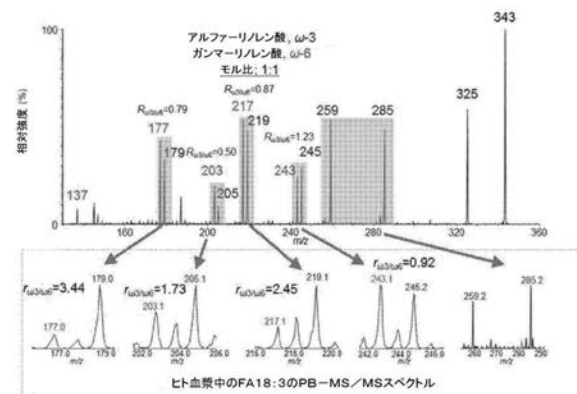


FIG. 71

【図 72】

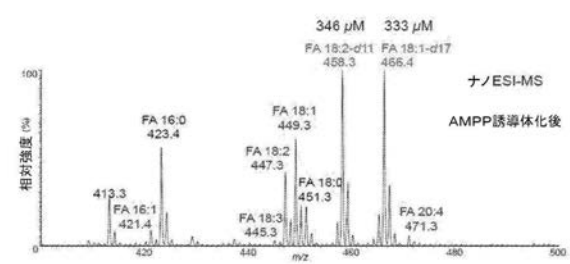


FIG. 72A

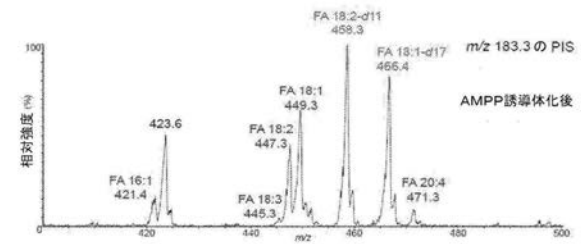


FIG. 72B

【図 7 3】

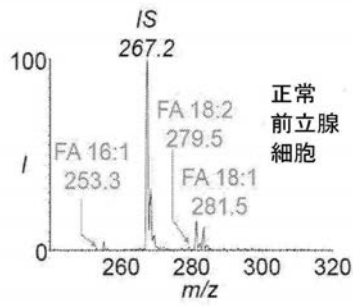


FIG. 73A

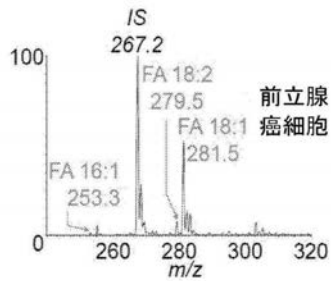


FIG. 73B

【図 7 4】

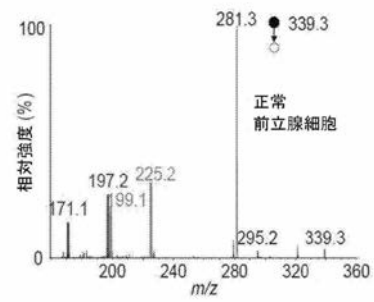


FIG. 74A

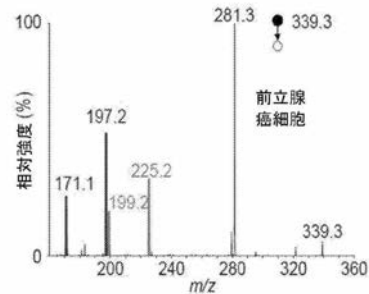


FIG. 74B

【図 7 5】

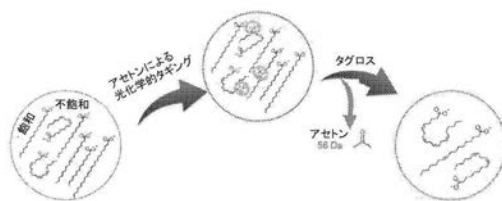


FIG. 75

フロントページの続き

(74)代理人 100181641

弁理士 石川 大輔

(74)代理人 230113332

弁護士 山本 健策

(72)発明者 ゼン オウヤン

アメリカ合衆国 インディアナ 47906, ウェスト ラファイエット, オニックス ストリート 949

(72)発明者 ユー シャ

アメリカ合衆国 インディアナ 47906, ウェスト ラファイエット, オニックス ストリート 949

(72)発明者 シャオシャオ マ

アメリカ合衆国 インディアナ 47906, ウェスト ラファイエット, オニックス ストリート 949

Fターム(参考) 2G041 CA01 DA05 EA04 FA10 FA13 GA09 GA10 HA01 JA20 KA01

LA08

2G045 AA26 CB01