[APPLICATION NOTE]

Waters
THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.™

前臨床またはバイオマーカー探索のための脳髄液中アミロイドβペプチドSPE/LC/MS/MS多成分同時定量法の改善

Erin E. Chambers[1], Mary E. Lame[2], and Diane M. Diehl[1]
[1]Waters Corporation, 34 Maple St., Milford, MA, [2]Pfizer, Neuroscience Research Unit, Groton, CT USA

利点

- Xevo® TQ-S MSシステムによる高感度化
- 高感度化によりサンプルサイズを削減可能
- 迅速で幅広いペプチドへ適用可能
- 単一のLC/MS/MSメソッドで異なるペプチドを定量、医薬探索におけるリガンドバインディングアッセイへの依存度を低減
- ミックスモードOasis® µElutionプレートを用いた高選択性サンプル前処理
- 高い分離能と感度を提供する ACQUITY UPLC® PST カラムが分析時間を短縮

ソリューション

Xevo TQ-S MS システム
ACQUITY UPLC システム
Oasis µElution プレート
ACQUITY UPLC PSTカラム

キーワード

バイオマーカー探索
ペプチド定量
アミロイドβ
疎水性ペプチド
LC/MS/MS
Oasis固相抽出製品

はじめに

前報 (720003682EN)では医薬探索における医薬またはバイオマーカー探索を目的としたヒトおよびサルの脳髄液(cerebrospinal fluid、CSF)中アミロイドβ(aβ)ペプチド多成分同時定量のための迅速で適用範囲の広いSPE/LC/MS/MSメソッドの開発について紹介しました。本報ではマススペクトロメトリーがXevo TQ MSから Xevo TQ-Sへ更新されています。この変更によりサンプルサイズを1/4に削減したうえで4-5倍の高感度化が達成されました。

従来生体中aβペプチドの定量は主にELISAのような免疫測定法で行われてきました。免疫測定法は開発に時間がかかり高価で、交叉反応を考慮する必要があり、また個々のペプチドについて別々のアッセイを必要とします。医薬探索において必要とされるスループットを得るためにLC/MS/MSを使用して高い特異性を持ちながら柔軟性も高いペプチド定量法が求められています。本研究では複数のaβペプチドを同時定量するためにLC/MS/MSに高選択サンプル前処理法を組み合わせて、1-38、1-40、および1-42 aβ ペプチドに焦点をあて検討を行いました。検討したaβ ペプチドの一次構造、等電点(pI)と分子量 (MW) を図1に示します。

固相抽出(solid phase extraction 、SPE) サンプル前処理によるCSF中のaβ画分の濃縮については前報で紹介いたしましたが、本報では更に必要とされるサンプルサイズが200 µLから50 µLへ減少しています。本SPEメソッドによりマトリックス成分が排除されることに加え、aβペプチドの溶解性が最適化された状態で濃縮されることから検出下限値が改善されました。

アルツハイマー症候群(Alzheimer's Disease、AD)の疾患修飾治療戦略として、aβ 38、40、42および他のaβペプチド種の定量はAD病理解析に必要とされることでしょう。ここで解説する方法はこれらペプチドの定量法として使われていくことが期待されます。

Amyloid β 1-38
DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGG
MW 4132 pI 5.2

Amyloid β 1-40
DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVV
MW 4330 pI 5.2

Amyloid β 1-42
DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVVIA
MW 4516 pI 5.2

図1. アミロイドβペプチドの1次構造、分子量および等電点

実験

ACQUITY UPLC 条件

カラム:	ACQUITY UPLC BEH C_{18} 300Å, 2.1 x 150 mm, 1.7 µm, Peptide Separation Technology
商品番号:	186003687
カラム温度:	50 ° C
サンプル温度:	15 ° C
注入量:	10.0 µL
インジェクションモード:	パーシャルループ
流速:	0.2 mL/min
移動相 A:	28% 濃アンモニア水/精製水 0.3:99.7
移動相 B:	アセトニトリル/移動相A 90/10
強ニードル洗浄液:	[アセトニトリル/IPA 60:40混液] / 28%濃アンモニア水 9:1 (600 µL)
弱ニードル洗浄液:	[28%濃アンモニア水 / 精製水 0.3:99.7溶液] / アセトニトリル 9:1 (400 µL)

グラジエント:

時間 (min)	%A	%B	Curve
0.0	90	10	*
1.0	90	10	6
6.5	55	45	6
6.7	55	45	6
7.0	90	10	6

ウォーターズ Xevo TQ-S 条件、ESI+

キャピラリ電圧:	2.5 V
脱溶媒温度:	450 ℃
コーンガス流量:	Not used
脱溶媒ガス流量:	800 L/Hr
コリジョンセル圧:	2.6 x 10^{-3} mbar
MRMトランジション:	ESI+, Table1 参照

Table 1. アミロイドβペプチドおよびN15標識内標準のMRMトランジション、コーン電圧、コリジョンエネルギー

ペプチド名	プリカーサイオン (m/z) 4+	プロダクトイオン (m/z) 4+	プロダクトイオンi.d.	コーン電圧 (V)	コリジョンエネルギー (eV)
Amyloid β 1-38	1033.5	1000.3	b 36	33	23
Amyloid β 1-38 N15 IS	1046	1012.5		30	22
Amyloid β 1-40	1083	1053.6	b 39	33	25
Amyloid β 1-40 N15 IS	1096	1066.5		35	22
Amyloid β 1-42	1129	1078.5	b 40	28	30
Amyloid β 1-42 N15 IS	1142.5	1091.5		35	28

サンプル前処理

サンプル調製

50 µL ヒトCSFまたは添加人工 CSF + 5% ラット血漿を5 M 塩酸グアニジンで1:1希釈し室温で45分間振とう後、50 µL の4% リン酸水溶液で希釈し撹拌。

注意: 添加サンプルは均一化のために添加後室温で30分静置してから塩酸グアニジン処理

Oasis MCXによる固相抽出

図2 に示す方法で抽出。すべての溶液は容量比で調製。すべてのステップをサンプルが入れられたµElutionプレートのウェルに実施。

Oasis MCX µElution プロトコール

商品番号: 186001830BA

コンディショニング:
200 µL メタノール

平衡化:
200 µL 4% リン酸水溶液

ロード:
150 µL 調製済CSF

洗浄 1:
200 µL 4% リン酸水溶液

洗浄 2:
200 µL 10% アセトニトリル水溶液

脱離:
2 x 25 µL 75/15/10 アセトニトリル/水/濃アンモニア水

希釈:
25 µL 精製水

図2. Oasis µElution MCX 抽出法

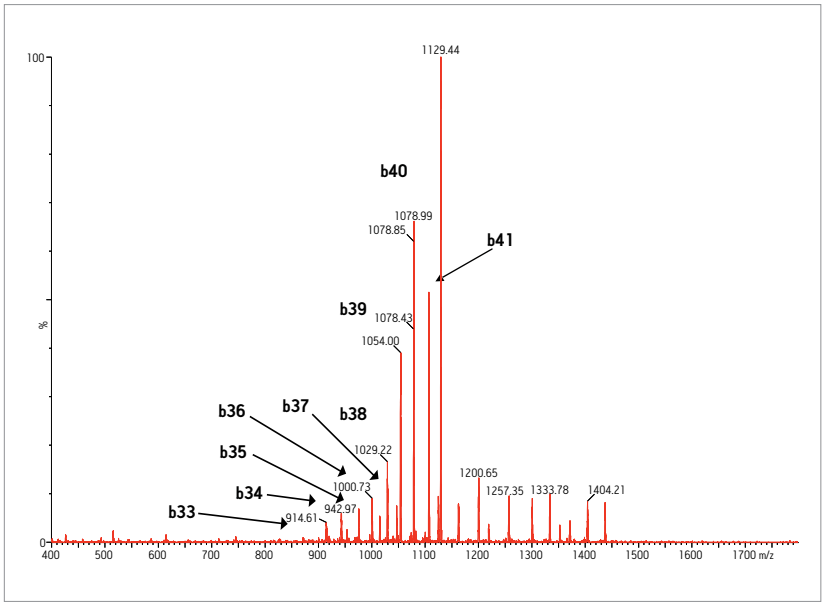

図3. アミロイドβ1-42と表記フラグメントイオンのESI+ MS/MS スペクトル例

結果と考察

マススペクトロメトリー

ESIポジティブモードで分析。4+ のプリカーサイオンはいくつかのbイオンと呼応する特異的なプロダクトイオンが観察されました。(図3)

Xevo TQ-S によりXevo TQ と比べ1/4少ないサンプルで4-5倍の感度が得られました。LQC(Lowest QC)サンプルはXevo TQ の 1/ 5濃度で試験を実施いたしました。Xevo TQ-S に採用された技術の詳細はRainville とBoothによる報告(ウォーターズアプリケーションノート720003415EN)をご参照ください。本報にはペプチド医薬品デスモプレシンにおける同様の感度向上例も紹介されています。システムのMSレンジも特異性を得るために重要でした。

Xevo TQ-SはMS1、MS2ともに2048までのMSレンジを有し、5+と比べより特異的な4+プリカーサイオンとフラグメントイオンの組み合わせを選択可能でした。

UPLC セパレーション

3種のアミロイドβペプチドの分離を図4に示します。アミロイドβペプチドのESI - モードによる検出感度は移動相中のアンモニア濃度の影響を強く受けますが、ESI+モードの場合はより頑健で24時間以上の分析においても安定な結果を与えました。対してESI - モードでは測定開始10-12時間後には移動相中アンモニアの揮発により50%もしくはそれ以上の感度低下が起こりました。

サンプル前処理: SPE

ミックスモードにより抽出選択性を高めたOasis MCXを用いてサンプル前処理を行いました。逆相とイオン交換の保持メカニズムを併せつ固相により複雑なCSF サンプル中に大量に存在する他のポリペプチドからaβ画分が選択的に分画されました。Oasis µElutionプレート（96-ウェル）によりエバポレートと再溶解をしないでサンプルの濃縮が可能であり、これにより時間の浪費とエバポレートによりペプチドが容器の壁面に吸着することによるロスが防がれました。

メソッド開発当初、人工CSFの抽出において非特異的吸着が高度に観察されたため、ヒトと異なる一次構造のアミロイドβを有するラットの血漿を5% 添加し吸着を防ぎました。

SPEメソッドは分析法全体の中で最も重要な部分でした。開発されたSPEメソッドとUPLCを組み合わせはアミロイドβ画分の非常に選択的な分離を達成し、ELISA法に必要な抗体や時間を要する免疫沈降などを行うことなく前臨床サンプル分析のスループットを改善しました。Xevo TQ-S による感度向上はCSFサンプル容量を200 µL から50 µL に低減でき前臨床試験に適していると考えられます。

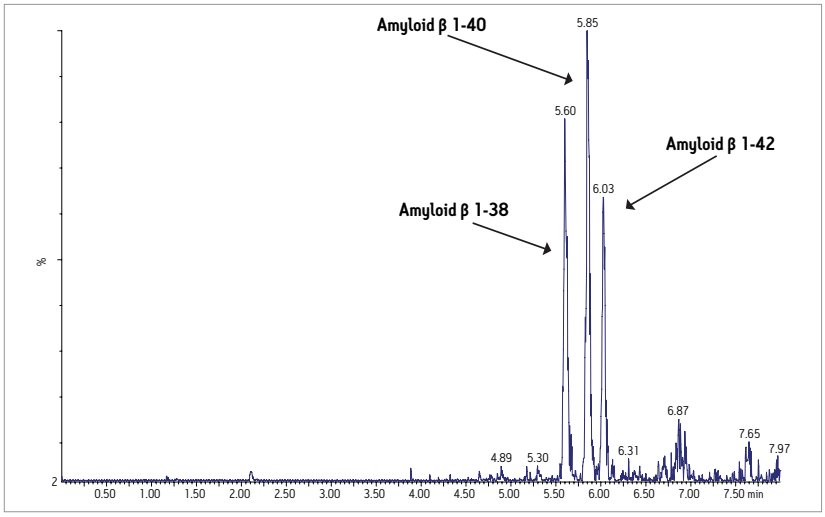

図4. 人工CSF + 5% ラット血漿からのアミロイドβ1-38, 1-40,および 1-42ペプチド抽出サンプルのUPLC/MS/MS分析例

Table 2. Xevo TQとTQ-S における検量線範囲とQCサンプル範囲比較

	200 µL サンプル Xevo TQ	50 µL サンプル Xevo TQ-S
検量線範囲	0.1-10 ng/mL	0.025 or 0.05-10 ng/mL
QC レンジ	0.2-6 ng/mL	0.04-6 ng/mL

Name	Type	Std. Conc.	RT	Area	IS Area	Response	Conc.	%Dev
Blank artificial CSF			5.73	19.7	7.0			
50 pg/mL artificial CSF	Standard	0.05	5.71	230.4	3620.5	0.064	0.057	14
100 pg/mL artificial CSF	Standard	0.1	5.71	390.8	3585.1	0.109	0.108	8.1
250 pg/mL artificial CSF	Standard	0.25	5.71	778.3	3737.3	0.208	0.220	-12
350 pg/mL artificial CSF	Standard	0.35	5.71	1267.3	3693.8	0.343	0.372	6.2
500 pg/mL artificial CSF	Standard	0.5	5.71	1494.7	3566.8	0.419	0.457	-8.5
750 pg/mL artificial CSF	Standard	0.75	5.71	2733.5	4152.0	0.658	0.727	-3.1
1 ng/mL artificial CSF	Standard	1	5.71	3166.8	3792.5	0.835	0.926	-7.4
5 ng/mL artificial CSF	Standard	5	5.72	14773.9	3148.3	4.693	5.270	5.4
7.5 ng/mL artificial CSF	Standard	7.5	5.72	24576.9	3877.0	6.339	7.125	-5
10 ng/mL artificial CSF	Standard	10	5.72	33343.3	3662.5	9.104	10.238	2.4

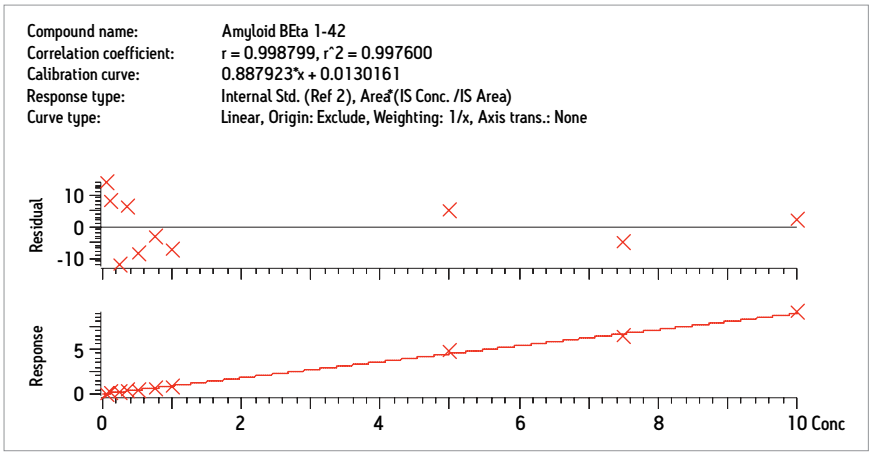

図5. 人工CSF + 5% ラット血漿からの0.05-10 ng/mLアミロイドβ1-42ペプチド抽出サンプルの代表的な検量線と残渣プロット

Table 3. 2種のプールしたヒトCSF中のアミロイドβペプチド濃度

	平均濃度 (ng/mL)	変動係数 (% RSD)	内標準変動係数 (% RSD)
Amyloid β 1-38 Human CSF 1	1.396	5.3	6.4
Amyloid β 1-38 Human CSF 2	0.702	1.7	
Amyloid β 1-40 Human CSF 1	5.429	3.3	4.7
Amyloid β 1-40 Human CSF 2	2.611	2.7	
Amyloid β 1-42 Human CSF 1	0.458	5.2	6.6
Amyloid β 1-42 Human CSF 2	0.226	1.9	

Table 4. 添加QC サンプルの平均偏差(%)

	QC 0.04 ng/mL	QC 0.075 ng/mL	QC 0.15 ng/mL	QC 0.2 ng/mL	QC 0.8 ng/mL	QC 2 ng/mL	QC 6 ng/mL
Amyloid β 1-38 Human CSF 1 and 2	2.3	5.8	-3.2	7.3	14.8	5.1	13.1
Amyloid β 1-40 Human CSF 1 and 2	-0.8	-3.2	-1.9	2.5	-2.6	-4.2	-3.8
Amyloid β 1-42 Human CSF 1 and 2	1.3	13.4	-3.6	5.6	2.0	-0.6	-0.2

結果と結論

- Xevo TQ-S タンデム四重極マススペクトロメーターにより1/4のサンプルサイズで4-5倍の高感度化を達成できました。
- ヒトおよびサルCSF 中のアミロイドβペプチド種を同時定量するためのSPE-UPLC/MS/MSバイオアナリシスメソッドが開発されバリデーションされました。
- 高い選択性を有するミックスモードμElution SPE とUPLC の分離を組み合わせがヒトおよびサルCSF 中の3種の主要アミロイドβペプチドの正確で信頼性が高い定量に重要でした。
- ポジティブイオンMS/MSとb イオンフラグメントを使用が本アプリケーションに必要とされるMSの特異性を与えました。
- 96 サンプルを30分以内に分析可能な状態へ前処理でき前臨床および臨床試験で要求されるサンプルスループットを達成できました。
- 本報で示された方法により前臨床試験において時間を要する免疫測定法や免疫沈降が排除可能でした。
- 本アプローチにより同一サンプル中の異なるアミロイドβペプチドを同じ方法で同時に分析できました。
- この単一な測定法は高度に選択的かつ特異的でハイスループットな方法であり、低濃度の内因性アミロイドβペプチドの定量に必要な感度を与えました。
- 開発されたひとつのUPLC/MS/MS 測定法は、関連する各ペプチドの定量に別々の抗体を必要とし別々の分析が必要となるELISA 法に対して顕著な優位性を示しました。

オーダーインフォメーション

本アプリケーションに使用された前処理製品とカラム	商品番号
Oasis MCX µElution Plate	186001830BA
ACQUITY UPLC BEH C_{18}, 300Å, 2.1 x 150 mm, 1.7 µm, Peptide Separation Technology Column	186003687

参考文献

1. T.A. Lanz, J.B. Schachter, Journal of Neuroscience Methods 169 (2008) 16-22.
2. T. Oe et al, Rapid Communications in Mass Spectrometry 20 (2006) 3723-3735.
3. JR Slemmon et al, Journal of Chromatography B 846 (2007) 24-31.
4. NT Ditto et al, Journal of Neuroscience Methods 182 (2009) 260-265.
5. T.A. Lanz, J.B. Schachter, Journal of Neuroscience Methods 157 (2006) 71-81.
6. MJ Ford at al, Journal of Neuroscience Methods 168 (2008) 465-474.
7. E. Portelius et al, Journal of Proteome Research, 6 (2007) 4433-4439.

適用規格:JISQ9001:2008(ISO9001:2008)
登録番号:JMAQA-331 登録日:1999年05月31日
審査登録範囲:理科学機器(液体クロマトグラフ・質量分析装置・データ管理システム等)の輸入・販売から保守業務までのトータルサポート及び保守プランの設計・開発

このISO9001認証登録ロゴは、Waters Corporationのものです。

Waters
THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.™

日本ウォーターズ株式会社 www.waters.co.jp
東京本社 〒140-0001 東京都品川区北品川1-3-12第 5 小池ビル TEL 03-3471-7191 FAX 03-3471-7118
大阪支社 〒532-0011 大阪市淀川区西中島5-14-10 サムティ新大阪フロントビル11F TEL 06-6304-8888 FAX 06-6300-1734
ショールーム 東京 大阪
テクニカルセンター 東京 大阪 名古屋 福岡 静岡

Waters、UPLC、ACQUITY UPLC、Xevo および Oasis は Waters Corporationの登録商標です。Ostro および The Science of What's Possibleは Waters Corporationの商標です。その他すべての登録商標はそれぞれの所有者に帰属します。

©2011 Waters Corporation. Produced in Japan. 2011年8月 720003860JA PDF