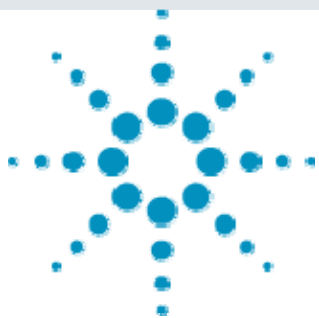




Agilent 6460 による真菌中 グリオトキシンの分析



＜要旨＞アスペルギルス症の原因と考えられているグリオトキシンの LC/MSMS による高感度分析法を開発しました。この分析法の検出限界は $0.00025 \mu\text{g/mL}$ でした。この分析法を用いて *A.fumigatus*, *A.lentulus* 及び *A.udagawae* の孢子及び培養液を測定した結果 *A.fumigatus*(11 株) 及び *A.udagawae*(4 株)の培養液から $0.01\sim 95.3 \mu\text{g/mL}$ の濃度で検出されました。

Key Words: アスペルギルス症、グリオトキシン、LC/MS-MS、*Aspergillus* 属

1. はじめに

アスペルギルス症は *Aspergillus fumigatus* をはじめとする *Aspergillus* 属の真菌による真菌症疾患の総称で孢子の吸入と体内での増殖が原因の日和見感染症です。また *A. lentulus* や *A. udagawae* も本症の起因菌となりますが、*A. fumigatus* とは異なった薬剤耐性を有することが報告されており臨床上の問題となっています。これら真菌が産生する二次代謝産物のなかでもグリオトキシンはマイコトキシンとして知られておりアスペルギルス症に関与が疑われる毒性化合物です。そこで、本研究では *A. fumigatus*, *A. lentulus* 及び *A. udagawae* 中グリオトキシンの産生能を比較する目的で LC/MS-MS 法を用いた高感度分析法を開発しこれら真菌中のグリオトキシンの測定を行いました。

2. 装置及び測定条件

分析条件は表.1 に示した通りです。装置には Agilent Technologies 製 Agilent6460 LC/MSMS を使用しました。分析用カラムには逆相系の Agilent Technologies ZORBAX Eclipse Extend C18 (100mm,2.1mm,1.8 μm)、移動相にはアセトニトリル及び 0.1% ぎ酸+10mM ぎ酸アンモニウム混合水溶液を使用しました。グリオトキシンの SRM 条件は図.2 に示したグリオトキシンのプロトン化分子をプリカーサーイオンとした MSMS スペクトルから強度の強いプロダクトイオンを 2 イオン選択しました。試料前処理は図.1 に示した通り、各菌株を 37℃ で 1 週間培養し、孢子は蒸留水を用いて採取しました。孢子中グリオトキシンの抽出にはメタノールによる浸漬(24 時間)、培養液中グリオトキシンの抽出には菌体を RPMI1640 液体培地で 24 時間振盪培養、菌体除去後、培養上清をクロロホルムにて抽出しました。これら抽出液は蒸発乾固後メタノール(1mL)に再溶解して測定試料としました。

表.1 LC/MS-MS 条件

LC	: 1260LC
Column	: ZORBAX Extend C18 (100mm,2.1mm,1.8 μm)
Mobile phase	: A: ACN, B: 0.1% HCOOH +10mM HCOONH_4 10%A---(20min)---80%A
Column temp	: 40 C
Sample volume	: 5 μL
Flow rate	: 0.2mL/min
MS	: Agilent 6460 triple quadrupole LC-MS
Ionization	: Agilent Jet Stream (Positive)
Drying gas	: 10L/min at 350℃
Nebulizer gas	: 345kPa
Sheath gas	: 12L/min at 400℃
Fragmentor	: 120V
Collision energy	: Target ion : 0V, Qualifier ion : 5V
Precursor ion	: m/z 327
Product ion(Target)	: m/z 263
Product ion(Qualifier)	: m/z 245

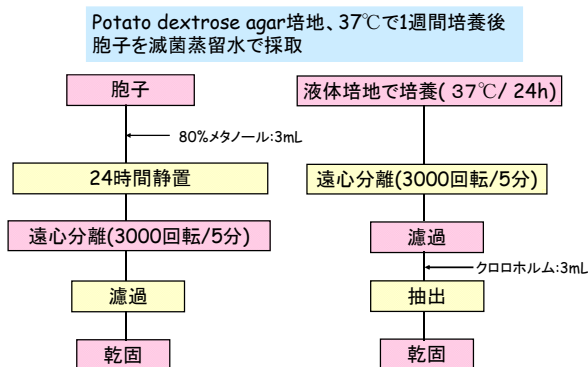


図.1 真菌中グリオトキシンの抽出条件

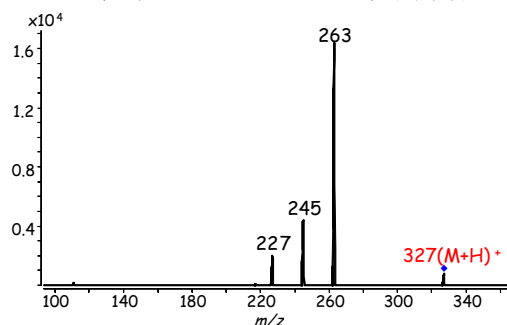


図.2 グリオトキシンの MS/MS スペクトル



Agilent Technologies

3.結果

グリオトキシンの SRM モードによるクロマトグラムを図.3 に示しました。このクロマトグラムから定量用イオンでの $S/N=3$ を検出限界とした検出限界は $0.00025 \mu\text{g/mL}$ でした。グリオトキシンの検量線は図.4 に示しましたが、 $0.01\sim 10 \mu\text{g/mL}$ の範囲で検量線の決定係数が 0.9997 と直線性は非常に良好でした。

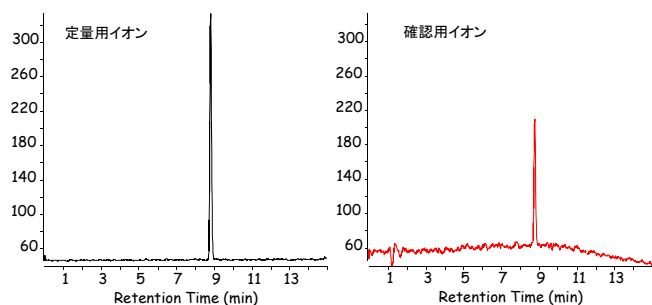


図.3 グリオトキシンの SRM クロマトグラム($0.01 \mu\text{g/mL}$)

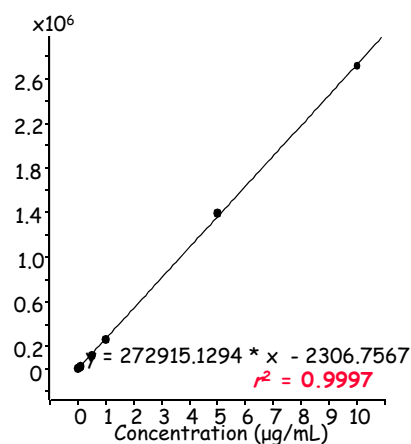


図.4 グリオトキシンの検量線

今回確立した分析法で *A.fumigatus*, *A.lentulus* 及び *A.udagawae* の孢子、培養液抽出液中グリオトキシンの測定を行いました。定量結果は表.2 に示しましたが、すべての菌株において孢子抽出液ではグリオトキシンは検出されませんでした。一方、培養液抽出液では *A.fumigatus* で 14 株中 11 株、*A.udagawae* で 8 株中 4 株から検出されました。定量値は抽出液濃度で *A.fumigatus* が $4.66\sim 95.30 \mu\text{g/mL}$ 、*A.udagawae* が $0.01\sim 0.83 \mu\text{g/mL}$ でした。また、図.5 には *A.fumigatus*, *A.udagawae* の孢子、培養液抽出液中グリオトキシンの SRM クロマトグラムを示しました。孢子抽出液では保持時間 13 分付近にマトリックス由来のピークが検出されましたが、グリオトキシンのピークは観察されませんでした。

表.2 *Aspergillus* 属菌株抽出液中グリオトキシンの定量値($\mu\text{g/mL}$)

No	<i>Aspergillus fumigatus</i>		No	<i>Aspergillus udagawae</i>	
	孢子	培養液		孢子	培養液
51941	ND	23.47	53867	ND	ND
51942	ND	76.15	53868	ND	ND
51977	ND	0.81	54302	ND	0.02
53870	ND	ND	51744	ND	0.07
54304	ND	7.76	702	ND	ND
51978	ND	95.30	5058	ND	0.83
53872	ND	ND	703	ND	0.01
53869	ND	4.00	FD0413	ND	ND
41362	ND	1.07	No <i>Aspergillus lentulus</i>		
47439	ND	46.41			
47450	ND	ND	41790	ND	ND
49824	ND	70.46	47063	ND	ND
49896	ND	84.88	41457	ND	ND
53842	ND	4.66			

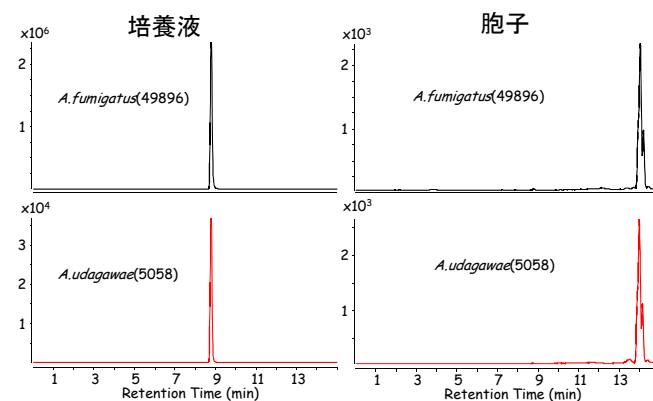


図.5 *A.fumigatus* 及び *A.udagawae* 中グリオトキシンの SRM クロマトグラム

4.まとめ

今回、*A.fumigatus*, *A.lentulus* 及び *A.udagawae* のグリオトキシン産生能を正確に把握する目的で LC/MSMS を用いたグリオトキシンの高感度分析法を開発し、各菌株の孢子及び培養液中グリオトキシンの定量を行いました。その結果、グリオトキシンが検出されたのは培養液のみで *A.lentulus* では全菌株で検出されませんでした。

【LCMS-201107TK-001】

本資料に記載の情報、説明、製品仕様等は予告なしに変更することがあります。

アジレント・テクノロジー株式会社

〒192-8510 東京都八王子市高倉町 9-1
www.agilent.com/chem/jp