

【第110回生涯教育講座】

質量分析を利用した臨床検査

なが い あつし たけ うち しづ え もり やま ひで ひこ
 長 井 篤 竹 内 志津枝 森 山 英 彦
 おか ざき りょう た まつ だ ちか し み しま せい じ
 岡 崎 亮 太 松 田 親 史 三 島 清 司
 しお た ゆ り
 塩 田 由 利

キーワード：質量分析，マススペクトロメトリー，起因菌同定，
 生化学検査，Cystatin C

1) はじめに

「質量分析」と聞いても何のことか理解しにくいと思われる。顕微鏡で見てわかるようなものであればどこに何があるという具体像が把握できるであろう。一方、質量分析は分子の違いを分析ソフトで表示できたり、さらにイメージング質量分析では分子の組織内での分布も表示できる。そのような高度な技術がなぜ可能となったのか。分子をイオン（荷電粒子）にして、重さ別に並べることで、その情報を分析して、ある特定の分子であることを同定するという基礎技術を応用することで発展してきた。また、分子を壊して、その破片をそれぞれ分析することで、後でその分子を再構成した状態を推定して、分子の特徴を把握することができる。ある分子は、きまった壊れ方、きまったイオン化を受けるので、データベースがあれば、未知の分子を特定することができる。また、1つの分子濃度を測定することも可能であり、1つの試料で類似分子を同時に測定することも可能

であるなど非常に便利な技術である。

質量分析器による測定は、通常いくつかの段階を経て行われる（図1）。適切な試料の前処置を行い、大まかにクロマトグラフィーで分離を行う。次に質量の差による分離を行う事前処理として、イオン化を行うことが必要である。そして、質量分析機（MS）でイオン源を使用してイオン化された試料を、磁場、電場をかけて質量による運動性の差を分析する。または純粋に質量の差によって検出器へ到達する時間で分離（MALDI-TOF MS）して、試料中の多くの物質の質量とイオン化を測定することができる。測定された分子は単に「その分子の質量（m）」ではなく、質量（m）とイオン化電荷数（z）の比（質量電荷比：m/z）

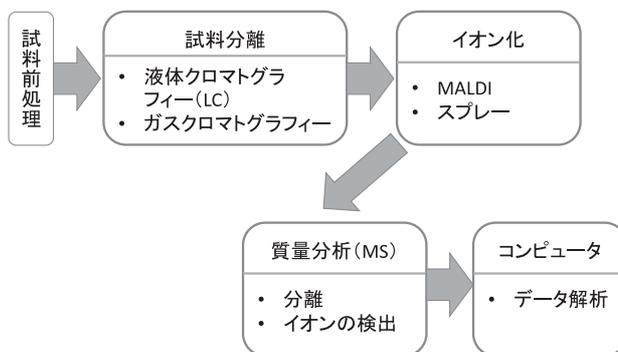


図1. 質量分析器による解析の流れ

Atsushi NAGAI et al.

島根大学医学部臨床検査医学
 連絡先：〒693-8501 出雲市塩冶町89-1
 島根大学医学部臨床検査医学

で表わされる。このような分析法で、試料中にある異性体や誘導体などを一斉に分析することも可能である。質量の厳密な値が分析できるため、生体試料中の脂肪酸、アミノ酸、天然有機化合物、薬物など多岐にわたる分野で応用されている。疾患のメタボローム解析では、原因の解明や早期診断に向けて旺盛に研究が進められている。

薬物検出、ドーピング検査、法医鑑定における質量分析の貢献はよく知られているが、臨床検査の領域でもその応用が期待されている。先天代謝異常症の診断には以前より用いられており、近年細菌感染症の迅速診断では保険適応となった。その他、これまで生化学検査室で行われているホルモンやタンパクの測定についても開発が行われている(表1)。本原稿では、臨床検査領域での質量分析の活用とその可能性について、自験例も含めて概説する。

2) 起因菌同定への貢献

従来検査との比較

検査部の微生物部門では、迅速に臨床の病原菌を同定・報告することが重要である。報告が遅れることで適切な感染症治療が行えないと、患者の病態に悪影響を及ぼしかねず、ひいては医療経済的にもコストが増大することとなる。微生物部門では収支を度外視して検査に費用を費やしているのが現状である。一般細菌の同定の場合、まずは培地で細菌を増殖させ、生えてきたコロニーを採取して形態学的、生化学的性状によって同定するという工程が必要である。そのためには菌の形態学的な知識と熟練した技術が必要で、時間とコストがかかる。

マススペクトロメトリー法による微生物同定は2011年に保険適応となり、主要医療機関に測定

表1. 質量分析技術を用いた臨床検査項目

| |
|-------------|
| 1)微生物同定 |
| 2)先天代謝異常症診断 |
| 3)血中薬物濃度測定 |
| 4)生化学測定項目 |
| ・ビタミンD |
| ・ステロイドホルモン |
| ・カテコールアミン |
| ・その他のペプチド |

機器が導入されて、従来の細菌感染症の診断(感染症起因菌の同定)に従来法とともに使用されている。マトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析法(Matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry: MALDI-TOF MS)を用いた同定法が使用されている¹⁾。

検査法の概要(図2)

図2にあるように、培養で得られたコロニーをプレートに塗布し、マトリックスを加えてレーザー照射をしてイオン化させ、電圧をかけて飛ばし、検出器で検出するものである。マトリックスというのはレーザー光を吸収して試料のイオン化を促進する有機化合物のことを指す。この方法により、細菌のリボゾームがうまくイオン化されることがわかり、リボゾームタンパクの発現の分析により細菌の菌種分類ができることから、質量分析技術に応用された。リボゾームタンパクをまとめてイオン化し、1-2mの高さの真空管内を飛ぶ速さで質量を分析し、それぞれの細菌独自のリボゾームを構成するタンパクのパターンで細菌を分類できる。

当大学でもいち早く測定機器 VITEK MS(シスメックス・バイオメリュー社)を導入して測定してきた。5-10分で測定は終わり同定が可能であるが、それを可能にしたのは、専用のデータベースであり、標準株のマススペクトルパターンが数

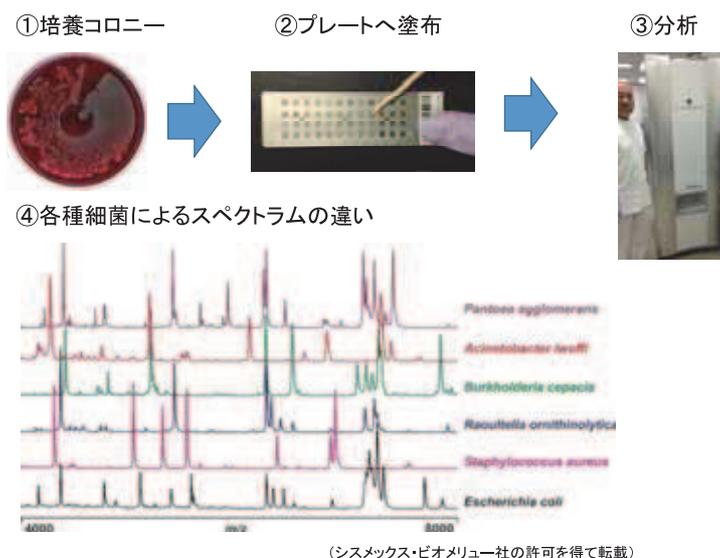


図 2. MALDI-TOF MS による細菌同定の流れ

表 2. 従来法と MALDI-MS 法での結果の一致率

| | 総数 | 完全一致 (%) | 属一致 (%) |
|-----------------|-----|------------|------------|
| 腸内細菌科 | 204 | 166 (81.4) | 196 (96.1) |
| ブドウ糖非発酵陰性桿菌 | 62 | 59 (95.2) | 60 (96.8) |
| Staphylococcus属 | 151 | 141 (93.4) | 146 (96.7) |
| Streptococcus属 | 48 | 39 (81.3) | 46 (95.8) |
| Enterococcus属 | 42 | 37 (88.1) | 39 (92.9) |
| Haemophilus属 | 19 | 16 (84.2) | 19 (100) |
| 酵母 | 29 | 25 (86.2) | 28 (96.6) |

千株記録してあり、サンプルの m/z パターンを、科→属→菌種レベルの順にスコア化し、同定を行う。簡単に言うと、図 2 のように各菌種で異なるパターンを識別する。当科での検出成績を例示すると、菌種ごとの従来法との一致率は表 2 のようになり、全体を集計すると、菌種名の完全一致 84.8%、菌種名までは問わず属名まで一致 94.6% となった。菌種別には一致率の低い科・属があり、MS では分類できない菌種もあるなどの問題点はあるものの、概ね良好な結果が得られた。

感染症の中でも、臨床的に菌血症・敗血症という状態は重篤である。血液中に菌が存在するにもかかわらず、血液培養を行っても菌の同定ができなかったり、時間がかかったりと、診断の遅れが治療の障害となることも多い。MALDI-TOF MS で直接血液培養ボトルから菌種を同定する試みが急速に進歩しており、迅速診断に活かされている。血液培養ボトルで菌の繁殖がみられたものから直接数 mL の培養液を採取し、前処理を行い、測定することで短時間に菌の同定が可能であり、開

発が進んでいる。

3) 生化学検査項目の分析応用

生化学検査の特徴と質量分析

生化学検査というと、AST、ALTのような酵素を酵素反応を利用して比色法で測定するなど、化学反応に基づく検査が主流であった。その後、感染症の抗原・抗体検査、ホルモン、腫瘍マーカーなどの検査項目が大幅に増加し、測定法も免疫学的測定法を用いるものが主となってきた。酵素や蛍光物質による標識、化学発光を用いた高感度な測定法が用いられている。免疫学的測定法(イムノアッセイ)では、抗体を用いる測定である。それゆえ、抗体の安定性や特異性などが問題となることがある。また、低濃度域の定量性が問題となることがある。そのような問題点を考えた場合、クロマトグラフィーに加え、マスペクトロメトリーを連続して行う、LC/MS/MSを利用することで、特異性と感度の壁を克服できる可能性がある。

LC/MS/MSによる生化学検査の原理

LC/MS/MSがどのような場合に検査に用いられるのか、その原理を簡単に述べる。LC/MS/MSとは名前のように液体クロマトグラフィーを行った後に、マスペクトロメトリーを2度行うという事(MS/MS: タンデムマス)である。図

1で言えば、質量分析の工程を2度繰り返すことである。LCの工程で夾雑物を減らして試料を分離する。次に、分離された目的物質をイオン化しMSで質量電荷比(m/z)として測定する。それでも類似の分子は分離できないことがあるため、分子を断片化(フラグメント化)して再度MSに通して目的分子由来のフラグメントイオンを分離、検出する。LC/MSよりフラグメントイオンの質量電荷比(m/z)のパラメータを1つ増やすことで、飛躍的に目的分子検出の特異性を向上させることができる。

以上の方法を用いると構造が類似していてもひとつの水酸基(OH)の違いを区別したり、異性体も区別できたりする。しかも同じ測定系で一斉に分析できる利点がある。現在実用化に向けて研究が進んでいるものとして、ビタミンD代謝物の一斉分析がある。図3に示すように、ビタミンDは脂肪組織への移行や肝臓・腎臓での代謝が非常に早いため、水酸化物の血中濃度で充足度が評価される。一般的には、25OH-D₃が充足状態を反映すると言われているが、遺伝子異常による代謝異常などを評価するためには、他の水酸化物濃度と総合的に評価する必要がある。そのような場合に現状のELISAなどの測定法では一定した測定値が得られないことより、同一検体から一斉分析が可能なLC/MS/MSによる測定が期待されて

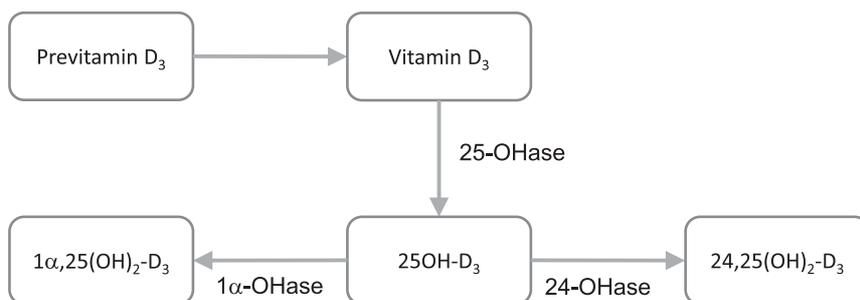


図3. ビタミンD代謝経路

いる。

髄液 cystatin C の LC/MS/MS による分析例

Cystatin C は、146個のアミノ酸からなる分子量約13,300の分泌性のタンパク質で、広く体液や細胞内ではライソゾームに存在して、システインプロテアーゼインヒビターとして、プロテアーゼの制御をしている。糸球体を自由に通過することでろ過され、そのほとんどが近位尿細管で再吸収され分解されることより、血清 cystatin C は腎機能の有用なマーカーとして保険適応も通り、測定されている。髄液中では血中の5.5倍程度高濃度に存在し、中枢神経の炎症の制御に重要な役割を果たすことや脳アミロイドアンギオパチーの髄液診断に有用であることを報告してきた^{2,3)}。髄液中での測定系は ELISA 法で行ってきたが、より高感度で精度の高い測定を目的に LC/MS/MS による測定を検討しているので、例として紹介する。

Cystatin C は、表 3-1 のようなアミノ酸配列でできているが、そのままでは分子量が大きすぎて LC/MS/MS では測定できない。そこで、まずは trypsin で消化する前処理を行いペプチド断片にしてから分析を行った。幾つかの断片に消

化されるが、そのうち MS で測定が可能なピークとして同定できたのは、表 3-1 では括弧で示され、表 3-2 に配列が示されるペプチドである。MS/MS 分析ではさらに 2 回目の MS でペプチド断片を断片化 (フラグメント化) して分析した結果、図 4 のように表 3-2 で示されたフラグメントイオンの質量電荷比 (m/z) のサイズと同一のピークが認められることがわかる。クロマトグラムでの溶出時間に一致したピークの強度 (ピークの面積) を標準ペプチドの強度と比較すること (面積比) で定量が可能である (図 5)。今回我々は Glufib という fibrinopeptide B に由来するペプチドを標準物質として検量線を作成し、cystatin C の測定を行った。

4) 今後の展望

微生物検査の項目で述べたように、起因菌同定の迅速性という点で MALDI-TOF MS 質量分析技術は非常に有用で革命的である。ただ、機器が高価であることから主要病院のみの導入であり、どのような臨床の場面で使用していくべきなのか具体的な方法についてはまだ検討の余地がある。

表 3-1. Cystatin C のアミノ酸配列

| 番号 | アミノ酸配列 | 番号 |
|-----|--|-----|
| 0 | MAGPLRAPLL LLAILAVALA VSPAAGSSPG KPRLVGGPM DASVEEKGVR R(ALDFAVGEY | 60 |
| 61 | NK)ASNDMYHS R(ALQVVR)ARK (QIVAGVNYFL DVELGR/TTCT KTQPNLDNCP FHDQPHLK | 120 |
| 121 | AFCFSFIYAV PWQGTMTLSK STCQDA | 146 |

表 3-2. Cystatin C の MS 測定に用いたアミノ酸断片と標準タンパク配列

| アミノ酸番号 | 配列 | 質量電荷比(m/z) | フラグメントイオン(m/z) | ペプチド仮称 |
|--------|------------------|------------|---------------------|----------|
| 52-62 | ALDFAVGEYNK | 613.6 | 86.2, 157.1 | Peptide1 |
| 72-77 | ALQVVR | 685.4 | 100.9, 122.3, 185.0 | Peptide2 |
| 81-96 | QIVAGVNYFLDVELGR | 896.2 | 474.9 | Peptide3 |
| 標準タンパク | EGVNDNEEGFFSAR | 785.7 | 72.1, 120.1, 186.9 | Glufib |



図4. Cystatin C フラグメントのマスペクトル

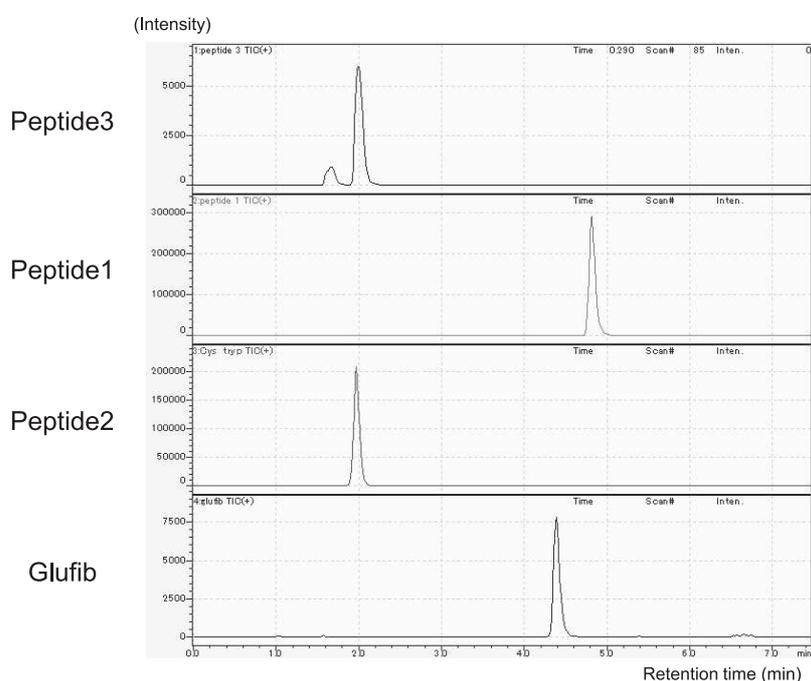


図5. Cystatin C 測定を選択反応モニタリング・クロマトグラム

また、データベースに一部の菌種が登録できていないこと、異なる菌でリボゾームタンパクが近似しているために鑑別が困難な場合があること、また、真菌では前処理の問題などもあり、同定できないことがあることなど、処理法からデータベースまで、問題点があることも事実である。しかし、サンプル調整が容易で迅速測定が可能で、検査自体も低価格化が図れ、人的誤差も少ないなどの利点を多く有している。今後改良が進んでいけば、煩雑な微生物同定過程を代替できる有力なツール

として汎用化される可能性もあると思われる。

生化学検査項目では、構造の類似した物質の分別が容易に可能で、誘導体なども一斉分析できる利点を生かして、LC/MS/MSの技術を臨床検査で実用化しようという試みが行われている。また、今回は述べなかったが、特性を生かして先天代謝異常症において異常物質の検出が行われ、スクリーニングが行われている。さらにはイメージング質量分析を用いて、組織中のがんに特有な分子の同定やアミロイドーシス前駆タンパク質の同定

も試みられており、今後早期診断や組織診断に用いられる可能性がある。

これまではプロテオミクスなどの研究分野で幅

広い活躍をしてきた質量分析であるが、今後は技術・機器の発展とともに、臨床検査として医療に寄与できることが期待される。

参 考 文 献

- 1) Sogawa K, Watanabe M, Sato K, et al. Use of the MALDI BioTyper system with MALDI-TOF mass spectrometry for rapid identification of microorganisms. *Analytical and bioanalytical chemistry* 2011; 400: 1905-1911.
- 2) Nagai A, Murakawa Y, Terashima M, et al. Cystatin C and cathepsin B in CSF from patients with inflammatory neurologic diseases. *Neurology* 2000; 55: 1828-1832.
- 3) Shimode K, Kobayashi S, Imaoka K, Umegae N, Nagai A. Leukoencephalopathy-related cerebral amyloid angiopathy with cystatin C deposition. *Stroke* 1996; 27: 1417-1419.