

第29回麻布環境科学研究会 一般演題10

質量分析装置を用いた問題飲酒者診断法の確立を目指して

○曾川一幸¹⁾、小寺義男^{1,2)}、野田健太^{3,4)}、梅村啓史³⁾、松下一之^{1,3)}、小島 良⁴⁾、朝長 毅^{1,5)}、野村文夫^{1,3)}

- 1) 千葉大学医学部附属病院 疾患プロテオミクス研究センター
- 2) 北里大学理学部 生体分子動力学講座
- 3) 千葉大学大学院医学研究院 分子病態解析学
- 4) 日東紡績 メディカル開発センター
- 5) 独立行政法人 医薬基盤研究所 プロテオームリサーチプロジェクト

1. 背景

わが国で最も広く利用されている γ -GTP、欧米で多用されている糖鎖欠損トランスフェリン(CDT)のいずれにおいても、いわゆるノンレスポonderが存在することに加え、非アルコール性疾患でも異常値を示す場合がある。すなわち、常習飲酒家のスクリーニングにおいて感度・特異度ともに満足すべきマーカーはなく、他施設共同研究においても γ -GTP及びCDTの限界が示されている。我々は、断酒目的で入院したアルコール依存症患者血清検体を用い、ProteinChip^R system (Bio-Rad)で新たな飲酒マーカーの探索を行った結果、fibrinogen α C chainの分解産物(5.9kDa)、Apo A IIの分解産物(7.8kDa)、Apo A I(28kDa)を見出し(Proteomics. 2004, 4:1187-95)、特に5.9kDaは γ -GTPノンレスポonderの検出にも有用であることを示した(Alcohol Clin Exp Res. 2007, 31:22S-26S)

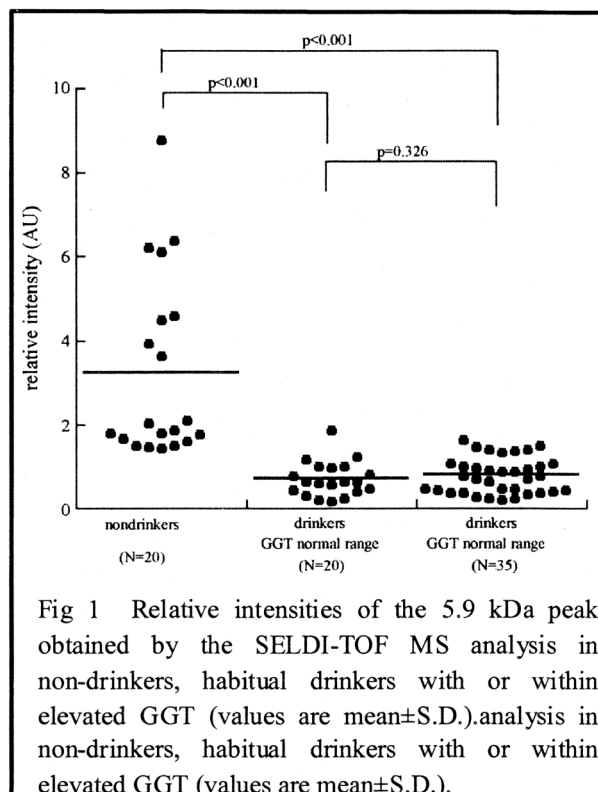


Fig 1 Relative intensities of the 5.9 kDa peak obtained by the SELDI-TOF MS analysis in non-drinkers, habitual drinkers with or within elevated GGT (values are mean \pm S.D.).analysis in non-drinkers, habitual drinkers with or within elevated GGT (values are mean \pm S.D.).

(Figure 1)。しかし、質量分析計は定量性が乏しく、正確な診断に用いることは難しい。そこで、今回我々は発現解析で使用する ClinProtTM System と安定同位体標識ペプチドを組み合わせ、5.9kDa の簡便かつ再現性の高い測定系の確立を目指した。

2. 対象・方法

健常者男性 8 名の血清検体を用いて、再現性および食事・採血から血清分離までの時間・凍結融解などの検査前変動要因が 5.9 kDa 測定に与える影響を検討した。

測定は磁性ビーズと MALDI-TOF/TOF MS を組み合わせた ClinProtTM system (Bruker

Daltonics)を用いた。血清に 5.9kDa に対する安定同位体ペプチド(SI-5.9 kDa)を内部標準として一定量添加し、陽イオン交換磁気ビーズ(WCX; Bruker Daltonics)に結合させ溶出し、溶出した試料をそのまま AnchorChip に調整後、AutoFlexRII (MALDI-TOF/TOF)により測定を行った。解析は FlexAnalysis™ software 2.4 (Bruker Daltonics) を用いてベースライン補正とスムージング処理を行い、SI-5.9kDa ピーク強度と血清中の 5.9kDa ピーク強度の比を求めた。

3. 結果

測定の基本性能は、同時再現性: CV 3.3 ±1.3% (2.1-5.3%)、日差再現性: CV 4.9±1.1% (2.9-6.2%)であった (Table 1)。また、血清中の 5.9kDa の安定性、および検体処理方法を確認するため、検体の凍結融解の影響: CV 6.3 ±0.7% (5.8-7.8%)、採血後、遠心までの時間の影響を確認したところ、5.9kDa の存在量は 30 分以降プラトーとなった。

Table 1. Coefficient of Variation for inter-day measurement and between-days measurement reproducibility.																
A: Inter-day measurement																
Sample No.	1		2		3		4		5		6		7		8	
SI-5.9kDa peptide	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
n	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8
Mean	1.60	21709	1.81	18143	2.13	25090	1.98	22163	1.85	22612	2.11	29981	2.19	34405	1.96	33711
CV (%)	2.50	4.82	4.74	6.06	2.27	13.79	5.30	5.53	4.36	8.14	2.11	7.01	2.57	4.56	2.35	15.82
B: Between-days measurement																
Sample No.	1		2		3		4		5		6		7		8	
SI-5.9kDa peptide	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
First week	1.60	20781	1.81	16750	2.13	24028	1.98	21377	1.85	21781	2.11	31220	2.19	35550	1.96	38186
Second week	1.67	15882	1.96	14550	2.13	20723	1.98	18554	2.00	19180	2.21	26624	2.26	29479	2.08	31470
Third week	1.82	15402	2.07	12501	2.40	19978	2.28	17524	2.11	17914	2.21	21599	2.35	28578	2.16	28873
Fourth week	1.63	19775	1.98	18038	2.10	19477	2.03	24165	1.96	22320	2.22	29904	2.38	36302	2.14	35902
Fifth week	1.70	16261	2.07	17261	2.26	22391	2.12	20477	2.04	18595	2.29	28328	2.35	33090	2.27	30542
Mean	1.68	17620	1.98	15820	2.20	21319	2.08	20420	1.99	19958	2.21	27535	2.31	32600	2.12	32995
CV (%)	4.99	14.02	5.43	14.31	5.67	8.79	6.19	12.68	4.75	9.88	2.86	13.58	3.54	10.69	5.37	11.81

4. まとめ

安定同位体標識物質を用いた MALDI-TOF MS 法により、精度良く血清中の 5.9kDa ペプチドを測定することができ、診断応用が可能であると考えられる。