

タンデムマス質量分析計を用いた 新生児ろ紙血中グリコサミノグリカン量の検討

学位論文内容の要旨

研究の背景

ムコ多糖症 (mucopolysaccharidosis, MPS) は、ライソゾーム病の一群である。その病態は、主に細胞骨格成分として体内に存在するグリコサミノグリカン (GAG) 分解酵素の欠損、活性低下である。MPS は、現在 I~IX 型の病型に大別されている。通常出生時には異常を示さず、出生後徐々に全身の組織に GAG の沈着が進行して症状が顕在化する。同一病型であっても軽症者と重症者が存在し、症状発現前には重症度を予見することは難しい。その治療については、近年では酵素補充療法が開発されて一定の効果をあげており、あるものは骨髄移植が有効である。いずれも症状顕在化前に治療を開始し、その後の GAG の蓄積を防いだ方がより有効と考えられるが従来早期発見は困難であった。他の先天代謝異常症と比べても発症頻度の高い疾患である MPS の早期発見の意義は高く、著者らは、この目的に適する測定法として、新生児ろ紙血中の GAG を抽出し、高速液体クロマトグラフィー/タンデムマス質量分析計 (LC/MS/MS) を用いて定量する手法を検討してきた。新生児ろ紙血を使用するメリットは、検体が従来から行われてきた新生児マス・スクリーニング検査と同一であるという点である。著者らはデルマトン硫酸 (DS)、ヘパラン硫酸 (HS)、ケラタン硫酸 (KS) の 3 種の GAG を MS/MS で測定できればほとんどの病型を推定できると考えた。これまでに、同法を用いて多数の新生児ろ紙血中の GAG を測定した報告は国内にはない。

対象

札幌市衛生研究所に新生児マス・スクリーニング目的で 2008 年 4 月 1 日から 1 年の間に送付された新生児ろ紙血のうち、研究目的の使用に同意が得られているもので日齢 4 から 6 の間に採血されたものを用いた。体重別に 6 群に分け、各 23 検体ずつ計 138 検体を正常検体として用いた。但し予備実験として、ヘパリン化毛細管を用いて吸収させたろ紙血では明らかに HS が高値になった為、ヘパリン化毛細管を用いている施設からの検体は除外した。

また手稲溪仁会病院小児科でフォローされている MPS 患者のろ紙血で、予め同意を得られているものを患者検体として使用した。今回は MPS I 型患者 2 名 (うち 1 名は日齢 5 の検体と 1 歳時の検体があり、計 3 検体)、MPS II 型患者 1 名 (酵素補充療法開始前とイデュルスルファターゼによる酵素補充療法開始 3 週間後の計 2 検体) の合計 5 検体を使用した。

方法

1. 概要

ろ紙血検体中に含まれる GAG である DS, HS, KS を抽出し、フィルター付遠心管を用いてまず不要な低分子成分を除いた後、フィルター上に残る GAG を酵素処理により二糖に分解して低分子化した。これを再度遠心することで、不要な高分子成分はフィルター上に残り、除く。ろ過液中に二糖として得られた GAG を LC/MS/MS で定量した。

2. ろ紙血検体の前処理方法

新生児ろ紙血を 3 mm で 1 枚打ち抜き検体とし、これを Microcon Ultracel YM-10 のフィルター上に入れ 1 % BSA 溶液 100 μ l を加えて 25 $^{\circ}$ C, 2 時間で抽出した。これを 8000 rpm, 15 分間の条件で遠心しコレクションチューブを新規のものに交換した。コンドロシンの 50 μ g/ml 水溶液 10 μ l と 50 mmol/l Tris-HCl 緩衝液 (pH7) 20 μ l, さらにケラタナーゼ II, ヘパリチナーゼ, コンドロイチナーゼ B を各 1 mU/30 μ l となるよう予め調整した酵素混合水溶液 30 μ l をフィルター上に添加した。約 10 秒間ボルテックミキサーにより混合した後に 37 $^{\circ}$ C で 12.5 時間加温した。これを 16000 rpm, 15 分間の条件で遠心し得られたろ過液をオートサンプラー用注入バイアルへ移し、検体とした。

3. 検量線試料の前処理方法

KS 標準溶液はケラタン硫酸 (ウシ角膜由来) を用い、HS 標準溶液として、不飽和ヘパラン/ヘパリン二糖キット (Hキット) を使用し、 Δ DiHS-0S, Δ DiHS-6S 及び Δ DiHS-NS を含む水溶液を作成した。Microcon Ultracel YM-10 へ各濃度 10 μ l の KS 及び HS 標準溶液を添加した。以降は 2. と同様にコンドロシンを添加及び酵素処理し、検量線試料とした。

4. 機器条件

LC/MS/MS 装置として質量分析計には API 4000 を使用した。また高速液体クロマトグラフィー装置として HP1100 system を、オートサンプラーとして HTC PAL を使用した。カラムは Hypercarb 2.0 mm i.d. \times 100 mm, 5 μ m を使用した。イオン化法は Turbo ionspray 法、検出モードは Multiple reaction monitoring (MRM) negative mode とした。KS, HS, DS を酵素分解して得られる二糖、それぞれの質量/イオン比 (m/z) (断片化前/断片化後) と断片化のエネルギー (CID) であるが、KS をケラタナーゼ II で分解すると、Gal β ¹⁻⁴GlcNAc(6S) (MSD) と Gal(6S) β ¹⁻⁴GlcNAc(6S) (DSD) の二種類の二糖が得られ、これらの m/z は 462.1/97.0 (CID: -80 eV) と同じであることから今回併せて KS として測定した。HS をヘパリチナーゼで分解すると、 Δ DiHS-0S [378.1/174.9 (-22eV)] と Δ DiHS-NS [416.0/137.9 (-34 eV)], Δ DiHS-6S [458.2/97.1 (-52 eV)] の 3 種類の二糖が得られた。また、DS をコンドロイチナーゼ B で分解すると、二糖である Δ DiDS-4S が得られるが、 Δ DiHS-6S と Δ DiDS-4S は同位体であり、 m/z と CID が同じで、ピークも分離出来ない。人体からは Δ DiHS-6S がほとんど産生されない為、本検討では Δ DiHS-6S で検量線を作成し、ろ紙血検体から得られたピークを DS 由来の Δ DiDS-4S として測定した。

結果及び考察

新生児ろ紙血の GAG を API4000 で測定した結果、 Δ DiHS-0S の平均は 87.57 ± 28.53 ng/ml, Δ DiHS-6S の平均は 205.58 ± 73.76 ng/ml, KS の平均は 357.07 ± 102.96 ng/ml となった。 Δ DiHS-NS については今回十分な感度が得られないものが多かった。なお現在に至るまで、この期間に新生児マス・スクリーニング検査を受けた児が MPS を発症したという事実は無い。また MPS 患者と正常新生児ろ紙血での測定の比較を行ったところ、明らかな差が認められ、これは MPSI 型患者の日齢 5 のろ紙血においても同様であった。MPSII 型患者の治療開始前と酵素補充療法開始後 3 週間後の検体を比較すると、治療開始後、KS を除くろ紙血中の GAG が低下していた。

測定時間の長さは今後の検討課題である。本法の測定時間は約 10 分/検体であり、現行のスクリーニング数程度を測定するには更なる測定時間の短縮を図らねばならない。

本法は被験者に対する侵襲も少なく、これまでと同様の方法で検体を収集できるという

点において優れており、これまで困難であった MPS の早期発見の一助となる可能性が示唆された。また、早期発見のみならず、その後の治療効果判定などにも使用できる可能性があり、大きなメリットと思われた。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 有 賀 正
副 査 教 授 岸 玲 子
副 査 教 授 畠 山 鎮 次

学 位 論 文 題 名

タンデムマス質量分析計を用いた 新生児ろ紙血中グリコサミノグリカン量の検討

ムコ多糖症 (mucopolysaccharidosis、MPS) は、ライソゾーム病の一群である。その病態は、主に細胞骨格成分として体内に存在するグリコサミノグリカン (GAG) 分解酵素の欠損、活性低下であり、通常出生時には異常を示さず、出生後徐々に全身の組織に GAG の沈着が進行して症状が顕在化する。その治療については、近年では酵素補充療法が開発されて一定の効果をあげており、あるものは骨髄移植が有効である。いずれも症状顕在化前に治療を開始し、その後の GAG の蓄積を防いだ方がより有効と考えられるが、従来早期発見は困難であった。本研究において、申請者は早期発見に適する測定法として新生児ろ紙血中の GAG を抽出し、高速液体クロマトグラフィー/タンデムマス質量分析計 (LC/MS/MS) を用いて定量する手法を検討した。申請者は対象として札幌市衛生研究所に新生児マス・スクリーニング目的で 2008 年 4 月 1 日から 1 年の間に送付された新生児ろ紙血のうち、研究目的の使用に同意が得られているもので日齢 4 から 6 の間に採血されたものを用いた。体重別に 6 群に分け、各 23 検体ずつ計 138 検体を正常検体として用いた。また手稲溪仁会病院小児科でフォローされている MPS 患者のろ紙血で、予め同意を得られているもの 5 検体を患者検体として使用した。

これらのろ紙血検体中に含まれる GAG であるデルマタン硫酸 (DS)、ヘパラン硫酸 (HS)、ケラタン硫酸 (KS) を抽出し、フィルター付遠心管を用いてまず不要な低分子成分を除いた後、フィルター上に残る GAG を酵素処理により二糖に分解して低分子化し、これを再度遠心することで、不要な高分子成分をフィルター上に除いた上でろ過液中に二糖として得られた GAG を LC/MS/MS で定量した。KS をケラタナーゼ II で分解すると、Gal β ¹⁻⁴GlcNAc (6S) (MSD) と Gal (6S) β ¹⁻⁴GlcNAc (6S) (DSD) の二種類の二糖が得られ、これらを今回併せて KS として測定した。HS をヘパリチナーゼで分解し得られた二糖の一つ、 Δ DiHS-0S を HS を反映するものとして測定し、また DS をコンドロイチナーゼ B で分解すると、二糖である Δ DiDS-4S が得られるが、HS 由来の Δ DiHS-6S と Δ DiDS-4S は同位体であり、本検討では Δ DiHS-6S で検量線を作成し、ろ紙血検体から得られたピークを DS 由来の Δ DiDS-4S として測定した。

新生児ろ紙血のGAGをタンデムマス質量分析計API4000で測定した結果、 Δ DiHS-0Sの平均は 87.57 ± 28.53 ng/ml、 Δ DiHS-6Sの平均は 205.58 ± 73.76 ng/ml、KSの平均は 357.07 ± 102.96 ng/mlとなった。HS由来の二糖の一つ、 Δ DiHS-NSについては今回十分な感度が得られないものが多かった。またMPS患者と正常新生児ろ紙血での測定の比較を行ったところ、明らかな差が認められ、これはMPSI型患者の日齢5のろ紙血においても同様であった。MPSII型患者の治療開始前と酵素補充療法開始後3週間後の検体を比較すると、治療開始後、KSを除くろ紙血中のGAGが低下していた。

公開発表に際し、副査の岸玲子教授から1検体当たりの価格、タンデムマス質量分析計の導入に当たっての問題点についての質問があった。次いで、副査の畠山鎮次教授から使用する機器の種類、新生児ろ紙血以外の検体使用、タンデムマス質量分析を行う上で、夾雑ピークの出現は無いのか、またどの様にして目的のピークと夾雑ピークを分離しているかについての質問があった。最後に主査の有賀正教授から現時点ではまだ有効な治療法が無い病型の発見の可能性と、それに伴い発生する問題点についての質問があった。いずれの質問に対しても、申請者は真摯かつ妥当な回答をした。

本研究は被験者に対する侵襲も少なく、検体が新生児ろ紙血であり、これは従来から行われてきた新生児マス・スクリーニング検査と同一であることから、従来と同様の方法で検体を収集できるという点において優れており、これまで困難であったMPSの早期発見の一助となる可能性を示唆した。また、早期発見のみならず、その後の治療効果判定などにも使用できる可能性も期待される。

審査員一同はこれらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。