トピックス

I. 総論

3. 質量分析の臨床検査分野への導入

野村 文夫

要 旨

質量分析技術の臨床検査応用は急速に進んでいる。ステロイドホルモン、ビタミンD代謝物などの定量測定においてLC-MS/MSは免疫アッセイに比して特異性に優れ、高感度である。また、多項目の同時測定も可能であり、今後臨床化学領域において重要な地位を占めると予想される。一方、細菌検査室におけるMALDI-TOF MSによる細菌・真菌の迅速同定はすでにルーチン検査として行われている。

〔日内会誌 102:3096~3102, 2013〕

Key words 質量分析, MALDI-TOF MS, LC-MS

はじめに

質量分析技術が登場してから約1世紀が経過した。当初は低分子化合物が解析対象であったが、2002年のノーベル化学賞の受賞対象となった田中耕一氏のソフトレーザー脱離イオン化法とJ.B. Fenn氏によるエレクトロスプレーイオン化(ESI)の開発により、解析対象が拡大した。その結果、質量分析技術の医療応用が加速され、現在では臨床検査において無くてはならない技術となりつつある。本稿では質量分析法とその検査応用の現状と展望について述べる。

1. 質量分析とその検査応用

質量分析装置は図1のようにサンプル分離部、

イオン化導入部、質量分析部、検出器、データ解析部の5つの部分から構成されている。臨床検査においては薬物の血中濃度やステロイドの定量などにおいてはHPLC (high-performance liquid chromatography)による分離、ESIまたはAPCI (atmospheric pressure chemical ionization)によるイオン化、三連四重極質量分析計による定量の組み合わせが一般的である。一方、細菌・真菌の菌体プロテオーム解析による迅速同定においてはマトリックス支援レーザー脱離イオン化(matrix-assisted laser desorption/ionization: MALDI)と飛行時間型(time-of-flight: TOF)の組み合わせが用いられる。なお、MS (mass spectrometry)/MS(エムエスエムエスまたはタンデムマス)は質量分析計を2台つないだものを意味する。最新の新生児マススクリーニング(タンデムマススクリーニング)ではLC

千葉大学大学院医学研究院分子病態解析学, 千葉大学医学部附属病院検査部・遺伝子診療部・疾患プロテオミクスセンター
New Era of Laboratory Testing. Topics: I. Generals; 3. Applications of mass spectrometry to laboratory medicine.

Fumio Nomura: Department of Molecular Diagnosis, Graduate School of Medicine, Chiba University, Japan and Divisions of Laboratory Medicine, Clinical Genetics and Proteomics Chiba University Hospital, Japan.

図 1. 質量分析装置の構成

HPLC : high performance liquid chromatography

GC : gas chromatography

CE : capillary electrophoresis

EI : electron ionization

CI : chemical ionization

FAB : fast atom bombardment

MALDI : matrix-assisted laser desorption ionization

SELDI : surface-enhanced laser desorption ionization

ESI : electrospray ionization

APCI : atmospheric pressure chemical ionization

APPI : atmospheric pressure photoionization

Q-pole : quadrupole

QqQ : triple quadrupole

TOF : time-of-flight

FT-ICR : Fourier transform ion cyclotron resonance

表 1. 臨床検査室における質量分析技術の利用

1) 先天代謝異常症のスクリーニングと診断
2) 血中薬物濃度測定 (TDM)
3) 臨床化学
ステロイドホルモン
ビタミン D, 葉酸
カテコラミンなど
ペプチド・蛋白質の多項目同時測定
4) 病原微生物の同定
5) 遺伝子解析における利用
SNPタイピング
メチル化定量解析

(liquid chromatography)-ESI-MS/MSが用いられる。

臨床検査やスクリーニングにおいて質量分析技術が利用される領域を表1に示した。質量分析を利用した先天代謝異常症の診断においては、まずガスクロマトグラフ質量分析計(GC/MS)がスタンダードとなった。現在でも有機酸代謝異常症においてGC/MSによる尿中有機酸分析はきわめて重要である。我が国における新生児マススクリーニングでは従来、①フェニルケトン尿症、②ホモシスチン尿症、③メープルシロップ尿症の3つのアミノ酸代謝異常、④先天性甲状腺機能低下症、⑤先天性副腎過形成、⑥ガラクトース血症の計6疾患が対象であったが、タンデムマス法の導入により従来のアミノ酸代謝異常症(①～③)を含む16種類以上の疾患を1

トピックス

回の検査でスクリーニングできるようになった¹⁾。しかし、その他の3疾患(④～⑥)については従来の方法を続ける必要がある。タンデムマスマスクリーニングは2011年の厚労省からの通達を受けて全国自治体に普及しているが、各自治体の基幹検査機関において一括測定される場合が多い。また、LC/MSは法医学における薬毒物分析やTDMにおいても必須のツールとなっている。

一方、質量分析技術は遺伝子解析においても有用であり、single nucleotide polymorphism (SNP)の高速タイピングやハイスループットなメチル化定量解析などにおいても使用される。本稿では質量分析技術が臨床検査の現場で実際に活用され始めている臨床化学と臨床微生物を中心に述べる。

2. 臨床化学検査における質量分析

1) イムノアッセイと質量分析の比較

感染症関連の抗原・抗体検査をはじめ、ホルモン、腫瘍マーカー、自己抗体等の測定に多用される各種免疫学的測定法は検査部の化学検査室の主役である。しかし、イムノアッセイでは同一項目について多くの検査試薬が存在し、使用される抗体も異なるため、測定法間差が生じる。さらに検体中の自己抗体様物質や異好性抗体(例えば患者血清中の免疫グロブリンが測定系で用いられているマウスモノクローナル抗体と反応してしまうなど)による異常反応が起こり得る。また、ゾーン現象、フック現象なども時に問題となる。

イムノアッセイでは特異抗体が持続的に供給され、入手可能であることが大前提である。我が国におけるバゾプレッシン(AVP)の唯一の測定系であったRIA (radioimmunoassay) で使用されていた抗血清の供給が停止されたため、一時期本邦におけるAVPの測定がストップしてしまったことは記憶に新しく、抗体のみに依存

する系の危うさを如実に示している。また、プロテオーム解析により見出されたペプチドバイオマーカーは翻訳後修飾を受けている場合も多い。その場合は特異抗体の獲得は容易でなく、イムノアッセイの構築が困難な場合も少なくない。また、イムノアッセイは一般に試薬が高価であり、ホルモン検査などにおいて交差反応が起こり得ること、低濃度域の定量性が不十分な点などが問題となる。

一方、質量分析法、とくに大気圧イオン化(APCI)またはエレクトロスプレーイオン化(ESI)とselected reaction monitoring (SRM) モードを用いた三連四重極質量分析計によるLC-MS/MSは広く用いられ、その解析対象も従来の薬物・毒物とその代謝物からホルモン、さらにはペプチド、蛋白質まで拡大しつつある。イムノアッセイ法と比べた場合の最大の利点は特異性が高く、高感度である点である。

しかし、初期投資に費用がかかり、機器の操作、維持、管理に高度の専門的知識が要求されること、現時点ではマニュアル操作に頼る部分が多いこと、サンプルの前処理操作(臨床検体からの抽出、分離精製、誘導体化など)が必要なこと、目的物のイオン化抑制に常に注意を払う必要があること、など臨床検査として不利な点もある。また、イムノアッセイのようにコマーシャルベースで測定系全体が提供されるわけではないので、現時点では項目ごとに至適な条件を組み合わせてIn-houseで測定系を作り上げる技術が求められる。

2) 質量分析法によるホルモン測定(ビタミンDを含む)

ステロイドホルモン、カテコールアミン、ペプチドホルモンの測定の主流は各種イムノアッセイであるが、LC-MS/MSによる測定法が高感度かつ高特異性でありまた、多項目の同時測定が可能なことから近年普及しつつある。

例えば、コルチゾールの測定においては類似

の構造を持つコルチゾン, 11-デオキシコルチゾールを始めとする他のステロイドや合成ステロイドであるプレドニゾロンなどとの交差反応が問題となる。したがって特異的な測定のためにはLC-MS/MSが優れている。

また、テストステロン、エストラジオールなどの性ホルモンについては、それぞれ成人男性、成人女性における測定については現行のイムノアッセイで十分であるが、低濃度域、すなわち女性・小児におけるテストステロンの測定、男性・小児におけるエストラジオールの測定においては、特異性、感度においてイムノアッセイに限界があり、LC-MS/MSによる測定がより正確である。例えばエストラジオールでは代表的なイムノアッセイ系 (CLIA (chemiluminescent immunoassay), CLEIA (chemiluminescent enzyme immunoassay)) の定量限界が15~25 pg/ml であるのに対し、LC-MS/MSでは0.5 pg/mlに達している²⁾。

ビタミンDはカルシウム代謝調節に必須な脂溶性ビタミンとして知られてきたが、活性化ビタミンDが多岐にわたる生理活性を有することが明らかとなり、ビタミンDの不足が多くの疾患の易罹患性を高めることが注目されている³⁾。その結果、生体におけるビタミンDの過不足の示標となる血中25OHビタミンD (25OHD) の測定の依頼件数が諸外国では指数関数的に増加し、我が国においても増加の兆しが見えている。

25OHDはHPLC法や競合的蛋白結合法で測定されていた時代からRIAを初めとするイムノアッセイに移り、さらに最近ではLC-MS/MSが注目されている。血中25OHDの大部分は25OHD3として存在するが、ビタミンD2のサプリメントを常用している場合は25OHD2の比率が増してくる。現在用いられているイムノアッセイは25OHD2と25OHD3を測り分けることができないだけでなく、その他の代謝物も測り込む可能性があり、特異性が十分とは言えない。事実、

市販のイムノアッセイ間のデータの不一致が指摘されているのに対して、異なるLC-MS/MSプラットフォーム間の一致率は良好とされている⁴⁾。筆者らも二連HPLCシステムと三連四重極質量分析計を組み合わせたLC-MS/MSとSRM法による25OHD2と25OHD3の迅速分別定量法を構築し活用している⁵⁾。25OHDの測定においてはLC-MS/MSがgold standardであり、日本臨床化学会の標準化専門委員会の見解⁶⁾でも、自施設の測定値がLC-MS/MSとのトレーサビリティを確保していることが求められており、そのための常用参照標準物質の入手も可能である。さらに最近ではSRM法により多項目の蛋白・ペプチドを同時に測定することも試みられている⁷⁾。

3. 臨床微生物検査における質量分析

従来から一般細菌の同定には形態学的手法 (コロニーの形状やグラム染色など) に加えて生化学的手法が用いられてきたが、後者は結果を得るのに長時間 (平均18時間程度) が必要である。高い識別能を有する分子生物学的手法は操作に熟練を要することに加えて、高コストである。それに対して、MALDI-TOF MSによる細菌同定は簡便性、正確性に優れ、迅速 (10分以内) に分離菌種の同定が可能である。また、当施設の経験でもランニングコストは従来の同定法の数分の1である。

質量分析技術の微生物同定への応用は1975年に端を発するが、1980年代になりMALDI-TOF MS技術の導入に伴い発展し、近年、複数の解析用ソフトや専用の解析機器が市販されて急速に普及しつつある^{8,9)}。MALDI-TOF MSにより得られる菌体の蛋白質成分 (主としてリボソーム蛋白) のマスマスペクトルとデータベースに登録されている菌種のマスマスペクトルとのパターンマッチングにより菌種名を知る方法である (図2)。実際のスペクトルを図3に示した。データベー

トピックス

図 2. MALDI-Biotyperによる迅速細菌同定の手順

図 3. 質量分析計で得られる細菌菌体成分のマスペクトル

表 2. 既存のデータベースにin-houseデータベースを加えることによる同定率の向上 (文献 10 より引用)

	No. of isolates	MALDI Biotyper method					
		Bruker database			Bruker-Chiba database		
		Species levels	Genus levels	No matching	Species levels	Genus levels	No matching
The concordance of identification of the species that were added to a database	498	434 (87.1%)	463 (93.0%)	35	488 (98.0%)	498 (100.0%)	0
The concordance of identification of the species that were not added to a database	47	39 (83.0%)	44 (93.6%)	3	39 (83.0%)	44 (93.6%)	3

スとしては現在 3 種類存在する。最も広く利用されているのがドイツのBruker Daltonics社のMALDI-Biotyperであり、次いで元々AnagnosTec社が開発し、現在bioMérieux社が扱い発展させたSARAMISのスペクトルデータベース(SuperSpectra)が知られている。この他、フランスで開発されたAndromasがある。我が国では解析ソフトと分析機器が一体となったMALDI-BiotyperとSuperSpectraを用いるVITEK[®]MS/AXIMA微生物同定システムが市販されている。いずれも我が国において医療機器登録されており、保険診療の枠組みで利用が可能である。

MALDI-TOF-MSによる微生物同定能力はデータベースの質と量に大きく左右される。すなわちその菌種がデータベースに存在しないあるいはデータベースが不十分な場合はMSスペクトルが得られても同定に至らない。Biotyperではユーザーが各施設の臨床分離株のスペクトルデータを独自に追加してデータベースを強化することができる点に特色があり、筆者らも当施設の分離株のスペクトルを追加した強化データベースを用いることにより、同定率が上昇することを確認している (表 2)¹⁰⁾。

本法の同定率は属レベルの同定率が 96~99%、種レベルで 85~97% 程度である。しかし、対象の菌種、用いた解析ソフトのversion、菌体の前処理の有無など条件の違いを考慮する必要がある。

嫌気性菌の同定率は一般細菌と比べ低いデータベースの充実による改善が期待できる。酵母様真菌(*Candida*属や*Cryptococcus*属など)では集落を直接塗布する方法ではマスマスペクトルパターンを得ることが難しく、ギ酸などによるタンパク抽出が必要となる。一方、糸状菌、抗酸菌、放線菌などにおいてもデータベースの充実が加速しているので、適切な前処理を行うことにより高率に同定可能となりつつある¹¹⁾。一方、本法はゲノムデータベースを元に行っているため、本来は同一菌種であると考えられる*Escherichia coli*と*Shigella* sp., *Mycobacterium tuberculosis*と*M. bovis*, *Bacillus cereus*と*B. anthracis*などは鑑別不可能である。

本法の迅速性が特に活かされるのは血液培養であり、血液培養陽性ボトルからの直接同定は、陽転後約 1 時間で同定結果が得られ、70~80% の同定率が得られる。

現在の機器では同定のためには 10⁵ 程度の菌量が必要なことから培養を経ずに臨床検体から直接同定するのは通常困難であるが、菌量が多い場合は尿や脳脊髄液から直接同定が可能である。特に髄液の場合は髄膜炎の迅速診断に貢献する。また、細菌の酵素による抗菌薬の分解産物の解析をはじめ、MALDI-TOF MS技術を細菌の薬剤耐性判定に応用する試みがなされている¹²⁾。今後、株レベルのタイピングへの応用も期待されている。

トピックス

質量分析技術の導入により、臨床細菌検査は大きく変貌しつつある。MALDI-TOF MSによる細菌同定は自動化によりきわめて簡便に結果が得られるが、細菌検査の一連の流れとその問題点を熟知した臨床細菌検査の専門家の下で実施することが望ましい。

おわりに

質量分析技術がいかに優れたものであっても、従来の解析手法にとって代わるものではなく、既存の方法といかに組み合わせて活用していくかがポイントである。その意味で臨床検査、とくに臨床化学、臨床微生物に関わるものにとって質量分析技術を身近にしておく必要がある。その一助として、日本医用マススペクトル学会は平成25年度より医用質量分析認定士制度とその講習会をスタートさせている。

著者のCOI (conflicts of interest) 開示：本論文発表内容に関連して特に申告なし

文 献

- 山口清次編：タンデムマス・スクリーニングガイドブック。診断と治療社，東京，2013。
- Kushinir MM, et al: High-sensitivity tandem mass spectrometry assay for serum estrone and estradiol. *Am J Clin Pathol* 129: 530-539, 2008.
- Michaelsson K, et al: Plasma vitamin D and mortality in older men: a community-based prospective cohort study. *Am J Clin Nutr* 92: 841-848, 2010.
- Farrell CJ, et al: State-of-the-art vitamin D assays: a comparison of automated immunoassays with liquid chromatography tandem mass spectrometry methods. *Clin Chem* 58: 531-542, 2012.
- Mochizuki A, et al: Preanalytical evaluation of serum 25-hydroxyvitamin D3 and 25-hydroxy vitamin D2 measurements using LC-MS/MS. *Clin Chim Acta* 420: 114-120, 2013.
- 渭原 博, 他: 血清 25 ヒドロキシビタミンD測定の標準化に関する日本臨床化学会栄養専門委員会の見解. *臨床化学* 38: 140-151, 2009.
- Strathmann FG, Hoofnagle AN: Current and future applications of mass spectrometry to the clinical laboratory. *Am J Clin Pathol* 136: 609-616, 2011.
- Sauer S, Kliem M: Mass spectrometry tools for the classification and identification of bacteria. *Nat Rev Microbiol* 8: 74-82, 2010.
- 大楠清文：MALDI-TOF MSを利用した菌種同定法. *臨床検査* 57: 388-396, 2013.
- Sogawa K, et al: Rapid identification of microorganisms by mass spectrometry: improved performances by incorporation of in-house spectral data into a commercial database. *Anal Bioanal Chem* 403: 1811-1822, 2012.
- Biswas S, et al: Use of MALD-TOF mass spectrometry for identification of bacteria that are difficult to culture. *J Microbiol Methods* 92: 14-24, 2013.
- Hrabak J, et al: Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight (MALDI-TOF) mass spectrometry for detection of antibiotic resistance mechanisms: from research to routine diagnosis. *Clin Microbiol Reviews* 26: 103-114, 2013.