

令和元年5月30日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K15770

研究課題名(和文) エイコサノイド高感度一斉定量法によるヒト病態解析と臨床検査への応用

研究課題名(英文) Pathological analysis and application to clinical testing by multiplex quantitative analysis of eicosanoid mediators

研究代表者

安本 篤史 (YASUMOTO, ATSUSHI)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：90769887

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：超高速液体クロマトグラフィー・三連四重極型質量分析計(LC-MS/MS)を用いて、健康人27名から血清・血漿を採取し、エイコサノイド高感度一斉定量を行った。176項目を測定し、その中から30種類のエイコサノイドについての特徴を見出し報告した(Yasumoto A, J Chromatogr B, 2017)。また、採血条件(採血管の種類、採血量、採血から遠心までの経過時間、保存条件[温度])でデータが変化し、血清は採血管に含まれる凝血剤の種類や採血量に大きく依存する。虚血性心疾患患者100名を対象に、抗血小板薬内服後の血清・血漿を解析中で、近日中に投稿予定である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

エイコサノイドはアラキドン酸から産生される生理活性脂質のひとつで、生理的および病理学的な炎症の恒常性を保つのに重要な役割を果たしている。エイコサノイドの過剰な産生は病気の発症や進行に関連しているが、エイコサノイド測定は実臨床では行われていない。

本研究により実臨床への応用の妨げとなっている原因が解明され、適切なサンプル採取から測定までの方法を提案し、測定されたエイコサノイドの結果の解釈、基準値についても明らかにした。虚血性心疾患患者のサンプルを測定し、実臨床への応用も可能であることを示し、今後、病態理解や治療法の選択に有用な検査法であることを示した。

研究成果の概要(英文)：Human serum and plasma were collected from 27 healthy donors and analyzed using liquid chromatography coupled with a triple quadrupole mass spectrometer (LC-MS/MS). We clarified the characteristics of 30 kinds of eicosanoid mediators out of 176 target compounds we measured (Yasumoto A, J Chromatogr B, 2017). In addition, the concentration of eicosanoids changes under blood collection conditions (type of blood collection tube, volume, elapsed time from blood collection to centrifugation, storage condition [temperature]), and the serum largely depends on the type of blood clotting agent contained in the blood collection tube and blood collection volume. Lastly, we are analyzing the serum and plasma collected after administration of antiplatelet drugs in 100 patients with ischemic heart disease, and will submit it in the near future.

研究分野：臨床検査

キーワード：エイコサノイド 高速液体クロマトグラフィー 血清

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

生理活性脂質は 1930 年代にプロスタグランジンの発見から始まり、1980 年代後半から重要な生理作用が解明されてきた。アラキドン酸に由来する生理活性脂質であるエイコサノイド性メディエーター (図 1) は、特異的な膜受容体を介して様々な生理作用を発揮することから、これまで多数の関連薬剤が開発され、医療現場で使用されている。

最近では -3 系の高度不飽和脂肪酸 (エイコサペンタエン酸[EPA]、ドコサヘキサエン酸[DHA]) に由来する代謝物がエイコサノイドに拮抗する

抗炎症性を有していることが注目され始めているが、生体に微量しか存在しない -3 系脂肪酸の代謝物を解析するには、高感度な質量分析法の発展は欠かせないものとなっている。

生理活性脂質の研究においてエイコサノイド類、EPA や DHA の定量解析は必要不可欠であり、測定方法も同時に発展してきた。エイコサノイドの定量解析には、従来、特異的な抗体を用いた ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) が行われてきて高感度定量が可能で、市販のキットを用いて簡便に再現性良く測定することができる。しかし、複数のエイコサノイド分子種を同時に測定することはできず、既知の分子種を測定するにとどまる。複数のエイコサノイドを高感度に測定する方法として、ガスクロマトグラフィー (GC) や液体クロマトグラフィー (LC) の検出系に質量分析計 (MS) を配置する GC-MS 法や LC-MS 法が用いられている。LC-MS 法はクロマトグラフィーの分離度は GC に劣るが試料の誘導化が不要で、MS/MS による選択的検出を利用した高感度検出が可能でエイコサノイド測定に適している。我々は教室が関与しているリポミクス社会連携講座にて超高速液体クロマトグラフィー・三連四重極型質量分析計を用いたエイコサノイド高感度一斉定量系 (Kita Y, Anal Biochem 342, 2005) で測定を行っている。

エイコサノイドの血液測定サンプルとしては主に血漿が頻用されてきた。血漿は一般的にクエン酸加血漿が用いられ、抗凝固状態で適切に遠心をして血小板を含む血球成分を十分に取り除く。そのため、健康者でエイコサノイドを測定すると、トロンボキサン A₂ に代表される血小板由来エイコサノイド類は測定感度以下であるが、シトクロム P450 (CYP) 代謝物は数 pg/mL のレベルで安定して測定できる。我々は一般的に測定されてこなかった血清での測定を試みており、安定した検体処理の方法を検討している。血清は全血を凝固させ血小板や凝固因子を除いたものであるが、血小板の細胞成分や代謝物、血小板由来エイコサノイド類が増加している。凝固させた検体上清であるため、これまで血清でのエイコサノイド測定は不相当とされてきたが、我々は抗血小板薬の薬効評価や血小板機能異常症に関する臨床検査への応用を可能と考え、これらの有益な検査がない現状で、医療現場におけるニーズは極めて高いと考えている。

2. 研究の目的

複数のエイコサノイドの一斉定量を実臨床で測定可能にし、保険収載する価値のある検査とするための基礎データの確立を目指し、抗血小板薬の薬効評価判定、血小板機能評価だけでなく、NETs に関連する感染症、血栓症の病態解明、新たな創薬にもつなげていく。

健康成人を対象として被験者のアスピリン内服前後での血漿・血清を採取し、エイコサノイド高感度一斉定量を行う臨床研究を予定している。また、虚血性心疾患患者で抗血小板薬内服前後の血漿・血清を同様に測定する (審査番号 11121)。150 種以上のエイコサノイド類を同時に測定することで、アスピリンや他の抗血小板薬のエイコサノイド類に及ぼす影響の全体像を解析する。その結果から、抗血小板薬の薬効評価としての有用性を評価していく。

さらに好中球・血小板をそれぞれ分離精製し、それぞれの未刺激、活性化状態でのエイコサノイド産生能や両者を混合させたときの変化を解析し、NETs の系を用いて、in vitro で確認していく。

3. 研究の方法

1. 血漿・血清を用いたエイコサノイド高感度一斉定量法の基礎検討

我々は超高速液体クロマトグラフィー・三連四重極型質量分析計 (LC-MS/MS) を用いてエイコサノイド高感度一斉定量を行い、血清の適切な検体処理の方法を検討する。これまでの研究でトロンビン入りの採血管を用いて、一定の採血量で採血を行い、採血後は 1 時間以内に遠心分離する必要があることが判明した。また、血清エイコサノイドには日内変動をほとんど認めないため、採血のタイミングを選ばないことも判明した。

150 種以上の測定項目の中から血清、血漿にて測定可能なエイコサノイド類を確認している。今後、健康成人 10 例 (男女 5 例ずつ) を対象として同意が得られた被験者のアスピリン内服

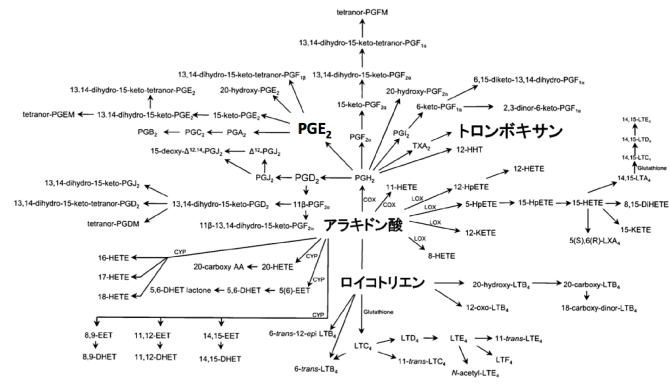


図1. アラキドン酸カスケード

Yamada, M, Kohira, T, Kita, Y, Shimizu, T, Shimadzu Corporation & Department of Lipidomics, The University of Tokyo

前後の血漿・血清を採取する臨床研究を予定しており、エイコサノイド類（AA、EPA、DHAとその代謝物を含む）を一度に測定することで、アスピリンがエイコサノイド類に及ぼす影響の全体像を解析する。

予備的研究として、アスピリン投与症例と非投与症例の患者血清を3例ずつのエイコサノイド測定を行い、トロンボキサン A2 および 12-HHT がアスピリン投与例で低下していることが示されたが、例数が少なく有意差は示せなかった。これは東京大学大学院医学系研究科・医学部倫理委員会の承認のもと、検査後残余血清を使用して行われた。虚血性心疾患患者を対象に、抗血小板薬の内服前後での血漿・血清エイコサノイド測定を行う前向き臨床試験（審査番号 11121）を行うことで、様々な抗血小板薬の薬効評価として、この測定法の有効性を検討する。

2. 好中球・血小板におけるエイコサノイド産生能の解析

健康成人の血液から好中球、血小板をそれぞれ分離精製し、*in vitro* で未刺激の状態、活性化状態（Phorbol 12-myristate 13-acetate, PMA を使用）でのエイコサノイド産生能を評価し、両者を混合させたときの変化を解析し、好中球と血小板のクロストークによって相加的ではなく、相乗的にエイコサノイドが産生されることが判明してきた。様々な Agonist でのクロストークの差を明らかにし、NETs の系でも確認していく。

4. 研究成果

エイコサノイドの測定において血漿での報告は多いが、血清での報告は少なく、血清の適切な採血条件については、検討されていない。そこで我々は血漿および血清の採血条件がエイコサノイド測定に与える影響について検討した。

血漿については一般的に用いられるクエン酸血漿と EDTA 血漿で比較し、採血量、採血後の放置時間、凍結融解、食事の影響について検討した。エイコサノイドは特に血小板の影響を強く受けるため、Ca キレート剤であるクエン酸や EDTA を含む血漿ではエイコサノイド濃度が極めて低く、クエン酸と EDTA とでいずれの評価項目でも有意差を認めなかった。結果として、血漿エイコサノイド測定の場合は、クエン酸でも EDTA でもどちらでも安定して測定可能であることが判明した。

次に血清についてプレーン管、シリカ入、シリカ+トロンビン入の3種類の採血管で比較した。図2で示すように、アラキドン酸由来のトロンボキサン B2 などのエイコサノイドで有意にトロンビン入りの採血管が高値となった。これはトロンビンによる血小板の活性化の結果として高値になっていることが推察される。血清は *in vitro* で血液を凝固させるため、一定量のトロンビンにて十分血小板を活性化させる方法が *in vivo* での血小板活性化能を評価できるため、以降の検討ではシリカ+トロンビン入の採血管を使用して検討を行った。

血清はクエン酸血漿と異なり、採血量が一定ではないため、採血量が与える影響について 4mL と 8mL とで比較した。図3で示すようにエイコサノイドは有意に 4mL で高値となった。採血管に塗布されているトロンビン量は一定であることから、採血量が多くなると血液中のトロンビン濃度が低下するため、結果として採血量が少ないほうがエイコサノイド濃度が高くなる結果を示している。以降の検討では採血量を 4mL で行った。

特に入院患者の場合、採血から遠心、測定まで時間を要することが多いため、実臨床への応用も考慮して採血から遠心までの時間が与える影響について検討した。図4で示されるようにトロンボキサン B2 は放置時間は影響していないが、プロスタグランジン D2 や A2、B2 は2時間放置することが有意に測定値が変化していた。これはプロスタグランジン D2 が分解されて、プロスタグランジン A2 および B2 へと代謝されていることを示している。採血後は、できるだけ速やかに測定が望ましいが、1時間以内であれば結果にはほとんど影響を与えないことが判明した。採血後、速やかに遠心分離し、血清分離したものを -80 で凍結し、6回の凍結融解を行ったが、いずれのエイコサノイド濃度も

図2. 採血管による測定値の差（血清）

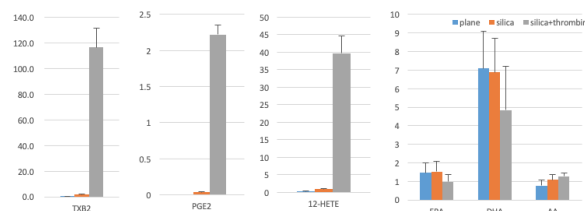


図3. 採血量による測定値の差

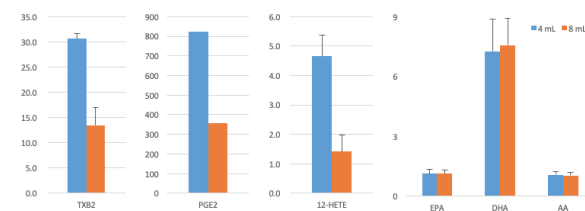
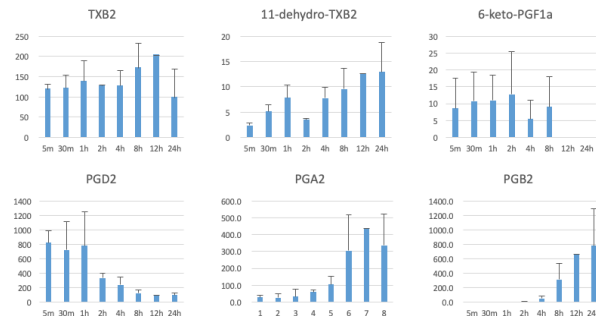


図4. 採血後、遠心までの放置時間

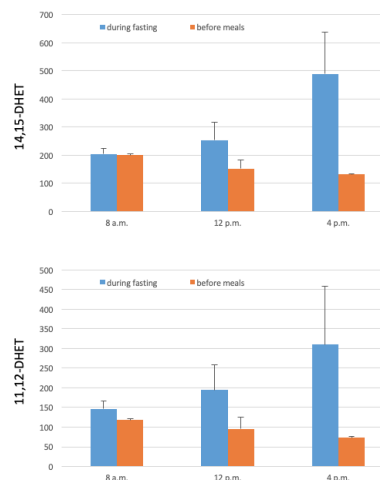


変化はなく、エイコサノイドは凍結融解には耐えられることも判明した。

最後に食事が与える影響について検討した。図5において棒グラフ(青)は絶食のときの朝昼夜の採血結果を示し、棒グラフ(赤)は各食前の採血結果を示す。多くのエイコサノイドは食事の影響や採血時間の影響を受けなかったが、DHETだけが影響を受けた。朝の時点ではほぼ変化はなかったが食事を摂らないと、時間経過で徐々にDHETは増加するが、食事をすることによりDHETは徐々に低下した。DHETは動脈硬化を抑制する作用などが一部報告されており、その減少が関与している可能性はあるが本研究では明確なところは不明である。

以上のことから、血漿については採血や採血後の状態にかかわらず安定して測定が可能であるが、血清は採血管、採血量が強く影響するため、測定時は必ず採血管および採血量を一定にする必要がある。採血時は必ずしも空腹である必要はないが、DHETを評価したい場合は食事の有無や採血時間には注意を払う必要がある。採血後は速やかに遠心分離することが推奨されるが1時間以内であれば影響は少ない。本データは現在、投稿準備中である。

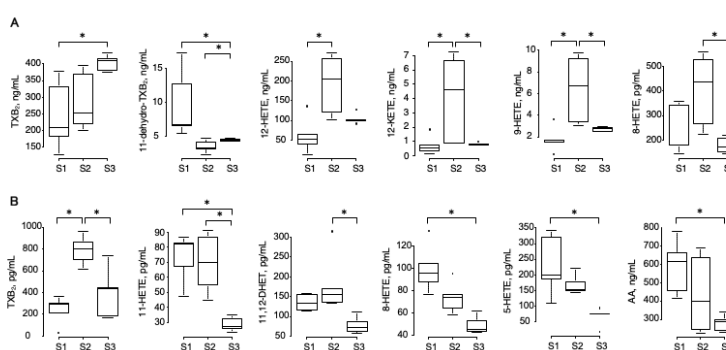
図5. 食事が与える影響



検体処理方法が確定したところで採血及び検体処理を統一して、健常人27名(男性12名、女性15名)より血漿・血清採血を行い、エイコサノイド一斉定量を施行した。176項目を測定し、その中から30種類のエイコサノイドについて着目し、その知見について報告した(Yasumoto A, Chromatogr B, 2017)。エイコサノイド濃度は血小板数の依存しており、血小板数が少ないと、濃度は低値となり、血小板数が多いと、その濃度は高値となる。そのため、免疫性血小板減少症のような血小板数が少ない疾患ではエイコサノイド全体が低値となる一方、本態性血小板血症のような血小板数が高い疾患では高値となる。ただし、今回27名の健常人の血小板数は基準値内に収まっており(18~45万/ μ L)、その基準値範囲内であれば、血小板数の影響は無視できることが判明した。

図6はS1-3の被験者3人の血清エイコサノイド濃度の結果を示しており、これはエイコサノイドの多くの化合物は個体間較差がみられることを示している。個体内較差は影響を与えるほど強くはないが、個体間較差は有意に見られ、結果として、各個人のベースラインの測定値を把握しておくことが必要である。

図6. エイコサノイドの個体間較差と個体内較差



結果としてエイコサノイド一斉定量法は血漿では安定して測定できるが濃度が極めて低いため、健常人では測定感度を越える化合物が多くなかった。血清は、採血方法、検体処理方法の影響を強く受けるが統一することで十分に評価は可能である。ただし、個人差が影響を与えることから1回の結果だけで病態評価することには危険を伴うことから各個人のベースラインからどのように変化するかを評価することが重要である。

虚血性心疾患患者を対象に、抗血小板薬の内服後の血漿・血清エイコサノイド測定を行う前向き臨床試験を施行した。最終的な登録症例は150例になり、それぞれの血漿・血清エイコサノイド濃度を測定した。現在の時点で症例の登録は終了しているが解析が終わっておらず、現在、解析を進めており近日中に発表を行う予定である。

最後に好中球・血小板におけるエイコサノイド産生能の解析であるが、先行研究では好中球と血小板のクロストークによって相加的ではなく、相乗的にエイコサノイドが産生されることを示したが再現性を示すために繰り返し、検討を行った結果、好中球と反応させることで相乗的な効果を再現することができなかった。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計3件)

1. Nitta N, Yasumoto A, Yatomi Y, Goda K. Intelligent Image-Activated Cell Sorting. Cell 175:266-276, 2018. doi: 10.1016/j.cell.2018.08.028. 査読有

2. Yasumoto A, Tokuoka SM, Kita Y, Shimizu T, Yatomi Y. Multiplex quantitative analysis of eicosanoid mediators in human plasma and serum: Possible introduction into clinical testing. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci 1068-1069:98-104, 2017. doi: 10.1016/j.jchromb.2017.10.014. 査読有
3. Jiang Y, Lei C, Yasumoto A, Yatomi Y, Goda K. Label-free detection of aggregated platelets in blood by machine-learning-aided optofluidic time-stretch microscopy. Lab Chip 17:2426-2434, 2017. doi: 10.1039/c7lc00396j. 査読有

〔学会発表〕(計1件)

1. Atsushi Yasumoto, Multiplex quantitative analysis of eicosanoids in human plasma, serum, and platelets: its possible introduction into clinical testing, International Society for Laboratory Hematology (ISLH), 2017.

〔その他〕

ホームページ等

東京大学医学部附属病院検査部ホームページ

東京大学大学院医学系研究科 内科学専攻病態診断医学講座臨床病態検査医学分野

<http://lab-tky.umin.jp/>

6 . 研究組織

(2)研究協力者

研究協力者氏名：清水 孝雄

ローマ字氏名：SHIMIZU Takao

研究協力者氏名：徳岡 涼美

ローマ字氏名：TOKUOKA Suzumi

研究協力者氏名：北 芳博

ローマ字氏名：KITA Yoshihiro

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。