

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 25 日現在

機関番号：13601

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590665

研究課題名(和文) 間質性肺炎疾患におけるリン脂質代謝異常の解析と質量分析による検査法の開発

研究課題名(英文) Analysis of phospholipid metabolism in interstitial pneumonia and development of a laboratory assay using mass spectrometry

研究代表者

日高 宏哉 (HIDAKA, Hiroya)

信州大学・医学部・准教授

研究者番号：10362138

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：気管支肺胞洗浄液(BALF)は、間質性肺炎疾患群の診断や病態把握に用いられるが、BALF中脂質組成と病態との関係は明らかでない。マトリックス支援イオン化飛行時間型質量分析法、ガスクロマトクマトグラフィ質量分析を用いて、脂質分子種、脂肪酸組成、脂質代謝酵素活性の測定法を構築した。測定法は、微量試料での迅速測定であり、良好な測定精度を示した。質量スペクトルによるBALF中リン脂質プロファイルを作成し、血清リン脂質プロファイルと合わせて解析することで、BALF中のリン脂質分子種組成の変動を検出できた。これらは、肺サーファクタンTや肺胞細胞のリン脂質代謝異常を捉える指標となると考えられた。

研究成果の概要(英文)：Bronchoalveolar lavage fluid (BALF) is used for diagnosis and determining clinical condition in interstitial pneumonia, but the relations between BALF lipid composition and clinical condition are unclear. We developed an assay for determining lipid species, fatty acid composition, and lipid metabolic enzyme activity using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry and gas chromatography mass spectrometry. The methods were rapid, simple, and accurate with very small samples. The BALF phospholipid profile was determined by mass spectrometry. We could detect changes in metabolism of phospholipid species in BALF by comparing the phospholipid profile of the serum with BALF. The results may be useful as an index to determine phospholipid metabolic disorders in pulmonary surfactant and alveolar cells.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：境界医学・病態検査学

キーワード：臨床化学 脂質 質量分析

1. 研究開始当初の背景

間質性肺疾患群は、主に肺胞や細気管支の間質に病変が認められ、種々の原因により発症する疾患である。

肺サーファクタントは、肺胞二型上皮細胞で合成され、肺胞腔に分泌され、肺胞の全体を覆う脂質-蛋白複合体で、その表面活性作用により呼吸機能の維持に働いている。肺サーファクタントの主成分はリン脂質であり、肺胞腔の液相に存在する肺胞マクロファージは、サイトカイン産生・分泌、免疫調節、リン脂質分解酵素の分泌など肺のホメオスタシスの維持に働いている。

肺サーファクタントや肺マクロファージ活性の分析には気管支肺胞洗浄液(BALF)が用いられ、現在までに、(1) 急性呼吸不全患者 BALF 中サーファクタントの成分変化が認められる、(2) 肺癌 BALF のサーファクタント組成の変化がマクロファージ細胞障害活性に影響する、(3) 肺胞蛋白症では、肺胞内に過剰のリン脂質が貯留する、など BALF のリン脂質組成の分析などが報告されている。

しかしながら、いずれも動物実験やリン脂質(PC, PE など)の同定や相対的な変化比率などの分析にとどまっており、ヒト患者材料からのリン脂質代謝産物やそれに関与するリン脂質代謝酵素活性の検討は十分にされていない。また、間質性肺疾患の病態と脂質動態も十分に明らかでなく、脂質分析の臨床検査への応用例はほとんどない。

2. 研究の目的

今回、マトリックス支援イオン化飛行時間型質量分析計(MALDI-TOF MS)、ガスクロマトグラフィ質量分析計(GC MS)を用いて、各種の脂肪酸側鎖で構成されるリン脂質分子種、およびリン脂質代謝産物の定量的分析法とリン脂質代謝酵素活性の分析法を構築し、脂質代謝の検査法を構築する。

次いで、質量分析を用いて BALF 中の脂質組成およびリン脂質分子種を分析し、リン脂

質プロファイルを作成する。

さらに、肺胞でのリン脂質代謝異常や、血清中への BALF 成分(リン脂質分解物質など)の漏出を見だし、呼吸器疾患における肺サーファクタントや肺マクロファージの動態を検出できる指標の検査法の構築を目指す。これらの方法は、間質性肺疾患群だけでなく、他の疾患におけるリン脂質代謝異常を検索する臨床検査ツールとなる事が期待できる。

3. 研究の方法

(1) 検体材料は、ヒト血清(日常検査終了後の廃棄予定血清、健常人ボランティア血清)および呼吸器疾患検査に提出された BALF(日常検査終了後の廃棄予定試料)を用いた。いずれの臨床検体も信州大学医学部の倫理委員会の承認を得て使用した。

(2) MALDI-TOF MS 内部標準法により、生体中のリン脂質、リン脂質代謝産物、トリグリセライド、コレステロールエステルの脂肪酸側鎖の違いによる分子種を定量的に分析した。

(3) MALDI-TOF MS により、リン脂質代謝酵素活性の分析法を構築した。

(4) GC MS 内部標準法により、脂肪酸組成の微量試料での迅速法を構築した。さらに、薄層クロマトグラフィ(TLC)と組み合わせて、脂質分子別の脂肪酸組成を分析した。

(5) MALDI-TOF MS により、BALF 中のリン脂質およびリン脂質代謝産物の組成分析法の検討を行った。

(6) 各種呼吸器疾患患者の BALF 中のリン脂質分子種プロファイルを作成し、病態による比較を行った。次いで血清中のリン脂質プロファイルとの比較を行い、サーファクタントやマクロファージの影響を検討した。

4. 研究成果

(1) MALDI-TOF MS は、異なる分子骨格の分子間では、イオン化エネルギーの強度により分子のイオン化が異なり、定量的な分析は出

来なかった。しかし、内部標準法により、リン脂質、リン脂質代謝産物、トリグリセライド、コレステロールを定量的に測定ができた。

リン脂質およびリン脂質代謝産物は、奇数脂肪酸(C17:0)や短鎖脂肪酸(C8:0)などのPCやSMの内部標準物質により、それぞれ同一骨格分子において変動係数(CV) 2-10%の精度で定量が可能であった。トリグリセライドは、ひまし油から精製したトリリシノレイン酸グリセロールを用い、コレステロールエステルはコレスタン-3-オンを用いて、それぞれ CV 3-11%の精度で定量が可能であった。また、これらの測定系において、濃度とピークイオン強度との直線性も良好であった。

GC MS を用いた脂肪酸組成の分析は、脂質を有機溶媒で抽出後、メタノール性塩酸を添加し電子レンジでトランスメチル化することで、短時間での測定が可能となった。主要脂肪酸での CV 6%以下、微量な多価不飽和脂肪酸(PUFA)は CV 6-11%程度で測定できた。また、いずれの脂肪酸も直線性は良好であり、血清で数 μ L 程度まで分析できた。さらに、TLC により脂質を分画後、各脂質の脂肪酸組成の分析も同様な結果を得た。

(2) MALDI-TOF MS を用いた内部標準法により、リン脂質やリン脂質代謝産物を定量的測定できたことから、ホスホリパーゼ A₂ (PLA₂) の酵素活性測定法を構築することができた。

基礎検討として、市販の脂肪酸の異なる PC およびリゾ PC を用いて検討した結果、濃度再現性で CV 約 7%、LPC/PC 比 (ピーク比と濃度比) の相関係数 $r=0.9948$ 、酵素測定法との相関係数 $r=0.9085$ 、と良好であった。

PLA₂ 処理によるヒトリボ蛋白(HDL)中の PC、LPC 濃度変化のタイムコースを検討した。超遠心分離により得た HDL 分画を脱塩精製し、これに PLA₂(蛇毒 *Crotalus adamanteus* 由来) を作用させたところ、血清主要 PC 濃度はそれぞれ時間経過により低下しており、一方

LPC 濃度は増加し、一定時間でほぼ平衡に達した。基質濃度の変化においても直線性を示し、MALDI-TOF MS による酵素活性測定が可能であった。

(3) 間質肺疾患群の診断や病態把握に用いられる BALF 中の細胞成分の約 90%はマクロファージであり、可溶成分には主に肺サーファクタント由来の脂質が含まれる。BALF の脂質組成を MALDI-TOF MS のポジティブイオンモードで測定した。

肺サーファクタントでは、主要な成分としてリン脂質(PC、SM)が検出され、さらにコレステロールが検出された。トリグリセライドは痕跡程度であった。

肺サーファクタントの構成主要成分であるジパルミトイルホスファチジルコリン(DPPC)などを、BALF に特徴的なリン脂質分子種組成として同定した。

BALF 中の PC 分子種の質量スペクトルより、脂肪酸側鎖にパルミチン酸(C16:0)とミリスチン酸(C14)から構成される DPPC (C16:0/16:0)と PC(C16:0/14:0)が検出された。さらに、PC(C16:0/18:0-3)、PC(C18:0/18:0-3)、PC(16:0 or C18:0/20:4)などの 12 種類の PC が検出された。また、リゾ PC(LPC)(C14:0~C20:4)が 7 種類、SM(C16:0)が検出された。これらの分子種は、MS/MS 分析で同定され、また GC MS により脂肪酸組成を確認した。これらの結果から、BALF のリン脂質ピークの組成比率からリン脂質プロファイルを作成した。

末梢血中の血小板および単核球の調製とマクロファージの分化などの手技を確認し、これらの細胞膜におけるリン脂質組成を分析した。これらの結果は、今後のリン脂質プロファイルの分析の際のリン脂質分子種の由来の検討に用いることができると考えられた。

(4) BALF および対照として血清中のホスファチジルコリン(PC)およびリゾ PC 分子種を MALDI-TOF MS により分析した。

血清では、BALF に特徴的な PC である PC(C16:0/14:0)と PC(C16:0/16:0)は検出感度以下であり、BALF では、PC(C16:0/18:1)、PC(C16:0/18:2)などのパルミチン酸を含む PC 分子種が血清中の組成比率より高値に検出された。

BALF の LPC 組成において、主要ピークは LPC(C16:0)であり、次いで LPC(C18:0)、LPC(C18:1)など、血清中 LPC と同様の組成であった。しかし、PC に対する LPC の比では、血清中の組成比に比べると、BALF では LPC(C14:0)、LPC(C16:0)、LPC(C18:2)などで低値であった。

BALF中のリン脂質分子種プロファイルは、BALFに特徴的なDPPCだけでなく、他の成分においても血清成分と異なり、BALF特有のパターンを示すことが見いだされた。

(5)以上の結果から、MALDI-TOF MS、GC MSを用いて、脂質分子種、脂肪酸組成、脂質代謝酵素活性測定法を構築した。全ての測定系は、微量試料で迅速的測定が可能であり、良好な測定精度を示した。質量スペクトルより、BALF中リン脂質プロファイルを作成した。BALと血清のリン脂質プロファイルを比較して解析することで、BALF中のリン脂質分子種組成の変動を検出できた。これらは、肺サーファクタントや肺胞細胞のリン脂質代謝異常を捉える指標となると考えられた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計13件)

1. Murata K, Fujimoto K, Kitaguchi Y, Horiuchi T, Kubo K, Honda T, Hydrogen peroxide content and pH of expired breath condensate from patients with asthma and COPD, COPD, 11(1);81-87, 2014, 査読有.

2. Kitaguchi Y, Fujimoto K, Hayashi R, Hanaoka M, Honda T, Kubo K, Annual changes in pulmonary function in combined pulmonary fibrosis and emphysema: over a 5-year follow-up. Respir Med, 107(12); 1986-1992, 2013, 査読有.

3. Uehara T, Masumoto J, Yoshizawa A, Kobayashi Y, Hamano H, Kawa S, Oki K, Oikawa N, Honda T, Ota H, IgG4-related disease-like fibrosis as an indicator of IgG4-related lymphadenopathy. Ann Diagn Pathol, 17(5);416-420, 2013, 査読有.

4. Kitaguchi Y, Fujimoto K, Komatsu Y, Hanaoka M, Honda T, Kubo K, Additive efficacy of short-acting bronchodilators on dynamic hyperinflation and exercise tolerance in stable COPD patients treated with long-acting bronchodilators, Respir Med, 107(3); 394-400, 2013, 査読有.

5. Tomita T, Hata T, Takeuchi T, Oguchi Y, Okada A, Aizawa K, Koshikawa M, Otagiri K, Motoki H, Kasai H, Izawa A, Koyama J, Hongo M, Ikeda U, High concentrations of omega-3 fatty acids are associated with the development of atrial fibrillation in the Japanese population, Heart Vessels, 28(4); 497-504, 2013, 査読有.

6. Hongo M, Hidaka H, Sakaguchi S, 他 10 名. Serum high-density lipoprotein cholesterol level and lifestyle habits among Japanese junior high school students, Shinshu Medical Journal. 61(4);205-215, 2013, 査読有.

7. Hidaka H, Takiwaki M, Yamashita M, Kawasaki K, Sugano M, Honda T, Consumption of Nonfat Milk Results in a Less Atherogenic Lipoprotein Profile: A Pilot Study, Ann Nutr Metab, 61(2), 111-116, 2012, 査読有.

8. Hidaka H, Takiwaki M, Yamashita M, Otsuki S, Kawasaki K, Sugano M, Honda T, Mild acid hydrolysis of sphingolipids yields lysosphingolipids: a matrix-assisted laser desorption and ionization time-of-flight mass spectrometry study, *J Anal Bio-Sci*, 35(3), 241-248, 2012, 査読有.
 9. 日高 宏哉, 血清リン脂質の質量分析とその臨床, *検査と技術*, 40;74-76, 2012, 査読無.
 10. 日高 宏哉, 質量分析を用いた脂質分析, *臨床化学*, 41;336-342, 2012, 査読無.
 11. 日高 宏哉, 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計による脂質の分析, *細胞*, 44(12);314-317, 2012, 査読無.
 12. Tsushima K, Yokoyama T, Kawa S, Hamano H, Tanabe T, Koizumi T, Honda T, Kawakami S, Kubo K, Elevated IgG4 levels in patients demonstrating sarcoidosis-like radiologic findings, *Medicine (Baltimore)*. 2011 May;90(3):194-200, doi: 10.1097/MD.0b013e31821ce0c8, 査読有.
 13. 日高 宏哉, MALDI-TOF MS と酵素法による血清リン脂質の分析, *臨床化学*, 40; 453-461, 2011, 査読無.
- [学会発表](計19件)
1. 日高 宏哉, 本田 孝行, 質量分析を用いた血清脂質の臨床検査(シンポジウム”質量分析を用いた最新検査法と検査診断への応用”)第60回日本臨床検査医学会, 2013年11月2日, 神戸.(招待講演)
 2. 北川 直也, 木戸口 周平, 川崎 健治, 菅野 光俊, 本田 孝行, 日高 宏哉, 血清スフィンゴミエリン(C16:0)の質量分析による定量. 第60回日本臨床検査医学会, 2013年11月2日, 神戸.
 3. 西島 史恵, 日高 恵以子, 中村 友彦, 本田 孝行, 日高 宏哉, 新生児・小児のガスクロマトグラフィ質量分析による血清中脂肪酸定量分析法の検討, 第60回日本臨床検査医学会, 2013年11月2日, 神戸.
 4. 堀 敦詞, 北川 直也, 本田 孝行, 日高 宏哉, MALDI-TOF 質量分析によるヒト血清中のスフィンゴ脂質の分析, 第60回日本臨床検査医学会, 2013年11月2日, 神戸.
 5. 木戸口 周平, 北川 直也, 川崎 健治, 菅野 光俊, 本田 孝行, 日高 宏哉. 気管支肺胞洗浄液中リン脂質の MALDI-TOF 質量分析. 第60回日本臨床検査医学会, 2013年11月2日, 神戸.
 6. Hongo M, Hidaka H, Sakaguchi S, Nakanishi K, et al., Serum high-density lipoprotein cholesterol level and lifestyle habits among Japanese junior high school students. European Society of Cardiology Congress 2013, Amsterdam, September 1, 2013, The Netherlands.
 7. 西島 史恵, 日高 恵以子, 中村 友彦, 本田 孝行, 日高 宏哉. 新生児・小児のガスクロマトグラフィ質量分析による血清中脂肪酸分析. 第53回日本臨床化学会, 2013年8月31日, 徳島.
 8. 堀 敦詞, 北川 直也, 本田 孝行, 日高 宏哉, ヒト血清中のスフィンゴミエリン分子種の質量分析. 第53回日本臨床化学会, 2013年8月31日, 徳島.
 9. 木戸口 周平, 北川 直也, 川崎 健治, 菅野 光俊, 本田 孝行, 日高 宏哉, 気管支肺胞洗浄液中脂質の質量分析, 第53回日本臨床化学会, 2013年8月31日, 徳島.
 10. 北川 直也, 木戸口 周平, 川崎 健治, 菅野 光俊, 本田 孝行, 日高 宏哉, リポ蛋白リパーゼ処理によるリポ蛋白中脂質の質量分析. 第53回日本臨床化学会, 2013, 8月30日, 徳島.
 11. 大槻 晋也, 北川 直也, 日高 恵以子, 本田 孝行, 日高 宏哉, 銅イオンによる LDL 変性に及ぼす含流アミノ酸の影響, 第58回

- 日本臨床検査医学会、2012年12月1日、京都。
12. 北川 直也、大槻 晋也、川崎 健治、菅野 光俊、本田 孝行、日高 宏哉：質量分析計によるトリグリセライドリッチリポ蛋白中脂質の分析、第58回日本臨床検査医学会、2012年12月1日、京都。
13. 藤巻 とも子、大槻 晋也、北川 直也、日高 恵以子、本田 孝行、日高 宏哉、ガスクロマトグラフィ質量分析による脂肪酸の分析、第58回日本臨床検査医学会、2012年12月1日、京都。
14. 堀 敦詞、大槻 晋也、北川 直也、日高 宏哉、質量分析法による眼窩脂肪組織の脂質分析、第58回日本臨床検査医学会、2012年12月1日、京都。
15. Hongo M, Hidaka H, Sakaguchi S, Izawa A, Ikeda U: Serum low high-density lipoprotein cholesterol is strongly associated with cardiometabolic risk factors among male Japanese junior high school students. 第76回日本循環器学会総会シンポジウム12、2012年3月16日、福岡。
16. 日高 宏哉、山下 峰、大槻 晋也、川崎 健治、菅野 光俊、本田 孝行、気管支肺胞洗浄液の質量分析、第58回日本臨床検査医学会、2011年11月18日、岡山。
17. 山下 峰、大槻 晋也、川崎 健治、菅野 光俊、本田 孝行、日高 宏哉、質量分析計による脂肪酸側鎖の異なるリン脂質の定量分析第58回日本臨床検査医学会、2011年11月18日、岡山。
18. 山下 峰、日高 宏哉、MALDI-TOF MS 内部標準法による血清リゾホスファチジルコリンの分析、第51回日本臨床化学会、2011年8月27日、札幌。
19. 大槻 晋也、毛利 正直、山下 峰、日高 宏哉、血清中含硫アミノ酸分画濃度の関連性について、第51回日本臨床化学会、2011年8月27日、札幌。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

日高 宏哉 (HIDAKA, Hiroya)
信州大学・医学部・准教授
研究者番号：10362138

(2) 研究分担者

本田 孝行 (HONDA, Takayuki)
信州大学・医学部・教授
研究者番号：80238815

本郷 実 (HONGO, Minoru)
信州大学・医学部・教授
研究者番号：40209317