

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 7 日現在

機関番号：34417

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460662

研究課題名(和文) 質量分析イムノアッセイを用いた内因性ジギタリス産生分泌機序と高血圧発症機序の解明

研究課題名(英文) Mechanism of production, secretion and hypertension in the endogenous digitalis like factors using mass spectrometry immunoassay

研究代表者

吉賀 正亨 (YOSHIKA, Masamichi)

関西医科大学・医学部・講師

研究者番号：70434834

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：各種の内因性ジギタリス(EDEF)がヒトに存在することを報告しているが、いずれもステロイド骨格を有する低分子物質であり解析手法が乏しい。質量分析イムノアッセイ(MISA)は少ない試料量で高感度な定性や定量解析が可能である。

現有の抗マリノブファゲニン(MBG)抗体用い、我々が確立したenzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)の前処置に使用している簡易カラムと比べ、MISAチップに現有する抗体を吸着させておきチップ内で抗原抗体反応を起こし試料を加えることで、目的の物質のみ抽出可能かの検討を行ったがチューブ内で十分な抗原抗体反応を起こすにいたらなかった。

研究成果の概要(英文)：This research is a part of patho-physiological study of endogenous digitalis-like factors (EDLFs). We have marinobufagin, telocinobufagin, and their related compounds, maronobufotoxin and telocinobufotoxin. Moreover, we reported they are existed in human plasma. EDLFs have low monocular compounds with steroid ring. Therefore their analytic methods have only some techniques. Recently MISA, which has been interested by same field's researchers, can be a technique for high sensitive qualitative as well as quantitative analysis in lesser sample volume. We tried MISA was used more easily and high specific pretreatment of our ELISA instead of C18 seppak columns. Our each antibodies was absorbed in MISA tubes, and then samples was added in MISA tube. In this tube, we tried to extract only target substances. Unfortunately, the adequate antigen antibody reaction in was not achieved in this study.

研究分野：医歯薬

キーワード：内因性ジギタリス 質量分析イムノアッセイ 高血圧 生理活性物質 質量分析

1. 研究開始当初の背景

我々はヒトに TCT が存在することを HPLC と LC/MS を用いて世界で初めて発見し報告し非常に注目を集めている。(吉賀正亨ら、培養副腎細胞から分泌される新規内因性ジギタリス様物質の発見、2005 年臨床検査医学会総会、福岡)。
しかし、EDLF の定性解析において、血液中には類似化合物が多く存在するためまず簡易カラムを用い夾雑物を取り除く。また TCT の血中濃度が少ないため 20ml の試料を減圧乾固して濃縮した試料を HPLC で 1 分毎の分画に分け、標品の TCT の溶出位置の分画を LC/MS に用いる煩雑な方法が必要であった。さらに定量解析も HPLC と ELISA を組み合わせる必要があった。近年開発注目された質量分析イムノアッセイ (MISA) は、MISA チップに抗体を吸着させて試料を加えることで、チューブ内で抗原抗体反応を起こし目的物質のみをチップに留め、目的物質のみ取り出し LC/MS の試料に用いることが可能になった。本方法を用いると多検体を自動的に処理できるようになる。従来の我々の方法では非常に多量の試料と手間を要したが、MISA を用いると、少量の検体で同時に多検体を短時間に自動的に処理し LC/MS に用いることができる。さらに LC/MS/MS を用いて selected reaction monitoring (SRM) 法を用いるとフラグメントパターンが確定している物質は定量的解析を行うこともでき、高感度で定量・定性両解析が可能になりさらに EDLF の研究が飛躍的に進むと考えられる。

2. 研究の目的

- MISA が EDLF の研究に応用出来るかの検討を行う。まず現有の抗 MBT 抗体を用い MISA 系を構築し、現在使用している測定系との比較を行い高血圧患者の血液や Y-1 細胞上清を用いて EDLF 産生組織、分泌機構の解明を行う。
- LC/MS/MS を用いて SRM 法を用い定量的解析を行う。

3. 研究の方法

現有の抗 MBG 抗体を使い MISA を構築し、従来の ELISA との測定感度の比較を行う。さらに LC/MS/MS で SRM 法を用い MBT、MBG の定量的解析をおこない、十分な感度が得られたならば、従来困難であった多検体の測定が可能となるため高血圧患者の血液中の MBT を測定し、病態生理への関与を検討する。

次に標品の TCT を用いて定法に従い抗 TCT 抗体を作成し TCT 測定の ELISA 系を構築する。EDLF の分泌組織と考えられている副腎皮質のモデル細胞である Y-1 細胞上清を経時的に測定し、TCT の分泌を検討し、アンジオテンシンやその阻害剤を添加して RAAS が調節因子になっているかを検討する。さらに MBT と同様に作成した抗 TCT 抗体を用い MISA を行い高感度な TCT の定性解析を行う。さらに

LC/MS/MS で SRM 法を用いて TCT、TCB の MBT、MBG の網羅的な定量解析をおこなう。

4. 研究成果

今回、すでに確立されている MBG、MBT の ELISA への前処置の検討として MISA を用いたが、目的の物質のみ抽出可能かの検討を行った。今回の検討では、チューブ内で十分な抗原抗体反応を起こすにいたらず、MBG または MBT を特異的に抽出することができなかった。

その原因として、血液中の MBG、MBT はその存在量が少ないため従来の前処置である濃縮作業が必要ある可能性がある。別の原因として MISA チップへの抗 MBG 抗体の吸着率の悪さが考えられた。チップの種類や、抗体濃度の調節を行ったが、十分な成果は得られなかった。

また両生類から抽出した TCT を原料に抗 TCT 抗体の作成を行ったが、MBT、TCB と構造式が非常に類似しているため、特異性の高い抗体産生にはいたらず、ELISA 系の構築ができなかった。

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 12 件)

1. 吉賀正亨, 中野麗香. 【血液、尿検査はどれくらいの頻度で何を診るべきか】 CKD 患者 medicina 53:1738-1740. 2016(総説のため査読なし)
2. 吉賀正亨, 中野麗香, 中尾光孝, 深町圭子, 中村文彦 R-CPC 症例 1: 妊娠 28 週から黄疸を来した 27 歳女性 臨床病理 64: 1091-1098 (総説のため査読なし)
3. 中村文彦, 吉賀正亨 (番目, 他 2 名). 著名な高 LD 血症を伴った溶血性貧血症例 臨床病理 64:1099-1106. 2016.(総説のため査読なし)
4. 吉賀正亨, 小宮山豊, 河崎裕英, 高橋伯夫. 2 度の非典型溶血性尿毒症症候群の発症を認めた一症例. 日本検査血液学会雑誌 17: 196-201. 2016.(査読あり)
5. 吉賀正亨, 小宮山豊, 吉田美香, 内藤澄悦, 家子正裕, 蔦幸治. フォスファチジルセリン依存性抗プロトロンビン抗体を認めたループスアンチコアグulant・低プロトロンビン血症症候群の 1 例. 臨床病理 64: 631-635. 2016(査読あり)
6. 小宮山豊, 吉賀正亨 【深く知ろう! 血栓止血検査】止血異常のスクリーニング検査としての PT, APTT 臨床検査 60: 130-135. 2016 (総説のため査読なし)
7. Takahashi H, Yoshika M, Yokoi T. Validation of two automatic devices:

- Omron HEM-7252G-HP and Omron HEM-7251G for self-measurement of blood pressure according to the European Society of Hypertension International Protocol revision 2010. Blood Press Monit. 20: 286-90. 2015 (査読あり)
8. Takahashi H, Yoshika M, Yokoi T. Validation of two automatic devices for the self-measurement of blood pressure according to the ANSI/AAMI/ISO81060-2:2009 guidelines: the Omron BP765 (HEM-7311-ZSA) and the Omron BP760N (HEM-7320-Z). Vasc Health Risk Manag. 9: 49-53. 2015 (査読あり)
 9. Takahashi H, Yoshika M, Yokoi T. Validation of three automatic devices for the self-measurement of blood pressure according to the European Society of Hypertension International Protocol revision 2010: the Omron HEM-7130, HEM-7320F, and HEM-7500F. Blood Press Monit. 20: 92-7. 2015 (査読有)
 10. 松尾武文, 金子誠, 吉賀正亨, 小宮山豊 全自動分析装置を用いるラテックス凝集法による血小板第4因子(PF4)/ヘパリン複合体抗体(HIT 抗体)の測定における問題点. 日本血栓止血学会誌 26: 641-646. 2015 (査読あり)
 11. 吉賀正亨 (番目,他 10 名), 高橋 伯夫 ラテックス凝集法と EIA 法で血小板第 4 因子-ヘパリン複合体抗体の測定結果に乖離を生じたヘパリン起因性血小板減少症の 1 例 (査読あり)
 12. 小宮山豊, 吉賀正亨 今月の特集 1 検査室間連携が高める臨床検査の付加価値 臨床検査の付加価値 止血検査室からの情報発信 臨床検査 58:460-464 . 2014 (査読あり)
- [学会発表](計7件)
1. 吉賀正亨, 高橋伯夫 活性型レニン濃度、アルドステロン濃度の迅速・高感度測定が拓く新たな高血圧臨床における役割 第 39 回日本高血圧学会総会 2016年9月30日~10月2日 仙台国際会議場(宮城県仙台市)
 2. 吉賀正亨, 鈴木 玲子, 角坂 芳彦, 薦幸治 新規レニン、アルドステロン測定キットの検討 第 63 回臨床検査医学会総会 2016年9月1日~9月4日 神戸国際会議場(兵庫県神戸市)
 3. 吉賀正亨, 小宮山豊, 乾恵美, 薦幸治 自験例を中心としたヘパリン起因性血小板減少症の各種検査の乖離に関する考察 第 17 回日本検査血液学会学術集会 2016年8月6日~8月7日 福岡国際会議場(福岡県福岡市)
 4. 吉賀正亨, 小宮山 豊, 高橋 伯夫, 薦 幸治 内因性ジギタリス様物質マリノプフォトキシンの分泌機構の検討 第 62 回臨床検査医学会総会 2015年11月19日~11月22日 長良川国際会議場(岐阜県岐阜市)
 5. 鈴木 健史, 吉賀正亨, 小宮山 豊, 澁谷 さやか, 寺内 里恵, 平井 雅美, 前田 茂一, 高橋 伯夫 採血不良検体モデルによる凝固線溶マーカーの変動(第2報) 第 16 回日本検査血液学会学術集会 2015年7月11日~12日 名古屋国際会議場(愛知県名古屋市)
 6. 吉賀正亨, 上野浩輝, 小宮山 豊, 澁谷 さやか, 寺内里恵, 平井雅美, 鈴木健史, 前田茂一, 高橋伯夫 第 VIII 因子を介する希釈組織因子プロトロンビン時間を用いた採血不良検体モデルと血漿 FDP 第 61 回臨床検査医学会総会 2014年11月22日~25日 福岡国際会議場(福岡県福岡市)
 7. 吉賀正亨, 小宮山豊, 宮田茂樹, 前田琢磨, 正木浩哉, 高橋伯夫 HIT 抗体価

遷延症例の心臓外科手術に伴う抗体検査法について 第 36 回血栓止血学会
総会 2014 年 5 月 29 日～31 日 大
阪国際交流センター（大阪府大阪市）

〔図書〕(計 1 件)

1. Bunkodo Essential
& Advanced Mook 第 17 巻 『ス
クリーニング検査に異常をみたら?』
17.K 低値

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

[http://research.kmu.ac.jp/kmuhp/KgApp?k
yoInId=ygdgbe](http://research.kmu.ac.jp/kmuhp/KgApp?k
yoInId=ygdgbe)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉賀正亨 (Masamichi Yoshika)

関西医科大学・医学部・講師

研究者番号：70434834

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()