

平成21年 5月19日現在

研究種目：若手研究 (B)  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19790757  
 研究課題名 (和文) 新生児慢性肺疾患の発症における新規好中球遊走因子に関する研究  
 研究課題名 (英文) A study regarding a novel chemotactic tripeptide for neutrophils in newborns with chronic lung disease  
 研究代表者  
 森岡 一郎 (MORIOKA ICHIRO)  
 神戸大学・医学部附属病院・助教  
 研究者番号：80437467

研究成果の概要：近年、未熟児を含め種々の新生児疾患の急性期に好中球性炎症の関与が注目されている。そこで、N-acetyl Proline-Glycine-Proline (acPGP) という3つのアミノ酸より構成される蛋白質が新たな好中球遊走因子であることに着目し研究を開始した。2007年度は神戸薬科大学と共同で、液体クロマトグラフィータンデムマス質量分析装置 (Liquid chromatography coupled tandem mass spectrometry: LC-MS/MS) を用いた acPGP の測定系の確立に成功した。2008年度は成人や新生児・未熟児の血清から世界で初めて acPGP の同定に成功し、論文や学会にて報告した。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,000,000	0	2,000,000
2008年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
総計	3,200,000	360,000	3,560,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学、胎児・新生児医学

キーワード：新生児・未熟児、好中球性炎症、血清、慢性肺疾患、N-acetyl Proline-Glycine-Proline (acPGP)、液体クロマトグラフィータンデムマス質量分析装置 (LC-MS/MS)

## 1. 研究開始当初の背景

最近、*in vitro* および *in vivo* の基礎研究において、3つのアミノ酸より構成される N-acetyl Proline-Glycine-Proline (acPGP) が、好中球遊走因子であることが明らかにされた。この acPGP が成人の慢性閉塞性肺疾患患者の気管洗浄液で増加することが報告され、ヒトの好中球性炎症性疾患への関与が示

唆される。特に新生児領域では死亡率の高い肺炎や敗血症、未熟児の慢性肺疾患の診断・治療に対して、この acPGP 測定の有用性が期待される。しかし、現在までに気管洗浄液以外のヒトの生体試料中に acPGP の存在を証明した報告はない。

## 2. 研究の目的

(1) 液体クロマトグラフィータンデムマス質量分析 (LC-MS/MS) を用い安定した acPGP の測定系を確立すること。

(2) 気管肺胞洗浄液以外のヒトの生体試料である血清から acPGP の存在を証明することで、ヒト好中球性炎症性疾患の病態解明につながる基礎データを構築すること。

## 3. 研究の方法

### (1) 対象

健常成人 22 人および神戸大学医学部附属病院周産母子センターに入院した未熟児・新生児 26 人 (在胎 23~40 週、出生体重 438g~4,076g) を対象とした。健常成人から 22 検体、新生児から 72 検体の血清サンプルを分析した。

### (2) 試料溶液の調製

血清 100  $\mu$ l に、内部標準として acPGG を添加後、OasisMAX カラム (30mg) を用いてペプチド画分を精製し、LC-MS/MS の試料とした。

### (3) 液体クロマトグラフィーの設定条件

液体クロマトグラフィーとして Shimadzu 10Avp システムを用い、カラムは Cosmosil 5C8-MS (4.6i.d.  $\times$  50mm)、移動相は 0.2%formicacid-acetonitrile 系、速度は 0.2ml/min とした。質量分析には applied Biosystems API 3000 MS/MS 装置を用い、正イオンモード、Multiple reaction monitoring (MRM) 法で測定した。

### (4) 分析の実際

内部標準物質として acPGG 20 pg を加えた 1、5、10、25、50、100 pg/ml の acPGP 濃度の溶液で検量線を作成した。検量線は、acPGP 濃度から得られたピーク面積を内部標準物質のピーク面積で補正し、acPGP 濃度の順にプロットすることにより得た。signal/noise 比が 3 のときの acPGP 濃度を検出限界とした。

定量精度は、成熟児、未熟児、成人のサンプルの同一検体を同じ日に 6 回分析する Intra-day assay と同一検体を異なる 6 日で分析する Inter-day assay を用い、それぞれ分析された 6 回の平均濃度と変動係数 (CV) を計算し、評価した。回収率は、acPGP10 pg/ml

と 50 pg/ml の 2 つの濃度の標準溶液を作成し、各々 6 回 LC-MS/MS で分析して下記の計算式から算出した。回収率 (%) = (LC-MS/MS 分析で得られた濃度 / 標準溶液の濃度)  $\times$  100

### (5) 統計学的分析

血清中の acPGP 濃度は、平均土標準偏差で表した。acPGP 濃度の比較のための統計学的分析には、マン・ホイットニー検定を用いた。p 値 < 0.05 で有意差ありとした。

## 4. 研究成果

### (1) 血清中の acPGP の存在の証明

MRM クロマトグラムにおいて、血清サンプルで、合成 acPGP と同様の保持時間である約 10 分のところに、単一のピークを認めた。それゆえ、血清中に acPGP が存在することを証明した。内部標準の acPGG は、約 8 分のところに acPGP とは異なるピークを検出した (図 1)。

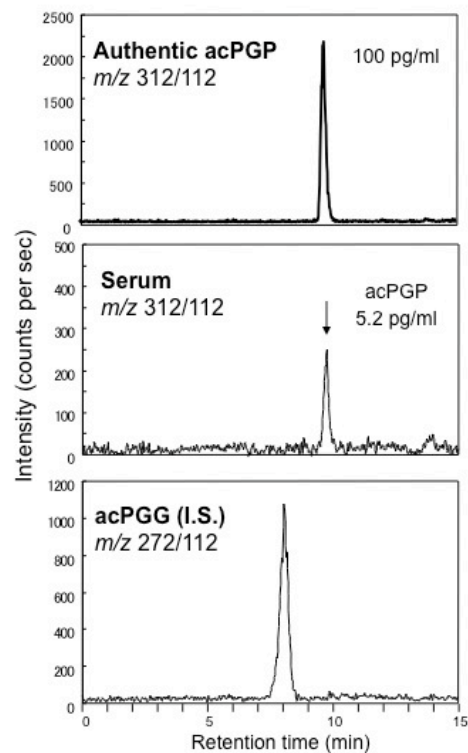


図 1 MRM クロマトグラム

### (2) 分析精度

acPGP の検量線では、1~100pg/ml で直線性を示した ( $y=0.0205x+0.024$ ,  $R^2=0.998$ )。それゆえ、定量性も十分あるものであった。

acPGP 濃度の検出限界は 1 pg/ml であった (signal/noise 比 3.2)。

成熟児、未熟児、成人の血清を用いた acPGP の定量精度を示す intra-day assay の結果は、成熟児、未熟児、成人の血清でそれぞれ CV(%)=1.8%、1.4%、3.4%であった。inter-day assay の結果はそれぞれ CV(%)=2.8%、3.0%、4.4%であった。回収率は、acPGP の濃度が 10pg/dl および 50pg/dl レベルでそれぞれ  $94.8 \pm 3.3\%$ 、 $97.9 \pm 1.7\%$ と高値を示した。

定量精度は、intra-day assay および inter-day assay はともに、CV (%) は 5%未満で、検体の保管、測定は非常に安定していた。acPGP の濃度が高濃度でも低濃度でも、回収率は 90%以上であった。それゆえ、我々の LC-MS/MS を用いた血清中 acPGP の定量法は、高い精度と正確性を有していた。

### (3) 健常成人および新生児の血清中 acPGP 濃度

血清中 acPGP 濃度は、健常成人 (n=22) および新生児 (n=72) でそれぞれ、 $6.3 \pm 2.7$  pg/ml、 $18.7 \pm 14.9$  pg/ml であった。新生児の血清中 acPGP 濃度は、健常成人よりも有意に高値であった (図 2)。

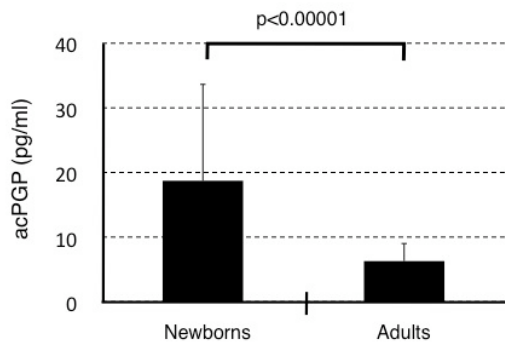


図 2 健常成人および新生児の血清中 acPGP 濃度

### (4) 新生児の出生体重別の血清中 acPGP 濃度

新生児の出生体重別の血清中 acPGP 濃度は、1,000 g 未満 (n=21)、1,001~2,500 g (n=29)、2,500 g 以上 (n=22) で、各々  $35.5 \pm 16.7$  pg/ml、 $13.7 \pm 6.0$  pg/ml、 $9.3 \pm 5.5$  pg/ml であった。出生体重が小さい児ほど血清中 acPGP 濃度は有意に高値となる結果であった (図 3)。

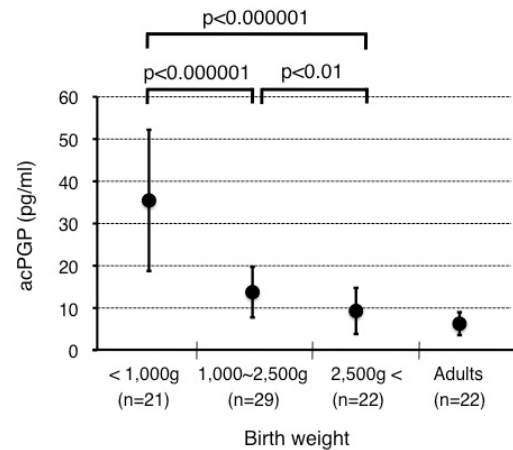


図 3 新生児の出生体重別の血清中 acPGP 濃度

### (5) 得られた成果の国内外における位置づけとインパクト、今後の展望

この研究で、LC-MS/MS を用いて高精度を有する acPGP の測定系を確立した。また、成人および新生児のヒト血清中に acPGP が存在することを世界で初めて証明した。

健常成人の血清中の平均 acPGP レベルは 6.3pg/ml で、量は少ないが健常成人の血清でさえ acPGP を含んでいることを示している。acPGP は、IL-8 と同様に炎症時に好中球を誘導するよう働くと考えられている。それゆえ、肺炎、慢性閉塞性肺疾患、リウマチ性関節炎、心筋梗塞などのようなヒト血清中 IL-8 濃度が高い好中球性炎症性疾患では、血清中 acPGP 濃度は健常成人よりずっと高い可能性がある。血清中 acPGP 濃度の測定が、これらの好中球性炎症性疾患の診断や治療効果判定に応用できる可能性がある。

新生児領域では、早産や早産児の慢性肺疾患を引き起こす子宮内炎症の診断ツールのひとつになりうる可能性を考え、新生児血清中の acPGP の測定を試みた。実際、新生児の血清中 acPGP 濃度は健常成人よりも有意に高く、acPGP が新生児において重要な役割を担っている可能性が示唆される。早産低出生体重児、特に、出生体重 1,000 g 未満の児では、1,000 g 以上の新生児に比べて、有意に血清中 acPGP 濃度が高かった。血清中 acPGP 濃度が高値を示したすべての児で、子宮内炎症である絨毛膜羊膜炎を有しており、慢性肺疾患を発症した。それゆえ、臍帯血や生後早期の新生児血液中の acPGP の増加が、絨毛膜羊膜炎や早産児の慢性肺疾患のバイオマーカーとして使用できることが期待される。

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1件)

(1) Shibata A, Morioka I, Ashi C, Nagasaki S, Tode C, Morikawa S, Miwa A, Enomoto M, Saiki K, Yokoyama N, Takeuchi A, Matsuo M. Identification of N-acetyl Proline-Glycine-Proline (acPGP) in human serum by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Clinica Chimica Acta*. 402, 124-128 (2009) 査読有

[学会発表] (計5件)

(1) 柴田暁男、森岡一朗、竹内敦子、齊木加代子、横山直樹、松尾雅文  
新生児好中球性炎症疾患における N-acetyl Proline-Glycine-Proline (acPGP) の役割に関する研究～LC-MS/MSによる血清acPGP測定系の確立、第240回兵庫県未熟児新生児懇話会、神戸、6/21/2007

(2) 柴田暁男、森岡一朗、竹内敦子、齋木加代子、横山直樹、松尾雅文  
LC-MS/MSを用いた血清中 N-acetyl Proline-Glycine-Proline 定量法の確立、第32回日本医用マススペクトル学会、京都、9/27-28/2007

(3) 柴田暁男、森川 悟、橋村裕也、三輪明弘、榎本真宏、佐藤有美、森岡一朗、横山直樹、松尾雅文  
新生児血清中における N-acetyl Proline-Glycine-Proline 存在の証明、第111回日本小児科学会、東京、4/25-27/2008

(4) Shibata A, Morioka I, Ashi C, Nagasaki S, Tode C, Saiki K, Yokoyama N, Takeuchi A, Matsuo M.  
Evidence for the Presence of N-Acetyl Proline-Glycine-Proline (acPGP) in the Serum of Newborns. Pediatric Academic Societies 2008 Annual Meeting (米国小児科学会), Honolulu, May 2-6, 2008

(5) 竹内敦子、長崎志津、葭ちとせ、森岡一朗、柴田暁男、松尾雅文  
血清中 N-acetyl Proline-Glycine-Proline

定量法の確立、日本質量分析学会第56回質量分析討論会、つくば、5/14-16/2008

6. 研究組織

(1) 研究代表者

森岡 一朗 (MORIOKA ICHIRO)  
神戸大学・医学部附属病院・助教  
研究者番号：80437467

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし