Kobe University Repository : Kernel

PDF issue: 2025-12-05

Identification of N-acetyl Proline-Glycine-Proline (acPGP) in human serum of adults and newborns by liquid chromatography-tandem mass spectrometry

柴田，暁男

(Degree)
博士（医学）

(Date of Degree)
2009-03-25

(Resource Type)
doctoral thesis

(Report Number)
甲4699

(URL)
https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1004699

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。

氏　　名	柴田　暁男
博士の専攻分野の名称	博士（医学）
学　位　記　番　号	博い第 4699 号
学位授与の　要　件	学位規則第 5 条第 1 項該当
学位授与の　日　付	平成 21 年 3 月 25 日

【 学位論文題目 】

Identification of N-acetyl Proline-Glycine-Proline (acPGP) in human serum of adults and newborns by liquid chromatography-tandem mass spectrometry(液体クロマトグラフィータンデムマス質量分析装置を用いたヒト成人および新生児血清中の N-acetyl Proline-Glycine-Proline (acPGP) の存在の証明)

審　査　委　員

主　査　　教　授　飯島　一誠

教　授　伊藤　智雄

教　授　平井　みどり

学位論文の内容要旨

Identification of N-acetyl Proline-Glycine-Proline (acPGP) in human serum of adults and newborns by liquid chromatography-tandem mass spectrometry

液体クロマトグラフィータンデムマス質量分析装置を用いた
ヒト成人および新生児血清中の **N-acetyl Proline-Glycine-Proline (acPGP)**
の存在の証明

神戸大学大学院医学研究科医科学専攻
小児科学
（指導教員：松尾雅文教授）

柴田　暁男

【はじめに】

好中球は、組織内に浸潤し炎症促進因子となることが知られている。今までに、インターロイキン（IL）-8 や成長関連癌遺伝子α・β・γなどのいくつかのサイトカインが、炎症促進時における好中球の化学遊走因子として確認されている。しかしながら、好中球浸潤の機序はいまだ十分に解明されていない。

そこで我々は、N-acetyl Proline-Glycine-Proline（acPGP）というトリペプチドに着目した。acPGP は、1993 年にアルカリ損傷を受けたウサギの角膜内で発見され、後に角膜炎症時に生じる好中球浸潤と密接に関わっていることが証明された。2006 年に acPGP は肺損傷モデルマウスの気管肺胞洗浄液中にも存在することが確認され、好中球の化学遊走因子のひとつであることが証明された。また、ヒトにおいて、慢性閉塞性肺疾患患者の気管肺胞洗浄液中にも acPGP が存在することが確認された。acPGP はヒトの好中球性炎症時に重要な役割を担っている可能性がある。しかしながら、気管肺胞洗浄液以外の生体試料中に acPGP の存在を証明した報告はない。

我々の研究の目的は、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である。また、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である。

【材料と方法】

化学薬品および試薬

標品としての合成 acPGP と内部標準としての N-acetyl Proline-Glycine-Glycine （acPGG）は KNC 研究室（神戸）で合成されたものを使用した。その他の薬品や試薬は市販で入手できるものを使用した。

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。

試料溶液の調製

血清 100μl 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。

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.×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。

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、正期産児、早産児、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)×100

統計学的分析

血清中の acPGP 濃度は、平均±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。

【結果】

方法の展開、特異性と選択性、イオン抑制

質量分析では、acPGP の〔M+H〕$^+$イオン（質量数/電価数（m/z）312）は、理論上、m/z 112 と m/z 140 のプロダクトイオンを産生する。また、acPGG の〔M+H〕$^+$イオン（m/z 272）は、m/z 112 と m/z 140 のプロダクトイオンを産生する。今回、実際に分析したときに産生した acPGP および acPGG のイオンプロファイルでも、m/z 112.1 と m/z 140.1 を検出した。そこで、m/z 312 と 112 と m/z 312 と 140 を検出するものを acPGP と判定した。

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。

LC-MS/MS での測定中にイオン抑制が生じることで定量誤差を認める場合がある。しかし、今回の分析では、このイオン抑制は認めず、定量性に問題はなかった。

分析精度

acPGP の検量線では、1～100pg/ml で直線性を示した（$y=0.0205x + 0.024$、$R^2=0.998$）。acPGP 濃度の検出限界は 1 pg/ml であった（signal/noise 比 3.2）。

正期産児、早産児、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、正期産児、早産児、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±3.3% 、97.9±1.7%と高値を示した。

健常成人および新生児の血清中 acPGP 濃度

血清中 acPGP 濃度は、健常成人および新生児でそれぞれ、6.3±2.7 pg/ml、18.7±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。

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、1,001～2,500 g、2,500 g 以上で、各々35.5±16.7 pg/ml、13.7±6.0 pg/ml、9.3±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。

【考察】

ヒト血清において、単一のピークが人工合成 acPGP と同じ保持時間で検出

されたことは、ヒト血清中に acPGP が存在していることを証明している。さらに、acPGP と内部標準である acPGG の比を使って作成された検量曲線は直線性を示しており、定量性も十分であった。定量精度に関しては、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。今回の測定は新生児を対象としているので、できる限り微量で測定したいと考え、100 μl の血清を用いて測定した。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 を用いて血清中 acPGP を定量する方法は、高い精度と正確性を有していた。

この研究がヒト血清中の acPGP を定量したはじめての報告である。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す。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かもしれない。

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た。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可能性がある。

【結論】

我々は、LC-MS/MS を用いて高い選択性と高精度を有する acPGP の測定系を確立した。我々のこの研究は、成人および新生児のヒト血清中に acPGP が存在することを証明した最初の報告である。

神戸大学大学院医学系研究科（博士課程）

論文審査の結果の要旨

受付番号	甲 第2010号	氏　名	柴田 暁男
論文題目 Title of Dissertation	**Identification of N-acetyl Proline-Glycine-Proline (acPGP) in human serum of adults and newborns by liquid chromatography-tandem mass spectrometry** 液体クロマトグラフィータンデムマス質量分析装置を用いたヒト成人および新生児血清中の **N-acetyl Proline-Glycine-Proline (acPGP)** の存在の証明		
審査委員 Examiner	主　査 Chief Examiner 飯島 一誠 副　査 Vice-examiner 伊藤 賀雄 副　査 Vice-examiner 平井みどり		

（要旨は1，０００字～2，０００字程度）

【目的】好中球の遊走を制御することは、炎症性疾患をコントロールする上で非常に重要である。 N-acetyl Proline-Glycine-Proline (acPGP)は、好中球遊走能を持つ新規の走化性トリペプチドであり、好中球浸潤が特徴のひとつである角膜アルカリ腐食の病態に関与することが知られている。最近、acPGP が、好中球が関与する炎症性疾患であるマウス肺傷害モデルや成人の閉塞性肺疾患の気管洗浄液中に高濃度で存在することが明らかにされ、acPGP がヒトの炎症性疾患における好中球の遊走に重要である可能性が指摘されている。しかし、これまでヒトの血清中で acPGP が検出されたことはない。研究者らは、液体クロマトグラフィータンデムマス質量分析装置を用いた血清 acPGP の測定法を確立し、成人および新生児の血清中に acPGP が存在することを示す目的で研究を行った。

【対象と方法】健常成人 22 名から血液検体を得た。また、2006 年 11 月から 2007 年 4 月までに神戸大学医学部附属病院に入院した 26 名の新生児（在胎週数：23－40 週、生下時体重：438－4,076 g）から生後 7 日目以内に複数回血液検体を採取した。なお、これらの新生児には先天代謝異常や先天奇形などの明らかな先天性疾患を持つものは含まれていない。これらの血液検体より血清を分離し、－20℃で保存した。血清 acPGP の濃度は、液体クロマトグラフィータンデムマス質量分析装置を用いて測定した。血清 acPGP 濃度の比較は、Mann-Whitney nonparametric rank test を用いて行い、$p<0.05$ を統計学的有意とした。

【結果】液体クロマトグラフィータンデムマス質量分析装置を用い、血清 acPGP の検出を試みたところ、acPGP 標準試料と同じ retention time の single peak が得られた。血清 acPGP の変動係数（日内変動、日間変動）は成熟児、未熟児、成人のいずれの試料を用いた場合にも 5%未満と低く、非常に精度の高い測定法であった。この測定法を用いて健常成人検体（n=22）と新生児検体(n=72)の acPGP 濃度を測定したところ、それぞれ、6.3±2.7 (range:1.2-9.9) pg/ml および 18.7±14.9 (range:2.6-79.0) pg/ml であり、新生児

の血清 acPGP 濃度は健常成人に比して有意に高かった。さらに、新生児を出生体重別に分け血清 acPGP 濃度を比較したところ、出生体重 1,000 g 未満群では、1,000 g 以上 2,500 g 未満群および 2,500 以上群に比して有意に高かった($P<0.0000001$)。また、1,000 g 以上 2,500 g 未満群は 2,500 以上群に比して有意に高かった($p<0.01$)。

【考察】研究者らは、液体クロマトグラフィータンデムマス質量分析装置を用い、血清 acPGP の高精度測定法を確立した。また、世界で初めてヒト成人および新生児の血清中に acPGP が存在することを明らかにした。また、出生体重が低いほうが、血清 acPGP が高いことも明らかにした。本研究で acPGP が高値を呈した出生体重 1,000 g 未満の症例は全例が病理学的には絨毛羊膜炎を有しており、経過中に新生児慢性肺疾患を発症しているが、前述のように、acPGP は強力な好中球遊走活性を持つことが知られており、子宮内感染や、それに引き続き発症する新生児慢性肺疾患の biomarker として acPGP が有用である可能性も考えられる。また、新生児領域以外の炎症性疾患への展開も考えられる。

本研究は、血清 acPGP の高精度測定法を確立し、ヒトの血清中に acPGP が存在することを世界で初めて明らかにした研究であり、従来ほとんど行われなかった新生児期炎症性疾患と血清 acPGP の関連について重要な知見を得たものとして価値ある集積であると認める。よって、本研究者は、博士（医学）の学位を得る資格があると認める。