



# 質量分析技術の臨床検査応用 — 現状と課題 —

の むら ふみ お  
野 村 文 夫  
Fumio NOMURA

## はじめに

質量分析の基本原理が初めて示されたのは19世紀末であり、この技術が世に出てから1世紀以上ということになる。質量分析技術の医療応用ではガスクロマトグラフィー質量分析(GC/MS)の歴史が長く、解析対象も当初は薬物をはじめとする低分子物質が主体であったが<sup>1)</sup>、2002年のノーベル化学賞の受賞対象となった田中耕一氏のソフトレーザー脱離イオン化法とJ.B.Fenn氏によるエレクトロスプレーイオン化(ESI)の開発により解析対象が高分子化合物に広がることとなった。さらにMALDI-TOF MSの実用化が進み、低分子化合物においてもESIとLC/MS/MSの組み合わせによる定量法が急速に普及した。本稿ではこれらの質量分析技術の臨床検査応用の現状と課題について述べる。

## I. 質量分析とその検査応用

臨床検査において質量分析技術が利用される領域を手技別に表1に示した。質量分析を利用した先天代謝異常症の診断においては先ずガスクロマトグラフィー質量分析計(GC/MS)がスタンダードとなった。現在でも有機酸代謝異常症などにおいてGC/MSによる尿中有機酸分析はきわめて重要である<sup>2)</sup>。わが国における新生児マススクリーニングでは従来、①フェニルケトン尿症、②ホモシスチン尿症、③メープルシロップ尿症の3つのアミノ酸代謝異常、④先天性甲状腺機能低下症、⑤先天性副腎過形成、⑥ガ

ラクトース血症の計6疾患が対象であったが、タンデムマス法の導入により従来のアミノ酸代謝異常症(①~③)を含む20種類以上の疾患を1回の検査でスクリーニングできるようになった<sup>3)</sup>。しかし、その他の3疾患(④~⑥)については従来の方法が続ける必要がある。タンデムマススクリーニングは2011年の厚労省からの通達を受けて全国すべての自治体に普及しているが、各自治体指定の専門機関がもっぱら担当している。また、LC/MSは法医学における薬毒物分析やTDMにおいても必須のツールとなっている<sup>4)</sup>。さらに近年は質量分析イメージングも注目されている<sup>5)</sup>。本稿では主に病院の臨床検査室と縁が深い臨床化学と臨床細菌学を取り上げる。

## II. 臨床化学領域における質量分析

### 1. 質量分析技術の利点と欠点(課題)

各種イムノアッセイは感染症関連の抗原・抗体検査をはじめ、ホルモン、腫瘍マーカー、自己抗体等

表1 方法別にみた質量分析技術の臨床検査応用

<b>GC/MS</b>
◆薬毒物分析
◆メタボローム解析
<b>LC/MS/MS(ESI, APCI)</b>
◆先天代謝異常症のスクリーニング
◆法中毒分析, TDM
◆臨床化学(低分子、アミノ酸、ペプチド・蛋白質)
◆DNA-freeのgenotyping
<b>MALDI-TOF MS</b>
◆細菌・真菌の迅速同定
◆質量分析イメージング

の測定に多用され、検査部の化学検査室の主役である。しかし、イムノアッセイでは同一項目について多くの検査試薬が存在し、使用される抗体も異なるため、測定法間差・試薬間差が生じる。そして低濃度域の定量性が不十分なこと、抗体の交差反応により特異度が十分でない場合があることなどが問題となる。

イムノアッセイでは特異抗体が持続的に供給され、入手可能であることが大前提である。わが国におけるバゾプレッシン (AVP) の唯一の測定系であったRIAで使用されていた抗血清の供給が停止されたため、一時期本邦におけるAVPの測定がストップしてしまったことはまだ記憶に新しいが、抗体のみに依存する系の危うさを如実に示している。

一方、質量分析法、とくに大気圧化学イオン化 (APCI) またはエレクトロスプレーイオン化 (ESI) と selected reaction monitoring (SRM) モードを用いた三連四重極質量分析計によるLC/MS/MSの利点および特徴は、特異性が高く、高感度であり、かつ多項目の同時測定が可能であり、ランニングコストも低いことである。臨床化学領域におけるLC/MS/MSの長所、特徴を表2にまとめた。

しかし、初期投資に費用がかかり、機器の操作、維持、管理に専門的知識が要求されること、現時点ではマニュアル操作に頼る部分が多く、サンプルの前処理操作 (臨床検体からの抽出、分離精製、誘導体化など) が必要なことが問題であり、現状では外来患者に対するいわゆる診察前検査としての利用は困難である。また、目的物のイオン化抑制にも常に注意を払う必要がある。さらにイムノアッセイのようにコマーシャルベースで測定系全体が提供されるわけではないので、現時点では項目ごとに至適な条件を組み合わせるIn-houseで測定系を作り上げる技術と知識、経験が求められる。その概要<sup>6)</sup>を図1に示した。質量分析技術の臨床検査応用は欧米で盛んであり、2016年の米国臨床化学会 (AACC) にお

表2 臨床化学分野におけるLC/MS/MSの利点、特徴

- ◆同一試料からの多項目同時定量が可能
- ◆前駆体・代謝物も含めた一斉分析が可能
- ◆感度・特異度に優れる
- ◆施設間差が少ない
- ◆抗体に依存しないことによる検査の継続性が保てる
- ◆ランニングコストが低い
- ◆他の測定系に対するGold standardとなる

ける分野別演題数 (表3) をみてもすでに臨床検査の一角を占めていることがわかる。

## 2. 質量分析法によるホルモン測定 (ビタミンDを含む)

ステロイドホルモン、ペプチドホルモンの測定の主流は各種イムノアッセイであるが、LC/MS/MSによる測定法が高感度かつ高特異性でありまた、多項目の同時測定が可能なることから近年急速に普及しつつある。

例えば、テストステロン、エストラジオールなど

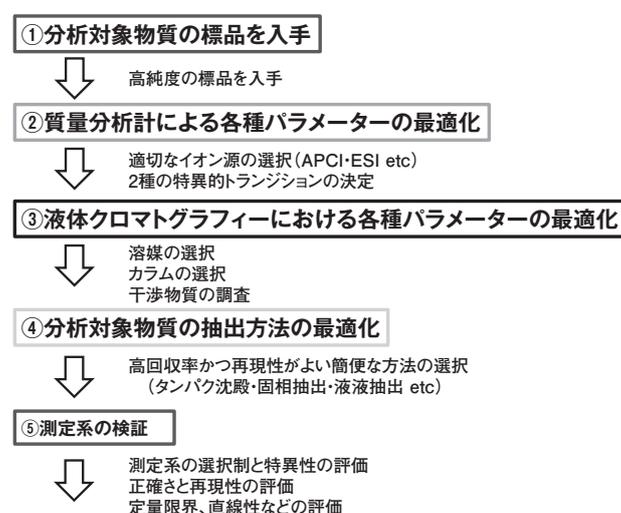


図1 LC/MS/MSによる低分子物質の測定系の確立の手順 (文献6より引用、一部改変)

表3 2016年米国臨床化学会 (AACC) における質量分析測定関連演題

Session Topics	
Endocrinology/Hormones	78 (11)
Infectious Disease	69 (3)
Clinical Studies/Outcomes	66
Cancer/Tumor Markers Management	62 (4)
53 (1)	
Mass Spectrometry Applications	50
TDM/Toxicology/DAU	46 (33)
Point-of-Care Testing	42 (1)
Factors Affecting Test Results	40 (1)
Immunology	38 (1)
Molecular Pathology/Probes	37
Cardiac Markers	32 (2)
Automation/Computer Applications	27 (1)
Technology/Design Development	26 (2)
Hematology/Coagulation	24
Pediatric/Fetal Clinical Chemistry	21 (4)
Proteins/Enzymes	19
Lipids/Lipoproteins	15 (1)
Electrolytes/Blood Gas/Metabolites	12 (2)
Nutrition/Trace Metals/Vitamins	10 (3)
Animal Clinical Chemistry	6

括弧内の数字は他分類の演題であって質量分析技術が利用されている演題数を示す

の性ホルモンについては、それぞれ成人男性、成人女性における中・高濃度域の測定については現行のイムノアッセイでも可能であるが、低濃度域、すなわち女性・小児におけるテストステロンの測定、男性・小児・更年期女性などにおけるエストラジオールの測定においてはイムノアッセイに限界があり、LC-MS/MSによる測定がより正確である<sup>7)</sup>。またエストラジオール (E2) だけでなく、エストロン (E1) も同時測定できるのでより深い解析が可能となる。ビタミンDはカルシウム代謝調節に必須な脂溶性ビタミンとして知られてきたが、活性化ビタミンDが骨代謝調節以外にも多岐にわたる生理活性を有することが明らかとなり、ビタミンDの不足が多くの疾患の易罹患性を高めることが注目されている。その結果、生体におけるビタミンDの過不足の示標となる血中 25OH ビタミンD (25OHD) の測定の依頼件数が諸外国では指数関数的に増加し、わが国においても現状では測定法が限定されるが、2016年より保険診療で実施可能となった。

血中 25OHD の大部分は 25OHD<sub>3</sub> として存在するが、ビタミンD<sub>2</sub> のサプリメントを常用している場合は 25OHD<sub>2</sub> の比率が増してくる。従来のイムノアッセイは 25OHD<sub>2</sub> と 25OHD<sub>3</sub> を測り分けることができないだけでなく、その他の代謝物も測り込む可能性があり、特異性が十分とは言えない。事実、市販のイムノアッセイ間のデータの不一致が指摘されているのに対して、異なる LC-MS/MS プラットフォーム間の一致率は比較的良好とされている<sup>8)</sup>。25OHD の測定においては LC-MS/MS が gold standard であり、日本臨床化学会の標準化専門委員会の見解<sup>9)</sup> でも、自施設の測定値が LC-MS/MS とのトレーサビリティを確保していることが求められている。同委員会は 25OHD 測定の標準化に向けた活動を継続している。筆者らは LC/MS/MS による 25 (OH) D<sub>3</sub>, 3-epi-25 (OH) D<sub>3</sub>, 25 (OH) D<sub>2</sub>, 24,25 (OH) 2D<sub>3</sub> の同時定量法を開発し、臨床応用している<sup>10)</sup>。これらの代謝物を分別測定できることの意義は単にビタミンD<sub>2</sub> の影響を除くだけでなく、3-epi 体の割合が比較的多い新生児サンプルの測定を正確にするために必要である。さらには乳児でみられる原因不明の高カルシウム血症においては CYP24A1 遺伝子変異による 24,24 (OH) 2D<sub>3</sub> の正確な定量による異常低値の確認が鑑別診断上重要である<sup>11)</sup>。

### Ⅲ. MALDI-TOF MS による微生物の迅速同定

#### 1. 概要

病院の細菌検査室における一般細菌の同定は形態学的手法 (コロニーの形状やグラム染色など) に加えて生化学的手法が用いられてきたが、後者は結果を得るのに長時間 (平均 18 時間程度) が必要である。核酸配列の解析などによる分子生物学的手法は正確であるが、現時点では高コストかつ煩雑であり、ルーチン検査に適しているとはいえない。これに対して、MALDI-TOF MS による細菌同定は簡便性、正確性に優れ、迅速 (10 分以内) かつ低ランニングコストで多くの分離菌種の同定が可能である。現状では感受性検査は従来法を実施する必要があるものの、わが国においても本技術を導入する施設が増え、臨床細菌検査に大きなパラダイムシフトが起きている<sup>12,13)</sup>。一般細菌の同定能力についての評価はほぼ定まり、糸状菌や抗酸菌の同定への応用が進んでいる。MALDI-TOF MS による微生物同定に関しては在院日数の短縮を含めコスト削減への貢献も明らかにされている<sup>14)</sup>。

#### 2. 解析の流れと菌種の同定能力

質量分析技術の微生物同定への応用は 1975 年に端を発するが、1980 年代になり MALDI-TOF MS の開発に伴い発展し、近年は複数の解析用ソフトや専用の解析機器が市販されて急速に普及している。わが国でも解析ソフトと分析機器が一体となった MALDI Biotyper と VITEK<sup>®</sup> MS が市販されており、2016年9月の時点で両者を合わせて 120 台以上がわが国の医療機関で稼働していると思われる。いずれの機器も保険診療の枠組みで利用が可能である。筆者の施設では Bruker 社の MALDI Biotyper を用いている。その解析の流れを図 2 に示した。コロニーの一部を MALDI plate に塗布し、マトリックスを加えてイオン化させて、TOF-MS 解析を行い、得られた MS スペクトルをデータベースのスペクトル情報と比較することでマッチングを行うものである。代表的な菌種の実際のスペクトルを図 3 に示した。10 分以内に結果が得られるので、従来の生化学的な手法に比

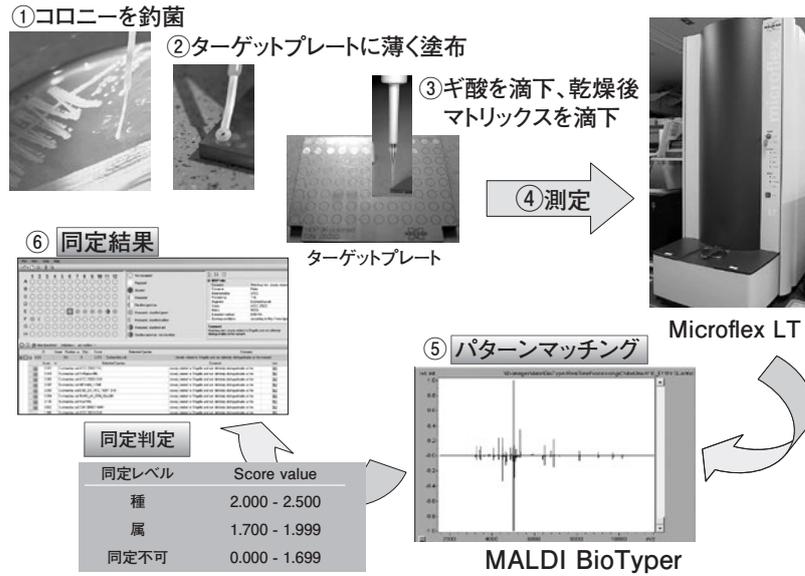


図2 MALDI Biotyperによる細菌同定手順

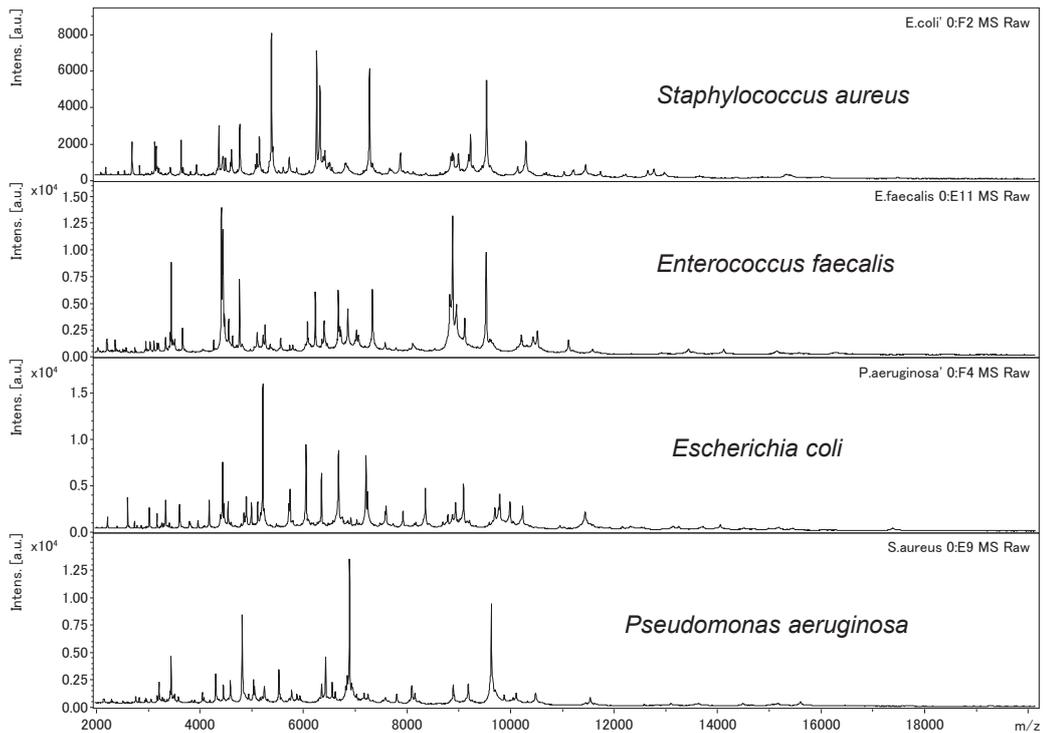


図3 細菌菌体蛋白質のMALDI-TOF MSスペクトルの例

してほぼ1日近く早く同定結果を知ることができる。血液培養の陽性検体からの同定の場合は従来法との時間差はさらに大きい。

MALDI Biotyperによる一般細菌(一部の真菌を含む)の同定率は種レベルで85~97%、属レベルでは96~99%となっている<sup>15)</sup>。同定率が100%とならない理由は主として3つある。1つ目はデータベ-

スの問題である。MALDI-TOF MSによる微生物同定能力はデータベースの質と量に大きく左右される。すなわちその菌種がデータベースに存在しない、あるいはデータ量が不十分な場合はMSスペクトルが得られても同定に至らない。表4に示すように筆者ら<sup>16)</sup>も市販のデータベースに当施設での分離株のスペクトルを追加した強化データベースを用い

表 4 既存のデータベースに in-house データベースを加えることによる同定率の向上

	No. of isolates	MALDI Biotyper method					
		Bruker database			Bruker-Chiba database		
		Species levels	Genus levels	No matching	Species levels	Genus levels	No matching
The concordance of identification of the species that were added to a database	498	434 (87.1%)	463 (93.0%)	35	488 (98.0%)	498 (100.0%)	0
The concordance of identification of the species that were not added to a database	47	39 (83.0%)	44 (93.6%)	3	39 (83.0%)	44 (93.6%)	3

(文献16より引用、一部改変)

ることにより、同定率が上昇することを確認しているが、市販のデータベースも定期的な改良が行われている。第2の理由は菌によっては適切な前処理が必要な点である。本技術の利点の1つは簡便性にあり、コロニーの一部を MALDI プレートに直接塗布し、マトリックスを加えてそのまま TOF MS を行える場合も多いが、菌種によっては菌体の十分な蛋白質抽出のための前処理を加える必要がある。ブドウ球菌などではプレート上での処理が可能であるが<sup>17)</sup>、酵母様真菌、マイコバクテリウム属、ノカルジア属などではより強力な抽出処理が必要である。結核菌などでは十分な前処理は蛋白質抽出だけでなく、不活化により操作上の安全性を担保するためにも必要である。ノカルジア属については強力な前処理が必要なこと、そして市販のデータベースが不十分であることから、筆者らは前処理法の改良および千葉大学真菌医学センターのご協力を得てデータベースの強化を行うことにより、その同定率が飛躍的に増加したのでルーチン検査においても活用している<sup>18)</sup>。

さらに第3の理由として、遺伝子レベルで近縁の菌種の区別が困難な点があげられる。

### 3. 菌体からの直接同定

本技術は現時点では同定のためには一定量以上の菌量が必要なことからコロニー形成をみながら利用される場合が多いが、特に迅速性が求められる血液培養では培養陽性と判明した時点で培養液から直接同定作業に入ることが可能であり迅速診断としての意義が大きく、菌種により異なるが、60～80%程度の陽性率が得られている<sup>19)</sup>。しかし、血液培養液にはヘモグロビンを初めとして細菌以外の蛋白質が大量に含まれているので、菌体を選択的に回収するための前処理が必須である。

尿路感染症の診断においても一定量以上の菌体量があれば直接同定が可能である<sup>20)</sup>。MALDI-TOF MS による診断の迅速性は治療開始までに時間的猶予がない細菌性髄膜炎において威力を発揮する、筆者らも *Klebsiella pneumoniae* による細菌性髄膜炎の診断に MALDI-Biotyper が有用であった症例を経験し、報告している<sup>21)</sup>。

### 4. 今後の課題 – 耐性菌検出への応用など

近年、MALDI-TOF MS による細菌同定の領域では Beyond identification として strain typing や抗菌薬に対する感受性・耐性の判定への利用が求められている。Strain typing では一部の菌種、たとえばサルモネラなどでは成功例があるが、多くの菌種では今後の課題である。複数の菌種が存在する検体に対する対応も必要となる。同定された菌種の抗菌剤に対する感受性・耐性の判別における MALDI-TOF MS の役割については最近の総説に詳しく記載されているが<sup>22, 23)</sup>、広く実用化される状況ではない。例えば、β-ラクタム系抗生物質に対する耐性機序としては β-ラクタマーゼ産生、porin の変化などが知られているが、細菌の β-ラクタマーゼによる抗菌剤の分解物を MALDI-TOF MS により検出することにより間接的に耐性の有無を評価することができる<sup>24)</sup>。また耐性に関わる porin の変化の検出も可能である<sup>25)</sup>。一方、もう一つの質量分析技術である LC/MS/MS も有用であり、まだ研究室レベルではあるが、ブドウ球菌を例として同定と薬剤感受性を同時に検出できる手法が紹介されている<sup>26)</sup>。

### おわりに

質量分析の技術革新により臨床検査が大きく変わろうとしている。特に MALDI-TOF MS による迅速

微生物同定は臨床細菌検査における必須の手法になりつつある。また LC/MS/MS の臨床化学への応用においては検体前処理を含めた操作性に課題があり、また保険償還の問題もあるが、近い将来臨床検査室の中核的な技術となると予想される。しかし、分析技術がいかに進歩したとしてもこれらの技術は臨床検査を熟知した者が従来の手法と適切に組み合わせるべきであることを強調したい。質量分析技術の臨床検査応用がさらに加速することに備えて日本医用マススペクトル学会では4年前より医用質量分析認定士制度 (<http://www.jsbms.jp/>) がスタートし、臨床検査技師を中心にすでに256名が認定を受けている。

## 文 献

- 1) Finkle BS. Drug-analysis technology : overview and state of the art. *Clin Chem.* 1987 ; **33** : 13B-17B.
- 2) Kuhara T. Noninvasive human metabolome analysis for differential diagnosis of inborn errors of metabolism. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2007 ; **855** : 42-50.
- 3) 山口清次(編). タンデムマス・スクリーニングガイドブック東京. 診断と治療社, 2013.
- 4) 石井 晃, 財津 桂. 法医学における質量分析. 丹羽利充・野村文夫(編), 医用質量分析ガイドブック. 診断と治療社, 東京, 2013 pp128-133.
- 5) Caprioli RM. Imaging mass spectrometry : Molecular microscopy for the new age of biology and medicine. *Proteomics.* 2016 ; **16** : 1607-1612.
- 6) Bozovic A, Kulasingam V. Quantitative mass spectrometry-based assay development and validation : From small molecules to proteins. *Clin Biochem.* 2013 ; **46** : 444-455.
- 7) Kushnir MM, Rockwood AL, Bergquist J. Liquid chromatography-tandem mass spectrometry applications in endocrinology. *Mass Spectrometry Reviews.* 2010 ; **29** : 480-502.
- 8) Farrell CJ, Martin S, McWhinney B, et al. State-of-the-art vitamin D assays : a comparison of automated immunoassays with liquid chromatography tandem mass spectrometry methods. *Clin Chem.* 2012 ; **58** : 531-542.
- 9) 渭原 博, 岡野登志夫, 橋詰直孝ほか. 血清25ヒドロキシビタミンD測定の標準化に関する日本臨床化学会栄養専門委員会の見解. *臨床化学* 2009 ; **38** : 140-151.
- 10) Satoh M, Ishige T, Ogawa S et al. Development and validation of the simultaneous measurement of four vitamin D metabolites in serum by LC-MS/MS for clinical laboratory applications. *Anal Bioanal Chem.* 2016 ; **408** : 7617-7627.
- 11) Schlingmann KP, Kaufmann M, Weber S et al. Mutations in *CYP24A1* and Idiopathic Infantile Hypercalcemia. *N Engl J Med.* 2011 ; **365** : 410-421.
- 12) A. Croxatto, G. Prod'hom, G. Greub. Applications of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology. *FEMS Microbiol Rev.* 2012 ; **36** : 380-407.
- 13) Nomura F. Proteome-based bacterial identification using matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) : A revolutionary shift in clinical diagnostic microbiology (Review) *Biochim Biophys Acta.* 2015 ; **1854** : 528-537.
- 14) Perez, R.J. Olsen, W.L. Musick, P.L et al. Integrating rapid pathogen identification and antimicrobial stewardship significantly decreases hospital costs. *Arch Pathol Lab Med.* 2013 ; **37** : 1247-1254.
- 15) Patel R. MALDI-TOF mass spectrometry: transformative proteomics for clinical microbiology. *Clin. Chem.* 2013 ; **59** : 340-342.
- 16) Sogawa K, Watanabe M, Satoh M et al. Rapid identification of microorganisms by mass spectrometry : improved performances by incorporation of in-house spectral data into a commercial database. *Anal Bioanal Chem.* 2012 ; **403** : 1811-1822.
- 17) Matsuda N, Matsuda M, Notake S et al. Evaluation of a simple protein extraction method for species identification of clinically relevant staphylococci by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J. Clin. Microbiol.* 2012 ; **50** : 3862-3868.
- 18) Segawa S, Nishimura M, Sogawa K et al. Identification of *Nocardia* species using matrix-assisted laser desorption/ionization-time-of-flight mass spectrometry. *Clin Proteomics.* 2015 ; **12** : 6. doi : 10.1186/s12014-015-9078-5.
- 19) Scott JS, Sterling SA, To H, et al. Diagnostic performance of matrix-assisted laser desorption ionisation time-of-flight mass spectrometry in blood bacterial infections: a systematic review and meta-analysis. *Infect Dis (Lond).* 2016 ; **48** : 530-536.
- 20) Ferreira L, Sanchez-Juanes F, Gonzalez-Avilla M et al. Direct identification of urinary tract pathogens from urine samples by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J. Clin Microbiol.* 2010 ; **48** : 2110-2115.
- 21) Segawa S, Sawai S, Murata S et al. Direct application of MALDI-TOF mass spectrometry to cerebrospinal fluid for rapid pathogen identification in a patient with bacterial meningitis. *Clin Chim Acta.* 2014 ; **435** : 59-61.
- 22) Charretier Y, Schrenzel J. Mass spectrometry methods for predicting antibiotic resistance. *Proteomics Clin Appl.* 2016 ; **10** : 964-981.
- 23) Doern CD, Butler-Wu SM. Emerging and Future Applications of Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight (MALDI-TOF) Mass Spectrometry in the Clinical Microbiology Laboratory: A Report of the Association for Molecular Pathology. *J Mol Diagn.* 2016 ; **18** : 789-802.
- 24) Hrabak J, Walkova R, Studentova V, et al. Carbapenemase activity detection by matrix-assisted laser desorp-

- tion ionization-time of flight mass spectrometry. *J. Clin. Microbiol.* 2011 ; **49** : 3222-3227.
- 25) Hu YY, Cai JC, Zhou HW, et al. Rapid detection of porins by matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry. *Front Microbiol.* 2015 ; **6** : 784. doi : 10. 3389/fmicb. 2015. 00784. eCollection 2015.
- 26) Charretier Y, Dauwalder O, Franceschi C. et al. Rapid Bacterial Identification, Resistance, Virulence and Type Profiling using Selected Reaction Monitoring Mass Spectrometry. *Sci Rep.* 2015 Sep 9 ; **5** : 13944. doi : 10. 1038/srep 13944.