

卓上型MALDI-TOF MS MALDI-8020

MALDI-TOF MSを使用した
糖化ヘモグロビン (HbA1c) の定量

Dennis van den Heuvel¹、Andreas Baurmeister²、脇華菜
¹ Shimadzu Benelux B. V., ² Shimadzu Europa GmbH

ユーザーベネフィット

- ◆ 糖化ヘモグロビンの定量の有望な方法です。
- ◆ サンプルの前処理は希釈のみで、簡単に行うことができます。
- ◆ クロマトグラフィーを使用しない高速な方法で、測定時間を短縮できます。

■はじめに

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 (MALDI-TOF MS) は、低分子から高分子までの様々な試料の分子量情報を得るための簡単で迅速な分析法です。現在、ポリマーおよび生体分子の研究開発や品質管理における幅広い応用例に加え、MALDI-TOF MSはハイスループットなルーチンとして、臨床分野における微生物同定でも広く普及しています。多くのMALDIアプリケーションが時間を要するクロマト分離工程を用いずに迅速に分析が可能です。

糖化ヘモグロビン (HbA1c) の定量は、糖尿病の管理のための最も重要かつ標準的なツールです。オランダ糖尿病協会は糖尿病の種類に応じて、HbA1c値を年に2~4回モニタリングすることを推奨しています¹⁾。現在、血液試料中のHbA1cの測定には、主にクロマトグラフィー分離法に基づいた、幾つかの手順と市販の装置が利用できます。MALDIは分析時間の短縮に役立ち、その結果、1日当たりの分析可能なサンプル数を増やすことができます。

■測定条件とサンプル

メソッドの検証のために、ヘモグロビンA1c標準試料 (Biorad製) を0.5 mLの脱イオン水に溶解し、1:1000に希釈しました。今回使用したメソッドは、実際に血液試料において必要とされる糖化ヘモグロビン量を十分に検出できることが分かりました。サンプルはプレコーティング法とマトリックスとしてシナピン酸を使用して調製しました。

分析は卓上型MALDI-TOF MSであるMALDI-8020 質量分析計で行いました (図1)。SampleStation™とAuraSolution™ソフトウェアパッケージにより、自動かつハイスループット解析が可能になりました。



図1 MALDI-8020 外観

SampleStationにより、サンプルIDと紐づいたサンプルリストを作成できます。ターゲットはサンプルプレートにあるバーコードリーダーによって認識され、解析はAuraSolutionソフトウェアによって自動で行われます。

■HbA1c標準品のMSスペクトル

MSスペクトルでは、15 kDa付近の1価イオンと7.5 kDa付近の2価イオンの二つのピーククラスタが観察されました (図2)。2価イオンの強度は1価イオンの強度の6倍でした。この高感度に加えて、2価イオンに対してよりよい分解能が観察されました。そのため、2価イオンのピーククラスタを以降の検証で用いることにしました。この2価イオンのm/z付近の質量範囲の拡大図を図3に示します。

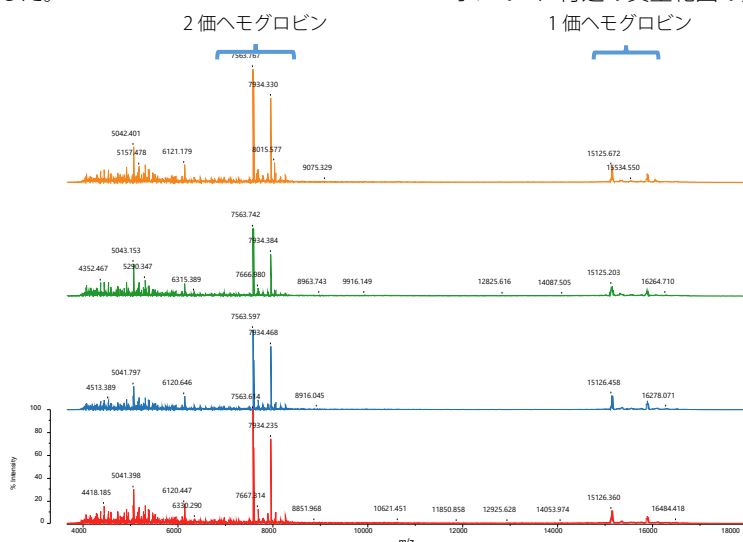


図2 HbA1c 標準品のマスマスペクトル
非糖化ヘモグロビンに対する糖化ヘモグロビンの比率は、上から下に向かって減少しています

ヘモグロビンのα鎖とβ鎖が、およびそれぞれの糖化物と同様に、明瞭に観察できました。

■ 定量化

HbA1cは糖化ヘモグロビンと総ヘモグロビンの比率として定義されます。慣例的にこの比は%またはmmol/molで表されます。したがって、糖化および非糖化β鎖ヘモグロビンの[M+2H]²⁺はHbA1c値を決定するために使用しました。その結果、ヘモグロビンA1c標準品の線形回帰は $r^2=0.9993$ の相関係数を示し、4.7~19 %または27~184 mmol/molの範囲でした(図4)。

■ 血液サンプルへのメソッド移管

このMALDIのメソッドを実際の血液試料にも適用しました。実際の患者20人のサンプルをMALDI-8020と従来のクロマトグラフィーシステムで分析し、今回確立された方法との比較を行いました。

標準品と同様に臨床上に適切な濃度範囲において、従来のクロマトグラフィーとMALDIの両手法の間に相関があることが示されました(図5)。

■ まとめ

このアプリケーションでは臨床サンプルにおいてMALDI-TOF MSの新たな可能性を示しました。分析する検体の量が増えるにつれ、MALDI装置のキャパシティーを効率的に活用できます。時間効率がよいサンプルの前処理を用いて、このメソッドは今後、HbA1c値を測定するルーチン制御の測定時間を短縮する迅速な分析ツールになり得ると考えられます。

参考文献

1) <https://www.diabetesfonds.nl>

2) Biroccio A., Urbani A.& Massoud R.

A quantitative method for the analysis of glycated and glutathiolated hemoglobin by matrix-assisted desorption ionization-time of flight mass spectrometry. Anal. Biochemistry 336 (2005), 279 – 288

3) Yeboah F.K. & Yaylayan V.A.

Analysis of glycated proteins by mass spectrometric techniques: qualitative and quantitative aspects. Nahrung/Food (2001) 45 (3), 164 - 171

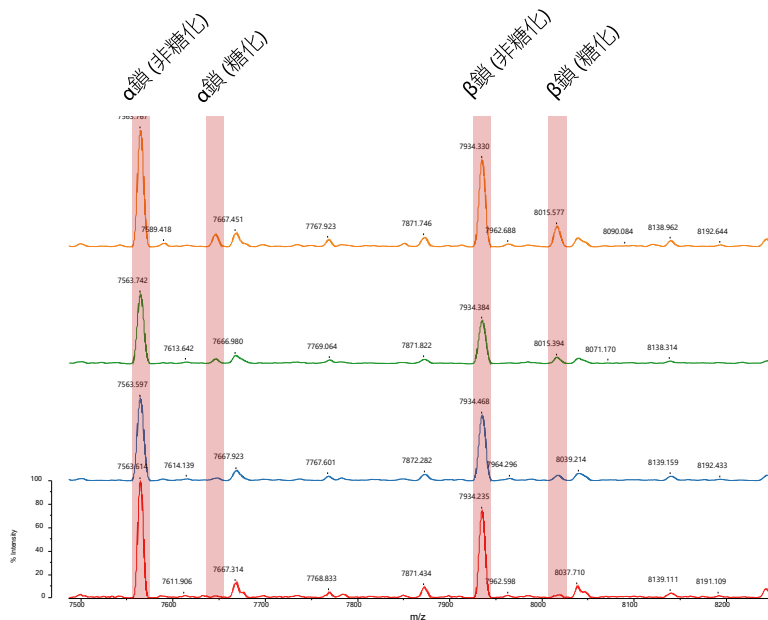


図3 糖化ヘモグロビンと非糖化ヘモグロビンの2価イオン(α鎖とβ鎖)を表すピーク。糖化ヘモグロビンと非糖化ヘモグロビンの比率は、上から下に向かって減少しています。

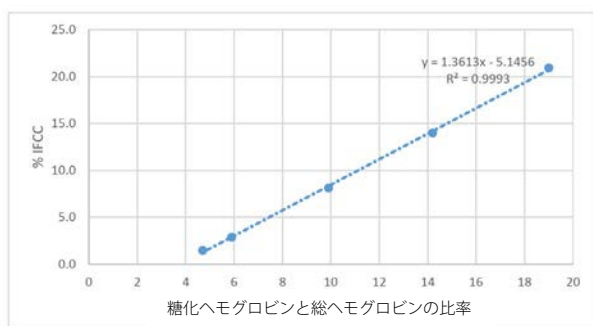


図4 線形回帰と相関係数を使用した検量線

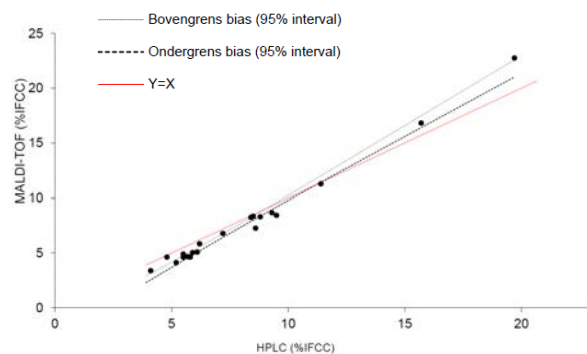


図5 従来のクロマトグラフィー法とMALDI-TOF MSによって分析されたHbA1c間の相関

SampleStationおよびAuraSolutionは株式会社 島津製作所の日本およびその他の国における商標です。

株式会社 島津製作所 分析計測事業部
グローバルアプリケーション開発センター

05-SCA-295-004-JP 初版発行：2022年2月

島津コールセンター ☎ 0120-131691

本文書に記載されている製品は、医薬品医療機器等法に基づく医療機器として承認・認証等を受けた機器ではありません。本文書に記載されている分析手法を診断目的で使用することはできません。

本文中に記載されている会社名および製品名は、各社の商標および登録商標です。本文中では「TM」、「®」を明記していない場合があります。

本資料は発行時の情報に基づいて作成されており、予告なく改訂することがあります。最新版は、島津製作所>分析計測機器の以下のサイトより閲覧できます。

<https://www.an.shimadzu.co.jp/apl/index.htm>
会員制情報サービス Shim-Solutions Club にご登録いただけますと、毎月の最新情報をメールでご案内します。新規登録は、<https://solutions.shimadzu.co.jp/> よりお願いします。

© Shimadzu Corporation, 2022