

論文審査の結果の要旨

Optimal conditions and the advantages of using laser microdissection and liquid chromatography tandem mass spectrometry for diagnosing renal amyloidosis

腎アミロイドーシス診断における質量分析法の至適条件とその有用性

日本医科大学大学院医学研究科 解析人体病理学分野
大学院生 青木 路子

Clinical and Experimental Nephrology 2018 年掲載

腎アミロイドーシスの病理診断は、アミロイド蛋白の沈着を congo-red 染色や電子顕微鏡で確認し、その原因アミロイド蛋白を免疫染色法で同定している。しかし、免疫染色法では、非特異的陽性所見や偽陰性所見によりアミロイド蛋白の同定が困難な症例がある。近年、アミロイド蛋白の同定に液体クロマトグラフィータンデム型質量分析法(LCMS/MS)が応用されてきた。本研究では LCMS/MS 法を用いて腎アミロイドーシスのアミロイド蛋白を同定するための至適条件と、従来の方法と比較して LCMS/MS 法の有用性について検討した。方法は 1994 年から 2016 年までに診断された 10 症例の AA アミロイドーシスと 13 症例の AL アミロイドーシスを用いた。LCMS/MS 法の至適条件として、レーザーマイクロダイセクション(LMD)により切除する試料の量 (5 μ m の厚さの標本での congo-red 陽性糸球体数)と添加する分解酵素 (0.1mg/mL のトリプシン) の量や還元剤の有無を検討した。LCMS/MS 法による蛋白解析は scaffold データベースを用いた。個々の蛋白質の存在の確からしさは spectra 値で表わされ、既存の報告と同様に spectra 4 以上を有意なアミロイド蛋白の存在とした。至適試料として、ホルマリン固定パラフィン検体の方が凍結標本よりもアミロイド蛋白や細胞骨格蛋白の spectra 値が高く、ホルマリン固定パラフィン標本が LCMS/MS 法には適していた。LMD により切除する congo-red 陽性糸球体数は 10 個で全症例のアミロイド蛋白の同定が可能であった。蛋白分解酵素量と還元剤については、原因アミロイド蛋白の種類によって至適トリプシン量が異なっていたが、1 検体に 0.1mg/mL のトリプシン 3 μ L の添加で AL および AA アミロイドの同定が可能であった。LCMS/MS 法を用いて腎アミロイドーシスを解析するための至適条件は、パラフィン標本 (厚さ 5 μ m) の糸球体 10 個を用い、1 検体あたりトリプシン量 3 μ L (0.1mg/mL)を添加すると定めた。さらに、蛍光抗体法で診断困難な症例も LCMS/MS 法ではアミロイド蛋白を同定することができた。学位論文第二次審査では、従来の方法での腎アミロイドーシス診断困難な症例の頻度、LCMS/MS 法の原理や解析条件、他臓器や他疾患への応用の可能性、腎病理における将来的な展望に関して慎重かつ活発な議論が行われ、いずれも的確な回答が得られた。本論文は従来の腎病理診断法に加わる新たな解析・診断方法としての LCMS/MS 法の有用性を明らかにし、その至適解析条件を設定した病理学的意義はとて高く、今後の解析・診断の基盤となる重要な研究という結論がなされた。よって、本論文は学位論文として十分に価値のあるものと認定した。