

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 9 日現在

機関番号：34419

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460211

研究課題名(和文) ソフトイオン化質量分析法を基盤とする乾燥ろ紙尿中ステロイドの臨床検査法の開発

研究課題名(英文) Determination of conjugated steroids in dried urine spots by means of liquid chromatography-mass spectrometry

研究代表者

三田村 邦子 (MITAMURA, Kuniko)

近畿大学・薬学部・准教授

研究者番号：70242526

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：非侵襲的に採取可能な尿中のステロイド代謝物のプロファイルを明らかにし、内分泌・代謝疾患の病態解析、診断指標の一助とすることを目的として、LC/MSによる尿中抱合型オキシステロールおよびテトラヒドロコルチコステロイドのプロファイル分析法を開発した。さらに本法が乾燥ろ紙尿に適用可能なことを示した。乾燥ろ紙尿は尿試料の保存や輸送が簡便であり、実施施設が限られた臨床検査用の検体として有用視される。

研究成果の概要(英文)：Profile determination methods for oxysterols sulfate and tetrahydrocorticosteroids glucuronides (THC-G) and/or these sulfates in urine samples by means of LC/MS/MS were developed. The method was applicable to quantitative analysis of THC-G in dried urine spots (DUS) sample. The method was well validated, and the concentration of THC-G in DUS were well correlated with those in liquid urine. DUS samples provides convenient and safe transportation, storage and handling of sample. DUS samples would be a useful alternative for clinical screening tests of endocrine disorders, particularly, when the sample needs to be transported over long distances.

研究分野：臨床分析化学

キーワード：乾燥ろ紙尿 抱合体 LC/MS テトラヒドロコルチコステロイド オキシステロール グルクロン酸抱合体 硫酸

1. 研究開始当初の背景

尿は非侵襲的に採取できる臨床検査試料として古くより利用されている。しかし、ステロイドホルモンは大部分が抱合体として排泄されているにも関わらず、その測定に関しては、抱合体を一旦加水分解した後、イムノアッセイや、さらに誘導体化後、GC/MSにより測定されており、抱合形式などの情報を喪失するなどの問題が残されている。さらに近年、極性化合物の直接分析に威力を発揮するソフトイオン化法であるエレクトロスプレーイオン化 (ESI) 法が液体クロマトグラフィ/質量分析法 (LC/MS) 用イオン化法として実績を上げているにもかかわらず、抱合体標品の入手が困難なことから、抱合体を酸や酵素により加水分解後の遊離型ステロイドの測定や、市販されている一部の抱合体のみの測定に留まっている。このため、方法形跡や抱合位置になど、抱合に関する情報は得られない。この点に関し、先に申請者は、クッシング症候群を初めとする内分泌・代謝疾患の診断に重要視される副腎皮質ホルモンの尿中排泄物であるテトラヒドロコルチコステロイドに着目し、グルクロン酸抱合体 (12 種) および硫酸抱合体 (18 種) の LC/ESI-MS による直接一斉測定法を開発した。しかし、これらの標品の合成は容易ではなく、多くの研究・臨床検査機関での汎用性という点では、問題が残る。

2. 研究の目的

乾燥尿の紙は、乾燥により菌の繁殖が抑制されるために保存しやすく、また、乳幼児からの採尿も容易である。さらに、試料採取施設と測定施設が離れている場合の運搬 (郵送) にも適していることから、臨床検査用検体として有用視されているが、その利用は有機酸やアミノ酸の新生児マススクリーニングなどに限定されており、ステロイドホルモンに関する報告はほとんどない。尿中抱合型ステロイドのプロファイルを明らかにするためには、信頼できる標品の確保と測定法の開発が必須となる。そこで本研究は、非侵襲的に採取可能な尿中ステロイド代謝物のプロファイルを明らかにし、内分泌・代謝疾患の病態解析、診断指標の一助とすることを目的として、まず、LC/MS による尿中抱合型ステロイド代謝物の直接一斉測定法を開発する。また、LC/MS など高額な精密測定機器や標品の入手が困難な場合に、郵送された試料を検査可能な施設で測定することが重要視されることから、乾燥尿紙尿中抱合型ステロイド代謝物の LC/MS 測定を構築する。

3. 研究の方法

(1) オキシステロールやビタミン D₃ の抱合型代謝物などこれまでに我々が合成、入手した標品を用いて、LC/MS による挙動を精査し、尿中濃度の測定法を構築する。

(2) 乾燥尿紙尿への適用のための、ろ紙の

種類、抽出方法、安定性などの基礎的検討を行い、実試料へ適用する。

4. 研究成果

(1) LC/MS による尿中抱合型ステロイド代謝物プロファイル解析

コレステロール及びその酸化生成体であるオキシステロールが硫酸抱合体に変換された後、尿中に排泄されていることが推測されることから、硫酸抱合型コレステロール及びオキシステロールの LC/ESI-MS/MS による一斉分析法を構築した。すなわち、尿を疎水性 - 弱陰イオン交換ミックス固定相を用いる固相抽出による簡便な前処理後、Pulsed-Q dissociation モードでの LC/ESI-MS/MS により脱プロトン化分子 硫酸イオンへの特徴的なトランジションを測定することが有用であることを見出した。さらに同一尿試料中における抱合型糖質コルチコイド代謝物 30 種のプロファイル分析法を開発した。すなわち、尿を疎水性 - 弱陰イオン交換ミックス固定相を用いる固相抽出によりグルクロン酸抱合体と硫酸抱合体に分画後、それぞれ LC/MS 分析に付したところ、マトリックス効果を受けず、満足のいく精度・正確度を有する測定法を開発することができた。また、本法を健常人尿に適用したところ、グルクロン酸抱合体、硫酸抱合体ともに昼間が高く、朝と夜が低いという日内変動が認められることが明らかになった (図 1)。

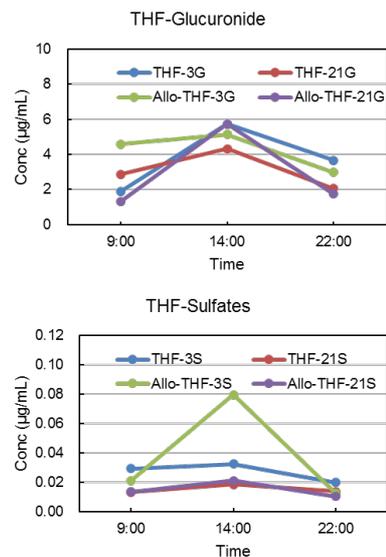


図 1 抱合型テトラヒドロコルチゾールの日内変動

一般に血中コルチゾールの日内変動では ACTH が高くなる起床直後が最も高く、昼頃までに急激に減少し、その後、夜にかけて徐々に減少し続ける。尿中抱合体についてはピークとなる時間が血中コルチゾールと比較して遅くなっているが、これはコルチゾールがテトラヒドロ体さらには抱合体へと代謝されるまでに時間がかかるためにおこったものと考えられる。以上の結果は、今後、採尿時間にも考慮する必要があるなど、実用化に

際しての知見が得られた。

(2) 乾燥ろ紙尿への適用

ろ紙に尿 50 μ L を塗布し、風乾後、尿が浸透した部分を裁断し、水、2%メタノール、4%メタノール、等張リン酸緩衝液 (PBS)、又は 2%トリフルオロ酢酸 (各々 3 mL) 中で超音波抽出した。固相抽出により脱塩後、LC/MS 分析に付したところ、グルクロン酸抱合型テトラヒドロコルチコステロイドは水または 2%メタノール、硫酸抱合体は PBS を抽出溶媒として用いたときに最も回収率が高かった。これは、ろ紙からの抽出率のみならず、抽出液を直接逆相系固相抽出したために、後者の回収率が影響しているものと考えられる。内因性テトラヒドロコルチコステロイドはグルクロン酸抱合体が主であり、硫酸抱合体はその 1/100 程度である。そこで、低濃度の硫酸抱合体を優先して抽出溶媒として PBS を用いることとした。また、ろ紙として、セルロースろ紙 (一般定性ろ紙、クロマトグラフィ用ろ紙、血液採取用ろ紙) とガラス繊維ろ紙で抽出率を比較したところ、大差は認められなかった。なお、抽出時間 (5~20 分) でも大差は認められなかった。そこで、安価なセルロース製一般定性ろ紙を用い、抽出溶媒に PBS、抽出時間を 10 分とすることとした。本前処理の全操作での絶対回収率はおよそ 80~110% と十分なものであった。本法によるグルクロン酸抱合体のアッセイ内・アッセイ間変動の相対標準偏差は 2.3~14%、添加回収率は 106~124% であり、満足のいく精度、正確性を有していた。また、本法による乾燥ろ紙中グルクロン酸抱合型テトラヒドロコルチコステロイド濃度と、既報による液体尿中のそれは、良好な相関性を示した (図 2)。

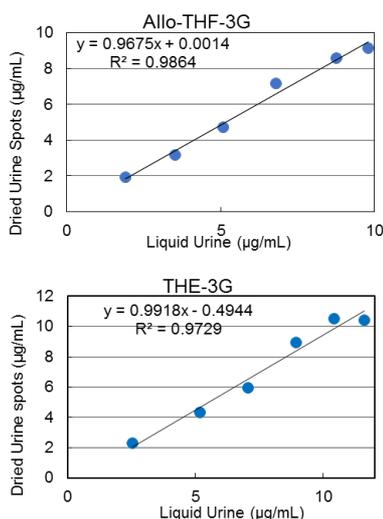


図 2 グルクロン酸抱合型テトラヒドロコルチコステロイドの乾燥ろ紙中濃度と液体尿中濃度の相関

さらに、乾燥ろ紙尿を室温または -20 で一

定期間保存後、グルクロン酸抱合体濃度を測定したところ、保存期間 1 週間程度までなら室温でも測定値の変動は 15%以内であった (図 3)。

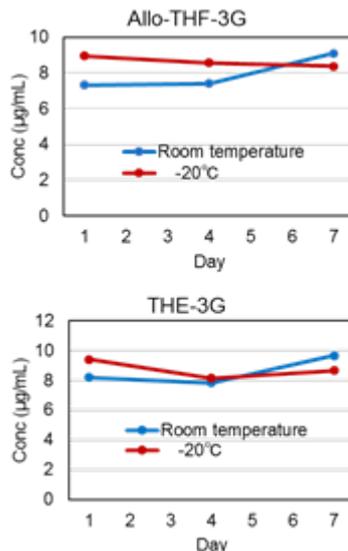


図 3 乾燥ろ紙尿中グルクロン酸抱合型テトラヒドロコルチコステロイドの安定性

以上のように、LC/MS/MS による乾燥ろ紙尿中抱合型テトラヒドロコルチコステロイド定量法を開発した。尿中テトラヒドロコルチコステロイドは内分泌疾患の指標としてのみならず、近年、テトラヒドロコルチゾンとテトラヒドロコルチゾール比はメタボリックシンドロームの指標として、また、5 系と 5 系 (アロ体) の比は性分化疾患 (5 レダクターゼ欠損症) などの指標としても注目されつつある。しかし、先述の通り、これらの検査には、脱抱合と誘導体化反応が必要であり、煩雑である。さらに、各抱合体のプロファイルと病態との関連は明らかではない。一方、LC/MS による直接定量法は簡便であるものの、標品の入手が困難なことから、我々の研究室をはじめ測定可能な施設は限られている。今回開発した乾燥ろ紙尿法は、より簡便な郵送が可能となったことにより尿中の抱合型ステロイドホルモンを対象とし検体検査が進み、病態の解明、病因の解析、疾患の診断の一助とな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 5 件)

Two major bile acids in the hornbills, (24R,25S)-3,7,24-trihydroxy-5-cholestan-27-oyl taurine and its 12-hydroxy derivative. Satoh R, Ogata H, Saito T, Zhou B, Omura K, Kurabuchi S, Mitamura K, Ikegawa S, Hagey LR, Hofmann AF, Iida T, *Lipids*, 61 (6), 757-768

(2016). DOI: 10.1007/S11745-016-4150-0
Identification of aldolase A as a potential diagnostic biomarker for colorectal cancer based on proteomic analysis using formalin-fixed paraffin-embedded tissue. Yamamoto T, Kudo M, Peng WX, Takata H, Takakura H, Teduka K, Fujii T, Mitamura K, Taga A, Uchida E, Naito Z, *Tumor Biol.* 37(10), 13595-13606 (2016). DOI: 10.1007/s13277-016-5275-8
Novel, major 2⁻ and 2⁻-hydroxy bile alcohols and bile acids in the bile of *Arapaima gigas*, a large South American river fish. Sato Née Okihara R, Saito T, Ogata H, Nakane N, Namegawa K, Sekiguchi S, Omura K, Kurabuchi S, Mitamura K, Ikegawa S, Raines J, Hagey LR, Hofmann AF, Iida T. *Steroids*, 107,112-120 (2016). DOI: 10.1016/j.steroids.2016.01.001
Improvement of solid material for affinity resins by application of long PEG spacers to capture the whole target complex of FK506. Mabuchi M, Shimizu T, Ueda M, Mitamura K, Ikegawa S, Tanaka A. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 25 (14), 2788-2792 (2015). DOI: 10.1016/j.bmcl.2015.05.014
Development and validation of a method for determination of plasma 25-hydroxyvitamin D₃ 3-sulfate using liquid chromatography/tandem mass spectrometry. Higashi T, Goto A, Morohashi M, Ogawa S, Komatsu K, Sugiura T, Fukuoka T, Mitamura K. *J. Chromatogr. B*, 969, 230-234 (2014). DOI: 10.1016/j.chromb.2014.08.027

[学会発表](計 14 件)

松本孝彬、山崎航、小川祥二郎、三田村邦子、池川 繁男、東 達也、ICD - LC/ESI-MS/MS による尿中テトラヒドロコルチコステロイドグルクロニドの定量法の開発、2017 年 3 月 25~27 日、日本薬学会第 137 年会、仙台国際センター(仙台)。
山本哲志、谷田和香奈、橋 知樹、三田村邦子、多賀淳、細胞外基質 Lumican の発現抑制による新規膵臓癌細胞増殖抑制法の開発、2017 年 3 月 25~27 日、日本薬学会第 137 年会、仙台国際センター(仙台)。
Yamamoto T, Shiburo R, Mitamura K, Taga A. Identificaiton of antitumor component in maple syrup to develop novel anti-cancer drugs for colorectal cancer. 2016 年 10 月 6 日~8 日、第 75 回日本癌学会学術総会、パシフィコ横浜(横浜)。
Kubota C, Yamamoto T, Mitamura K, Taga A. The role of maple syrup on cell proliferation of colorectal cancer cells. 2016 年 10 月 6 日~8 日、第 75 回日本癌学会学術総会、パシフィコ横浜(横浜)。
Yamamoto T, Shiburo R, Mitamura K, Taga

A. Protein component in maple syrup has a potential to develop novel anti-cancer drugs for colorectal cancer. 2016 年 5 月 21 日~24 日、米国消化器病週間(DDW2016)、サンディエゴ(USA)。

Takakura H, Yamamoto T, Mitamura K, Kudo M, Naito Z, Taga A.: The role of cyclophilin A as a novel therapeutic target of colorectal cancer based on proteome analysis using formalin-fixed and paraffin embedded colorectal cancer tissue. 2016 年 5 月 21 日~24 日、米国消化器病週間(DDW2016)、サンディエゴ(USA)。
三田村邦子、森 莉子、上田麻美子、亀井美希、山本哲志、多賀淳、LC/ESI-MS による乾燥ろ紙尿中糖質コルチコイド代謝物のスクリーニング法の開発、2016 年 3 月 27 日~29 日、日本薬学会第 136 年会、パシフィコ横浜(横浜)。

三田村邦子、薬学による臨床化学へのアプローチ、シンポジウム「臨床化学の未来を拓く」、2015 年 10 月 30 日~11 月 1 日、第 55 回日本臨床化学会年次学術集会、大阪大学コンベンションセンター(大阪)

Mitamura K, Kurabuchi S, Ueda M, Yamamoto T, Taga A, Ikegawa S, Comparison of the sensitivity and selectivity for the CID and PQD mode in the analysis of conjugated steroids、第 63 回米国質量分析学会(ASMS 2015)、2015 年 5 月 31 日~6 月 4 日、セントルイス(USA)。

三田村邦子、LC/MS による抱合型ステロイド代謝物測定~臨床への応用を目指して~、2015 年 4 月 10 日、日本分析化学会近畿支部 2015 年度第 1 回講演会、大阪科学技術センター(大阪)。

三田村邦子、上田麻美子、山本哲志、多賀淳、池川繁男、LC/ESI-MS/MS による尿中抱合型テトラヒドロコルチコステロイドのプロファイル分析、2015 年 3 月 26 日~28 日、日本薬学会第 135 年会、神戸サンボーホール(神戸)。

三田村邦子、蔵淵 慧、上田麻美子、池川繁男、山本哲志、多賀 淳、LC/ESI-LIT-MS/MS における PQD 及び CID 測定による尿中硫酸抱合型ステロイドの分析、2014 年 10 月 16 日~17 日、第 39 回日本医用マススペクトル学会年会、三井ガーデンホテル千葉(千葉)。

上田麻美子、三田村邦子、山本哲志、多賀淳、LC/ESI-MS/MS による尿中抱合型テトラヒドロコルチコステロイドのプロファイル分析 - 硫酸抱合体とグルクロン酸抱合体の分別定量の試み -、2014 年 10 月 11 日、第 64 回日本薬学会近畿支部総会・大会、京都薬科大学(京都)。

蔵淵慧、三田村邦子、池川繁男、山本哲志、多賀淳、同位体希釈 LC/ESI-MS/MS によるヒト尿中硫酸抱合型オキシステロールの高感度直接一斉定量法の開発、2014 年 10 月 11

日、第 64 回日本薬学会近畿支部総会・大会、
京都薬科大学（京都）。

6 . 研究組織

(1)研究代表者

三田村 邦子 (MITAMURA, Kuniiko)

近畿大学・薬学部・准教授

研究者番号：70242526

(2)研究分担者

なし