

平成 30 年 6 月 5 日現在

機関番号：13501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10581

研究課題名(和文) 探針エレクトロスプレー法質量分析装置による癌バイオマーカーの検索と臨床応用

研究課題名(英文) Search for cancer biomarkers and clinical application, Using a probe electropray mass spectrometry

研究代表者

山岸 敬 (YAMAGISHI, Takashi)

山梨大学・大学院総合研究部・助教

研究者番号：30436860

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：この研究の目的は尿を検体として探針エレクトロスプレー法で得られる質量スペクトルから癌患者と非癌患者の特異的差異を判別することで、前立腺癌と膀胱癌に対するスクリーニングシステムを構築することである。今回得られた質量スペクトルの視覚的差異は明らかでなく、統計的解析が可能な検体数を収集して解析するまでには至らなかった。しかし、数千以上の十分な検体を得ることができれば、統計的解析のみならず帰納的学習機械を用いた確率的解析によりスクリーニングシステムを構築できる可能性はある。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study is to construct a screening system for prostate cancer and bladder cancer by distinguishing specific differences between the cancer patients' and non-cancer patients' mass spectrum obtained by probe electropray ionization-mass spectrometry using urine. The visual differences of the mass spectrum obtained this study were not clear, and statistical analysis could not be performed because the number of samples was small. However, if it is possible to obtain thousands or more of sufficient specimens, there is a possibility that a screening system can be constructed not only by statistical analysis but also by stochastic analysis using an inductive learning machine.

研究分野：医歯薬学

キーワード：質量スペクトル 膀胱癌 前立腺癌 診断装置 癌バイオマーカー

1. 研究開始当初の背景

現在、医療現場では腫瘍マーカーが癌診断補助法として広く用いられているが、検体内の単一成分にのみ着目しているに過ぎず、閾値から著明に逸脱している場合を除けば、感度、特異度、ともに参考程度にしかならない腫瘍マーカーがほとんどである。また、検体採取から結果報告まで30分から数時間かかる項目がほとんどであり、時に数日を要する項目も存在する。泌尿器科悪性疾患の代表である前立腺癌では血清 PSA (Prostate Specific Antigen) が有効な腫瘍マーカーであるが、臨床現場では結果報告まで40分から50分を要し、検査キットを持たない医療機関では外部検査機関に委託する必要がある数日を要する。また、PSA値が4.0~10.0ng/mlである場合、前立腺生検が必要となるが、癌陽性率は20-30%と感度は決して高くなく、不要な前立腺生検が行われていることが現状である。膀胱癌に関しては有効な腫瘍マーカーが存在せず、肉眼的血尿といった臨床症状を認めて初めて精査を行い、膀胱癌の診断を得る事がほとんどである。また、健診尿検査で顕微鏡的血尿を認めた場合でも膀胱癌に対しては非常に特異度が低い。このような臨床現場において、迅速性に優れた、高感度、高特異度の補助診断法を開発することができれば広く普及することになり、探針エレクトロスプレー法による質量スペクトル分析装置が利用できるのではないかと考える。

従来のエレクトロスプレー法は、試料供給部にキャピラリーが使用されている(図1)。このキャピラリー先端をナノ化することで試料の検出効率を上げることができるのだが、キャピラリー径のナノ化には目詰まりなどの理由により限界がある。山梨大学クリーンエネルギー研究センター平岡らは、キャピラリーの究極型ともいえる探針を用いることで、試料の検出効率を極限まで上昇させた(K. Hiraoka et al., Rapid Commun. Mass Spectrom., 21, 3139-3144 (2007))。探針先端に薄く濡らす程度に捕捉される試料は数pLとごく微量であるため、高電圧負荷による表面電荷密度は上昇して分子を効率よくイオン化することができる。このような原理である探針エレクトロスプレー法の持つ様々な特徴をまとめると以下ようになる。

(1) 放電破壊現象が起こりにくいいため大気圧下での測定が可能である、(2) 液体はもとより水分を含むものすべてが測定対象となる、(3) 試料の前処理は不要、(4) 直接的なリアルタイムでの迅速分析が可能、(5) 塩を含む生体試料(尿など)において塩由来のクラスターイオンはほとんど観測されないため脱塩などの処理が不要。(6) 探針駆動部は構造がシンプルなため装置が小型である。

この質量分析装置はコンパクトであり、簡便かつ迅速性に優れており、臨床現場で必要とさせる条件を満たしている。山梨大学 解

剖学教室 竹田らは、淡明型腎細胞癌に対して迅速診断の有用性を報告している(S. Takeda et al., J.Anal. Oncol., 1, 74-80 (2012))。

探針エレクトロスプレー法では2分ほどで質量スペクトルを得ることができる(図2)。得られる質量スペクトルは1500~2000m/z以下の低分子領域で威力を発揮し、単一成分の濃度に着目するのではなく、構成成分の質量比を連続的に分析し出力する。そのスペクトルのピークは正常検体と癌細胞を含む検体とでは差異が生じる。その差異を検出して、質量と閾値を設定することで質量スペクトルから癌診断を行うことが可能と考える。

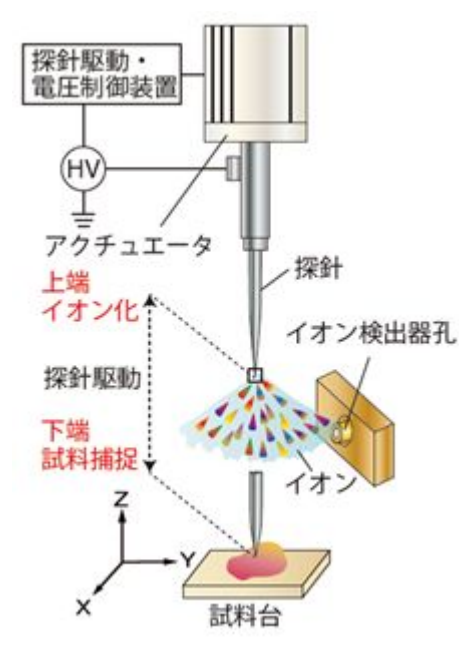


図1 探針エレクトロスプレー法概略図

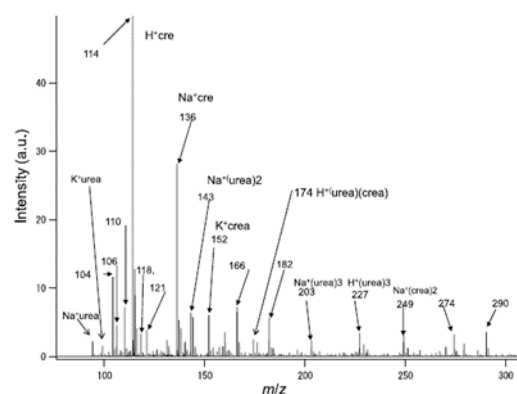


図2 質量スペクトル(人の尿)

2. 研究の目的

探針エレクトロスプレー法を用い、臨床上もっとも低侵襲で分量採取することができる尿を検体として質量分析を行い、その質量スペクトルから癌に特徴的なピーク（もしくはピークの消失）を得て、癌患者と非癌患者の特異的差異を判別することで、前立腺癌と膀胱癌に対する健康診断レベルでスクリーニングを、より簡便に迅速にそして安価に行うことができるシステムを構築することが本研究の目的である。

最終的には、泌尿器科領域において多種にわたる癌腫の診断に対して、探針エレクトロスプレー法を即時診断可能な臨床検査装置として応用する癌診断へとつなげる。副次的項目として前立腺癌、尿路上皮癌、腎癌の新規バイオマーカーの解明へ。

3. 研究の方法

PSA 値が基準値以上で前立腺生検予定である患者の直腸診直後の尿を採取し検体とする。これは直腸診により前立腺液が尿中に分泌され、その前立腺液内には前立腺癌特異物質が含まれている可能性があり、直腸診を行わない場合に比べ、癌患者と非癌患者の差異を生じやすくなると考えられる。経尿道的膀胱腫瘍摘除術予定の患者からの採尿は、手術当日早朝尿を採取して検体とする。その理由として、早朝尿は膀胱粘膜との接触時間が最も長く、癌特異物質の尿中移行量が1日の中で得られる尿の中で最大と考えられるためである。コントロールとして悪性腫瘍を持たない人（ボランティア）の尿を用いる。それぞれの検体は処置することなく-80℃で冷凍保存する。ある程度の検体が蓄積したら、検体を解凍しそれぞれの検体に対して探針エレクトロスプレー法による質量分析を行い、質量スペクトルを得る。病理組織診断で悪性腫瘍の診断がついた検体と悪性腫瘍を認めない検体のスペクトルの差異を、視覚的もしくは定量化後に統計学的に検出し、そして同時に検体に対しメタボローム解析を行って、その特異的ピークに対応する物質を同定する。そして悪性腫瘍特異的物質の質量ピークもしくは欠損物質の閾値を統計学的に設定し、最終的に癌補助診断へと応用する。

4. 研究成果

検体採取は統一性を持たせるため、同一医師が詳細な説明を行うため、同意書を得るまでに相当な時間を必要とした。そのため日常診療中に採取できた検体の数は限られたが、前立腺癌患者と膀胱癌患者の尿検体を数例得ることができた。その少ない検体でまずは分析を行った。当大学で開発されたイオン化法による質量スペクトル分析装置である探針エレクトロスプレー法にて質量スペクトルを得た。しかし、検体数が少なすぎるため統計学的な解析を行うまでには至らなかった。また、以前に得られた健常者の尿のスペクトルと比較して、得られた癌患者のスペクトルには、明らかな視覚的差異は確認することができない結果であった。しかし、予定検体数に達する前にメタボローム解析を行うことで、有用なデータを得ることができると判断し、外注先業者を数社選定していたが、外注検査費用と予算の折り合いがつかずにメタボローム解析を行うことができなかった。帰納的学習機械を用い確率的診断を算出する方法は研究開始当初では検討する項目であったが、明らかに検体数が足りずに不能であると判断した。少ない検体数でも確率的診断を行うことができる方法を模索したが、適切な方法が見つからずに断念した。

しかし、帰納的学習機械の有用性は学会（2013年第101回日本泌尿器科学会総会）で腎がんに関して報告済みであり（図3、図4）、適切な検体数としては数千症例以上ではあるが、収集することができればスクリーニングシステムを構築できる可能性はある。

しかし、帰納的学習機械の有用性は学会（2013年第101回日本泌尿器科学会総会）で腎がんに関して報告済みであり（図3、図4）、適切な検体数としては数千症例以上ではあるが、収集することができればスクリーニングシステムを構築できる可能性はある。

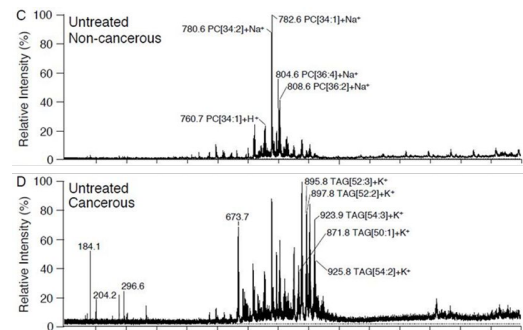


図3
上段：正常腎組織の質量スペクトル
下段：淡明細胞型腎細胞の質量スペクトル

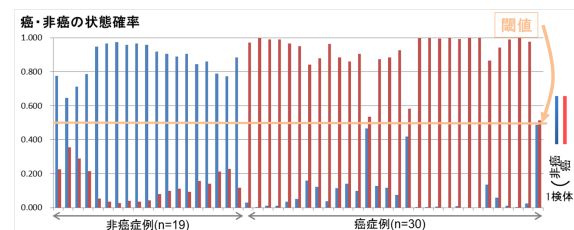


図4 帰納的学習機械による解析結果

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）

〔学会発表〕(計 1 件)

山岸 敬

探針エレクトロスプレー (PESI) と帰納的学習機械 (dPLRM) を組み合わせた癌診断装置の可能性 腎細胞癌において
第 101 回日本泌尿器科学会総会
2013 年 4 月 26 日さっぽろ芸術文化の館

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山岸 敬 (YAMAGISHI, Takashi)

山梨大学・大学院総合研究部・医学研究員
研究者番号：30436860

(3)連携研究者

宮本 達也 (MIYAMOTO, Tatsuya)
山梨大学・大学院総合研究部・助教
研究者番号：80456459

(2016年5月31日まで連携研究者)

神家満 学 (KAMIYAMA, Manabu)
山梨大学・大学院総合研究部・講師
研究者番号：90362061

井原 達矢 (IHARA, Tatsuya)
山梨大学・大学院総合研究部・助教
研究者番号：

武田 正之 (TAKEDA, Masayuki)
山梨大学・大学院総合研究部・教授
研究者番号：80197318