

令和元年6月14日現在

機関番号：15201

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K21173

研究課題名(和文)性分化疾患の診断を目的としたタンデムマスによる血中ステロイドー斉分析法の確立

研究課題名(英文)Diagnosis of disorders of sex development (DSD) by steroid profiling using dried blood spots and electrospray ionization/tandem mass spectrometry (MS/MS)

研究代表者

虫本 雄一 (Mushimoto, Yuichi)

島根大学・医学部・特別協力研究員

研究者番号：90467712

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：出生週数37週から42週未満、出生体重2,500 g以上、正期産児の生後5日目血液ろ紙血を用いて、タンデムマスを用いた血中ステロイド分析法を確立した。目的とする12物質のキャリブレーターをろ紙血で作成し、内部標準にはCHS MSMS Steroids Kitを用いた。ステロイド合成酵素欠損症として先天性副腎過形成患者の血液ろ紙を同一患者からの複数検体を含む12検体の分析を行い、170HP高値等により診断が可能であることを確認した。その他、P450オキシドレダクターゼ(POR)欠損症1例の分析も行うことができ、正常コントロールと区別することができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

血液ろ紙血によるタンデムマスを用いた血中ステロイド分析法を確立した。少量の血液で血中ステロイド全体のプロファイルを評価できることは、新生児期にとって侵襲が少なく検査を行いやすくなる。また、ステロイドの尿中代謝産物を評価していた尿中ステロイドプロファイルと異なり、血中ステロイドを直接評価できることで、どの部位の酵素障害かを検討する事が容易になる。DSDの診断を簡単かつ迅速に行うことが可能となれば、治療や性別判定までの時間を短縮することができ、臨床現場におけるメリットは大きい。

研究成果の概要(英文)：We investigated the efficacy of steroid profiling using dried blood spots and electrospray ionization/tandem mass spectrometry (MS/MS). The difference of the 17-Hydroxyprogesterone(170HP) between 12 patients with congenital adrenal hyperplasia(CAH) and control subjects was remarkable. A patient with cytochrome p450 oxidoreductase deficiency(PORD) was distinguished from control subjects. Our results raise the possibility that our method was useful for the diagnosis of patients with disorders of sex development (DSD).

研究分野：小児内分泌

キーワード：性分化疾患 DSD タンデム質量分析 ステロイド

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

### (1) 性分化疾患におけるステロイド合成酵素欠損症の迅速な診断法の必要性

DSD の診断には、下垂体ホルモンの測定、画像検査 (超音波、MRI、尿道造影)、染色体検査に加えて、ステロイドもしくはその代謝産物の評価等が必要である。現時点では、特に新生児においては必要血液量の問題からステロイド代謝産物の評価が十分にできないため、ステロイド合成酵素欠損症の診断、または除外のためには、最終的に遺伝子検査が必要な場合もあり、迅速な診断が困難な状況である。

### (2) 現在行われているステロイド合成酵素欠損症のための検査には限界がある

ステロイド合成酵素欠損症の中で最も頻度が高い先天性副腎過形成 (21 水酸化酵素欠損症) は、新生児マス・スクリーニングの対象疾患である 1)。診断マーカーである 17 -ヒドロキシプロゲステロン (17 -OHP) は、他のステロイド合成酵素欠損症の鑑別にも使用されるが、血液ろ紙血、または血清を用いた免疫化学的測定法により測定されている。しかし、胎児副腎由来物質と交差反応を起こすため偽高値となる場合が多く、精度は低い。その他の血中ステロイド代謝産物では、17-ヒドロキシプレグネノロン、デオキシコルチコステロン、プロゲステロン、プレグネノロン、DHES、アンドロステンジオンが一般検査で可能であるが、個々での測定が必要なため採血量が多く (1 検体で血清 0.5ml)、新生児期に同時に検査を行うのは現実的ではない。

現在、国内で主流となっているのは、ガスクロマトグラフィ質量分析法 (gas chromatography mass spectrometry:GC/MS) による尿中ステロイド分析である 2)。侵襲が少ない尿を使用しているメリットがある一方で、尿中代謝産物の測定であるため、血中ステロイドの変動との時間差が生じること、2 つ以上の血中ステロイドが同じ代謝産物として測定されることが課題であった。また、代謝産物の評価には特別な知識が必要であり、検査の専門家でなければ結果の判読が困難であった。

近年、欧米を中心にタンデムマスを用いた液体クロマトグラフタンデム型質量分析法 (liquid chromatography tandem mass spectrometry:LC/MS/MS) による血中ステロイド分析が普及しつつあるが、国内での報告はわずかである。

## 2. 研究の目的

タンデムマスによる血中ステロイド一斉分析を用いた低侵襲かつ迅速な DSD の診断法の確立する

## 3. 研究の方法

少量の血液サンプルで検査可能なタンデムマスによる血中ステロイドの一斉分析法を確立するため、以下の 2 項目を検討した。

(1) 正常新生児の血液を用いてステロイド一斉分析を行い、正常新生児期のステロイドプロファイルを検討する

(2) 確定診断のついている性分化疾患症例を対象として、疾患特有なステロイドプロファイルを検討する

タンデムマスによるステロイド一斉分析方法

・液体クロマトグラフタンデム型質量分析 (liquid chromatography tandem mass spectrometry:LC-MS/MS) を用いる

・安定同位体を用意し、内部標準法による定量を行う

・検体は、直径 3mm の血液ろ紙片 5 枚 (全血として 15 $\mu$ l に相当)、または血清の場合には 200 $\mu$ l 未満、で測定を行う

・カラムを用いて、検体を分離する

・測定項目の標品を入手し、MRM の最適化を行い条件設定を行う

【16 種類のステロイド代謝産物測定項目】

1. ミネラルコルチコイド：コレステロール、プレグネノロン、プロゲステロン、デオキシコルチコステロン、コルチコステロン、18 ヒドロキシコルチコステロン、アルドステロン

2. グルココルチコイド：17 ヒドロキシプレグネノロン、17 ヒドロキシプロゲステロン、11 デオキシコルチゾール、コルチゾール

3. 性ステロイド：デヒドロエピアンドロステロン (DHEA)

デヒドロエピアンドロステロンサルフェイト(DHEA-S)、アンドロステンジオン、テストステロン、エストラジオール

#### 4. 研究成果

##### 【血液ろ紙血によるタンデムマスを用いた血中ステロイド分析法の確立】

出生週数 37 週から 42 週未満、出生体重 2,500 g 以上、正期産児の生後 5 日目血液ろ紙血を用いて、タンデムマスを用いた血中ステロイド分析法を確立した。対象としたステロイド代謝産物は、コルチゾール、11 デオキシコルチゾール(11-DOF)、21 デオキシコルチゾール、17 ヒドロキシプロゲステロン、17 ヒドロキシプレグネノロン、コルチコステロン、デオキシコルチコステロン(DOC)、プロゲステロン、プレグネノロン、テストステロン、アンドロステンジオン、デヒドロエピアンドロステロンの 12 種類。目的とする 12 物質のキャリブレーターをろ紙血で作成し、内部標準には CHS MSMS Steroids Kit を用いた。

【確定診断のついている性分化疾患症例を対象として、疾患特有なステロイドプロファイルを検討する】

ステロイド合成酵素欠損症として先天性副腎過形成患者の血液ろ紙を同一患者からの複数検体を含む 12 検体の分析を行い、170HP 高値等により診断が可能であることを確認した。その他、P450 オキシドレダクターゼ (POR) 欠損症 1 例の分析も行うことができ、正常コントロールと区別することができた。

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3 件)

#1 Wada K, Kobayashi H, Moriyama A, Haneda Y, Mushimoto Y, Hasegawa Y, Onigata K, Kumori K, Ishikawa N, Maruyama R, Sogo T, Murphy L, Taketani T:

A case of an infant with congenital combined pituitary hormone deficiency and normalized liver histology of infantile cholestasis after hormone replacement therapy.

Clin Pediatr Endocrinol 査読あり 26(4):251-257, 2017, doi: 10.1297/cpe.26.251

#2 阿部 恭大、美根 潤、岸 和子、虫本 雄一、南 憲明、高橋 幸利、竹谷 健:

リツキシマブが有効であった難治性非ヘルペス性急性辺縁系脳炎の女児例  
小児科臨床 査読あり 70(9):1414-1418, 2017 doi:なし、オープンアクセスなし

#3 Yamada K, Kobayashi H, Bo R, Purevsuren J, Mushimoto Y, Takahashi T, Hasegawa Y, Taketani T, Fukuda S, Yamaguchi S.

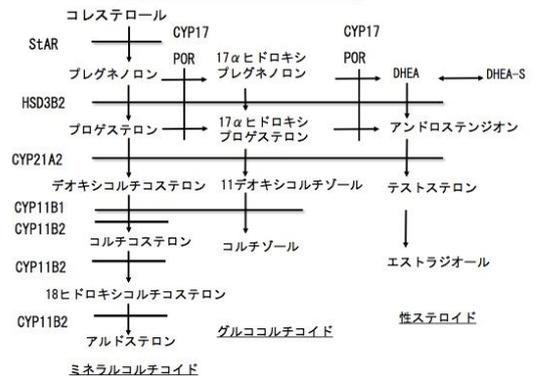
Efficacy of bezafibrate on fibroblasts of glutaric acidemia type II patients evaluated using an in vitro probe acylcarnitine assay.

Brain Dev. 査読あり 39(1):48-57. 2017 doi: 10.1016/j.braindev.2016.08.004.

〔学会発表〕(計 28 件)

#1 虫本 雄一、大久保 一宏、トカン ヴラット、戸田 尚子、石井 加奈子：遺伝子検査

#### ステロイド合成経路



で確定診断に至っていない LPL 欠損症疑いの 9 歳女児例、第 2 回日本小児内分泌学会九州・  
沖縄地方会 2019 年 2 月 23 日

#2 Miyako K, Suzuki S, Mushimoto Y:Investigation of vitamin D status in children with  
growth disorder. 10<sup>th</sup> Biennial Asia Pacific Pediatric Endocrine Society (APPES) Scientific  
Meeting, Nov 7-10, 2018

#3 鈴木秀一、虫本雄一、都研一：ケトアシドーシスと高度脱水から急性腎不全を呈した自閉  
症スペクトラム障害の 1 型糖尿病、14 歳男児例

第 52 回日本小児内分泌学会学術集会 2018.10.4-6

#4 都研一、虫本雄一、勝又規行：McCune-Albright 症候群骨病変における *GNAS* 遺伝子変異  
解析と FGF23 の発現プロファイル、第 22 回小児分子内分泌研究会 2018.7.7-8

#5 大坪寛央、虫本雄一、鈴木秀一、都研一、李守永、原寿郎：糖尿病ケトアシドーシスと高  
血糖高浸透圧症候群が混在したインスリン抵抗性を伴う 1 型糖尿病の 9 歳女児例、第 500 回日  
本小児科学会福岡地方会例会 2018.6.9

#6 虫本雄一、鈴木秀一、河野敦子、都研一：フラッシュグルコースモニタリングの導入によ  
って小児 1 型糖尿病初発入院時における基礎インスリンの比率は低下した、第 61 回日本糖尿  
病学会年次学術集会 2018.5.24-26

#7 鈴木秀一、虫本雄一、河野敦子、都研一、武市実奈、西村真直、郭義胤、野津寛大：矮小  
陰茎、停留精巣、高度蛋白尿を契機に不全型 Denys-Drash 症候群が疑われた 1 例、第 91 回日  
本内分泌学会学術総会 2018.4.26-28

#8 鈴木秀一 虫本雄一 河野敦子 都研一：成長障害におけるビタミン D 不足の関与に関す  
る研究、第 121 回日本小児科学会学術集会 2018.4.20-22

#9 鈴木秀一、虫本雄一、河野敦子、都研一：25(OH)VD の評価におけるピットフォール：季  
節性、PTH、基準値に関連して、第 1 回日本小児内分泌学会九州・沖縄地方会 2018.2.11

#10 Miyako K, Suzuki S, Mushimoto Y, Wada T, Kurosawa K:A Japanese pedigree of  
ATR-X syndrome in which each individual showed various degrees of manifestations.

10th International Meeting of Pediatric Endocrinology.Sep 14-17, 2017

#11 虫本雄一、河野敦子、鈴木秀一、都研一：低身長を主訴に受診した児の 10 人に 1 人は治  
療の対象となる、第 120 回日本小児科学会学術集会、2017.4.14-16

#12 虫本雄一、江藤潤也、河野敦子、勝又規行、都研一：McCune-Albright 症候群骨病変にお  
ける *GNAS* 遺伝子変異解析と FGF23 の発現プロファイル、第 51 回日本小児内分泌学会学術  
集会、2017.9.28-30

#13 鈴木秀一、虫本雄一、河野敦子、都研一：日本人幼児の多くは潜在的なビタミン D 欠乏状  
態の可能性がある、第 51 回日本小児内分泌学会学術集会、2017.9.28-30

#14 河野敦子、鈴木秀一、虫本雄一、都研一：低身長と卵巣形成不全を合併した 47,XXX の 1  
例、第 17 回日本内分泌学会九州支部学術集会、2017.9.2

#15 虫本雄一、鈴木秀一、河野敦子、都研一：持続血糖測定器「リブレ Pro®」による血糖モ  
ニタリングを行った小児 1 型糖尿病初発 3 名の検討、第 23 回日本小児・思春期糖尿病研究会  
年次学術集会、2017.7.16

#16 虫本雄一：小児 1 型糖尿病の初期治療における持続血糖測定器「リブレ Pro®」の有用性  
第 484 回福岡市糖尿病アーベント、2017.6.20

#17 芹田陽一郎、森さよ、虫本雄一、鈴木秀一、佐々木敦子、都研一、原寿郎：著明な成長障  
害を契機に診断された萎縮性甲状腺炎の 1 例、第 495 回日本小児科学会福岡地方会例会、  
2017.6.10

#17 小柳美里、下村瑞代、虫本雄一、都研一：極端な糖質制限を行っていた 1 型糖尿病の 15

歳女子例：カーボカウントの落とし穴、第 60 回日本糖尿病学会年次学術集会、2017.5.18-20

#18 Yuichi Mushimoto, Shuichi Suzuki, Sayo Mori, Yoshinori Koga, Yoshio Zaizen, Kenichi Miyako: A case of Bartter syndrome with severe failure to thrive and electrolyte abnormalities associated with cholelithiasis. The 9th biannual scientific meeting of the Asia Pacific Pediatric Endocrine Society (APPES), November 17-20, 2016

#19 鈴木秀一、虫本雄一、都研一、和田敬仁、黒澤健司：46, XY 性分化疾患と精神運動発達遅滞から ATR-X 症候群が疑われた 1 例、第 50 回日本小児内分泌学会学術集会、2016 年 11 月 16 日～17 日

#20 和田啓介、小林弘典、森山あいさ、羽根田泰宏、虫本雄一、長谷川行有紀、鬼形和道、岩橋輝明、石川典由、丸山理留敬、十河剛、梅津守一郎、川上牧夫、竹谷健：ヒドロコルチゾン補充で胆汁うっ滞性肝炎の病理像が劇的に改善した複合型視床下部下垂帯機能低下症の乳児例、第 50 回日本小児内分泌学会学術集会、2016 年 11 月 16 日～17 日

#21 虫本雄一、河野敦子、鈴木秀一、都研一：低身長を主訴に受診した 548 名の 3 年後の転帰、第 491 回日本小児科学会福岡地方会例会、2016 年 10 月 8 日

#22 虫本雄一：災害時の備えと対応（患児家族への説明用資料の御紹介）  
第 474 回福岡市糖尿病アーベント、2016 年 6 月 21 日

#23 虫本雄一、都研一、中枢性甲状腺機能低下症としてフォローされていた MCT8 遺伝子異常症の 1 例、第 3 回九州小児内分泌若手セミナー（平成の会）、2016 年 6 月 4 日

#24 森山あいさ、長谷川有紀、和田啓介、東本和紀、虫本雄一、山口清次、瀬島齊  
鼠径ヘルニアと広範囲蒙古斑が観察されていたムコ多糖症 2 型の 5 歳男児例

第 54 回山陰小児外科内科・周産期研究会 2016/2/3

#25 Kenichi Miyako, Yuichi Mushimoto, Atsuko Kawan: The correlation between the increase in insulin-like growth factor-I 24 hours after the first injection of growth hormone and the improved growth. 54th ESPE Meeting, October 1-3, 2015

#26 小林弘典、虫本雄一：タンデムマスを用いたろし血中ステロイドー斉分析、第 42 回日本マ  
スクリーニング学会、2015 年 8 月

#27 小林弘典、和田啓介、虫本雄一、坊亮輔、鬼形和道、杉本利嗣：部分 GHD に対する GH 治療を契機に低カルシウム血症が顕在化した常染色体優性低カルシウム血症の女児例、第 16 回日本内分泌学会中国支部学術集会、2015

#28 虫本雄一、小林弘典、長谷川行洋、望月弘、麻生敬子、阿部祥英、安蔵慎、佐藤英利、佐藤真理、曾根田瞬、田久保憲行、横田一郎、鶴原昭史、長崎啓祐、鬼形和道、宮崎徹、山口清次：小児の肥満、メタボリックシンドロームにおける AIM (apoptosis inhibitor of macrophage) の検討、第 49 回日本小児内分泌学会学術集会、2015

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

なし

## 6. 研究組織

(1)研究分担者

なし

(2)研究協力者

研究協力者氏名：小林 弘典

ローマ字氏名：(Kobayashi, hironori)

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。