

機関番号：23803

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20590034

研究課題名 (和文) 唾液を試料とする無侵襲ホルモン検査システムの開発と臨床応用評価

研究課題名 (英文) Development and application of determination methods of salivary hormones for noninvasive diagnosis of endocrine disorders

研究代表者

東 達也 (HIGASHI TATSUYA)

静岡県立大学・薬学部・准教授

研究者番号：90272963

研究成果の概要 (和文)：その採取において被験者負担が少ない唾液を検査試料，選択性に優れた高速液体クロマトグラフィー-エレクトロスプレーイオン化タンデム質量分析を方法論に選択し，また，検出指向誘導体化を駆使して臨床検査上重要な低分子ホルモン及び関連化合物の高感度・精密定量法を開発した．これらの定量法を実試料分析に応用し，唾液検査が先天性副腎過形成症の薬物療法，ビタミン D 供給状態の評価，加齢男性性腺機能低下症診断，バセドウ病患者診断などに有用であることを証明した．

研究成果の概要 (英文)：Saliva has recently been attracting attention as a noninvasive tool in clinical examinations. In this study, highly sensitive and specific liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry methods were developed for the determination of low-molecular weight hormones and related compounds in saliva. For some compounds, novel derivatization procedures were developed to enhance their detection responses. The developed methods were useful in the diagnosis and treatment for several diseases and deficiencies, such as congenital adrenal hyperplasia, vitamin D deficiency, late-onset hypogonadism and Graves disease.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010 年度	900,000	270,000	1,170,000
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：臨床分析科学

科研費の分科・細目：薬学・物理系薬学

キーワード：唾液，ホルモン検査，無侵襲，高速液体クロマトグラフィー-タンデム質量分析，分析科学

1. 研究開始当初の背景

臨床検査は複雑な現代社会に生きる我々にとって疾病の診断・早期発見ばかりでなく，安心で快適な生活を送るために不可欠なものであり，社会的に大きなニーズがある．特にホルモンは生命機能維持に必須の生体分子であり，その測定は新生児マススクリーニングに始まり，癌や骨粗鬆症のような加齢性疾患診断まで広範囲になされている．ホルモン検査は，信頼性の高い分析法によりなされることは当然ながら，そのための試料採取に

においても簡便で被験者の負担の少ないものへと要求が高まっている．現在，ホルモン検査は血液や尿を試料とする場合が圧倒的に多いが，これらの採取には苦痛を伴うことや常時のそれが難しい，感染の恐れがあるなどの欠点がある．唾液はこのような点が克服でき，被験者の負担の少ない (被験者フレンドリーな) 検査試料となり得る．一方，方法論としてホルモン検査の主流を占めるイムノアッセイは，交差反応に起因する診断ミス頻度が高いことが問題視されている．これに代

わるものとして、高速液体クロマトグラフィー-タンデム質量分析 (LC-MS/MS) に期待が寄せられているが、唾液による検査には感度の問題から実用に程遠い。言い換えれば、唾液中対象ホルモンのLC-MS/MS、特に汎用性に優れるエレクトロスプレーイオン化 (ESI)-MSにおける応答性を飛躍的に増大させることができれば、新しい無侵襲検査システムが実現するものと期待される。

2. 研究の目的

本研究では、対象ホルモンのESI-MS/MSにおける応答性の飛躍的増大をキーポイントとして、唾液を用いる無侵襲ホルモン検査システムの確立と臨床応用を目指した。すなわち、本研究は分析化学を武器として、現在の臨床検査の二大重要課題とも言える測定値信頼性の向上と被験者負担の大幅な低減の両方を一気に解決しようと計画されたものである。

3年の研究期間内で以下の項目について唾液を試料とする検査システムを確立することを当初の目的とした。また、医療現場への普及を最大限に考慮し、臨床応用性の評価までを期間内の達成目標とした。

- (1) 先天性副腎過形成 (CAH) 患児薬物投与量設定・治療効果確認のための17 α -ヒドロキシprogesterone (17OHP)
- (2) 骨粗鬆症予防診断マーカー、25-ヒドロキシビタミンD₃ (25OHVD₃)
- (3) 甲状腺機能診断マーカー、サイロキシン (T₄) 及びトリヨードサイロニン (T₃)

3. 研究の方法

- (1) まず、唾液中17OHP、25OHVD₃やT₄をはじめとする各種ホルモン及び関連化合物 (いずれもpg/mLオーダー) のLC-MS/MS分析法の開発を目指し、検出感度が不足するものについては、それを大幅に増大させる方策を検討した。すなわち、目的化合物の有する特徴的官能基 (オキソ基、共役ジエン、カルボキシル基など) と迅速かつ定量的に反応し、ESIに活性な高プロトン親和性原子団 (例: ピリジル基) を併せ持つ誘導体化試薬を選定し、高感度誘導体化法を開発した。そして各誘導体について、選択反応検出 (SRM) 構築に向けてLC-ESI-MS/MS挙動を精査した。なお、対象化合物自身がESI-MSに高感度な応答を示した場合には、誘導体化を行わず、その化合物に特異的なSRMを構築した。
- (2) 唾液採取には様々な器材が市販されているが、これらの利点・問題点を見極め、被験者側の負担と分析面のバランスの取れた最適の採取法を確立した。特に新生児の場合は、いかなる器材も使用できないので、プラスチック製スポイドなどによる採取を多方

面から評価した。唾液の前処理はスループットや医療現場のことも考慮して1段階の固相抽出のみの簡便なものを開発し、各種バリデーション試験により評価した。

(3) 各種ホルモン及び関連化合物に対して開発した分析法の臨床応用性を評価した。すなわち、唾液分析がCAH投薬量設定や治療効果確認に、あるいは骨粗鬆症予防のマーカーに利用できることを証明するために、血中と唾液中17OHPあるいは25OHVD₃の濃度の相関を吟味した。また、唾液中T₄レベルがパセドウ病診断に有用であること示すため、本疾患患者の唾液を分析した。

(4) ホルモン及び関連化合物の唾液中レベル変動を疾病診断に利用する場合、それが疾病以外の要因で、例えば唾液分泌量亢進などによって変動しないことを証明する必要がある。中性かつ脂溶性低分子ホルモンについてはこの点が解決され、唾液検査が実用化されているものもある。しかし、イオン性官能基を有する化合物については研究が不十分である。そこで、当初の試験項目に追加して、胆汁酸 (ステロイドカルボン酸) をモデル化合物とし、唾液分泌亢進 (ガム咀嚼) によるその濃度変動を解明、唾液検査実現のための基礎情報を獲得した。

4. 研究成果

当初の項目に加えて、加齢男性性腺機能低下 (LOH) 症候群マーカーのテストステロン (T) 及びデヒドロエピアンドロステロン (DHEA)、黄体や胎盤機能検査に有用なprogesterone (PROG) の唾液分析法も構築し、臨床応用性の評価を行った。以下に具体的な成果を記す。

(1) 17OHPはCAHの優れたマーカーであり、患児の薬物投与量設定・治療効果確認のためには、その血中濃度モニタリングが必須である。報告者は採血に伴う患児の苦痛や医療従事者の負担を低減させるべく、LC-ESI-MS/MSによる唾液中17OHP定量法を開発した。すなわち、まず、2-hydrazinopyridine (HP) による誘導体化を導入して唾液中17OHP (pgオーダー) の検出を可能にした。続いて、1段階の固相抽出による簡便な前処理法を開発し、精度・正確度試験、血中濃度との相関などの各種バリデーション試験を経て、定量法を確立した。本法をCAH新生児のヒドロコルチゾン (HC) 投与量設定に適用したところ、血液分析と同等の情報が得られた。さらにHCによる治療中の患児においても投薬後の17OHPレベルの減少が唾液から明瞭に読み取れ、治療効果モニタリングにも有用なことを証明した。

(2) ビタミンDの供給状態の指標で、骨粗鬆症予防診断マーカーとしても重要な

25OHVD₃の唾液中レベル測定法の開発と臨床応用評価を行った。25OHVD₃をPTADとの付加体に導くとともに移動相添加剤の工夫も行い、2 pg/mLの定量限界を達成した。(1)と同様のバリデーション試験を実施してLC-ESI-MS/MS定量法を確立後、ビタミンD供給状態の評価に本法を用いた。その結果、健常女性の唾液中25OHVD₃レベルが健常男性のそれよりも有意に低く、骨粗鬆症が女性に多いことと整合する結果を得、さらに唾液中25OHVD₃レベルが低値を示した被験者がビタミンD₃サプリメントを服用した場合、本法により唾液中25OHVD₃レベル上昇が明瞭に観察できた。このように、開発した方法がビタミンD供給状態評価法として優れていることを実証した。

(3) 加齢男性性腺機能低下 (LOH) 症候群の無侵襲診断を目指して唾液中テストステロン (T) 及びデヒドロエピアンドロステロン (DHEA) の同時定量法を開発した。本法では誘導体化試薬として2-hydrazino-1-methylpyridineを用いることにより、T及びDHEAの検出感度をそれぞれ4倍及び1600倍向上させることに成功した(定量限界はいずれも10 pg/mL, 唾液0.5 mL使用)。次に本法を臨床試料 ($n = 114$) に適用したところ、唾液中T及びDHEAは年齢と共に有意 ($P < 0.001$) に減少し、70歳以上のボランティアの両アンドロゲン濃度 ($n = 30$, T: 27.6 ± 10.9 pg/mL及びDHEA: 25.3 ± 9.5 pg/mL) は、20歳代のそれら ($n = 24$, T: 55.0 ± 13.6 pg/mL及びDHEA: 57.0 ± 14.9 pg/mL) の約50%であった。さらに開発した方法では、両アンドロゲンの日中内リズムやDHEAサプリメント服用後のレベル上昇、すなわち体内のT及びDHEA変動を唾液から読み取ることができた。

(4) 唾液を用いるホルモン検査の問題点の一つは、イオン性官能基を有する化合物の唾液中濃度が唾液分泌量によって変動する場合がある、すなわち、唾液から正確な生体情報が得られない場合があるということである。しかし、この点に関して詳細な研究はなされていない。そこで肝胆道系疾患の診断に有用とされる胆汁酸のLC-ESI-MS/MSによる高感度定量法 (HPを用いる誘導体化を導入) を開発し、唾液分泌量の亢進による唾液中レベルの変動を吟味した。その結果、グリシン抱合型胆汁酸であるグリコケノデオキシコール酸濃度は分泌量亢進により大きく減少するのに対し、遊離型胆汁酸のケノデオキシコール酸の濃度は唾液分泌量に左右されないことを見出した。

(5) 胆汁酸やカテコールアミン代謝物などはカルボキシル基を有し、それらの測定は様々な代謝、栄養疾患の診断や治療上重要である。しかし、ある種のカルボン酸では最新の高性能LC-MS/MS装置を用いたとしても十

分な感度が得られず、このことが唾液検査実現の隘路となっていた。そこで、2-picolyamine (PA) を用いて、これらカルボキシル基を有するホルモン関連物質のESI-MS/MS用検出指向誘導体化法を開発した。PA誘導体は誘導体化前のカルボン酸と比較して数倍から百倍以上の高感度を示し、LODは注入量あたり数fmolに達した。そして、PA誘導体化を唾液分析に適用したところ、超微量の遊離型一次胆汁酸やホモバニリン酸などを少量のサンプル (100–200 μ L) 及び簡便な前処理で検出することに成功した。

(6) 黄体や胎盤機能の指標となるプロゲステロン (PROG) の唾液中レベル測定法 (同位体希釈LC-ESI-MS/MS) を構築し、月経周期や妊娠週数によるPROGの産生・分泌量の変動が唾液から読み取れることを示した。

(7) 現在、甲状腺疾患の診断及び治療効果の確認は血中遊離型T₄濃度に基づいているが、その測定では採血に伴う被験者の大きな負担や事前の平衡透析や限外濾過に由来する高コスト、簡便性の低さなどが問題となっている。そこで報告者は、同位体希釈LC-ESI-MS/MSによる唾液中T₄定量法を開発した。そして、開発した分析法を用いて健常人とバセドウ病患者の唾液中T₄濃度を測定したところ、後者の濃度が顕著な高値を示した [健常人 (男性 $n = 10$, 女性 $n = 6$), 69.9 ± 29.0 pg/mL; 患者 ($n = 2$), 675及び194 pg/mL]。すなわち、本法を用いると、唾液にてバセドウ病診断が可能であることが示唆された。今後、検体数を増やして臨床実用性をさらに確認するという課題が残されているものの、開発した方法が現行の血液検査の無侵襲かつ簡便な代替法になることが期待された。

このように本研究は、唾液中ホルモンの単なる分析手法開発に留まらず、臨床応用に関する重要なデータを得ることに成功した。

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7件)

- ① T. Higashi, K. Ito, M. Narushima, T. Sugiura, S. Inagaki, J. Z. Min, T. Toyo'oka: Development and validation of stable-isotope dilution liquid chromatography–tandem mass spectrometric method for determination of salivary progesterone, *Biomed. Chromatogr.*, 査読有, 印刷中.
- ② T. Higashi, T. Ichikawa, C. Shimizu, S. Nagai, S. Inagaki, J. Z. Min, H. Chiba, S. Ikegawa, T. Toyo'oka: Stable isotope-dilution liquid chromatography/tandem mass

- spectrometric method for determination of thyroxine in saliva, *J. Chromatogr. B*, 査読有, 印刷中.
- ③ T. Higashi, T. Ichikawa, S. Inagaki, J. Z. Min, T. Fukushima, T. Toyooka: Simple and practical derivatization procedure for enhanced detection of carboxylic acids in liquid chromatography–electrospray ionization–tandem mass spectrometry, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 査読有, 52, 2010, 809–818.
- ④ T. Higashi, Y. Shibayama, T. Ichikawa, K. Ito, T. Toyooka, K. Shimada, K. Mitamura, S. Ikegawa, H. Chiba: Salivary chenodeoxycholic acid and its glycine-conjugate: their determination method using LC–MS/MS and variation of their concentrations with increased saliva flow rate, *Steroids*, 査読有, 75, 2010, 338–345.
- ⑤ Y. Shibayama, T. Higashi, K. Shimada, A. Odani, A. Mizokami, H. Konaka, E. Koh, M. Namiki: Simultaneous determination of salivary testosterone and dehydroepiandrosterone using LC–MS/MS: method development and evaluation of applicability for diagnosis and medication for late-onset hypogonadism, *Journal of Chromatography B*, 査読有, 877, 2009, 2615–2623.
- ⑥ Y. Shibayama, T. Higashi, K. Shimada, K. Kashimada, T. Onishi, M. Ono, K. Miyai, S. Mizutani: Liquid chromatography–tandem mass spectrometric method for determination of salivary 17 α -hydroxyprogesterone: A noninvasive tool for evaluating efficacy of hormone replacement therapy in congenital adrenal hyperplasia, *Journal of Chromatography B*, 査読有, 867, 2008, 49–56.
- ⑦ T. Higashi, Y. Shibayama, M. Fuji, K. Shimada: Liquid chromatography–tandem mass spectrometric method for determination of salivary 25-hydroxyvitamin D₃: a noninvasive tool for the assessment of vitamin D status, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 査読有, 391, 2008, 229–238.

[学会発表] (計9件)

- ① 市川拓也, 東 達也, 稲垣真輔, 関 俊哲, 豊岡利正: 同位体希釈LC–ESI–MS/MSによる唾液中チロキシンの定量法の開発, 第21回クロマトグラフィー科学会議, 2010年10月23日, 西宮.
- ② Tatsuya Higashi, Kazutake Shimada, Toshimasa Toyooka: Liquid

chromatography–mass spectrometric assays of salivary hormones and related compounds, The 12th Asia-Pacific Congress of Clinical Biochemistry, 2010年10月5日, Seoul.

- ③ 市川拓也, 東 達也, 稲垣真輔, 関 俊哲, 豊岡利正: カルボン酸のESI–MS/MS用検出指向誘導体化法の開発と唾液分析への応用, 第17回クロマトグラフィーシンポジウム, 2010年6月5日, 広島.
- ④ 市川拓也, 東 達也, 稲垣真輔, 関 俊哲, 福島 健, 豊岡利正: 臨床・栄養化学上重要なカルボン酸の簡便なLC–ESI–MS/MS用検出指向誘導体化法の開発, 日本薬学会第130年会, 2010年3月30日, 岡山.
- ⑤ 東 達也, 柴山優人, 島田和武, 三田村邦子, 池川繁男, 豊岡利正: 唾液中胆汁酸: LC–ESI–MS/MS定量法と唾液分泌量亢進に伴う濃度変動, 第34回日本医用マスペクトル学会年会, 2009年9月10日, 東大阪.
- ⑥ 東 達也, 柴山優人, 島田和武, 豊岡利正: 唾液中アンドロゲンのLC–MS定量法の開発とそれを用いる無侵襲LOH症候群診断の試み, 第22回バイオメディカル分析科学シンポジウム, 2009年7月16日, 各務原.
- ⑦ 柴山優人, 東 達也, 島田和武, 小谷 明, 溝上 敦, 小中弘之, 高 栄哲, 並木幹夫: LOH症候群の無侵襲診断・治療効果モニタリングを目指した唾液中アンドロゲンのLC–ESI–MS/MSによる定量, 日本薬学会第129年会, 2009年3月26日, 京都.
- ⑧ 東 達也: 唾液を用いる無侵襲ホルモン検査法の開発第33回日本医用マスペクトル学会年会, 2008年9月25日, 東京.
- ⑨ 柴山優人, 東 達也, 島田和武, 鹿島田健一, 大西寿和: 唾液中17 α -hydroxyprogesteroneのLC–MS/MS定量法の開発とCAHにおける治療効果モニタリングへの適用, 第21回バイオメディカル分析科学シンポジウム, 2008年8月7日, 札幌.

[その他]

ホームページ

<http://w3pharm.u-shizuoka-ken.ac.jp/~analchem/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

東 達也 (HIGASHI TATSUYA)
静岡県立大学・薬学部・准教授
研究者番号: 90272963

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし