

平成 22 年 5 月 20 日現在

研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：2008～2009
 課題番号：20790031
 研究課題名(和文) LC-MS を基盤とする新生児マススクリーニングの精密再検証システムの構築
 研究課題名(英文) Development of precise re-examine system of newborn mass screening based on liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS)
 研究代表者
 西尾 忠 (NISHIO TADASHI)
 慶應義塾大学・薬学部・助教
 研究者番号：80401892

研究成果の概要(和文): 低体重児に対する新生児マススクリーニングにおいて, 先天性代謝異常症の高頻度な偽陽性が問題となっている. 我々は, スクリーニング初回検査に調製済みの血液濾紙を再利用して, 高速液体クロマトグラフィー-質量分析法 (LC-MS) を基盤とする上記疾患の病態分子マーカーの精密定量法の開発を行った. この結果, 本法が疾患の精密再検証に有効であることが示唆された. また, 臨床現場での実用化を指向して, 移動相に水のみを使用する温度応答性クロマトグラフィーによる生体試料分析の検討を行った. 本法によりサル血中麻酔薬の分析, 動態解析が可能であった.

研究成果の概要(英文): High-sensitive and reliable analytical methods are required for newborn mass screening. As for low-birth weight infants, high false positive rate of diseases are observed in the first screening assay. Based on this background, we developed the effective analytical methods of biomarker, utilizing the high-performance liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS). Furthermore, we applied the temperature-responsive chromatography to quantification of anesthetic agents in biological fluids. In this chromatography system, only water is used as the mobile phase, and there are many advantages from the point of view of the green chemistry.

交付決定額

(金額単位:円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・物理系薬学

キーワード：臨床分析科学, 新生児マススクリーニング, 先天性副腎過形成症, 先天性甲状腺機能低下症, LC-MS, 誘導体化, 温度応答性クロマトグラフィー

1. 研究開始当初の背景

(1) 新生児マススクリーニングは, 遺伝的

酵素欠損による代謝異常や内分泌疾患の早期発見・治療開始を目的として全新生児に対

して実施されている。対象疾患のうち、先天性副腎過形成症 (CAH) の診断は、酵素イムノアッセイ (EIA) による血液濾紙中の 17α -ヒドロキシprogesterone (17-OHP) の異常高値検出に基づいている。また、先天性甲状腺機能低下症は甲状腺刺激ホルモンとトリヨードサイロニンの異常低値を共に EIA で検出し診断している。しかし、EIA は共存物質の交差反応や非特異的の反応から偽高値を示し、特に低体重児において軽度の CAH あるいは先天性甲状腺機能低下症の見逃し頻度が高いという欠点も有している。このため EIA による測定結果とその健康状態・症状が符合しない新生児に対して、医療現場からその原因を確定可能な精密再検証法の確立が強く望まれている。我々は EIA に代わる分析手法として高速液体クロマトグラフィー-質量分析 (LC-MS) に着目し、上記疾患のマーカー分子の精密分析法の確立と臨床応用を目指した。

(2) 新生児マススクリーニングは疾患の早期発見が重要であるため、測定結果を迅速に報告する必要がある。現在、測定の実施からその結果が届くまで数日を要するが、臨床現場で測定が可能となれば非常に有効である。しかし、臨床現場で高速液体クロマトグラフィー (HPLC) 分析を行う際、移動相に大量の有機溶剤を使用する。このため患者や医療従事者への有機溶剤暴露や有機廃液の問題がネックとなっている。そこで我々は、移動相に水のみを使用する温度応答性クロマトグラフィーに着目し、その生物試料分析を指向し、今回そのモデル実験として麻酔薬プロポフォールのサル血清中濃度測定を行った。

2. 研究の目的

(1) CAH 精密再検証システムの開発

早産児及び低体重児では副腎の未成熟から 17-OHP に構造が酷似した 17α -ヒドロキシpregnenolone (17-OHPreg) が血中に大量に蓄積し、EIA 初回検査においてその交差反応に起因する 17-OHP 高値の取扱いが問題となっている。この問題解決には 17-OHP 及び 17-OHPreg の両ステロイドの同時定量が必要不可欠であり、その方法論として選択性、汎用性に優れ、プロフィール分析可能な LC-MS が有効である。このような背景から、我々は LC-MS による 17-OHP と 17-OHPreg の精密分析法の開発と臨床応用を目指した。すなわち本研究は、初回検査に調製済みの血液濾紙を再利用して、それに含有される超微量分子の定量を可能とする飛躍的感度向上法の開発から始まり、医療への普及を考慮した臨床応用性の評価までを目標とした。

(2) 温度応答性クロマトグラフィーによる生体試料分析法の開発

感温性ポリマーであるポリ-N-イソプロピルアクリルアミド (PNIPAAm) は下限臨界溶液温度 (32°C) を境に迅速かつ可逆的な親水性 (<LCST) - 疎水性 (>LCST) 変化を生じる。この PNIPAAm をシリカゲル表面に修飾し、カラムに充填して分析を行うのが温度応答性クロマトグラフィーである。本法は固定相表面の物性を温度変化により制御可能であり、水のみでの移動相で分析できるメリットを有している。このような有用性にも関わらず、現在まで実試料分析に適用した報告はなかった。以上の背景から、我々は温度応答性クロマトグラフィーの臨床分析への適用を目的とし、今回そのモデル実験としてサル血清中の麻酔薬プロポフォールの定量法の開発を行った。さらにこの方法を用いて薬物動態を追跡するほか、得られた定量値を汎用型の逆相 HPLC で得られるそれとの比較を行った。

3. 研究の方法

(1) CAH 精密再検証システムの開発

マーカーステロイドの LC-ESI-MS 用検出指向誘導体化法 (Fig. 1); 本研究では、初回検査用に調製済みの血液濾紙を再利用して定量分析を行うため、ステロイド検出に超高度が要求される。そこで 17-OHP 及び 17-OHPreg の有するオキソ基を足がかりに、エレクトロスプレーイオン化 (ESI) 活性原子団として 2-ヒドラジノピリジン (HP) を導入した。すなわち、ステロイドの EtOH 溶液にトリフルオロ酢酸存在下、HP を添加し、15 min 超音波処理することで誘導体化を行った。感度向上は誘導体化前後において得られるそれぞれの検出限界をもとに評価した。

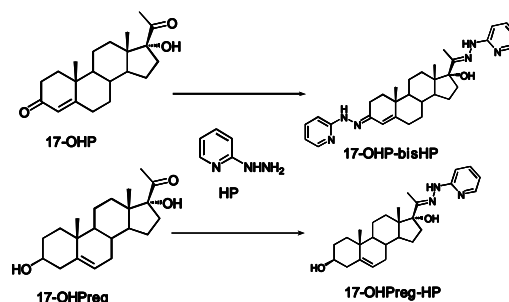


Fig. 1. Derivatization of 17-OHP and 17-OHPreg with HP

マーカーステロイドの同時定量法; 直径 3 mm の血液濾紙 3 枚 (全血 $8\ \mu\text{L}$ に相当) を測定試料とし、内標準物質 (IS, 重水素化した 17-OHP 及び 17-OHPreg) を添加し MeOH 中で超音波処理を行い抽出を行った。次いで固相カートリッジ (Strata-X) による精製を行った後、残渣を HP 誘導体化に付し LC-ESI-MS 分析を行った [分析条件; API2000 (Applied Biosystems 社製) に LC-20AD クロ

マトグラフ (島津製) を装着した LC-MS 装置。正イオン検出 ESI, 選択反応検出 (SRM, 17-OHP bisHP m/z 513.4→364.1, 17-OHPreg HP m/z 424.3→253.0), YMC Pack Pro C18RS カラム (5 μ m, 150x2 mm i.d., YMC 社製), MeCN-MeOH-10 mM HCO₂NH₄ (5:3:1, v/v/v), 0.2 mL/min, 40°C]. 検量線は 17-OHP で 0.5-20 ng/mL, 17-OHPreg で 1.0-20 ng/mL で作成した。精度, 正確度は日内・日間変動試験及び添加回収試験で評価した。

臨床応用性評価; 札幌市衛生試験所から患与された CAH 陰性又は偽陽性の正常体重児及び CAH 偽陽性の低体重児の血液濾紙を用いて各ステロイドの分析を行った [EIA 初回検査キット; Enzaplant Neo-17 α -OHP, 17-OHP のカットオフ値; 4 ng/mL]. 統計分析には Mann-Whitney の U 検定又は Steel-Dwass 試験を適用した。

(2) 温度応答性クロマトグラフィーによる生体試料分析法の開発

温度応答性カラムの作製 (Fig. 2); 先ず, PNIPAAm にメタクリル酸ブチル (BMA) を 3% 含有した感温性ポリマー, P(NIPAAm-co-BMA3%) をラジカル重合により合成した。これをアミノプロピルシリカゲル (粒径 5 μ m) に修飾し, ステンレスカラム (150x4.6 mm i.d.) に充填した。このカラムを用いて, 温度変化に伴うプロポフォル及びチモール (IS として使用) の保持挙動を精査した。

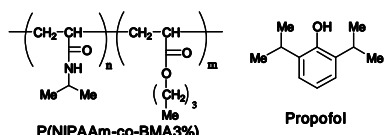


Fig.2. Structures of P(NIPAAm-co-BMA3%) and propofol

サル血清中薬物の定量法; 京都大学霊長類研究所から患与されたサル血清を用いて分析法の開発を行った。血清 (80 μ L) に IS を添加し, 固相抽出 (4115SD カートリッジ) で精製した。目的画分を MeOH で溶出し, 蛍光検出 HPLC (HPLC-FL) 分析に付した [分析条件; 移動相; H₂O, 1.0 mL/min, 40°C, 励起波長; 267 nm, 蛍光検出波長; 310 nm]. 検量線は 0.5-10 μ g/mL の範囲で作成し, 同時再現性試験を行った。

薬物動態研究及び汎用型分析法との比較; 薬物単回投与又は持続投与したサルから採血し, 開発した方法を用いて薬物血中濃度の経時変化を追跡した。また同一サンプルを温度応答性クロマトグラフィーと汎用型 HPLC [分析条件; Inertsil カラム (5 μ m, 150x4.6 mm i.d., GL サイエンス社製), H₂O-MeCN-H₃PO₄ (45:55:2, v/v/v), 1.0 mL/min, 30°C] でそれぞれ測定し, 得られた定量値を

比較検討した。

4. 研究成果

(1) CAH 精密再検証システムの開発

マーカーステロイドの LC-ESI-MS 用検出指向誘導体化法; LC-ESI-MS における 17-OHP 及び 17-OHPreg の検出限界 (S/N=5) はそれぞれ 1.0 pg, 400 pg であったが, HP を作用させることで飛躍的に感度が向上した。すなわち得られた誘導体, 17-OHP bisHP 及び 17-OHPreg HP は強いプロトン付加イオン [M+H]⁺ を与え, 検出限界はそれぞれ 0.4 pg, 2.5 pg と前者で 2.5 倍, 後者で 160 倍の高感度測定が可能となった。これまで 17-OHPreg の ESI に対する応答性の低さから血液濾紙などの微量サンプルを用いた測定は行われてこなかったが, 我々の開発した方法により実現可能となった。また, 本法は試料に HP を添加し 15 min 超音波処理を行うのみの簡便な誘導体化である。オキソステロイドのみならず, 他のオキソ基を有する化合物にも適用可能であるため, 汎用型 LC-ESI-MS 用誘導体化試薬としての普及が期待される。

マーカーステロイドの同時定量法; ステロイドの血液からの抽出, 精製にいたる一連の前処理における回収率は 17-OHP で 78.1 \pm 1.1%, 17-OHPreg で 81.3 \pm 2.0% (平均 \pm 標準偏差, n=5) であった。前述の分析条件で測定を行うと, 17-OHPreg HP は 2.7 min, 17-OHP bisHP は 5.1 min にピークが明瞭に観測され, 内因性夾雑物質の妨害も受けなかった。なお MS 測定では SRM を採用し, 検量線は 17-OHP で 0.5-20 ng/mL, 17-OHPreg で 1.0-20 ng/mL の範囲で相関係数 0.999 の良好な直線性が得られた。また日内・日間変動試験から得られる相対標準偏差はいずれも 16% 以下であった。これにより初めて, LC-MS を基盤とする血液濾紙中 17-OHP 及び 17-OHPreg の同時定量法が確立できた。

臨床応用性評価 (Fig. 3); 札幌市衛生試験所から患与された血液濾紙を, 正常体重児 (NBWI, 出生体重 >2500 g) の CAH 陰性及び偽陽性, 低出生体重児 (LBWI, 2500-4500 g), 極低出生体重児 (VLBWI, 1500-4000 g), 超低出生体重児 (ELBWI, <1500 g) のいずれも偽陽性の 5 群に分類した。開発した分析法を用いて 17-OHP 及び 17-OHPreg の定量を行い, 群間での統計分析を行った。先ず, NBWI 内の 2 群で分析を行ったが, 偽陽性群では陰性群と比較して両ステロイド濃度とも有意に高値を示した。しかし, 17-OHPreg 濃度は 17-OHP 濃度の 10 倍以下であり, EIA キットの交差反応性が 0.5% 以下であることを考慮すると 17-OHPreg 高値が CAH 偽陽性の直接の原因ではないことが明らかとなった。一方, CAH 偽陽性 NBWI の 17-OHP 濃度を LC-MS 測定値と EIA 測定値とで比較すると, 後者で有意

に高値を示し、前者の値を現行のCAHカットオフ値 (4 ng/mL) に当てはめると、17例中16例が陰性となりLC-MS分析の有用性が示される結果となった。次にNBWI群と他の3群間で両ステロイド濃度の比較を行ったところ、LBWI、VLBWI、ELBWI群では大部分がLC-MSによる17-OHP定量値が4 ng/mL以上となった。以上のことから、低体重児のCAH診断はLC-MS分析を駆使しても困難であることが明らかとなった。

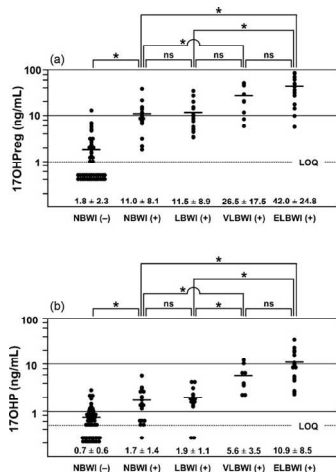


Fig. 3. 17-OHPreg and 17-OHP levels in infants determined using LC-MS method. Values are mean concentration with standard deviation. * and ns represents statistically significant ($P < 0.005$) and non significant, respectively. (+) and (-) represent false positive and negative, respectively, in EIA-based screening.

(2) 温度応答性クロマトグラフィーによる生体試料分析法の開発

温度応答性カラムの作製 (Fig. 4); 合成した感温性ポリマー, P(NIPAAm-co-BMA3%) は 24.6°C に LCST を有し、分子量は 4000 程度であった。このポリマーを充填剤に適用した温度応答性クロマトグラフィーでは、低温領域 ($< \text{LCST}$) では固定相表面が親水性を示すため、脂溶性の高いプロポフォルは殆ど保持されなかった。一方、LCST 以上のカラム温度では表面が疎水性へと変化するため、薬物の保持が劇的に増大した。プロポフォル、IS 及びサル血清中夾雑物が完全分離するカラム温度を求めたところ 40°C であることが判明した。

サル血清中薬物の定量法; 測定に先立つ前処理は固相抽出による精製のみで非常に簡便であり、その回収率はプロポフォルで $77.8 \pm 6.1\%$ 、IS で $86.3 \pm 8.1\%$ ($n=5$) と満

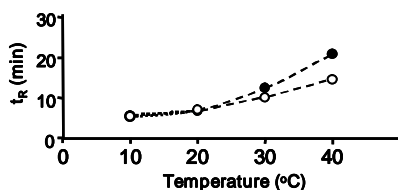


Fig. 4. Effect of a temperature change on the retention time (t_R) of propofol (closed circle) and IS (open circle) using P(NIPAAm-co-BMA3%) modified column.

足しうるものであった。検量線は $0.5\text{--}40 \mu\text{g/mL}$ の範囲で相関係数 0.999 の良好な直線性を示した。また日内・日間変動試験において、相対標準偏差はそれぞれ、4%、14%以下であった。以上の結果から、初めて温度応答性クロマトグラフィーを基盤とする生体試料分析法が確立できた。

薬物動態研究及び汎用型分析法との比較; 開発した分析法を用いることでプロポフォルをサルに単回静脈投与した際における薬物濃度の経時変化が追跡可能であった。また、薬物持続投与をした際の血中薬物濃度を測定し、プロポフォルレベルが治療有効濃度である $3\text{--}8 \mu\text{g/mL}$ に調節可能であることが示された。これにより本法が薬物治療モニタリング (TDM) に有効であることが明らかとなった。最後に本法で得られる定量値と汎用型逆相 HPLC から得られるそれとの比較検討を行った。この結果、両者に有意な差は観察されず、本法の臨床分析適用への可能性が示唆された。温度応答性クロマトグラフィーは移動相に水のみを使用するため、従来法で問題であった有機溶媒のヒトへの暴露や有機廃液の問題をクリアできる環境低負荷型の分析法である。このよう観点からも、今後温度応答性クロマトグラフィーの臨床現場への導入が期待される。

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7件)

西尾 忠, 金澤 秀子, 多機能性ポリマーを用いる環境低負荷型クロマトグラフィーシステムの開発, 分析化学 (査読有), 59, 163-173 (2010).

Nishio T., Suzuki R., Tsukada Y., Kanazawa H., Okano T., Miyabe-Nishiwaki T., Aqueous chromatographic system for the quantification of propofol in biological fluids using a temperature-responsive polymer modified stationary phase., *J. chromatogr. A* (査読有), 1216, 7427-7432 (2009).

Kobayashi H., Nishikawa M., Sakamoto C., Nishio T., Kanazawa H., Okano T., Dual temperature- and pH-responsive fluorescence molecular probe for cellular imaging utilizing a PNIPAAm fluorescein copolymer., *Anal. Sci.* (査読有), 25, 1043-1047 (2009). Kobayashi N., Oyama H, nakano M., Kanda T., Banzono E., Kato Y., Karibe

T., Nishio T., Goto J.,
'Cleavable' haptin biotin
conjugate: preparation and use for the
generation of anti-steroid
single domain antibody fragment.,
Anal. Biochem. (査読有), 387, 257-266
(2009).
Higashi T., Yokoi H., Nagura Y.,
Nishio T., Shimada K., Studied on
neurosteroids XXIV. Determination of
neuroactive androgens, androsterone
and 5 α -androstane-3 α ,17 β -diol, in rat
brain and serum using liquid
chromatography-tandem mass
spectrometry., *Biomed. Chromatogr.*
(査読有), 22, 1434-1441 (2008).
Higashi T., Nishio T., Uchida S.,
Shimada K., Fukushi M., Maeda M.,
Simultaneous determination of
17 α -hydroxyprogesterone and
17 α -hydroxypregnenolone in dried
blood spots from low birth weight
infants using LC-MS/MS., *J. Pharm.
Biomed. Anal.* (査読有), 48, 17-182
(2008).
Miyashiro Y., Nishio T., Shimada K.,
Characterization of in vivo
metabolites of toad venom using liquid
chromatography-mass spectrometry., *J.
Chromatogr. Sci.* (査読有), 46,
534-538 (2008).

[学会発表](計11件)

西尾 忠, 機能性ポリマーを用いた環境
応答型蛍光プローブの開発, 日本薬学
会第130年会, 2010.03.28 (岡山)
西尾 忠, 温度応答性ポリマーを用いた
水系クロマトグラフィーによる麻酔薬
プロポフォール血中濃度測定,
2010.03.13 (東京)
西尾 忠, 超高速液体クロマトグラフィー
による医薬品及び食品成分の分析,
日本分析化学会第58年会, 2009.09.25
(北海道)
西尾 忠, 超高速分離システムを用いた
薬物血中モニタリング及びジェネリック
医薬品の品質評価試験, 第16回クロ
マトグラフィーシンポジウム,
2009.05.30 (長崎)
西尾 忠, 蛋白質蛍光イメージングを指
向したアミノ酸由来機能性高分子の開
発, 日本薬学会第129年会, 2009.03.27
(京都)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

西尾 忠 (NISHIO TADASHI)
慶應義塾大学・薬学部・助教
研究者番号: 80401892

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし