

平成 26 年 5 月 21 日現在

機関番号：32660

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590046

研究課題名(和文) 多点分子認識ESIラベル化による先天性代謝異常症の新規精密検査法の開発

研究課題名(英文) Development of multi-point recognizing derivatization procedures for reliable diagnoses of inborn errors of metabolism

研究代表者

東 達也 (Higashi, Tatsuya)

東京理科大学・薬学部・教授

研究者番号：90272963

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：先天性副腎過形成症(CAH)をはじめとする先天性代謝異常症の精密検査法の確立を目標に、マーカー分子の特徴的部分構造を多点で認識し、超高感度・高選択LC/MS/MS分析を実現する誘導体化=多点分子認識ESIラベル化法を開発した。さらに本法の臨床試料(濾紙血,尿,唾液など)分析への応用性を評価したところ,CAHに加えて,長鎖3-ヒドロキシアシル-CoA脱水素酵素欠損症や潜在的ビタミンD欠乏症診断において良好な結果が得られた。

研究成果の概要(英文)：The multi-point recognizing derivatization procedures, which enable to the highly sensitive and specific determination of diagnostic makers by LC/ESI-MS/MS, have been developed for reliable diagnoses of inborn errors of metabolism, such as congenital adrenal hyperplasia (CAH). The developed procedures was applied to the clinical sample analyses (dried blood spot, urine, saliva and so on) and proved to have sufficient practicality in diagnoses of CAH, long-chain 3-hydroxyacyl CoA dehydrogenase deficiency and neonatal vitamin D deficiency.

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：分析科学 先天性代謝異常症 LC/ESI-MS/MS 多点分子認識 誘導体化 精密検査 バイオマーカー
高感度

1. 研究開始当初の背景

先天性副腎過形成症 (CAH) の新生児マススクリーニングは、濾紙血中の 17α -hydroxylprogesteroneの異常高値を酵素イムノアッセイ (EIA) により検出するものであるが、健常児、特に早産児・低体重児に対する陽性 (偽陽性) 頻度の高いことが問題となっている。このような偽陽性児では、採血とEIAに基づく検査が繰り返され、結局、陽性が陰性かの鑑別ができない場合も少なくない。このため、被験児のみならず、家族、医療者の負担は極めて大きく、医療現場からは、CAHの偽陽性検体に対して真に鑑別可能な再検証法の確立が強く望まれている。これに対し、pregnanetriolone (PTL) が真性のCAH患児と偽陽性児を鋭敏に識別可能なマーカーとして注目されているが、臨床試料中の超微量PTLをLC/ESI-MS/MSで測定して偽陽性児の検査値の問題に取り組んだ報告は無い。また、コレステロール合成障害による発育・成長障害や精神遅滞などを主症状とするSmith-Lemli-Opitz症候群 (SLOS) は、現行のマススクリーニング対象ではないが、患児の良好な予後のためには早期の療育開始が不可欠である。このため、蓄積する7-dehydrocholesterol (7DHC) を指標として、LC/ESI-MS/MSによる新規スクリーニング実施が求められている。さらに最近、SLOSが自閉性障害 (自閉症) を合併することが注目され、セロトニン (5HT) の関与も示唆されているが、未解明の部分が多い。したがって、濾紙血中7DHCや5HTの測定は、SLOSの早期の診断及び治療開始に繋がるものと期待されるが、その技術は開発されていない。そこで本研究では、PTLのピシナルジオール、7DHCの共役ジエンや5HTのヒドロキシインドール構造など、複数の官能基で構成されるマーカー分子の特徴的構造を多点で認識し、超高感度・高選択性をもたらす誘導体化法 = 多点分子認識ESIラベル化法を新たに開発して先天性代謝異常症の診断に貢献することを目指した。

2. 研究の目的

本研究では、対象マーカー分子のESI-MS/MSにおける応答性・シグナル・ノイズ比 (S/N) の飛躍的増大を実現する多点分子認識ESIラベル化法の開発をキーポイントとして、CAHやSLOSなどの先天性代謝異常症に対し、精密検査システムの確立と臨床応用性評価を目的とした。すなわち、本研究は分析科学を武器として、現在の先天性代謝異常症検査における問題を解決し、医療現場に貢献することを目指し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) PTL測定に基づくCAH精密再検証システム
- (2) 7DHC測定に基づくSLOS新規診断システム
- (3) 5HT測定に基づくSLOSにおける自閉症病因解析の支援システム

3. 研究の方法

- (1) PTL、7DHCや5HTをはじめとする各種マーカー分子 (いずれもng ~ pgオーダー) のLC/ESI-MS/MS分析法の開発を目指し、検出感度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 (ピシナルジオール、共役ジエン、ヒドロキシインドール構造など) を多点で特異的に認識すると共に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: ジメチルアミノ基) を持つ誘導体化試薬を選定・合成し、高感度誘導体化法を開発した。そして各誘導体について、選択反応検出構築に向けてLC/ESI-MS/MS挙動を精査した。
- (2) 臨床試料としては濾紙血を基本としたが、血清、尿、唾液などへも対象試料を拡大し、これらの前処理法を検討した。すなわち、スループットや医療現場のことも考慮して可能な限り簡便な前処理法を開発し、各種バリデーション試験により評価した。
- (3) 各種マーカー分子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、新生児濾紙血、尿、唾液などの実試料を用いてそれを精査した。
- (4) 先天性代謝異常症診断マーカー分子の中には、キラル化合物も存在し、対掌体間で生体内挙動が異なること、対掌体の比が新たな指標となることなども考えられる。すなわち、精密な診断には対掌体の弁別測定必要な場合が考えられることから、新たにESI活性キラル誘導体化法を開発を行った。これには当初の項目に加えて、先天性代謝異常症の一つである長鎖3-ヒドロキシアシル-CoA脱水素酵素 (LCHAD) 欠損症を対象として、3-hydroxypalmitic acid (3HPA) をマーカーとする高感度キラル分析法を検討した。

4. 研究成果

当初の項目に加えて、LCHAD欠損症マーカーの3HPAやビタミンD欠乏症のマーカーである25-hydroxyvitamin D₃ [25(OH)D₃] の特異的ESIラベル化 - LC/ESI-MS/MS分析法なども構築し、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) 上述のように、現在のCAHの再検査は被験者及び医療者の負担が極めて大きいばかりか、結局、真陽性と偽陽性の鑑別ができない場合も少なくない。これら被験者の過重負担、診断結果の信頼性の問題を一気に解決すべく、新規再検査用マーカーPTL及びpregnanetriol (PT) の高感度定量法を開発した。PTL、PTの特徴的部分構造であるピシナルジ

オールを認識し、かつプロトン親和性を増大させてESI効率を大幅に引き上げる多点分子認識ESIラベル化法として、(3-dimethylamino-phenyl)dihydroxyborane (DAPB) を用いるそれを開発した。DAPBを用いると、PTL及びPTの応答性は100倍以上向上し、fg~pgオーダーの検出が達成された。しかし、当初の目的であった濾紙血分析では良好な結果が得られなかったため、これに代わるものとして尿分析を検討した。1段階の固相抽出による簡便な前処理法と²H₄-DAPBを同時に用いるisotope-coded derivatizationに基づく定量法を開発し、精度・正確度試験など各種バリデーション試験を実施した。今回、CAH患児の尿検体が入手できなかったが、健常人の尿分析では、良好な結果が得られ、DAPBを用いる多点分子認識ESIラベル化が十分な臨床実用性を有することが証明された。さらにDAPBを用いるピシナルジオールステロイドのESIラベル化の適用拡大も検討した。すなわち、本法をCYP3A4が関わる薬物相互作用の内因性プローブである4β-hydroxycholesterol分析に適用したところ、わずか10 μLの血清で共存物質の妨害を受けることなく、高感度・高選択的な検出が可能であった。このようにDAPBを用いる多点分子認識ESIラベル化が、ピシナルジオールを有する様々なステロイドバイオマーカーのLC/ESI-MS/MS、すなわち、それらの精密検査に十分な実用性を有することを証明した。

(2) 濾紙血中7DHCを指標とするSLOSの新規診断法の開発では、7DHCの*s-cis*-ジエンと反応する4-phenyl-1,2,4-triazoline-3,5-dione (PTAD) を利用した。その結果、7DHCのESI応答性は70倍も向上し、検出限界は1 pgに達した。しかし、本法を新生児濾紙血分析に適用したところ、7DHCを検出することができなかった。この原因を精査したところ、7DHCは濾紙血中で不安定であり、濾紙血を用いてSLOS検査は不可能ことが判明した。本結果を受けて、濾紙血に代えて患児の負担なく採取可能な唾液を用いるSLOS診断法を検討したところ、健常人検体では7DHCが明瞭に検出でき、患児では7DHCの異常高値が予想されることから、唾液検査の有用性が強く示唆された。

(3) SLOSの病態解析を目標に5HTの多点分子認識ESIラベル化分析法を検討した。すなわち、5HTに触媒存在下、2-picolyamineを反応させて誘導体を調製したが、試薬由来の妨害物質が除去できないこと、それに起因してLC/ESI-MS/MSで高感度分析が困難なことが判明し、実用的な5HTの多点分子認識ESIラベル化法の開発は達成できなかった。しかし、5HTの最終代謝産物である5-hydroxyindole acetic acid (SHIAA) のレベルがSLOSで変動するとの仮説を立て、その尿中分析法を開発した。すなわち、SHIAA用新規高感度化試薬、1-[(4'-dimethylaminophenyl)carbonyl]piperazine (DAPPZ) をデザイン・開発し、尿分析に適用

したところ、共存物質の妨害を受けることなく、SHIAAのピークを明瞭に検出することができた。

(4) 先天性代謝異常症診断マーカー分子の中には、3HPAに代表されるキラル化合物も存在し、精密な診断には対掌体の弁別測定が必要な場合が考えられる。このことから、新たにESI活性キラル誘導体化法の開発を行った。すなわち、新規試薬、(S)-1-(4-dimethylaminophenylcarbonyl)-3-aminopyrrolidine (DAPAP) 及びLCHAD欠損症診断のための3HPA分析法を開発した。また、本法では、先天性代謝異常症ではないが、*N*-acetyllecine (糖尿病マーカー候補) やibuprofen (前立腺癌や大腸癌と関わるAMACR活性評価マーカー) の対掌体の弁別測定が可能であった。

(5) 最近、新生児のビタミンD不足がくる病や骨軟化症などの骨疾患のみならず、将来の糖尿病、多発性硬化症、統合失調症などの危険因子となることが報告され、その評価法の確立が切望されている。そこで、当初の項目に加え、新生児濾紙血を用いるビタミンD供給状態評価法 (潜在的ビタミンD欠乏症診断法) を開発した。すなわち、新たに4-(4'-dimethylaminophenyl)-1,2,4-triazoline-3,5-dione (DAPTAD) を多点分子認識ESIラベル化試薬として開発し、超高感度かつ不活性妨害代謝物である3-エピ体と完全分離できる新規定量法を確立した。そして、札幌市生まれの新生児濾紙血に本法を適用し、被検児の半数以上が中程度及び深刻なビタミンD不足 (4.5 ng/mL以下) であることを報告した。

(6) この他、新生児の神経芽細胞腫をはじめとするマーカーとなりうるカテコールアミンに対して、その代謝物の無侵襲唾液分析法を確立した。これにも2-picolyamineを用いる誘導体化を適用し、fmolオーダーの感度を達成した。そして、簡便な前処理での定量に成功した。

このように本研究は、臨床検査マーカー分子の多点分子認識ESIラベル化法とこれを組み合わせた高感度・精密LC/ESI-MS/MS分析法の開発に成功した。濾紙血への適用が困難な項目があること、5HTのラベル化法が開発できなかったこと、など当初の目的を達成できなかった項目も見られるが、これに代わる尿及び唾液分析法及び、5HTの代謝物を指標とする代替法の開発を成し遂げた。また、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も得た。

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4件)

S. Ogawa, H. Tadokoro, M. Sato, T. Hanawa, T. Higashi: (S)-1-(4-Dimethylaminophenylcarbonyl)-3-aminopyrrolidine: A

derivatization reagent for enantiomeric separation and sensitive detection of chiral carboxylic acids by LC/ESI-MS/MS, *Journal of Chromatography B*, 査読有, 940, 2013, 7-14.

S. Ogawa, S. Ooki, M. Morohashi, K. Yamagata, T. Higashi: A novel Cookson-type reagent for enhancing sensitivity and specificity in assessment of infant vitamin D status using liquid chromatography/tandem mass spectrometry, *Rapid Communication in Mass Spectrometry*, 査読有, 27, 2013, 2453-2460.

T. Higashi, K. Kawasaki, N. Matsumoto, S. Ogawa: LC/MS/MS of steroids having vicinal diol as electrospray-active boronates, *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 査読有, 61, 2013, 326-332.

東 達也, 小川祥二郎: 低分子化合物のソフトイオン化MSにおける検出指向誘導体化, *ぶんせき*, 査読有, 2013, 2013, 422-428.

[学会発表](計9件)

小川祥二郎, 大木 智, 篠田健太, 東 達也: ESI増強重水素標識Cookson型試薬を用いる尿中ビタミンD₃代謝物のLC/MS/MS定量法の開発, 日本薬学会第134年会, 2014年3月28日, 熊本.

東 達也: ESI増強誘導体化試薬を用いる低分子化合物の高感度LC/MS/MS, 第2回千葉医用マススペクトロメトリー研究会, 2013年12月10日, 千葉.

田所弘晃, 佐藤真帆, 小川祥二郎, 東 達也: 光学活性カルボン酸のLC/ESI-MS/MS用新規誘導体化試薬の開発と唾液中NSAIDs分析への応用, 第24回クロマトグラフィ学会議, 2013年11月12日, 東京.

東 達也: 唾液中低分子バイオマーカーのLC/MS/MS, 第60回日本臨床検査医学会学術集会, 2013年11月1日, 神戸.

田所弘晃, 佐藤真帆, 小川祥二郎, 東 達也: 1-DAPAP: 光学活性カルボン酸のLC/ESI-MS/MS用新規誘導体化試薬の開発, 第11回次世代を担う若手のためのフィジカル・ファーマフォーラム, 2013年8月29日, 静岡.

大木 智, 篠田健太, 諸橋美里, 小川祥二郎, 東 達也: 新規Cookson型試薬の開発と新生児DBS中25-ヒドロキシビタミンD₃測定への応用, 第26回バイオメディカル分析科学シンポジウム, 2013年8月2日, 東京.

川崎勝己, 松本奈宜砂, 小川祥二郎, 東 達也: プロトン親和性ボロン酸を用いたビシナルジオールステロイドの高感度LC/ESIMS/MS, 日本薬学会第133年会, 2013年3月28日, 横浜.

川崎勝己, 松本奈宜砂, 小川祥二郎, 東 達也: 微量ステロイドバイオマーカーのLC-ESI/MS/MSにおける環状誘導体化の

有用性, 日本分析化学会第61年会, 2012年9月21日, 金沢.

東 達也: 誘導体化 - LC/ESI-MS/MSによる低分子バイオマーカーのトレースキャラクター化, 第52回日本臨床化学会年次学術集会, 2012年9月8日, 盛岡.

[その他]

ホームページ

http://www.tus.ac.jp/fac_grad/p/index.php?64dd

6. 研究組織

(1) 研究代表者

東 達也 (HIGASHI TATSUYA)

東京理科大学・薬学部・教授

研究者番号: 90272963

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし