様式Ｆ－１９

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成２５年５月１日現在

機関番号：１３５０１
研究種目：若手研究（B）
研究期間：2011～2013
課題番号：２３７９０６１９
研究課題名（和文）　革新的イオン化法を用いた質量分析型がん診断装置の開発
研究課題名（英文）　Development of rapid cancer diagnosis by the novel electrospray ionization-mass spectrometry

研究代表者
吉村　健太郎（YOSHIMURA KENTARO）
山梨大学・大学院医学工学総合研究部・助教
研究者番号：７０５１６９２１

研究成果の概要（和文）：大気圧イオン化法である探針エレクトロスプレー法（PESI）を用いた質量分析により、ヒトがん組織の脂質のマススペクトルを取得する条件を検討した。同条件を用いてヒト腎細胞がんおよび、肝細胞がんの検体より約 3,000 セットのマススペクトルを収集し、それをトレーニングデータとしてベイズ推計に基づいた学習機械である dual penalized logistic regression machine（dPLRM）を教育し、盲験スペクトルの判定を行ったところ、病理診断結果と 90%以上一致する判定結果を得ることに成功した。

研究成果の概要（英文）：Probe electrospray ionization (PESI) is a biocompatible ambient ionization technique. We determined the conditions of measurements for lipids in human tissues. More than 3,000 spectra datasets were obtained from specimens of human renal cell carcinoma and hepatocellular carcinoma. These data were used as a training dataset, which serves as a reference for the dPLRM. We input randomly selected test datasets to the dPLRM to get probabilistic result of cancer diagnosis. We achieved over 90% coincidence of diagnosis with those judged by the conventional histopathology.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合　計
交付決定額	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学
科研費の分科・細目：境界医学・病態検査学
キーワード：質量分析

１．研究開始当初の背景

がんの診断と質量分析

一般的ながんの確定診断法は、病理組織学的手法によるものが主流であり、これには試料作成から診断に至るまでに多くの時間を要する。また、診断には熟練が必要であるが、近年病理診断医自体の不足も問題となっている。この様な背景から、がんの診断を簡便、迅速かつ正確に行うことのできるシステムの開発は急務である。

近年、マススペクトル解析によるがんの診断システムの開発が試みられている（Setou et al., 2010; Min et al., 2010）。マススペクトル解析においては試料のイオン化を行う行程が必須であるが、従前の方法では試料の煩雑な前処理や、真空中での測定が要求されるため、一部の方法論を除くと臨床で直ちに応用可能なものは少ない。大気圧下でのマススペクトル解析を可能としたイオン化法としてはエレクトロスプレーイオン化法や、脱離エレクトロスプレーイオン化法があるが、前者は試料採取に用いるキャピラリーが詰まり

やすい、後者はイオン化時に試料表面に有機溶媒とガスを吹き付けるため変性が起こるといった欠点があるため、生体組織を対象とした解析には不向きである。

探針エレクトロスプレーイオン化法(Probe Electrospray Ionization; PESI) (Hiraoka et al., 2007)は、煩雑な試料の前処理を行うことなく、金属製の探針によって生の試料を新鮮なまま採取し、針にそのまま電圧を印加して試料をイオン化する方法である。PESI で採取される試料量は、数百フェムトリットルという細胞一個程度の量であり(Yoshimura et al., 2009)、さらに塩の混入による影響をほとんど受けない(Chen et al., 2008)、生体に対する侵襲性が極めて低い(Yoshimura et al., 2011; Yoshimura et al., 2012)といった、他のイオン化法にはない優れた利点が備わっている。この様に、生体試料の測定に最適なイオン化法である PESI を質量分析装置と連結し(PESI-MS)、生体組織のマススペクトル測定を行い、結果を比較すれば、種々の疾患の診断が可能となる。

２．研究の目的

本研究では大気圧イオン化法である PESI を利用した質量分析型がん診断装置の開発を目的とする。従前の質量分析を利用したがん診断法は、腫瘍マーカーの検出を基盤としたものが主流であり、また、その対象としては低分子化合物や網羅的解析法が確立しているタンパク質が多い。一方、本研究はがん組織より直接的に得られた脂質のスペクトルに注目し、個々のスペクトルデータを分析するのではなく、脂質全体の発現パタンを捉え、これにベイズ理論を応用したアルゴリズムを適用して診断を行うものである。さらに、本診断システムには統計的学習機械を導入するため、測定を重ねることで診断精度が向上する。本研究により学習機械型診断アルゴリズムが確立できれば、腫瘍マーカーという既成概念にとらわれない新しいコンセプトのがん診断が可能となる。

３．研究の方法

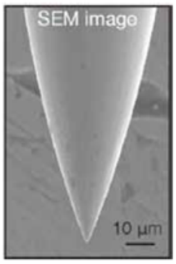
(1) 検体の収集と保管

がんの摘出手術で得られたヒト肝細胞がんおよび腎細胞がんの腫瘍部及び、その周辺の非がん部組織の検体を生理食塩水で洗浄した後、約 5 mm の切片に細切し、ディープフリーザーにて保管した。測定時には 5 分前に組織を室温にて解凍し、そのまま質量分析に用いた。各種の検体は山梨大学附属病院及び、横浜市立大学附属病院、神奈川県立がんセンターより提供された。なお、全ての実験操作および、検体の取扱いについては、各施設の倫理委員会の許可を得て行われた。

(2) PESI-MS システムの構築

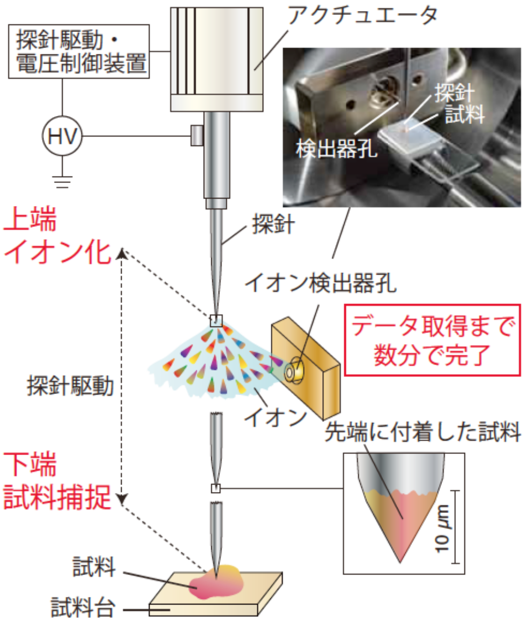
探針を鉛直方向に駆動させる動力となるリニアアクチュエーターに先端径数百 nm のステンレス製探針(図 1)を装着し、上下の連続運動を行う。

図 1、探針先端の SEM 画像



探針が下位に到達すると、試料台に固定された生体試料表面に針先がわずかに接触し、生体分子が採取されるが、このときはまだ電圧はかかっていない。次に探針が上位へと移動すると同時に電圧が印加され、生体分子のイオン化が起こり、検出器に吸引される(図 2)。試料表面には乾燥の防止と、イオン化効率の向上のために溶媒を滴下する。溶媒は検出目標である生体分子種の特徴に合わせて、任意に選択可能である。

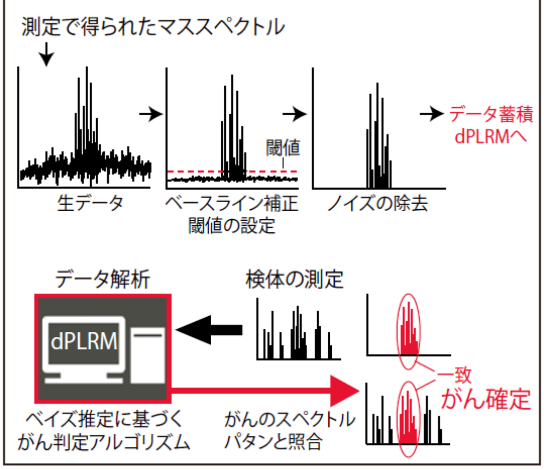
図 2、PESI-MS システムの概要



(3) スペクトルデータの処理と蓄積、学習機械によるがん判定

測定により得られたマススペクトルデータはベースラインの補正やノイズの除去、データの統合による次元縮約などの各種処理を行い、データベースへ蓄積する。構築されたデータベースをトレーニングデータとし、dual penalized logistic regression machine (dPLRM, Tanabe et al., 2001)により盲験スペクトルのがん判定を行う(図 3)。判定結果を病理診断の結果と比較し、正答率を評価するが、正答率が低い場合にはデータの処理法を改良する、あるいは蓄積データ数を増加させることで改善を行う。

図3､スペクトルデータの処理と判定までの流れ



4．研究成果

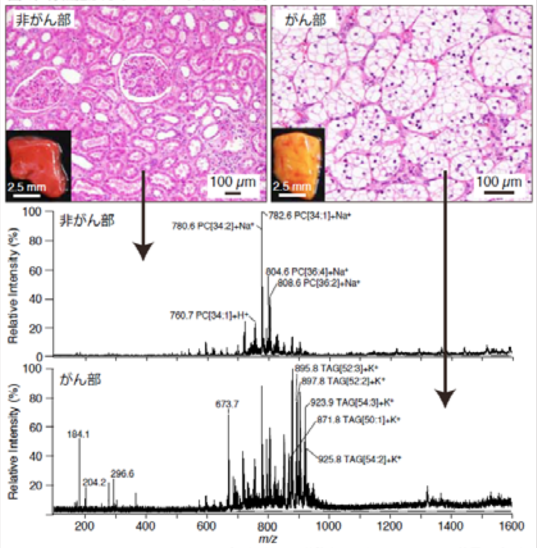
(1) 脂質の測定条件検討

PESI-MS は生体成分の中でも脂質の検出を得意としているため、まずはその至適測定条件を検討した。脂質を効率良くイオン化するには、有機溶媒中に脂質成分を溶解させる必要があったため、探針先端にスプレイヤーを用いて溶媒を噴霧する、あるいは組織表面に溶媒を直接滴下するという二種類の条件で検討を行った。なお、溶媒種に関しては、クロロホルム、エタノール、メタノール、イソプロパノール等を各種濃度で試したところ、50%エタノールを用いた場合に、最も効率良く安定したマススペクトルを得られることが分かった。スプレイヤー、溶媒滴下いずれの手段においても、一定のイオン強度の増強効果が得られることが明らかとなったが、スプレイヤーを用いるとシステムが複雑化するため、以降の測定においては、単純に溶媒を滴下する方法を採用した。

(2) 検体の測定とデータベース構築

80 検体の腎細胞がんおよび、60 検体の肝細胞がん(非がん部および、がん部を含む)の測定を行い、m/z 400-1100 の範囲のマススペクトル(図 4)を約 3000 セット収集した。スペクトルの生データは Excel に蓄積した後に CSV フォーマットに変換し、これをトレーニングデータベースとした。

図 4、腎細胞がんのマススペクトルの一例



※ データベースに蓄積するのは m/z 400-1100 の範囲のデータ

(3) マススペクトルデータの処理

マススペクトルデータには電気ノイズが含まれ、これは測定回ごとに不特定のパタンで現れる。またベースラインとなるイオン強度も毎回異なるため、夫々のピークパタンに影響を与え、がん特有のスペクトルパタンを抽出する際に誤差が生じ、正答率が低下する危険性がある。そのため、ベースラインの補正や、ノイズの除去(図 3)を行ったデータと、全く処理を行わないデータで構築されたデータベースのそれぞれをトレーニングデータとして用い、dPLRM による盲験データの判定を行った。

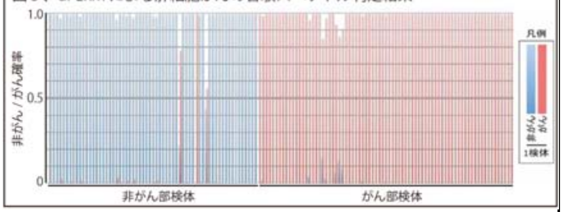
結果はデータ処理の有無に関わらず、一定の正答率であった。dPLRM は原則としてスペクトルに存在する全てのピークに着目し、総合的に特徴を判別するために、本来のピークをマスキングしてしまう程のノイズが無い限り、特にデータ処理を行わなくとも、非がん部とがん部を判別できることが明らかとなった。また、スペクトルの生データは、7,000 項目からなるが、トレーニングデータ、盲験データいずれも 10 項目ずつを積算し、700 項目に縮約しても、判定の正答率は低下しなかった。これにより、構築するデータベースの容量を

10 分の１に圧縮でき、また、診断に係る時間も短縮された。

(4) dPLRM によるがんの判定結果

得られたスペクトルの一部をランダムに抽出し、盲験データとして、これを dPLRM によって判定した。その結果、腎細胞がん、肝細胞がん共に、病理診断の結果と 90%以上一致する結果を得た。その結果の一部を図 5 に示す。

図 5、dPLRM による肝細胞がんの盲験スペクトル判定結果



肝臓非がん部の 60 スペクトル及び、がん部の 80 スペクトルを盲験として、dPLRM によって判定した結果、偽陽性がわずかに 3 例見られたのみで、他は全て病理診断の結果と一致した。以上の結果は、特定のスペクトルに着目せずに、脂質全体のプロファイルからがん判定が可能であることを示しており、さらに、本システムががん診断装置として有用であることを示唆している。

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 8 件）

(1) Nagata A, Hamamoto A, Horikawa M, Yoshimura K, (2 名省略), Characterization of ciliary targeting sequence of rat melanin-concentrating hormone receptor 1, General and Comparative Endocrinology. In press (2013) (査読有)
(2) Mandal MK, Saha S, Yoshimura K, (4 名省略), Biomolecular analysis and cancer diagnostics by negative mode probe electrospray ionization, Analyst. 138;1682-8(2013) (査読有)
(3) Mandal MK, Yoshimura K, Chen LC, (7 名省略), Application of probe electrospray ionization mass spectrometry (PESI-MS) to clinical diagnosis: solvent effect on lipid analysis, Journal of The American Society for Mass Spectrometry. 23;2043-7(2012) (査読有)
(4) Yoshimura K, Chen LC, Mandal MK, (8 名省略), Analysis of renal cell carcinoma as a first step for developing mass spectrometry-based diagnostics, Journal of The American Society for Mass Spectrometry. 23;1741-9(2012) (査読有)
(5) Mandal MK, Yoshimura K, Saha S, (8 名省略), Solid probe assisted nanoelectrospray ionization mass spectrometry for biological tissue diagnostics, Analyst. 137;4658-61(2012) (査読有)
(6) Takeda S, Yoshimura K, Hiraoka K, Innovations in Analytical Oncology - Status quo of Mass Spectrometry-Based Diagnostics for Malignant Tumor, Journal of Analytical Oncology. 1;74-80(2012) (査読有)
(7) Yoshimura K, Takeda S, Hedgehog signaling regulates myelination in the peripheral nervous system through primary cilia, Differentiation. 83;S78-85(2012) (査読有)
(8) Yoshimura K, Chen LC, Yu Z, Hiraoka K, Takeda S, Real-time analysis of living animals by electrospray ionization mass spectrometry, Analytical Biochemistry. 417;195-201(2011) (査読有)

〔学会発表〕（計 11 件）

(1) Yoshimura K., Kasai H., Moriishi K., Takeda S., 各種ヘッジホッグシグナルリガンド特異的な生理機能の解析, 第 118 回日本解剖学会総会・全国学術集会, 2013 年 3 月 28 日, 香川
(2) Yoshimura K., Takeda S., 末梢神経のミエリン形成におけるヘッジホッグシグナルの調節機構, 第 72 回日本解剖学会中部地方会, 2012 年 10 月 14 日, 岐阜
(3) Yoshimura K., Chen L.C., Mandal M.K., Tanabe K., Hara M., Fujii H., Takeda M., Hiraoka K., Takeda S., Developing a human cancer diagnostics system based on the probe electrospray ionization-mass spectrometry and Bayesian statistics, 19th International Mass Spectrometry Conference, 2012 年 9 月 18 日, 京都
(4) Yoshimura K., Misawa T., Hamamoto A., Saito Y., Takeda S., Mouse somatostatin receptor 3 on primary cilium modulates the calcium dynamics, 第 35 回日本神経科学大会, 2012 年 9 月 14 日, 名古屋

(5) Yoshimura K., 一次繊毛による末梢ミエリン形成調節, 第 14 回応用薬理シンポジウム, 2012 年 9 月 3 日, 山梨
(6) Yoshimura K., Takeda S., 末梢ミエリン形成における一次繊毛による Hh シグナル受容調節機構, 第 3 回繊毛研究会, 2012 年 6 月 9 日, 東京
(7) Yoshimura K., Takeda S., 一次繊毛を介した Hh シグナルの活性化によるミエリン形成促進機構, 第 117 回日本解剖学会総会合同大会, 2012 年 3 月 27 日, 山梨
(8) Yoshimura K., Takeda S., Hedgehog signaling facilitates the myelination by Schwann cells through the primary cilia, 第 34 回日本神経科学大会, 2011 年 9 月 14 日, 横浜
(9) Yoshimura K., Chen L.C., Mandal M.K., Hiraoka K., Takeda S., Rapid cancer diagnosis using electrospray ionization mass spectrometry, 第 59 回質量分析総合討論会, 2011 年 9 月 13 日, 大阪
(10) Yoshimura K., Takeda S., Hedgehog signaling regulates the early stage of myelination by Schwann cells through the primary cilia, 第 63 回日本細胞生物学会大会, 2011 年 6 月 27 日, 北海道
(11) Yoshimura K., Chen L.C., Zhan Y., Hiraoka K., Takeda S., Real time analysis of living animals by electrospray ionization mass spectrometry using solid needle as sampling probe, 59th American Society for Mass Spectrometry Conference, 2011 年 6 月 5 日, Denver, CO

〔産業財産権〕
○出願状況（計 1 件）
名称：質量分析装置、及び該装置を用いた癌診断装置
発明者：出水 秀明、谷畑 博司、糸井 弘人、田邉 國士、竹田 扇、吉村 健太郎、平岡 賢三、チェン リー チュイン、堀 裕和
権利者：株式会社島津製作所、田邉 國士、国立大学法人山梨大学
種類：特許権
番号：特願 2012-186490
出願年月日：2012 年 8 月 27 日
国内外の別：国内

６．研究組織
(1)研究代表者
吉村　健太郎（YOSHIMURA KENTARO）
山梨大学・大学院医学工学総合研究部・助教
研究者番号：70516921

(2)研究分担者
なし

(3)連携研究者
なし