

加した m/z 186 のピークが最も大きかった。HVA でも同様に [M+H]⁺ の m/z 183 のピーク、[M+NH₄]⁺ の m/z 200 のピーク、[M+Na]⁺ の m/z 205 のピークが観測され、やはり [M+NH₄]⁺ の m/z 200 のピークのピークが最も大きかった。これに対し、VMA ではイオンのピークが全く観察されなかった。これは VMA から DOPAC のピークにかけて m/z 161 のピークが大きく出ており、これが VMA のイオン化を妨げているのではないかと考えられる。

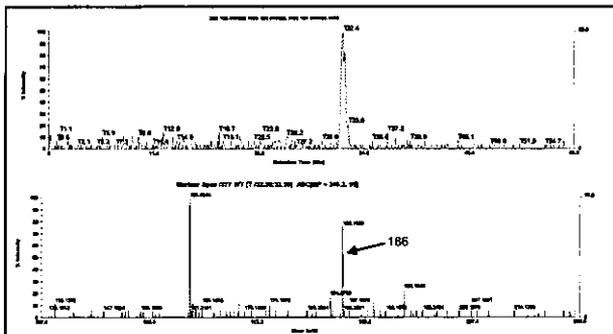


Fig.3-1 DOPAC m/z 168 ([M+H]⁺)
 m/z 186 ([M+NH₄]⁺) m/z 191 ([M+Na]⁺)

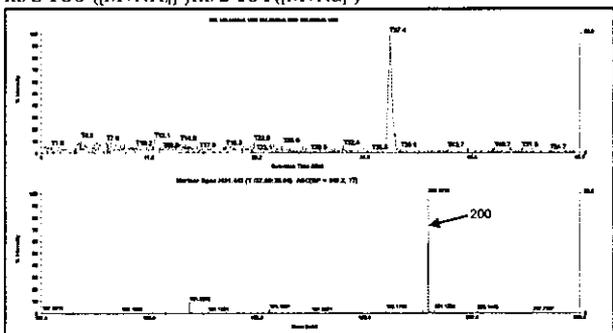


Fig.3-2 HVA m/z 183 ([M+H]⁺)
 m/z 200 ([M+NH₄]⁺) m/z 205 ([M+Na]⁺)

E. 結論

今回の実験より、LC-MS におけるカテコールアミン代謝物一斉分析のための条件決定ができ、さらにカテコールアミン代謝物の溶出順及び、それぞれの物質の基準ピークの確認ができた。この条件及び結果は、今後の血清中カテコールアミン代謝物直接測定法の基準となるものであると言える。しかしながら今回の試料の濃度は質量分析装置導入時点で 500 ng/mL と高濃度であるため、さらに検出感度を上げる工夫が必要であり、また定量性の確認も必要であると考えている。

1.2. 血液中カテコールアミン一斉分析 LC-MS の為の前処理濃縮法・分離法の確立

B. 方法

標準液、試薬、試液及び機器は 1 の実験と同じものを使用した。

1. 内面逆相カラム

血清からの低分子の分離においては、低分子が血清中に多量に存在するアルブミンなどのタンパク質に結合していることもあり低分子とタンパク質の分離が必要である。そこで多孔性の ODS 修飾された樹脂に BSA をコートした内面逆相カラム (TSK precolumn, BSA-ODS, TO219, 東ソー (株)) を用いた血清直接注入による分析を試みた。この内面逆相カラムは Fig.4 に示したように、孔の外側の ODS は BSA によりコートされているため不活性となっており、内部のみが逆相カラムとして働くものである。このためタンパク質のような大きな分子は孔の内部に入り込むことができず素通りするが、ODS と相互作用できる低分子は ODS に保持されるためタンパク質との分離及び濃縮が可能である。このカラムを用い、10 mM 酢酸アンモニウム緩衝液を移動相とし、タンパク質と低分子の分離を行った。

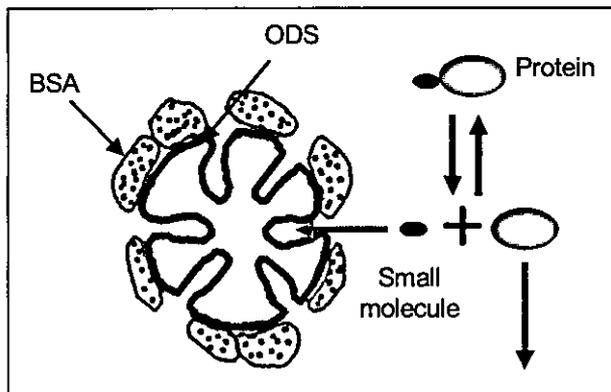


Fig.4 内面逆相カラム

2. カラムスイッチング

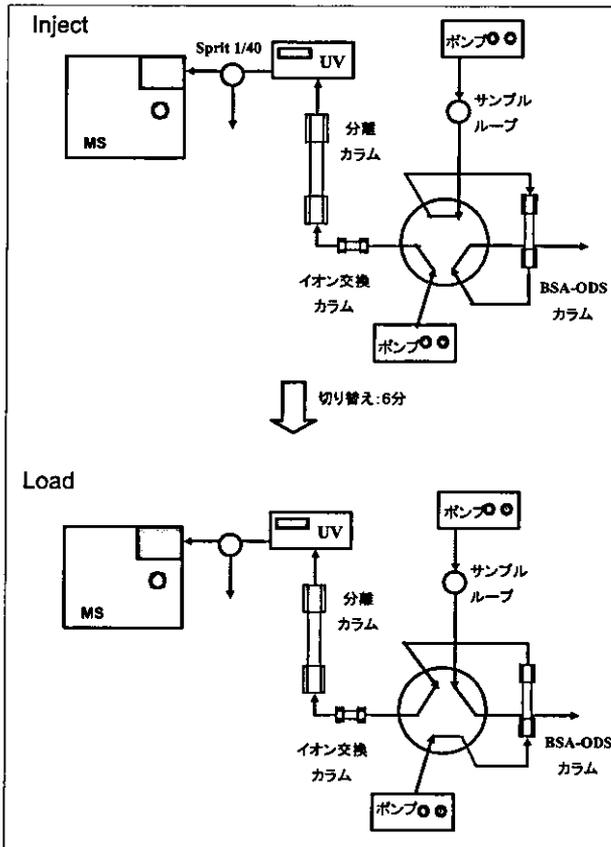


Fig.5 カラムスイッチング

内面逆相カラムにより濃縮した試料を分離カラムに導入するために Fig.5 のような流路を用いた。つまり試料導入時には、サンプルループから内面逆相カラムを通り排液され、もう一方では分離カラムのコンディショニングを行う。そしてカラムスイッチングにより内面逆相カラムにバックフラッシュを行い、分離カラムから UV 検出器そして MS に導入されるようになっている。

C. 結果・考察

1. 内面逆相カラム

FBS を用いた模擬血清を用いてタンパク質と低分子の分離を試みた。しかしながら、今回の標的であるカテコールアミン代謝物は水溶性が高いため、ODS による保持が不十分で分離を完全に行うことはできなかった。そこで保持を高めるためにイオンペア剤を用いることとした。MS へオンラインで接続すること、血清との十分な分離が期待できることなどの理由から、揮発性の Nonafluoropentanoic acid ($\text{CF}_3(\text{CF}_2)_3\text{COOH}$, ACROC) を用い移動相を 0.02% $\text{CF}_3(\text{CF}_2)_3\text{COOH}/10 \text{ mM}$ ギ酸アンモニウム緩衝液へ変更した。Fig.6-1 にその LC クロマ

トグラムを示す。このように、タンパク質や塩を多量に含む大きなピークが先行し、その後カテコールアミンを含む低分子のピークが出た。このときのタンパク質濃度の時間的経過を Lowry 法による 700 nm の吸光度により求めたところ、6 分以降にはタンパク質が存在していないことがわかり、Fig.6-2.3 のようにタンパク質と低分子の分離が可能となった。

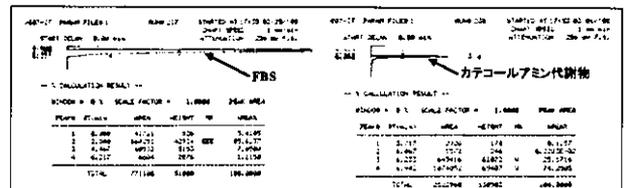
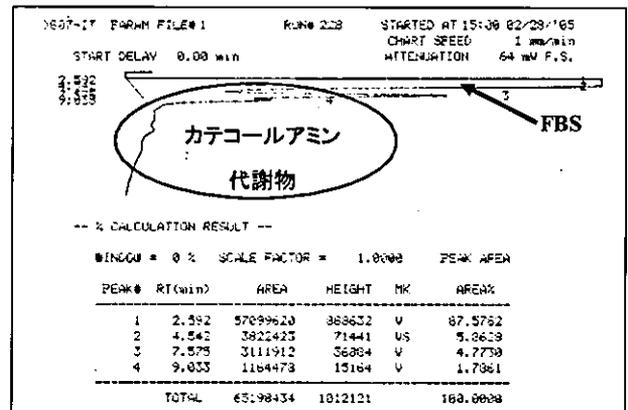


Fig.6-1 内面逆相カラムによるカテコールアミン代謝物添加 FBS の分離、6-2 試料導入から 6 分まで、6-3 カラムスイッチング後

2. カテコールアミンの分離・測定

内面逆相カラム中に濃縮された低分子を 6 分後に流路を切り替えることにより、分離カラムへの導入及びその分離を図った。しかし内面逆相カラムで用いたイオンペア剤が、分離及びイオン化を妨げてしまい良好な分離が得られなかった。そこで分離カラムの前に強陰イオン交換カラム (TOYOPEARL QAE-550 東ソー(株)) による、イオン交換処理によりイオンペア剤の吸着を試みた。それぞれの標準物質においてイオンペア剤の除去率と標準物質の回収率を確認したところ、アミン型、アミノ酸型においては良好な結果が得られた。しかしカルボン酸型においては回収率が非常に悪かった。これは現在の条件 (pH 3.07) ではイオン型であり、イオン交換基と相互作用してしまうためであると考えられる。そこで溶出を 5% メタノール / 0.2N 蟻酸溶液 (pH 2.12) で行った。これにより除去率、回収率ともに良好な結果を得ることができた。

E. 結論

今回の実験により、内面逆相カラムと強陰イオン交換カラムを用いることで、血清直接注入による血清カテコールアミン一斉分析系の条件の決定ができた。現在はオフラインの部分もあり回収率などに問題はあるが、今後、イオン交換カラムも含め系のオンライン化を進めていき、よりよい系の確立を行う予定である。

F. 参考文献

1. Morita I, Masujima T, Yoshida H, and Imai H, *Anal. Biochem.* 151,358-364 (1985)
2. Gustavsson SA, Samskog J, Markides KE, Langstrom B. *J Chromatogr A.* 2001 Dec 7;937(1-2):41-7.
3. Fuh MR, Haung CH, Lin SL, Pan WH. *J Chromatogr A.* 2004 Mar 26;1031(1-2):197-201.

2. 尿中カテコールアミン一斉分析 LC-MS の為の前処理濃縮法・分離法の確立

B. 研究方法

1. 検討項目

①抽出物確認に HPLC-UV を用いることとし、その条件最適化検討を行う。最終的に LC-MS で解析を行うことから、揮発性の緩衝液あるいはイオン対試薬を用いることとする。さらに尿試料を用いることから、急激な溶媒組成の変化を避け、グラジエント溶出を必要とする場合はリニアグラジエントとする。

②標準試料を用い、OASIS MCX カートリッジの選択性を検証し、回収率を求める。

③添加試料を用い、尿中からカテコールアミン類を抽出する条件を決定する。

2. ヒト生体試料

本研究に用いた生体試料は、試験実施者の部分尿とした。採尿後、遠心管の目盛りで尿量を測定し、尿量の 2% の 6 N 塩酸を添加し pH を 2 以下の塩酸酸性蓄尿とし、遮光して冷蔵し、1 日以内に使用した。試験実施後に余った試料は、バイオハザードとして感染性廃棄物処理を施して全量を廃棄した。

3. 試薬

Norepinephrine : Fluka

DOPA, DOPAC, Dopamine, Epinephrine, HVA, Metanephrine, Norepinephrine, VMA : SIGMA
メタノール : 関東化学社製 特級
アンモニア : 関東化学社製 特級
塩酸 : 関東化学社製 特級
ギ酸 : 関東化学社製 特級
ギ酸アンモニウム : 片山化学工業
TFA : SIGMA
精製水 : Milipore で精製した超純水

4. LC 条件

装置 : 島津製作所製 LCMS-2010 (システムコントローラ : SCL-10AVP、ポンプ : LC-10AVP、グラジエントユニット : FCV-10ALVP、デガッサ : DGU-12AM、UV 検出器 : SPD-10AVP) データ解析ソフト : 同社製 LCMSSolution

分析用カラム : ULTRON N-C18 (4.6 mmI.D. × 15 cm) 信和化学工業

分析用カラム : Inertsil ODS (4.6 mmI.D. × 15 cm) GLサイエンス社製

ガードカラム : ステンレスカラム (316-1/4) に東ソー TSK-GEL LS-410A ODS 10-20 μm を充てん

移動相 A 液 : 水 + メタノール + ギ酸 = 96 : 4 : 1 (v/v)

移動相 B 液 : メタノール + ギ酸 = 100 : 1 (v/v)

流速 : 0.5 mL/min

カラム温度 : 室温

サンプルループ : 100 μL 分析試料に応じてループカット方式と計量注入方式を使い分けた。計量注入方式はマイクロシリンジ計量とした。

測定

検出器 1 : OD 280 nm

検出器 2 : OD 210 nm

5. 固相抽出

カートリッジ : OASIS MCX (6 cc / 150 mg) Waters 社製

サンプル : 標準物質添加塩酸酸性蓄尿を精製水で 10 倍希釈 (10 mL)

洗浄 : 0.1 N 塩酸 (5 mL)

抽出 : 5% アンモニア含有メタノール

最終溶液 : 45°C 温浴中空素気流乾固 → 再溶解 (1% ギ酸)

6. 標準試料

カテコールアミン類およびその代謝物の標準品として、DOPA、DOPAC、Dopamine、Epinephrine、HVA、Metanephrine、Norepinephrine、Normetanephrine、およびVMAを用いた。それぞれ10 mgを電子天秤で正確に秤量した。Epinephrineは0.1 N塩酸に溶解しメスフラスコを用いて0.1 N塩酸で10 mLに、それ以外は精製水に溶解しメスフラスコを用いて精製水で10 mLとし、標準溶液原液とした。標準溶液原液を等量ずつ混合したものを混合標準溶液、各々を精製水で9倍に希釈したものをHPLCピーク同定用試料とした。各標準溶液原液を1 mLずつ混合し、0.1 N塩酸1 mLを加えて最終濃度を各100 µg/mLとしたものをワーキング溶液とした。

7. 試験試料

塩酸性尿にワーキング溶液を添加したものを添加試料、ワーキング溶液に代えて精製水を添加したものをブランク試料とした。

C. 研究結果

1. LC分析条件の検討

標準品として用いたカテコールアミン代謝物類は、アルカリ条件下では速やかに分解・変性するため、実際の尿試料もpH3以下の酸性条件とされる。この条件下では、アミン型のDopamine、Epinephrine、Metanephrine、Norepinephrine、Normetanephrineとアミノ酸であるDOPAは高い極性を持ち、一方でカルボン酸型であるDOPAC、HVA、VMAは極性が低くODSに強く保持される。こうした場合通常、アルキルスルホン酸塩等のイオン対試薬を用い高極性物質の保持を強めるが、本研究においてはLC-MSを前提としているため、不揮発性の塩を移動相に添加することを避け、高極性移動相から低極性移動相へのグラジエント溶出を行った。極性溶媒として、ギ酸、ギ酸アンモニウム緩衝液、TFAを検討した。この結果、1%ギ酸と50 mMギ酸アンモニウム緩衝液(pH 3.05)において良好な分離を得たが、移動相調製操作の容易さから1%ギ酸を採用した。この条件において溶出条件を検討した結果、最も保持の強い物質でも50%メタノール添加で溶出することから、移動相A液を水:メタノール:ギ酸 = 96:4:1、移動相B液をメタノール:ギ酸 = 100:1としてFig.7に示すグラジエントとした。

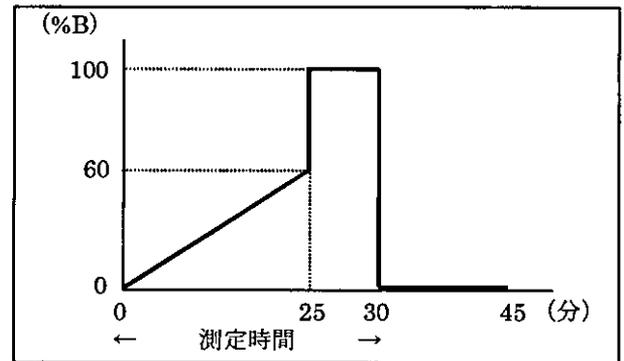
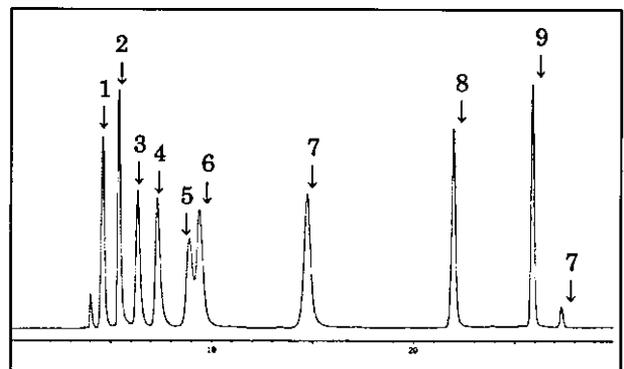


Fig.7 グラジエント設計

この条件で分離した混合標準溶液のLCクロマトグラムをFig.8に示す。溶出順序は、Norepinephrine、Epinephrine、Normetanephrine、Dopamine、Metanephrine、DOPA、VMA、DOPAC、HVAであった。



1: Norepinephrine 2: Epinephrine
 3: Normetanephrine 4: Dopamine
 5: Metanephrine 6: DOPA 7: VMA
 8: DOPAC 9: HVA

Fig.8 混合標準溶液のクロマトグラム

2. OASIS MCXによる精製

OASIS MCXは、強陽イオン交換・逆相ミックスモード充てん剤である。塩基性化合物と夾雑低極性物質の分離に適するとされるが、酸性条件下でのカテコールアミン代謝物類の一斉捕集が可能と考えられることから、この充てん剤を用いて分離・精製を行うこととし、その条件の検討を行った。

2.1. 標準試料溶液による検討

まず、標準試料を用いて捕集・抽出の検討を行った。ワーキング溶液を精製水で10倍希釈し、10 mLをOASIS MCXカートリッジに負荷し、素通り画分を回収した。次に0.1 N塩酸5 mLで洗浄し、洗浄画分を回収した。シリッジで空気を押し込み間隙水を除去した後、

5%アンモニア含有メタノール 5 mL で抽出した。この時、抽出液がアルカリ性であるため抽出物が褐色に変色したため、あらかじめ試験管に 6 N 塩酸を 0.5 mL 加えておき、その中に 4.5 mL の 5%アンモニア含有メタノールで抽出する方法に変更した。抽出後、抽出液を直ちにボルテックスミキサーで激しく攪拌し、45 °C 温浴中で完全に乾固するまで窒素気流乾固を行った。乾固物を 1% 酢酸 0.5 mL で溶解し、0.22 μm フィルターでろ過して HPLC 試料とした。負荷試料、素通り画分、抽出画分の LC クロマトグラムをそれぞれ以下に示す (Fig.9-1、Fig.9-2、Fig.9-3)。

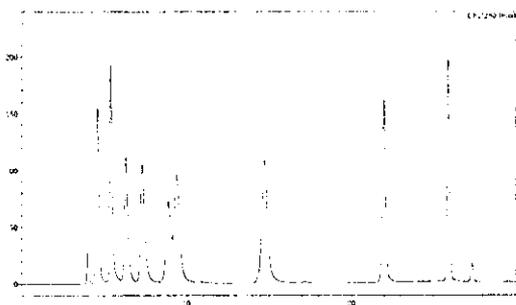


Fig.9-1 負荷試料

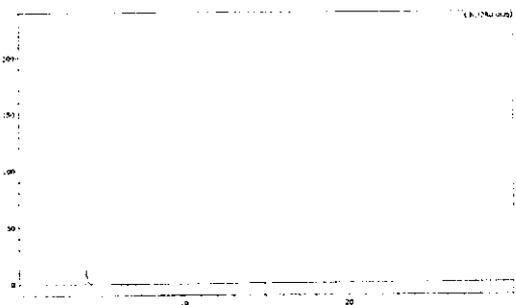


Fig.9-2 素通り画分

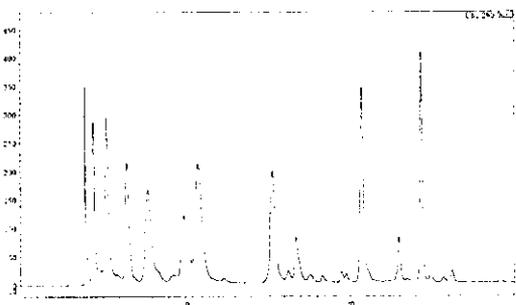


Fig.9-3 抽出画分

負荷したカテコールアミン代謝物類 9 種類全てが抽出画分に得られた (Fig.9-3)。各成分の回収率を Table.1 に示す。

Table.1 回収率

成分	ピーク面積		回収率 (%)
	負荷試料	抽出画分	
Norepinephrine	1879547	909211	48.4
Epinephrine	2149920	1284153	59.7
Normetanephrine	1655483	989472	59.8
Dopamine	1896400	1230799	64.9
Metanephrine	1541864	894505	58.0
DOPA	2349371	1794326	76.4
VMA	2692997	1113978	41.4
DOPAC	2357109	1344499	57.0
HVA	2104326	1114780	53.0

窒素気流乾固→再溶解により、抽出画分は負荷試料の 20 倍濃度。抽出画分のインジェクト量は負荷試料の 1/5 であるので、抽出画分の試料実量は負荷試料の 4 倍となっているため、抽出画分のピーク面積は解析結果の 1/4 倍（小数点以下四捨五入）としている。

ほぼすべての成分で回収率が 60% を下回る結果となった。特に VMA においては約 40% と非常に低い回収率となった。

次に、標準試料を用いて選択性の検討を行った。この試験は、分析カラムに Inertsil ODS を用いた。10 倍希釈ワーキング溶液 10 mL を負荷し、洗浄後、一方はメタノールで抽出後、5%アンモニア水で抽出を行い (A コース)、もう一方は 5%アンモニア水で抽出後、メタノールで抽出を行った (B コース)。それぞれ最後に 5%アンモニア/メタノールで抽出した。各画分のクロマトグラムを Fig.10-1 ~ -8 に示す。

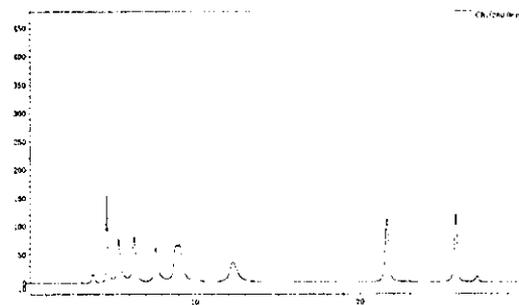


Fig.10-1 A コース 素通り画分 (100 μL インジェクト)

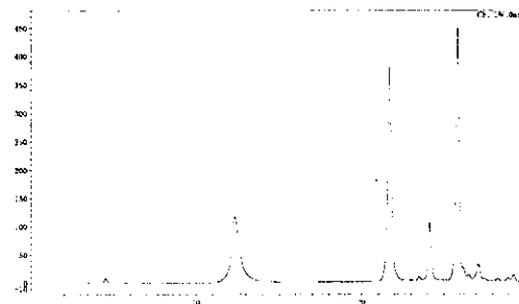


Fig.10-2 A コース メタノール抽出 (窒素気流乾固→0.5 mL 1% 酢酸に再溶解 20 μL インジェクト)

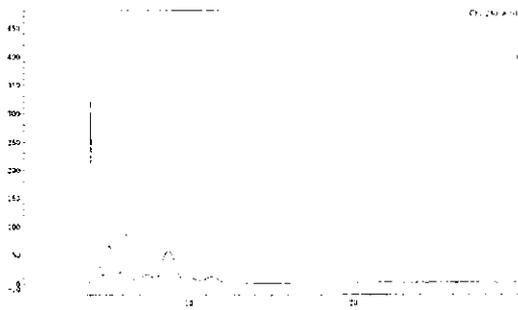


Fig.10-3 A コース アンモニア抽出
 (0.5 100 mL 6 N 塩酸中に 4.5 mL で抽出
 100 μ L インジェクト)

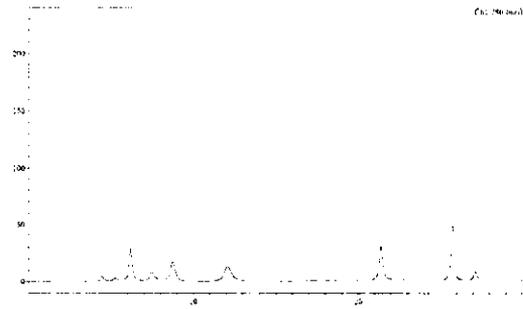


Fig.10-7 B コース メタノール抽出画分
 (窒素気流乾固→0.5 mL 1% ギ酸に再溶解
 20 μ L インジェクト)

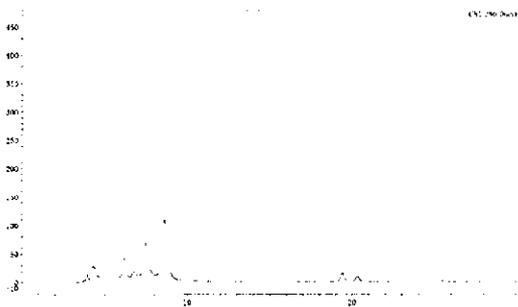


Fig.10-4 A コース
 5% アンモニア / メタノール抽出
 (0.5 mL 6 N 塩酸中に 4.5 mL で抽出
 窒素気流乾固→0.5 mL 1% ギ酸に再溶解
 20 μ L インジェクト)

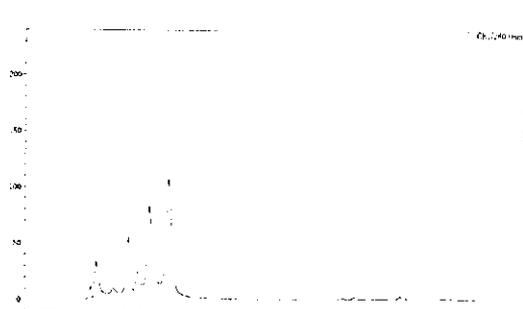


Fig.10-8 B コース
 5% アンモニア / メタノール抽出
 (0.5 mL 6 N 塩酸中に 4.5 mL で抽出
 窒素気流乾固→0.5 mL 1% ギ酸に再溶解
 20 μ L インジェクト)

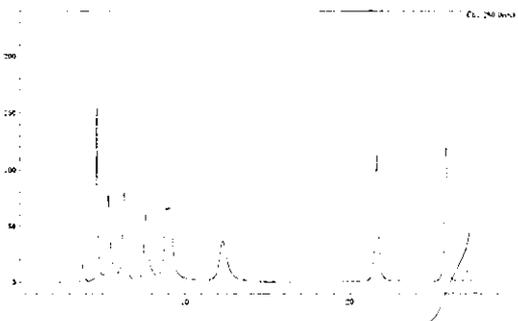


Fig.10-5 B コース 素通り画分
 (100 μ L インジェクト)



Fig.10-6 B コース アンモニア抽出画分
 (0.5 mL 6 N 塩酸中に 4.5 mL で抽出
 100 μ L インジェクト)

A コースから、VMA、DOPAC、HVA のカルボン酸型分子群は OASIS MCX の逆相モードで捕集されていることが分かった。しかし一方で B コースで 5% メタノールでも溶出していた。アミン型分子群およびアミノ酸はメタノールでは溶出せず、5% アンモニアで溶出されたことから、OASIS MCX の陽イオン交換モードで捕集されていることを裏付けた。このことから、カテコールアミン代謝物類の抽出は抽出溶媒によって選択的に行えることが分かった。これにより、生体試料中から抽出する際の夾雑物洗浄溶媒を選択することができる。

5% アンモニア / メタノールによる全成分一斉抽出の操作のスキームを Fig.11 に示す。

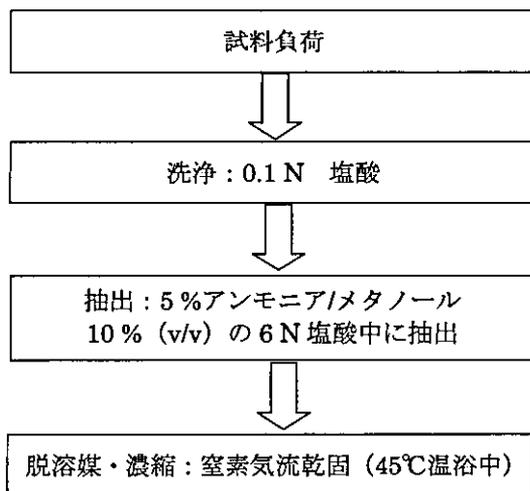


Fig.11 抽出操作スキーム

2.2. 添加試料による検討

塩酸蓄尿：ワーキング溶液 = 9 : 1 (v/v) に混合した添加試料と、塩酸蓄尿：精製水 = 9 : 1 (v/v) に混合したブランク試料をそれぞれ調製した。尿中塩類と OASIS MCX のイオン交換相互作用を抑制するために、各試料溶液を精製水で 10 倍希釈し、OASIS MCX に 10 mL 負荷した。5 mL の 6 N 塩酸で洗浄し、シリンジで空気を押し込み間隙水を除去した。試験管にあらかじめ 0.5 mL の 6 N 塩酸を加えておき、その中に 4.5 mL の 5 % アンモニア / メタノールで抽出した。抽出液は 45℃温浴中で窒素気流乾固した後、0.5 mL 1 % ギ酸に再溶解した。HPLC 試料は、0.22 μm フィルタでろ過した、抽出操作前試料 100 μL、抽出操作後再溶解液 20 μL とした。ブランク試料とその OASIS MCX 抽出物、添加試料とその OASIS MCX 抽出物の各クロマトグラムを Fig.12-1 ~ -4 に示す。

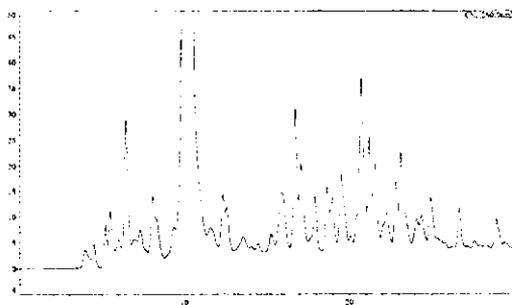


Fig.12-1 ブランク試料のクロマトグラム

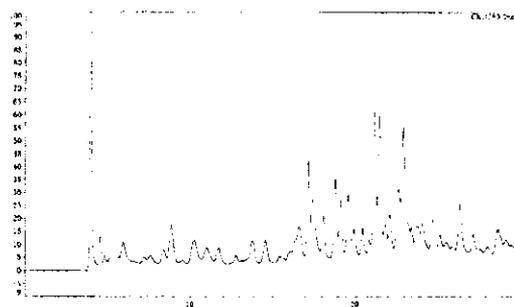


Fig.12-2 ブランク試料の OASIS MCX 抽出物のクロマトグラム

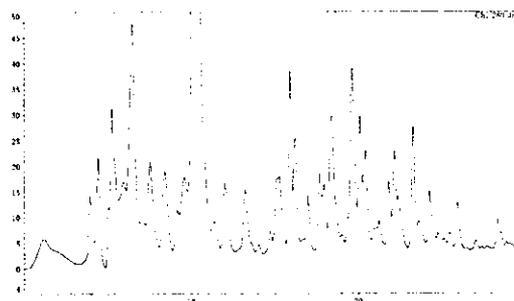


Fig.12-3 添加試料のクロマトグラム

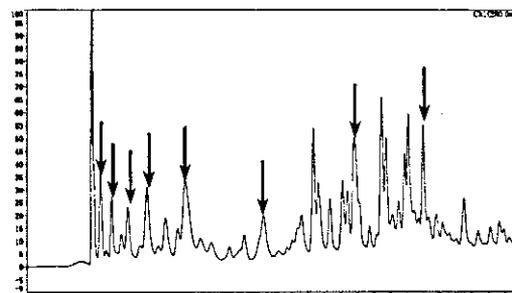


Fig.12-4 添加試料の OASIS MCX 抽出物のクロマトグラム

その結果、添加試料の抽出溶液の LC クロマトグラムに、ブランク試料の抽出溶液の LC クロマトグラムと比較して明らかに増大したピーク (Fig.12-4 中の矢印) を認めた。これらのリテンションタイムが標準品抽出溶液の LC クロマトグラムに出現するピークのリテンションタイムとほぼ一致することから、カテコールアミン代謝物類が尿中から OASIS MCX による抽出操作によって回収できることを確認した。

D. 考察

- (1) カテコールアミン類およびその代謝物類の HPLC-UV 分析
 現在、神経芽細胞腫マスキリングには、カテコールアミン類の最終代謝産物である VMA と HVA を

対象とし、HPLC-ECDにより分析・定量されている。VMAとHVAはカルボン酸型であることに加えベンゼン環3位がO-メチル化されていることから、低pH条件下でODSに非常によく保持する。このため、従来のVMA、HVAを対象としたHPLC条件では溶媒強度が強く、イオン型となっているアミン型分子群を含んだ成分一斉分析に適用できない。溶媒強度を弱くし、イオン対試薬としてアルキルスルホン酸塩を用いることにより、アミン型分子群をも同時にHPLC分析を可能にできるが、分析時間が延びる傾向にあることに加え、不揮発性の塩を添加することによりLC-MSに適用できなくなる欠点がある。そのため、緩衝液あるいはイオン対試薬は揮発性のものでなければならない。

検討の結果、1%ギ酸を含有する移動相において最も良好な分離を得た。1%ギ酸水溶液のpHを測定したところ約pH2であり、これはアミン型分子群が分子型として存在できるpH域であることに加え、塩酸酸性蓄尿とほぼ等しいpHであることから、緩衝作用を持たないギ酸添加移動相で十分な分離が達成できたものと考えられる。

分析時間短縮のためには、グラジエント溶出が適している。ステップワイズグラジエントによりさらに分析時間を短縮することは可能である。しかし、生体試料をHPLC分析する場合、急激な溶媒組成変化は巨大なノイズピークを生じる原因となる。これを防ぐために、カラム体積の5倍のリニアグラジエント溶出とした。さらに再コンディショニング前に100%メタノールによるカラム洗浄工程を含めた。これにより、カテコールアミン代謝物類標準品9種類を、測定時間30分、分析サイクル45分(流速0.5 mL/min)で分析可能となった。

ところで、ODSへの保持が特別に強力なVMA、DOPAC、HVAを除く他の物質は、15分以内にすべて溶出し、ピーク間隔が非常に狭い。これらを十分に分離するためには、移動相の初期状態の有機溶媒濃度をさらに下げるか、十分な分離が得られるまでアイソクラティック溶出を行うべきである。本研究に使用したHPLCシステムは、機器バリデーションによりグラジエントディレイが7.5 minであることが明らかになっており、これを考慮して最初からグラジエント溶出とした。グラジエントディレイが小さなシステムでは、溶出初期はアイソクラティックで行う等の対策をする必要がある。

LC条件としては簡便な移動相による良好な分離能を

達成したが、LC-MSへの最適化は今後の課題である。

(2)OASIS MCXによる分離・精製

OASIS MCXは、Waters社が開発・販売する陽イオン交換・逆相ミックスモード充てん剤である。メーカー案内では、生体マトリックスからの塩基性化合物の抽出に推奨されている。本研究では、塩酸酸性条件下でカテコールアミン代謝物類が正電荷を持つアミン型分子群と、電荷を持たないカルボン酸型分子群に大別されることに着目した。すなわち、正電荷型分子群をイオン交換モードにより、非電荷分子群を逆相モードにより一斉に捕集されることを期待した。

メーカー標準プロトコルに従って抽出操作を行ったところ、標準品の9種類すべてが抽出液中に回収された。しかし、現状では回収率が低い。素通り画分、洗浄画分のどちらにも標準品と見られるピークは認められないため、カートリッジ内に残留していると考えられる。OASIS MCX充てん剤からカテコールアミン代謝物類をより強く溶離する抽出条件を求める必要があるが、生体試料中の夾雑物を強く溶離してはならない。抽出溶媒の組成により選択的に抽出を行えることが選択性の検討試験から明らかになったので、夾雑物の洗浄を最適化することにより適度な溶離力で目的物を溶出することが可能となる。洗浄の最適化は今後の課題とする。

抽出物のLCクロマトグラムのvoid付近や、リテンションタイム15分以降の強保持域に、処理前には見られないピークが出現した。これらは強い酸性条件下や乾固処理中の加熱等によって加水分解された産物である可能性が考えられる。MSにて、これらのピーク成分の分子量および構造を確認する必要がある。仮に加水分解物とすると、前処理の過程で成分の一部が失われているということになる。ピーク成分の確認を早期に行い、定量に影響が及ぶ可能性があれば前処理方法を検討する。

現在までのOASIS MCX抽出方法では、抽出液が非常に濃い塩化アンモニウム溶液となる。事実、窒素気流乾固によって多量の塩結晶が析出する。現在のところ抽出物の確認にHPLC-UVを用いており、塩の影響はほとんど見られない。現在、MSに適用するにあたり、効果的な脱塩方法あるいは抽出液を高濃度塩溶液にしない抽出方法を開発中である。

E. 結論

OASIS MCX によるカテコールアミン代謝物類の一斉捕集を行った。極性の異なる分子群を一斉に捕集することから、精製工程の短縮となり収率の向上が見込まれる。ただし、現状では収率は低い。回収率低下の原因として、抽出条件の不適だけでなく、目的物の分解、変性等による損失が考えられる。MS による構造化学的な解析を加えることで、分解、変性も定量的に解析することが可能となる。これらの化学的改変の定性的、定量的解析は代謝異常の解明への応用につながる。

現在までに確立した LC 条件をもとに、LC-MS 条件最適化と、最終抽出物の MS 試料用処理方法の開発、定量測定系の確立を行っている。

F. 参考文献

- 1) Chan ECY, Ho PC. High-performance liquid chromatography/atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometric method for the analysis of catecholamines and metanephrines in human urine. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 14, 1959-1964 (2000)
- 2) Mitsui Akane, Nohta Hitoshi, and Ohkura Yosuke. High-performance liquid chromatography of plasma catecholamines using 1,2-diphenylethylenediamine as precolumn fluorescence derivatization reagent. *J. Chromatogr.* 344, 61-70 (1985)
- 3) 好井信子, 森本弘美, 植田晶子, 十川聖三 神経芽細胞腫の乳児マス・スクリーニング実施状況について (第 13 報) 香川県環境保健研究センター所報 創刊号 198-202 (2002)
- 4) 山辺真一, 林隆義, 今中雅章, 吉岡敏行, 西島倫子 エストラジオール類の固相抽出における溶出条件の検討 岡山県環境保健センター年報 26, 24-25 (2002)

3. 新検出法 MALDI-TOF 質量分析法による高分子タンパク質検出法の確立

本実験で使用した質量分析装置は、分子量に依存しない検出感度を持ち、従来の質量分析装置が苦手とするタンパク質などの高分子を高感度に検出できる。これを用い、高分子タンパク質をターゲットとした神経芽細胞腫診断のための新規マーカー探索および分析法の開発を行うことを目的とし、まず本装置による基礎実験を行った。

B. 研究方法

1. 試料の調製

1.1. 測定試料

標準試料として、マウス IgG (R&G Systems)、牛血清 albumin (BSA, SIGMA)、 β -casein (SIGMA) を用い、それぞれ Milli-Q 水 (Academic A10 にて作成) に溶解し、最終濃度 20 nmol/mL とした。また、混合試料として細胞培養用培地 (10% 牛胎児血清含有 α -MEM) を用いた。さらに培地については、ゲル濾過クロマトグラフィーによる脱塩処理を行った。ゲルは Sephadex G-25 Medium (アマシャムバイオサイエンス) を用い、Milli-Q 水で分離・溶出し、タンパク質分画を回収して、これを脱塩処理試料とした。

1.2. マトリックス

マトリックスには、高分子を効率よくイオン化できるシナピン酸 (ACROS) を用い、共に 50% アセトニトリル (関東化学株式会社)、0.5% トリフルオロ酢酸 (SIGMA-Aldrich) 溶液に溶解して飽和溶液を調製した。

試料とマトリックスは MALDI プレート上にて混合し、室温に放置して結晶化させ、これを測定用試料とした。

2. 質量分析装置

COMET 社製の MALDI-TOF 質量分析装置、macromizer を用いた。

3. 測定条件

測定はすべてポジティブイオンモードで行った。

Extraction Voltage	: 20 kV
Second Voltage	: 3 kV
Lens Voltage	: 10.5 kV
Extraction Delay	: 2500 nsec (IgG)
	1500 nsec (BSA)
	(混合試料)
	1200 nsec (β -casein)

C. 研究結果

1. macromizer の検出感度について

macromizer には、トンネル結合型極低温検出器が搭載されている。この検出器は、検出器に到達したイオンを、その大きさによることなくカウントすることができるため、理論的には同濃度の試料であれば同じシグナル強度で検出する (実際にはイオン化効率等の要因により理論値とは異なる)。BSA の測定結果を Fig.13

に示す。主ピークは MALDI 法の特徴でもある 1 価体イオン ($m/z\ 66.5 \times 10E^3$) で、2 価体イオンも検出されている。電荷数は、エネルギーカイネティクスを表した Energy vs. Mass (Fig.13-B) から読みとることができる。マススペクトルに示されたピークと相対した X 軸のエネルギーをみると、主ピークでは 20 keV を中心とした帯がみられるのに対し、 $m/z\ 33.3 \times 10E^3$ では 25 keV、 $m/z\ 22.2 \times 10E^3$ では 30 keV を中心とした帯がみられる (図中、実線矢印および楕円で囲んだ部分)。これはそのイオンの持つエネルギー量、すなわち電荷数の違いを示し、keV 値が高ければ電荷も多いことを現している。さらに、1 価体の多量体ピークも複数検出され、BSA においては 2 ~ 5 量体ピークが得られた (矢印および楕円で囲んだ部分、波線)。 β -casein においても BSA と同様なパターンでピークが得られた。IgG では主に 1 価体、2 価体ピークが確認できた。

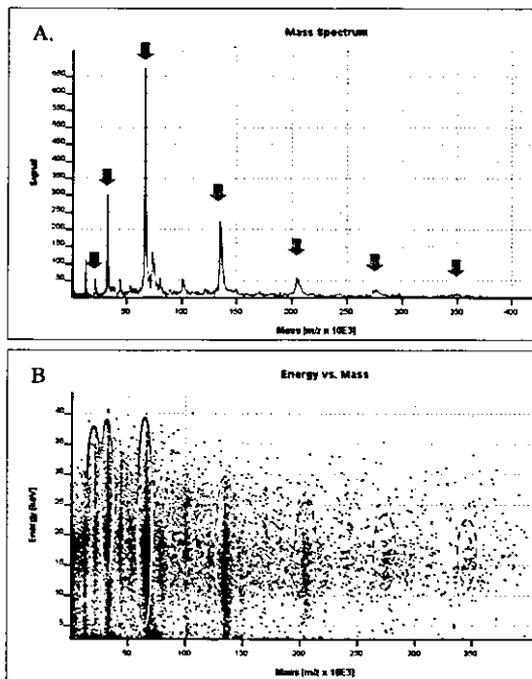


Fig.13 BSA のマススペクトルとエネルギー / マス比

混合試料の場合では、1 ~ 200 kDa の広範囲におけるピークパターンが確認できた。また、ゲル濾過クロマトグラフィーによる脱塩処理を行うことにより、ピーク強度の増加が確認できた (Fig.14.)。

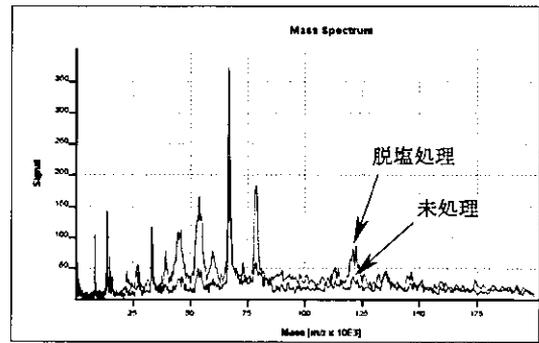


Fig.14 脱塩処理前後のマススペクトル比較 (混合試料)

D. 考察

今回の測定結果から、高分子量のタンパク質を高感度良く検出できること示された。検出ピークは主に 1 価体イオンで、さらに多価体イオンや多量体イオンがそのエネルギー分布図から解析可能であることがわかった。また、混合試料においても、BSA やトランスフェリンなど血清中のタンパク質が高感度良く検出され、SDS-PAGE で確認したところ、泳動パターンを反映したタンパク質のピークが得られていた。今回はポジティブモードのみの測定であったため、すべてのピークが得られているわけではない。また、タンパク質毎のイオン化効率の違いも検出パターンに反映されると考えられる。タンパク質のどのような構造、もしくはアミノ酸組成がどのようにイオン化に影響するのか、今後検証する必要がある。

E. 結論

新検出法 MALDI-TOF 質量分析装置を用いた標準物質の検出感度の検証を行った。

従来の質量分析法では検出が難しいとされる高分子タンパク質を高感度に検出できることが示された。このことは、これまで検出が難しいとされた高分子タンパク質複合体の検出の可能性も示しており、プロテインチップや組織マッピングへの利用が可能である。さらに、高分子タンパク質の一斉解析が可能となれば、病態解析や人工ワクチンのためのプロファイリング技術などへの応用が考えられる。

現在、神経芽細胞腫細胞株を用い、細胞内タンパク質や培養上清中への分泌タンパク質の解析を進めている。神経芽細胞腫に特徴的な因子、発現パターンの解析を進め、これをもとにプロテインチップの作成や病理組織のマッピングを試みる予定である。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Comparison of Catecholamine Pre-concentrated Level using Commercial Pre-concentration Tips Yuri Aoki, Tomomi Hasegawa, Katsuya Wada, Koji Kubota, Eiso Hiyama, Tsutomu Masujima
Chromatography, to be published
- 2) Pre-concentration Procedure for the Mass Spectroscopic Analysis of Total Human Catecholamines.
Tomomi Hasegawa, Katsuya Wada, Yuri Aoki, Koji Kubota, Eiso Hiyama, Tsutomu Masujima
Clinical Chemistry, to be published

2. 学会発表

日本薬学会第 125 年会

（東京：2005 年 3 月 29 日～ 31 日）

- 1) 神経芽細胞腫診断のための新規マーカーの検索
Investigation of new biomarkers for the diagnosis of neuroblastoma
○長谷川朝美¹, 青木悠里¹, 久保田耕司¹, 升島努¹, 檜山英三¹, 前田昌子²（¹ 広島大院医歯薬, ² 昭和大薬）
- 2) LC-MS によるマスキリーニングのための尿中カテコールアミン類の分析法の開発
Development of the analysis of catecholamines in human urine by LC/MS for mass screening.
○久保田耕司, 杉山礼隆, 守田弘之, 青木悠里, 長谷川朝美, 升島努, 檜山英三（広島大院医歯薬）
- 3) トンネル結合極低温検出質量分析機による高分子高感度検出
○青木悠里¹, 升島努¹, Gertraud Hayn², Urs Matter²（¹ 広島大院医歯薬, ² COMET 社 分析部）
- 4) LC-MS による神経芽細胞腫の新マーカー探索
○升島努¹, 檜山英三¹, 前田昌子²（¹ 広島大院医歯薬, ² 昭和大薬）

H. 知的財産の出願・登録状況

なし

マススクリーニング症例の病理組織研究と腫瘍特性に関する研究 —神経芽腫の組織型とその年齢分布、予後との関連性—

分担研究者 浜崎 豊 静岡県立こども病院 臨床病理科医長

研究要旨

神経芽腫の多数例の組織学的所見と生物学的、あるいは臨床所見との関連性の調査研究から、乳児期から年長児にわたる神経芽腫の組織型とその年齢分布を予測した。マススクリーニング発見神経芽腫は6～8ヵ月を頂点とし、12ヵ月頃には退縮傾向を示し、その大半、70%程度が消退していくと考えられる。これと並行して乳児神経芽腫は成熟傾向を示すようになり、24ヵ月までには良性の神経節腫が神経芽腫群腫瘍例の20～30%を占めるようになる。乳児期にも2～5%に存在する予後不良群は、20～24ヵ月以降には非マススクリーニング例として神経芽腫群腫瘍例の60～70%を占めるようになり、年長児神経芽腫の予後不良の主たる要因となる。

Summary

According to the morphological, biochemical, and clinical studies of a large number of cases with neuroblastoma, the relationship between the histological classification, the age distribution, and the prognosis was estimated. The neuroblastomas detected by mass screening, mostly found in the age of 6 months to 8 months, show the trend toward regression by the age of 12 months. Approximately 70 % of infantile neuroblastoma might regress finally, and another 30 % of neuroblastoma tends to mature, following to represent benign ganglioneuroma by the age of 24 months. Unfavorable histological group, which includes a small number of cases in infancy, occupies most of the cases after 20 months of age, causing poor prognosis of the neuroblastoma patients of older age group.

分担・共同研究者：浜崎 豊（静岡県立こども病院臨床病理科医長）、小林庸次（大阪市立総合医療センター病理部長）、中山雅弘（大阪府立母子保健総合医療センター検査部長）、田中祐吉（神奈川県立こども医療センター病理科部長）、岸本宏志（埼玉県立小児医療センター病理科医長）、村上仁彦（同病理科医員）、横山繁昭（北海道立小児総合保健センター検査部長）、堀江 弘（千葉県こども病院検査部長）

A. 研究目的

神経芽腫のなかには自然退縮して腫瘍縮小するもの、あるいは分化・成熟傾向を示して神経節腫に移行し、予後良好な経過を示す例がある¹⁾。一方で、腫瘍増殖傾向が著しく、骨髄をはじめ多くの臓器への腫瘍転移を示し、きわめて予後不良の腫瘍も存在するので、予後不良例を早期発見することは神経芽腫例の予後の向上につながる。

この神経芽腫の多様性は腫瘍のもつ組織学のおよび生物

学的特性に由来すると考えられ、また神経芽腫の組織発生の時期とも密接に関連している。神経芽腫の組織型の年齢分布を検索することは神経芽腫を理解し、その早期発見や臨床的予後を検討することの基本となる。また、生物学的特性のひとつとして、腫瘍細胞核のDNA量解析を利用したDNA倍数体による神経芽腫のタイプ分類と組織型、予後との関連性の検討を進め、その他、これまでの多数の症例の後ろ向き研究から、組織型とMYCN増幅や予後との関連性などの調査研究により、乳児から年長児まで広い範囲の神経芽腫の病理組織学的特性とその基本的概念を理解し、今後のマスの評価と方法の改善に役立てることを目的とした。

B. 研究方法

乳児神経芽腫の組織登録症例として217例の年齢分布、その退縮、成熟などの組織学的所見をまとめ、また、無治療、経過観察された82症例のうち、結果的に腫瘍摘出された25例の詳細な組織学的検索をまとめた。小児医療4施設の神経芽腫、神経節腫を含む神経芽腫群腫瘍、533症例

の組織型についてはそれらの年次の推移を検索した。また、神経芽腫 308 例の DNA 倍数体と組織型、予後との関連を検討した。加えて、神経芽腫群腫瘍、当院の 136 症例の年齢区分と組織型との関連性について検討した。以上の検索結果から、乳幼児から年長児まで神経芽腫群腫瘍全体としての予後を含めて、その組織型と年齢分布との関連性を予測した。

C. 研究結果

1. 神経芽腫群腫瘍の組織学的分類

INPC 国際分類 (International Neuroblastoma Pathology Classification) により神経芽腫、神経節芽腫、神経節腫などの神経芽腫群腫瘍の組織型を分類し、年齢などを加味した予後良好群、予後不良群についてもその基準により分類し (表 1)、臨床的所見と腫瘍の組織学的診断・組織型との関連性について調査、検討した²⁻⁴⁾。ただし、ここでの年齢は腫瘍発見年齢とは必ずしも一致せず、腫瘍切除時の年齢を表している。

2. 乳児神経芽腫の年齢分布と組織所見

1994～1999 年に組織登録された 1 歳までの乳児神経芽腫、217 例の年齢別の頂点は 8 カ月例であり、7 カ月が 56 例、8 カ月が 60 例、9 カ月が 31 例と、3 カ月で 67.7% を占める。組織学的検索では、6～8 カ月の 125 例のうち 66 例 (52.8%) が部分的な退縮傾向を示し、成熟傾向は 12 例 (9.6%) であった。そして、9～11 カ月の 58 例では 30 例 (51.7%) が退縮傾向を、4 例 (6.9%) が成熟傾向を示した。症例は少ないが、12～17 カ月の 8 例では、5 例 (62.5%) が退縮傾向を、2 例 (25.0%) が成熟傾向を示した。

3. 無治療経過観察例で腫瘍切除された症例のまとめ

マスキリーニング (マス) により発見された 82 例が、その後、無治療で経過を観察されているうちに、腫瘍の増大などにより結果的に腫瘍摘出された 25 症例の臨床的および組織学的所見を検討した結果、1) 25 症例の初診時の年齢は 6 ヶ月から 10 ヶ月、平均 7.5 ヶ月である。2) 腫瘍切除時の年齢は 10 ヶ月から 4 歳 5 ヶ月まで分布し、平均年齢は 1 歳 8 ヶ月で、臨床的 stage は 24 例が stage 1～2 で、stage 4S が 1 例である。3) 原発部位は副腎が 14 例、後腹膜交感神経節が 8 例、縦隔が 3 例である。4) 組織型は poorly differentiated NB が 6 例、differentiating NB が 6 例、neuroblastoma NOS が 2 例、GNB intermixed が 6 例、GN maturing が 3 例、GN mature が 1 例、GNB nodular が 1 例で、いずれも favorable group の範疇に入る。5) いずれの症

例も一部退縮 (18 例)、あるいは成熟 (13 例、一部は重複) の傾向を示し、1 歳 4 ヶ月頃から成熟傾向がみられ、とくに 1 歳 6 ヶ月以降は、1 例を除いて、神経節芽腫ないし神経節腫の明らかな成熟所見を示し、マス発見乳児神経芽腫への自然経過として、年齢とともに退縮、成熟する傾向を示唆している。

4. 神経芽腫群腫瘍における良性の神経節腫の推移

1975～2001 年までの 4 施設 (大阪市立総合医療セ

Neuroblastoma: undifferentiated, poorly differentiated, differentiating Ganglioneuroblastoma, intermixed Ganglioneuroma: maturing, mature Ganglioneuroblastoma: nodular, favorable/unfavorable
<u>Favorable group (FH)</u> poorly differentiated NB (<1.5 yrs, low or intermediate MKI) differentiating NB (<1.5 yrs, low or intermediate MKI) differentiating NB (1.5 - 5 yrs, low MKI) GNB intermixed / GN (in any age) GNB nodular (favorable NB components)
<u>Unfavorable group (UH)</u> undifferentiated NB (in any age) high MKI tumors (in any age) neuroblastoma (1.5 - 5 yrs) poorly differentiated differentiating (intermediate MKI) all neuroblastoma (5 yrs ≤) GNB nodular (unfavorable NB components)

表 1 神経芽腫 INPC 国際分類
 International Neuroblastoma Pathology Classification (INPC)

ンター、大阪府立母子保健総合医療センター、神奈川県立こども医療センター、静岡県立こども病院) における神経芽腫群腫瘍、533 例について調査研究したところ、1985 年頃からマス発見症例が飛躍的に増加し、神経芽腫群腫瘍全体の 48.6% (1985～1989 年) から 67.2% (1995～1999 年) を占めるようになった。この神経芽腫群腫瘍の経時的推移のなかで、良性の神経節腫は 1975 年から 1979 年頃には 28.0% を占めていたが、1995 年から 1999 年には 2.2% まで著減している。この神経節腫の減少は、非マス例との比較でも同様に、28.0% から 6.7% まで減少している。統計学的にも、神経節腫と神経芽腫の発生頻度との間には交互作用があり、マス発見神経芽腫例の増加に逆相関して神経芽腫が減少していることが分かった ($p < 0.0001$)。

5. 組織型と DNA 倍数体、年齢分布と予後との関連性

組織型および DNA 倍数体と臨床的予後との関連性については、神経芽腫 308 例を検討した結果、1.5 歳未満例の神経芽腫の予後は全体として良好であった。すなわち、1) 症例全体の生存率は 86.5% であった。2) 1.5 歳未満例と 1.5 歳以上例の予後 (生存率) については、1.5 歳未満例が 94.2%、1.5 歳以上例が 61.8% であり、統計学的に両者の間には有意な差が認められた ($p \leq 1\%$)。

なお、1.5 歳未満症例では、組織型や DNA 倍数体に

よるタイプ分類にかかわらず、予後は良好であった。また、組織型が予後不良群では DNA 倍数体、年齢にかかわらず予後は不良との結果が得られた。タイプ分類からみると、タイプ 2 神経芽腫は予後良好のタイプ 1 と予後不良のタイプ 3 の中間に位置し、多様な組織型、臨床像を示し、そのなかでも予後不良群の早期発見は予後改善に有用であることが示唆された。

6. 神経芽腫群腫瘍の組織型、年齢分布と予後との関連性

神経芽腫群腫瘍、136 例のうち 6 ヶ月から 12 ヶ月までのマス発見例は 45 例 (90%) で、また、24 ヶ月までの症例は 86 例であり、マス発見例が 56 例 (65.1%) となるが、2 歳以降のマス発見例はみられない。上記の INPC 組織型と予後との関連性をみると、年齢が 6 ヶ月未満も含めて 12 ヶ月までの症例では、組織型が予後良好群の 58 例はもちろん、予後不良群の 4 例でも臨床的予後は良好である。年齢 12 ヶ月から 24 ヶ月でみると、組織型が予後良好群 13 例では 1 例のみが死亡しているが、予後不良群の 10 例では生存が 2 例 (生存率 20%) である。24 ヶ月以降も死亡率が高く、予後不良群の 30 例のうち生存は 11 例 (生存率 36.7%) となっている。以上に加えて、36 ヶ月以上では神経節腫症例が 19 例と多くみられる。全体として、組織型が予後不良群の 44 例のうち 31 例は死亡している (死亡率 70.5%)。一方、予後良好群の 72 例のうち 71 例は生存している (生存率 98.6%)。ただし予後良好群のうちの 2 例は 6 年後、13 年後に二次的要因で死亡し、136 症例全体の生存率は 70.7% となる (表 2)。

D. 考察

胎児性腫瘍のひとつである神経芽腫の発生頻度は、従来、出生 10 万人に 10 例程度とされているが、本邦では全国的に導入された HVA / VMA マスにより発見される乳児神経芽腫は少なくとも、従来の約 2 倍の頻度となった。これらの乳児神経芽腫の病理組織学的な検索や臨床的所見、検査所見などから症例の年齢分布を予測すると、その大半、70% 程度は 12 ヶ月から 18 ヶ月頃までに退縮傾向を示すようになり、あるいは、その他の症例として 30% 前後は 12 ヶ月頃から腫瘍組織の成熟傾向が顕著となり、良性の神経節腫として長期に残存するようになる。これらの神経節腫症例は、従来、検診などで年長児に偶然、発見されていた。

多数例の臨床的予後の調査でも、マス発見例では予後良好の経過をたどることが分かっている。とくに、組織学的な検証として、無治療経過観察症例において腫瘍摘出された症例の検索では 18 ヶ月頃までに大半が成熟傾向を示すことが組織所見として確かめられた⁵⁾。

今回のより詳細な組織型と年齢分布の検討でも、1 歳未満例のみならず、1 歳から 2 歳例においても、マス発見例の大半は組織学的にも予後良好群の範疇に入り、臨床的にも予後は良好である。ただ、2 歳までの症例でも組織学的に予後不良群の症例では、臨床的にも死亡例の頻度が高くなっている。また、年齢が 2 歳を超えると、組織学的には予後良好群の症例が著減し、大半の症例が予後不良群の範疇に入ってくると考えられる。

生物学的な検討のひとつとして、DNA 倍数体と組織型、予後との関連性をみても、予後良好なタイプ 1 と予後不良なタイプ 3 の中間型としてタイプ 2 が位置づけられ、このタイプ 2 には組織所見、臨床像の多様性があり、今後の神経芽腫の早期発見、治療のターゲットのひとつとなる。

年 齢	6 ヶ月 未満	6 ~ 12 ヶ月	12 ~ 18 ヶ月	18 ~ 24 ヶ月	24 ~ 36 ヶ月	36 ~ 60 ヶ月	60 ヶ月 以上
非マス症例 (80 例)	12	5	5	8	10	15	25
マス症例 (56 例)	0	45	8	3	0	0	0
Unfavorable group (44 例)	2	2 (生存 2)	4	6 (生存 2)	10 (生存 3)	8 (生存 2)	12 (生存 4)
Favorable group (72 例)	10	48	9 (死亡 1)	4	0	1	0
Ganglioneuroma (20 例)	0	0	0	1	0	6	13

表 2 神経芽腫群腫瘍 136 例の組織型、年齢分布と予後との関連性

* 6 ~ 12 ヶ月の UH2 例、18 ~ 24 ヶ月の UH2 例、24 ~ 36 ヶ月の UH2 例、36 ~ 60 ヶ月の UH3 例、60 ヶ月以上 UH4 例が生存し (計 13 例)、UH 44 例中の 31 例は死亡 (死亡率 70.5%)

* 12 ~ 18 ヶ月の FH の 1 例は腫瘍死しているが、FH 72 例中、71 例は生存し (生存率 98.6%)、FH の 2 例は 6 年後、13 年後に二次的要因で死亡し、136 症例全体の生存率は 70.7% となる

以上のような神経芽腫の組織学的、生物学的、あるいは臨床的な特徴を踏まえて、今後、6ヵ月マスの休止により、乳児神経芽腫に加えて、進行神経芽腫に対する治療をどうするかが大きい課題として提示されることになる。乳児神経芽腫など、予後良好例に対しては過剰治療が減少し、あるいは化学療法、腫瘍切除にかかわる有害事象が減少することが予測される。それとともに、マスにより神経芽腫が切除された結果として、1.5歳以降、あるいは年長児になって発見される良性の神経節腫症例が減少したが⁶⁾、年長児で良性の神経節腫が発見される頻度が再度、増加する可能性は否定できず、今後、1.5歳以降に発見される神経芽腫例への対応が課題として残る。

病理組織学的な検討課題としては、1歳未満の乳児神経芽腫、および1歳以降の神経芽腫など、乳児から年長児神経芽腫まで広い範囲での腫瘍の病理組織学的特性をINPC国際

分類による組織形態から比較検討する必要がある。とくに、乳児神経芽腫の退縮、分化・成熟などの組織学的、生物学的特性をまとめ、1歳から2歳の神経芽腫、あるいは2歳以降の神経芽腫の特性と神経芽腫について今後、臨床的予後を含めて、比較検討する必要がある。その他、マス陰性例で、その後に発症した神経芽腫例の検討、組織学的に予後良好群であるが、臨床的には予後不良であった症例の調査も必要である。そして、今後の前向き研究の一環として、神経芽腫の生物学的形質の解明と連携して、データセンターなどの設置を含めて、中央病理診断システムの構築が必要となろう（図1）。

E. 結論

神経芽腫のもつ多様性は腫瘍本来の組織学のおよび生物学的特性に由来すると考えられ、また、神経芽腫の組織発

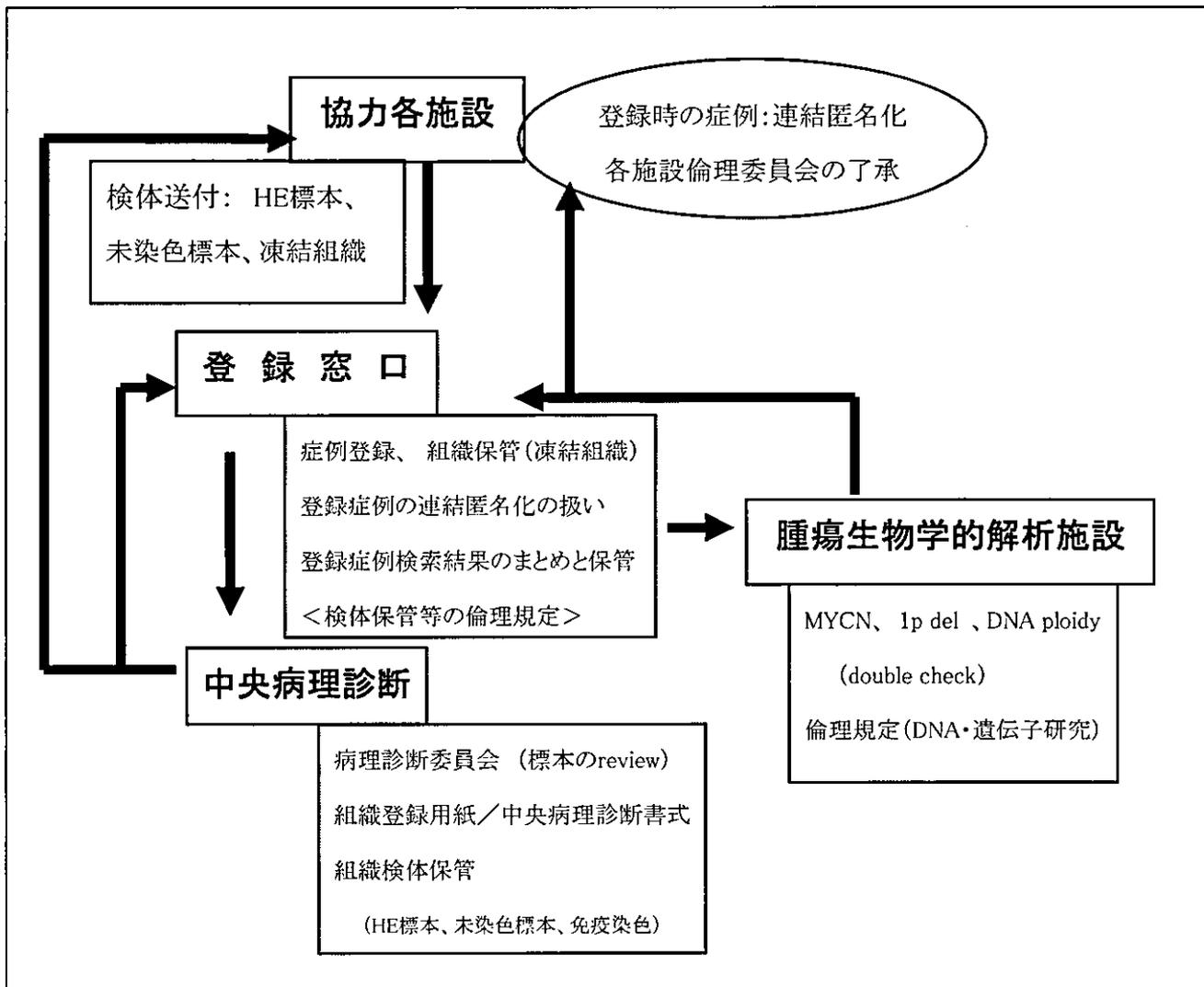


図1 神経芽腫症例登録から中央病理診断へのフローチャート（案）

生時期とも密接に関連している。病理組織学的な検索により、乳児から年長児神経芽腫まで広い範囲での腫瘍特性の基本的概念が解明され、そして、今後のマスの評価と方法の改善や神経芽腫の早期発見、早期治療の一助になることを期待している。

F. 参考文献

1. 浜崎 豊：乳児神経芽腫の特異性 —特にその組織学的な退縮傾向について—。病理と臨床, 17:429-434,1999.
2. Shimada H, et al: Terminology and morphologic criteria of neuroblastic tumors. Recommendations by the International Neuroblastoma Pathology Committee. Cancer, 86:349-363,1999.
3. Shimada H, et al: The International Neuroblastoma Pathology Classification (the Shimada system). Cancer, 86:364-372,1999.
4. 小児腫瘍組織分類委員会：神経芽腫群腫瘍—国際分類INPCによる— 小児腫瘍カラーアトラス 第2巻 第1版 金原出版 2004.
5. 水田祥代、他：マスキングで発見され無治療で経過観察された神経芽腫82例—日本小児がん学会平成10年—12年度神経芽腫委員会報告— 小児がん,39:131-136,2002.
6. 浜崎 豊、小林庸次、中山雅弘、田中祐吉：神経芽腫の減少について—マスキング発見神経芽腫摘出の影響か—。小児がん 40:182-185,2003.

G. 研究発表

1. 論文発表
 - 1) 小児腫瘍組織分類委員会：神経芽腫群腫瘍—国際分類INPCによる— 小児腫瘍カラーアトラス 第2巻 第1版 金原出版 2004.
 - 2) 浜崎 豊、小林庸次、中山雅弘、田中祐吉：神経芽腫の減少について—マスキング発見神経芽腫摘出の影響か—。小児がん 40:182-185,2003.
2. 学会発表
 - 1) 浜崎 豊、岸本宏志、田中祐吉、山本圭子：神経芽腫の予後、とくにDNA倍数体解析によるタイプ分類および組織型との関連性。第20回日本小児がん学会 平成16年11月、京都

H. 知的財産権の出願・登録状況

とくになし。

神経芽細胞腫の網羅的遺伝子解析

檜山英三^{1,2}、山岡裕明²、末田泰二郎²、C. Patrick Reynolds³、檜山桂子⁴

¹ 広島大学自然科学研究支援開発センター生命科学研究支援分野生命医科学研究開発部

² 広島大学病院小児外科

³ ロサンゼルス小児病院

⁴ 広島大学原爆放射線医科学研究所、遺伝子診断治療開発

研究要旨

神経芽細胞腫は、その予後が腫瘍特性に大きく依存し、神経芽細胞腫マススクリーニング（マス）の施行により、いくらかのサブグループに分かれることが明らかになってきた。腫瘍特性の解析として、従来さまざまな面から解析され、多くの予後関連因子が報告されてきた。そこで、マスによって多く発見された分化/退縮腫瘍と症状から発見され予後不良であった腫瘍を用いて、網羅的に遺伝子異常解析を行うことで、腫瘍特性の層別化を試みとともに、従来報告されてきた様々な予後関連因子を同一のプラットフォームで解析することで、重要な予後因子を選別することを目的とした。マス発見例 13 例を含む 25 例を対象とし、遺伝子変化は SNPs アレイ (Affymetrix 社製) を用いて検索し、一部は BAC を用いた CGH アレイ (アズワン社製) にて異常の再現性を検討した。遺伝子異常の中で 1p 欠失と *MYCN* のコピー数について検討したが、以前のデータとほぼ一致した。アレイ CGH の結果との比較では、データはほぼ一致したが、SNPs アレイはアレイ CGH では見出せなかった 1 MB 以下の遺伝子欠失あるいは増加を検出することが可能であった。遺伝子異常に起因した遺伝子発現変化の解析により、予後不良例の生物学的特性の鍵を握る遺伝子の解明が期待され、これらは、リスク分類のみならず、治療のターゲットとして有望と考えられた。

Summary

Biological heterogeneity of neuroblastoma results in favorable or unfavorable outcomes. Japanese mass-screening (MS) program revealed the several subgroups in neuroblastoma. Biological characteristics have been examined in the various fields and many factors have been reported as prognostic indicators. In this study, genomic alterations were examined in neuroblastoma tissues including regressing/ maturing tumors detected by MS and prognosis-poor tumors to classify the subgroups in neuroblastoma and to identify the essential factor to classify these subgroups. Genomic DNA extracted from 25 neuroblastomas including 13 MS-detecting tumors were analyzed by single-nucleotide polymorphic allele (SNPs) arrays (Affimetrix® GeneChip Human mapping Array) and some of them were also by array based CGH using BAC (bacterial artificial clone). In genomic alterations, SNPs array showed all chromosome 1p deletion and *MYCN* amplification as well as new alterations. The chromosomal aberrations by SNPs array were comparable with those by array based CGH but small deletions (< 1MB) were detectable only in SNPs array. Genomic SNPs arrays may help identify key genetic aberrations associated with aggressive or favorable biological behavior. These data point toward key genes that warrant further study as candidates for use in risk assessment and/or as therapeutic targets in neuroblastoma.

A. 研究目的

神経芽細胞腫の予後は、その細胞の腫瘍特性に大きく依存し、病期 IVS に代表されるように自然退縮する腫瘍がある一方、大量化学療法によっても腫瘍が増大し、予後が極めて不良な腫瘍まで存在する¹⁾。また、病理学的に未分化な細胞が大半を占めていた腫瘍も、患児の年齢が大きくなるにつれ、分化する腫瘍が存在することも知られた事実である。一方、1才を越える頃から悪性度が高く、転移或いは再発を繰り返す予後不良例も多くみられる。この違いは、腫瘍のゲノム異常に起因していることが推測され、最も有名なものは *MYCN* 遺伝子増幅である。特に、本邦では生後 6 ヶ月児の神経芽腫マスキリーニング事業によって、従来診断されず、分化退縮した腫瘍が数多く発見され、発症率が倍増した。さらに、その事実から、臨床診断がついても無治療で経過観察する試みが行われ、この経過で後に切除された腫瘍の多くが、分化傾向が観察されたこともそれを支持するエビデンスである。

こうした神経芽細胞腫の腫瘍特性に関しては、古くから多方面で検討され、1 番染色体単腕 (1p) 異常をはじめ、多くの異常が報告されてきた¹⁾。それぞれの異常について、予後に関連していることが示されてきているものも少なくないが、どの異常が最も予後に直結した異常であるかどうかの検討は十分なされていない。また、同一の遺伝子異常であってもその測定法の相違や、その判定基準が異なることから、それぞれを集計して比較検討することも容易ではない。例えば、*MYCN* 遺伝子増幅に関しては、従来サザンプロテイングによってそのシグナル強度から 10 倍以上を増幅とするとされていたが、最近では、定量 PCR 法による測定、さらに細胞個々のコピー数を算定する FISH (Fluorescence in situ hybridization) 法によって検討している施設も存在する。また、1p 異常も、染色体分析、RFLP (restriction fragment length polymorphisms)、microsatellite analysis、SNPs (single nucleotide polymorphisms) など様々な検討方法が存在する。これらの遺伝子異常は、個々に解析を行う代わりに、他の異常と共に同時に網羅的に検討し、遺伝子異常の頻度とその重み付けを行うべきである。その方法として開発されたのが CGH (comparative genomic hybridization) 法であるが、感度が悪い一方煩雑であった。近年のナノテクノロジーの進歩により、マイクロアレイの技術が進歩し、アレイ CGH、SNPs アレイが開発された。この方法を用いることで、神経芽細胞腫の遺伝子異常を網羅的に解析できると考えられ、今回検討した。

B. 研究方法

対象

1991 年以降、広島大学およびその関連施設で化学療法前に切除した神経芽細胞腫腫瘍 25 例を対象とした。INSS 病期分類（括弧内はマスキリーニング発見例）は INSS 分類で、1:6 例（5 例）、2A:2 例（1 例）、2B:3 例（2 例）、3:5 例（2 例）、4:6 例（1 例）、4S:3 例（2 例）、病理分類（嶋田分類）は favorable:15 例（12 例）、unfavorable:10 例（1 例）であった。切除腫瘍は、病理学的確認後、使用まで -80 度に冷凍保存した。また、治療前の末梢血を採取し、有核細胞を採取し、患児の体細胞として -80 度に冷凍保存した。

方法

切除腫瘍を粉碎後、末梢血細胞はそのペレットを Proteinase K 処理し、フェノール・クロロフォルム・イソアミルアルコールにて除蛋白し、DNA を抽出した。

遺伝子異常の検索（図 1）は、GeneChip® Human Mapping 100K Set (Affymetrix 社製) を用いて、ヒトゲノム上の約 10 万個の SNPs を検索した。DNA 250 ng を制限酵素 (*Xba*I または *Hind*III) で処理しアダプターをライゲーションしたのちにアダプターに相補的なプライマーを用いた PCR で増幅し、その後断片化して、エンドラベルして、SNPs Chip にハイブリダイズした。シグナルは専用のスキャナーで読みとり、体細胞の解析データと併せて、LOH 解析、核 SNPs のコピー数を算出した。

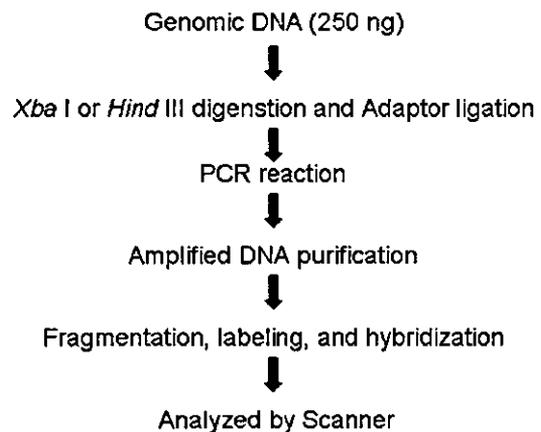


図 1: GeneChip® を用いた検索法

また、同様のサンプルを使用し、1440 の BAC クローンを搭載したアレイ CGH (アズワン社製) にて同様の検体を検討した。

(倫理面への配慮)

今回使用した検体は、全て、広島大学医学部倫理委員会

承認の「小児固形腫瘍の染色体および遺伝子解析」(承認番号医倫ヒ第 20 号) 研究に基づき、同意が得られているもののみを使用した。

C. 研究結果

対象とした 25 例について、その遺伝子異常の中で 1p 欠失と MYCN のコピー数について検討した。すると、1p 欠失は 25 例中 12 例に見いだされ、マイクロサテライトマーカーを使用した以前のデータとほぼ一致した³⁾が、その欠失部位はより明快であった。MYCN 遺伝子増幅は、その最も近傍にある SNP のシグナル強度を測定した (図 2)。3 倍以上の増幅例では、全てシグナルが増強し、その倍率もほぼ一致した結果であった。

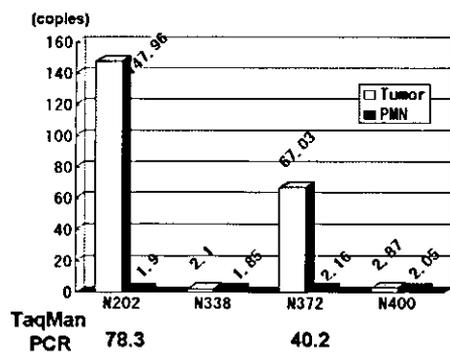


図 2 : MYCN 増幅 / SNP 1519534 の結果

6 例において、BAC を用いたアレイ CGH の結果と比較した。アレイ CGH でみられた各染色体異常は、SNPs アレイで全て検出された (図 3)。また、SNPs アレイにおいては、BAC アレイでは見出せなかった 1 MB 以下の遺伝子欠失あるいは増加を検出することが可能であった。核 DNA 量が 3 倍体、4 倍体の検体では、染色体全体での増減がみられた。

マス症例においても、高頻度に見出される遺伝子異常が存在した。

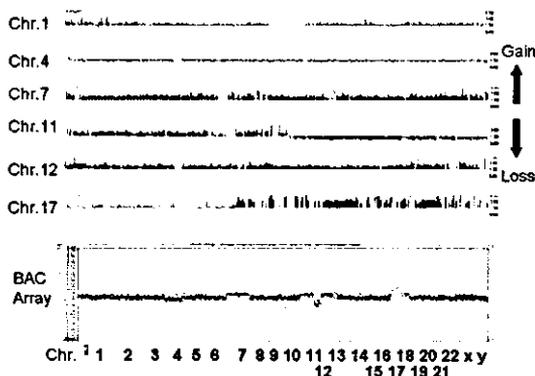


図 3 : SNPs アレイ (上) と BAC アレイ (下) の比較

D. 考察

今回の検討から、従来の遺伝子異常として報告されてきた増幅、増加、あるいは欠失は、SNPs アレイを用いることで検出可能であり、また、核型に異常を認める症例はそれぞれの染色体数の算出もほぼ可能であった。さらに、MYCN 領域の検索から、増幅倍数のみならず、アンプリオコンの領域も容易に測定可能で、17q の遺伝子増加も同様であった。遺伝子欠失についても、その欠失領域が容易に測定でき、これらの検討を重ねることで、共通増幅あるいは欠失領域の推定が極めて容易に行えるものと考えられた。また、従来我々が行ってきた遺伝子発現アレイを組み合わせる^{3,4)}ことで、これらの部位に存在する遺伝子が、遺伝子量の変化に伴って発現変動していることを確認する。さらにネットワーク解析することで本腫瘍の発生あるいは悪性度獲得に密接に関連した遺伝子を見出すことが可能となり、本腫瘍の診断、治療に貢献できると考えられた。とくに、マス症例の高頻度に認められる異常と臨床発見例にて見られる異常の比較、さらに悪性度の高い腫瘍で見出される異常の程度から、マスでの悪性度の高い腫瘍の早期発見例や過剰診断例の特性を検討し、マスの効果判定にも有効と考えられた。

また、この検討は、腫瘍 DNA 量が 250 ng と極めて少量で、検査結果が 2 日程度で得られることは、限られた臨床サンプルを使用しての実際の検討には、有用性が高いと考えられる。

さらに、遺伝子異常解析を網羅的に行うことで、今まで個別に検討されてきた異常がそれぞれの因果関係として検討され、遺伝子異常がどの時点で生じ、悪性度の獲得がどのように起きているかを見出すことも可能となる。これらに発現解析も導入し、遺伝子異常と遺伝子発現解析から、真に予後因子として重要なものを選別し、それらに重み付けを行ない、神経芽細胞腫のリスク分類のエビデンスとする予定である。

E. 結論

神経芽細胞腫検体の DNA を用いた SNPs 解析を行い、遺伝子異常の網羅的解析が可能であることが見出され、今後、本腫瘍の遺伝子異常解析に有用なツールであることが示された。

F. 参考文献

- 1) Brodeur, GB: Neuroblastoma: biological insights into a clinical enigma. Nature Rev. Cancer 3:203-206, 2003

- 2) Hiyama E, et al: Biological characteristics of neuroblastoma with partial deletion in the short arm of chromosome 1. *Med Pediatr Oncol*.36:67-74, 2001
- 3) Hiyama E, et al. Differential gene expression profiles between neuroblastomas with high telomerase activity and low telomerase activity. *J. Pediatr Surg Int*, 38: 1730-1734, 2003.
- 4) Hiyama E., et al. Expression profiling of favorable and unfavorable neuroblastomas. *Pediatr Surg Int*, 20: 33-38, 2004.

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Hiyama E., et al. Expression profiling of favorable and unfavorable neuroblastomas. *Pediatr Surg Int*, 20: 33-38, 2004.
- 2) 檜山英三、金子道夫、家原知子：抗がん剤使用ガイドライン：神経芽腫. *がん治療学会誌*, in press

2. 学会発表

- 1) Hiyama E, et al. Gene expression profiling of neuroblastoma cell lines treated identifies genes upregulated by retinoic acid that are overexpressed in favorable neuroblastoma primary tumors. *Advanced in Neuroblastoma 11th Conference*, June 16-19, 2004, Genova, Italy
- 2) 檜山英三, 他：マイクロアレイからみた神経芽細胞種の病態探索 第41回日本小児がん学会, 京都, 2004.11.21-22.

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案特許

なし

3. その他

なし