

価した論文は、全乳児が公費負担でマスを受診できる条件下での受診群と未受診群の比較であった。従って、セレクションバイアスの影響を除去できないままのエビデンスに終始していた。本研究では、マス実施地域とそれ以外の未実施地域を比較するので、マスの有効性を評価するための比較可能性が保証される。

- (3) NB 症例の治療プロトコルを全国で統一し、受診群と未受診群における治療の差異を最小限にとどめることができる。
- (4) 罹患例と死亡例を正確に捕捉するために、学会、行政の協力のもとで漏れのない登録システムを確立する。
- (5) VMA および HVA 検査の精度管理を充実させる。

2. 研究デザイン

前向き介入試験

マス実施群に対して、比較可能な未実施群を設定してフォローアップ調査する。

マス陽性例に対しては、適切なインフォームドコンセントで同意が得られれば全例治療介入とする。従って、無治療経過観察は行わない。

治療プロトコルはJNBSGプロトコルに従うものとする。

3. 対象

MS実施群：

京都府（京都市を除く）、大阪府（大阪市を除く）、札幌市

希望者のみ実施：

新潟県

検討中：

静岡県、川崎市（12ヶ月）、熊本、岡山、その他、実施可能な自治体にご参加いただく。

MS未実施群：

上述以外で本プロジェクトに協力できる自治体から、本研究班が選定する。

4. 症例数

MS実施群：3年間での約60万人

MS未実施群：60万人以上

上のサンプルサイズは以下の条件の下で算出した。

- (1) 5年間の累積死亡率がマス実施群、出生10万人

対2、非実施群、出生10万人対5とする。

- (2) カイ2乗検定による2群の比率の差を、有意水準5%、検出力80%の片側検定により検定するものとする。

5. 研究期間

症例集積期間：上述の症例数が集積されるまでの期間

フォローアップ期間：集積期間ならびに集積終了時から5年間

6. MSの実施時期

1歳6ヶ月とする。1歳児検診や郵送によってMSの時期を周知する。1歳6ヶ月を中心に前後1ヶ月間にMS検体を返送してもらうこととする。

7. MSの検査精度管理

1) HPLC（高速液体クロマトグラフィー：high performance liquid chromatography）によるスクリーニング

- (1) 本プロスペクティブ研究のMSで採用する検査方法は、HPLC法とする。
- (2) HPLC法を採用する場合、全国的に同一のカットオフ値で、同一の検査水準でスクリーニングを行うことが必要不可欠である。
- (3) 上述(2)の要件を満たすために、この研究班の検査部会でMSのための検査プロトコルを作成し、検査実施者はそれに従うこととする。
- (4) 同一のプロトコルでも、実際に、高い水準のスクリーニング検査が行われたことを示すために、この研究班での検査実施者は、特定の第三者による外部精度管理の評価を受けるものとする。

2) 外部精度管理

①検査水準の評価

②軽度異常でも正しく見出されているか否かの評価

上述2点の評価の結果、精度に問題のある検査施設に対しては、即座に、問題点の改良を要請する。これらを実施する方法として、1977年以来、日本の新生児スクリーニングで採用している方法が、国際的に見ても唯一のものとする。

3) 新たな精度管理の導入

VMA/HVAなどの基準物質を厳密に測定するために、最近、安定同位体標識のVMA,HVAを用いてタンデムマススペクトル(LC/MS)を利用して正確に測定す

る方法が報告されてきているので、以前の精度管理の方法に加え、このような正確な基準物質測定法を導入する。

7. NB 症例の臨床データならびに予後データ収集・統括するためのデータセンター

(1) データセンターの設置

- (1) 小児がん学会、小児外科学会の登録システムと連携し、整合性のある登録事業を展開する。全数登録から、マスクリーニング陽性例、陰性例、非受検例、対照地域での発症例を検討できるシステムとする。
- (2) JNBSGに以下の作業が可能なセンターを当研究班からプロポーザルとして提出し、早急にデータセンターの設置と稼働を要請する。

(2) 仕事内容

- ①小児神経芽細胞腫症例の登録
- ②検査事業主体のマス受検対象者リスト、受検者リストと登録症例との照合
- ③住民票照会での転居の確認
- ④人口動態統計（マス実施自治体とMS未実施自治体の新生児数）の収集ならびに死亡票の調査
- ⑤ステージ分類・組織学的診断結果のレビュー
- ⑥その他、データ収集、集計に関わる業務

- (3) マス受検対象者リスト、受検リストの電子媒体での収集
各実施地域あるいは検査センターで収集し、電子媒体として保存する。

- (4) 登録症例がマス受検対象者受検リストマス受検地域者かどうかの確認作業

- ①MS実施月齢前の発症の場合、その症例はマス受検なしである。
- ②MS実施月齢後の発症の場合、施行自治体の検査センターでのマス受検対象者リスト、受検者リストとマッチングを図る。キー項目は氏名、性別、1歳6ヶ月時の住所、生年月日である。
- ③②でのマッチング件数が0の場合、マス未受検者とする。
- ④②でのマッチング件数が2件以上ある場合、登録情報を精査の上、住所等でマス受検者であることを特定する。

- ⑤登録情報で「マス受検あり」のある場合には、その記載の信頼性を精査した上で採用する。

(5) 神経芽細胞腫の死亡の同定

- (1) 以下のセンター、学会、行政データに基づき、死亡例の把握を正確に行う。

NB登録センター

小児外科学会

小児がん学会

小児慢性特定疾患の追跡

死亡個票（利用許可申請中）

- (2) 平成17年度「小児慢性特定疾患治療研究事業の登録・管理・評価・情報提供に関する研究」研究班と「子どもの病気に関する包括的データベース（難治性疾患に関する疫学研究データベース等を含む）の構築とその利用に関する研究」研究班を総括する国立成育医療センター成育政策科学研究部の協力を得て、登録システムを構築する。

(6) 疫学検査の倫理指針、個人情報保護法への対応

- (1) 上述のデータは、原則として、登録時に代諾者のインフォームドコンセントを得て登録する。
- (2) 氏名、性別、生年月日等の個人情報に関しては、マス受診の有無を判定するために必要であることを、マス受診時に全例インフォームドコンセントを得ておく。その際、もし発見された際には、治療介入することの同意を得ることが望ましい。
- (3) インフォームドコンセントの実施方法は、個々の自治体で適切に行うこととする。

8. MS の検査実施方法

インフォームドコンセントで同意が得られた親から検体を提出してもらう。

9. MS 未実施群へのインフォームドコンセント

学会ホームページなどで小児神経芽細胞腫の説明ページを用意するなどして、マス実施群と同程度の知識を持ってもらうように配慮する。

10. 全国の病院での症例登録の義務化（全数登録システムの構築）

専門医制度とのリンク、小児慢性特定疾患データとの照合などにより、効率のよい全数登録システムをめざす。関連学会などを通して、小児慢性特定疾患治療研究事業

への申請を推奨する作業にて効率の良い登録システムを推進する。

11. 収集されるべきデータ項目

- ①月齢、性別、生年月日、現住所などの基本情報
- ②INSS基準でのステージ分類
- ③N-myc増幅、DNA ploidy、1pの欠失、カテコラミン代謝
- ④治療プロトコールに基づく生物学的データ

12. 統計学的な解析

- (1) 10万人対標準化死亡率比
- (2) 10万人対標準化罹患率比

II. 小児神経芽細胞腫マスキリーニングの費用対効果解析

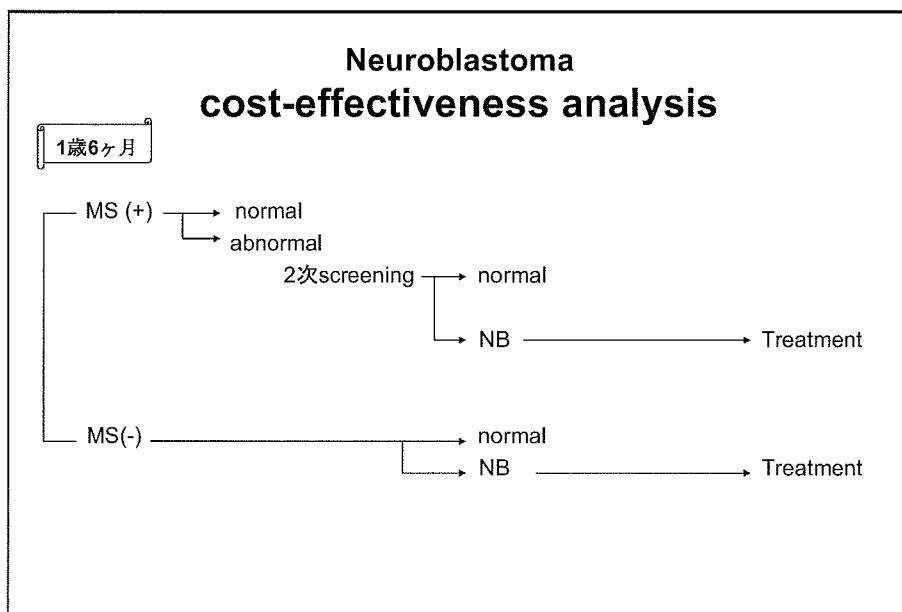
1. 研究の背景・目的

本邦における代表的なマスキリーニング検査としては新生児マスキリーニング検査があり、現在、先天性代謝疾患4疾患、内分泌疾患2疾患の合計6疾患が対象となっている。これら6疾患以外にも多数の先天性代謝疾患や内分泌疾患があり、それらの中にはマスキリーニング検査方法が確立しているものもある。しかしながら、マスキリーニングに費やすことができる資源は有限であり、検査方法が確立している先天性代謝疾患の全てをマスキリーニングに加えることは不可能である。したがって、マスキリーニングの導入に際しては、ある疾患にマスキリーニング

検査を導入した場合に費やされる資源と、導入によって得られる利益のバランスを考慮し、投入した費用に対する効果(効率)が大きな疾患を優先しなければならない。新生児マスキリーニングにおいてはすでにこのような医療経済的な効率の評価(費用対効果分析)が行われ、現行のマスキリーニング対象疾患の中では、先天性甲状腺機能低下症とフェニルケトン尿症の効率が良いことが明らかにされている(久繁ら、1994)。また今後、新たにある疾患にマスキリーニングを適用しようとする場合においても、費用-便益分析や費用-効用分析に基づいて導入を検討す

る試みが行われている(久繁ら、2000)。

1985年から全国規模で神経芽細胞腫マスキリーニングにおいても、このような費用-便益分析が行われた。当初は肯定的な結論が多く、Sawadaら(1984)も日本でのマスキリーニングが経済的に有用であると報告している。Scriberら(1987)はカナダでの導入により28万ドルの治療費削減が可能であるとし、Bertholdら(1991)はドイツにおいてマスキリーニング施行により年間180万ドルの治療費削減が可能であるとしている。その後は経済的効率に関する報告はほとんど行われていない。大植ら(1997)は、マスキリーニング発見例がすべて進行すると仮定して経済的意義を認めているが、その一方で、自然退縮例の存在を考慮すると意義が認められなくなる可能性があるとも述べている。その後、欧米そして日本での神経芽細胞腫マスキリーニングの中止により、欧米も含めて本疾患におけるマスキリーニングの費用対効果分析の報告はほとんどみられなくなった。



本研究では、MSの実施時期を1歳6か月にしたときの費用対効果分析の解析計画を立案したので以下で説明する。

2. NBのマスキリーニングから治療までのプロセスと費用の推定

- (1) マスキリーニングから治療までの診療プロセス
- (2) 費用の推定
 - ・MS検査1件当たりの費用：約800円
 - ・NB患者1人を発見するのに要する費用：約300万円
 - ・運用費用(MS検査試薬代、専任技師の person 費、事務経費など)：年間約4000万円

(3) 6か月MSにおけるNB症例重症度

1992～95年に大阪府立母子保健総合医療センターを受診したNB患者41人の内訳

{	MS (+) 35人	{	normal 5人
			abnormal 30人
	MS (-) 3人		

6ヶ月未満発症3人

これらの症例の病期は Stage I 9例、Stage II 12例、Stage III 8例、Stage IV A 7例、Stage IV B 4例、Stage IV S 1例で、Stage IIIの1/8例、Stage IV Aの6/7例、Stage IV B 4/4例と進行期のほとんどはMS (-) 例であった。

早期例に比して進行例の治療費が高額であること、MS (+) 症例に早期例が多いことから、これらの症例を放置すれば前例進行癌になると仮定すれば、MS は医療費の大幅な軽減につながる。

従って入院期間も長くなり医療費も高騰する。

そこで、MS 発見例の治療費を 300 万円、その症例が放置されて後に進行癌になった時の治療費を 1000 万円と仮定すると、症例 1 例にかかる経費の期待値は計 600 万円 (=NB1 名を発見するのに要するコスト 300 万円 + その治療費 300 万円) になる。

しかし自然退縮を考慮するとその割合が 40% のときに経費の期待値が 600 万円と同じになり、それ以上だと MS を施行する方がむしろ経費がかかることになる (大阪府立母子保健総合医療センター小児外科 大植ら)。

MSの時期を6ヶ月から1歳6ヶ月に変更することにより、自然退縮する Stage IV S 症例を考慮することなく、全症例を適切な治療の対象とすることが可能となるが、その1年間の差の間に発症例の拾い落としがないように留意しなければならない。

3. NB 症例の治療費に関する推定

**Neuroblastoma
cost-effectiveness analysis**

治療法の検討

- MS (+), (-) の2群に分けて治療内容を比較する。
- MS (+) 群はop. 単独やop. +Chemotherapy (CTx.) の割合が多く、MS (-) 群は移植を併用した治療の割合が多くなると予測される。

Tx. —

- op.
- op.+ CTx.
- op.+ CTx.+ autoPBSCT/alloPBSCT/related BMT/unrelated BMT
- others

平均治療費と平均入院期間

{	手術のみ	: 約130万円、約1か月
	A1などの化学療法	: 約520万円、約5か月
	A1などの化学療法+autoBMT	: 約2000万円、約9か月
	無治療経過観察	: 年間約50万円

MS 発見例の治療費の平均は約 300 万円、進行例の治療費の平均は約 1000 万円となり、より高度な治療をするに

4. 小児神経芽細胞腫 worksheet 記入項目 (案)

- ・患者 ID
- ・性別
- ・生年月日
- ・診断時住所
- ・診断時月齢
- ・マスキリーニング (あり、なし)
- ・2次マスキリーニング (あり、なし)
- ・画像検査 (CT、MR、RI、X-p、US)
- ・骨髄穿刺 / 生検 (あり、なし)
- ・INSS 分類 (stage1、2A、2B、3、4)
- ・組織分類 {
 - 神経芽腫 (花冠細線維型、円形細胞型)
 - 神経節腫 (高分化型、混合型、低分化型)
 - 神経節芽腫
 - 不明
- ・INPC 所見 {
 - Favorable Histology
 - Unfavorable Histology
 - 不明
- ・Ha-ras 発現 (低い、高い、不明)
- ・trk A 発現 (低い、高い、不明)
- ・N-myc 増幅 {
 - なし
 - あり (FISH 法か PCR 定量法 のコピー数)
 - 不明
- ・カテコラミン代謝 {
 - スクリーニング時 (尿中 VMA/Cr、尿中 HVA/Cr、尿中 VMA/HVA 定量)
 - 経時的受診時 (尿中 VMA/Cr、尿中 HVA/Cr、尿中 VMA/HVA 定量)
- ・フェリチン値
- ・NSE 値
- ・原発巣 (臓器名、不明)
- ・治療 (あり、なし)
- ・治療開始年月日
- ・術前化学療法 {
 - なし
 - あり (レジメン、施行コース数)
- ・手術 {
 - なし
 - 生検のみ
 - 原発腫瘍亜全摘術
 - 原発腫瘍全摘術
 - 全摘 + センチネルリンパ節生検
 - 全摘 + 系統的リンパ節生検、その他
- ・2回以上の手術 {あり (術式)、なし}
- ・手術後再発 {あり (年齢)、なし}
- ・化学療法 {
 - あり (レジメン、施行コース数)
 - なし
- ・放射線照射療法 {
 - なし
 - あり (照射部位、合計照射量)
- ・移植 {
 - なし
 - auto-PBSCT (施行回数)
 - allo-PBSCT (施行回数)
 - Related BMT (施行回数)
 - Unrelated BMT (施行回数)
 - その他 (名称、施行回数)
- ・予後 {
 - 生存
 - 死亡 (死因、死亡年月日)

A. 参考文献

- 1) Schilling FH, Spix C, Berthold F et al. Children may not benefit from neuroblastoma screening at 1 year of age. Updated results of the population based controlled trial in Germany. *Cancer Lett* 197 : 19-28,2003.
- 2) Schilling FH, Spix C, Berthold F et al. Neuroblastoma screening at one year of age. *N Engl J Med* 346 : 1047-53,2002.
- 3) Woods WG, Gao RN, Shuster JJ, et al. Screening of infants and mortality due to neuroblastoma. *N Engl J Med* 346 : 1041-6,2002.
- 4) Woods WG, Tuchman M, Robison LL et al. Screening for neuroblastoma is ineffective in reducing the incidence of unfavourable advanced stage disease in older children. *Eur J Cancer* 33 : 2106-12,1997.
- 5) Woods WG, Tuchman M, Robison LL et al. A population-based study of the usefulness of screening for neuroblastoma. *Lancet* 348 : 1682-7,1996.
- 6) 久繁哲徳. マス・スクリーニングシステムのテクノロジー・アセスメントに関する研究. 厚生省心身障害研究: マス・スクリーニングシステムの評価方法に関する研究, 平成5年度研究報告, pp63-67,1994.
- 7) 久繁哲徳. 【マス・スクリーニング】新生児スクリーニングの利益と危険, 費用判断の分かち合い (解説/特集). *小児科診療* 63 (9) : 1377-1382,2000.
- 8) Sawada T, Todo S, Fujita K, Iino S, Imashuku S, Kusunoki T. Mass screening of neuroblastoma in infancy. *Am J Dis Child* 136 (8) : 710-712,1982.
- 9) Scriver CR, Gregory D, Bernstein M, Clow CL, Weisdorf T, Dougherty GE, Auray-Blais C, Giguere R, Lemieux B, Laberge C. Feasibility of chemical screening of urine for neuroblastoma case finding in infancy in Quebec. *CMAJ* 136 (9) : 952-956,1987.
- 10) Berthold F, Hunneman DH, Kaser H, Harms D, Bertram U, Erttmann R, Schilling FH, Treuner J, Zieschang J. Neuroblastoma screening : arguments from retrospective analysis of three German neuroblastoma trials. *Am J Pediatr Hematol Oncol* 13 (1) : 8-13,1991.
- 11) 大植孝治, 井村賢治, 八木誠, 米田光宏, 井上雅美, 八木啓子, 河敬世, 入江明美, 竹島清美, 中山雅弘. Cost benefit からみた神経芽腫マスキリーニングの意義. *小児がん* 34 (2) : 180-184,1997.

B. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Toyabe S., Nakamizo M., Uchiyama M., Akazawa K. Circannual variation in the onset and relapse of steroid-sensitive nephritic syndrome. *Pediatric Nephrology* 20 : 470-473, 2005.
- 2) Toyabe S, Akazawa K. Fukushi D, Fukui K, Ushiki T. CHRONIS : an animal chromosome image database. *Chromosome Res*, 13 : 593-600, 2005.
- 3) Toyabe SI, Cao P, Abe T, Uchiyama M, Akazawa K. Impact of sociocultural factors on hospital length of stay in children with nephrotic syndrome in Japan. *Health Policy*, in press.
- 4) Nakamizo M, Toyabe S, Asami T, Akazawa K. Seasonality in the incidence of congenital hypothyroidism in Japan. *J Paediatr Child Health.* ; 41 : 390-1, 2005.

C. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

- 1) 赤澤宏平、鳥谷部真一、八代 貴史. 間接費按分プログラム (特許 2005-150008, 出願中)

神経芽腫マススクリーニング発見症例の生物学的特性と 予後に関する研究

分担研究者 中川原 章 千葉県がんセンター研究局

研究要旨

神経芽腫マススクリーニング (MS) により発見された症例の分子生物学的性状を明確にし、自然退縮する腫瘍と再発する腫瘍の違いを明らかにすることを目的とし、今回は、TrkA 遺伝子発現および我々が開発した神経芽腫に特化した実用化 DNA ミニチップによる解析を行った。その結果、TrkA mRNA レベルを測定した散発性神経芽腫 279 例では、TrkA 発現が予後と極めて有意に関連していたものの、MS 発見神経芽腫 520 例では死亡例が 3 例のみで、TrkA が高発現した 327 例では全例が生存しており、TrkA 発現の低い症例の中に再発、死亡例が存在する (1.5%) ことが明らかになった。また、実用化 DNA ミニチップによる解析により、MS 再発例の中に posterior 値が 0.5 以下のものが見られた。しかしながら、TrkA 発現レベルは MS 発見神経芽腫の予後と多少関連していたものの、その発現レベルが低くても 98% の累積 8 年生存率を示し、TrkA 発現レベルから見ても現時点において MS の有意な有効性は示されなかった。

A. 研究目的

乳児の尿中カテコラミン代謝産物の検査 (マススクリーニング) による神経芽細胞腫の早期発見システムの効果判定は、今後の難治性神経芽細胞腫の治療戦略決定に重要である。そこで本分担研究では、これまでに当研究施設に集積されたマススクリーニング発見症例について、TrkA 発現と予後との関係、および最近我々が開発した神経芽腫予後予測用実用化 DNA ミニチップによる解析を行った。

B. 研究方法

1) 解析の対象とした神経芽腫症例の内訳

平成 7 年から平成 13 年までに千葉県がんセンター研究所へ登録され、MYCN コピー数、DNA ploidy、TrkA 発現の検査を受けた神経芽腫 979 例の中から、TrkA 発現解析結果を有する 893 例を対象とした。このうち、MS 発見神経芽腫症例は 520 例、散発性神経芽腫症例は 373 例であった。

2) 予後マーカーの検査

神経芽腫を対象とした予後マーカーは、MYCN 遺伝子のゲノムにおけるコピー数、TrkA 遺伝子発現、DNA プロイディなどである。まず、インフォームドコンセントが得られ、凍結および冷蔵にて送付された神経芽腫の生検あるいは外科的切除された組織について、凍結組織から RNA と DNA を調製し、サザン解析およびノザン解析を施行した。冷蔵組織からは腫瘍細胞を LymphoPrep を用いて分離し、フローサイトメーターを用いて DNA プロイディ解析を行った。

3) 神経芽腫予後予測用実用化 DNA ミニチップ検査

当研究室で開発した神経芽腫予後予測用実用化 DNA ミニチップ (Ohira et al., Cancer Cell, 2005) を SRL 医療検査会社に技術移管し、そのチップを用いて、各腫瘍の posterior 値を出した。

倫理面の配慮としては、本研究に用いるサンプルは、全て組織供与施設において文書によるインフォームドコンセントを得、匿名化された後に当研究室に供与されたものを用いた。本研究は「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」に則って行い、研究実施内容について千葉県がんセンター倫理審査委員会に諮り、すでに承認を得ている。

C. 研究結果

1) MS 発見神経芽腫における TrkA 遺伝子発現の意義

MS 発見神経芽腫における TrkA 遺伝子発現レベルの内訳は、高発現 327 例 (63%)、中等度発現 136 例 (26%)、低発現 57 例 (11%) であった。腫瘍に基づく死亡例は 3 例のみ (0.6%) で、中等度発現群に 2 例、低発現群に 1 例であった。Kaplan-Meier 法による累積 8 年生存率は、高発現群 100%、中等度発現群 97.8%、低発現群 98.2% であった。死亡した 3 例の内訳をみると、中等度発現群の 2 例はいずれも MYCN single copy で副腎原発、うち測定できた 1 例の DNA ploidy は Diploidy/Tetraploidy であった。また、低発現群で死亡した 1 例では、MYCN 増幅があり、副腎原発で、DNA ploidy は Diploidy/Tetraploidy であった。

2) 散発性神経芽腫における TrkA 遺伝子発現の意義

一方、散発性神経芽腫における TrkA 遺伝子発現レベルの内訳は、高発現 74 例、中等度発現 56 例、低発現 149 例であった。Kaplan-Meier 法による累積 8 年生存率は、高発現群 74%、中等度発現群 44%、低発現群 35% であった。1 歳未満の乳児例では、TrkA 発現のレベルにより明らかな予後の差が見られ、高発現例は有意に高い生存率を示した ($p=0.002$)。一方、1 歳以上症例においては、TrkA 発現は 8 年累積生存率に有意な差を示さなかったが、生存期間の約 2 倍の延長が見られた。また、MYCN 増幅症例で TrkA が高発現した 6 例のうち 3 例が 4 年以上生存し、うち 1 例は非坦がん生存中である。

3) 神経芽腫予後予測用実用化 DNA ミニチップ検査の結果

これまでに MS 発見神経芽腫 60 症例を対象に、我々が開発した cDNA マイクロアレイ (神経芽腫 cDNA libraries から抽出した 5340 cDNAs を搭載) を用いて予後予測値である posterior 値 (1.0: 現治療法で極めて良い予後が期待される; 0: 予後は全く期待できない) を出したところ、前例が 0.5 以上の値であった。しかしながら、MS で発見され、経過観察されていた腫瘍が 1 年後に増大してきたため、手術摘出された腫瘍の実用化 DNA ミニチップ検査を行ったところ、その posterior 値は 0.341 であった。したがって、この腫瘍の生物学的性状は、少なくとも遺伝子発現プロファイルから見ると必ずしも良性ではない可能性が示唆された。

D. 考察

今回の解析結果から、MS 発見神経芽腫の TrkA 遺伝子発現レベルは、約 3 分の 2 症例において高発現であったが、残り約 3 分の 1 症例においては必ずしも高くなかった。死亡した 3 症例は MYCN が増幅した 1 例と MYCN single copy で TrkA 中等度発現の 2 例であったが、全死亡率が 1% 以下であったため、少なくとも MS 発見神経芽腫における TrkA 遺伝子発現レベルは予後決定には有意な影響を及ぼさないことが示唆された。しかしながら、今回の DNA チップ検査を受けた 1 例のように、腫瘍増大あるいは再発する例の中に生物学的特性が悪性に近い腫瘍も稀に存在している可能性があり、過去において MS により発見された神経芽腫生存症例の長期フォローアップが重要と思われた。

E. 結論

神経芽腫の生物学的特性 (とくに自然退縮) を決める重要な遺伝子の一つである TrkA の発現レベルは、MS 発見神経芽腫の生物学的特性を知る上で極めて重要であった。今後は一部の予後不良な症例の臨床経過と、再発時の腫瘍を含めた腫瘍組織の網羅的遺伝子発現解析等から、それらの分子背景

の解明を行っていきたい。さらに腫瘍組織のゲノム異常解析については、網羅的な解析方法であるアレイ CGH 法を導入し、遺伝子発現とゲノム異常の両方の観点から詳細な分類を行う予定である。

F. 参考文献

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) [Nakagawara A.](#) Chapter 5. Molecular and developmental biology of neuroblastoma. In Neuroblastoma, Eds. N-K. Cheung & S. Cohn, Springer-Verlag, Heidelberg, pp41-53, 2005.
- 2) Kramer S, Ozaki T, Miyazaki K, Kato C, Hanamoto T, [Nakagawara A.](#) Protein stability and function of p73 are modulated by a physical interaction with RanBPM in mammalian cultured cells. *Oncogene* 24:938-944, 2005.
- 3) Abe M, Ohira M, Kaneda A, Yagi Y, Yamamoto S, Kitano Y, Takato T, [Nakagawara A.](#), Ushijima T. CpG island methylator phenotype is a strong determinant of poor prognosis in neuroblastomas. *Cancer Res.* 65:828-834, 2005.
- 4) Ohira M, Oba S, Nakamura Y, Hirata T, Ishii S, [Nakagawara A.](#) A review of DNA microarray analysis of human neuroblastomas. *Cancer Lett.* 228:5-11, 2005.
- 5) Lin L, Ozaki T, Takada Y, Kageyama H, Nakamura Y, Hata A, Zhang J-H, Simonds W, [Nakagawara A.](#), Koseki H. Topors, a p53 and topoisomerase I-binding RING finger protein, is a co-activator of p53 in growth suppression induced by DNA damage. *Oncogene* 24:3385-3396, 2005.
- 6) Ozaki T, Hosoda M, Miyazaki K, Hayashi S, Watanabe K, Nakagawa T, [Nakagawara A.](#) Functional implication of p73 protein stability in neuronal cell survival and death. *Cancer Lett.* 228:29-35, 2005.
- 7) Ohira M, Oba S, Nakamura Y, Isogai E, Kaneko S, Nakagawa A, Hirata T, Kubo H, Goto T, Yamada S, Yoshida Y, Fuchioka M, Ishii S, [Nakagawara A.](#) Expression profiling using a tumor-specific cDNA microarray predicts the prognosis of intermediate-risk neuroblastomas. *Cancer Cell* 7:337-350, 2005.
- 8) Hanamoto T, Ozaki T, Furuya K, Hosoda M, Hayashi

- S, Nakanishi M, Yamamoto H, Kikuchi H, Todo S, Nakagawara A. Identification of protein kinase A catalytic subunit beta as a novel binding partner of p73 and regulation of p73 function. *J. Biol. Chem.* 280:16665-16675, 2005.
- 9) Gotoh T, Hosoi H, Iehara T, Kuwahara Y, Osone S, Tsuchiya K, Kuroda H, Ohira M, Nakagawara A, Sugimoto T. Prediction of *MYCN* amplification in neuroblastoma using serum DNA and real-time quantitative PCR. *J. Clin. Oncol.* 23: 5205-5210, 2005.
- 10) Osajima-Hakomori Y, Miyake I, Ohira M, Nakagawara A, Nakagawa A, Sakai R. Biological role of anaplastic lymphoma kinase in neuroblastoma. *Am J Pathol.* 167:213-222, 2005.
- 11) Aoyama M, Ozaki T, Inuzuka H, Tomotsune D, Hirato J, Okamoto Y, Tokita H, Ohira M, Nakagawara A. LMO3 interacts with neuronal transcription factor, HEN2, and acts as an oncogene in neuroblastoma. *Cancer Res.* 65:4587-4597, 2005.
- 12) Chen H, Suzuki M, Nakamura Y, Ohira M, Ando S, Iida T, Nakajima T, Nakagawara A, Kimura H. Aberrant methylation of FBN2 correlates with progression of human non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 50:43-49, 2005.
- 13) Okabe-Kado J, Kasukabe T, Honma Y, Hanada R, Nakagawara A, Kaneko Y. Clinical significance of serum NM23-H1 protein in neuroblastoma. *Cancer Sci.* 96:653-660, 2005.
- 14) Ozaki T, Nakagawara A. p73, a sophisticated p53 family member in the cancer world. *Cancer Sci.* 96:729-737, 2005.
- 15) Koshikawa N, Maejima C, Miyazaki K, Nakagawara A, Takenaga K. Hypoxia selects for high-metastatic Lewis lung carcinoma cells overexpressing Mcl-1 and exhibiting reduced apoptotic potential in solid tumors. *Oncogene*, in press.
- 16) Hosoda M, Ozaki T, Miyazaki K, Hayashi S, Furuya K, Watanabe K, Nakagawa T, Hanamoto T, Todo S, Nakagawara A. UFD2a mediates the proteasomal turnover of p73 without promoting p73 ubiquitination. *Oncogene*, in press.
- 17) Kaneko Y, Kobayashi H, Watanabe N, Tomioka N, Nakagawara A. Biology of neuroblastomas that were found by mass screening at 6 months of age in Japan. *Pediatr. Blood Cancer*, in press.
- 18) Machida T, Fujita T, Ooo M L, Ohira M, Isogai E, Mihara M, Hirato J, Tomotsune D, Hirata T, Fujimori M, Adachi W, Nakagawara A. Decreased expression of pro-apoptotic *BMCC1*, a novel gene with the *BNIP2* and *Cdc42GAP* homology (BCH) domain, is associated with poor prognosis in human neuroblastomas. *Oncogene*, in press.
- 19) Chen H, Suzuki M, Nakamura Y, Ohira M, Ando S, Iida T., Nakajima T, Nakagawara A, Kimura H. Aberrant methylation of RASGRF2 and RASSF1A in human non-small cell lung cancer. *Oncol. Rep.* in press.
- 20) Inamori K, Gu J, Ohira M, Kawasaki A, Nakamura Y, Nakagawa T, Kondo A, Miyoshi E, Nakagawara A, Taniguchi N. High expression of N-acetylglucosaminyltransferase V in favorable neuroblastomas: Involvement of its effect on apoptosis. *FEBS Lett.* in press.

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

神経芽腫における血清NM23H1蛋白質の臨床的意義

分担研究者 金子 安比古 埼玉県立がんセンター臨床腫瘍研究所

研究要旨

血清 NM23H1 蛋白質は悪性リンパ腫や白血病では予後予測因子として確立している。血清 NM23H1 蛋白質を測定することにより、神経芽腫の予後が予測可能かどうか検討した。対象は 217 例の神経芽腫患者で、マスキング発見例が 131 例、臨床的に発見された例が 86 例である。ELISA 法で血清 NM23H1 蛋白質を測定し、予後因子や転帰との関係を解析した。血清 NM23H1 蛋白質濃度は対象小児と比較して神経芽腫患者で高かった ($P < 0.0001$)。MYCN 増幅患者の血清 NM23H1 蛋白質濃度は MYCN シングルコピー患者と比較して高かった ($P = 0.0006$)。臨床的に発見された 86 例を対象にして予後を分析したところ、血清 NM23H1 蛋白質濃度が高い患者の生存期間は低い患者と比較して短かった ($P = 0.034$)。同様の関係は MYCN シングルコピー患者 ($P = 0.04$)、1 歳未満の患者 ($P = 0.03$)、第 3 病期の患者 ($P < 0.0001$) に限定しても確認された。血清 NM23H1 蛋白質濃度の測定は容易に実施でき、神経芽腫患者の予後予測に役立つので、臨床応用が期待される。

Summary

Prognostic factors in neuroblastoma have been thoroughly investigated and include *MYCN* copy number, *TRKA* expression level, chromosomal ploidy, 1p loss, and 17q gain in the tumor cells. Laborious and time-consuming work is required to examine these biological factors. We have reported that *NM23* genes were overexpressed in various hematological malignancies and that serum NM23-H1 protein levels were useful to predict a patient's outcome. In this study we assessed the clinical implications of serum NM23 protein on neuroblastoma. We examined serum NM23-H1 protein levels in 217 patients with neuroblastoma including 131 found by mass-screening and 86 found clinically by an enzyme-linked immunosorbent assay, and determined the association between this protein level and known prognostic factors or the clinical outcome. The serum NM23-H1 protein level was higher in neuroblastoma patients than in control children ($P < 0.0001$). Patients with *MYCN* amplification had the higher serum NM23-H1 level than those with a single copy of *MYCN*. Overall survival was assessed in the 86 patients, and worse in patients with the higher serum NM23-H1 level (≥ 250 ng/mL) than in those with the lower level (< 250 ng/mL) ($P = 0.034$). The higher level of NM23-H1 was correlated with a worse outcome in patients with a single *MYCN* copy, or in those with less than 12 months of age, but not in patients with *MYCN* amplification, or in those older than 12 months. Serum NM23-H1 protein levels that are easily measurable predict the clinical outcome of patients with neuroblastoma.

A. 研究目的

神経芽腫はもっとも頻度の高い小児固形腫瘍である。乳児期に発見される神経芽腫の予後は良好であるが、年長児になって発見される進行期腫瘍の治癒は困難である。神経芽腫の予後因子として、腫瘍細胞の *MYCN* 増幅、1p 欠失、11q 欠失、17q 増加、染色体 ploidy などが知られているが、これらの診断には生検や手術により検体を侵襲的に採取する必要がある。血清中の蛋白質を調べることにより神経芽腫患者の予後が予測できれば、採取や測定が容易なので、臨床的に極めて有用である。*NM23H1* 高発現は神経芽腫、急性骨髄性白血病、悪性リンパ腫の予後不良因子である。また、血清 NM23H1 蛋白質高濃度を示す急性骨髄性白血病

および悪性リンパ腫患者の予後は不良であると報告されている。そこで、神経芽腫患者の予後が血清 NM23H1 蛋白質濃度の測定により、予測可能かどうか検討した。

B. 研究方法

対象は 217 例の神経芽腫で、2000 年から 2002 年に手術または生検を受けた乳児（12 ヶ月未満）または年長児（12 ヶ月以上）である。217 例を患者を発見方法により、MS 発見腫瘍 131 例、臨床的発見腫瘍 86 例に分類した。86 例中 1 歳未満の乳児は 29 例であった。第 1、2 病期の乳児、年長児と第 3 病期の乳児は手術のみか、vincristine と cyclophosphamide による化学療法により、第 3、4 病期

の年長児と第4病期の乳児は日本神経芽腫研究グループのプロトコールにより治療を受けた。

血清 NM23H1 蛋白質を ELISA 法により、*MYCN* コピー数をサザン法により、*TRKA* 発現をノーザン法により、ploidy をフローサイトメトリーにより、それぞれ分析した。既知の予後因子や血清 NM23H1 蛋白質濃度で分類した患者の生存曲線を Kaplan-Meier 法で求め、各群の生存率を Log-rank 法で比較した。

(倫理面への配慮)

検体を研究に用いることについて家族よりインフォームドコンセントを取得した。また、研究内容について、埼玉県立がんセンター倫理審査委員会に提出し、承認を得た。患者のプライバシーを厳守して研究を実施した。

C. 研究結果

血清 NM23H1 蛋白質の測定を、神経芽腫患者 217 例と対象小児 23 例について行った。神経芽腫患者の濃度は 176 ± 280 ng/mL であり、対象小児の濃度 27 ± 41 ng/mL に比べて有意に高かった ($P < 0.0001$)。臨床的所見との関係について分析すると、臨床的に発見された患者の血清 NM23H1 蛋白質濃度はマスキリーニングで発見された患者に比べて高い傾向を示した ($P = 0.0595$)。*MYCN* 増幅患者の血清 NM23H1 蛋白質濃度は *MYCN* シングルコピー患者に比べて高かった ($P = 0.0006$)。血清 NM23H1 蛋白質濃度は年齢、病期、*TRKA* 発現、ploidy とは関係していなかった。

マスキリーニング発見例は全例、生存していたので、予後解析を行わなかった。臨床的に発見された 86 例を対象にして予後を分析したところ、血清 NM23H1 蛋白質濃度が高い患者の生存期間は低い患者に比べて短かった ($P = 0.034$)。さらに、1 歳未満の患者 ($P = 0.03$) や、第 3 病期の患者 ($P < 0.001$) や、*MYCN* シングルコピー患者 ($P = 0.04$) に限定しても、血清 NM23H1 蛋白質濃度が高い患者の生存期間は低い患者に比べて短かった。年齢が 12 カ月以上の患者は 12 カ月未満の患者に比べて、第 3、4 病期の患者は第 1、2、4S 期の患者に比べて、また、*MYCN* 増幅患者は非増幅患者に比べて、それぞれ不良な予後を示した。これらの結果は血清 NM23H1 蛋白質濃度が既知の予後因子と同様に神経芽腫患者の予後予測に有用であることを示している。86 例を対象に血清 NM23H1 蛋白質濃度、患者年齢、病期、*MYCN* 増幅の 4 因子を用いて多変量解析を実施したところ、4 因子とも独立した予後因子ではなかった。マスキリーニング発見例を加えた 217 例を対象にした多変量解析では、病期、年齢、*MYCN* 増幅の相対危険度が 7.3 ($P = 0.006$)、3.9 ($P = 0.01$)、2.3 ($P = 0.04$) であり、独

立した予後因子であったが、血清 NM23H1 蛋白質濃度の相対危険度は 1.7 ($P = 0.16$) であり、予後に対する影響は小さかった。

D. 考察

神経芽腫患者 217 例を対象にして ELISA 法で血清 NM23H1 蛋白質を測定したところ、血清 NM23H1 蛋白質濃度は対象小児と比較して神経芽腫患者で高かった。*MYCN* 増幅患者の血清 NM23H1 蛋白質濃度は *MYCN* シングルコピー患者に比べて高かった。臨床的に発見された 86 例を対象にして予後を分析したところ、血清 NM23H1 蛋白質濃度が高い患者の生存期間は低い患者に比べて短かった。さらに、1 歳未満の患者や、第 3 病期の患者や、*MYCN* シングルコピー患者に限定しても、血清 NM23H1 蛋白質濃度が高い患者の生存期間は低い患者に比べて短かった。反対に、1 歳以上の患者や、第 4 病期の患者や、*MYCN* 増幅患者においては、血清 NM23H1 蛋白質濃度は予後因子ではなかった。これらの所見は、血清 NM23H1 蛋白質濃度測定による予後診断は、神経芽腫の低リスク群、および中リスク群に適応できることを示している。

多変量解析では血清 NM23H1 蛋白質濃度は有意な予後因子には成らなかったが、その理由として、観察期間が短いこと、*MYCN* 増幅例と血清 NM23H1 蛋白質濃度高値例が重なっているためと考えられた。NM23H1 は *MYCN* シグナル伝達系の下流に位置することが知られている。*MYCN* 非増幅例で血清 NM23H1 蛋白質高値例では、*NM23H1* の変異か増幅が生じている可能性がある。

組織と異なり、血液は容易に患者から採取できる。血清 NM23H1 蛋白質濃度は神経芽腫の予後因子であると証明されたので、その測定による予後予測は、臨床的に用いられるものと期待される。

E. 結論

血清 NM23H1 蛋白質濃度は神経芽腫の予後因子である。血液は腫瘍に比べて容易に得られるので、血清 NM23H1 蛋白質濃度測定による予後予測は臨床的に有用な診断法になると期待される。

F. 参考文献

1. Okabe-Kado J, Kasukabe T, Honma Y, Hanada R, Nakagawara A, Kaneko Y. Clinical significance of serum NM23H1 protein in neuroblastoma. *Cancer Sci* 96: 653-660, 2005.

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Okabe-Kado J, Kasukabe T, Honma Y, Hanada R, Nakagawara A, Kaneko Y. Clinical significance of serum NM23H1 protein in neuroblastoma. Cancer Sci 96: 653-660, 2005.
- 2) Kaneko Y, Kobayashi H, Watanabe N, Tomioka N, Nakagawara A. Biology of neuroblastomas that were found by mass screening at 6 months of age in Japan. Pediatr Blood Cancer 46: 285-291, 2006.

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

予後不良神経芽腫の特異的腫瘍マーカーの検索 —プロテオーム解析から

長谷川 朝美¹

分担研究者 升島 努¹ 檜山 英三²

¹ 広島大学大学院 医歯薬学総合研究科

² 広島大学 自然科学研究支援開発センター

研究要旨

我々は現在休止中である神経芽細胞腫診断のための新しい精度の高い検査法の確立を目指し、尿・血清を用いたカテコールアミンの一斉分析系の確立を進めてきた。前年度までに LC/MS によるカテコールアミン類及び代表的な代謝物一斉分析のための条件決定及び、尿・血清における前処理法を確立した。今回、その前処理法及び分析法の改良を進め、これらの手法を用いた新規マーカー検索法の確立を終え、いよいよ疾患試料測定への準備が整った。

Summary

The establishment of the analytical method of total metabolic substances of catecholamine in urine and serum for diagnosis of Neuroblastoma was achieved. Until last year, we established the analytical method of total catecholamines in standard solutions by LC/MS and pre-treatment method for urine and serum samples. This year, we improved the reliability of the analytical method and pre-treatment method, and finally establish the method for total catecholamine metabolites searching new makers, and will start the survey for finding predictive markers in stocked patient samples.

A. 研究目的

神経芽細胞腫の早期発見・治療にはタイプ・予後を判定することのできる検査法は必須である。しかしながら、現在の HVA・VMA を測定するという検査法では、そのような判定は難しい。そこで我々は今まで同時測定されていなかった、カテコールアミンの中間代謝物も含めた一斉分析により、その量関係からタイプ・予後の判定ができないかと考えた。そこで今回、血清・尿の直接注入によるカテコールアミン類の一斉分析系の確立、及びこれを利用した新規のマーカーの検索法の最終確立を目指し、検討を進めた。

B. 研究方法

1. LC/MS 条件

LC は日本分光（株）の Gulliver Series 及び Micro21 Series (Pump:PU-01, Detector:UV-01) を、前処理カラムとして内面逆相カラム (TSK precolumn, BSA-ODS, T0219, 東ソー（株）) および強陰イオン交換樹脂 (TOYOPEARL QAE-550 東ソー（株）) を、分析カラムとして化学物質評価研究機構の *L-column ODS* (150 x 1.5 mm) を用いた。MS

は Applied Biosystems 社製の MarinerTM, ESI-TOF 及び QSTARR XL, nanoESI-QqTOF を用い、データ処理は同社の Data ExplorerTM 及び AnalystQS により行った。LC/MS 分析は前回の報告と同様、1% 酢酸溶液とメタノールのグラジエントにより行い、Mariner への導入には流速を 5 mL/min まで落とす必要があるためにスプリッターティーにより流量を 1/40 になるよう調整し、ESI-TOF/MS ポジティブイオンモードで測定を行った。また microLC/MS による分析は 8% メタノール / 1% 酢酸溶液で平衡化したカラムに試料を注入し、直後に 60% メタノール / 10 mM 酢酸アンモニウム緩衝液 (pH 5.6) へ上昇させることにより、流速 10 mL/min で行った。また Mariner への導入はスプリッターティーにより流量を 1/2 になるよう調整し、ESI-TOF/MS ポジティブイオンモードで測定を行った。

2. 試薬

DOPA、DOPAC、Dopamine、Ephinephrine、Normetanephrine、Metanephrine、HVA、及び VMA は SIGMA、Norepinephrine は Fulka より購入し

た。またイオンペア試薬である Trifluoroacetic acid、Pentafluoropropionic acid、Heptafluorobutyric acid は ALDRICH から、Nonafluorovaleric acid は東京化成工業、pentadecafluorooctanoic acid は和光純薬から購入した。また本研究で使用した水は全て (Milipore) で精製した超純水を用い、メタノール、酢酸、酢酸アンモニウムは関東科学 (株)、ギ酸は米山薬品工業 (株) より購入した。

3. 標準液の調整

カテコールアミンの標準物質として、DOPA、Dopamine、Norepinephrine、Epinephrine、Normetanephrine、Metanephrine、DOPAC、HVA、VMA を用いた。それぞれの調整は超純水を用い 1mg/mL になるように作成した。さらに条件検討のために全ての標準試料を混合し、超純水により希釈し最終濃度を 10 µg/mL とし、これを標準試料混合溶液とした。また同様に FCS により希釈し、模擬血清とした。

(倫理面への配慮)

現在までの研究は市販の FCS を使用した模擬血清を使用しており、倫理上の問題はないものと考えられる。しかしながら今後、患者血清の使用も考えており、インフォームドコンセントの実施及びプライバシーの保護に十分配慮する必要がある。

C. 結果及び考察

1. イオンペア試薬を用いた前処理法の確立

前回、内面逆相カラムを用いたタンパク質と低分子の分離について報告を行ったが、イオンペア試薬の効果が不十分であり、完全に分離することはできなかった。そこで保持を高めるために炭素鎖のさらに長い Pentafluoropropionic acid (CF₃CF₂COOH)、Heptafluorobutyric acid (CF₃(CF₂)₂COOH)、Nonafluorovaleric acid (CF₃(CF₂)₃COOH)、Pentadecafluorooctanoic acid (CF₃(CF₂)₆COOH) を用いその効果を検証した。実験には内面逆相カラムにおいて最も保持の弱い Norepinephrine を用い、流速 0.5 mL/min、移動相 1% ギ酸溶液により実験を行った。3 分でのカラムスイッチングを行うためにはこの Norepinephrine が 3 分以上に溶出しなければならない。つまり保持時間としては 3.5 分以上が必要である。Fig. 1-a で示すように移動相として 0.1 mMCF₃(CF₂)₆COOH / 1% ギ酸溶液を用いることでこのような保持を得ることができた。そのときの LC クロマトグラムを Fig. 1-b に示す。このように 3 分でのカラムスイッチングによりタンパク質と低分子の分離が可能となった。

	FCS [min]	Norepinephrine [min]
1: 0.2%CF ₃ COOH	0.96	1.65
2: 0.2%CF ₃ CF ₂ COOH	1.06	1.79
3: 0.2%CF ₃ (CF ₂) ₂ COOH	0.92	2.12
4: 0.2%CF ₃ (CF ₂) ₃ COOH	1.19	2.38
5: 0.05 mMCF ₃ (CF ₂) ₆ COOH	1.00	2.62
6: 0.1 mMCF ₃ (CF ₂) ₆ COOH	1.06	>3.7

Sample: Norepinephrine
 Mobile phase: 1% HCOOH
 The flow rate : 0.5 mL/min

Fig. 1-a イオンペア試薬の効果

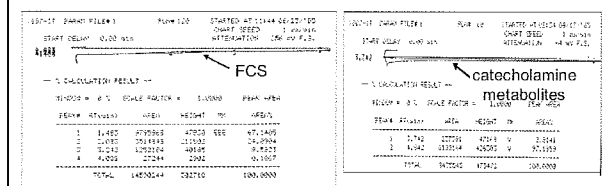


Fig. 1-b 左: Injection → 3 min
 右: カラムスイッチング後

2. 再現性の検討

タンパク質と分離した低分子分画を試験管に分取、遠心エバポレーターにて蒸発乾固した後再溶解し HPLC にて分離を行った。しかしながら、蒸発乾固のみではイオンペア試薬を完全に除去することはできなかった。そこで内面逆相カラムの後に強陰イオン交換樹脂である QAE を充填したカラムをおくことにより、イオンペア試薬を除去した。この前処理に関する再現性を標準溶液 (10 µg/mL) 100 µL を用いて検討した。評価は HPLC のピークエリアにより行った。その結果を Table. 1 に示す。このように、内面逆

	means	S.D.	C.V.(%)
Norepinephrine	305427.0	21422.8	7.0
Epinephrine	362579.2	27708.2	7.6
Normetanephrine	294155.4	7883.5	2.7
Dopamine	341016.6	12294.5	3.6
Metanephrine	357009.6	18422.8	5.2
DOPA	322912.2	7283.6	2.3
Tyrosine	206910.0	7183.9	3.5
VMA	144917.8	10714.4	7.4
DOPAC	350319.4	10976.4	3.1
HVA	434509.4	26024.9	6.0

n=5

相カラムにおいて先行して溶出してくる Norepinephrine、Epinephrine、VMA において多少のばらつきがあるものの、良好な再現性を得ることができた。このばらつきは、これらの物質の極性が高く ODS に対する親和性が弱いため、内面逆相カラムにおけるイオンペア試薬の平衡化のばらつきが大きく影響してしまったためと考えられる。これらを厳密に制御することによりバラツキを抑制することができた。

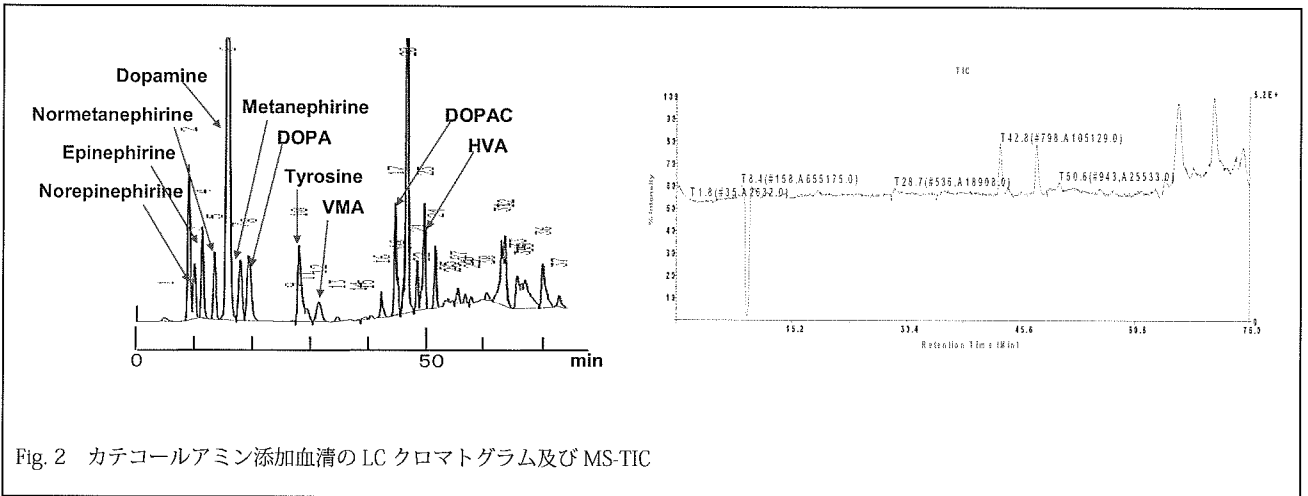


Fig. 2 カテコールアミン添加血清のLCクロマトグラム及びMS-TIC

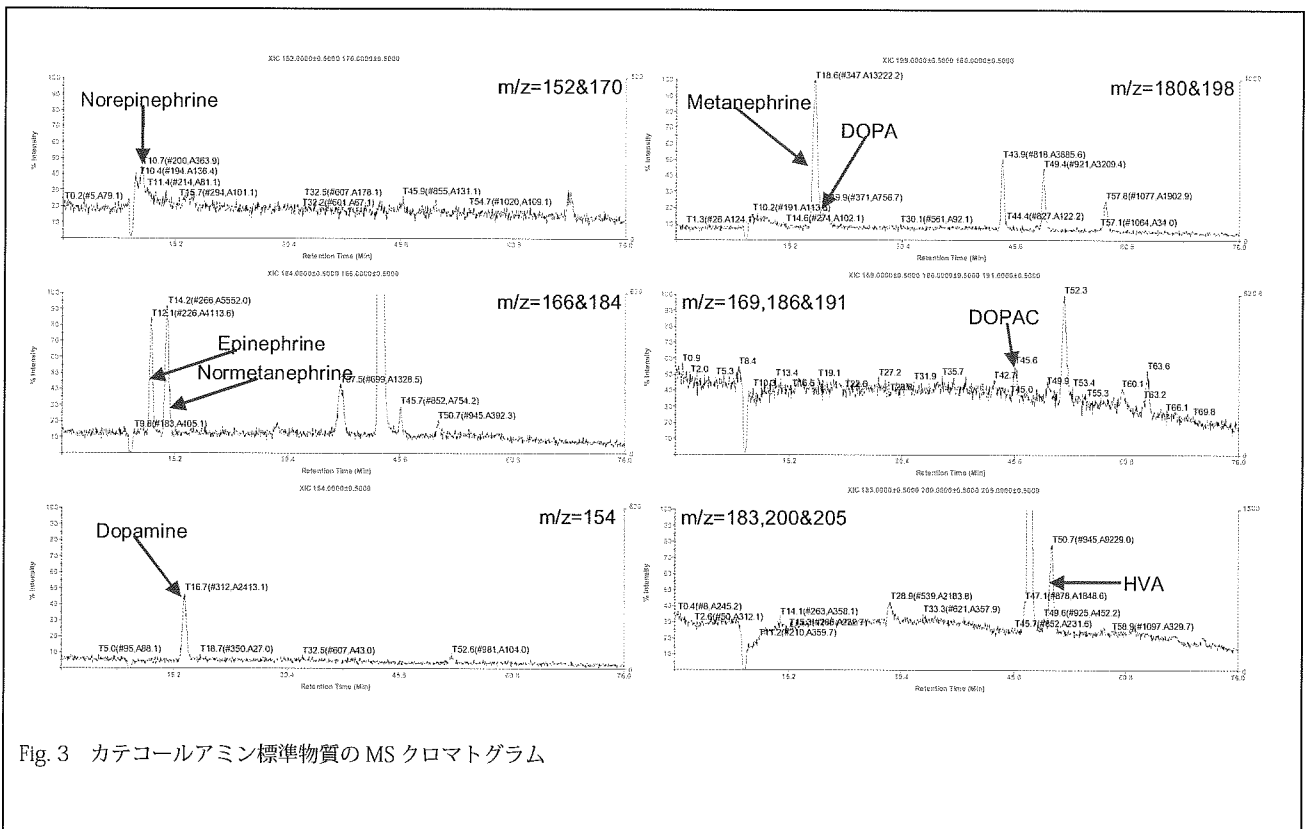


Fig. 3 カテコールアミン標準物質のMSクロマトグラム

3. 血清カテコールアミンの一斉分析

模擬血清を今回確立した分析にかけた結果を Fig. 2 に示す。HPLC の UV 検出において、添加した標準物質を血清成分に邪魔されることなくきれいに分離することができたとともに、多数の血清由来の物質もピークとして検出することができた。同様に MS クロマトグラムにおいてもそれぞれの成分をピークとして検出することが可能であった (Fig. 3)。

さらに MS クロマトグラムにおいてカテコールアミン類

以外で検出された分子ピークを Fig. 4 に示す。HPLC の UV クロマトグラムでも血清中の様々な物質を検出することができたが、MS クロマトグラム上でも種々のピークの検出が可能であった。その中には UV で検出され、それに伴い MS のピークが検出された例 (Fig. 3-a) もあったが、UV 検出でピークのない領域で MS のピークが見られる例 (Fig. 3-b) もあった。こちらのピークに関しては UV 吸収のない物質によるものであると考えられる。現在 MS/MS を用いてこれらの物質の同定を試みている。

time	m/z						time	m/z			time	m/z					
8.5	147	149	163	167	172	189	44.8	256			56.1	239					
8.6	177						45.7	167	184		57.8	163	180				
8.9	266	267	268				45.8	186			59	190					
9.6	271						46.1	181			60.1	191					
9.7	266	267					46.7	283	300	301	60.9	287	288				
9.8	172						47	239			63.3	182					
9.9	208	234	264	279	280		47.6	188	205	206	207	63.6	191				
10.1	175						49.4	180	181	195	63.7	208					
10.2	162	163	227	228	229		49.5	265			64.8	223	224	241	242	263	
14	204						49.7	222			65.2	288					
15	235						50.4	222			65.5	264	249	250	251	271	
16	137						50.7	183	200	201	66.7	266	267	268			
17.5	150	151					50.8	282			67.6	286	287				
28.8	183						52.3	186	187	277	68.1	294					
37.5	166						52.6	153			68.8	269	270				
41.9	195						53	256			69.9	280					
42.8	166	167	168	169			53.2	172			70.1	299					
43.2	181						53.3	160			70.8	284					
43.8	265						55.1	181			71.3	279	280	281			
43.9	163	180	262				56	291			72.3	252					

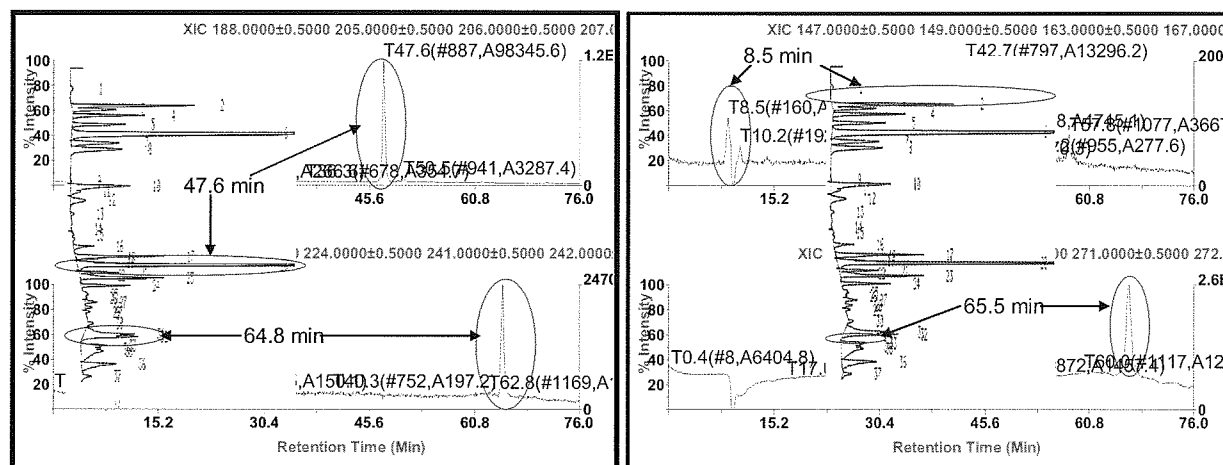


Fig. 4 カテコールアミン以外で検出された分子ピーク (ESI-TOF/MS; positive mode)
 a:HPLC-UV 及び MS で検出
 b:MS でのみ検出

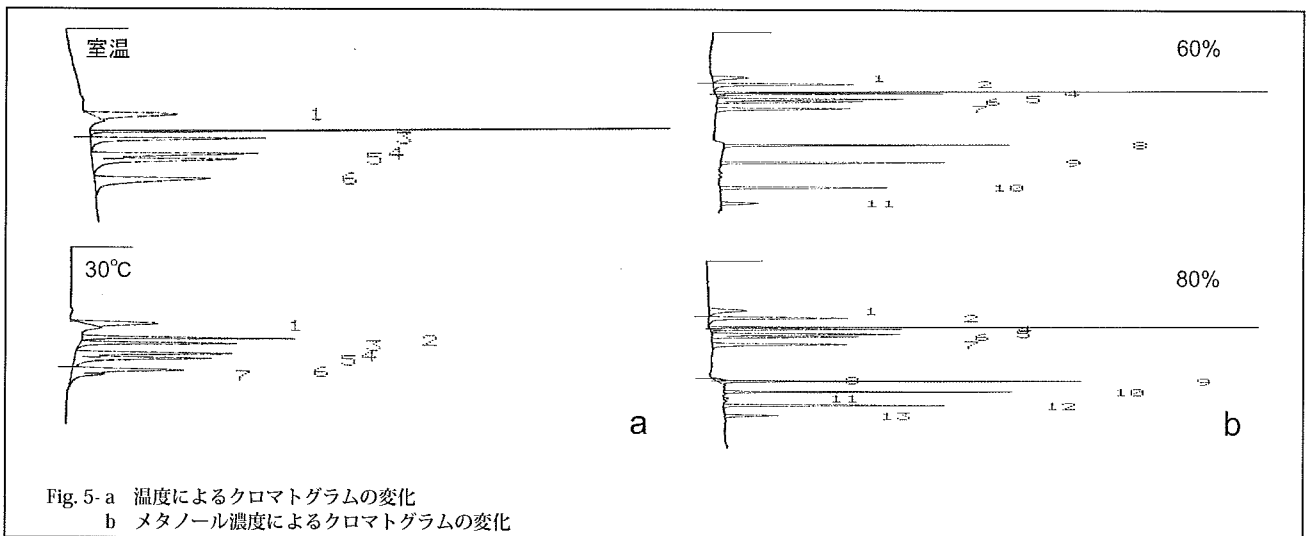
4. microLC/MS 化による検出感度の改善

HPLC での分析においては最低でも 0.2 mL/min において実験を行なう。しかしながら ESI 法によるイオン化においては流速 5 μ L/min が最適であり、LC/MS 分析においてはスプリッターティーにより流量を落とさなければならず、MS の利点である高感度を生かされていないという現状がある。そこで microLC への移行により流量を落とすことなく MS 分析を行なうことを目指した。

micro LC における分析条件を決定するための第一段階と

してアミノ基を持つ 6 種類の分離を試みた。有機溶媒濃度を変化させていったところ、メタノール濃度を 8% とした時に 6 つを分離することができた。しかしながら常温ではピーク形状にばらつきがあり、時間もかかっていた。そこでカラムを恒温槽に入れることによりカラム温度 30 $^{\circ}$ C とすることによりピーク形状の改善を図った。(Fig. 5-a)

次にカルボン酸である 3 種類の溶出条件の検討を行った。分析時間をできるだけ短くするために、80% メタノール/MilliQ での溶出を試みたところ DOPAC, HVA は溶出されな



かった。これはこれらの物質が分子型で存在しており、カラム内に強く保持されているためであると考えられる。そこでpHを中性付近に移行させ、これらをイオン型として溶出することを試みた。10 mM 酢酸アンモニウム (pH5.6) を用いることで、これらの溶出が可能となった。さらにメタノールの濃度の検討を行なった。Fig. 5-b にメタノール濃度が60%のときと80%のときのクロマトグラムを示したが、80%の方がVMAからHVAまでの溶出時間の間隔が短いことがわかる。つまりメタノール濃度はVMA以降に溶出される脂溶性の高い物質の溶出時間に関与してくると思われる。別の実験から血清においては、この領域に溶出される物質が多いことがわかっているため、この差はできるだけ大きいほうが好ましい。そこでメタノール濃度は60%を採用することとした。

microLC/MSによる血清カテコールアミン一斉分析により得られたLCクロマトグラムとその際のMSのTIC及び各成分のMSクロマトグラムをFig.6示す。LCのクロマトグラムではconventional LCと比較して多少カテコールアミンの分離は悪化しているが、MSクロマトグラムにおいては、各成分をピークとして分離・検出することができたとともにピークの拡大が見られた。これは移動相組成の変化や、血清由来の物質の溶出時間がずれたことによるものと考えられる。特にVMA、DOPAC、HVAでは移動相にアンモニウムイオンが含まれているため、アンモニウム塩の形でイオン化が増したためだと考えられる。microLC/MSにおいては50 ngの、conventional LCにおいては800 ngの負荷であるのでmicroLC/MS化により20.8から89.6倍の感度向上が図れたといえる。また示していないが、microLC化したことによりconventional LCでは検出できていなかったイオンを検出することも可能となった。

5. MS/MSによるカテコールアミン類同定法の確立

血清中には様々な物質が存在する。一般にLC/MS分析ではLCでの保持時間とMSでのm/zの二つの情報を統合して物質を同定するが、血清など多量の成分が含まれている試料においてはLCでの保持時間が変化しやすく、また構造異性体などm/zの同一の物質が数多く存在するため、絶対にこの物質であると断定することはできない。カテコールアミン類においても組成式が同じ構造異性体が存在し、それらの同定はLCの保持時間に頼らざるを得ない。しかしながら、血清におけるLCでの保持時間の情報は不確定でありそのみに頼るのは危険である。そこでカテコールアミン類の各成分についてMS/MS分析を行ない、その成分固有のフラグメントイオンを決定し、多量の成分を含む生体試料中におけるカテコールアミン類の確実な同定法の確立を目指した。実験はカテコールアミン標準物質の単一溶液(10 µg/mL、50%メタノール/1%酢酸溶液)を用い、質量分析機(QSTAR[®] XL)においてnanoESI法により、ESI-TOF/MSポジティブモードで実験を行った。この際カルボン酸型の3種類に関してはポジティブモードでのイオン化を促進するため溶媒として50%メタノール/2 mM 酢酸アンモニウム緩衝液を用いた。

これらの結果およびフラグメントのm/z及びフラグメント間のm/z差から考えられる構造をFig. 7-aとbに示す。まずアミノ基を持つ6種類に関してだが、いくつかの共通のフラグメントがみられた。これらのフラグメントはm/z 107, 77, 65であり、カテコール骨格特有のフラグメントであると考えられ、このうちいくつかのフラグメントの存在を確認することでカテコールアミン類であると同定できる。またEpinephrineとNormetanephrineは分子量が同一であるが、これらのMS/MSスペクトルを見てみ

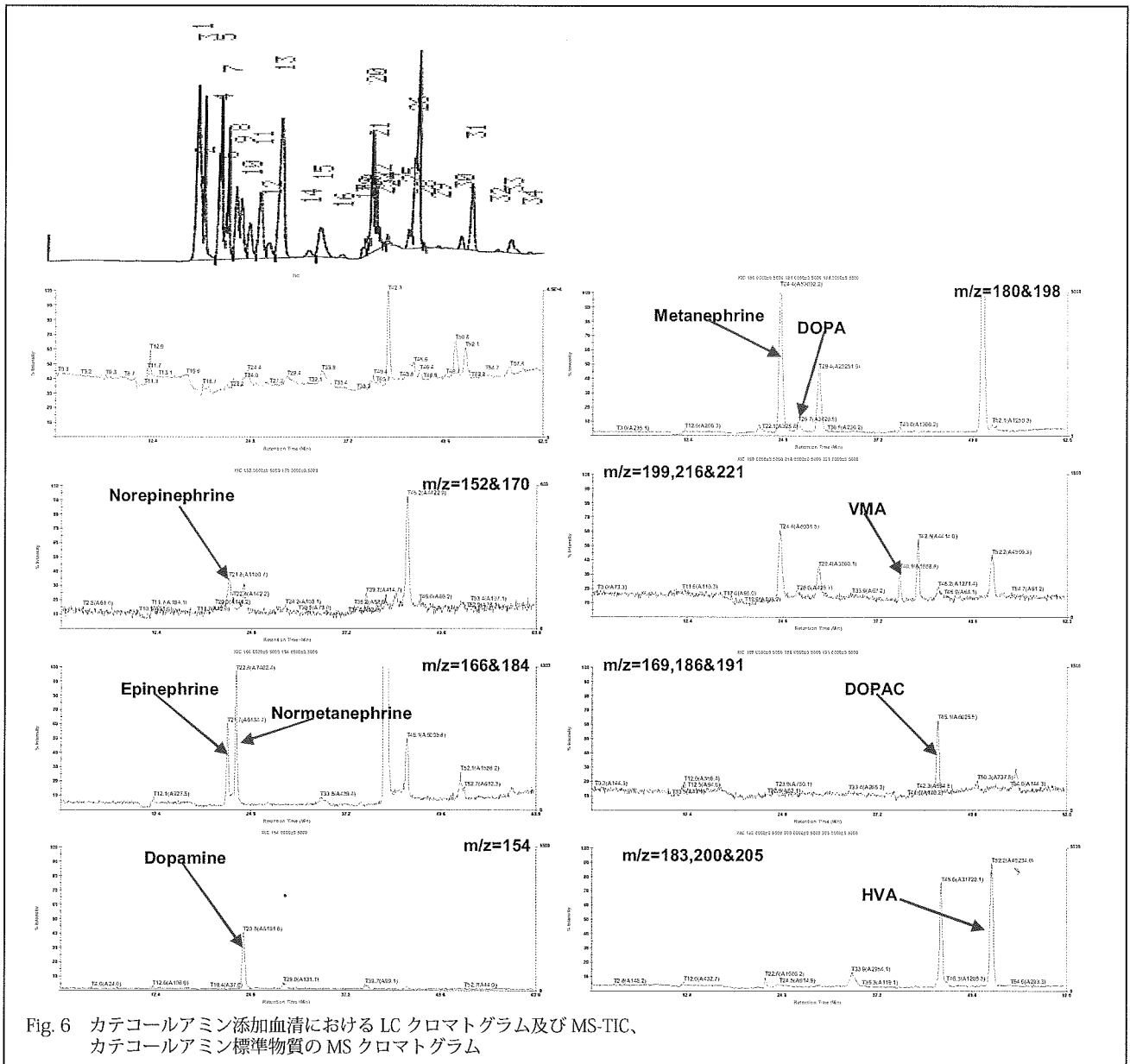
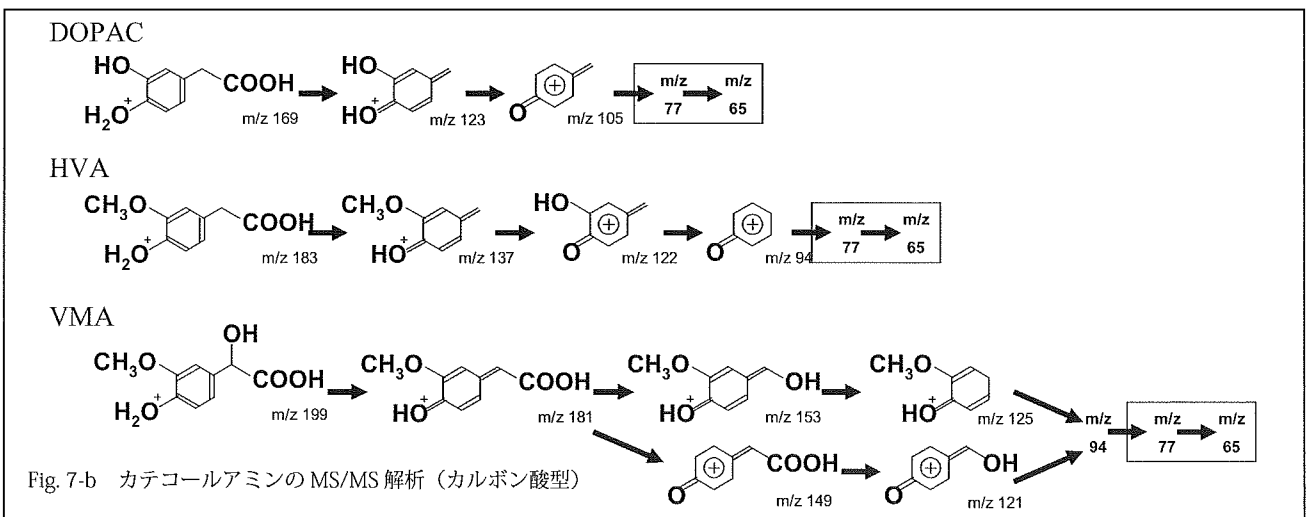
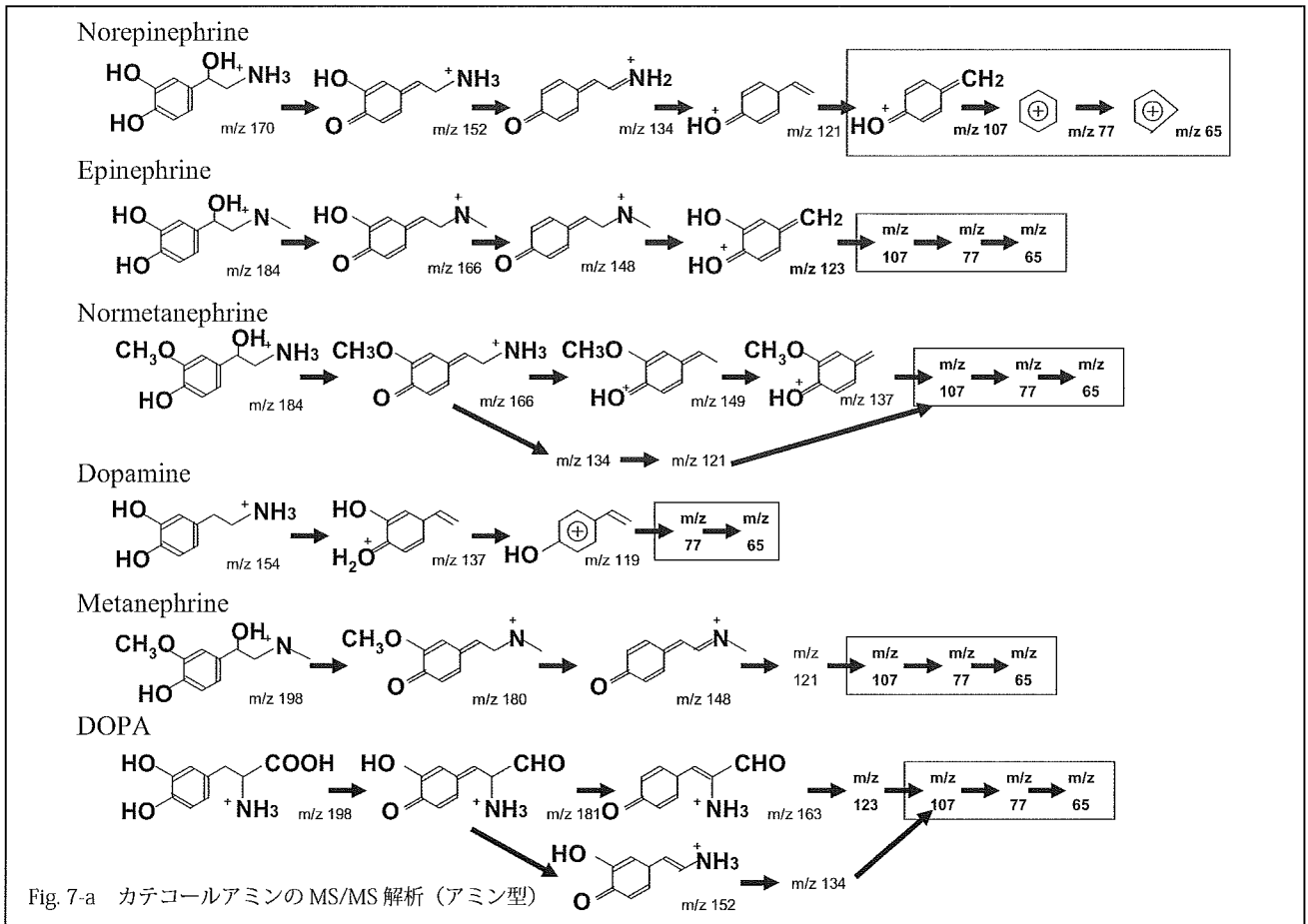


Fig. 6 カテコールアミン添加血清における LC クロマトグラム及び MS-TIC、カテコールアミン標準物質の MS クロマトグラム

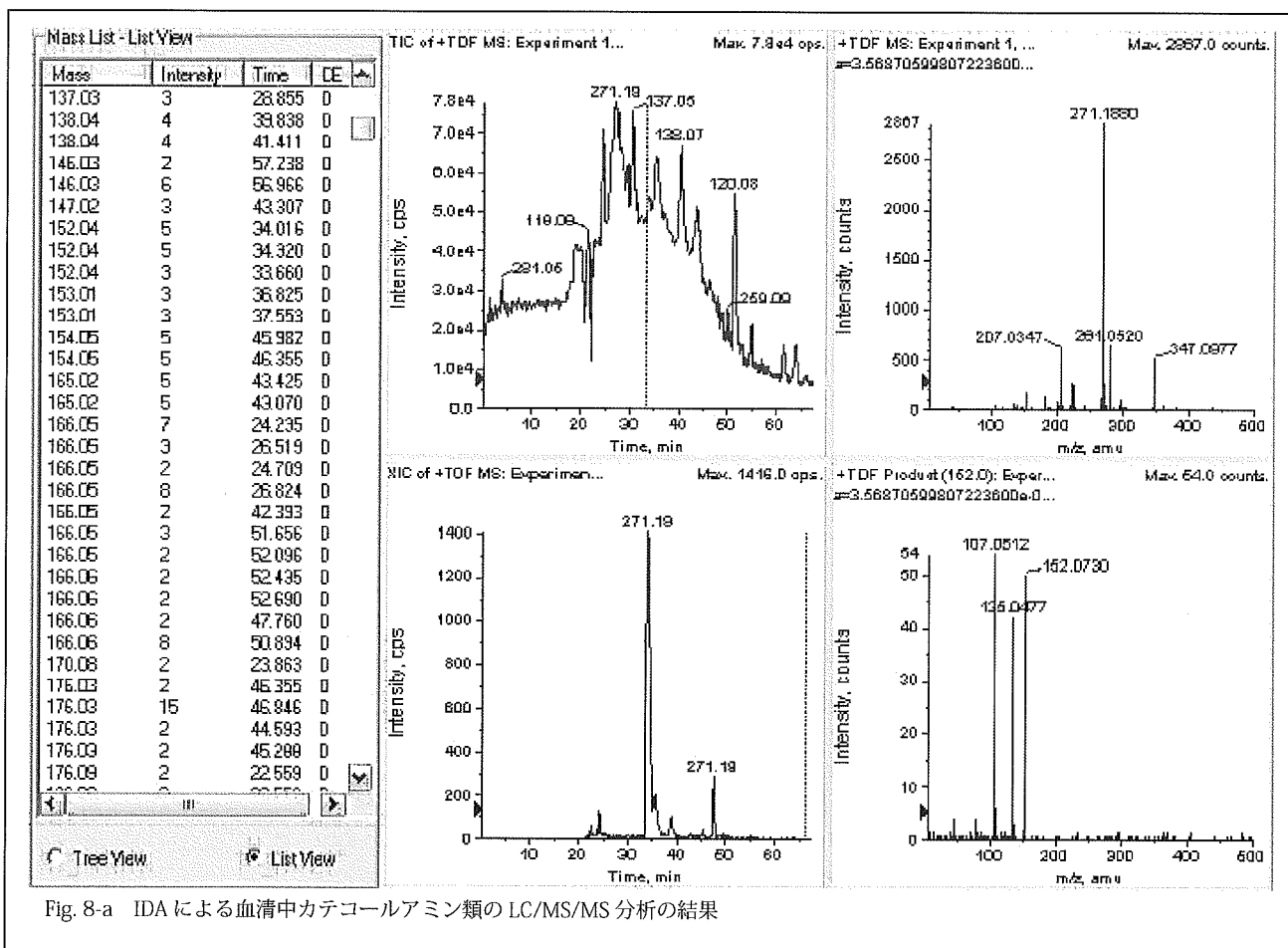
ると Epinephrine においては m/z 123 のフラグメントが、Normetanephrine においては m/z 134 と 149 のフラグメントが固有のピークとして得られた。この違いはこの 2 つの物質におけるメチル基の結合位置の違いによるものであり、N-メチル基をもつ Epinephrine では m/z 134 のような構造はとり得ず、逆に O-メチル基を持たない Normetanephrine では m/z 149 のような構造をとることはできない。これらのフラグメントの検出により個々の同定が可能であると言える。同様に分子量 197 の、Metanephrine と DOPA においては、はじめのフラグメンテーションの段階で違いがあり、Metanephrine においては H_2O としてフェノール性水酸基がはずれ、DOPA においては $-OH$ がはずれることでカル

ボキシル基がアルデヒド基へと変わる。そのため、その後のフラグメンテーションも異なってくる。つまりカテコール骨格由来の m/z の小さなフラグメント以外のピークパターンが異なるので、これらの同定は容易であると考えられる。次にカルボン酸型についてだが、アミン型に比べ強度は多少劣るが、MS/MS 分析を行なうのに十分なシグナルが得られた。このときそれぞれの物質において強いピークとして見られたのは、添加した酢酸アンモニウム緩衝液由来のアンモニウムが付加したイオンであった。しかし MS/MS 分析のターゲットとしてプロトン付加イオンを選択しても十分に MS/MS 分析を行なうことができた。これらの 3 種類もアミノ基を持つグループと同様に m/z 77, 65 などの



フラグメントが得られた。また、ベンジル位に水酸基を持たないDOPAC及びHVAにおいてはポジティブでのイオン化に負の影響を与えるカルボキシル基の脱離がまず起こるのに対し、ベンジル位に水酸基を持つVMAにおいては、アミン型で類似の構造を持つものと同様にパラ位の水酸基と連鎖し水の脱離が起こり、その後カルボキシル基の脱離が

起こった。これら3種類はメチル化、水酸化の位置が全て違うため、ベンゼン環由来のフラグメント以外に共通のフラグメントを見出すことができなかった。しかしながら今回の実験により決定されたそれぞれの物質固有のフラグメントは、生体試料中での正確な同定に利用可能であるといえる。



6. 血清カテコールアミンのLC/MS/MS分析

種々の物質が存在する血清中においてカテコールアミン類を正確に分析するためQSTARのIDA機能を利用したLC/MS/MS分析を試みた。IDA機能とは適切なイオンを自動で選択し、MS/MSを行なう手法のことである。この際必ずMS/MS分析するイオンを選択することができるため、血清中のカテコールアミン類の濃度が低い場合でもMS/MS分析されるためフラグメントの確認による正確な定性分析が可能となる。LC/MS/MS分析の結果をFig. 8-aに示す。このようにIDAによる解析の結果は、MS/MS分析したイオンがリストになって出てくる。そのリストの数値をクリックすることによりその時点のTOFのMSクロマトグラム、そのイオンのXIC、そのイオンのMS/MSスペクトルが表示される。カテコールアミン類のうちアミン型のイオンのXIC及びMS/MSスペクトルをFig. 8-bに示す。血清中には様々な物質が存在している。たとえばEpinephrineのプロトン付加イオンのm/zは184であるが、m/z184に対するMS/MSデータはFig. 8-bのEpinephrineのXICを見ても分かるように数多く存在する。このうちで、Epinephrine固有のフ

ラグメント(m/z148、123など)を与えるものは、最も初めの24分付近のピークのみである。その後ろの26から27分のピークにはNormetanephrine固有のフラグメント(m/z149、134など)が出ており、血清中の同じm/zを与える物質と区別することができたとともに、EpinephrineとNormetanephrineをきちんと判別することが可能となった。同様の解析により、m/z152、134などのフラグメントから22分前後にNorepinephrineが、m/z137、119などのフラグメントから28分前後にDopamineが、m/z180、165、148などのフラグメントから30分前後にMetanephrineが、m/z181、163、139などのフラグメントから32分前後にDOPAが溶出していることが分かった。今回の実験においてはカルボン酸型の物質がMS/MS分析されていなかった。IDA分析のパラメーターを変化させても結果は同じであった。これは同時に溶出してくる物質のピーク強度が大きいため、その物質に隠れてしまいこれらの物質がMS/MS分析の対象とならなかったためであると考えられる。