

いて、小さな遺伝子異常に起因した遺伝子発現変化を検討することで、神経芽細胞腫の悪性度を規定している遺伝子変化を同定することが可能と考えられる。

また、MYCN増幅群では、MYCN遺伝子の位置する2pの領域にMYCNとは異なった複数のアンプリコンを有する症例が見られ、本腫瘍の増幅過程について興味ある所見であると共に、MYCN増幅群の中にそれぞれ個性が存在する可能性が示唆された。

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、SNPアレイを用いることで十分検出可能であり、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やアンプリコンを構成する断片が見出され、これらは、増幅の発生機序について興味ある所見であるとともに、増幅領域に含まれる遺伝子によってそれぞれの腫瘍の性質に差が生じる可能性が示唆された。

今回の検討では、神経芽腫のゲノム異常の発生機構が複数存在し、これらが生物学的特性に密接に関連していることが示された。とくに、染色体が全体として増減している症例は予後良好で、これらは別のサブセットとして治療方針を決定すべきグループであると考えられた。これに対し、MYCN増幅型は従来指摘されてきたとおり、極めて予後不良であり、これらに対してスクリーニングによる早期発見も含めた新たな治療戦略が必要であると考えられる。残りのSilent型、Partial chromosome gain/loss型はいわゆる中間群であり、これらを詳細に解析することで、神経芽腫の発生、進展に関与する真の遺伝子を見出せるものと考えている。そこで、従来我々が行ってきた遺伝子発現アレイを組み合わせ⁴⁾⁵⁾ことで、ある程度予後を層別化することができた。この事実は、発現量が予後と相関している遺伝子の中で、遺伝子量の変化に伴って変動している遺伝子を抽出し、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の獲得に密接に関連したシグナル伝達系を見出すことができる。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率、過剰診断例の有無を検討し、マスの効果判定、さらに新たなスクリーニング法への知見が得られると考えている。

また、今回用いたSNPアレイによるゲノム解析は、腫瘍DNA量が250ng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。網羅的発現解析や蛋白解析〔プロテオーム〕も導入し、遺伝子異常と遺伝子発現、蛋白発現解析から、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う。そして、これらから腫瘍の個性診断を行い、網羅的遺伝子解析に基づいたリスク分類を確立し、それに基づいた治療のガイドライン作りとそれぞれのリスク群の個性を把握した上での早期診断法としてのスクリーニング法の開発とテーラード治療をめざしている。

E. 結論

神経芽腫検体のDNAを用いた全ゲノム上のSNPの網羅的解析による、遺伝子異常の網羅的解析を行った結果、この腫瘍のゲノム異常は4つに大別された。これらのうち、Whole chromosome gain/loss型は予後良好で、MYCN増幅型は予後不良であり、Silent型およびPartial chromosome gain/loss型はその中間であった。中間の2つのタイプは、遺伝子発現の網羅的解析によって予後の良いものと悪いものを層別することが可能であった。これらの網羅的解析によって、遺伝子異常から本腫瘍のリスク分類が可能となるだけでなく、本腫瘍の発生、進展の機序、さらに腫瘍特性の決定因子の同定に極めて有用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, Yamaoka H, Kamimatsuse A, et al. Single nucleotide polymorphism array analysis to predict clinical outcome in neuroblastoma patients. *J Pediatr Surg*, 41: 2032-2036, 2006.
4. 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.
5. 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, Yamaoka H, Kamimatsuse A, Onitake Y, Hiyama K, Nishiyama M, Sueda T. Single nucleotide polymorphism array analysis to predict clinical outcome in neuroblastoma patients. *J Pediatr Surg*, 41(12): 2032-2036, 2006.
- 2) Iehara T, Hosoi H, Akazawa K, Matsumoto Y, Yamamoto K, Suita S, Tajiri T, Kusafuka T, Hiyama E, Kaneko M, Sasaki F, Sugimoto T, Sawada T. MYCN gene amplification is a powerful prognostic factor even in infantile neuroblastoma detected by mass screening. *Br J Cancer*, 94(10): 1510-5, 2006.
- 3) Hasegawa T, Hiyama E, Wada K, Masujima T. Pre-treatment and one-shot separating analysis of whole catecholamine metabolites in plasma by using LC/MS. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 385(5): 814-20, 2006.
- 4) Masujima T, Tsuyama N, Hasegawa T. Videovisualization of dynamic cell responses and its molecular analysis for nanomedicine. *Nanomedicine*, 1(3), 331-343, 2006.
- 5) Hasegawa T, Hiyama E, Masujima T, et al.

Analysis of total catecholamine metabolites by LCMS. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, in press.

- 6) 檜山英三, 家原知子, 米田光宏, 鬼武美幸, 山岡裕明, 澤田 淳, 中山雅弘, 杉本 徹, 林富, 福澤正洋, 升島 努, 赤澤宏平, 大瀧 慈. 神経芽細胞腫マススクリーニングで得られたエビデンスと今後. *日本マススクリーニング学会雑誌*, 16: 39-47, 2006.
- 7) 中山雅弘. 1歳半神経芽腫マススクリーニングの試み. 第22回日本小児がん学会, 第48回日本小児血液学会, 教育講演集, p 29-32, 2006.
- 8) 長谷川朝美, 檜山英三, 和田克哉, 升島 努. LC/MSによるカテコールアミン類及びその代謝物の一斉分析法の確立. *日本マススクリーニング学会誌*, in press.
- 9) 檜山英三, 山岡裕明. 神経芽細胞腫—マススクリーニング休止後の対応と展望—. *小児科臨床*, 59 (4): 667 - 684, 2006.

1. 学会発表

- 1) 家原知子, 杉本 徹, 檜山英三, 他. 日本における神経芽腫リスク分類の提案—全国登録症例の解析より—. *小児がん学会*, 大阪, 11.24-25, 2006.
- 2) 長谷川朝美, 檜山英三, 升島 努. 生体試料中のカテコールアミン類 LC/MS分析のための前処理戦略. 第13回クロマトグラフィーシンポジウム, 東京, 6.7-9, 2006.
- 3) 長谷川朝美, 津山尚宏, 前田昌子, 檜山英三, 升島 努. カテコールアミン類及び血清成分の LC/MS/MS解析. *日本分析化学会第55年会*, 名古屋, 9.20-22, 2006.
- 4) 長谷川朝美, 津山尚宏, 前田昌子, 檜山英三, 升島 努. LC/MS/MSによる新しい神経芽細胞腫マーカーの検索. *日本分析化学会第55年会*, 名古屋, 9.20-22, 2006.
- 5) 西垣俊太, 長谷川朝美, 津山尚宏, 前田昌子, 檜山英三, 升島 努. LC/MSによる神経芽細胞腫診断のための尿中カテコールアミン代謝物の前処理法及び一斉分析. 第19回バイオメディカル分析科学シンポジウム, 福岡, 8.1-3, 2006.

- 6) 長谷川朝美, 津山尚宏, 前田昌子, 檜山英三, 升島 努. LC/MS/MS を用いた新規神経芽細胞腫マーカーの検索. 第45回日本薬学会日本病院薬剤師会中国四国支部学術大会, 広島, 10.28-29, 2006.
- 7) 西垣俊太, 長谷川朝美, 升島 努, 檜山英三. LC/MS/MS によるカテコールアミン一斉定量法の確立及び尿検体のプロファイリング. フィジカルファーマフォーラム2007, 富山, 3.27-28, 2007.
- 8) 長谷川朝美, 芦刈沙織, 豊田祐子, 津山尚宏, 前田昌子, 檜山英三, 升島 努. LC/MS/M による神経芽細胞腫診断のための新規マーカー検索. 日本分析化学会第55年会, 名古屋, 9.20-22, 2006.
- 9) 西垣俊太, 長谷川朝美, 津山尚宏, 前田昌子, 檜山英三, 升島 努. LC/MS/MS による尿中カテコールアミン類一斉分析法の確立. 日本薬学会第127年会, 富山, 3.28-30, 2007.
- 10) 澤田 淳, 中山雅弘, 赤澤宏平, 藤田晃三, 檜山英三. 生後18ヶ月幼児への神経芽腫マスキリーニングの実施について. 第22回日本小児がん学会 第48回日本小児血液学会 第4回日本小児がん看護学会, 大阪市, 11.24-26, 2006.
- 11) 米田光宏, 福澤正洋, 檜山英三, 他. マスキリーニング施行世代における1歳代神経芽腫の特徴 - 本邦登録症例と欧米との比較検討. 第22回日本小児がん学会, 大阪, 11.23-24, 2006.
- 12) 石山洋, 久保田倫子, 澤田淳, 他. 生後18ヶ月幼児に対する神経芽細胞腫マスキリーニングの実施要綱と検査機関の対応. 平成18年度静岡県公衆衛生研究会, 11, 2006.
- 13) 山岡裕明, 鬼武美幸, 家原知子, 杉本 徹, 林 富, 福澤正洋, 佐々木文章, 杉山正彦, 近藤知史, 田尻達郎, 米田光宏, 高原裕夫, 浜崎豊, 赤澤宏平, 大瀧 慈, 檜山英三. 神経芽腫マスキリーニング試行時期の登録例から得られたエビデンス. 第22回小児がん学会, 大阪, 11.24-25, 2006.
- 14) Hiyama E, Yamaoka H, Kamimatsuse A, Onitake Y, Hiyama K, Nishiyama M, Sueda T. Single nucleotide polymorphism array analysis to predict clinical outcome in neuroblastoma patients. 39th Annual Meeting of the Pacific Association of Pediatric Surgeons, Taipei, Taiwan, 14-18, 2006.
- 15) Hiyama E, Hiyama K, Yamaoka H, Nishimura S, Reynolds CP, Sueda T. Comparative genome-wide analyses of gene expression and genetic alteration in neuroblastomas detected by mass screening and clinical symptoms. 97th Annual Meeting of American Association for Cancer Research, Washington, DC, USA, 4.1-5, 2006.
- 16) Hiyama K, Tsugane M, Tanimoto K, Nishimura Y, Hiyama E, Nishiyama M. Differential regulation of cellular proliferation between transformed and non-transformed immortal cells. 97th Annual Meeting of American Association for Cancer Research, Washington, DC, USA, 4. 1-5, 2006.
- 17) Hiyama E, Yamaoka H, Fukuba I, Fukuda E, Sueda T, Onitake Y, Hiyama K. Telomere 3' Single-Strand Overhang Length in Neuroblastoma. Advances in Neuroblastoma Research 2006, Los Angeles, USA, 5. 17-20, 2006.
- 18) Hiyama E, Yamaoka H, Kamimatsuse A, Onitake Y, Sueda T, Nishiyama M, Hiyama K. Genomewide single nucleotide polymorphism microarray mapping for prediction of outcome of neuroblastoma patients. 42nd Annual Meeting of the American Society of Clinical Oncology, Atlanta, Georgia, 6.2-6, 2006.
- 19) Hiyama E, Hayashi Y, Fukuzawa M, Sasaki F, Sugiyama M, Kondo S, Tajiri T, Yoneda A, Akazawa K, Ohtaki M. Heterogeneous subgroups in human neuroblastoma for clinically relevant risk stratification. 43th Annual meeting of the Japanese Society of Pediatric Surgeons, Akita, 6. 7-9, 2006.
- 20) Hiyama E, Yamaoka H, Onitake Y, Yoneda A, Nakayama M, Iehara T, Sugimoto T, Sawada

T. Akazawa K, Ohtaki M. Proporsal of new benefical neuroblastoma screening system: Insights into the bioloty ob neuroblastic tumors screened at 6-months of age. International Society for Neonatal Screening 2006, Tokushima, Japan, 9. 16-19, 2006.

21) 鬼武美幸, 山岡裕明, 檜山桂子, 末田泰二郎, 檜山英三. マイクロアレイにて抽出した神経芽細胞腫の分化誘導下に発現増強する遺伝子の臨床応用. 日本癌治療学会, 10.18-20, 2006.

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

厚生労働科学研究費補助金（子ども家庭総合研究事業）
分担研究報告書

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

分担研究者 升島 努 広島大学大学院 医歯薬学総合研究科 教授

研究要旨

神経芽細胞腫の早期発見・正確な診断は、小児の癌による死亡を減少させるためには必須である。現行の神経芽細胞腫マスキニングにおいては、予後やタイプの判定が難しく、過剰治療の原因となっていた。そこで我々は腫瘍のタイプ・予後を判断することのできる検査法の確立、さらには新しいマーカー候補分子の検索法の確立を行った。現行のマスキニングでは注目されていなかったカテコールアミンの中間代謝物も対象とし、タンデム MS を用いた尿中・血中カテコールアミン代謝物の一斉分析法の確立により、9 種のカテコールアミンの一斉定量法を確立した。また LC/MS/MS による網羅的分子追跡により、低分子を標的とした新しいマーカーの検索も行い、候補物質を発見した。

Summary

Early detection and accurate diagnosis of neuroblastoma is a vital basis to decrease the death caused by the infantile cancers. However, it was very difficult to determine a subtype of the tumor and prognostic expectation using the established method for mass-screening of candidate neuroblastoma patients, and the treatment of tumors diagnosed by the screening sometimes caused unnecessary treatments against tumors with good prognosis. In order to improve these problems, we have established a new examination method that could determine a subtype of neuroblastoma and its prognosis. We have also established a method to search for new diagnostic markers of the neuroblastoma with poor prognosis. Although several catecholamine intermediate-metabolites were not used as diagnostic markers in the established screening method, we have succeeded to quantify nine catecholamine metabolites all together in urine and blood using tandemMS. In addition, during the survey for new diagnostic markers of malignant neuroblastoma, we have succeeded to find candidate markers with small molecular weight by LC/MS/MS.

A. 研究目的

神経芽細胞腫は小児特有の悪性腫瘍であり、その診断は昨年度まで新生児マスキニングにより行われてきた。尿中 VMA、HVA 濃度を測定するスクリーニング法に対し測定値の正確性やカットオフ値の設定など問題点が挙げられ、またスクリーニング実施後の神経芽細胞腫による死亡の推移からは現行のスクリーニングには有効性がないとし、厚生労働省の委員会において、スクリーニング休止の結論に至った。しかし、否定的な見解とは反対にマスキニングにより死亡率が減少したという見解

もあり、再開の必要性も挙げられている。

そこで我々は、陽性患者の中に良性あるいは退縮性の患者が含まれてしまう、というこれまでのスクリーニングにおける問題点を解決するため腫瘍のタイプ・予後を判断することのできる検査法の確立、さらには新しいマーカー候補分子の検索を試みた。標的は尿・血液中低分子とし、LC/MS 及び LC/MS/MS を用いて実験を行った。結果については以下の 3 章にわけ詳細を報告する。

1. LC/MS 及び LC/MS/MS によるカテコールアミン一斉定量系の確立

2. 尿中カテコールアミン一斉分析の為の前処理濃縮法の確立

3. 血液中カテコールアミン一斉分析の為の前処理濃縮法確立及び新規マーカー検索

B. 実験方法

1. 分析条件

LC条件検討においては日本分光(株)のGulliver Series及びMicro21 Series (Pump:PU-01, Detector:UV-01)を、分析カラムとして化学物質評価研究機構のL-column ODS (150×1.5mm及び150×4.6mm)を用いた。

前処理においては、尿に対して陽イオン交換-逆相ミックスモード固相カラム (Oasis[®] MCX ; Waters : 4.6×20mm) を、血清に対しては内面逆相カラム (TSK precolumn, BSA-ODS, T0219, 東ソー(株)) 及び内面陽イオン交換カラム (CAPCELL PAK MF-SCX, SHISEIDO) を用いた。

LC/MSはMicro21 SeriesとMariner[™], ESI-TOF/MS (Applied Biosystems) のセット及びLCMS-2010 (ESI or APCI-Q/MS; SHIMADZU) を用いた。データ処理はData Explorer[™]及びLCMSポストランにより行った。

LC/MS/MSはMicro21 SeriesとQSTAR[®] XL (ESI-QqTOF/MS; Applied Biosystems) のセット及びProminence Series (SHIMADZU) とAPI3200 (ESI or APCI-QqQ/MS; Applied Biosystems) を用い、データ処理は同社のAnalystQSにより行った。またMarinerへの導入はスプリッターティーにより流量を1/40になるよう調整し測定を行った。

2. 試薬

DOPA、DOPAC、Dopamine、Epinephrine、Normetanephrine、Metanephrine、HVA、及びVMAはSIGMA、NorepinephrineはFulkaより購入した。MSにおける内標準物質として安定同位体標識されたd₄-Dpmamine、d₆-Epinephrine、d₃-creatinineをCDN ISOTOPESより、d₃-DOPAをCambridge Isotope Laboratories, Incより購入した。また本研究で使用した水は全て超純水を用い、アセトニトリル、メタノール、酢酸、ギ酸アンモニウム、炭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1 mg/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10µg/mLとし、これを標準試料混合溶液とした。また同様に尿、FCSにより希釈し、模擬尿、模擬血清とした。

(倫理面への配慮)

使用した患者検体は全て広島大学病院の倫理委員会において本研究への使用について承認を得たものである。

C. 結果及び考察

1. LC/MS及びLC/MS/MSによるカテコールアミン一斉定量系の確立

1-1. LC/MSによるカテコールアミン一斉定量系の確立

MSのイオン化法にはいくつかの方法が存在するが、LCとの組み合わせとして汎用されるのはESI及びAPCIである。LCにより分離したそれぞれの物質がMSにおいてどのようにイオン化するか及びESIとAPCIのどちらがカテコールアミン類の分析に適しているかについて検量線を作成することにより検証した。今回の実験では定量性に優れたMSである四重極型のMSであるLCMS-2010を用いた。

Table. 1にESI及びAPCIでの分析の結果を示す。ESIにおいては、アミノ基を有する6種類についてはポジティブモードで検出が可能であった。この際通常のESIでのイオン化により生成される[M+H]⁺だけでなく、イオン化の段階で脱水が起こった[M+H-H₂O]⁺も多く検出された。これに対してカルボキシル基を持つ3種類はポジティブモードではイオン化しなかった。VMAとDOPACに関してはネガティブモードで[M-H]⁻の形で検出が可能であったが、HVAに関してはどちらのモードでも検出がされなかった。しかしながら別のMSにおいては[M+H]⁺、[M+NH₄]⁺の形で検出されており、イオンソースによっては検出できないことがあるのではないかと考えられる。これに対

し APCI では、全ての物質をポジティブモードで検出することができた。アミノ基を持つ6種類に関しては ESI と同様のイオンが検出されたのに対して、カルボキシル基を持つ物質においてはイオン化の段階で分解されたフラグメントイオンが主に検出され、[M+H]⁺ の形では検出されなかった。APCI においては ESI で検出されなかった HVA についても検出が可能であった。

検出限界、定量限界に関しては、HVA を除く全ての物質において ESI の方が優れていた。これらの濃度は血清の基準値に近い値を示しており、実際の検体分析にも十分に利用可能であるといえる。

1-2. LC/MS/MS によるカテコールアミン一斉定量法の確立

一般に LC/MS 分析においては 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、生体試料のように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、物質の同定・定量は困難である。そこで各物質の構造を反映した定量法としてしばしば活用されるのが MS/MS 法による MRM 分析である。MRM 分析とはプリカーサーイオン（イオン化によってできたイオン）と、衝突室内で分解してできたプロダクトイオンの組み合わせを検出する手法

	ESI				APCI			
	mode	m/z	検出限界 (ng/mL)	定量限界 (ng/mL)	mode	m/z	検出限界 (ng/mL)	定量限界 (ng/mL)
norepinephrine (MW169.2)	+	152,170	1	2	+	152,170	100	200
epinephrine (MW183.2)	+	166,184	0.5	1	+	166,184	20	50
normetanephrine (MW183.2)	+	166,184	0.2	0.5	+	166,184	2	5
dopamine (MW153.2)	+	154	1	2	+	154	500	500
metanephrine (MW197.2)	+	180,198	0.1	0.2	+	180,198	2	5
DOPA (MW197.2)	+	181,198	0.2	0.5	+	181,198	1000	1000
VMA (MW198.2)	-	197	10	10	+	137,181	50	100
DOPAC (MW167.2)	-	167	10	10	+	123,186	100	200
HVA (MW180.2)	-	no signal	-	-	+	137	5	10

Table. 1 それぞれのイオン化において検出されたイオン及び検出限界・定量限界

	ESI			APCI				ESI			APCI		
	mode	Q1	Q3	mode	Q1	Q3		mode	Q1	Q3	mode	Q1	Q3
norepinephrine	+	170.0	152.2	+	170.0	152.2	DOPA	+	198.1	181.2	+	198.1	181.2
	+	152.2	135.2	+	152.2	135.2		+	198.1	152.1	+	198.1	152.1
epinephrine	+	184.1	166.0	+	184.1	166	VMA	-	197.1	136.9	+	181.3	93.1
	+	184.1	122.9	+	184.1	122.9		-	197.1	137.8	+	181.3	65.1
	+	166.0	151.1	+	166	151.1	DOPAC	-	167.1	122.9	+	123.1	77.0
normetanephrine	+	184.1	166.0	+	184.1	166.0	HVA	-	167.1	95.0	+	123.1	51.2
	+	166.1	134.2	+	166.1	134.2		-	181.1	137	+	137.1	94.1
dopamine	+	154.1	137.4	+	154.1	137.4		-	181.1	122.1	+	137.1	66.1
	+	154.1	91.2	+	154.1	91.2							
metanephrine	+	198.1	180.3	+	198.1	180.3							
	+	198.1	148.1	+	198.1	148.1							

Table. 2 各物質の Q1（プリカーサーイオン）と Q3（プロダクトイオン）の組み合わせ

であり、個々の物質について構造特異的なプロダクトイオンを選択することにより、より選択的かつ高感度な分析が可能である。

LC/MS/MSにより定量を行うため、それぞれの物質に対してプリカーサーイオンとプロダクトイオンの組み合わせの検討を Prominence Series と API3200 を用いて行った。結果を Table. 2 に示す。metanephrine と DOPA のようにプリカーサーイオンにおいては同じ m/z で検出されるイオンにおいてプロダクトイオンについてはそれぞれの構造を反映した値（metanephrine：180.3 と 148.1、DOPA：181.2 と 152.1）になっており 2 つを区別し選択的な定量が可能となった。こちらの MS においてもカルボン酸をもつ物質は先ほどの結果と同様に、ESI ではネガティブモードで、APCI においてはポジティブモードで検出が可能であった。

さらにこれらのイオン組み合わせの検証により LC/MS/MS、MRMモードによる検量線の作成及び検出限界・定量限界の検証を行った。その結果を Table. 3 に示す。ESI と APCI を比較してみると、まず検出限界においては HVA 以外の物質について ESI の方が良好であった。さらに検出限界以上の定量性については、ESI では全てが相関係数 0.99 以上となったのに対し、APCI においては dopamine、DOPA、DOPAC、HVA のようにイオン化効率の低い物質においては良好な直線性が得られなかった。以上より、カテコールアミン類のような極性の官能基を持つ分析対象に対しては ESI の方が適していると考えられる。

さて生体試料の LC/MS 分析の際には前処理やイオン化のばらつきを補正するため内標準物質を使用する。安定同位体標識された物質は、前処理における挙動も MS におけるイオン化も分析対象と一致するため汎用される。そこで今回の分析においても安定同位体標識体である d4-Dpmamine、d6-Epinephrine、d3-DOPA、13C6-VMA、d2-HVA（プリカーサーイオンとプロダクトイオンの組み合わせは Table. 4）を内標準物質として用い、前処理やイオン化の補正を行った。内標準物質による補正後の検量線を Table. 5 に示す。ほとんどの物質においては相関係数の改善が見られ、定量範囲の上限が上昇した。しかしながら normetanephrine や metanephrine においては相関係数の改善が見られなかった。これは同じ構造をもつ内標準物質を使用していないことが原因と考えられる。これに関しては現在使用している内標準物質をうまく利用すること、または新たな内標準物質の検討を行う等の手法によりさらなる定量性の改善を行っていく。

1-3. LC/MS/MS の精度管理への応用

LC/MS/MS 分析では、プリカーサーイオンで物質を選択し、更にプロダクトイオンでも物質の選択を行うため、より選択的かつ正確な定量が可能である。財団法人日本公衆衛生協会スクリーニング精度管理センターの鈴木先生の依頼により LC/MS/MS を用いた精度管理用試料の値付けを行った。精度管理用試料は VMA、HVA、クレアチニンの混合溶液である。まず VMA と HVA については検量線の範囲を 1、

	ESI			APCI		
	検出限界 (ng/mL)	R ²	定量範囲 (ng/mL)	検出限界 (ng/mL)	R ²	定量範囲 (ng/mL)
norepinephrine	50	0.9991	50-10000	200	0.9936	200-20000
epinephrine	50	0.9993	50-10000	50	0.9933	50-20000
normetanephrine	2	0.9956	2-10000	<1	0.9998	1-20000
dopamine	10	0.9962	10-10000	10	0.9784	10-20000
metanephrine	2	0.9949	2-1000	10	0.9999	10-20000
DOPA	100	0.9969	100-20000	2000	0.9863	2000-20000
VMA	10	0.9992	10-20000	10	0.9969	10-20000
DOPAC	500	0.9971	500-20000	500	0.9758	500-20000
HVA	1000	0.9992	1000-10000	<1	0.9897	1-5000

Table. 3 LC/MS/MS, MRMモードによる検出限界・定量限界の検証

	ESI			APCI				ESI			APCI		
	mode	Q1	Q3	mode	Q1	Q3		mode	Q1	Q3	mode	Q1	Q3
d ₆ -epinephrine	+	172.2	53.1	+	172.2	53.1	¹³ C ₆ -VMA	-	203.0	142.8	+	187.1	99.2
	+	172.2	80.9	+	172.2	80.9		-	203.0	144.0	+	187.1	70.2
d ₄ -dopamine	+	158.4	141.0	+	158.4	141.0	d ₂ -HVA	-	183.0	139.1	+	185.1	139.1
	+	158.4	95.2	+	158.4	95.2		-	183.0	123.8	+	185.1	96.1
d ₅ -DOPA	+	201.0	183.1	+	201.0	183.1							
	+	201.0	183.8	+	201.0	183.8							

Table. 4 内標準物質におけるQ1（プレカーサーイオン）とQ3（プロダクトイオン）の組み合わせ

	ESI		APCI	
	R ²	定量範囲 (ng/mL)	R ²	定量範囲 (ng/mL)
norepinephrine/d-epinephrine	0.9978	50-20000	0.9985	200-20000
epinephrine/d-epinephrine	0.9994	50-20000	0.9948	50-20000
normetanephrine/d-epinephrine	0.9943	2-20000	0.9162	1-10000
dopamine/d-dopamine	0.9976	10-20000	0.9945	10-20000
metanephrine/d-epinephrine	0.9658	2-20000	0.8979	10-20000
DOPA/d-DOPA	0.9986	100-20000	0.998	2000-20000
VMA/C-VMA	0.9975	10-20000	0.9978	10-20000
DOPAC/d-HVA	0.9992	1000-10000	0.9869	500-5000
HVA/d-HVA	0.9996	1000-20000	0.9981	1-20000

Table. 5 LC/MS/MS, MRMモード, 内標準物質による補正による定量限界の検証

2, 5, 10, 20 μg/mLとし、さらに内標準物質を¹³C₆-VMA, d₂-HVAを2μg/mLとなるように添加しn=5で実験を行った。結果は

VMA : $y=0.4304x+0.0449$ R²=0.9999

HVA : $y=0.6377x-0.0388$ R²=0.9999

であった。この検量線を用いて精度管理用試料を測定したところ、VMA : 9.97μg/mL (n=5, SD=0.034)、HVA : 14.83μg/mL (n=5, SD=0.128) と想定値 VMA : 10μg/mL、HVA : 15μg/mL にほぼ一致した。

次にクレアチニンについては検量線の範囲を20, 50, 100, 200, 500, 1000μg/mLとし、さらに内標準物質であるd-クレアチニンを50μg/mLとなるように添加しn=5で実験を行った。結果は $y=0.024x-0.0033$, R²=0.9999であった。この検量線を用いて精度管理用試料を測定したところ、298.4μg/mL (n=5, SD=2.41) と想定値300μg/mLにほぼ一致した。現

在この試料を用いた精度管理が進められているとの事であり、その結果が待たれる。

2. 尿中カテコールアミン一斉分析の為の前処理濃縮法の確立

2-1. 生尿試料に対する前処理法の確立

尿試料をLC/MS/MS分析にかけるためには、イオン化を妨害する電解質やイオン性の物質の除去及び標的物質の濃縮が必要となる。カテコールアミン類がベンゼン環やカルボキシル基などの疎水性基とアミノ基のような陽イオン基を持つ点に着目し、陽イオン交換-逆相ミックスモード樹脂であるOasis MCX (Fig. 1)を用いることとした。

前処理の流れとしては、尿試料100μLをカラムに添加し、1%ギ酸溶液を3分間流すことにより電解質やイオン性の物質の除去を行った。3分後に移動相を2M HCOONH₄ buffer (pH3) : ACN=20 :

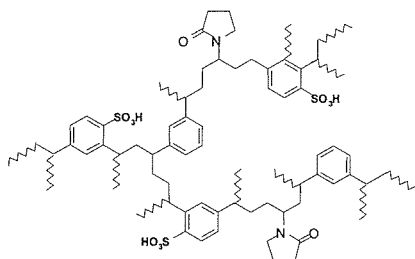


Fig. 1 Oasis MCX 樹脂の構造

80に変更することによりカラム内に保持されていたカテコールアミン類を溶出させた。この溶液を蒸発乾固し、再溶解し分析に用いる。LC/MSによりこの前処理の再現性について検証した結果を Table. 6に示す。epinephrine及びdopamineにおいてC.V.値が5%を超えてしまったものの、そのほかの物質においては5%以下と良好な再現性を得ることができた。

	C.V.(%)		C.V.(%)
norepinephrine	3.9	DOPA	4.9
epinephrine	5.8	VMA	4.7
normetanephrine	2.7	DOPAC	3.4
dopamine	5.3	HVA	3.1
metanephrine	3.9		

Table. 6 前処理におけるばらつき

2-2. LC/MSによる生尿試料の分析

2-1により確立した前処理法を用い、カテコールアミン類添加尿試料をLC/MS分析にかけた結果をFig. 2に示す。LCのクロマトグラム(a)においては尿中の夾雑物質がかなり検出されており、カテコールアミン類を同定することは困難であった。MSのTIC(b)においても同様であった。しかしながらMSクロマトグラムにおいては、各物質をピークとして検出することができ、尿中のたくさんの物質の中から各成分の同定が可能であった。

2-3. LC/MS/MSによる尿試料の分析

2-2の分析と同様に、カテコールアミン添加尿を試料とし、LC/MS/MS、MRMモードによる検量線の作成を試みた。MRMモードでのQ1/Q3の検出の値はTable. 2及び4の値を用いた。内標準物質で補正し、作成した検量線についてTable. 7に示す。標準物質での結果とは異なり、全ての物質につい

てAPCIの方が検出限界も低く、定量範囲が広いという結果になった。更に直線性に関して、APCIの方が良好な直線性を得ることができた。またESIのnorepinephrineにおいては、もともとイオン化効率の悪い物質であった上に、同時に大量の物質が溶出されているため、ほとんどイオンが検出されなかった。これらの結果は尿中にはカテコールアミン類以上に極性の高い物質が多く、ESIではそれらが優先的にイオン化してしまうため、カテコールアミン類のイオン化が抑制されてしまっており、逆にAPCIではそれら極性の高い物質のイオン化があまり起こらないために、カテコールアミン類を感度良く検出できたのではないかと考えられる。以上の実験より尿中のカテコールアミン類の定量にはAPCIが適しているといえる。

3. 血液中カテコールアミン一斉分析の為の前処理濃縮法確立及び新規マーカー検索

3-1. 血清試料に対する前処理法の確立

血清からのカテコールアミン類を含む低分子の抽出においては、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。そこで内面逆相カラム(TSK precolumn, BSA-ODS, T0219, 東ソー(株))及び内面陽イオン交換カラム(MF-SCX, SHISEIDO)(Fig. 3)を用いた血清直接注入による分析を試みた。どちらのカラムにおいても多孔性樹脂の表面が親水性にコートされているため、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、表面とも相互作用できないため、カラムに保持されることなく素通りしていく。これに対して低分子は孔の内部に入り込むことができるため、それぞれの修飾に応じた物質の保持がおこる。内面逆相カラムでは孔内部のODSにより脂溶性の高い物質(カテコールアミン類であればカルボキシル基をもつVMA, DOPAC, HVA)を保持する。これに対して内面陽イオン交換カラムでは、内部に陽イオン交換基が修飾されているため陽イオン性の物質(カテコールアミン類のうちアミノ基を持つnorepinephrine, epinephrine, dopamine, normetanephrine, metanephrine, DOPA)を保持する。

今回の実験では、血清試料100μLをカラムに添

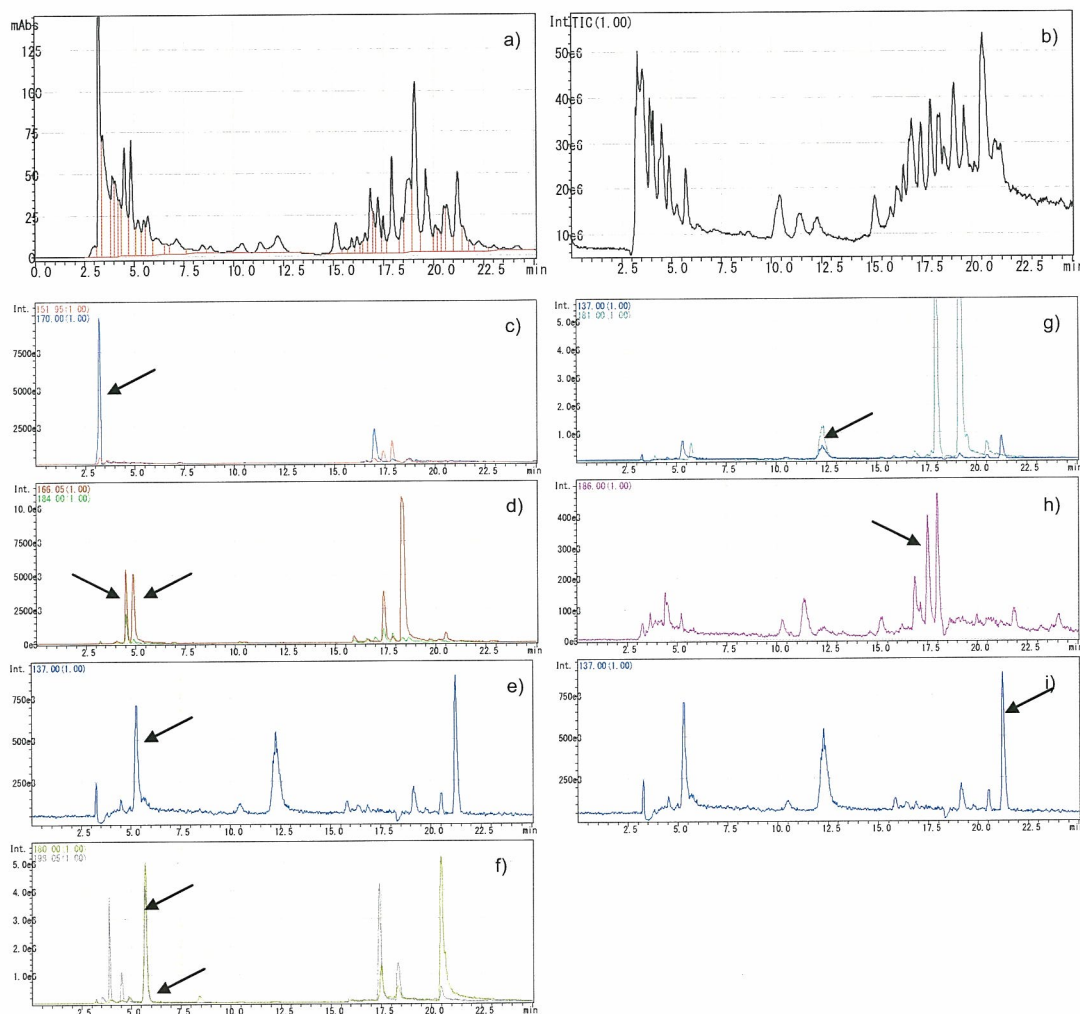


Fig. 4 カテコールアミン類添加血清の LC/MS 分析の結果

a) LCクロマトグラム, b) MS の TIC, c) Norepinehrine の XIC (m/z152, 170), d) Epinephrine (左) 及び Normetanephrine (右) の XIC (m/z166, 184) e) Dopamine の XIC (m/z137, 154), f) Metanephrine (左) 及び DOPA (右) の XIC (m/z180, 198) g)VMA の XIC (m/z137, 181) h) DOPAC の XIC (m/z123, 186)

	ESI			APCI		
	検出限界 (ng/mL)	R ²	定量範囲 (ng/mL)	検出限界 (ng/mL)	R ²	定量範囲 (ng/mL)
norepinephrine/d-epinephrine				200	0.9988	500-20000
epinephrine/d-epinephrine	500	0.9601	500-10000	<100	0.9906	100-10000
normetanephrine/d-epinephrine	<100	0.9397	500-5000	<100	0.9998	100-20000
dopamine/d-dopamine	<100	0.9885	100-10000	<100	0.9974	100-10000
metanephrine/d-epinephrine	<100	0.9159	100-1000	<100	0.9998	100-20000
DOPA/d-DOPA	200	0.9903	500-10000	<100	0.9942	100-10000
VMA/C-VMA	<100	0.9923	200-20000	<100	0.9955	100-10000
DOPAC/d-HVA	<100	0.9933	200-2000	<100	0.992	100-20000
HVA/d-HVA	<100	0.9695	2000-20000	<100	0.9915	100-20000

Table. 7 カテコールアミン添加尿における検量線 (LC/MS/MS, MRMモード)

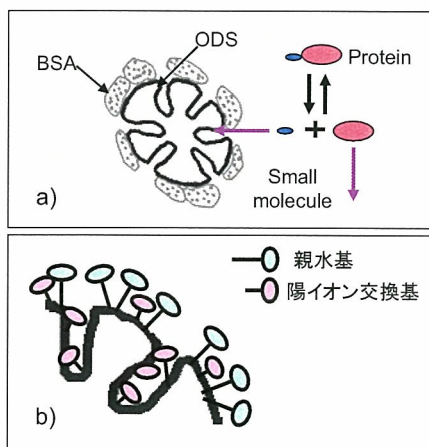


Fig. 3 a) 内面逆相カラムの原理
b) 内面陽イオン交換カラムの原理

加し、1%ギ酸溶液を4分間流すことによりタンパク質の除去を行った。さらに4分後に移動相を内面逆相カラムについては1 M NH_4HCO_3 buffer (pH 10.9) : ACN=5 : 95、内面陽イオン交換カラムについては3.6 M HCOONH_4 buffer (pH 3) :

	C.V.(%)		C.V. (%)
norepinephrine	5.5	DOPA	4.1
epinephrine	2.8	VMA	3.3
normetanephrine	2.3	DOPAC	1.7
dopamine	4.0	HVA	2.3
metanephrine	2.0		

Table. 8 前処理におけるばらつき

ACN=50 : 50に変更することによりカラム内に保持されていたカテコールアミン類を溶出させた。これらの溶液を回収、蒸発乾固した後、再溶解し分析に用いた。

LC/MSによりこの前処理の再現性について検証した結果をTable. 8に示す。NorepinephrineにおいてC.V.値が5%を超えてしまったもののほかの物質においては5%以下と良好な再現性を得ることができた。

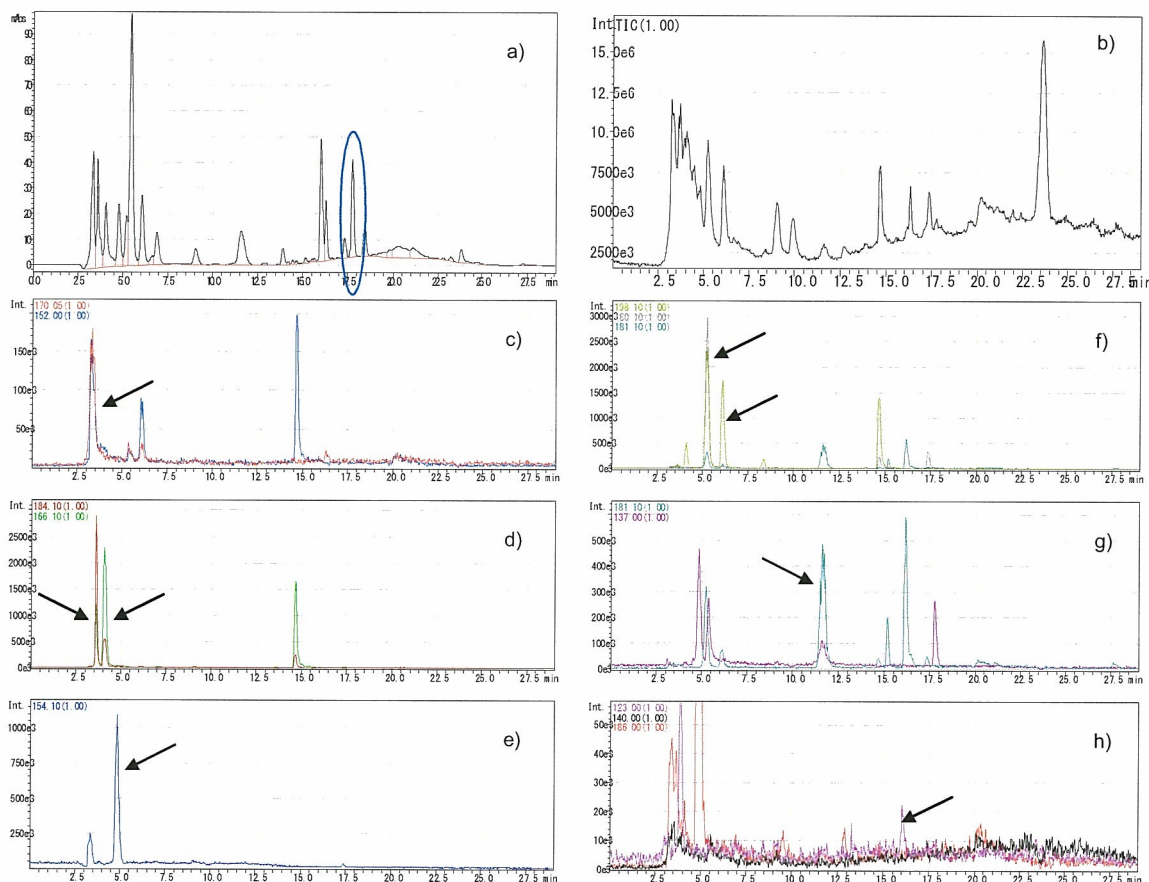


Fig. 4 カテコールアミン類添加血清のLC/MS分析の結果

a) LCクロマトグラム, b) MSのTIC, c) NorepinephrineのXIC (m/z152, 170), d) Epinephrine (左) 及び Normetanephrine (右)のXIC (m/z166, 184) e) DopamineのXIC (m/z137, 154), f) Metanephrine (左) 及び DOPA (右)のXIC (m/z180, 198) g) VMAのXIC (m/z137, 181) h) DOPACのXIC (m/z123, 186)

3-2. LC/MS によるカテコールアミン添加血清試料の分析

尿の実験と同様に3-1により確立した前処理法を用い、カテコールアミン類を添加した血清をLC/MS分析にかけた結果をFig. 4に示す。LCのクロマトグラム(a)においてはカテコールアミン類のピークのいくつかは確認することができた。しかし正確に同定することは困難であった。MSのTIC(b)においては夾雑物質の影響で確認は困難であった。これに対してMSクロマトグラムにおいては、各物質をピークとして検出することができ、血清中のたくさんの物質の中から各成分の同定が可能であった。今回の実験は1-2の実験と同様にLCMS2010を用いたためHVAは検出できなかった。しかしながらLCの保持時間から考えるとFig. 4-a)の青く囲ったピークがHVAと判断できるので、HVAも回収されていると判断した。MSではピークの小さいDOPACについてもLCでは検出できていることから、今回確立した手法はすべてのカテコールアミン類に対して有効であると言える。

3-3. LC/MS/MS による血清試料の定量分析

3-2の分析と同様に、カテコールアミン添加血清を試料とし、LC/MS/MS、MRMモードによる検量線の作成を試みた。MRMモードでのQ1/Q3の検出の値はTable. 2及び4の値を用いた。内標準物質で補正し、作成した検量線についてTable. 9に示す。尿分析の結果と同様に、全ての物質につい

てAPCIの方が検出限界も低く、定量範囲が広いという結果になった。更に直線性に関しても、APCIの方が良好な直線性を得ることができた。これはAPCIでのイオン化により、イオン化される物質が限定され、カテコールアミン類のイオン化への影響がESIよりも低かったのではないかと考えられる。2-3, 3-3の実験より生体試料中のカテコールアミン類の定量にはAPCIが適しているといえる。

3-4. LC/MS/MS による神経芽細胞腫患者血清中低分子の解析

以上により確立した血清中低分子の一斉分析法を用い、患者血清の分析及びその解析を行った。今回用いた検体は全部で28検体、広島及び京都で保存されていた検体であり病期等の情報のついたものである。またコントロール試料としては、小児リュウマチの患者の血清を用いている。

患者血清の分析により得られたLCクロマトグラム及びMSクロマトグラムをFig. 5に示す。LCにおいては比較的早い時間（極性の高い物質が溶出する領域）に大きなピークが2つ、遅い時間（極性の低い物質が溶出する領域）に小さなピークが数多く検出されているのがわかる。ほとんどのピークにおいてピークの幅が比較的広いことから1つのピークの中にいくつかの物質が含まれていると考えられる。MS分析結果よりどのような物質が検出されているか抽出してみたところ、約250種の物質を抽出できた。

	ESI			APCI		
	検出限界 (ng/mL)	R ²	定量範囲 (ng/mL)	検出限界 (ng/mL)	R ²	定量範囲 (ng/mL)
norepinephrine/d-epinephrine	200	0.9934	200-5000	5	0.9986	5-2000
epinephrine/d-epinephrine	< 1	0.9996	1-2000	< 1	0.9971	1-5000
normetanephrine/d-epinephrine	< 1	0.9969	1-200	< 1	0.9992	1-5000
dopamine/d-dopamine	5(1)	0.9959	5-5000	< 1	0.9973	1-5000
metanephrine/d-epinephrine	< 1	0.9805	1-200	< 1	0.9974	1-5000
DOPA/d-DOPA	< 1	0.9899	1-5000	5	0.9886	5-5000
VMA/C-VMA	< 1	0.9997	1-5000	< 1	0.995	1-5000
DOPAC/d-HVA	50	0.9963	50-5000	10	0.9949	10-5000
HVA/d-HVA	10	0.9971	10-5000	5	0.9947	5-5000

Table. 9 カテコールアミン添加尿における検量線 (LC/MS/MS, MRM モード)

これらの物質の変化・物質のパターンにより、予後やタイプの分類ができないかと考え、3次元のグラフ化を行った。結果がFig. 6, 7である。コントロール血清 (Fig. 6-a) と本邦分類 I 期 (Fig. 6-b) の結果を比較すると、ほぼ似た形状をしている。しかし本邦分類 I 期ではグラフの左側 (m/z が小さく、溶出が早い物質) 及びグラフの右側 (m/z が大きく、溶出が遅い物質) の群が検出されていないなどの相違点も見られる。更に本邦分類 III 期 (Fig. 6-c) の結果に関しては、コントロール血清と本邦分類 I 期では似たパターンであったグラフの奥側 (m/z が小さく、溶出が遅い物質) に関しても大きく異なっていた。しかしながら本邦分類 IV 期 (Fig. 7-a,b) を比較してみると同じ病期にもかかわらず、大きくパターンが異なっている。Fig. 7-b に関してはコントロールと似たパターンとなっており、3次元の解析のみで病期やタイプの判別は困難であると言える。

そこで MakerView という MS 専用の統計解析ソフトを用いて解析を行うこととした。このソフトは MS 分析の結果から検出されたピークを自動的に抽出し、グループ間で t 検定を行うことにより有意差のある物質を検索するソフトである。本邦分類 I 期とコントロール血清間で t 検定を行った結果を Fig. 8 に示す。a) は t 検定の結果、b) は 12.7 分、m/z 204.2 のピークで t 値が 99.8291、c) は 18.0 分、m/z 152.0、のピークで t 値は 99.7307、d) 31.6 分、m/z 279.2 のピークで t 値は 99.2848 である。いくつ

かの検体において検出されていないもののコントロールでは全く検出されておらず、これらの物質が本邦分類 I 期のマーカーになりうると考えられる。また本邦分類 IV A 期と本邦病期 I 期間の t 検定の結果においては Fig. 9 で示すとおり b) 23.3 分、m/z 281.1, t 値 98.2689, c) 35.6 分、m/z 217.1, t 値 97.9748, d) 29.0 分、m/z 195.2, t 値 97.8676 などの物質に差が見られた。しかし本邦病期 I 期では全く検出されず、本邦分類 IV A 期でカウントが高い物質など、どちらかの病期に特異的な物質がほとんどなく、病期分類が可能なマーカーの候補を発見することはできなかった。

さらに本邦分類 IV A 期とコントロールについて t 検定を行った。15 の物質において t 値が 99 を越え有意な差が見られたが、このうちより t 値の高い 26.2 分の m/z 475.6 のピーク、12.0 分の m/z 204.2 のピーク、10.8 分の m/z 243.0 のピーク、7.2 分の m/z 333.2 のピークに関して Fig. 10 から 13 に示す。

まず、26.2 分の m/z 475.6 のピークに関しては Fig. 10-a) に t 検定の結果、b) に m/z 475.6 の MS クロマトグラム、c) に MS スペクトルを示した。これを拡大してみると d) のようになり、m/z 475.6 は 3 価のイオンであることが分かる。また e) のように m/z 356.9 に 4 価のイオンも見られており、MW 1423.8 のペプチドであると考えられる。これ以外の 12.0 分の m/z 204.2 のピーク (Fig. 11)、10.8 分の m/z 243.0 のピーク (Fig. 12)、7.2 分の m/z 333.2 (Fig. 13) のピークに関してはすべて 1 価の低分子化合物

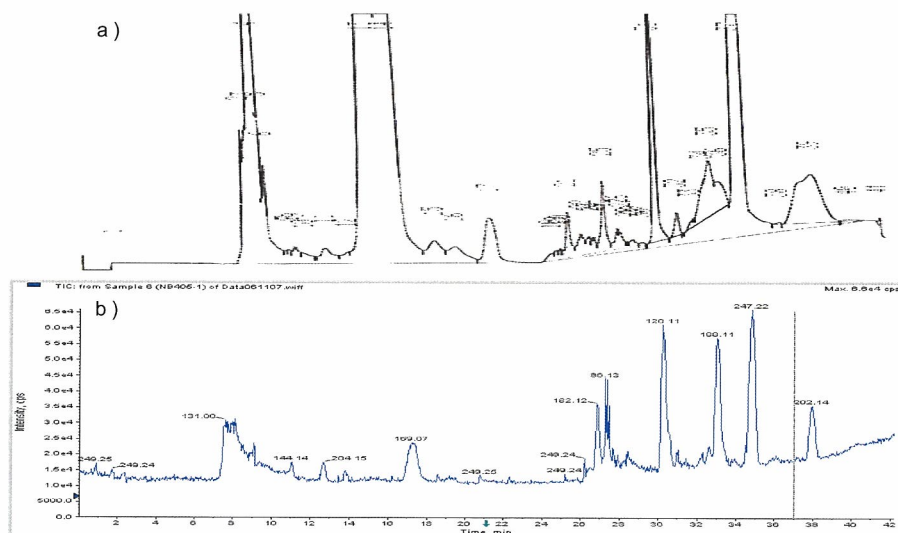


Fig. 5 患者血清分析の結果 a) LC クロマトグラム, b) MS クロマトグラム

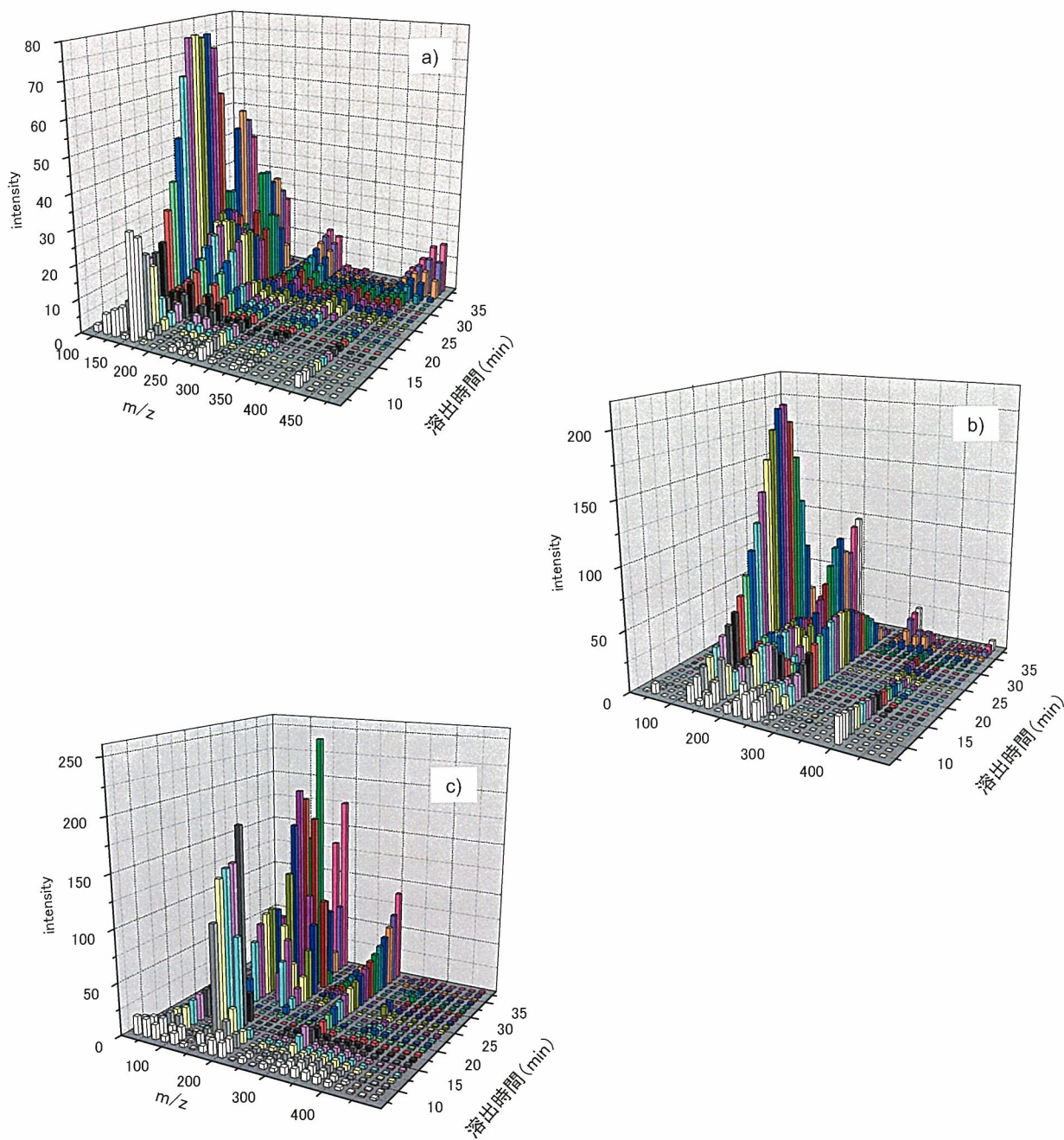


Fig. 6 患者血清分析の3次元解析 a) コントロール血清, b) 本邦分類Iの患者血清, c) 本邦分類IIIの患者血清

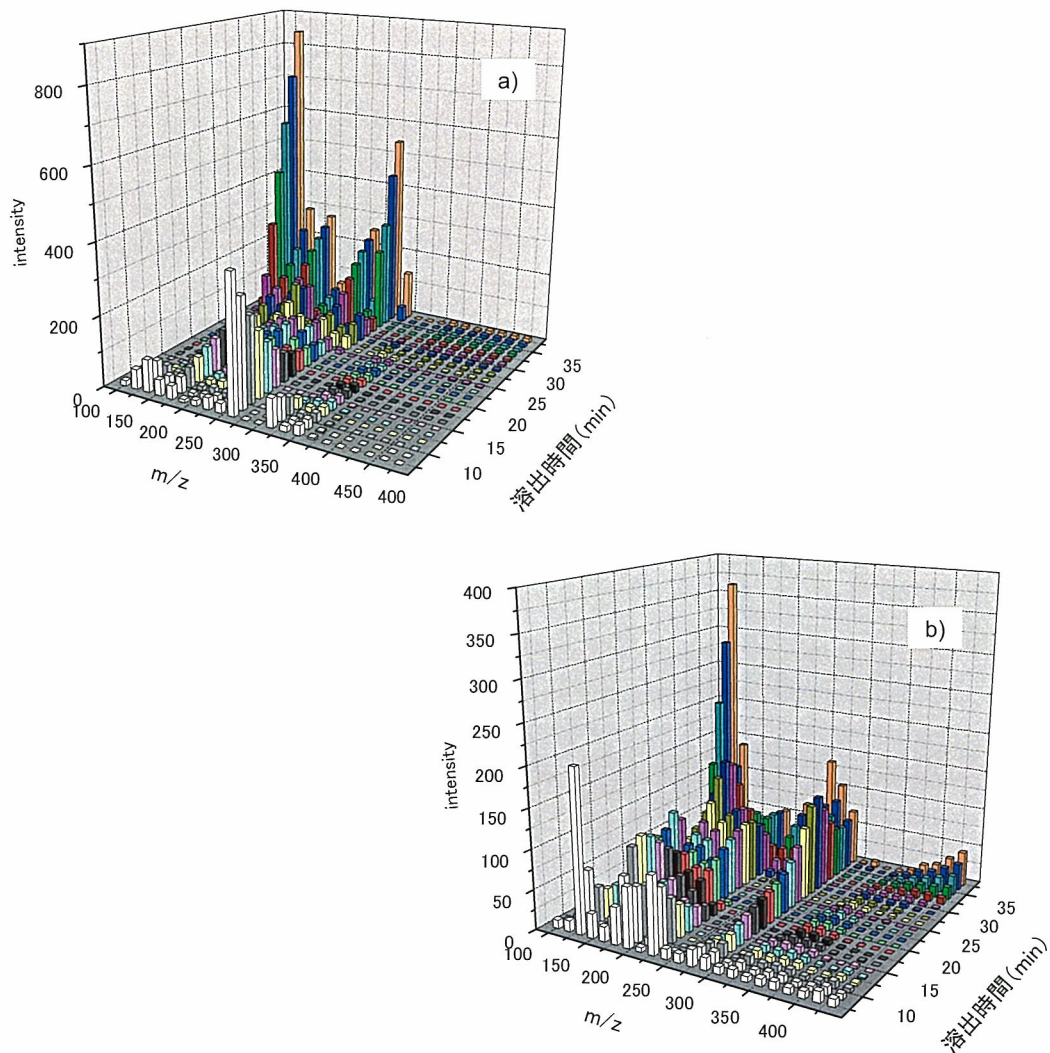


Fig. 7 患者血清分析の3次元解析 a) 本邦分類IV A の患者血清, b) 本邦分類IV A の患者血清

であった。これらの物質について本邦分類 I 期とコントロールで t 検定を行った結果及び本邦分類 IV A 期と本邦分類 I 期で t 検定を行った結果を Fig. 14 及び 15 に、これらの t 値をまとめたものを Table. 10 に示す。本邦分類 I 期の検体の中には、これらの物質が検出されない検体もあったものの、本邦分類 I 期とコントロールにおいても t 値が 90 以上となり、これらが神経芽細胞腫特異的な物質であることが考えられる。しかしながら本邦分類 IV A 期と本邦分類 I 期で t 検定を行った結果では、有意な差が見ら

れなかったため予後に関わる物質ではないと判断できる。しかしながら各病期の検体が 7 例程度とまだ例数が少なく、患者間のばらつきが大きく出ており、微量の変化が見えていない可能性が考えられる。現在、この解析で発見したマーカー候補 6.2 分の m/z 475.6 のピーク、12.0 分の m/z 204.2 のピーク、10.8 分の m/z 243.0 のピーク、7.2 分の m/z 333.2 のピークに関して構造解析を進めるとともに、例数を増やし解析を行っていく予定である。

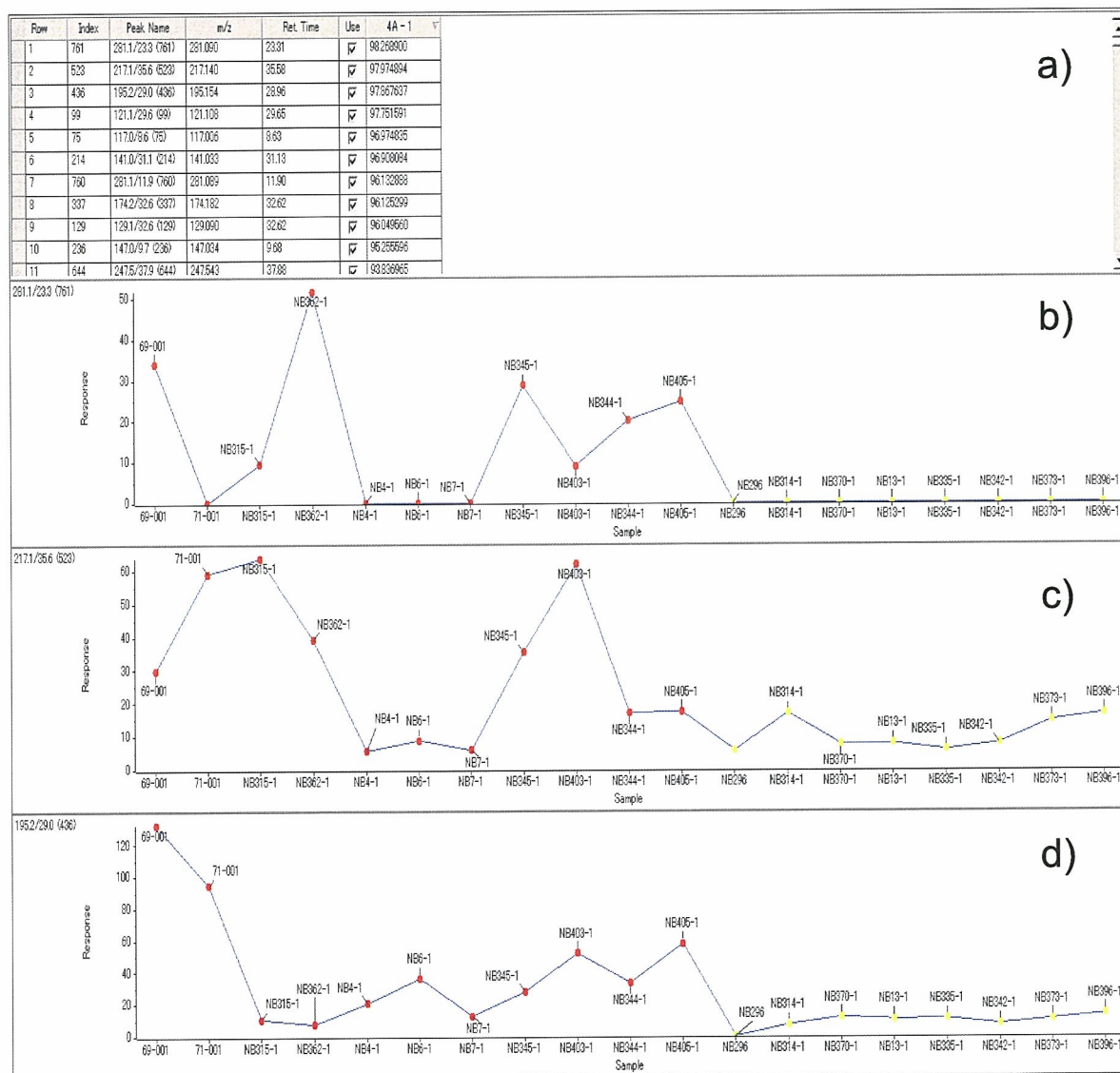


Fig. 8 患者血清分析の MakerView 解析 IV A 期患者血清 (赤) と I 期患者血清 (黄) 間の t 検定の結果 a) t 検定の結果, b) 23.3 分, m/z281.1, t 値 98.2689, c) 35.6 分, m/z217.1, t 値 97.9748, d) 29.0 分, m/z195.2, t 値 97.8676 各検体におけるそれぞれの物質の推移

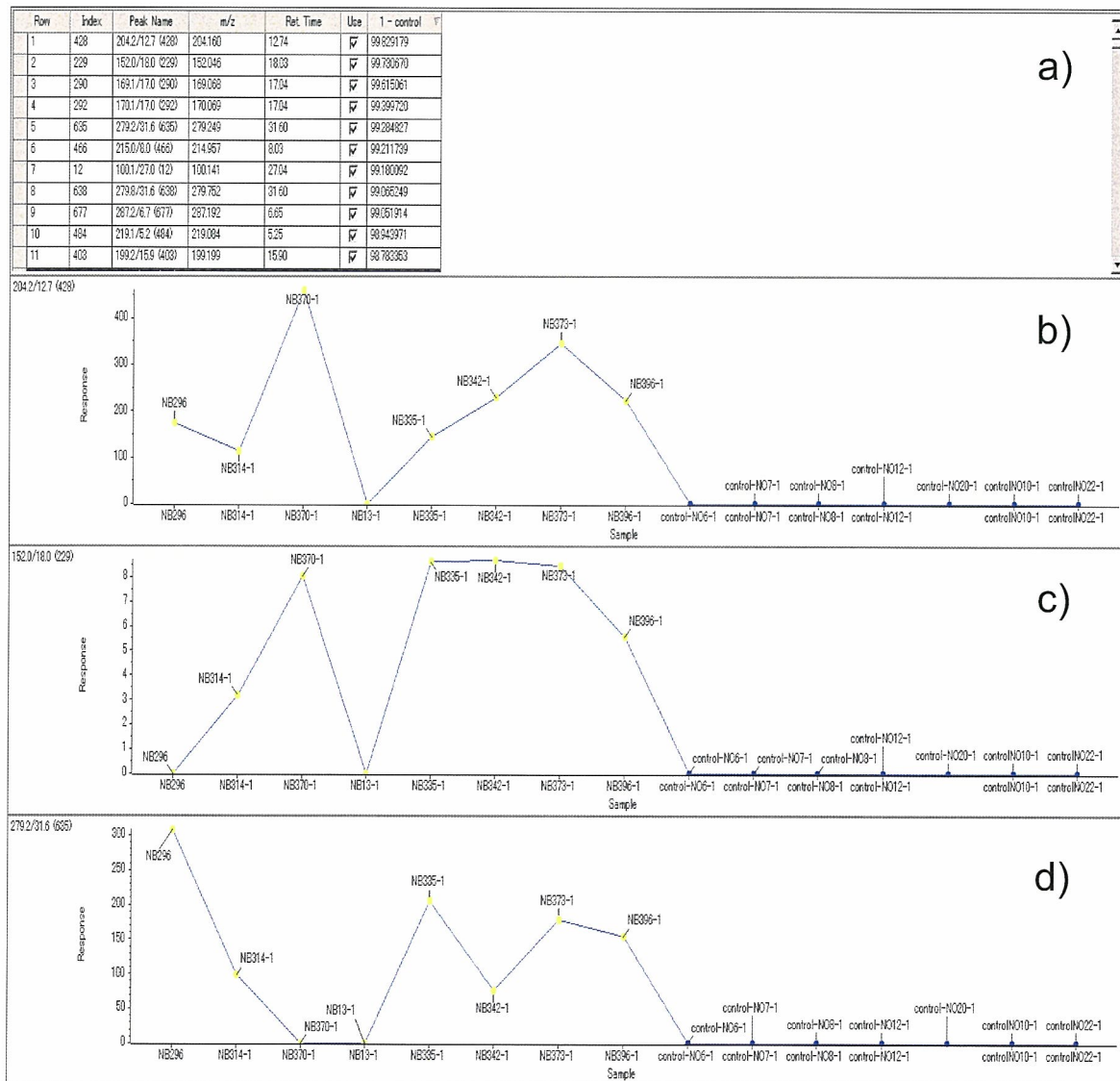


Fig. 9 患者血清分析のMakerView解析 I期患者血清（黄）とコントロール血清（青）間のt検定の結果 a) t検定の結果, b) 12.7分, m/z204.2, t値 99.8291, c) 18.0分, m/z152.0, t値 99.7307, d) 31.6分, m/z279.2, t値 99.2848 各検体におけるそれぞれの物質の推移

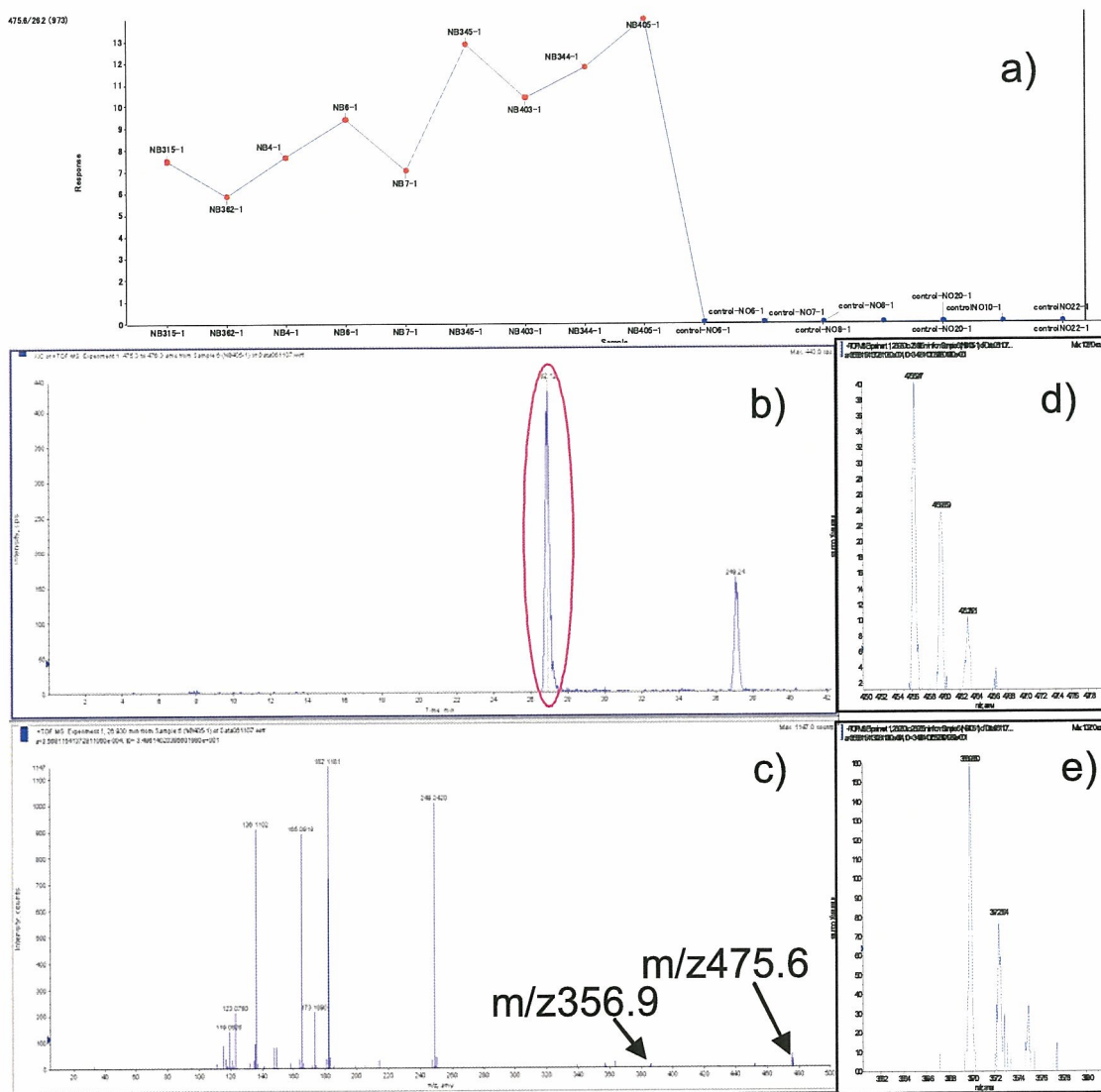


Fig. 10 患者血清分析のMakerView解析 IV A期患者血清(赤)とコントロール血清(青)間で有意な差が見られた物質(26.2分のm/z475.6のピーク)
 a) t検定の結果, b) m/z475.6のMSクロマトグラム, c) MSスペクトル, d) m/z475.6のMSスペクトル(3価), e) m/z356.9のMSスペクトル(4価)

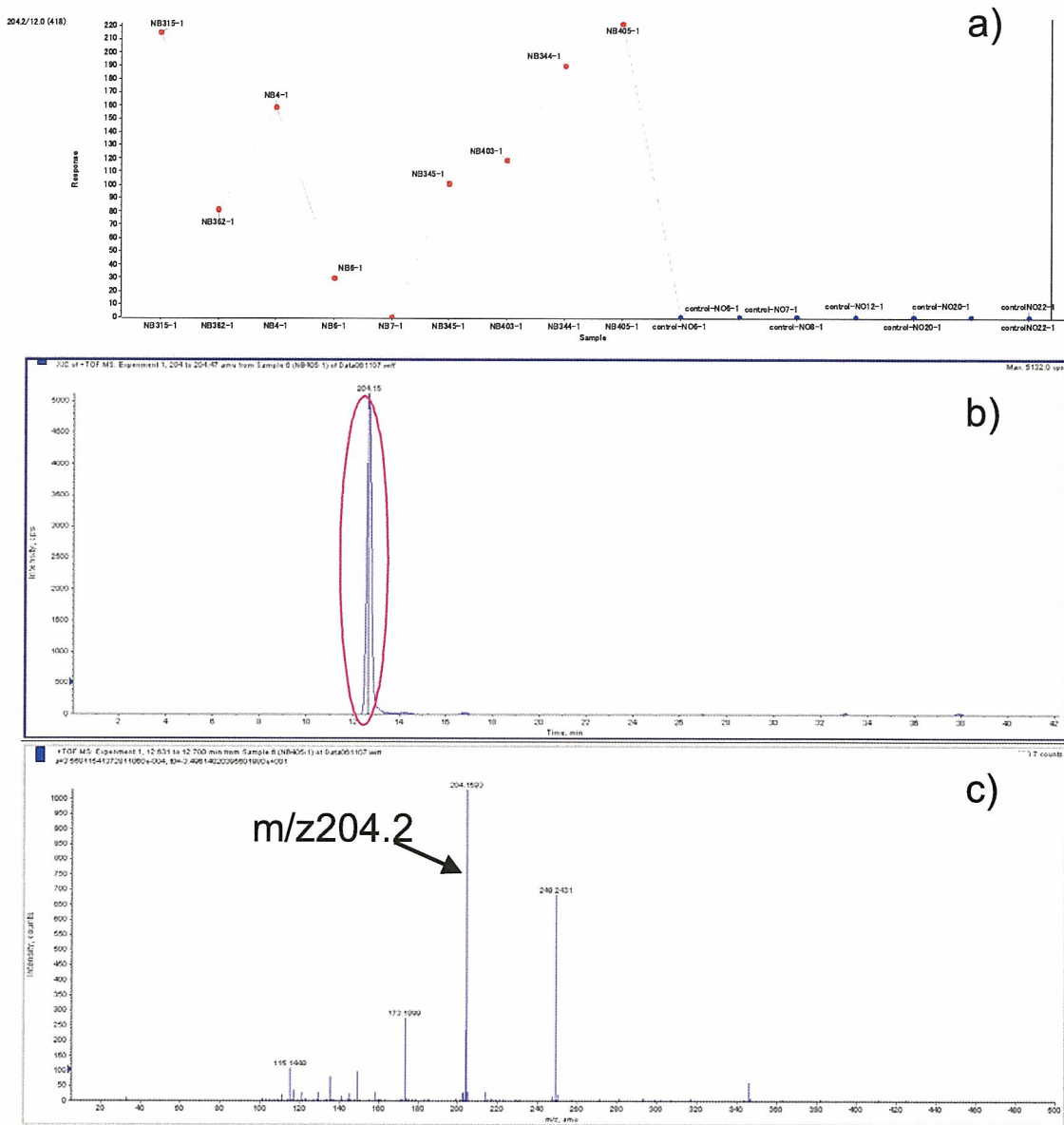


Fig. 11 患者血清分析のMakerView解析 IV A 期患者血清（赤）とコントロール血清（青）間で有意な差が見られた物質（12.0 分の m/z204.2 のピーク）

a) t 検定の結果, b) m/z204.2 の MS クロマトグラム, c) MS スペクトル