

血漿中の遊離アミノ酸プロファイルを活用した新規疾病リスク評価法の開発



味の素株式会社

はじめに

近年、生体内の代謝物の網羅的な測定、所謂、メタボロミクス手法の発展に伴い新たなバイオマーカーに関する報告が活発している。一方、代謝物測定に基づく診断マーカーの実用化は、血液に代表される臨床検体中の代謝物の不安定性や、膨大な臨床データから病態を再現性良く判別するための数理モデルの構築などの課題があり、それらを克服し臨床実用まで至った技術は殆どない。そうしたなか、本研究では、代謝物のなかでもアミノ酸やアミンに着目し、1) 血液サンプルの安定化技術の開発、2) LC/MS法を用いた高速アミノ酸分析法の開発、更には3) 大規模臨床データの集積とともに数理モデルの開発を通じて、病態リスクの評価のための診断マーカーの開発を試みた。これまで、血液、尿、或いは脳脊髄液中の遊離アミノ酸濃度は、先天性代謝異常や肝硬変などの患者に対する臨床検査法として極めて限定的に利用されるに留まっていた。そうしたなか、本研究では、生体内のアミノ酸プールの変動、とりわけ、血液中のアミノ酸濃度は、ある特定の生理条件下において様々な代謝的要因が加わった結果として生じている動的平衡状態の表現型であり、全身の代謝活動をトータルで表す有益なメタボロミクス・サブセットと捉え、広くその診断用途の拡大を図ることとした。具体的には、種々の病態生理的条件、或いは負荷条件下で血中アミノ酸プロファイルを集集し、生体内のアミノ酸プロファイルの変動と生理状態との相関を各種病態モデル動物に加え、臨床的にも評価を重ねた<sup>1)</sup>。以下に、本研究による新規疾病リスク評価法の基盤を成す各要素技術に係る業績の概要を説明する。

1. 血液検体中アミノ酸濃度の安定化デバイスの開発

上述の通り、代謝物診断の臨床実用の課題として、臨床検体における代謝物の不安定性が挙げられる。アミノ酸測定においても、血液には血球やタンパク質が多量に含まれているため、採血後に速やかに冷却を行わない限り、生体内濃度の分布から大きく逸脱する。血漿化し凍結することで血漿中のアミノ酸濃度は安定化できるため、採血後、血漿分離前の検体を冷却することが必須となる。しかしながら、実際の臨床現場では採血後に全血から血漿を速やかに分離するのは困難である。従って、採血して直ちに検体を4℃程度まで冷却することが必要となる。通常、実験室などではこのような冷却には氷水を使うのが容易且つ最適であるが、採血現場に氷水を導入するのは容易ではない。そこで、本研究では小型で複数の検体を同時に氷水とほぼ同等の冷却速度で、約10時間と長時間冷却可能なデバイスの開発に成功し、効率よく均質な血漿サンプルを収集することを可能とした。当該デバイスによる検体冷却法は氷冷法のように氷水を溢すが恐れがないことから、臨床現場では使い勝手の良い方法である。本製品は、1) 氷水に近い冷却速度を有し、2) 採血管挿入部位による温度のばらつきがなく、3) 長時間保冷が可能(0℃, 10時間)であるという3つの特徴を有する。当該成果は、特許を1件出願し、また、他社との連携で製品化され(製品名キューブクーラー®、フェルテグロー メディカル株式会社)、医療機関で広く採用されている。

2. 質量分析計を用いた高速アミノ酸分析技術の開発

従来、アミノ酸の分析は、アミノ酸を液体クロマトグラフィー(LC)により分離し、ニンヒドリンによる呈色反応で検

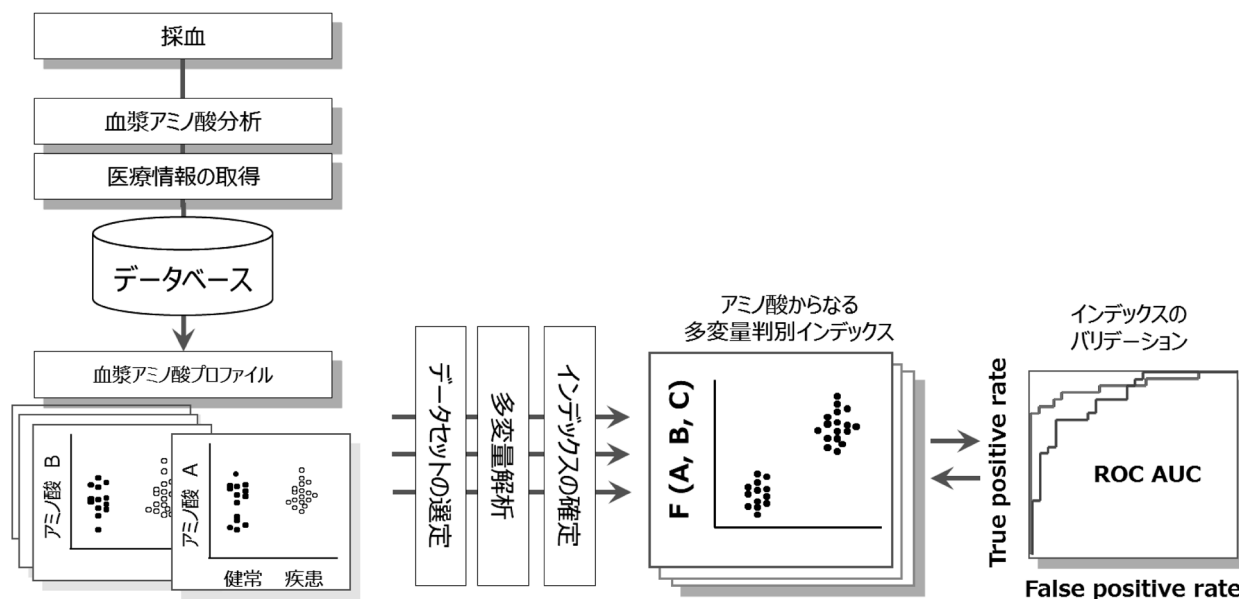


図1 血漿中の遊離アミノ酸プロファイルを活用した診断インデックスの開発

出、定量する方法が長年利用されていた。しかしながら、当該技術では1検体に2時間近く分析に要するため、精度、正確性は高いものの多数の臨床検体を測定するには不向きであり、結果としてアミノ酸分析の臨床用途を限定的なものとしていた。そこで、本研究では独自に開発した新規試薬によりアミノ酸を誘導体化し、液体クロマトグラフィー-質量分析計(LC-MS)を用いることで、1検体を10分以内の超高速分析を実現した。その際、既存方法とほぼ同等の精度、正確性で分析する革新的な技術の開発に成功した<sup>2)</sup>。

本成果により、高い臨床エビデンスを有する診断マーカーの開発に求められる数万規模の臨床検体を短時間で分析を行うことが可能とした。また、実際の臨床検査においても短時間で検査結果を報告することを可能とした。その過程でアミノ酸分析に係る特許を2件出願し、他社との共同で当該技術を搭載したアミノ酸分析装置(製品名UF-Amino Station, 株式会社島津製作所)及び試薬(製品名APDS タグ<sup>®</sup>, 和光純薬工業株式会社)の製品化に成功した。また、当該技術に係る学術論文を3報発表した。

### 3. 生物情報解析技術を活用した診断インデックスの開発

従来、アミノ酸分析が臨床検査として利用されてきた先天性代謝異常等を除き、単一のアミノ酸濃度の変動のみで、がんや生活習慣病等の特定疾患の罹患有無を判定することは困難であった。他方、多くの疾患において血中濃度が変化するアミノ酸は単一ではなく、複数のアミノ酸の血中濃度が変化することに着目し、多変量解析技術を駆使し、個々のアミノ酸の濃度変化に関する情報を統合・圧縮することで、患者群と対照群などの二群間の差異を最大化する方法を考案した。ここで、判別に係るインデックスが実用的であるためには、単純に導出用データに対して高い判別能を有するだけでなく、検査対象集団全体に対して高い判別性能を有する、即ちインデックスの頑健性が保証されていることが極めて重要となるが、当該研究においては、数理モデル作成から検証までのサンプルサイズ設計や式決定のアルゴリズムに関して、生物統計、数理統計、機械学習の技術を駆使し、臨床研究のデザインの部分から実際に実用に供するに耐えうる判別式を得るためのアルゴリズムの構築に成功した。これまで、本技術を活用し、胃がん、大腸がん、肺がん、前立腺がん、乳がん、子宮・卵巣がんの罹患リスクを評価するための多変量の数理モデルを複数の血漿アミノ酸濃度からなるインデックスとして各々開発に成功した<sup>3-4)</sup>。また、血中

アミノ酸濃度を活用し、内臓脂肪蓄積、脂肪肝、食後高インスリン血漿等の生活習慣病の罹患リスクを検査するための新たなインデックスの開発にも成功した<sup>5)</sup>。当該研究を通じて、特許を9件以上出願し、更に10報以上の学術論文を発表した。

以上の成果により、2011年4月より、胃がん、肺がん、大腸がん、前立腺がん、乳がんを対象とした「アミノインデックス<sup>®</sup>がんリスクスクリーニング」(「AICS」)が国内で発売され、全国の病院で普及拡大しつつある。また、2012年5月より、対象がん種として子宮・卵巣がんが新たに加わり、今後は、膵臓がんについても追加される予定である。加えて、生活習慣病や、近年、社会的な問題になりつつある高齢者のロコモティブシンドロームの予防に向けた栄養評価等の領域においても製品化を予定している。当該技術は、味の素株式会社がこれまで、アミノ酸の発酵生産や医薬品・臨床栄養などの事業を通じ、アミノ酸の代謝生理研究<sup>6)</sup>や分析技術を集積したことが実用化の成功要因と考える。また、臨床検体の管理、分析技術、臨床エビデンスの構築、更には、数理モデルの解析まで、多様な技術課題を、分析化学、統計学、生理学・生化学といった異なる分野の融合により構築された独創性の高い新技術により克服したものである。本技術は、日本発の代謝物診断法として様々な疾患の早期発見に資する検査法として確立するのみならず、今後は、検査後の個別化された栄養介入や治療を通じて、全く新しい予防医療や個別化医療の提案にも広く貢献することが期待される。

### 引用文献

- 1) Y. Noguchi, Q. Zhang, T. Sugimoto, Y. et al.: *Am. J. Clin. Nutr.*, **83**, 513S-519S (2006).
- 2) K. Shimbo, Y. Yahashi, K. Hirayama, M. et al.: *Anal. Chem.*, **81**, 5172-5179 (2009).
- 3) Y. Miyagi, M. Higashiyama, A. Gochi, M. et al.: *PLoS One*, **6**, e24143 (2011).
- 4) Y. Ihata, E. Miyagi, R. Numazaki, T. et al.: *Int. J. Clin. Oncol.*, **19**, 364-72 (2014).
- 5) M. Yamakado, T. Tanaka, K. Nagao, et al.: *Clinical Obesity*, **2**, 12 (2012).
- 6) Y. Luo, J. Yoneda, H. Ohmori, et al.: *Cancer Res.*, **74**, 330-340 (2014).

謝 辞 臨床データの収集に当たり、三井記念病院総合健診センター、神奈川県立がんセンター、横浜市立大学医学部をはじめ多数の医療機関の関係者の皆さまのご尽力いただきましたことを深く感謝いたします。