



Okayama University
of Science

中国地域さんさんコンソ
新技術説明会

微生物酵素利用した尿中小児がんマーカーの簡便測定法

Development of rapid diagnosis method of neuroblastoma using microbial enzyme.

岡山理科大学 理学部 生物化学科
准教授 三井 亮司



小児がん 神経芽腫

神経芽腫について

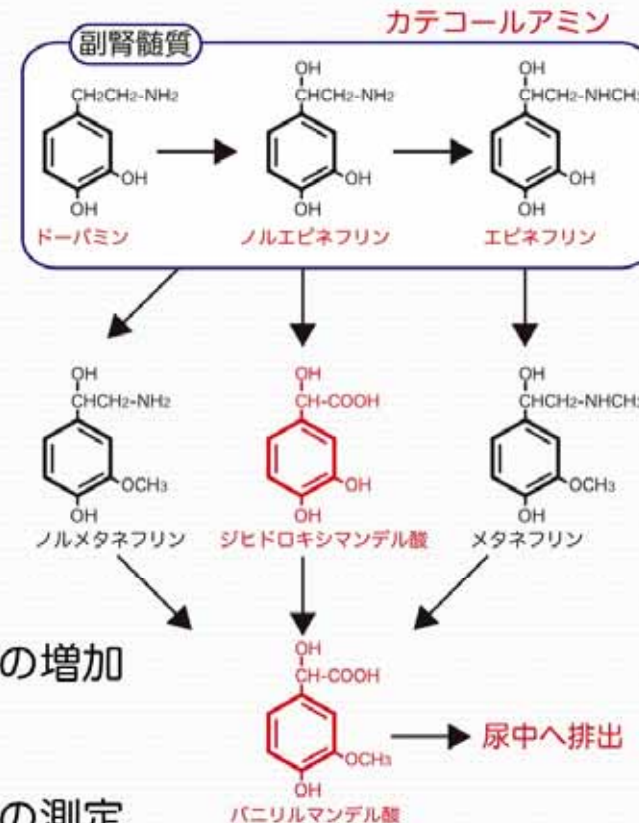
- ・白血病に次ぐ発生率の高い小児がん
- ・小児腹部腫瘍の20~50%を占める
- ・年間発生頻度は 米国で500人以上, 日本では200人以上、8.2~9.9/100万人)
- ・小児悪性腫瘍の死亡原因の15%を占める
- ・副腎や交感神経節に発症

特徴

- ・副腎髄質ホルモンや神経伝達物質の過剰産生
- ・尿中バニリルマンデル酸、ホモバニリン酸濃度の増加

検査

- ・尿中バニリルマンデル酸、ホモバニリン酸濃度の測定
- ・正常値 1.5~4.3 mg/day





Okayama University
of Science

神経芽腫マススクリーニング

生後6ヶ月児を対象としたマススクリーニング

1983年	神経芽細胞腫研修会の開催
1984年	生後6ヶ月児対象 神経芽細胞腫検査補助事業開始 (厚生省)
1989-1994年	カナダ ケベック州でマススクリーニング
1995-2000年	ドイツ 16州でマススクリーニング
2003年	<u>厚生労働省補助事業を休止</u>

休止理由

早期発見を目指して6ヶ月のスクリーニングを開始したが、1歳未満の症例の予後が一般に良く、1歳以上の症例は予後が悪い。
発見される症例は増えたが、進行した症例を減少させる効果に疑問。

厚労省検討会

「神経芽細胞腫マススクリーニング検査のあり方に関する検討会」

→簡便正確かつ高感度な新規検査法の必要性

京都府 札幌市では18ヶ月での無料マススクリーニングを実施
他自治体も有料で実施 (大阪府など)



Okayama University
of Science

従来の尿中バニリルマンデル酸の測定

高速液体クロマトグラフィー(HPLC)による測定

- 高価な装置が必要
- 多検体の測定に時間が必要 (時間)
- 有機溶媒の使用
- 前処理などの負担 (カラムに負荷をかける要因(タンパクなど) の除去)
- 頻繁に継続的に測定することが難しい



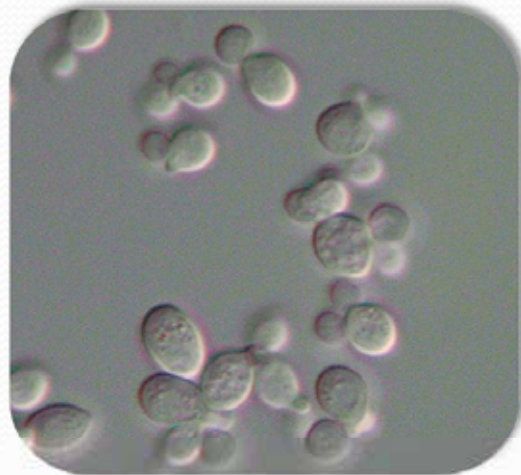
酵素法による迅速・簡便かつ従来よりも特異性の高い分析法の開発



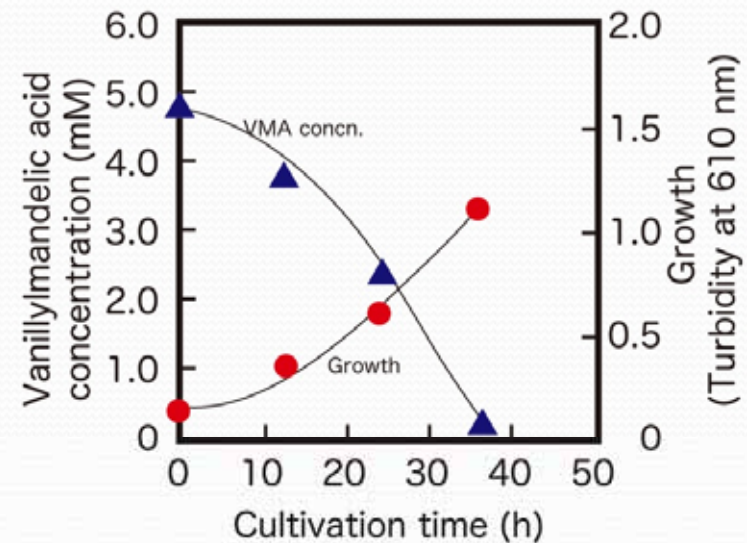
Okayama University
of Science

バニリルマンデル酸資化性菌

Rhodosporidium paludigenum VMA4



VMA4株によるバニリルマンデル酸の分解

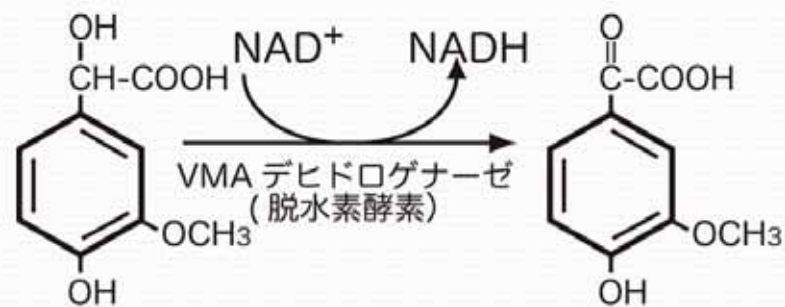


分離源	土壌	周縁の形状	全縁
隆起状態	円錐状	表面の形状	平滑
光沢および性状	輝光、湿性	色調	淡橙

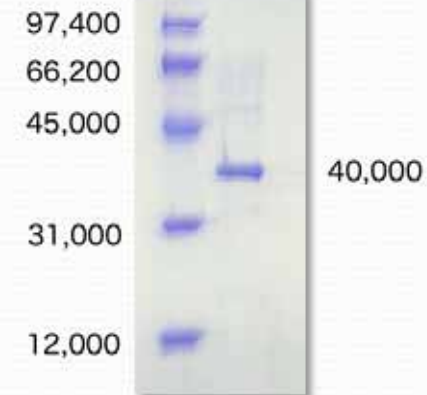


Okayama University
of Science

R. paludigenum VMA4由来バニリルマンデル酸デヒドロゲナーゼ



SDS-PAGE



Purification

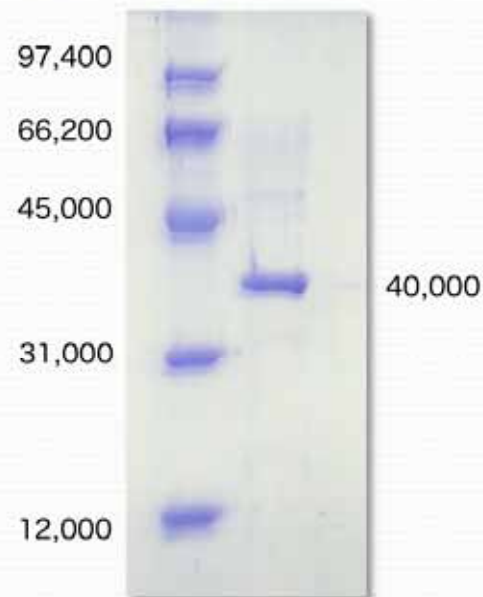
	Total protein (mg)	Total activity (U)	Specific activity (U/mg)	Yield (%)	Purification (-fold)
Cell-free extract	2000	600	0.3	100	1
DEAE-Sepharose	120	550	5	90	20
Phenyl-Sepharose	30	400	15	60	50
Resource Q	8	120	15	30	70
Superdex 200	1	100	100	15	300



Okayama University
of Science

バニリルマンデル酸デヒドロゲナーゼの酵素化学的性質

SDS-PAGE



バニリルマンデル酸デヒドロゲナーゼの性質

Molecular weight

Subunit (SDS-PAGE)	40,000
Native (Gel-filtration)	80,000

Structure

Homo dimer

Effect of pH

Optimum	8.0
Stability	4.0~8.0

Temperature

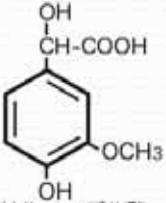
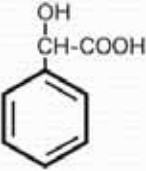
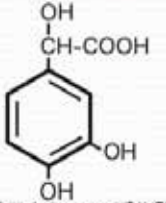
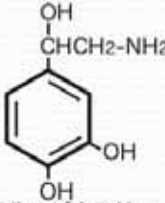
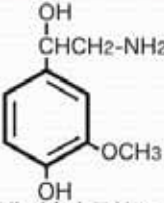
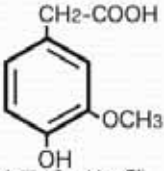
Optimum (°C)	55
Stability (°C)	~40

N-terminal and internal
a. a. sequence

N-term. ; not determined
Internal ; FEVIPANLTHDEFK
SAHNPRGHVLGAVGLGAIQK
LVYYDVAPADAETEK
LLSAGLDVHEFEPQVSK



バニリルマンデル酸デヒドロゲナーゼの基質特異性

						
Relative activity (%)	100	25	90	0	0	0
Configuration	(D)	D	(D)	—	—	—
<i>K_m</i> (mM)	0.9 (0.45)	1.1	0.1(0.05)			

バニリルマンデル酸およびジヒドロキシマンデル酸はラセミ体を用いての測定値
() の値は D 体のみを基質として測定した場合の推定値

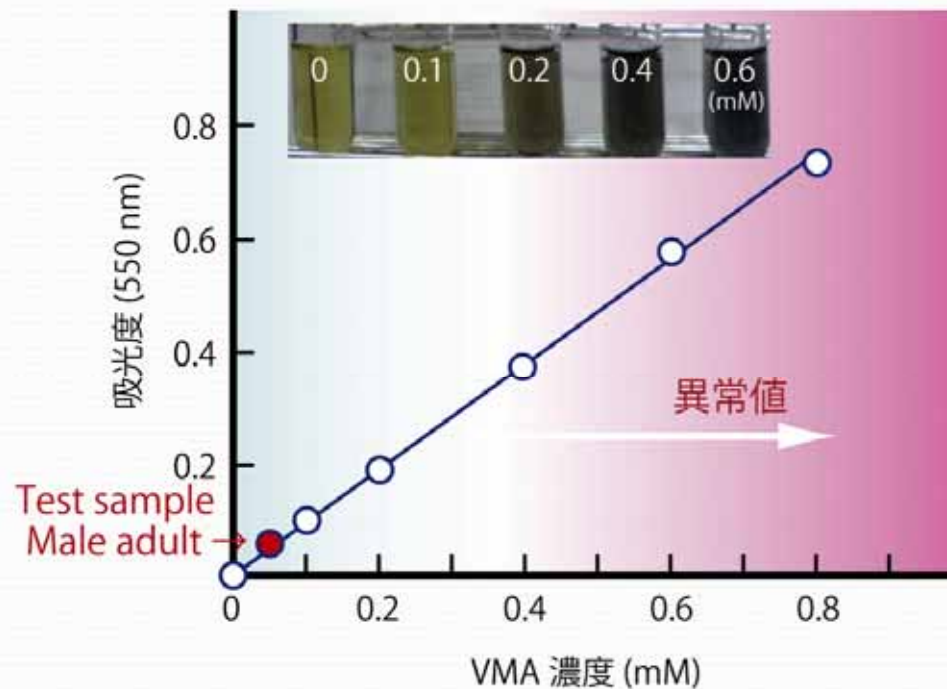
尿中バニリルマンデル酸はD体*

*Armstrong et al., 3-methoxy-4-hydroxy-D-mandelic acid, a urinary metabolite of norepinephrine, Biochim Biophys Acta (1957) 25(2), 422-3



Okayama University
of Science

尿中バニリルマンデル酸の測定



測定キットの構成

構成

VMAデヒドロゲナーゼ
中性緩衝液 含NAD⁺
検体 (尿, 血液など)

検出

NADHの吸光測定 (340 nm)
NBT(550 nm or 呈色比較) など



Okayama University
of Science

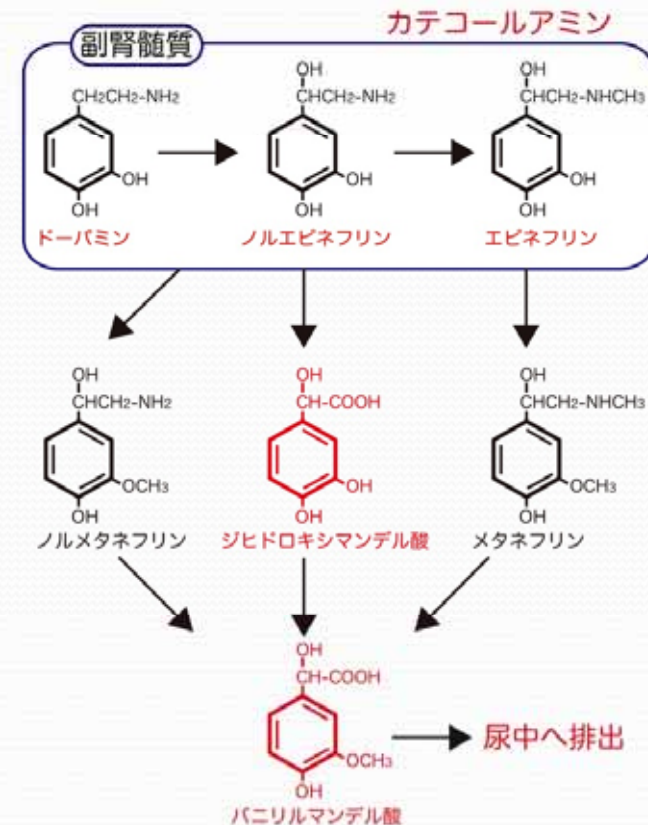
新規酵素法による測定法の利点

- 高価な装置が必要を必要としないため、診療所や家庭での検査が可能。特に治療後の再発チェックなどに有効。
- 短時間での分析（5分以内）での分析判定が可能。
- 多検体の測定を並列でいちどに検査可能。
- 微量の尿検体で測定が可能。
- 基質特異性が高いため、前処理などの必要がなく、直接、尿サンプルから測定が可能



想定される用途

1. 簡便な測定法を生かしたマススクリーニング法への適用。
2. 本酵素の基質特異性を生かした、新たなスクリーニングデータの集積。
3. カテコールアミン代謝産物（ジヒドロキシマンデル酸、およびバニリルマンデル酸）の光学分割による光学活性体の生産。
4. 血中カテコールアミン代謝産物の測定。





Okayama University
of Science

実用化に向けた課題

1. 酵素の大量供給法
遺伝子工学的手法で簡便に高純度の酵素を取得できる系の構築
2. 検査キットの提供方法
液体試薬としては供給可能であると考えられるが、より簡便にセンサーなどへの応用やろ紙などを用いたさらに簡便な方法の開発
3. 実検体での実証
模擬サンプルや健常者の尿検体では測定実績があるが、ポジティブコントロールでの検証



Okayama University
of Science

協力していただける企業への期待

1. 酵素の大量供給法
現在、cDNAクローニングをほぼ終えており、大量発現に向けた取り組みを実施中であるため、酵素の供給は近く可能になると考えている。
2. 検査キットの提供方法
センサー分野や固定化酵素などへのさらに簡便に測定できる方法に関する分野でも共同研究を希望。
3. 実検体での実証
新規な基質特異性（立体選択性）を生かした実検査への適用による有効性の評価に関して協力を期待。



Okayama University
of Science

本技術に関する知的財産権

発明の名称：D-マンデル酸誘導体脱水素酵素

出願番号：特願2009-203355

出願人：学校法人 加計学園

発明者：三井亮司 田中三男



Okayama University
of Science

お問い合わせ先

学校法人 加計学園

岡山理科大学 学外連携推進室
コーディネーター 安井茂男

TEL : 086-256-9731

FAX : 086-256-9732

e-mail : renkei@office.ous.ac.jp

岡山理科大学 理学部 生物化学科
三井 亮司

TEL : 086-256-9708

FAX : 086-256-9708

e-mail : rmitsui@dbc.ous.ac.jp