

# 日本医療研究開発機構 医療機器等における先進的研究開発・開発体制強靱化事業 事後評価報告書

公開

## I 基本情報

補助事業課題名: (日本語) tRNA 修飾異常を起因とする疾患を迅速かつ正確に診断可能なシステム研究開発  
(プログラム名) (英語) Study of the development of simplified diagnostic system of diseases caused  
by abnormal tRNA modifications

実施期間: 令和/平成2年8月26日～令和6年3月31日

補助事業担当者 氏名: (日本語) 渡邊 淳  
(英語) Jun Watanabe

補助事業担当者 所属機関・部署・役職:

(日本語) 株式会社島津製作所・分析計測事業部 ライフサイエンス事業統括部 MSビジネスユニット・マネージャー

(英語) Shimadzu Corporation, Analytical & Measuring Instrument Division, Life Science Business Department, MS Business Unit, Manager

## II 補助事業の概要

### 研究開発の目的・意義

従来、ミトコンドリア病の診断には、臨床症状、家族歴、脳画像診断、(運動負荷時)の血液・髄液中の乳酸・ピルビン酸比、筋生検など複合的診断を行い、最終的に遺伝子診断を実施している。ミトコンドリア病は乳幼児に発症することが多く、乳幼児を対象に髄液採取、採血、運動負荷、筋生検などの侵襲的処置は臨床の現場では困難を伴う。また母系遺伝性である MELAS 型および MERFE 型ミトコンドリア病では、遺伝子検査は家族内の軋轢を生じさせるなど倫理的・社会的問題も大きい。

我々は、尿中の修飾 tRNA の代謝産物を LC/MS 質量分析機器で測定することにより、ミトコンドリア病が診断できるか臨床標本を用いて原理検証を行った (AMED・H29 年度先端計測分析技術・機器開発プログラム、要素技術開発タイプ)。その結果、尿中の修飾ヌクレオシドを測定することで、従来の同疾患診断マーカーより優れた診断マーカーであることが明らかになった。

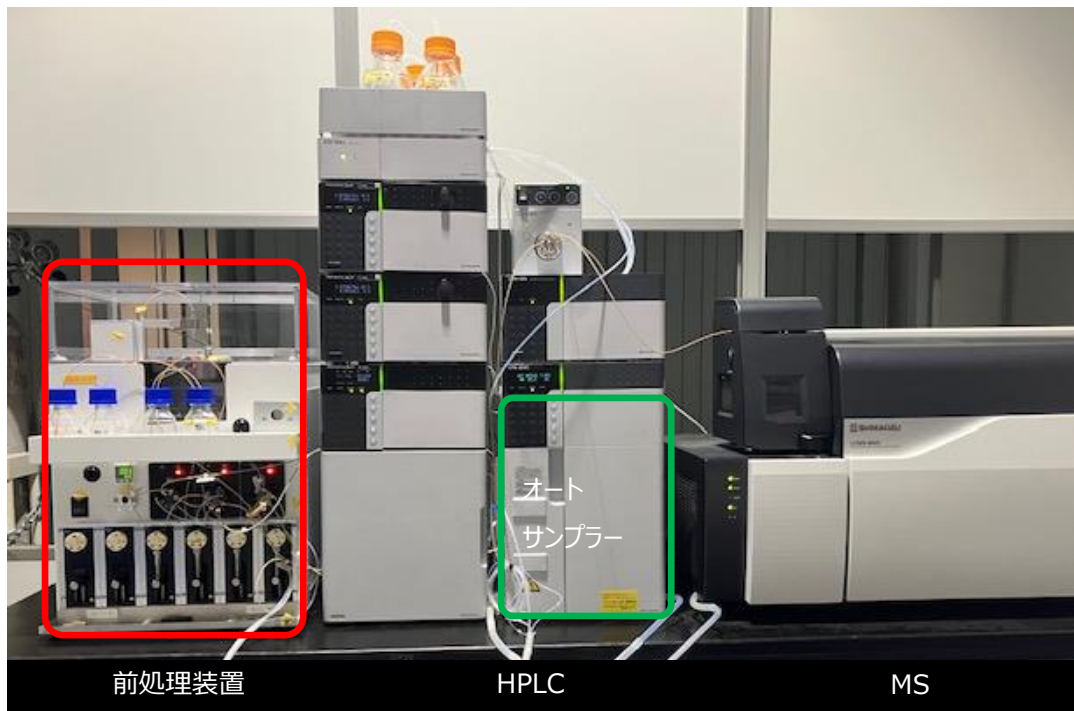
そこで、本研究開発では、従来、侵襲的診断方法しかなかった希少難病疾患であるミトコンドリア病を尿中の修飾ヌクレオシドを測定することにより、非侵襲で迅速かつ正確に診断できるシステムを開発した。

## 開発した機器・システムの概要

ミトコンドリア病診断システム（以下から構成される）を開発した。

### ●全自動尿標本前処理装置～高速液体クロマトグラフ質量分析計（LC/MS）

全自動で尿標本の前処理ができる装置を開発した。



円盤形による制御方式とし、前処理後の分析を行う高速液体クロマトグラフ質量分析計（LC/MS）と連動する前処理装置を完成させた。

・手作業で尿を分取してバイアル中で溶媒と混合したのち、HPLCのオートサンプラーにバイアルをセットすれば、前処理から分析まで全自動を行われる。

通常、前処理装置にサンプラーをセットするが多いが、本開発ではHPLCのオートサンプラーを活用した。これにより、

1. 検体とデータファイルが必ず一致する、
2. オートサンプラーの冷却機能を活用できる、
3. 検体数を100検体に増加できる

等のメリットが得られる。

・前処理後のサンプルをロスなくLC/MSへ導入するため高感度分析が可能となる。

⇒前処理（分析）に用いる試料（尿）の必要量は10  $\mu$ Lのみ。

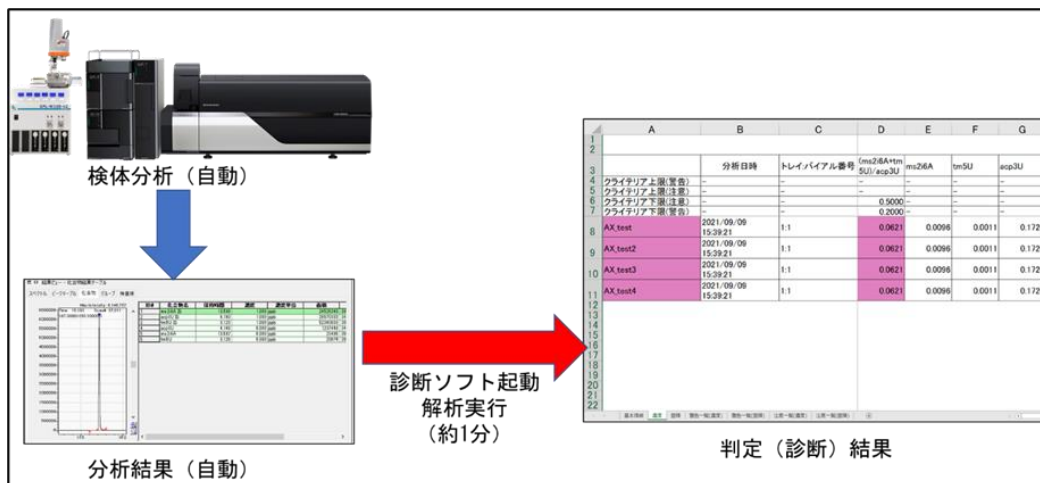
・前処理装置とLC/MS装置を連動させることで、前処理からターゲットとなる修飾ヌクレオシドの分析までを15分以内に行うことができる。

### ●診断ソフトウェア

分析後、ミトコンドリア病診断式を自動計算、判別・診断する機能を持つソフトウェアを開発した。

・分析結果から自動計算後、判定結果レポートを自動で作成することができる。

・約1分（※検体数による）で診断ソフト起動から解析完了までを実施することができる。



本診断システムを用い、診断精度の評価を行った結果、診断に有効と判断できる目標値である『感度：94%以上、特異度：90%以上』をクリアすることが分かった。

### ●前処理用試薬キットの開発

本診断システムにおいて、試料（尿）の最初の希釈工程で修飾ヌクレオシドの標準試薬を用いる。その試薬についてのキットを開発した。



本試薬キットについては、保存安定性の評価を行い、以下の基準を満たすことを確認した。

- ・候補となる濃度、温度条件で12か月保存を行い、目的成分の濃度変化が適正範囲以内であること

## Purpose and significance of research and development

Traditionally, mitochondrial disease is diagnosed by a combination of clinical symptoms, family history, brain imaging, lactate-pyruvate ratio in blood and cerebrospinal fluid (during exercise), muscle biopsy, and finally genetic diagnosis. Mitochondrial disease often affects infants and young children, and invasive procedures such as CSF sampling, blood sampling, exercise stress, and muscle biopsy in infants and young children are difficult in clinical practice. In maternally inherited forms of MELAS and MERFE mitochondrial disease, genetic testing is also associated with significant ethical and social problems, such as conflict within families.

We conducted a proof-of-principle test using clinical specimens to determine whether mitochondrial disease can be diagnosed by measuring metabolites of modified tRNA in urine with an LC/MS mass spectrometer (AMED • H29 Advanced Measurement Analysis Technology and Equipment Development Program, Element Technology Development Type). Measurement of modified nucleosides in urine was found to be a better diagnostic marker than conventional markers for the same disease.

Therefore, in this research and development, we developed a system that can rapidly and accurately diagnose mitochondrial diseases, which are rare and intractable diseases, by measuring modified nucleosides in urine.

## Overview of developed devices and systems

Mitochondrial disease diagnosis system (composed of the following) was developed.

### Fully Automatic Urine Sample Pretreatment System coupled with High Performance Liquid Chromatograph Mass Spectrometer (LC/MS)

We have developed a fully automatic pretreatment system for urine samples.

A disk control system has been developed, and a pretreatment apparatus linked to a high-performance liquid chromatograph mass spectrometer (LC/MS) for analysis after pretreatment has been completed.

- By hand, the urine is collected and mixed with the solvent in a vial, and then the vial is loaded into an HPLC autosampler, which is fully automatic from pretreatment to analysis.

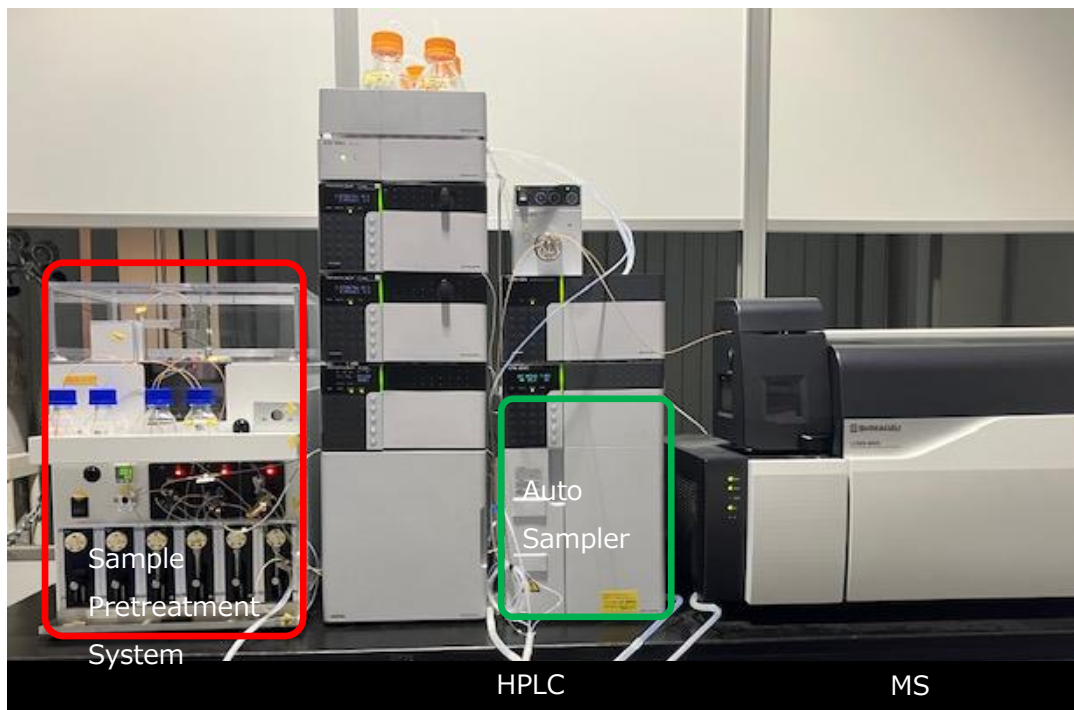
Usually, a sampler is set in the preparation equipment, but in this development, an HPLC autosampler was utilized. This results in:

1. The sample and data file must match,
  2. You can take advantage of the cooling function of the autosampler,
  3. Increase the number of samples up to 100
- and the like.

- Since the sample after the pretreatment is introduced into the LC/MS without loss, the highly sensitive analysis becomes possible.

=> Only 10uL of the sample (urine) is required for pretreatment (analysis).

- By interlocking the pretreatment device with the LC/MS device, the process from pretreatment to analysis of the target modified nucleoside can be performed within 15 minutes.



### Diagnostic software

After analysis, we developed software that automatically calculates, discriminates, and diagnoses mitochondrial disease diagnostic equations.

- After automatic calculation from the analysis result, the judgment result report can be automatically created.
- From the start of the diagnostic software to the completion of the analysis can be performed in about 1 minute (\* according to the number of samples).

As a result of the evaluation of the diagnostic accuracy using this diagnostic system, it was found that the target value "Sensitivity:  $\geq 94\%$ ; specificity:  $\geq 90\%$ " which can be judged to be effective for the diagnosis was cleared.

### Development of a reagent kit for pretreatment

In this diagnostic system, a standard reagent for modified nucleosides is used in the first dilution step of the sample (urine). A kit for the reagent was developed.

The storage stability of this reagent kit was evaluated, and it was confirmed that the following criteria were met.

- Store at the candidate concentration and temperature for 12 months, and the change in concentration of the target ingredient must be within the appropriate range.