

博 士 論 文

LC-MS を用いた代謝物解析法の確立と
疾患バイオマーカー探索への応用

**Establishment of the metabolite profiling method using LC-MS,
and its application to the detection of disease biomarkers**

本論文は静岡県立大学大学院薬学研究科博士論文である

2014 年 3 月

(March, 2014)

静岡県立大学大学院 薬学研究科 薬学専攻

博士後期課程 生体機能分子分析学講座

筒井 陽仁

Tsutsui, Haruhito

略語リスト

A β	Amyloid beta
ACN	Acetonitrile
Ac-PUT	<i>N</i> ¹ -Acetyl-putrescine
Ac-SPD	<i>N</i> ⁸ -Acetyl-spermidine
Ac-SPM	<i>N</i> ¹ -Acetyl-spermine)
AD	Alzheimer's Disease
AI	(<i>R</i>)-(-)-1-Aminoindan
ApoE	Apolipoprotein E
BAP	(3 <i>R</i>)-(-)-1-Benzyl-3-aminopyrrolidine
Borax	Sodium tetraborate decahydrate \cdot 10H ₂ O (Na ₂ B ₄ O ₇ \cdot 10H ₂ O)
CA15-3	Carbohydrate antigen15-3
CAA	Cerebral amyloid angiopathy
CAD	Cadaverine
CBD	Cortico Basal Degeneration
CE	Capillary electrophoresis
CHEA	(<i>S</i>)-(+)-1-Cyclohexyl-ethylamine
DAC-SPD	<i>N</i> ¹ , <i>N</i> ⁸ -Diacetyl-spermidine
DAC-SPM	<i>N</i> ¹ , <i>N</i> ¹² -Diacetyl-spermine
DAH	1,6-Diaminohexane
DAP	Diaminopropane
DBD-APy	(<i>R</i>)-(+)-4-(3-Aminopyrrolidin-1-yl)-7-(<i>N,N</i> -dimethylaminosulfonyl)-2,1,3-benzoxadiazole
DBD-F	4-(<i>N,N</i> -Dimethylaminosulfonyl)-7-fluoro-2,1,3-benzoxadiazole
DM	Diabetes mellitus
DPDS	2,2'-Dipyridyl disulfide
EDTA	Ethylenediamine-tetra-acetic acid
ESI	Electrospray ionization
FDA	Food and Drug Administration
FL	Frontal lobe
FLP	Flurbiprofen
GC	Gas chromatographic
HA	3-Hydroxybutyric acids
HA- <i>d4</i>	3-Hydroxybutyric acid-3,4,4,4- <i>d4</i>
HPLC	High performance liquid chromatography
I.S.	Internal standard substance

IBP	Ibuprofen
LA	Lactic acids
LA- <i>d3</i>	Lactic acid-3,3,3- <i>d3</i>
LOD	Limit of detection
LOP	Loxoprofen
MI	Multiple infarct
MRM	Multiple Reaction Monitoring
MS	Mass spectrometer
NFT	Neurofibrillary tangle
NMDA	<i>N</i> -Methyl-D-aspartate
NMR	Nuclear magnetic resonance
NSAID	Non-steroidal anti-inflammatory drug
ODC	Ornithine decarboxylase
ODS	Octa Decyl Silyl
OL	Occipital lobe
OPLS-DA	Orthogonal partial least-squares-discriminant analysis
ORN	Ornithine
PA	L-prolinamide
PAO	Polyamine oxidase
PCA	Principal components analysis
PL	Parietal lobe
PMP	(<i>S</i>)-(+)-1-(2-Pyrrolidinylmethyl)-pyrrolidine
PSP	Progressive supranuclear palsy
PUT	Putrescine
RSD	Relative standard deviation
SPD	Spermidine
SPDS	Spermidine synthase
SPM	Spermine
SPMS	Spermine synthase
SRM	Selected reaction monitoring
SSAT	Spermidine/spermine- <i>N</i> ¹ -acetyltransferase
TFAP	(3 <i>R</i>)-(+)-3-(Trifluoroacetamido)-pyrrolidine
THFA	(<i>S</i>)-(+)-Tetrahydrofurfuryl-amine
TOF	Time of flight
TPP	Triphenylphosphine
UPLC	Ultra performance liquid chromatography

目次

序論 1

第 1 章 乳がん患者唾液中ポリアミンの一斉分離	4
第 1 節 序.....	4
第 2 節 実験材料及び方法.....	6
1-2-1 試薬.....	6
1-2-2 装置.....	7
1-2-3 UPLC-ESI-MS/MS 条件.....	7
1-2-4 ポリアミンの DBD-F 誘導体化.....	9
1-2-5 唾液採取.....	9
1-2-6 唾液前処理.....	9
1-2-7 分析バリデーション.....	10
第 3 節 実験結果及び考察.....	11
1-3-1 ポリアミンの DBD-F 誘導体化.....	11
1-3-2 DBD-F 誘導体化ポリアミンの LC-MS/MS 一斉分離分析.....	13
1-3-3 唾液中 11 種ポリアミンの一斉分離検出.....	16
1-3-4 分析バリデーション.....	17
1-3-5 健康人及び乳がん患者唾液中ポリアミンの定量.....	22
第 4 節 小括.....	26
第 2 章 光学活性カルボン酸のキラル誘導体化 LC-MS/MS 分析 - 唾液中 DL-乳酸, DL-β-ヒドロキシ酪酸の定量 -	27
第 1 節 序.....	27
第 2 節 実験材料及び方法.....	29
2-2-1 試薬.....	29
2-2-2 実験装置.....	31
2-2-3 HPLC-ESI-MS/MS.....	32
2-2-4 UPLC-ESI-MS/MS.....	34
2-2-5 誘導体化反応の最適時間.....	36
2-2-6 NSAIDs (IBP, FLP, LOP) を用いた誘導体化試薬スクリーニング.....	37
2-2-7 実試料への応用 (ラット血漿中 NSAIDs の検出).....	37
2-2-8 DL-LA, DL-HA に対する最適キラル分離誘導体化試薬の探索.....	38
2-2-9 唾液の採取.....	38
2-2-10 唾液の前処理.....	38
2-2-11 分析バリデーション.....	39
第 3 節 実験結果及び考察.....	40
2-3-1 キラルなアミンを用いた NSAIDs 誘導体化.....	40

2-3-2	NSAIDs 誘導体ジアステレオマーの HPLC-MS/MS 分離分析	42
2-3-3	ラット血漿中検出への応用.....	45
2-3-4	DL-LA, DL-HA に対する最適キラル分離誘導体化試薬の探索	47
2-3-5	DL-LA, DL-HA 誘導体の UPLC-ESI-MS/MS 分析	49
2-3-6	唾液中 DL-LA, DL-HA の分析.....	51
2-3-7	分析バリデーション	53
2-3-8	健常人と糖尿病患者の唾液中 LA, HA の定量.....	57
第 4 節	小括.....	61
第 3 章 アルツハイマー病脳の LC-MS を用いた メタボローム解析研究.....		62
第 1 節	序.....	62
第 2 節	実験材料及び方法	64
3-2-1	試薬.....	64
3-2-2	実験装置.....	65
3-2-3	脳検体の情報	66
3-2-4	前処理	67
3-2-5	UPLC-ESI-TOF-MS 分析	67
3-2-6	多変量解析① 主成分分析 (PCA) による成分比較	69
3-2-7	多変量解析② 判別分析 (OPLS-DA) によるマーカー探索	70
3-2-8	同定実験.....	71
3-2-9	脳組織中 SPD, SPM 及び関連化合物の定量.....	72
3-2-10	生化学的実験	73
第 3 節	実験結果及び考察	74
3-3-1	脳検体の病理学的検査.....	74
3-3-2	脳組織中低分子代謝物の UPLC-ESI-TOF-MS 分析	76
3-3-3	多変量解析	79
3-3-4	化合物の絞り込み及びデータベース検索	84
3-3-5	SPD, SPM の同定実験	88
3-3-6	脳組織中 SPD, SPM 及び周辺代謝物の定量.....	90
3-3-7	生化学的追加実験	93
第 4 節	小括.....	97
総括 98		
参考文献.....		102
謝辞 113		

序論

バイオマーカーは薬学的には「生体内の生物学的変化を定量的に把握するため、生体情報を数値化・定量化した指標」と定義されている（日本薬学会 HP より）。また FDA（米国食品医薬品局）はバイオマーカーの位置づけを「正常なプロセスや病的プロセス、あるいは治療に対する薬理学的な反応の指標として客観的に測定・評価される項目」としている。つまりバイオマーカーとは、人間の健康状態を定量的に把握するための科学的な指標のことであり、人が発する生体情報を数値化・定量化した指標である。特に、診断分野ではバイオマーカーの重要性が注目されており、疾患などに起因して発現する化学物質の量、濃度、程度を表す数値である。具体的には、日常診療で用いられるバイタルサインや、生化学検査、血液検査、腫瘍マーカーなどの各種臨床検査値や画像診断データなども含まれる¹。そして、これまでに血漿 LDL（低比重リポタンパク）、p53 遺伝子、マトリックスメタロプロテアーゼなど、いくつかの疾患に対するバイオマーカーが発見され、健康診断等に採用されており^{2,3}、疾患特異的に変化し、疾患の状態や変化、治癒の程度を特徴づける指標こそが、有用なバイオマーカーとされている。また最近では、疾患治療後の効果の測定だけでなく、早期診断・予防のための日常的な指標、さらに医薬品に対する副作用反応の確認や、疾患メカニズムの解明による医薬品ターゲット識別などの分野に応用可能なバイオマーカーの発見が特に期待されている。

バイオマーカー探索研究の対象物質としては、遺伝子（DNA）、mRNA、タンパク質、低分子代謝物などが挙げられる。このような対象物に対し、疾患メカニズムなどから疾患に関連する標的物質を予測し、生理学的、生化学的研究が行われる一方で、ヒトゲノム解析完了後のポストゲノム研究として生命現象を包括的に解析・解明することを目的としたオミックス研究が盛んに行われている。具体的には、遺伝子を対象にしたゲノム解析、mRNA を対象にしたトランスクリプトーム解析、タンパク質を対象にしたプロテオーム解析、低分子代謝物を対象にしたメタボローム解析などがあり、対象物質に対応した分析法を用い、様々な角度から対象疾患に対しバイオマーカー探索を目的に研究されている⁴⁻⁸。これらの中でも特に代謝物解析の分野では、近年の分析機器の急激な発達により、様々な代謝物の微量分析が可能となり、その応用範囲も広まり、注目を集めている。

低分子代謝物（メタボライト）には、細胞の活動によって生じる特異的な代謝中間体、ホルモン、シグナル分子や二次代謝産物などが含まれる。そして、これらを解析することは、mRNA やタンパク質の発現データの解析だけでは不明な部分、つまり細胞のある瞬間での特異的な生理現象を明らかにすることが可能となり、現在このようなアプローチは毒性学をはじめ、診断や疾患マーカー探索など様々な分野で、一つの現象解析ツールとして応用されることが多くなった⁹⁻¹²。そして、適切な分析ツールを用いたメタボライトプロファイリングによって生体試料中の内因性代謝物や生物

学的分子などのバイオマーカー候補物質を探索することは、これまでの報告からも可能であることが判明している¹²⁻²¹。

代謝物解析には現在多くの分析機器が利用されている。特に、網羅的代謝物解析(メタボローム解析)において、これまでの報告で主に利用されてきた検出機器としては、核磁気共鳴分析(NMR)²²⁻²⁵や質量分析(MS)²⁶⁻²⁹があげられる。メタボローム解析が行われ始めた当初はデータと構造情報が直結するNMRが良く用いられていたが、複雑なスペクトルの解析が困難な点や感度、定量性、再現性が低い点などから最近ではあまり使われなくなっている。NMRに代わり、近年メタボローム解析で用いられている検出器が、MSである。MSは分子量を m/z として計測できるため、測定したい分子量の範囲を設定すれば、測定試料中に設定した範囲のどのような分子がどの程度存在するのかという情報を網羅的に短時間で得ることができる。このようにMSは非常に広範囲の低分子代謝産物の検出や測定を可能にするため、近年メタボローム解析の際に利用されることが増えつつある³⁰⁻³²。またMSがメタボローム解析に用いられる際、試料中の化合物の検出を明確にし、夾雑物によるピークの混雑を避けるためにも、試料をMSに直接導入するのではなく、あらかじめ、ある程度の分離することは不可欠である。MSと組み合わせて用いられる分離ツールとしては、液体クロマトグラフィ(LC)³³⁻³⁶やガスクロマトグラフィ(GC)^{38,39}あるいはキャピラリー電気泳動(CE)⁴⁰などが一般に良く用いられる。GC-MSは高い分離能と感度を持ちデータベースが豊富なため未知化合物の構造解析には適しているが、各成分を揮発化しなければならないので、誘導体処理が不可欠となり、その使用が限定されてしまう難点がある。これに対しLC-MSは揮発化のための誘導体化を必要とせず網羅的な代謝物質分析には適している。しかし一方で、通常の逆相カラムでは強極性の化合物がカラムにほとんど保持されず、移動相を流すと同時に溶出する可能性があるので注意する必要がある。その点で、イオン性の極性化合物の分離検出にはCE-MSが適している。しかし、その扱いには熟練を要し、中性分子は原理的に測定できないのでLC-MSとの組み合わせが不可欠となる。このように分離方法には長所短所があるため、測定目的により使い分ける必要がある⁴¹。我々の実験では測定対照は複雑な化合物が多く混在する生体試料であったためLC-MSによる測定が最も適していると判断し使用した。

一方で、目的化合物を絞り代謝物分析をする場合でも同様な理由でLC-MSが適していると考えられた。加えて、LC-MSを用いた標的化合物分析において、有効なツールの一つとして誘導体化法が挙げられる。誘導体化はLC-MS分析において、目的化合物をイオン化しやすい化合物に変換すると同時に、カラムへの保持力を上げLCでの分離効果の向上も期待できる。また、誘導体化により特徴的なフラグメントイオンが生成する場合や、クロマトグラム上目的化合物と妨害物質の分離が容易になる場合は、より選択的な検出が可能となり、結果としてsignal/noiseの向上を図ることができる。さらに、目的化合物が光学活性を持ち直接分析において光学分割が困難である場合には、誘導体化試薬にキラルな化合物を用いることにより、光学分割を図るジア

ステレオマー法を行うことができる。この手法を用いれば、昨今話題になっている“光学異性体間による生体内の活性の違い”も考慮に入れた代謝物分析が可能となり、これまで見落とされてきたバイオマーカーの発見にもつながると考えられる。

ここまで述べてきたような背景のもと、本研究では、疾患バイオマーカー探索を目的とした LC-MS による代謝物解析として、目的化合物を絞り込み疾患との関連性を評価する標的代謝物解析と、疾患特異的に変化する低分子化合物を、標的化合物を絞らず解析していく、メタボローム解析技術を用いた網羅的代謝物解析を行った。

第 1 章では、対象疾患を乳がんとした標的代謝物解析を行った。乳がんは、転移率が高く早期発見・診断が治療の要となる疾患であるが、現在の乳がん検診は、高価であることや、マンモグラフィでは、痛みを伴いかつ検査時に乳房を露出するという精神的な負担を患者に与え、なかなか検診率が増加しない現状がある。そこで本研究では、生体試料として非侵襲的かつ採取可能な唾液に注目し、健康診断等で行えるような乳がんの初期スクリーニング法の開発を目的とした唾液中乳がんバイオマーカー探索を行った。標的化合物は、血清や尿中の量が、乳がん患者と健常人と比べて有意な差があるという報告があり、現在臨床の場でも腫瘍マーカーの 1 つとして注目されているポリアミンとし、乳がん患者唾液中 11 種ポリアミンの定量を行った。

第 2 章では、糖尿病をはじめとする様々な代謝疾患における生体内変化が報告されている乳酸 (LA) や β -ヒドロキシ酪酸 (HA) の誘導体化 LC-MS/MS 分析法の開発し、糖尿病バイオマーカーとしての有用性を評価した。また LA や HA は光学活性を持つため、光学異性体間の発現の差にも注目した。光学異性体分析のための誘導体化試薬はキラルな 8 種のアミンよりスクリーニングし、分離度等を考慮した最適な試薬を採用した。

第 3 章では、標的化合物を絞らずに疾患特異的に変化する代謝物を網羅的に解析するメタボローム解析技術を用いてバイオマーカー探索を行った。対象疾患は、生前の診断に応用可能な新規低分子バイオマーカーの発見が求められているアルツハイマー型認知症 (AD) とした。さらに今回、ヒト剖検脳を用いることにより、AD による脳内の代謝変化についても解析し、AD のメカニズム解明も同時に目的とし研究を進めた。

第 1 章 乳がん患者唾液中ポリアミンの一斉分離

第 1 節 序

現在乳がんは、ヨーロッパやアメリカの諸国だけでなくアジアの国々でも世界的に増加している⁴²。乳がんの中でも、非転移性の非黒色腫皮膚がんが最も頻度が高いが、全体の 20%以上が転移性がん、その中のほとんどが予後不良である。また、転移性がんの発生率は過去 40 年間に著しく増加しており、生活スタイルの変化が一因なのではないかと言われている。

また乳がんの発生率は、40 歳以下の女性で 5%と低く、多くの乳がんは若年時の乳がん検診（生化学的検査や画像診断）により早期発見・予防が可能であると言われている。現在の乳がん検診法には、視触診、マンモグラフィ、超音波、MRI や遺伝子検査などがある。この中でも近年、特に採用されているのがマンモグラフィでは確かな成果もあげているが、患者に与える精神的負担や痛みを伴う点については不満も多く、なかなか検診率が増えてこないが現実である。また診断性能の高い遺伝子検査も近年注目を集めているが診断料が高額で、未だ一般的な検査ではない。従って、患者に嫌がられず、簡易的で安価な別の検査法の開発が強く望まれている。

現在の乳がんの腫瘍マーカーは主に CA15-3 が採用されており、乳がん患者で増加することが知られているが、患者により個人差も大きく決定的なマーカーとは言えない⁴³。こういった腫瘍マーカーの多くが糖たんぱく質や酵素などの高分子である中、低分子のがんマーカー候補としてヒスタミンやポリアミンといった生体内アミンが挙げられる。特にポリアミンは、RNA や DNA の安定化剤や成長因子、セカンド・メッセンジャー、酸化防止剤、栄養素および同化作用の調節因子など多面的機能に働く化合物であることが知られている⁴⁴⁻⁴⁶。そして、1971 年に、尿中ポリアミンの測定が、がん診断に利用できる⁴⁷という報告がされて以来、がんマーカーの研究が盛んに行われるようになってきた。その中でも近年、ポリアミンの生合成に関わるオルニチンオキシダーゼのエストロゲン受容体に対する活性が乳がん患者の血漿で上昇するとの報告⁴⁸⁻⁵⁰があり、ポリアミンと乳がんの関連性が注目を集めている。

また本章では、採取が簡便で無痛・無侵襲、随時にかつ繰り返しに可能である唾液に注目した。また唾液は血液から作られるため、唾液中濃度は採取した時点での血中濃度を、さらには血中のタンパク非結合（生理活性型）濃度を反映する。加えて、唾液はタンパク質や脂質の含有量が少ないため、その分析では血清あるいは血漿を用いる場合よりも共存物質の影響を受けにくい。このような利点から唾液を用いた検査が盛んに検討されているが、一般に唾液中の化合物濃度は血清及び血漿中の 1/100～1/1000 程度であり、唾液分析には極めて高感度な分析手法が要求される⁵¹⁻⁵⁴。

ここで、臨床検査における分析方法に目を向けると、現在最も信頼性の高い分析手法として、HPLC あるいは UPLC の高い分離機能と MS の高選択性、豊富な化学情報量の特徴を併せ持つ LC-MS が考えられ、GC/MS より適用化合物範囲が広く、汎用性に優れる。さらにタンデム MS (MS/MS) を用いて選択反応検出 (Selected reaction

monitoring: SRM) モードを駆使することにより、極めて特異的な検出・定量が可能になる。この分析法を用いることにより、唾液中に低濃度に存在する化合物に対しても高感度な分析ができると考えられた。

以上のことを総合し、本章では、乳がんバイオマーカーとしてアセチル体を含む 11 種ポリアミンを標的にし、本格的な乳がん検査を行う前に、非侵襲的かつ簡易で安価に、健康診断等で採用可能な唾液を用いた乳がん検査法の開発研究に取り組んだ。

唾液中ポリアミンの分析法には、前述で述べた LC-MS/MS 分析法と、本研究室で以前開発されたポリアミン DBD-F 誘導体化分析法を組み合わせた分析法を考案し、11 種ポリアミンの一斉分離検出への応用が可能であるかを検討した^{55, 56}。

第 2 節 実験材料及び方法

1-2-1 試薬

【ポリアミン】

Ornithine (ORN)	和光純薬
Putrescine (PUT)	和光純薬
Cadaverine (CAD)	和光純薬
Spermine (SPM)	和光純薬
<i>N</i> ¹ , <i>N</i> ⁸ -Diacetyl-spermidine (DAc-SPD)	和光純薬
<i>N</i> ¹ , <i>N</i> ¹² -Diacetyl-spermine (DAc-SPM)	和光純薬
Diaminopropane (DAP)	東京化成
<i>N</i> ⁸ -Acetyl-spermidine (Ac-SPD)	東京化成
<i>N</i> ¹ -Acetyl-putrescine (Ac-PUT)	東京化成
<i>N</i> ¹ -Acetyl-spermine (Ac-SPM)	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO)
Spermidine (SPD)	関東化学
1,6-Diaminohexane (DAH: 内標準物質)	東京化成

【その他試薬】

Acetonitrile (ACN)	関東化学
Methanol (MeOH)	関東化学
Formic acid (HCOOH)	和光純薬
4-(<i>N,N</i> -Dimethylaminosulfonyl)-7-fluoro-2,1,3-benzoxadiazole (DBD-F)	東京化成
Sodium tetraborate decahydrate · 10H ₂ O (Na ₂ B ₄ O ₇ · 10H ₂ O) (Borax)	和光純薬

以下有機溶媒については、移動相の用途で用いる場合は LC-MS グレード、その他の用途で用いる場合は特級グレードを用いた。

1-2-2 装置

遠心分離機：微量高速遠心機 CF16RX II 型 (日立)

遠心エバポレーター (溶媒留去用)：EZ-2 パーソナルエバポレーター (Genevac)

UPLC：ACQUITY ultraperformance liquid chromatograph (UPLC I-class, Waters)

ESI-MS/MS：Xevo™ TQ-S triple quadrupole-mass spectrometer (Waters, Milford, MA)

1-2-3 UPLC-ESI-MS/MS 条件

UPLC の測定条件

Column：ACQUITY UPLC BEH C18 column (1.7 μ m, 100 \times 2.1 mm i.d.; Waters)

Temperature：40 °C,

Flow rate：0.35 mL/min

Mobile phase

A：0.1 % Formic acid in water, Mobile phase, B：0.1% Formic acid in acetonitrile

→B% =20 - 60 - 90 - 98 - 98 - 20 - 20 (0 - 8 - 10 - 11 - 12 - 13 - 20 min)

Injection volume：5 μ L

ESI-MS/MS の測定条件

Detected ion mode: positive

Capillary voltage: 3.00 kV

Cone voltage: 50V

Desolvation gas flow: 1,000 L/h

Cone gas flow: 150 L/h

Nebuliser gas flow: 7.0 L/h

Collision gas flow: 0.15 mL/min

Collision energy: 10-38 eV (Table 1-1 参照)

Collision cell exit potential: 5 V

Desolvation temp: 500 °C

Analytical software: MassLynx, version 4.1

Table 1-1 Detection of polyamines labeled with DBD-F by UPLC-ESI-MS/MS

Polyamine	Precursor ion [M+H] ⁺	Product ion (<i>m/z</i>)	Cone voltage (V)	Collision energy (eV)	LOD* (S/N=3) (amol)
Ac-PUT	356.13	311.08	30	10	34
DAc-SPD	455.19	100.08	30	22	9.0
DAP	525.13	437.03	30	20	12
PUT	539.14	451.10	30	20	6.0
CAD	553.16	465.06	30	20	18
DAH (I.S.)	567.17	479.07	30	20	n.d.**
ORN	583.13	495.03	30	22	23
Ac-SPD	638.21	550.11	40	25	43
DAc-SPM	737.27	100.08	40	33	21
SPD	821.22	733.12	50	26	10
Ac-SPM	920.29	834.20	50	38	10
SPM	1103.3	1015.2	50	38	24

*LOD: limit of detection, **n.d.: not determined

1-2-4 ポリアミンの DBD-F 誘導体化

各種ポリアミン (内標準物質を除く 11 種類 100 nM) 30 μ L を 1.5 mL マイクロチューブに入れ, さらに内標準物質 (DAH 100 nM) 30 μ L を加え混合し遠心エバポレーターにて溶媒留去した. 残渣に誘導体化試薬 DBD-F (40 mM) を 150 μ L、Borax 水溶液 (100 mM – pH 9.3) を 150 μ L 加え, 60°C で 30 min 反応させた. 反応終了後すぐに 4°C で 5 分間放冷し反応を停止させ, メンブランフィルター (0.20 μ m) でろ過し, ろ液 5 μ L を UPLC-ESI-MS/MS を用いて測定した.

1-2-5 唾液採取

唾液 (約 1 mL) は直接試験管に採取し, 直ちに -20°C で凍結保存した. 使用直前に遠心分離 (3000rpm, 10 min) し変性したムチンを沈殿させた後, 上清をサンプルとして用いた. 被験者は採取 30 分前から飲食を, さらには唾液中の血液の混入を防ぐため, 1 時間前から歯磨きを控えてもらった.

乳がん患者は, 初発患者 8 名 (43~67 歳), 再発患者 22 名 (38~81 歳) そして, 同年代の健常人 14 名の合計 44 名からの唾液採取を行った.

(本研究に用いた唾液の採取及び分析は, 静岡県立大学及び名古屋市立大学の倫理審査のもと個人情報管理等を配慮し, 倫理指針に準拠した)

1-2-6 唾液前処理

内標準物質 (I.S.) として DAH (100 nM) を 30 μ L 加え, アセトニトリル 90 μ L を加えた試験管に唾液サンプル 30 μ L を添加し, ボルテックスミキサーで 1 分間攪拌後, 室温で 15 分放置した (除タンパク処理). 遠心分離 (3,000rpm, 10 min) 後, 上清を全量採取し, 0.2 μ m でフィルターろ過を行った. ろ液を 150 μ L 採取し, 遠心エバポレーターで溶媒留去した. その後, 残渣に 40 mM DBD-F 150 μ L, 100 mM Borax 150 μ L 加え 60°C, 30 min 反応させ, 4°C で 5 分間放冷し反応を止めた. 反応液を 0.45 μ m フィルターろ過し, UPLC-ESI-MS/MS で質量分析した.

1-2-7 分析バリデーション

【検量線】

11 種ポリアミン (2-2000 nM) 30 μ L に対し、内標準物質 DAH (100 nM) 30 μ L を加え、溶媒留去後、残渣に 40 mM DBD-F 150 μ L, 100 mM Borax 150 μ L 加え 60°C, 30 min 反応させ、4°C で 5 分間放冷し反応を止めた。反応液を 0.45 μ m フィルターろ過し、UPLC-ESI-MS/MS で質量分析した。検量線は各々誘導体と内標準物質誘導体のピーク面積比の値と濃度を用いて作成した (N=5)。

【日内・日間変動】

日内・日間変動係数は 2 人の健常人より採取した唾液 (Saliva A-B) を用いた。日内変動では繰り返し 5 回、日間変動では 5 日間の測定を行い、それぞれ定量値の RSD 値 (%) を算出した。

【添加回収試験】

2 種の健常人唾液 30 μ L に 11 種ポリアミン (唾液中濃度に合わせて SPM, Ac-SPM, SPD, Ac-SPD: 1.7, 3.3 fmol, ORN, CAD, PUT, DAP, Ac-PUT, DAc-SPD, DAc-SPM: 16.7, 33.4 fmol), を 30 μ L 添加し、1-2-6 に記述した方法で前処理を行い、UPLC-ESI-MS/MS を用い唾液中各種ポリアミンを定量した。標品添加唾液と非添加唾液中のポリアミンの定量値を比較し、添加回収率を算出した。添加回収率は $F/(F_0+A) \times 100$ (%) [F: 標品添加唾液中 LA, HA 濃度, F₀: 非添加唾液中 LA, HA 濃度, A: 標品添加量] で算出した。

【凍結融解安定性試験】

2 種の唾液について、通常操作、1 回及び 2 回の凍結・融解後にそれぞれ前処理後、DBD-F 誘導体化し、UPLC-ESI-MS/MS にて各ポリアミンを定量した。通常測定と凍結・融解を 1 回及び 2 回繰り返した場合の各種ポリアミンの定量値を比較することにより、凍結融解操作における唾液中ポリアミンの安定性を試験した。

第3節 実験結果及び考察

1-3-1 ポリアミンの DBD-F 誘導体化

ポリアミンは生体内に広く存在し、その構造上にアミノ基を2つ以上有するという特徴を持っており、親水性の高いアミノ酸の代謝物である (Fig. 1-1)。これまでポリアミンの逆相クロマトグラフィによる分離検出には、紫外線 (UV) 検出器を用いた、ガスクロマトグラフィ (GC)^{57,58}、液体クロマトグラフィ (LC)⁵⁹⁻⁶⁵、キャピラリー電気泳動 (CE)^{66,67} を用いた。いくつかの方法は確立されてきたが、高感度な検出を達成することはできなかった。また、蛍光誘導体化試薬を用いた高速液体クロマトグラフィ (HPLC) 分離の蛍光検出分析では、血漿と尿中で検出に成功した報告がされているが、夾雑ピークも多く低濃度のポリアミンの同時検出は不可能であった⁶⁸。

この様な背景から、我々の研究室では、近年夾雑物の多い生体試料の分析に使われるようになった LC-MS 分析技術と蛍光標識技術を組み合わせることにより、ヒト毛髪中の微量なポリアミンの検出法を開発した⁶⁹⁻⁷²。したがって、今回の唾液中ポリアミンの分離検出にも前報告で使用された DBD-F 誘導体化法を採用した。DBD-F 誘導体化反応は一般に、アルカリ条件下で効率よく進行するため、0.1 M の Borax (pH 9.3) の中で 60 °C で 30 分間反応させた (Fig. 1-2)。さらに本実験では前報告のポリアミンに加え近年がんとの関連性が強くバイオマーカーとしての特許申請をされたジアセチル体も含めた 11 種のポリアミン (Fig. 1-1) の一斉分離分析を試みた。

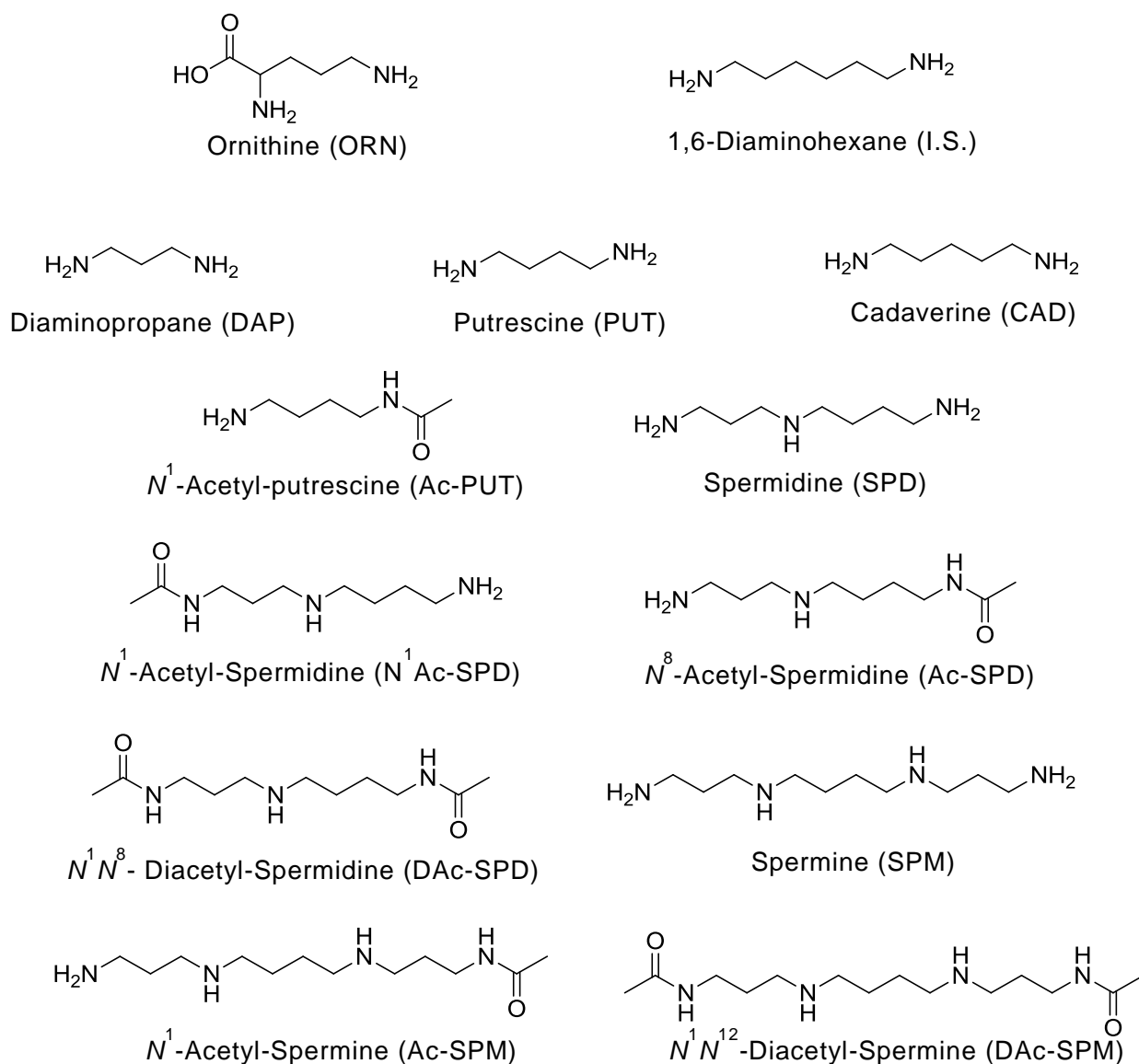


Fig. 1-1 Structures of the tested polyamines

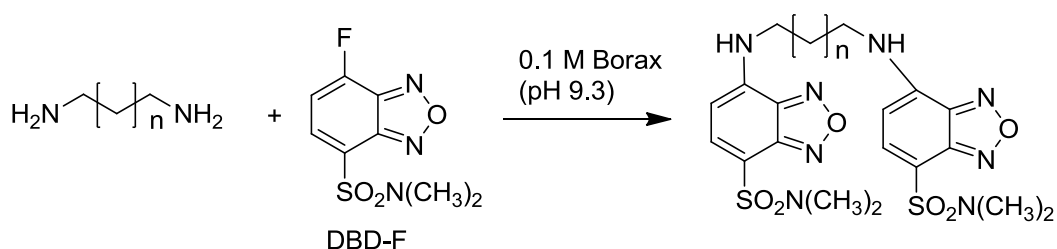


Fig. 1-2 General reaction scheme between polyamines and DBD-F

1-3-2 DBD-F 誘導体化ポリアミンの LC-MS/MS 一斉分離分析

DBD-F 誘導体化した 11 種ポリアミンを一斉分離分析するために、グラジエント条件と移動相を変えながら測定し、最適な分離条件を検討した。

まず ESI-MS/MS での高感度な測定条件を決定するために、各ポリアミン DBD-F 誘導体の娘イオンとその時の collision energy 等の条件検討を行った。ESI-MS/MS の開裂パターンは Fig. 1-3 に示した。ジアセチル体以外のポリアミン誘導体は DBD-F の S-N 結合が切れ、 m/z 44.05 の部分が 2 つ脱離した、残りの構造が検出された。一方、ジアセチル体は、DBD-F とポリアミンの結合した N の隣の位置で切れた m/z 100.08 の娘イオンが検出された。実際の MS/MS スペクトルを SPD, Ac-SPD, DAc-SPD を例に Fig. 1-4 に示し、11 種と I.S. すべて誘導体の MS/MS での測定条件を Table 1-1 に示した。

また Table 1-1 の条件で親イオン/娘イオンを設定し、UPLC-ESI-MS/MS にて Selected reaction monitoring (SRM) モードにより選択的で高感度な分析を行った。分離に関しては、様々な検討をした結果、最終的に A: 0.1 % ギ酸含有水/B: 0.1% ギ酸含有アセトニトリル の系で B% = 20 - 60 - 90 - 98 - 98 - 20 - 20 (0 - 8 - 10 - 11 - 12 - 13 - 20 min) の溶媒勾配にて測定を行うことにより、I.S.を含む 12 本の誘導体のピークを一斉分離検出することに成功した (Fig. 1-5 A)。さらに 11 種ポリアミンに各々ついて検出限界 (LOD) を S/N=3 で算出したところ、9-43 amol と amol レベルの高感度な分析が可能となり、低濃度に存在する唾液中ポリアミンについても検出可能であると考えられた。

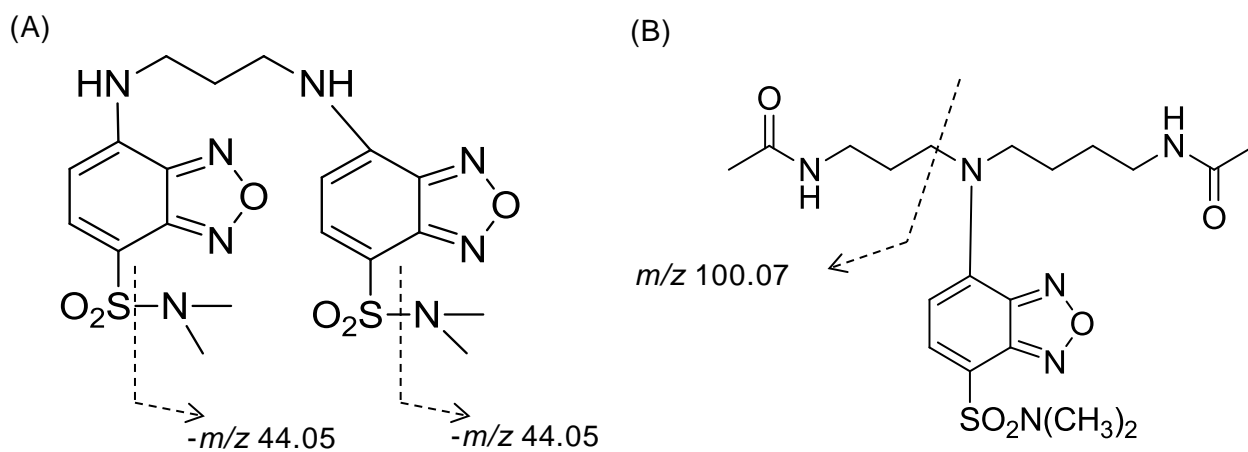


Fig. 1-3 Typical cleavage pattern of DBD-F-polyamines by ESI-MS/MS

(A) Polyamines other than Diacetyl types, (B) Diacetyl polyamines

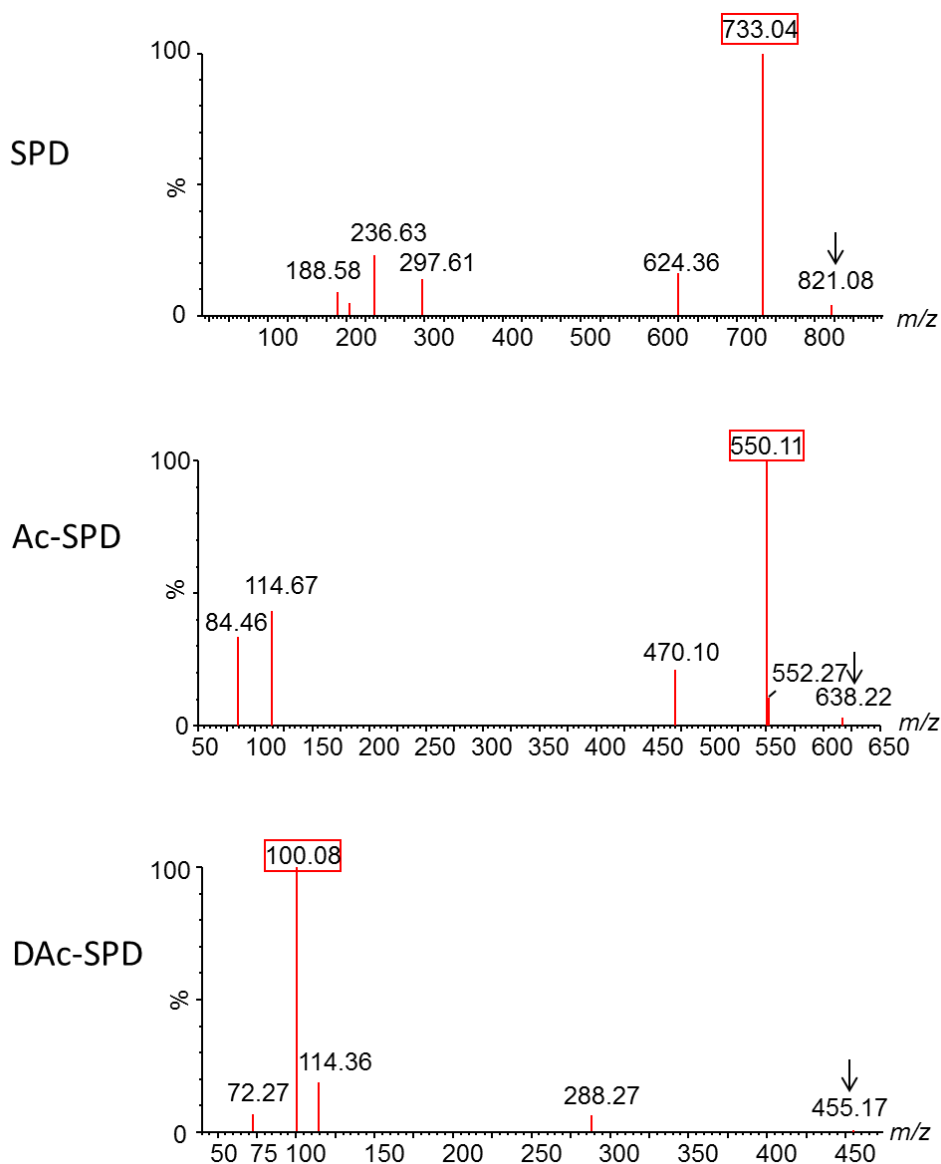


Fig. 1-4 UPLC-ESI-MS/MS spectra of SPD, Ac-SPD, and DAc-SPD

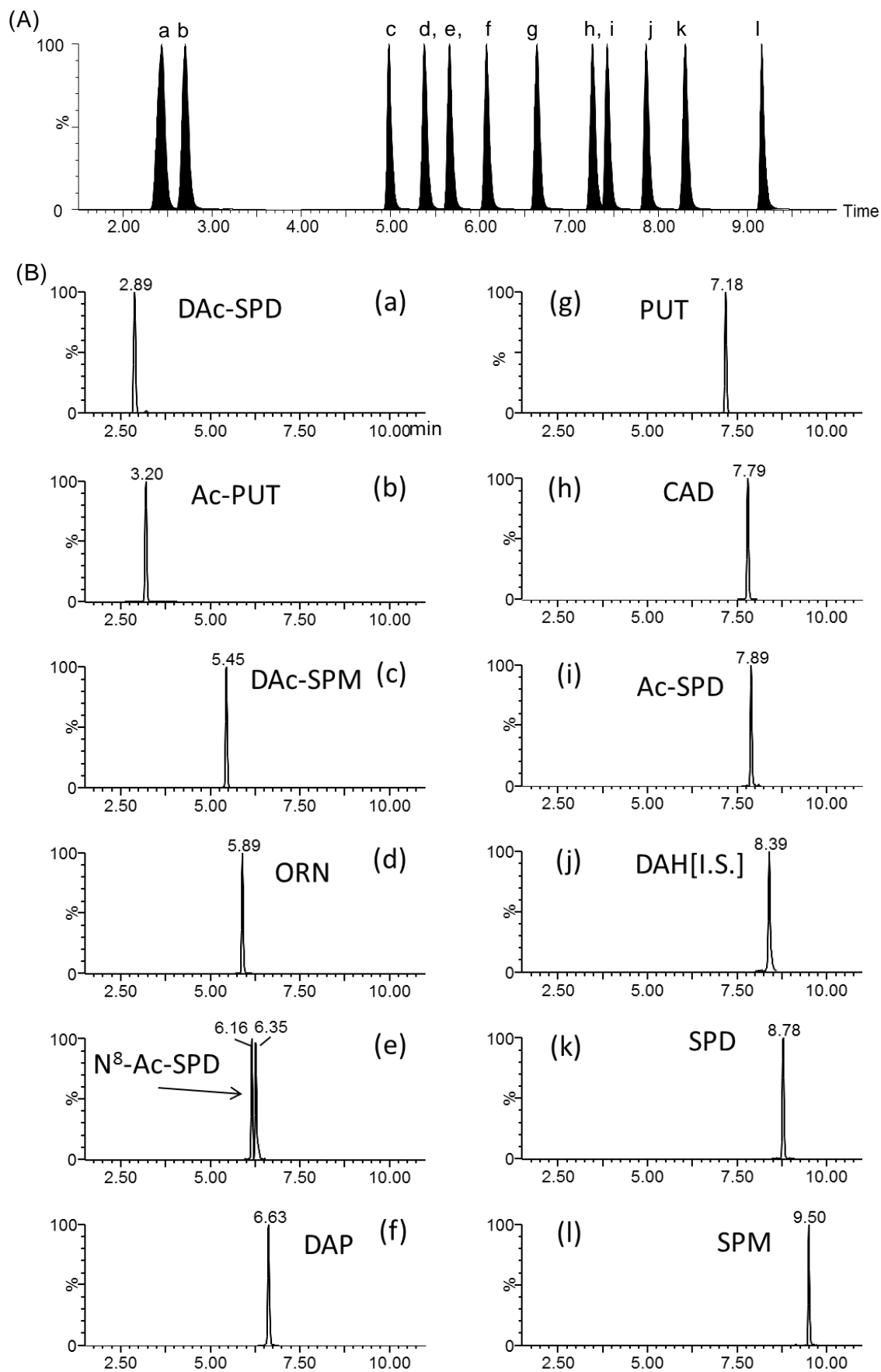


Fig. 1-5 The selected reaction monitoring (SRM) chromatograms of polyamine derivatives obtained from (A) authentic reagents and (B) the human saliva of a healthy volunteer. The UPLC-ESI-MS/MS conditions are described in the Experimental Section and Table 1-1

1-3-3 唾液中 11 種ポリアミンの一斉分離検出

確立した LC-MS/MS を用いた 11 種ポリアミンの一斉分離検出法を唾液に応用し、さらに唾液中 11 種ポリアミンの定量法の確立を目指し研究を行った。

唾液 30 μL に対し前処理を行い、唾液中ポリアミンを測定した結果、標品と同様の測定条件下で I.S.を含む 12 本の誘導体のピークを一斉分離検出することに成功した (Fig. 1-5 B)。

また、Fig. 1-5 B (e) で観測された、いずれも親イオン \rightarrow 娘イオンが m/z 638.2 \rightarrow 550.1 の 2 本のピークについては、標品との比較の結果、6.16 分に溶出したピークは N^8 -Acetyl-Spermidine であると確認でき、6.35 分に溶出したピークはその構造異性体である N^1 -Acetyl-Spermidine であると予想された。しかし、 N^1 -Acetyl-Spermidine については標品の入手が困難であったため、未だ同定には至っていない。今後標品が入手でき次第、同定を行う予定である。

1-3-4 分析バリデーション

1-3-3 において唾液中ポリアミン検出に成功した結果を受け、次に同検出法を用いた唾液中ポリアミンの定量法の確立を目的とし、各種バリデーション試験を行った。

DBD-F を誘導体化試薬として用い 11 種ポリアミンの検量線[X: ポリアミン量 (fmol), Y: ポリアミン誘導体 / DAH (I.S.) ピーク面積比] を作成したところ、各種ポリアミンに関して1-1000 (fmol) の範囲における回帰直線の決定係数 (r^2) は0.9949 – 1.0000 と直線性の高い値であった。また検量線の傾きの相対標準偏差 RSD 値も全て 9.9%以下と良好な値で、本法が検量線作成に適していることが示唆された(Table 1-2)。

次に、精度を精査する目的で異なる 11 種ポリアミン濃度の唾液 2 種類を用いて、日内、日間変動試験を行った。n=5 で試験したところ、日内変動係数は 9.85%以下、日間変動係数は 9.74%以下であり、本法が精度に優れていることが確認できた (Table 1-3)。また、本法の正確度を添加回収試験から評価した結果、添加回収率は 89.4%以上で、この値は生化学分析での許容範囲であり、本法が正確度に優れていることが明らかとなった (Table 1-4)。

凍結・融解による唾液中 11 種ポリアミンの定量値の変動を評価した。通常処理を行った唾液検体 (凍結・融解 1 回) を基準として、さらに凍結・融解を 1 回、2 回と繰り返した際の唾液中ポリアミンの安定性を試験した。その結果、唾液中ポリアミン量は通常測定に比べ 87.7~106%と変動は許容範囲であり、凍結融解を少なくとも 3 回繰り返しても測定値に変動がないことが判明した (Table 1-5)。

Table 1-2 Calibration Curves of Polyamines Labeled with DBD-F

Polyamines	Calibration range (fmol)	Linear equation	Linearity (R ²)	CV (%) n=3
SPM	1-1000	$y = 0.00102x - 0.00346$	0.9947	3.0 - 5.3
Ac-SPM	1-1000	$y = 0.0193x - 0.0678$	0.9997	4.3 - 5.3
SPD	1-1000	$y = 0.0235x - 0.104$	0.9991	1.3 - 6.5
DAc-SPM	1-1000	$y = 0.0361x - 0.0187$	1.0000	2.6 - 4.8
Ac-SPD	1-1000	$y = 0.0213x - 0.0659$	0.9996	5.1 - 9.9
ORN	1-1000	$y = 0.0225x + 48361$	0.9985	6.9 - 9.2
CAD	1-1000	$y = 0.0365x - 0.406$	0.9965	2.4 - 5.9
PUT	1-1000	$y = 0.0482x - 0.0344$	0.9998	3.4 - 7.7
DAP	1-1000	$y = 0.0259x - 0.112$	0.9991	0.7 - 5.6
DAc-SPD	1-1000	$y = 0.0910x + 0.0610$	1.0000	3.5 - 8.8
Ac-PUT	1-1000	$y = 0.0357x - 0.106$	0.9995	2.9 - 6.7

Table 1-3 Intraday and Interday Assays of Polyamines in Human Saliva by Proposed Procedure

Intra-day	Saliva A (fmol)	RSD (%)	Saliva B (fmol)	RSD (%)
SPM	9.76	4.89	7.76	6.53
Ac-SPM	2.87	1.04	1.23	3.10
SPD	6.69	7.25	6.72	4.56
DAC-SPM	58.2	3.95	86.4	5.81
Ac-SPD	8.00	0.560	4.27	1.65
ORN	131	4.28	50.7	8.30
CAD	51.1	5.97	59.6	5.32
PUT	185	3.23	264	5.21
DAP	173	4.56	67.0	5.71
DAC-SPD	66.6	7.30	59.4	9.22
Ac-PUT	218	9.85	331	9.08
Inter-day				
SPM	9.52	5.15	7.65	4.68
Ac-SPM	2.81	5.61	1.17	8.09
SPD	6.23	2.28	6.56	2.51
DAC-SPM	55.2	8.24	84.4	5.26
Ac-SPD	7.90	3.90	4.05	3.79
ORN	125	2.91	51.2	5.74
CAD	50.5	9.74	56.3	8.93
PUT	180	4.12	259.4	2.28
DAP	166	6.55	66.2	7.11
DAC-SPD	60.6	4.81	55.1	5.09
Ac-PUT	208	5.37	329	2.40

Table 1-4 Recovery of Polyamines Spiked in the Saliva of Healthy Volunteers

Saliva A	Intact amount (fmol)	Spiked amount (fmol)	Accuracy (%)	RSD (%)	Spiked amount (fmol)	Accuracy (%)	RSD (%)
SPM	10.9	1.70	99.2	1.6	3.30	99.3	0.7
Ac-SPM	2.80	1.70	99.5	2.2	3.30	93.1	1.7
SPD	6.70	1.70	98.8	1.2	3.30	106	2.9
DAc-SPM	67.6	16.7	92.8	3.5	33.4	103	1.3
Ac-SPD	8.50	1.70	99.9	5.0	3.30	94.1	0.90
ORN	109	16.7	99.5	1.5	33.4	97.0	2.3
CAD	55.6	16.7	96.4	3.1	33.4	101	5.9
PUT	230	16.7	102	2.9	33.4	99.0	1.5
DAP	151	16.7	86.3	1.9	33.4	93.7	1.4
DAc-SPD	74.5	16.7	108	7.0	33.4	96.5	1.3
Ac-PUT	242	16.7	96.3	3.4	33.4	96.7	4.7
Saliva B							
SPM	7.80	1.70	100	3.6	3.30	96.4	7.3
Ac-SPM	1.20	1.70	99.5	8.0	3.30	93.1	2.7
SPD	6.60	1.70	100	3.6	3.30	103	2.9
DAc-SPM	85.2	16.7	101	13	33.4	95.8	9.9
Ac-SPD	4.10	1.70	94.8	11	3.30	104	1.3
ORN	50.4	16.7	99.3	2.4	33.4	97.6	6.7
CAD	58.8	16.7	93.2	5.0	33.4	99.1	7.2
PUT	257	16.7	97.0	3.1	33.4	96.6	8.0
DAP	68.6	16.7	87.9	8.9	33.4	89.4	11
DAc-SPD	56.4	16.7	93.4	8.3	33.4	93.7	5.2
Ac-PUT	324	16.7	102	3.7	33.4	101	3.1

Table 1-5 Freeze/Thaw Stability of Polyamines in Human Saliva

polyamines	Initial (%)	Saliva A		Saliva B	
		freeze/thaw cycle		freeze/thaw cycle	
		1	2	1	2
SPM	100	95.2	101	106	99.8
Ac-SPM	100	98.8	98.5	93.4	95.5
SPD	100	102	98.8	102	101
DAc-SPM	100	98.2	89.5	98.8	93.4
Ac-SPD	100	95.9	96.7	101	101
ORN	100	88.8	92.2	92.2	93.0
CAD	100	100	97.6	98.9	97.7
PUT	100	103	98.2	99.2	97.7
DAP	100	99.9	103	98.8	99.2
DAc-SPD	100	92.2	89.1	89.9	87.7
Ac-PUT	100	94.5	102	95.5	102

1-3-5 健常人及び乳がん患者唾液中ポリアミンの定量

続いて、開発した唾液中ポリアミンの定量法を用いて、健常人と乳がん初発患者、再発患者の唾液中ポリアミン濃度を分析し、その実用性を評価した。

乳がん患者は、初発患者 8 名、再発患者 22 名そして、同年代の健常人 14 名の合計 44 名の唾液中ポリアミン量の比較を行った。

定量結果を棒グラフで表したものを Fig. 1-6-1 に散布図にしたものを Fig. 1-6-2 に示した。結果より、N アセチル体以外のポリアミンでは、CAD, ORN, SPM が若干ではあるが増加傾向にあることが判明した。一方、N アセチルポリアミン (Ac-PUT, Ac-SPD, Ac-SPM, DAc-SPD および DAc-SPM) の唾液中濃度は健常人よりも乳がん患者において非常に高い傾向であることが判明した (Fig 1-6)。また、Ac-SPD, DAc-SPD および DAc-SPM の 3 つのポリアミンは再発患者においてのみ非常に高く、唾液中においても、尿中におけるこれまでの報告された結果と矛盾しない結果となった^{73,74}。しかし、いずれも濃度に個人差が大きく、明確なバイオマーカーと言えるものはなかった。これは、唾液の濃さに個人差があることが原因であると考えられた。そこで、唾液の濃さの影響を受けない、各群内のポリアミン 11 種の全体に対する比で比較することとした。その結果、Fig 1-7 に示すように、がん発症による CAD と DAc-SPD, DAc-SPM の上昇、及び Ac-PUT, ORN が減少していることが新たに発見された。このような割合の変化のメカニズムは未だ不明であるが、単一ではなく複数のポリアミン定量値を比較することにより、より正確な診断が行える可能性が示唆された。

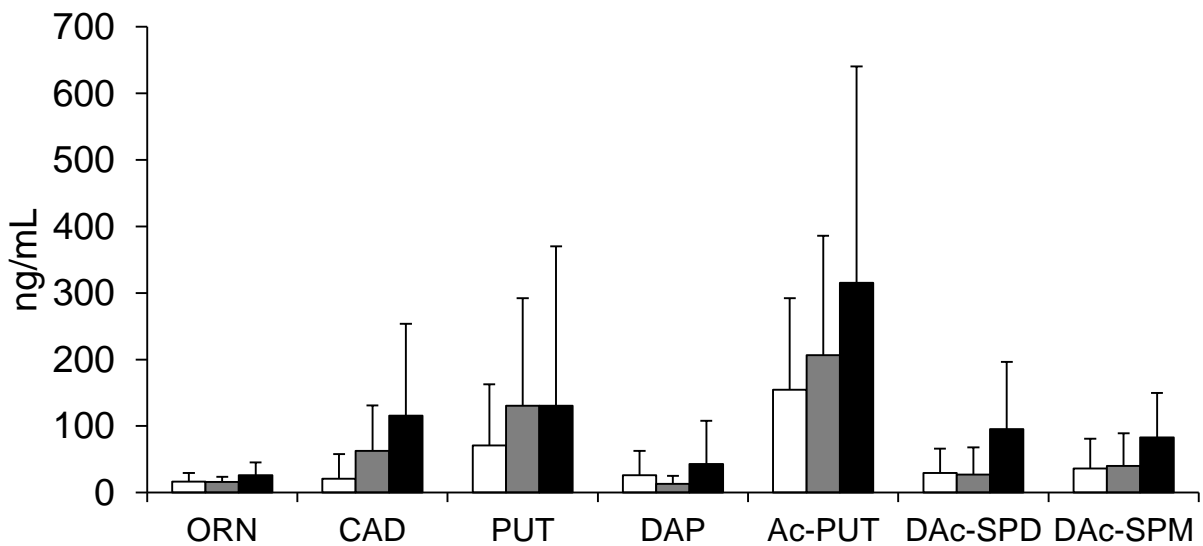
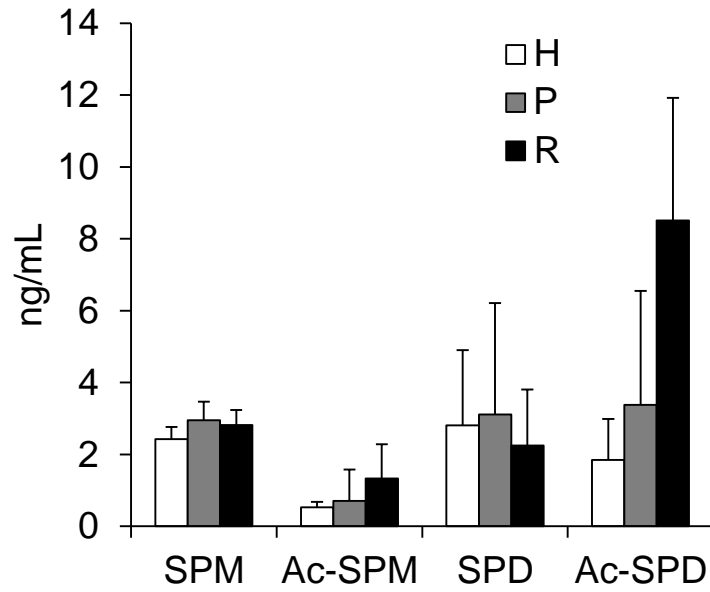


Fig. 1-6-1 Average concentration of polyamines in the saliva of breast cancer patients and healthy volunteers (mean \pm standard deviation).

H, healthy volunteer (n = 14); P, primary patient (n = 12); R, relapsed patient (n = 24).

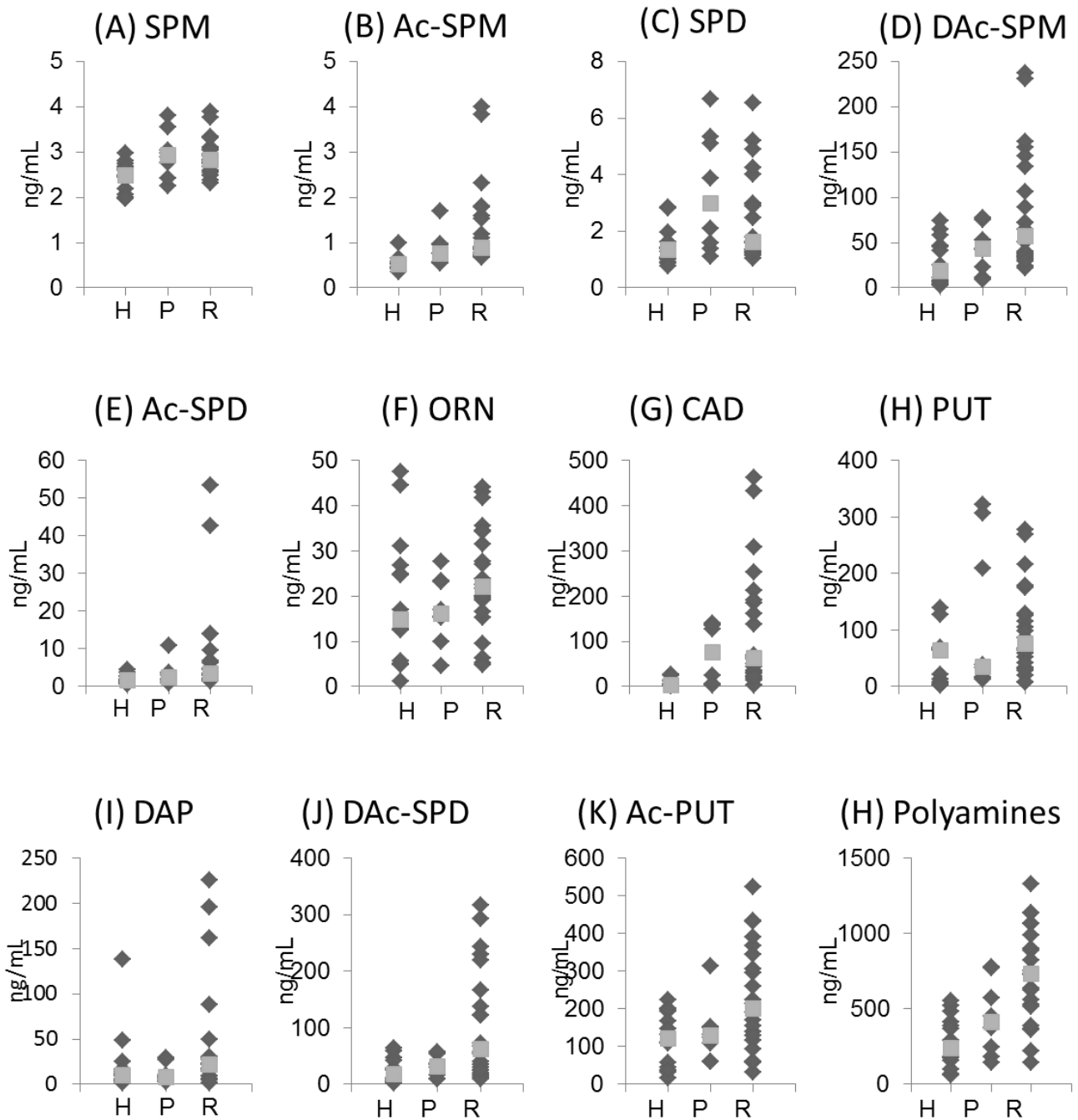


Fig. 1-6-2 Scatter plots of polyamine concentrations in the saliva of breast cancer patients and healthy volunteers. (■ : Average)

N, healthy volunteer (n = 14); P, primary patient (n = 12); R, relapsed patient (n = 24).

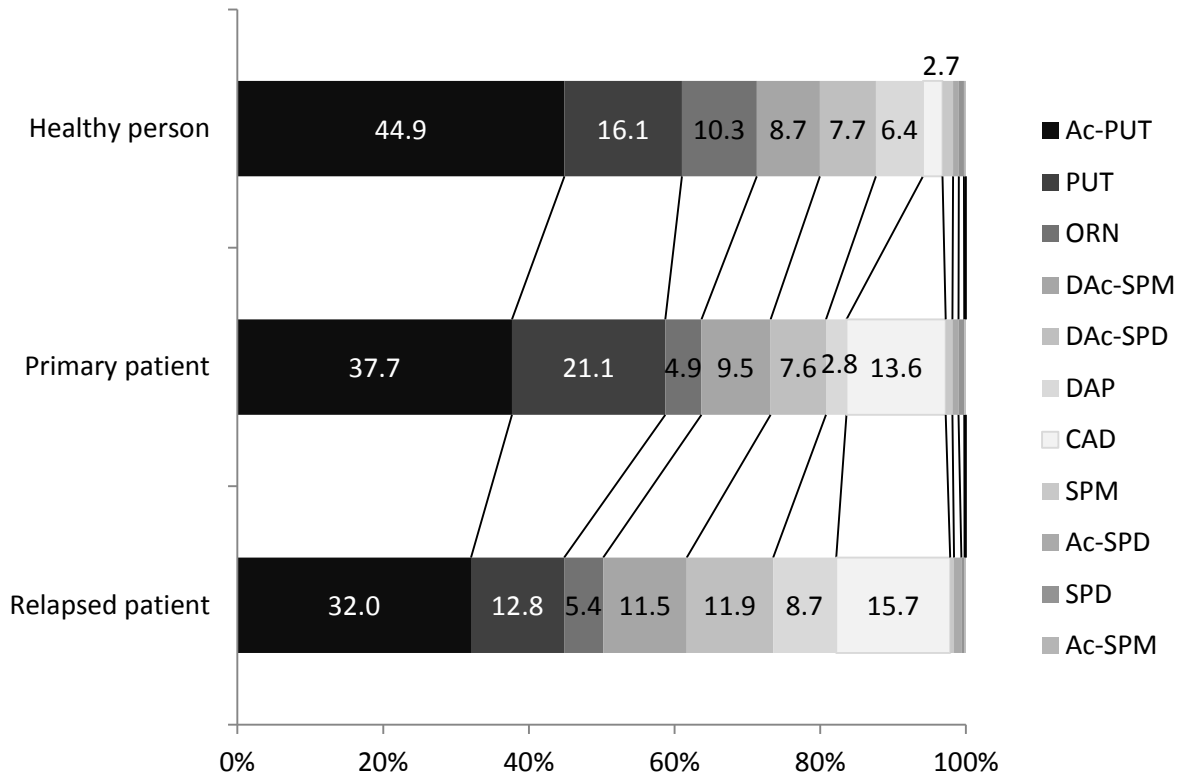


Fig. 1-7 Percentage (%) of polyamines in healthy volunteers, primary patients, and relapsed patients

第4節 小括

本章にて、LC-MS/MSを用いた唾液中11種ポリアミン(DAP, PUT, CAD, Ac-PUT, ORN, SPD, Ac-SPD, DAc-SPD, SPM, Ac-SPM, DAc-SPM)の一斉分離定量法の確立に成功した。

本法では蛍光誘導体化試薬であるDBD-Fをポリアミンに標識し、その誘導体をESI-MS/MSにて高感度測定した。分離には1.7 μm オクタデシルシリルシリカゲル(ODS)粒子充填の逆相カラムを使用し、UPLCにより10分以内に11種のポリアミンを同時分離分析することに成功した。

次に上記の方法を唾液に応用したところ、唾液中の夾雑物質に妨害されることなく、11種ポリアミンの検出することに初めて成功した。続いて唾液中ポリアミンの定量法の確立を目指し、各種分析バリデーション試験を行った結果、添加回収率86.3～107.8%、日内変動係数RSD 9.9%以下、日間変動係数RSD 9.7%以下と本法は精度、正確度ともに良好な定量法であると示唆された。また凍結・融解安定性試験では、1~3回の凍結融解においても、唾液中ポリアミンは安定に定量可能であることが示唆された。

乳がん患者と健常人の唾液中ポリアミン濃度比較では、初発、再発患者において特にジアセチルポリアミン濃度が増加傾向にあった。しかし、定量値に個人差が大きく、単一ポリアミンをバイオマーカーとすることは難しいと考えられた。そこで各群内の総ポリアミン量に対する各ポリアミンの割合を比較した結果、CADとDAc-SPD、DAc-SPMの割合が乳がん患者で上昇しており、Ac-PUT、ORNの割合が減少していた。このように11種同時に測定することにより、複数のポリアミンの比を利用した乳がんの簡易診断への応用が期待された。

第 2 章 光学活性カルボン酸のキラル誘導体化 LC-MS/MS 分析 - 唾液中 DL-乳酸, DL-β-ヒドロキシ酪酸の定量 -

第 1 節 序

生物体内での生理作用を制御する生理活性物質の多くはキラルであることが広く認知されている。例えば、近年では D-セリンが脳内で神経伝達を調節すること⁷⁵、D-アスパラギン酸が内分泌組織でホルモン分泌を制御すること⁷⁶などが確認されている。このようにアミノ酸をはじめ様々な化合物の光学異性体間での機能の違いが報告されており、光学異性体は微量であっても重要な生理活性を示す場合が多く、多種の疾患の新たなバイオマーカーとしての期待が高まりつつある。しかし、さらなる生体内光学異性体の作用の違いを解析するためには、より高感度かつ正確な光学異性体分離法が必要である。

現在、光学異性体分離法には、主に液体クロマトグラフィが用いられる。また、液体クロマトグラフィを用いて分離するにはキラルカラムを用いる方法と、キラル誘導体化試薬を用いるジアステレオマー法がある。前者はコストが高く、最適な条件検討が必要である。一方、後者はキラル標識等の操作が要求されるが、標識化試薬を自由に選択できることにより、試料中の夾雑物の影響を受けにくく、高感度検出が可能である。これらの理由により、液体クロマトグラフィを用いたキラル分離法ではジアステレオマー法が用いられることも多い⁷⁷⁻⁸⁶。また現在の標識化試薬は UV や蛍光等の検出器をターゲットにしたものは多いが、これらの検出器に比べて、より高感度に検出できる MS/MS を用いた検出をターゲットにした試薬は少ない⁸⁷⁻⁸⁹。

そこで本章では、より高感度なキラル分離を実現すべく、MS/MS 検出に応用可能なキラル分離試薬の探索を行った。今回の対象化合物は光学活性カルボン酸とし、モデルとして非ステロイド型抗炎症剤 NSAIDs [Ibuprofen (IBP), Flurbiprofen (FLP), Loxoprofen (LOP)] を用いた。市販されているキラルなアミン 8 種について光学分割能を評価した。

次にスクリーニング結果キラル分離誘導体化試薬として有用であった試薬を用い、生体内カルボン酸分析に応用した場合の有用性を評価した。対象としたカルボン酸は、乳酸 (LA), β-ヒドロキシ酪酸 (HA) とした。LA, HA はともに解糖系や脂肪酸分解が過剰に起きる糖尿病患者の体内での上昇 (乳酸アシドーシス, ケトアシドーシズ) が懸念されており、糖尿病のバイオマーカーの 1 つとして考えられている⁹⁰⁻⁹⁹。また LA, HA はともに光学活性を持つが、光学異性体間の作用の違い等は未だ報告は少ない。そこで本研究では、糖尿病患者での LA, HA の上昇において光学異性体間に差が生じるかを、唾液を用いて検討した。唾液を用いた点については、既に前章にて述べたように、非侵襲に簡易的に採取が可能で、繰り返し随時に採取ができ、血中遊離型濃度を反映できるといった利点がある^{100, 101}。しかし欠点として対象化合物の濃度が血漿などと比べ低いこと、1 回に採取できる量が限られることなどが考えられ、従来

の測定法では感度不足であると考えられていた。そこで今回の誘導体化試薬を用いた方法を適用できれば、これらの欠点を克服し、簡易診断法用検体として利用可能であると考え、唾液中の LA, HA の D 体及び L 体の定量を行い、糖尿病の新たなバイオマーカーとして有用性を評価した。

第 2 節 実験材料及び方法

2-2-1 試薬

【キラル分離誘導体化試薬候補試薬】

(*R*)-(+)-4-(3-Aminopyrrolidin-1-yl)-7-(*N,N*-dimethylaminosulfonyl)-2,1,3-benzoxadiazole (DBD-APy),

(*S*)-(+)-1-(2-pyrrolidinylmethyl)-pyrrolidine (PMP)

L-prolinamide (PA)

(3*R*)-(-)-1-benzyl-3-aminopyrrolidine (BAP),

(*S*)-(+)-1-cyclohexyl-ethylamine (CHEA)

(3*R*)-(+)-3-(trifluoroacetamido)-pyrrolidine (TFAP)

(*R*)-(-)-1-aminoindan (AI)

(*S*)-(+)-tetrahydrofurfuryl-amine (THFA),

全て東京化成より購入。構造は Fig.1 参照

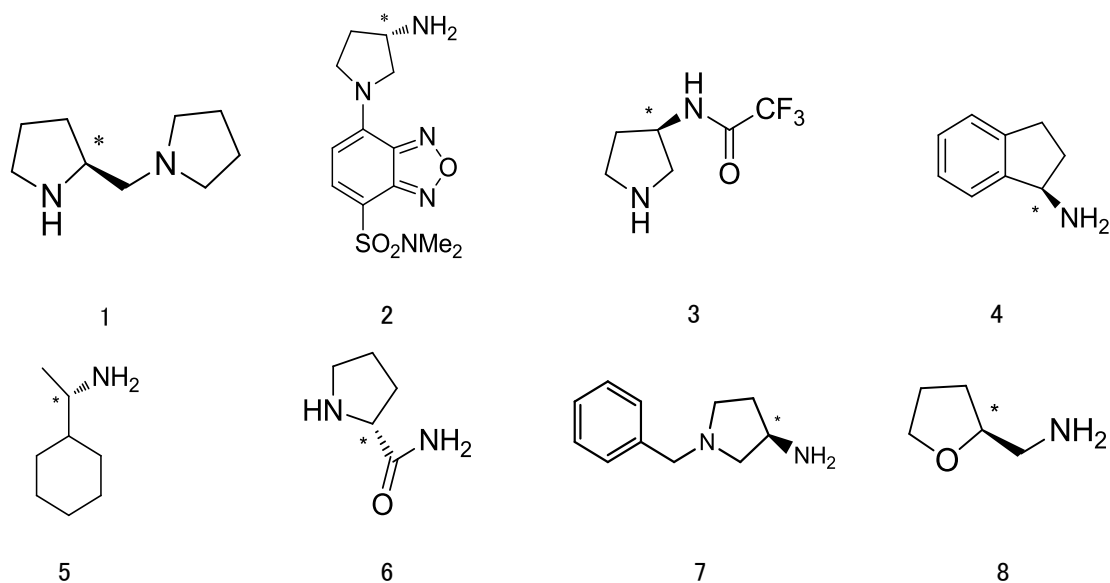


Fig. 2-1 Structures of chiral amines tested: (1) PMP, (2) DBD-APy, (3) TFAP, (4) AI, (5) CHEA, (6) PA, (7) BAP, and (8) THFA

【NSAIDs】

DL-Ibuprofen

Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)

DL-flurbiprofen

Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)

DL-Loxoprofen

第一三共

【標的化合物】

D-Lactic acids

(D-LA; Sigma-Aldrich; St. Louis, MO)

L-Lactic acids

(L-LA; Sigma-Aldrich; St. Louis, MO)

D-3-Hydroxybutyric acids

(D-HA; Kanto Chemicals; Tokyo, Japan)

L-3-Hydroxybutyric acids

(L-HA; Kanto Chemicals; Tokyo, Japan)

【内標準化合物】

DL-Lactic acid-3,3,3-*d*3

(DL-LA-*d*3; C/D/N Isotopes; Quebec, Canada)

DL-3-Hydroxybutyric acid-3,4,4,4-*d*4

(DL-HA-*d*4; C/D/N Isotopes; Quebec, Canada)

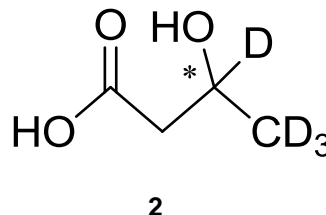
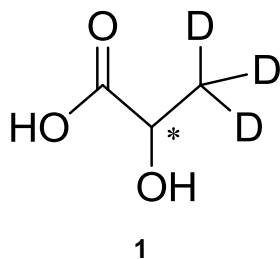


Fig. 2-2 Structures of internal standards (I.S.).

1. DL-Lactic acid-3,3,3-*d*3 (LA-*d*3), 2 DL-3-Hydroxybutyric acid-3,4,4,4-*d*4 (HA-*d*4)

【その他試薬】

ACN

関東化学

MeOH

関東化学

HCOOH

和光純薬

Triphenylphosphine (TPP)

東京化成

2,2'-Dipyridyl disulfide (DPDS)

東京化成

以下有機溶媒については、移動相の用途で用いる場合は LC-MS グレード、その他の用途で用いる場合は特級グレードを用いた。

【ラット】

♂ Wistar rats (7 weeks old) [Charles River Japan]

2-2-2 実験装置

遠心機：【生体試料】微量高速遠心機 CF16RX II型 (日立)

【生体試料以外】卓上小型遠心機 (久保田製作所)

遠心エバポレーター (溶媒留去用)：EZ-2 パーソナルエバポレーター (Genevac)

HPLC：Agilent Technologies 1100 シリーズ液体クロマトグラフ

ESI-MS/MS：Applied Biosystems API 3000 三連四重極質量分析計

UPLC：ACQUITY ultraperformance liquid chromatograph (UPLC I-class, Waters)

ESI-MS/MS：Xevo™ TQ-S triple quadrupole-mass spectrometer (Waters, Milford, MA)

2-2-3 HPLC-ESI-MS/MS

HPLC の測定条件

Column : Mightysil C18 RP column (3 μ m, 100 mm \times 2.0 mm i.d.; 関東化学)

Temperature : 40 $^{\circ}$ C,

Flow rate : 0.2 mL/min

Mobile phase A : 0.1 % Formic acid in water, Mobile phase B : 0.1% Formic acid in acetonitrile

→Mixed A and B with suitable volume (Table 2-1 参照)

Injection volume : 2 μ L

• ESI-MS/MS の測定条件 (API3000)

Detected ion mode: positive

Declustering potential: 40 V,

Focusing potential: 200 V

Entrance potential: 10 V,

Ion spray voltage: 5 kV

Curtain gas (nitrogen) pressure: 10 psi

Nebulizer gas (nitrogen) pressure: 14 psi

External turbo gas flow rate (nitrogen): 6 L/min

Turbo gas temperature: 500 $^{\circ}$ C

Collision gas pressure (nitrogen): 6 psi

Collision energy :35-40 eV (Table 2-1 参照)

Collision cell exit potential: 10 V

System: Analyst software (Version 1.3.1, Applied Biosystems)

Table 2-1 HPLC-ESI-MS/MS data for the NSAID diastereomers derivatized with chiral amines

No	ID	Mobile phase #	k'	α	Rs	CE* (eV)	Transition (precursor ion, <i>m/z</i> / product ion, <i>m/z</i>)	LOD** (fmol)
1	PMP+IBP	65/35	9.22	1.15	1.76	35	343.4[M+H] ⁺ /271.8	0.76
2	PMP+FLP	70/30	17.22	1.11	1.35	35	381.2[M+H] ⁺ /310.0	0.62
3	PMP+LOP	75/25	9.18	1.21	1.71	35	383.3[M+H] ⁺ /312.0	0.66
4	DBD-APy+IBP	40/60	11.46	1.16	2.70	40	500.4[M+H] ⁺ /202.0	0.60
5	DBD-APy+FLP	45/55	14.00	1.18	3.85	40	538.2[M+H] ⁺ /202.0	0.75
6	DBD-APy+LOP	50/50	9.88	1.11	2.12	40	540.2[M+H] ⁺ /202.0	0.57
7	TFAP+IBP	50/50	18.12	1.05	1.29	35	371.2[M+H] ⁺ /182.8	0.76
8	TFAP+FLP	60/40	38.16	1.11	2.36	35	409.5[M+H] ⁺ /182.8	0.85
9	TFAP+LOP	70/30	38.02	1.09	2.19	35	411.4[M+H] ⁺ /182.8	0.91
10	AI+IBP	40/60	16.62	1.17	1.54	40	322.4[M+H] ⁺ /116.8	0.96
11	AI+FLP	50/50	30.62	1.09	2.38	40	360.4[M+H] ⁺ /116.8	0.65
12	AI+LOP	60/40	35.34	1.11	2.85	40	362.4[M+H] ⁺ /116.8	0.68

#Mobile phase: H₂O/CH₃CN cont. 0.1% (v/v) HCOOH, *CE: collision energy

**LOD: Limit of detection

2-2-4 UPLC-ESI-MS/MS

UPLC の測定条件

Column : ACQUITY UPLC BEH C18 column (1.7 μm , 100 \times 2.1 mm i.d.; Waters)

Temperature : 40 $^{\circ}\text{C}$,

Flow rate : 0.35 mL/min

Mobile phase A : 0.1 % Formic acid in water, Mobile phase B : 0.1% Formic acid in acetonitrile C: 0.1 % Formic acid in methanol

→Mixed A, B and C with suitable volume (Table 2-2 参照)

Injection volume : 2 μL

ESI-MS/MS の測定条件

Detected ion mode: positive

capillary voltage: 3.00 kV

cone voltage: 50V

desolvation gas flow: 1,000 L/h

cone gas flow: 150 L/h

nebuliser gas flow: 7.0 L/h

collision gas flow: 0.15 mL/min

collision energy: 20-25 eV (Table 2-2 参照)

collision cell exit potential: 5 V

desolvation temp: 500 $^{\circ}\text{C}$

Analytical software: MassLynx, version 4.1

Table 2-2 Separation and detection of LA and HA enantiomers derived from chiral amines by UPLC-ESI-MS/MS

Diastereomers	Mobile Phase	tR		α	Rs*	CE** (eV)	Transition (precursor ion, <i>m/z</i> / product ion, <i>m/z</i>)	LOD*** (fg)
	(H ₂ O/MeOH/MeCN in 0.1% HCOOH)	L-LA, D-HA	D-LA, L-HA	k'_1/k'_2				
PMP-LA	98/1.6/0.4	1.9	2.7	1.39	4.87	20	227.2[M+H] ⁺ /156.0	5.4
PMP-HA	98/1.6/0.4	3.8	6.2	1.63	9.4	20	241.0[M+H] ⁺ /170.0	11.5
S-DBD-APy-LA	75/20/5	10.0	9.6	1.04	1.08	25	384.2[M+H] ⁺ /202.0	-
R-DBD-APy-HA	75/20/5	11.6	12.0	1.03	0.85	25	398.2[M+H] ⁺ /202.0	-
R-AI-LA	75/20/5	7.4	7.2	1.03	1.08	25	206.2[M+H] ⁺ /116.8	-
S-AI-HA	75/20/5	7.9	7.4	1.06	2.6	25	220.2[M+H] ⁺ /116.8	32.8
TFAP+DL-LA	95/5/0	9.5	9.5	-	-	25	255.1[M+H] ⁺ /182.8	-
TFAP+DL-HA	95/5/0	14.3	14.3	-	-	25	269.3[M+H] ⁺ /182.8	-

The values of k' , α and Rs were calculated using the following equations:

$$k' = (t_R - t_0)/t_0, \quad \alpha = k'_1/k'_2, \quad Rs = 2 \times (t_{R2} - t_{R1}) / (W_1 + W_2)$$

where t_R , t_{R1} and t_{R2} are the retention times of the peaks, t_0 is the void volume of the column, and W_1 and W_2 are the bases of the triangles derived from the peaks.

2-2-5 誘導体化反応の最適時間

室温にて縮合剤である TPP 及び DPDS 存在下で, IBP (10 μ M) に対し PMP (1.0 mM) を加え, 反応液を 5, 15, 30, 60, 90, 120, 180 分の各時間に採取し, 溶媒留去後, 残渣を移動相に再溶解し, HPLC-ESI-MS/MS で分離分析した. 各々の時間における反応液中 PMP-IBP 誘導体のピーク面積を比較し, 最適反応時間を決定した. 測定は Multiple Reaction Monitoring (MRM) モード m/z 343.3 \rightarrow 271.8 (親イオン \rightarrow 娘イオン) で行った. 他の NSAIDs-キラルアミンの反応も同様に行った.

誘導体化反応は Fig 2-3 参照.

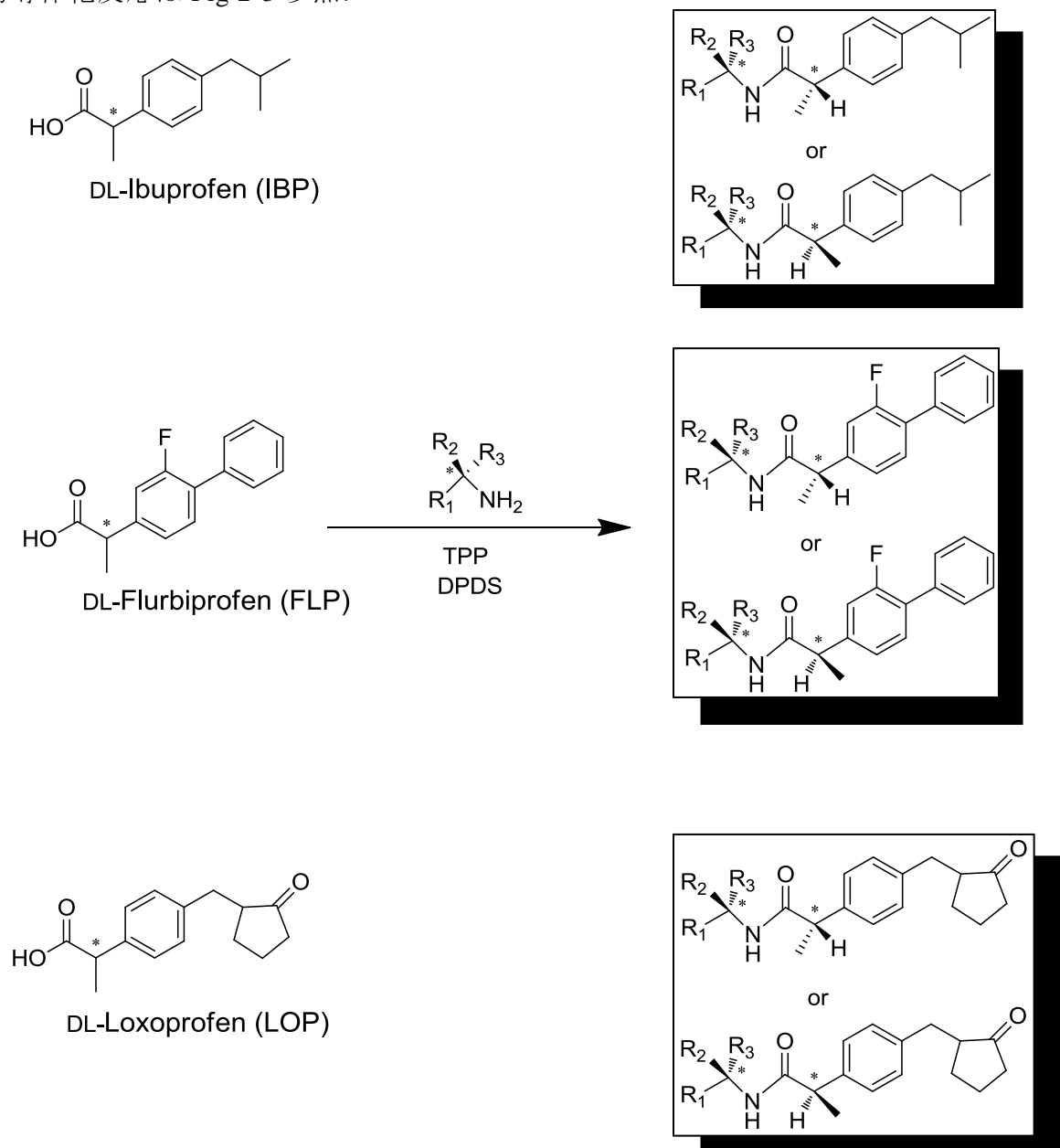


Fig. 2-3 Derivatization reactions of NSAID enantiomers with chiral amines in the presence of activation reagents.

2-2-6 NSAIDs (IBP, FLP, LOP) を用いた誘導体化試薬スクリーニング

TPP (10 mM) 100 μ L, DPDS (10 mM) 100 μ L の混合液にキラルアミン (1 mM) 100 μ L を加え活性化させた後, NSAIDs (10 μ M) 100 μ L を加え室温で 90 分間反応させた. 反応液の溶媒を留去し, 残渣に移動相を加え得たサンプルを HPLC-ESI-MS/MS にて測定した. 各々の NSAIDs-キラルアミンの組み合わせで, 親イオン-娘イオンを決定し, 最適な MS/MS 装置のパラメーターを決定した (Table 2-1).

また, 最適化した測定条件下における, 各種ジアステレオマーの保持係数 k' , 分離係数 α , 分離度 R_s , 検出限界 LOD ($S/N = 5$) を算出した. それぞれの計算式は以下の通り

$$k' = (t_R - t_0)/t_0,$$

$$\alpha = k'_1/k'_2,$$

$$R_s = 2 \times (t_{R2} - t_{R1}) / (W_1 + W_2)$$

(t_R, t_{R1}, t_{R2} は各ピークの溶出時間, t_0 はカラムに保持されされない成分の溶出時間. W_1, W_2 はピーク幅.)

2-2-7 実試料への応用 (ラット血漿中 NSAIDs の検出)

ラット血漿 0.1 mL に対し NSAIDs (0.1 mL, 10 nM) を 0.3 mL 添加し, 15 分間攪拌した. 遠心分離 (3000rpm, 10 min) 後, 上清を除タンパクプレート [Sirocco Protein Precipitation Plate (Waters, Milford, MA, USA)] を用いて処理した. ろ液 250 μ L を採取し, 溶媒留去後, 0.1 mL のアセトニトリルに再溶解した. その後, 得た溶液にキラルアミン (1 mM), TPP (10 mM), DPDS (10 mM) をそれぞれ 0.1 mL 加え, 誘導体化を行った. 反応液を溶媒留去後, 移送相 0.4 mL に再溶解し, HPLC-ESI-MS/MS 分析をおこなった. 条件は Table 2-1 に従った.

動物実験は, 静岡県立大学の動物実験のための倫理委員会のガイドラインによって行なわれた. ラットは, 12 時間の暗明サイクル, 室温を 23 度とし, 飼料と水の摂取は制限なく飼育された. ラット血液採取の前にはジエチルエーテル麻酔を用い, 血液は下行大動脈から採取し, ヘパリン処理されたポリエチレンチューブに収集された. さらに 10 分間, 3000rpm で遠心分離し血漿を得た.

2-2-8 DL-LA, DL-HA に対する最適キラル分離誘導体化試薬の探索

DL-LA, DL-HA 各々 10 μM を用い、第 2 節でカルボン酸の光学分離能が高かったアミン PMP, DBD-APy, TFAP および AI について、光学分離分析を試みた。誘導体化反応方法は Fig 2-3 と同様である。

誘導体化後、反応液の溶媒を留去し、残渣に移動相を加え得たサンプルを UPLC-ESI-MS/MS にて測定した。DL-LA, DL-HA 誘導体各々の親イオン-娘イオンを決定し、最適な MS/MS 装置設定、分離パラメーターを算出し、DL-LA, DL-HA の分離に最適な誘導体化試薬を決定した (Table 2-2)。各種パラメーターの算出法は 2-2-6 と同様。

誘導体化反応の最適時間には、導体化試薬は LA, HA とともに光学分割可能であった PMP (1.0 mM) を用いた。分析機器は UPLC-ESI-MS/MS で測定し、Multiple Reaction Monitoring (MRM) モード PMP-LA: m/z 227.2 \rightarrow 156.0, PMP-HA m/z 241.1 \rightarrow 170.1 (親イオン \rightarrow 娘イオン)で行った。実際の方法は 2-2-5 に従った。

2-2-9 唾液の採取

唾液 (1 mL) は直接試験管に採取し、直ちに -20°C で凍結保存した。使用直前に遠心分離 (3000rpm, 10min) し変性したムチンを沈殿させた後上清をサンプルとして用いた。被験者は採取 30 分前から飲食を、さらには唾液中の血液の混入を防ぐため、1 時間前から歯磨きを控えてもらった。糖尿病患者は 44 歳から 69 歳の 10 名 (男/女 = 5/5)、健常人は 42 歳から 61 歳の 10 名 (男/女 = 6/4) の方から採取した。(本研究に用いた唾液の採取及び分析は、静岡県立大学及び沼津市立病院の倫理審査のもと個人情報管理等を配慮し、倫理指針に準拠した)

2-2-10 唾液の前処理

内標準物質 DL-LA-*d3*, 930 pg (10 pmol) と DL-HA-*d4*, 108 pg (1 pmol) を 300 μL (100 nM / 溶媒 ACN) ずつ加えた試験管に唾液サンプル 100 μL を加え、ボルテックスミキサーで 1 分間攪拌後、室温で 15 分放置した。混合液を遠心分離 (3,000rpm, 10 min) 後、上清を全量採取し、Sirocco 除タンパクプレートでフィルターろ過を行った。濾過後、350 μL 採取し、遠心エバポレーターで溶媒除去後、ACN 100 μL に再溶解した (唾液サンプル)。

上記で調製した唾液サンプルに PMP, AI (1 mM) 100 μL と縮合剤 TPP (10 mM) 100 μL , DPDS (10 mM) 100 μL を加え室温で 90 分反応させた (溶媒は全て ACN)。反応後、遠心エバポレーターにより溶媒を除去し、各々初期溶媒 400 μL に再溶解し測定サンプルとして UPLC-ESI-MS/MS にて測定した。

2-2-11 分析バリデーション

【検量線】

DL-LA 100 μL (2.5, 12.5, 25.0, 125, 250 ng/mL) と DL-HA 100 μL (0.5, 2.5, 12.5, 25.0, 50 ng/mL) に対し、内標準物質 DL-LA-*d3* (25 ng/mL) と DL-HA-*d4* (12.5 ng/mL) を 100 μL 加え、PMP 及び AI にて誘導体化後、UPLC-ESI-MS/MS にて測定した。検量線は各々誘導体と内標準物質誘導体の比の値と濃度を用いて作成した。(N=5)

【日内・日間変動】

日内・日間変動係数は4人の健常人より採取した唾液 (Saliva A-D) を用いた。日内変動では繰り返し5回、日間変動では5日間の測定を行い、それぞれ定量値の RSD (%) を算出した。

【添加回収試験】

2種の健常人唾液 (Saliva C, D) 90 μL に DL-LA (450, 900 pg), DL-HA (104, 208 pg) を 10 μL 添加し、前述の UPLC-ESI-MS/MS を用いた定量法を用いて唾液中 DL-LA, DL-HA を定量した。標品添加唾液と非添加唾液中の DL-LA, DL-HA の定量値を比較し、添加回収率を算出した。添加回収率は $F/(F_0+A) \times 100$ (%) [F: 標品添加唾液中 LA, HA 濃度, F_0 : 非添加唾液中 LA, HA 濃度, A: 標品添加量] で算出した。

第 3 節 実験結果及び考察

2-3-1 キラルなアミンを用いた NSAIDs 誘導体化

カルボン酸とアミンが反応してアミドを生成する反応では、活性化試薬による縮合反応が一般的で、本研究で縮合剤として採用した TPP と DPDS 存在下の脱水縮合反応は、通常室温のような穏やかな条件の下で進むことが知られている¹⁰²。また、TPP, DPDS を用いた反応は、有機溶媒存在下での反応が望ましいとの報告があり¹⁰³、試薬はすべてアセトニトリル溶液を使用した。本実験で採用した誘導体化反応式を Fig. 2-2 に示した。

誘導用の反応時間は、DL-IBP と PMP の反応により最適化した。Fig. 2-4 に示されるように、誘導体化反応率は時間経過とともに進行しており、生成物のピーク面積は 90 分後に最大となり、その後は一定であった。誘導化反応の時間的経過は、光学異性体間でほぼ違いはなかったため、ともに最適時間は 90 分とした。

また本実験で使用した他の試薬についても、同様の結果となり、この結果と本研究室で以前報告された結果から、TPP, DPDS 存在下、アセトニトリル中、室温でのキラルアミンによるキラル NSAIDs の誘導体化反応の最適時間は、90 分であることが示唆された¹⁰³。

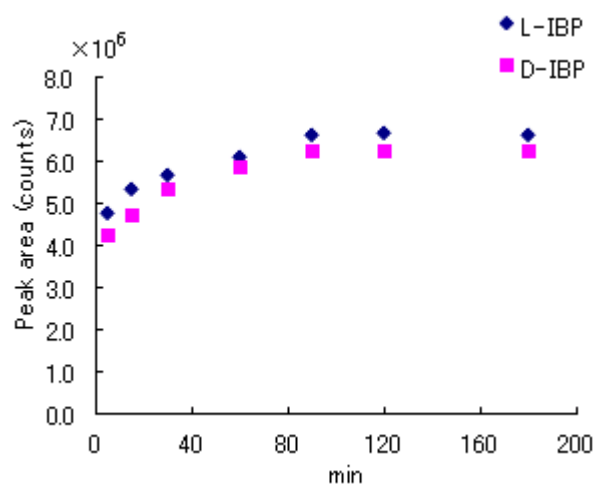


Fig. 2-4 Time courses of the reaction of DL-IBP with PMP at room temperature.

2-3-2 NSAIDs 誘導体ジアステレオマーの HPLC-MS/MS 分離分析

8種のキラルアミンにより誘導体化されジアステレオマーとなった DL-IBP 誘導体は水/アセトニトリル系 (0.1% HCOOH 含) を移動相とする逆相系の分離モードでの分離を試みた。

結果、PMP, DBD-APy, TFAP および AI に由来した DL-IBP ジアステレオマーは、一定組成の移動相条件下で良好に分離された。しかし、PA, BAP, CHEA および THFA 由来の DL-IBP ジアステレオマーの分離は不十分であった。分離に成功した DL-IBP ジアステレオマーの MS/MS スペクトルについては Fig. 2-5 に示した。また各ジアステレオマーの親イオン→娘イオン、検出限界 (S/N = 5) については Table 2-1 に示した。PMP 以外は誘導体化試薬由来の娘イオンとなっており、MRM モードにおいて、どのカルボン酸においても娘イオンが一定であるため、LC-MS/MS 用誘導体化試薬として有効であることが示唆された。また PMP に関しても、常に生成化合物よりピロリジン (m/z 70.2) の部分が切れたものが娘イオンになることが判明しており、試薬特有の娘イオンが検出されることから、LC-MS/MS 用誘導体化試薬として有効であることが示唆された。

この結果を受け、PMP, DBD-APy, TFAP および AI に対しては、さらに DL-FLP と DL-LOP の分離についても検討した。これら4種の試薬のキラル誘導体化能を評価すべく、保持係数 k' , 分離係数 α , 分離度 R_s を算出し、Table 2-1 に示した。また各々の NSAIDs で最も分離が良かったジアステレオマーのクロマトグラムを Fig. 2-6 に示した。クロマトグラムから明らかなように、各々試薬により分離度は異なっていたが、これら4種の試薬について、キラルなカルボン酸に対する LC-MS/MS 用キラル誘導体化試薬として有用であることが示唆された。

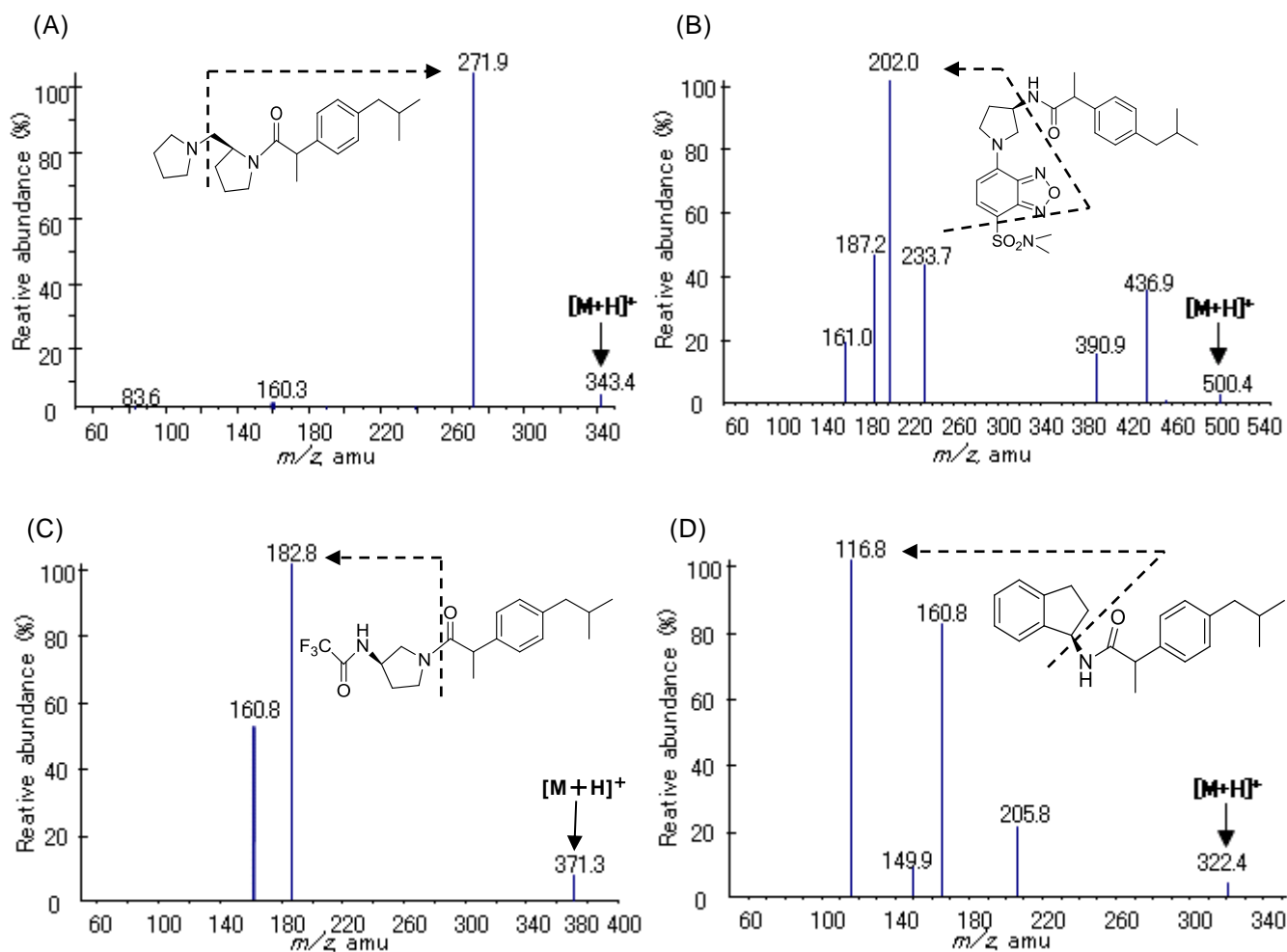


Fig. 2-5 ESI-MS/MS spectra of the derivatives obtained from the reaction of DL-IBP with chiral amines (A) PMP, (B) DBD-APy, (C) TFAP, and (D) AI. The MS/MS spectra were recorded by the collisional activation of $[M + H]^+$ of the respective derivatives. The other conditions are described in Table 2-1.

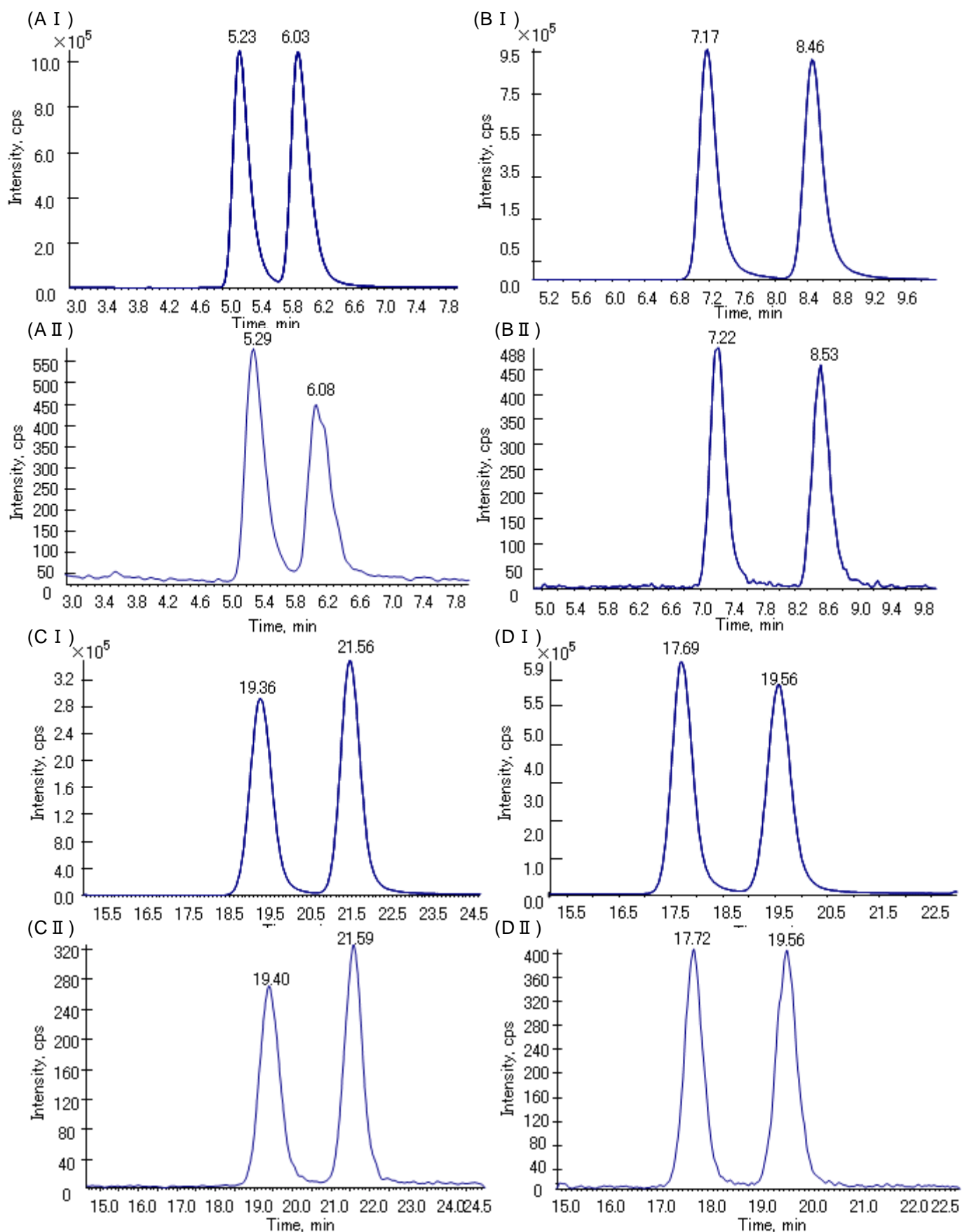


Fig. 2-6 MRM chromatograms of the diastereomers obtained from authentic NSAIDs (A) PMP + DL-IBP, (B) DBD-APy + DL-FLP, (C) TFAP + DL-FLP, and (D) AI + DL-LOP. Injected amounts of each enantiomer of IBP, FLP, and LOP: (I) 47 pmol and (II) 4.7 fmol. The HPLC–ESI–MS/MS conditions are described Table 2-1.

2-3-3 ラット血漿中検出への応用

生体試料中の分析への応用例として、ラット血漿中に NSAIDs が存在した場合に PMP, DBD-APy, TFAP および AI を誘導体化試薬として使用可能であるかを検討した。

ラット血漿に添加された NSAIDs を検出した MRM クロマトグラムは Fig.2-7 に示した。血漿中の各ジアステレオマーの MRM クロマトグラムは, Fig. 2-6 の標品の MRM クロマトグラムと形状, ピーク強度ともに, ほぼ再現性が見られ, 血漿に添加された NSAIDs は内因性物質の妨害なく, 完全に分離検出されたと考えられた。従って、これらの 4 種の試薬を用いれば, 血漿中においても, キラルなカルボン酸をジアステレオマーとして分離検出することが可能であると示唆された。

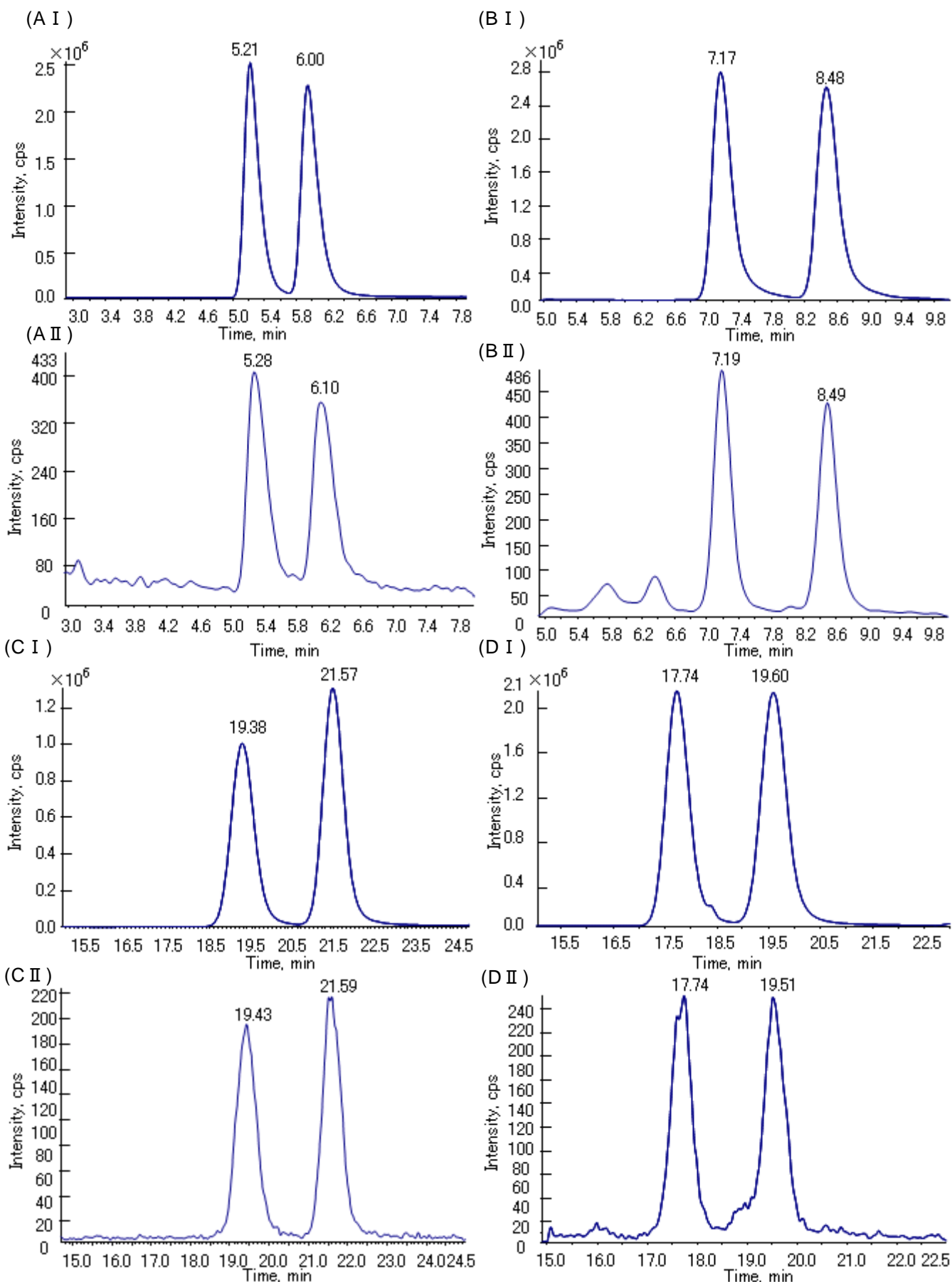


Fig. 2-7 MRM chromatograms of the diastereomers obtained from NSAIDs spiked in rat plasma (A) PMP + DL-IBP, (B) DBD-APy + DL-FLP, (C) TFAP + DL-FLP, and (D) AI + DL-LOP. Spiked mounts of DL-IBP, DL-FLP, and DL-LOP to 0.1 mL plasma: (I) 30 nmol and (II) 3 pmol. The HPLC-ESI-MS/MS conditions are described in Table 2-1.

2-3-4 DL-LA, DL-HA に対する最適キラル分離誘導体化試薬の探索

NSAIDs に対する光学分離能が高かった光学活性アミンの PMP, DBD-APy, TFAP および AI について、各々 DL-LA, DL-HA と反応させ、光学分離分析を試みた。その結果、DL-LA に対しては PMP 誘導体が $R_s = 4.91$ と唯一有効で、DL-HA に対しては PMP 誘導体 ($R_s = 9.37$), AI 誘導体 ($R_s = 2.64$) がキラル分離可能であることが判明した (Table 2-2 参照)。一方、TFAP 誘導体は、様々な溶媒割合を試したが、ピークが 1 本しか検出されず、今回検討した簡易的な分離モードではジアステレオマーの分離は不可能であった。DBD-APy 誘導体は、ピークが割れキラル分離の可能性はあるが、TFAP 誘導体同様、分離は不可能であると判断した。これは標的化合物に対し誘導体化試薬の構造が大きすぎたため、ジアステレオマー間の構造の差が分離に反映されなかったと考えられた。以降、唾液中の DL-LA, DL-HA の定量を行う際も、DL-LA に対しては PMP, DL-HA に対しては PMP, AI を誘導体化試薬として用いたキラル分離を行うこととした。また、これらの結果から、ジアステレオマー法におけるキラル分離において、1 つの誘導体化試薬が全てのキラル化合物に対して有用に分離を促すとは考え難く、標的化合物に合わせて、数種類の誘導体化試薬との組み合わせを検討する必要があることが示唆された。

誘導用の反応時間は、Fig 2-8 に示されるように、DL-LA 及び DL-HA と PMP の反応で最初に最適化した。誘導体化は時間経過により進行し、生成物のピーク面積は 90 分後に最大となり、その後は一定であった。誘導化反応の時間的経過は、光学異性体間でほぼ違いはなかったため、ともに最適時間は 90 分とした。

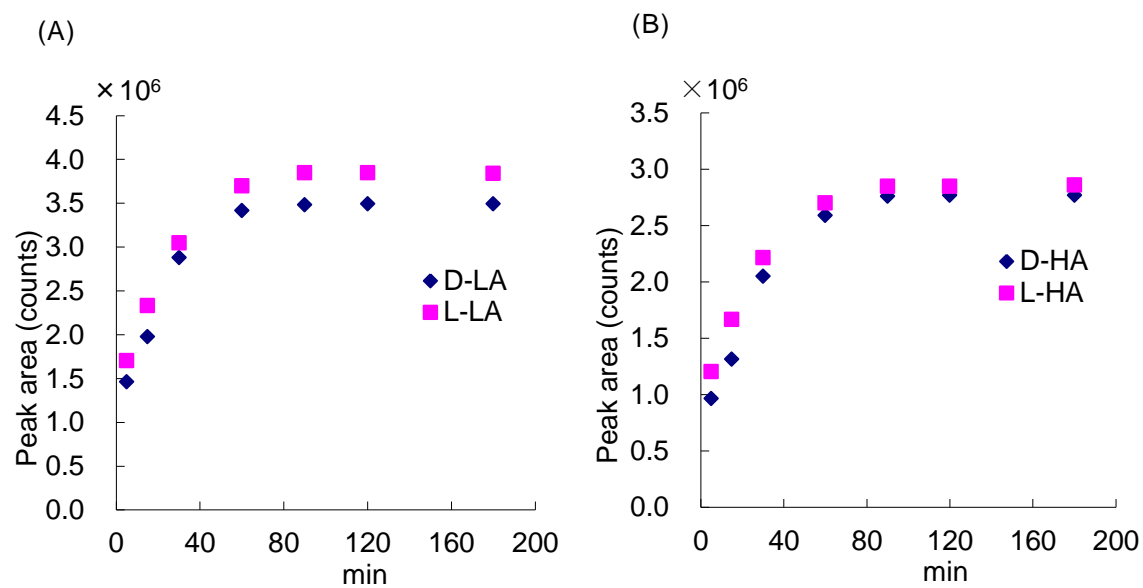


Fig. 2-8 Time courses of the a b reaction of carboxylic acids with PMP at room temperature.

(A) Enantiomers of LA. (B) Enantiomers of HA. The derivatization conditions are described in the “2-3-1-4” section

2-3-5 DL-LA, DL-HA 誘導体の UPLC-ESI-MS/MS 分析

DL-LA に対しては PMP を, DL-HA に対しては PMP, AI を誘導体化試薬として用い, 生成物を UPLC-ESI-MS/MS にて測定した. また今回, 内標準物質として用いた安定同位体である LA-*d3* と HA-*d4* の構造を Fig. 2-2 に示し, MS モードにて測定し得た LA, LA-*d3*, HA, HA-*d4* の PMP 誘導体 MS スペクトルを Fig. 2-9 (A1-4) に示し, 各々検出した誘導体のイオンを親イオンとして MS/MS 測定した結果を Fig. 2-9 (B1-4) に示した. PMP に関して LA 誘導体と HA 誘導体の親イオン→娘イオンは m/z 227.2→156.0, 241.1→170.1 であり, 第 2 節での結果同様, 生成化合物よりピロリジン (m/z 70.2) の部分が切れたものが娘イオンになった. さらに, データは示していないが AI-HA 誘導体に関しても, 試薬由来の m/z 116.8 の娘イオンが得られ, Fig 2-5(D) と矛盾しない結果となった. 検出限界は PMP-LA 誘導体が 5.38 fg, PMP-HA 誘導体が 11.5 fg, AI-HA 誘導体が 32.8 fg とすべて高感度に検出が可能であった.

また LA-*d3* 誘導体は LA 誘導体の $m/z + 3$, HA-*d4* 誘導体は HA 誘導体の $m/z + 4$ のイオンが検出されたため, これらの安定同位体化合物も同様に検出可能であると考えられた.

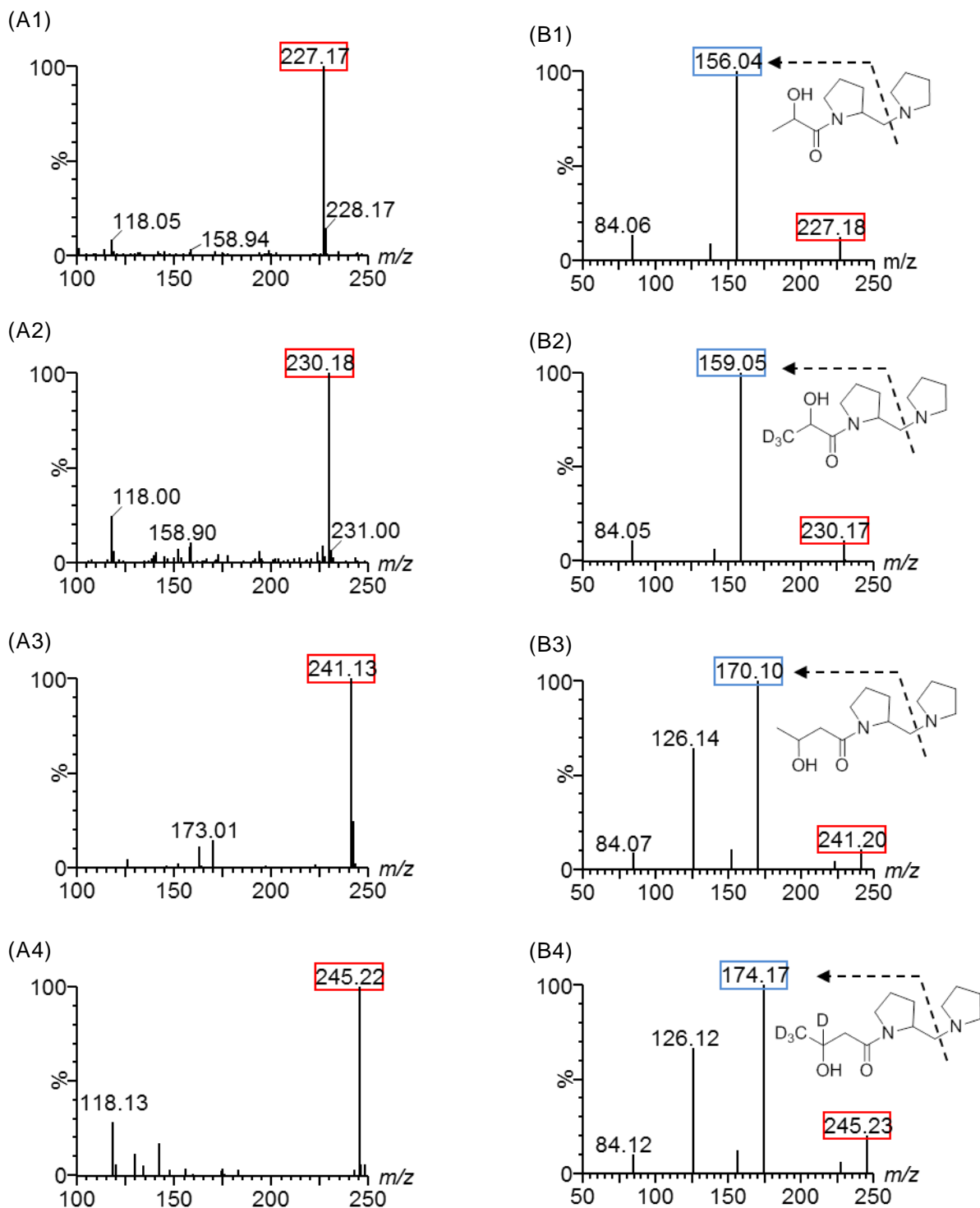


Fig. 2-9 Mass spectral features of the derivatives obtained from S-PMP.

A: Mass spectra; B: MS/MS spectra.

1. PMP-LA, 2. PMP-LA-*d*3, 3. PMP-HA, 4. PMP-HA-*d*4.

The MS/MS spectra were recorded by the collisional activation of $[M+H]^+$ of the respective derivatives. The other conditions are described in the “1-3-6” section and Table 1

2-3-6 唾液中 DL-LA, DL-HA の分析

唾液中 DL-LA, DL-HA の UPLC-ESI-MS/MS での分離検出を目的に検討を行った。内標準物質を用いた定量法の開発を念頭に置き、まず健常人の唾液に各々の内標準物質を添加し、DL-LA, DL-HA 及び、DL-LA-*d*3, DL-HA-*d*4 の唾液中での同時誘導体化さらに同時 LC-MS/MS 分析 (MRM モード) を検討した。

結果を Fig. 2-10 に示し、A1-4 には各々標品のクロマトグラム、B1-4 には唾液中の各成分のクロマトグラムを示した。標品の各成分の溶出時間は、1.93 (L-LA), 2.71 (D-LA), 1.92 (L-LA-*d*3), 2.70 (D-LA-*d*3), 3.81 (L-HA), 6.20 (D-HA), 3.72 (L-HA-*d*4), 6.05 (D-HA-*d*4) となり、それぞれ対応する成分とほぼ同時に溶出しており、このことから、これらの安定同位体が LA 及び HA の内標準物質として有用であると示唆された。

また唾液中でも LA, HA, 内標準物質ともに検出され、夾雑ピークによる妨害もなく、標品と同様な分離度で検出された。唾液中においても D-LA は検出することができ、健常人唾液では L-LA に比べ約 10%含まれていることが判明した。D-HA もまた唾液中に検出可能であり、健常人唾液には L 体に比べ約 50%含まれていた。

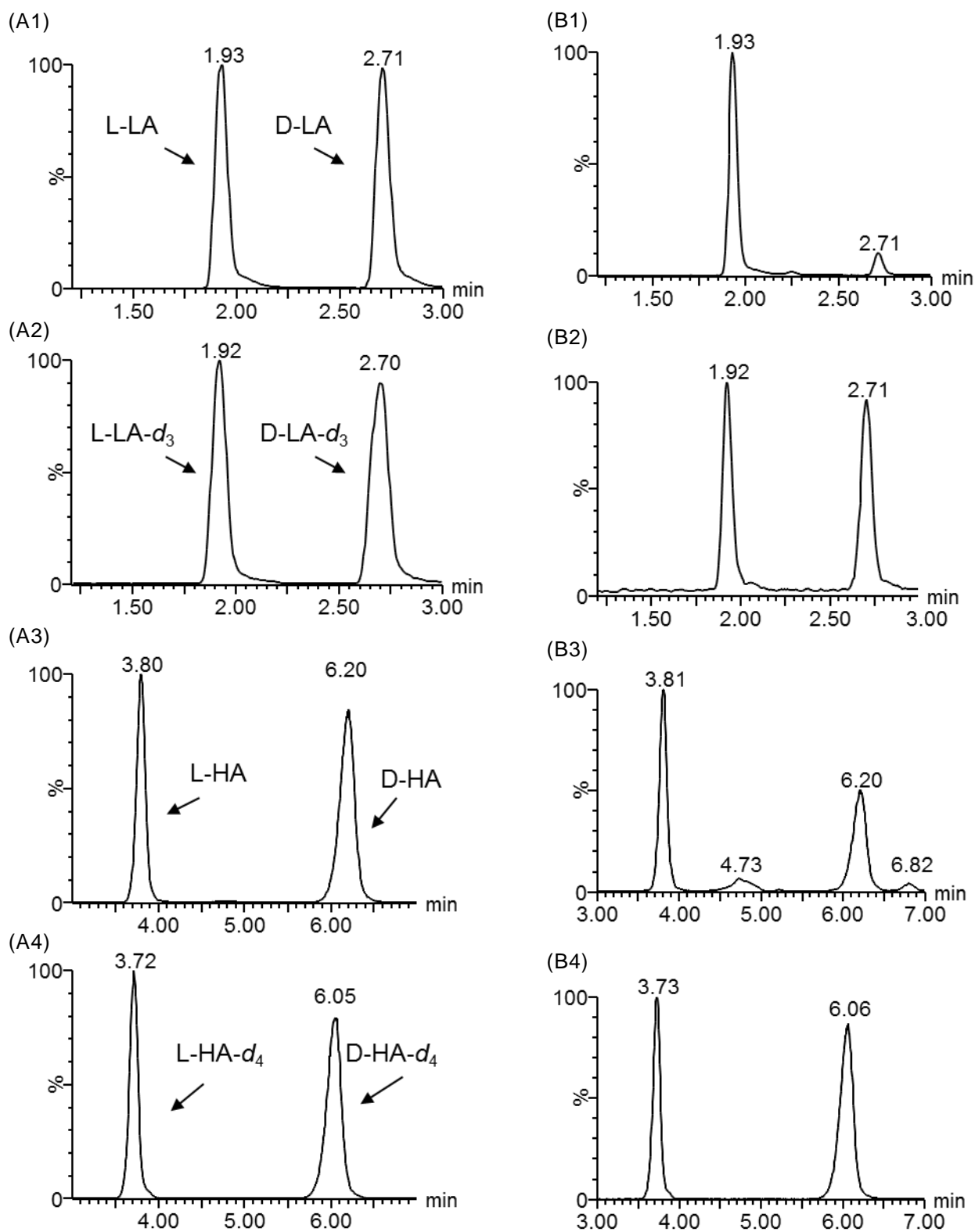


Fig. 2-10 MRM chromatograms of the diastereomers obtained from authentic carboxylic acids and saliva of a healthy volunteer.

A: Authentic carboxylic acids (injection amount, 25 fmol each); B: Saliva.

The UPLC–ESI-MS/MS conditions are described in the “Experimental” section and Table 1

2-3-7 分析バリデーション

S-PMP を誘導体化試薬として用い LA と HA の D 及び L-体の検量線[X: LA or HA 濃度 (ng/mL), Y: LA or HA 誘導体 / I.S. ピーク面積比] を作成した結果, DL-LA 及び DL-HA に関して 2.5-250 (ng/mL) 及び 0.5-50 (ng/mL) の範囲における回帰直線の決定係数 (r^2) は 0.9979 – 0.9998 と直線性の高い値であった. また検量線の傾きの変動係数 CV 値も全て 8.32 以下で良好な値で, 本法が検量線作成に適していることが示唆された(Table 2-3).

精度を精査する目的で異なる LA 及び HA 濃度の唾液 2 種類を用いて, 日内, 日間変動試験を行った. n=5 で試験したところ, 日内変動係数は 9.89%以下, 日間変動係数は 9.27%以下であり, 本法が精度に優れていることが確認できた (Table 2-4).さらに, 本法の正確度を添加回収試験から評価した. その結果, 添加回収率は 97.7%以上で, この値は生化学分析での許容範囲であり, 本法が正確度に優れていることが明らかとなった (Table 2-5).

Table 2-3 Calibration curves of LA and HA enantiomers derived from S-PMP (n=5)

Carboxylic acid	Calibration range (ng/mL)	Linear equation	Linearity (R^2)	CV (%)
L-LA	2.5 - 250	$y = 0.2227x - 0.0569$	0.9998	2.33 - 7.32
D-LA	2.5 -250	$y = 0.2514x - 0.1927$	0.9979	2.67 - 7.54
L-HA	0.5 - 50	$y = 0.0139x - 0.0350$	0.9994	0.96 - 8.27
D-HA	0.5 - 50	$y = 0.0142x - 0.0381$	0.9995	0.720 - 3.97

Table 2-4: Intra-day and Inter-day assays of LA and HA enantiomers derived from S-PMP (n=5)

Intra-assay	D-LA	L-LA	DL-LA
Saliva A (ng/mL)	12.9 ± 0.472	87.5 ± 8.65	100 ± 9.00
RSD (%)	3.65	9.89	8.97
Saliva B (ng/mL)	10.1 ± 0.571	122 ± 10.5	132 ± 10.9
RSD (%)	5.69	8.64	8.24
Inter-assay	D-LA	L-LA	DL-LA
Saliva A (ng/mL)	13.1 ± 1.22	87.4 ± 3.48	101 ± 4.24
RSD (%)	9.27	3.99	4.22
Saliva B (ng/mL)	9.86 ± 0.492	121 ± 9.03	131 ± 9.35
RSD (%)	4.91	7.46	7.14
Intra-assay	D-HA	L-HA	DL-HA
Saliva C (ng/mL)	2.73 ± 0.0204	13.4 ± 0.121	16.2 ± 0.140
RSD (%)	0.0.733	0.903	0.864
Saliva D (ng/mL)	8.37 ± 0.0301	22.6 ± 0.409	31.0 ± 0.435
RSD (%)	0.358	1.81	1.40
Inter-assay	D-HA	L-HA	DL-HA
Saliva C (ng/mL)	2.78 ± 0.0499	13.8 ± 0.721	16.5 ± 0.719
RSD (%)	1.79	5.22	4.34
Saliva D (ng/mL)	8.46 ± 0.241	22.2 ± 1.25	30.6 ± 1.33
RSD (%)	2.84	5.63	4.35

Table 2-5: Recovery of LA and HA enantiomers spiked in the saliva of healthy volunteers (n=5)

Saliva E		Intact Sample	Spiked sample (+4.50 ng/mL)	Spiked sample (+9.00 ng/mL)
D-LA	measured (ng/mL)	10.0	14.8 ± 0.21	18.8 ± 0.85
	Expected (ng/mL)		14.5	19.0
	Accuracy (%)		102 ± 1.45	99.4 ± 4.48
L-LA	measured (ng/mL)	97.2	102 ± 5.11	106 ± 4.38
	Expected (ng/mL)		102	106
	Accuracy (%)		99.9 ± 5.02	99.4 ± 4.12
Saliva F		Intact Sample	Spiked sample (+1.04 ng/mL)	Spiked sample (+2.08 ng/mL)
D-HA	measured (ng/mL)	4.90	5.77 ± 0.110	6.84 ± 0.201
	Expected (ng/mL)		5.91	6.95
	Accuracy (%)		97.7 ± 1.86	98.3 ± 2.88
L-HA	measured (ng/mL)	30.6	31.7 ± 0.812	32.6 ± 0.580
	Expected (ng/mL)		31.6	32.7
	Accuracy (%)		99.9 ± 2.56	99.8 ± 1.77

2-3-8 健常人と糖尿病患者の唾液中 LA, HA の定量

糖尿病患者及び健常人の各 10 名の唾液中 DL-LA, DL-HA を本測定法に従って UPLC-ESI-MS/MS 分析した。

Fig. 2-11 には, PMP および AI を誘導体化試薬として利用し, 定量した D-HA および L-HA の唾液中濃度および D/L 比を示した。

PMP 誘導化での D-HA および L-HA の平均濃度は, 糖尿病患者で 10.2 および 14.3 ng/mL で, 健常人の唾液中濃度は 6.71 および 9.72 ng/mL であった (Table 2-6, Fig 2-11 A). DL-HA の唾液中濃度は, 健常群よりも糖尿病群でわずかに高かったが, D/L 比は両群でほぼ差がなかった (健常群 74.3 / 糖尿病群 81.5). また, これらの結果は S-AI 誘導化での HA 定量でもほぼ同じ結果となり (Table 2-6, Fig 2-11 B), 信頼性の高い結果であることが示唆された。

次に唾液中 DL-LA の定量を, PMP 誘導化法を用いて行った。結果は Table 2-6, Fig. 2-12 に示した。L-LA の唾液中の濃度は, 健常群 52.4 ng/mL, 糖尿病群 64.7 ng/mL と群間に大きな差は見られなかった。一方で, D-LA の濃度は健常群 6.02 ng/mL, 糖尿病群 41.6 ng/mL と糖尿病群での大きな増加が確認された。

糖尿病患者の血清中の DL-LA 濃度の増加は, これまでに Avogaro らによって報告されていた^{104, 105}。更に今井らは, 糖尿病患者および健常人の血清中の D/L 比を比較し, 糖尿病患者の血清中 D-LA の比率は健常人よりわずかに高かったが, 有意な違いは血清分析では観察されなかったという結果を報告していた¹⁰⁶。これに対し今回の研究では, 糖尿病患者の唾液中 D-LA の比率が著しく高いという結果となり, 血清での結果とは少し異なったが, 糖尿病での D-LA 比率上昇傾向の裏付けとなる報告となった。D-LA 比率上昇の生体内メカニズムは未だ解明されていないが, LA の D/L 比の糖尿病新規バイオマーカーとしての可能性が示唆された。

Table 2-6 Determination of LA and HA enantiomers in saliva of DM patients and healthy volunteers

Amine	Saliva	Amount (ng/mL)			D/L ratio (%)	Amount (ng/mL)			D/L ratio (%)
		D-LA	L-LA	DL-LA		D-HA	L-HA	DL-HA	
PMP	C	6.02 ± 4.21	52.4 ± 21.9	58.4 ± 22.8	11.9 ± 8.12	6.71 ± 3.93	9.72 ± 4.70	16.3 ± 6.70	81.5 ± 48.9
	DM	41.6 ± 44.9	64.7 ± 44.7	106 ± 81.7	62.9 ± 52.6	10.2 ± 7.42	14.3 ± 6.42	24.6 ± 11.1	74.3 ± 44.4
AI	C	n.d	n.d	n.d	n.d	6.89 ± 3.33	9.94 ± 4.41	16.8 ± 7.83	77.5 ± 37.2
	DM	n.d	n.d	n.d	n.d	9.52 ± 5.91	16.7 ± 7.83	26.2 ± 11.3	65.9 ± 37.4

n.d: not determination

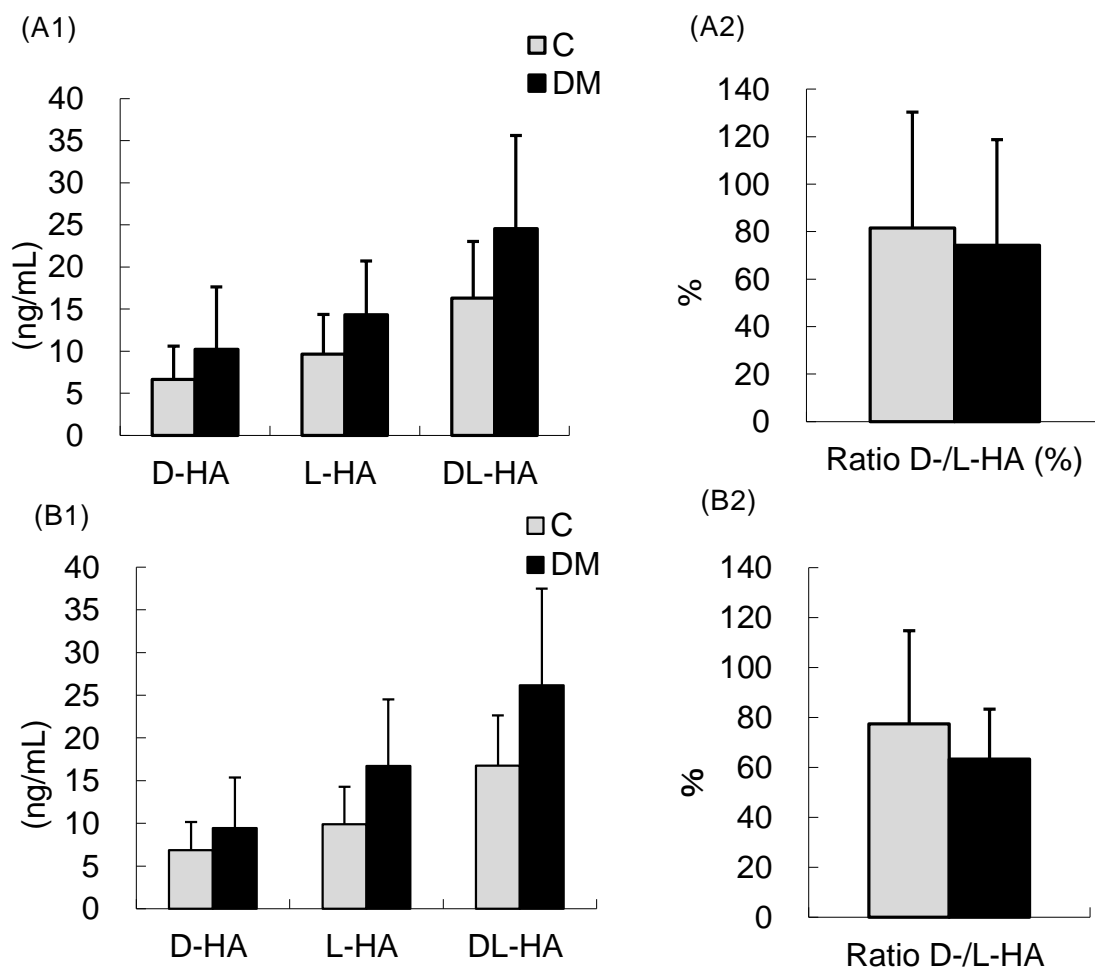


Fig. 2-11 Concentration of HA enantiomers in saliva of DM patients and healthy volunteers (n=10)

DM = Diabetes Mellitus patients, C = healthy volunteers.

A: Reacted with PMP, B: Reacted with AI

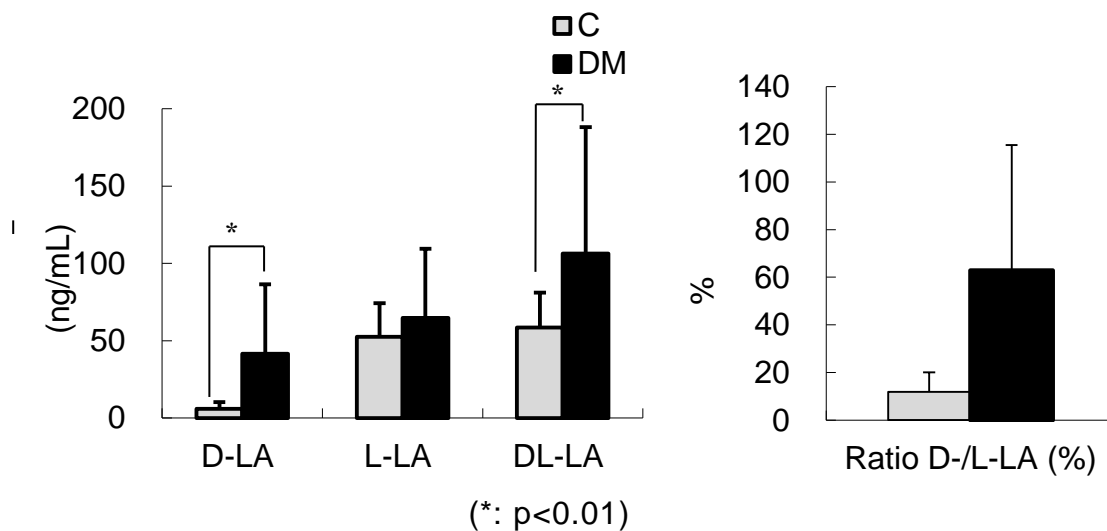


Fig. 2-12 Concentration of LA enantiomers obtained from PMP reagents in saliva of DM patients and healthy volunteers (n=10)

DM = diabetes mellitus patients, C = healthy volunteers

第4節 小括

本章では、安価で簡易的な誘導体化法を用いた LC-ESI-MS/MS による唾液中 LA と HA の高感度かつ光学異性体分離可能な検出法及び定量法を開発した。

誘導体化試薬はキラルなカルボン酸である NSAIDs を対象とした、分離度 R_s を最重要評価項目としたスクリーニングにより 8 種のキラルなアミンの中より選定した。選定した PMP, DBD-APy, TFAP および AI はラット血清に添加した NSAIDs でも R_s 値 1.5 以上の分離検出に成功し、生体試料中カルボン酸にも応用可能であることが示唆された。

LA, HA の LC-ESI-MS/MS 分析では選定された 4 種のアミンから、LA に対しては PMP, HA に対しては PMP, AI がキラル分離検出可能な誘導体化試薬として見出された。分離度 R_s 値は DL-LA に対しては PMP 誘導体が $R_s = 4.91$, DL-HA に対しては PMP 誘導体 ($R_s = 9.37$), AI 誘導体 ($R_s = 2.64$) でありどの試薬も十分な光学分割に成功した。また検出限界は PMP-LA 誘導体が 5.38 fg, PMP-HA 誘導体が 11.5 fg, AI-HA 誘導体が 32.8 fg と全てにおいて高感度に検出が可能であった。

これらの方法を用いた唾液中 LA, HA の検出法は精度、正確度に優れ、DL-LA は 2.5-250 (ng/mL), DL-HA は 0.5-50 (ng/mL) の範囲で定量可能であった。

開発した分析法を用いて健常人と糖尿病患者の唾液中 LA, HA を定量したところ、HA に関しては健常人に比べ糖尿病患者で DL の合計量の増加は見られたが、D/L 比に大きな差は見られなかった。一方、LA は DL 合計の定量値はわずかに増加しており、さらに D/L 比も大きく糖尿病患者で健常人に比べ上昇し、LA の D/L 比の糖尿病新規バイオマーカーとしての可能性が示唆された。

今後はメカニズムの解明やバイオマーカーとしての診断法への応用等が期待される。

第3章 アルツハイマー病脳の LC-MS を用いた

メタボローム解析研究

第1章、第2章とポリアミン、乳酸、 β -ヒドロキシ酪酸など、候補化合物を絞った標的バイオマーカー探索研究を報告した。本章では、標的を絞らず、疾患特異的に変化する生体試料中の代謝物を、メタボローム解析技術を用い網羅的に探索し、新たな疾患新規バイオマーカー候補化合物を見出すことを目的として研究を行った。

第1節 序

“メタボロミクス”とは病態生理学的な刺激あるいは遺伝的変異に対する生体の動的多変量応答を測定することであると定義されている¹⁰⁷。増減や非仮説的变化を分析するメタボローム解析はもともと毒性メカニズムの検証に広く用いられていたが、近年の分析機器の急激な発達により、様々な代謝物の微量分析が可能となり、メタボローム解析の応用範囲も広まった。メタボロミクスの応用例の一つに、臨床診断、疾患マーカー探索分野がある。大腸・胃がん組織のエネルギー代謝経路の代謝物変動をメタボローム解析により明らかにした報告¹⁰⁸や血中アミノ酸濃度と疾患との関係を明らかにするためのアミノインデックス技術の確立¹⁰⁹など、近年この分野での研究は非常に盛んである。しかし、これらの研究の殆どは基礎的な研究に留まっており、今後ますます研究の進展が要求される分野である。

このような背景から、我々は、以前よりメタボローム解析技術を用いた、疾患発症前（未病）から測定値が増加あるいは減少する臨床バイオマーカー探索研究を目的に研究を行ってきた。既報の研究として、新規バイオマーカーの発見が期待されている疾患の一つにⅡ型糖尿病がある^{110,111}。Ⅱ型糖尿病を対象疾患とし、従来の診断に用いられている血糖値やヘモグロビン A1c 値の変化よりも早期に発症を把握できる、つまりは未病状態における糖尿病新規バイオマーカーの探索を目標として、疾患モデルマウスである糖尿病自然発症マウスの生体試料を用いた LC-MS によるメタボローム解析研究を行った。その結果、アミノ酸代謝化合物である *N*-Acetyl-leucine (NAL) が、糖尿マウス体内で、未病状態からコントロールマウスよりも低濃度であることが判明した(Fig. 3-1)^{112,113}。この成果から、LC-MS を用いたメタボローム解析技術は疾患の新規バイオマーカー探索法の一つとして確かに有用であることが示唆された。

そこで本章では、既報で示した手法を応用し、新たに近年低分子バイオマーカーの必要性が高まっているアルツハイマー型認知症 (AD) を標的疾患とし、メタボローム解析によるバイオマーカー探索研究に取り組んだ。

AD は、記憶、指向、行動障害を症状とする高齢者で頻繁にみられる疾患である。現在原因と考えられているのが、脳内でのアミロイド β (A β) を主成分とする老人斑

の蓄積や、タウタンパク質の異常リン酸化といった組織異常であり、これらにより神経細胞死が生じ、高次脳機能に障害を生じさせていると考えられている (アミロイドカスケード仮説)¹¹⁴。AD の病理学的マーカー探索には、臨床診断、イメージング、生化学的手法が報告されている。その中でも、AD 患者の脳脊髄液中 A β やタウタンパク質の脳内代謝産物は、非 AD 患者に比べ、発症の数十年前から変化しており、病理学的症状として、早期の診断が可能であった^{115, 116}。特に脳内のグルコース代謝は、AD の初期に変化していることが報告された¹¹⁷⁻¹²⁵。AD の進行がどのように始まり、継続しているのかは未だ判明していないが、アミロイドカスケード仮説だけで解決できないことが示唆され始めた。そのため、AD 発症による脳内の代謝物変化を網羅的に解析することは、病理学的解析のヒントになる可能性があり、その重要性は近年頻繁に言及されている¹²⁶。

そこで本節では、LC-MS を用いたメタボローム解析を応用し、ヒト脳を直接分析し、そのデータを多変量解析することで、AD 特異的に起こる代謝変化を探索した。LC-MS 分析には、ESI-TOF による m/z 100~1000 のイオンをスクリーニングした。多変量解析には、主成分分析 [Principal components analysis (PCA)] 及び判別分析 [Orthogonal partial least-squares-discriminant analysis (OPLS-DA)] を用いた。ヒト生体については、剖検脳による確定診断 (老人斑の沈着)された前側頭葉 (FL)、頭頂葉 (PL)、後頭葉 (OL)をそれぞれ用いた。各部位の比較を行うと同時に、代謝変化と老人斑蓄積との関連性についても調査した。

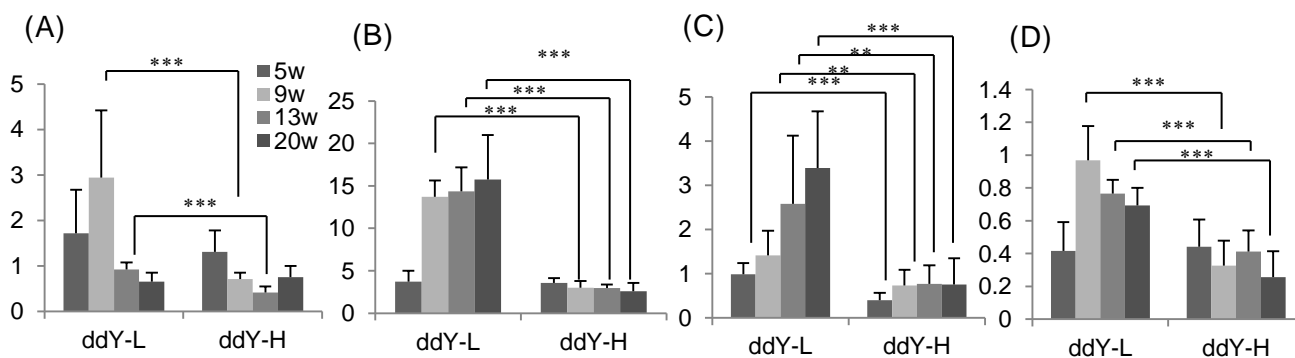


Fig. 3-1 Fluctuation of N-acetyl-L-leucine (m/z 174.11) in biological specimens. (A), Plasma; (B) Hair; (C), Kidney; (D), Liver. Each column plus bar represents mean \pm S.E. (n=10)

Significant differences from ddY-L at same weeks are indicated by Student's t-test (*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$).

第 2 節 実験材料及び方法

3-2-1 試薬

ACN	関東化学
HCOOH	和光純薬
Hydrochloric acid (HCl)	和光純薬
MeOH	関東化学
Tris-HCl buffer (50 mM)	和光純薬
Sodium Chloride (NaCl)	関東化学
Ethylenediamine-tetra-acetic acid (EDTA)	和光純薬
ORN	和光純薬
PUT	和光純薬
SPM	和光純薬
Ac-SPD	東京化成
Ac-SPM	Sigma-Aldrich
SPD	関東化学
DAH	東京化成
DBD-F	東京化成
Na ₂ B ₄ O ₇ · 10H ₂ O (Borax)	和光純薬

以下有機溶媒については、移動相の用途で用いる場合は LC-MS グレード、その他の用途で用いる場合は特級グレードを用いた。

3-2-2 実験装置

粉碎機 : Shake Master auto (バイオメディカルサイエンス)

遠心機 : 【ヒト生体試料】 微量高速遠心機 CF16RX II 型 (日立)

【ヒト生体試料以外】 卓上小型遠心機 (久保田製作所)

遠心エバポレーター : EZ-2 パーソナルエバポレーター (Genevac)

限外濾過フィルター : Amicon Ultra - 0.5 (Merck)

UPLC : AUCQUITYTM Ultra Performance LC (Waters)

TOF-MS : (Waters LCT Premier XETM TOF-MS)

【解析ソフト】

MarkerLynxTM XS (Waters)

【Method parameters】

Mass tolerance = 0.05 Da

Apex Track Peak Parameters:

Peak width at 5% height (seconds) = 15 / Peak-to-peak baseline noise = 50

Apply smoothing = Yes

Collection Parameters:

Intensity threshold (counts) = 100 / Mass window = 0.05 / Retention time window = 0.10

Noise elimination level = 6

Deisotope data = Yes.

Maximum elemental composition:

C=500, H=1000, N=200, O=200, S=10, P=10, and Cl=10 (mass tolerance: 5.0 mDa)

【データベース】

ChemSpider (<http://www.chemspider.com/>)

KEGG (<http://www.kegg.com/>)

Human metabolome database (<http://www.hmdb.ca/>)

NIST (<http://www.nist.gov/pml/data/asd.cfm>)

MassBank (<http://www.massbank.jp/>)

BioCyc (<http://biocyc.org/>)

3-2-3 脳検体の情報

脳検体は、福祉村病院ブレインバンク（文部科学省 包括脳プロジェクト ブレインネットワーク）により保管され、ADと病理学的評価された組織を用いた。本検体は、ADの危険因子として知られているアポリポタンパク質（ApoE）遺伝型は全て3/3に合わせ、遺伝的な要因を除外した。患者の検死診断及び脳の摘出等は、福祉村病院長寿医学研究所で行われ、各部位を-80°C条件下において本学に移管した。その際の患者情報などは、ブラインドしたうえで分析に寄与した（Table 3-1）。

（本研究に用いた脳検体の取り扱いは、静岡県立大学、福祉村病院及び名古屋市立大学の倫理審査のもと個人情報管理等を配慮し、倫理指針に準拠した）

Table 3-1 Characterization of the AD and Control study groups

Sex	Age	ApoE	Patho diag	fix	Brain weight	Onset	Duration	Cause of death
F	85	33	Multiple Infract (MI)	4	1095	-	-	ileus
F	95	33	MI	24	990	85	10	Respiratory failure
F	87	33	Multiple myeloma	10	1060	86	1	Multiple myeloma
F	95	33	MI	12	1190	-	-	Bil duct cancer
M	82	33	Subdral hemorrhage	14	1320	-	-	Respiratory failure
M	79	33	MI	13	1080	-	-	Heart failure
F	95	33	MI	4	870	85	10	Heart failure
F	87	33	Cerebellium infarct	36	1080	-	-	unknown
M	90	33	Traumatic Subarachnoid hemorrhage	4	1190	-	-	Trauma
F	93	33	Physiological aging	2	950	-	-	Heart failure
F	87	33	AD (BraakVI/C), CAA,	6.5	960	81	6	anemia
F	95	33	AD (BraakVI/C)	6	920	86	9	Heart failure
F	91	33	AD (BraakVI/C), MI	3.5	980	76	15	Respiratory failure
F	93	33	AD (BraakVI/C), CAA	3	1180	86	7	Heart failure
M	86	33	AD (BraakVI/C)	12	990	80	6	Pneumonia
F	73	33	AD (BraakVI/C)	2.5	710	53	20	Heart and respiratory failure
M	97	33	AD (BraakV/C)+MI	12	1160	91	6	Multi organ failure
F	88	33	AD (BraakV/C), MI	11	1010	82	6	Pneumonia, heart failure
M	91	33	AD (BraakV/C)	5	1260	84	7	Respiratory failure
F	91	33	AD (BraakV/C), MI	20	1000	81	10	Sudden death

Bottom note: M: male, F: female, MI: multiple infarct, CAA: cerebral amyloid angiopathy.

3-2-4 前処理

抽出液 : 250 μ L Tris-HCl buffer (50 mM, pH 7.4)
 NaCl (200 mM) in H₂O
 EDTA (2 mM) in H₂O
+ 250 μ L MeOH

脳組織をホモジナイズし、凍結チューブ(2 mL) に約 50 mg 秤量した。上記の抽出溶液を脳 (500 μ L / 50 mg) 加え、ジルコニアビーズ 5.0 mm を 2 個入れ、5 分間ホモジナイズした。その後、液全量を Amicon Ultra - 0.5 に注入し 14,000 g, 10 min で遠心限界ろ過を行った。ろ液 (分子量 3,000 以下分画) を約 100 μ L 採取し、UPLC-TOF-MS 測定した。

3-2-5 UPLC-ESI-TOF-MS 分析

UPLC および ESI-TOF-MS の測定条件は以下の Table3-2 に示した。

UPLC カラムは、検出される化合物数を高め、より広い範囲でモニタリングするため、2 種類用いた。1 つはオクタデシルシリカゲル(ODS)の微粒子が詰められたカラムである Waters 社の T3-C18 カラム、もう一方はシリカゲル分子中にペンタフルオロベンゼンが含まれ、アミノ酸などのイオン性の高極性化合物も保持可能な Sigma-Aldrich 社の HS-F5 カラムを用いた。

Table 3-2 UPLC-ESI-TOF-MS conditions

UPLC (separation conditions)		
Column	ACQUITY UPLC™ HSS T3-C18 column (1.8 μm, 150 mm×2.1 mm i.d., Waters)	Discovery® HS-F5 HPLC Column (3 μm, 150 mm×2.1 mm i.d, SUPELCO)
Mobile phase A	0.1 % HCOOH in H ₂ O	
Mobile phase B	0.1% HCOOH in CH ₃ CN	
Gradient elution	B% = 0% maintained (0 – 1 min), 100 % linearly increased (1 - 11 min) and maintained (11 – 13 min), 0 % maintained (13 -18 min)	B% = 0 % maintained (0 – 10 min), 100 % linearly increased (10 - 25 min) and maintained (25 – 30 min), 0 % maintained (30 min – 40 min)
Column temperature	40 °C	
Flow rate	0.4 mL/min	0.3 mL/min
Injection volume	5 μL	
TOF-MS (LCT Premier XE conditions)		
Polarity	ESI positive (W mode)	
Capillary voltage	3000 V	
Sample cone voltage	10 V	
Desolvation gas flow	650 L/h	
Cone gas flow	50 L/h	
Source temperature	120 °C	
Desolvation temperature	350 °C	
MS range	<i>m/z</i> 100-1000	

3-2-6 多変量解析① 主成分分析 (PCA) による成分比較

PCA は、合成関数を利用して、数多くの情報を単純化 (主成分: Component) することを目的とした多変量解析の 1 つである. LC-MS を用いたデータ解析では, m/z , ピーク強度, 保持時間 (Rt) の 3 変数を三次元で扱い, 検出されたすべての化合物をクロマトグラム上にプロットする. この各プロットを分布図に示し, 分散の重心を原点とし, 最も分散の大きい方向に PC1 (第 1 主成分) の軸を取る (Fig. 3-1 参照). さらに PC1 に垂直で 2 番目に分散の大きい方向に PC2 (第 2 主成分) を設定する. この平面を投影し, 各々のプロットを得たものが Loading plot と呼ばれる. また各サンプルで検出された化合物情報から算出された, PC1, PC2 各主成分に対応した固有値をもとに, サンプルごとにプロットしたものを Score plot と呼ぶ, つまり PCA の Score plot は各サンプル中の成分を視覚的に比較できる. 今回は AD 群と非 AD 群 (Control) を各々 10 検体中の低分子成分を部位ごと (FL, PL, OL) に比較した.

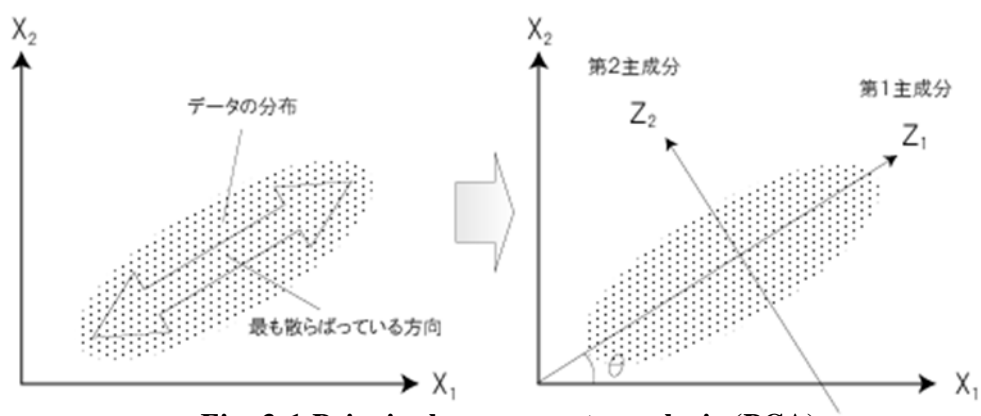


Fig. 3-1 Principal components analysis (PCA)

(<http://www.macromill.com/landing/words/b007.html>)

3-2-7 多変量解析② 判別分析 (OPLS-DA) によるマーカー探索

OPLS-DA は事前に与えられているデータが、異なる 2 グループに分かれることが明らかな場合に、新しいデータがどちらのグループに入るのかを判別するための基準 (判別関数) を得るための手法である。今回の実験では AD 群と非 AD 群の 2 群に分けられる場合で、 m/z の値、ピーク強度、 R_t のパラメーターにより 2 群間の明確な区分けを行った。

【S-plot を用いたマーカー候補リスト作成とデータベース検索】

S-plot とは、OPLS-DA で得られた判別関数を用いて、検出されたそれぞれの化合物について、縦軸に信頼性 (群間の差と群内誤差との相関係数; 1 に近いほど個体差なく群間で差がある)、横軸にマーカー候補性 (群間におけるピーク強度の差の絶対値; 大きいほど差が大きい) としてプロットされた図である (Fig. 3-2 参照)^{113, 127, 128}。S-plot を各脳の部位ごとに作成し、信頼性を示す p 値が $\pm 0.85 \sim 1.00$ である化合物を抽出した。抽出された化合物は、増加傾向、減少傾向それぞれについてマーカー候補リストを作成した。リストに挙げた化合物についてクロマトグラムのピーク形状の良好な化合物のみに絞り込んだ。このように絞り込んだマーカー候補代謝物に対し、次に m/z の値と MS スペクトルパターンから組成式の予測を行い、予測された組成式をデータベースに照合した。予測された組成がデータベースにない場合、Unknown 化合物として示した。

脳内で変化する代謝物 (AD マーカー候補化合物) は、脳部位ごとのマーカー候補として比較した。その結果、すべてに共通して検出された化合物についてはさらにリストアップした。

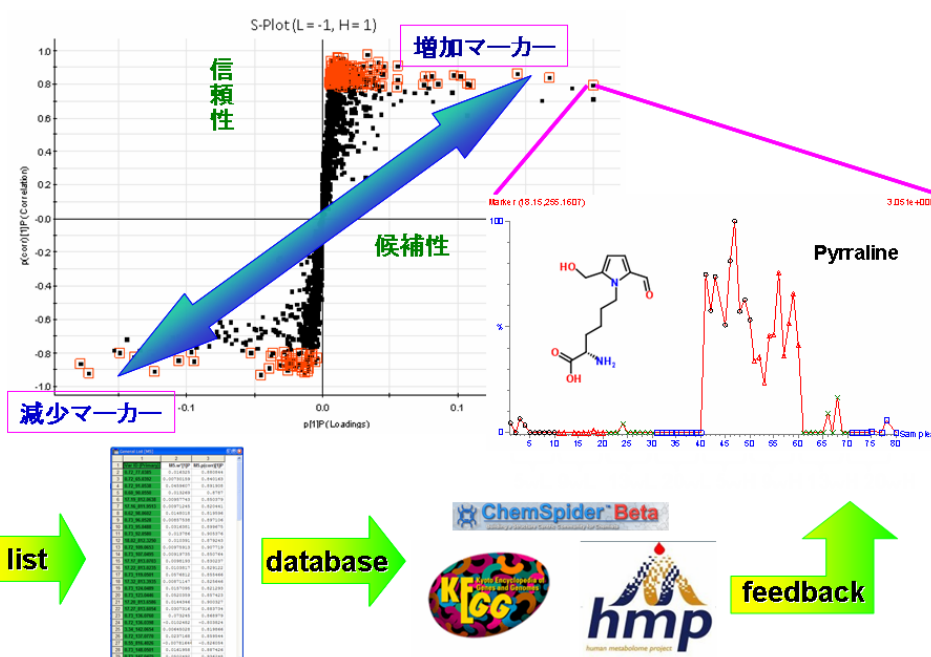


Fig. 3-2 Method of metabolite profiling by a multivariate statistical analysis

3-2-8 同定実験

各部位にリストを比較して得られた共通のマーカ－候補化合物の中で、化合物名が予測された **SPD, SPM** について、標品マッチングを実行し同定することができた。標品 10 μM を脳サンプルと同条件下で **UPLC-ESI-TOF-MS** 測定し、溶出時間、 m/z 値の確認を行った。さらに **SPD, SPM** はポリアミンであったため、第 1 章で用いた **DBD-F** を用いた誘導体化分析法を用いて、標品及び脳内の **SPD, SPM** について **DBD-F** 誘導体の **MS/MS** スペクトルを確認し、同定を行った。

3-2-9 脳組織中 SPD, SPM 及び関連化合物の定量

AD 患者脳内で増加傾向であることの判明したポリアミン SPD, SPM について、前章で確立した DBD-F を用いたポリアミン分析法を用い、脳組織抽出液中ポリアミン濃度を定量した。

また SPD, SPM の代謝経路としては、データベース KEGG によれば、オルニチン脱炭酸酵素 (ODC: ornithine decarboxylation) に始まる経路であり、ORN, PUT, Ac-SPD, Ac-SPM が関与している (Fig. 3-3)。そこで、これら 6 種のポリアミンの同時定量を行い、AD 発症による脳組織のポリアミン代謝変化を評価した。

DBD-F 誘導体分析法は第 1 章で用いた前処理法に従って行った。内標準物質 (I.S.) として DAH (100 nM) を 20 μ l 加え、アセトニトリル 40 μ L を加えた試験管に脳抽出液は 20 μ L を添加し、ボルテックスミキサーで 1 分間攪拌後、室温で 15 分放置した (除タンパク処理)。遠心分離 (3,000rpm, 10min) 後、上清を全量採取し、0.2 μ m でフィルターろ過を行った。ろ液を 150 μ L 採取し、遠心エバポレーターで溶媒留去した。その後、残渣に 40 mM DBD-F 150 μ L, 100 mM Borax 150 μ L 加え、60°C, 30 min 反応させ、4°C で 5 分間放置し反応を停止した。反応液を 0.45 μ m フィルターろ過し、UPLC-ESI-MS/MS により質量分析した。

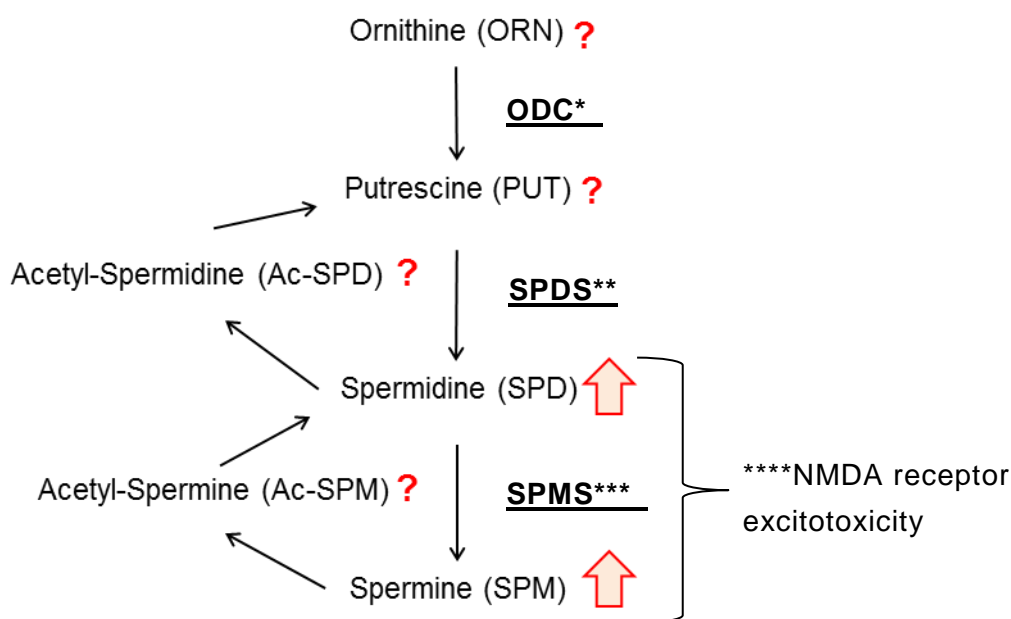


Fig. 3-3 Pathway of SPD and SPM

*ODC: ornithine decarboxylase

**SPDS: SPD synthase

***SPMS: SPM synthase

****NMDA: N-Methyl-D-aspartate

3-2-10 生化学的実験

AD の病理的影響は、SPD, SPM 及び関連ポリアミン代謝に関する変化が神経細胞内あるいは細胞外で生じるのか検討した。本実験では、脳組織切片を用いた組織染色及び、神経細胞のポリアミン定量を行った。

【脳組織の免疫染色】

免疫染色に用いた抗体		
抗体名	希釈率	製品番号
ODC	x1000	#ab66067
SPDS	x500	# ab156879
SPMS	x500	#ab111884
NMDAR1	x1000	#ab17345
NMDAR2A	x500	#ab16646

本実験では、各種抗体（上表）を用いて AD 群 5 例、非 AD 群 5 例の脳組織を用いて、圧力釜・クエン酸処理（抗原賦活）、発色にはジアミノベンジジン（DAB）発色法、核染色にはヘマトキシリン・エオジン（HE）染色法での免疫組織化学的解析を行った。また、脳組織部位は FL, PL, OL と記憶機能に関連する海馬（H）とした。抗原酵素である ODC, SPDS, SPMS の作用点は Fig. 3-2 参照。

また NMDAR1 及び NMDAR2A は NMDA 受容体の 2 種のサブタイプである。NMDA 受容体とは NMDA（N-メチル-D-アスパラギン酸）がアゴニストとして選択的に作用する受容体である。近年その 1 つのサブタイプが AD に関連している報告があり、AD 治療薬のメマンチンもこの受容体に作用する薬である¹²⁹⁻¹³¹。さらに SPD, SPM が NMDA の別のサブタイプのアゴニストである報告もあり、SPD, SPM の AD と関連性を示唆すると考え、両方の NMDA 受容体の免疫染色も行った。

第3節 実験結果及び考察

3-3-1 脳検体の病理学的検査

脳検体の臨床情報は Table 3-1 に記載した。アポリポ蛋白質 E (ApoE) 遺伝子型はすべての AD 患者が 3/3 とした。検死の病理学診断での AD 進行度を表す Braak stage は神経原繊維レベル 5 もしくは 6 であり、老人斑レベルは C であった。また、生前の疾病期間は 6~20 年であった。AD 脳の病理検査では、脳組織の老人斑及びタウタンパク質の存在を Gallyas-Braak 変法 (G-B 変法*) による組織染色により、視覚的に評価した (Fig 3-3)。本病理所見は、非 AD 群の脳組織に対し、AD 群の A β 及びタウタンパクの凝集斑が頻出していることがわかる。その傾向は前頭葉 (FL)、頭頂葉 (PL) および後頭葉 (OL) すべての領域で観察されるが、領収頻度は OL < PL < FL の順で増加傾向である。これらの結果に基づき非 AD 及び AD 群を分類した。

*G-B 変法は、もともと神経原繊維変化 (NFT) を選択的に染色する目的で開発された。しかし、NFT だけではなく、他のタウオパチー・シヌクレイノパチーの一部も陽性に染色する。G-B 変法の特徴として、PSP や CBD のグリア細胞内タウ蓄積が強く染色される。一方、ピック球の染色は弱い。このような違いが蓄積しているタウの isoform の違いと関係するという説もあるが定かではない。G-B 変法では、通常ホルマリン固定パラフィン標本の場合、レビー小体は染色されないが、グリア細胞質封入体は陽性である。

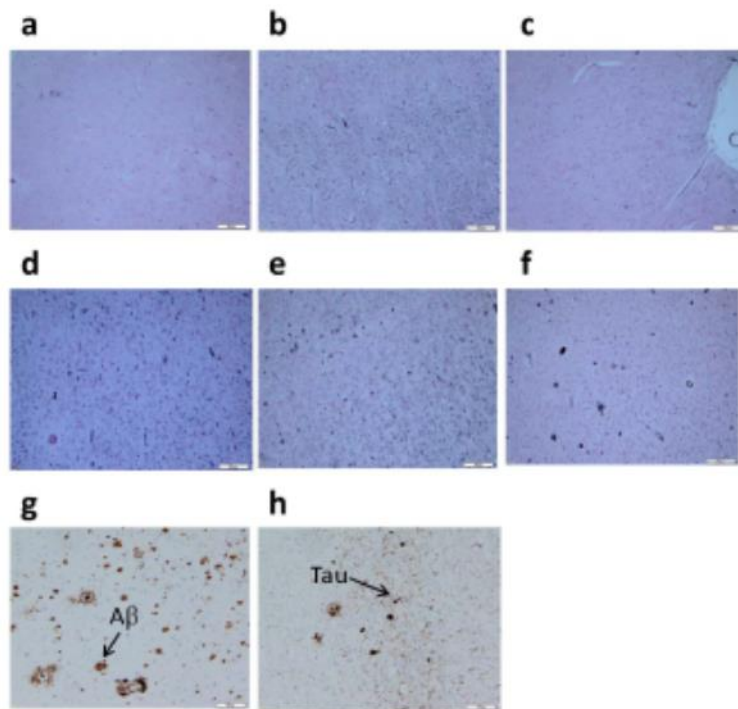
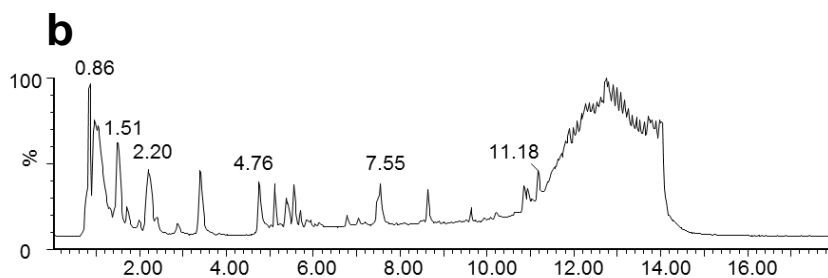
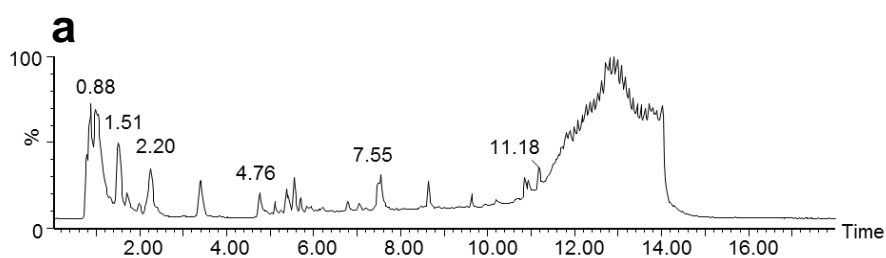


Fig. 3-4 The plaque/tangle pattern of Gallyas-Braak (GB) and A β /Tau staining from representative AD/Control brain tissues.

(a), Frontal lobe region from Control patient. (b), Parietal lobe region from Control patient. (c), Occipital lobe region from Control patient. (d), Frontal lobe region from AD patient. (e), Parietal lobe region from AD patient. (f), Occipital lobe region from AD patient. (g), A β staining from frontal lobe region (a). (h), Tau staining from frontal lobe region (a). For routine immunohistochemistry, an anti-human β amyloid antibody (Dako, mouse monoclonal, 1:30), an anti-human pTau antibody (INNOGENETICS, clone AT8 1:1000) were used for detection of plaque/ tangle.

3-3-2 脳組織中低分子代謝物の UPLC-ESI-TOF-MS 分析

AD 発症により変化する脳組織中 (部位 : FL, PL, OL) 代謝物の評価において, AD 患者 (n=10) 及び非 AD 患者 (n=10) の網羅的分析を実施した. UPLC-ESI-TOF-MS 測定法は, 既報に従い, T3-C18 と HS-F5 のカラムを用い, ポジティブ・ネガティブモードによる, m/z 100-1000 の範囲で測定した (Table 3-2). 脳組織の抽出法には, 生体試料で一般的に使用される MeOH / 緩衝液を用いた. さらに, 限外ろ過を行い, 除タンパク処理かつ, 分子量 3000 以下のみの化合物を調製した. 本液を UPLC-ESI-TOF-MS 分析した結果, Fig. 3-4 a, b に代表するようなクロマトグラムを得られ, ポジティブモードでは 1201 ~ 4699 種, ネガティブモードでは 385 ~ 1110 種の化合物の検出に成功した (Fig. 3-3 c). また, 測定の再現性としては, AD 群 (n=10), 非 AD 群 (n=10) で 6 回繰り返し測定の出時間及び, ピーク面積の RSD 値 (%) を評価した結果, 溶出時間の RSD = 0.08 - 1.63%, ピーク面積の RSD = 1.44 - 8.93% といずれも 10% 以下であった. 本法が再現性に優れ, 多変量解析に対応したデータであることが証明された (Table 3-3).



c

Ionization	Control				AD			
	Positive		Negative		Positive		Negative	
Column	T3-C18	HS-F5	T3-C18	HS-F5	T3-C18	HS-F5	T3-C18	HS-F5
FL	1201	2818	543	1110	1281	2771	570	1062
PL	1607	4574	385	879	1664	4699	392	876
OL	1946	2317	423	634	1944	2284	431	630

Fig. 3-4 UPLC-ESI/TOF/MS chromatograms (T3-C18 and positive ionization) and list of low-molecules in brain tissues from AD and Control groups.

a, The chromatogram of low-molecules in FC brain from control

b, The chromatogram of low-molecules in FC brain from AD

c, The list of detected low-molecules in brain tissues

Table 3-3 Validation of UPLC-ESI-TOF-MS analysis of typical *m/z* values in pooled PL brain tissues from AD and Control.

no.	Calculated compound name	<i>m/z</i>	Ret. Time	Ret. Time. RSD(%)	peak area RSD (%)
1		139.99	11.39	0.08	8.52
2	Spermidine	146.17	0.80	0.69	8.67
3	Methyl 2,2-dimethylhydrazinecarbodithioate	151.04	0.60	0.71	8.24
4	(E)-(4-Nitrophenyl)diazene	152.05	10.45	0.10	7.29
5	3H-2,1-Benzoxathiol-3-one 1,1-dioxide	184.99	10.62	0.08	8.30
6	Spermine	203.22	0.80	1.63	6.64
7	(1,3,5-Triazine-2,4,6-triyltriiimino)trimethanol	217.11	4.85	0.39	4.04
8	1-(4-Morpholinyl)-1-nonanone	228.2	8.20	0.33	7.18
9	3,6,9,12-Tetraoxatetradecane-1,14-diol	239.15	5.12	0.80	8.93
10	1,2,3-Propanetriyl tripropanoate	261.13	5.13	0.72	6.05
11	3-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]-N-(5-methyl-1,2-oxazol-3-yl)propanamide	283.18	5.31	0.63	7.53
12	1,4,7,10,13-Pentaoxacyclononadecane-14,19-dione	305.16	5.31	0.63	3.82
13	3,6,9,12,15,18-Hexaoxaicosane-1,20-diol	327.2	5.45	0.59	7.09
14		334.14	5.13	0.12	4.24
15		346.04	1.27	0.59	5.70
16	(3E)-N,N-Diisopropyl-3-[(2-nitrobenzoyl)hydrazono]butanamide	349.19	5.46	0.59	8.03
17		385.13	2.22	0.42	5.13
18		387.24	8.84	0.16	1.44
19		431.26	8.85	0.10	2.51

*The pooled parietal lobe tissues from AD (n=10) and Control (n=10) were performed on the same day for determining the intra-day accuracy, replicate (n=6) analytes of various peaks.

3-3-3 多変量解析

UPLC-ESI-TOF-MS 分析により得られたデータは、多変量解析により評価を行った。まず、PCA により群ごとの成分全体の比較を行い、次に OPLS-DA により 2 群間比較を行った。さらに OPLS-DA の結果得られる S-Plot を用いることにより、AD 発症により、変化を示す代謝物を抽出した。

【PCA による成分比較】

PCA score plot は各サンプルの成分を視覚化したものである。代表例として T3-C18 カラム及びポジティブモードで検出したデータを Fig. 3-5 a-c に示した。また、全ての測定条件における PCA は Fig. 3-6 に示した。

老人斑の発現が多い FL 及び PL 部位において、AD 群のサンプルは Score plot 上の特定領域に集中していた。これにより、AD 群の脳組織中低分子成分は非 AD 群と比較して、明らかに差があることが判明した。さらに AD 群 10 検体は類似した PCA 挙動を示したため、主成分の寄与率が大きい低分子マーカーが、高確率で存在していることが示唆された。

一方 OL 部位では、AD 群と Control 群のプロットはわずかに違う領域に分布されていたが、FL, PL に比べ、群ごとの成分のバラつきが大きく特定することはできなかった。この結果から脳組織中成分は、老人斑蓄積に依存し変化する可能性が示唆された。

【判別分析 (OPLS-DA) による AD マーカー探索】

代表的な OPLS-DA score plot (T3-C18 カラム/ポジティブモード) を Fig. 3-7 に示し、FL, PL 部位に関しては PCA 同様、2 群間に差があると仮定した場合も判別することができた。

また、同条件における S-plot は Fig. 3-6 d-f に示した。本統計の結果、信頼性を示す p 値が $\pm 0.85 \sim 1.00$ である化合物 (AD 群特異的に増加 (□) 及び減少 (□) していたもの) を抽出した。抽出した化合物は、FL, PL 部位では約 60~100 となった。一方、OL では条件を満たす化合物は存在しなかった。AD により特異的变化を示す化合物について、他の条件で検討した結果、抽出に成功した化合物数を Table 3-4 に示した。すべての条件から 431 化合物が抽出された。本化合物は、いずれも AD 病理変化に対応するものと考えられる。

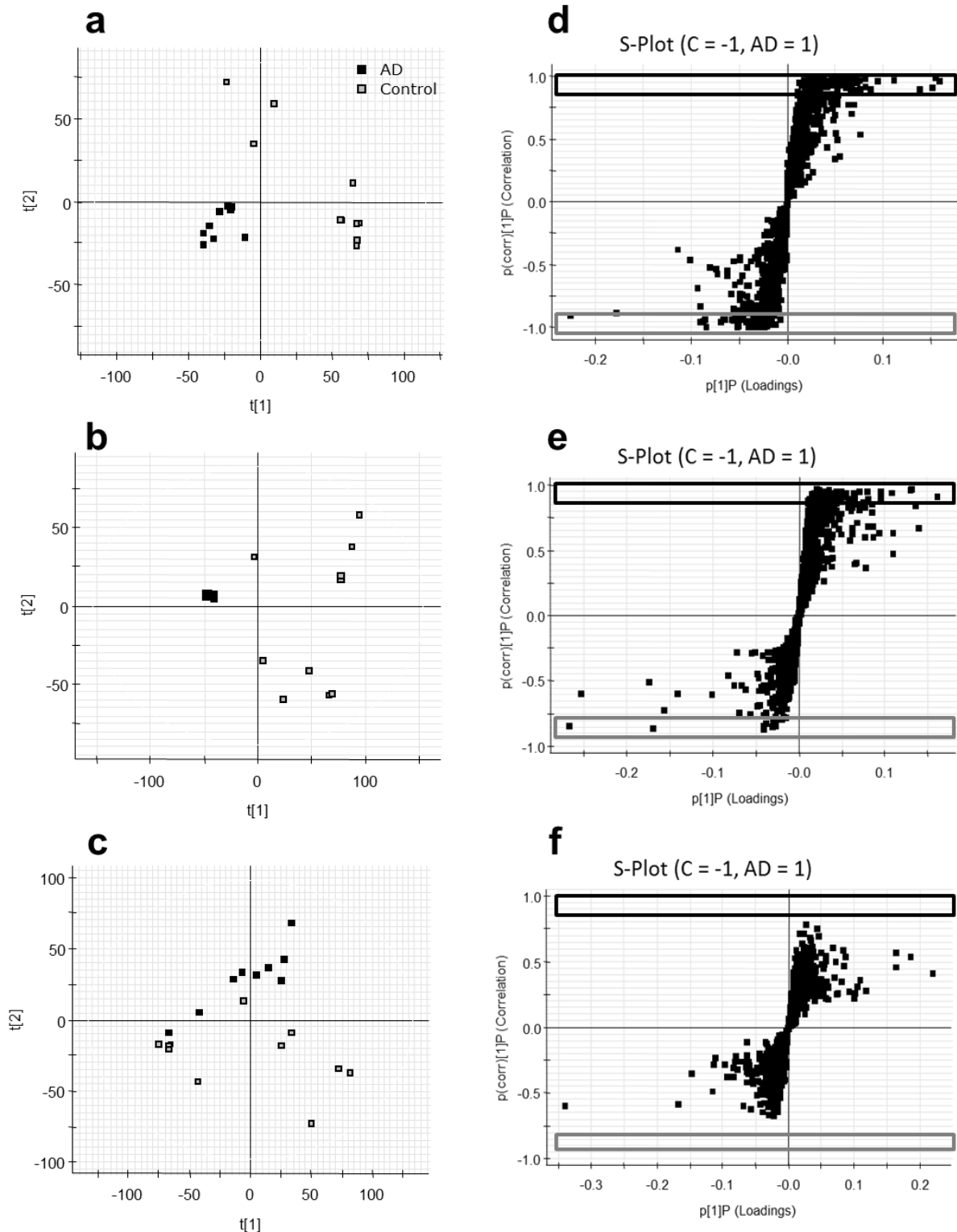


Fig. 3-5 PCA score-plots and S-plots between AD and Control groups in each brain region (n= 10 for each sample). (a) PCA score-plot of frontal lobe region (explained variance (R²): component 1, 0.32 and component 2, 0.49, and predictive ability (Q²): component 1, 0.22 and component 2, 0.21). (b) PCA score-plot of parietal lobe region (R²: component 1, 0.3 and component 2, 0.45, and Q²: component 1, 0.21 and component 2, 0.17). (c) PCA score-plot of occipital lobe region (R²: component 1, 0.18 and component 2, 0.28, and Q²: component 1, 0.08 and component 2, 0.03). (d), S-plot of frontal lobe region. (e) S-plot of parietal lobe region. (f), S-plot of occipital lobe region.

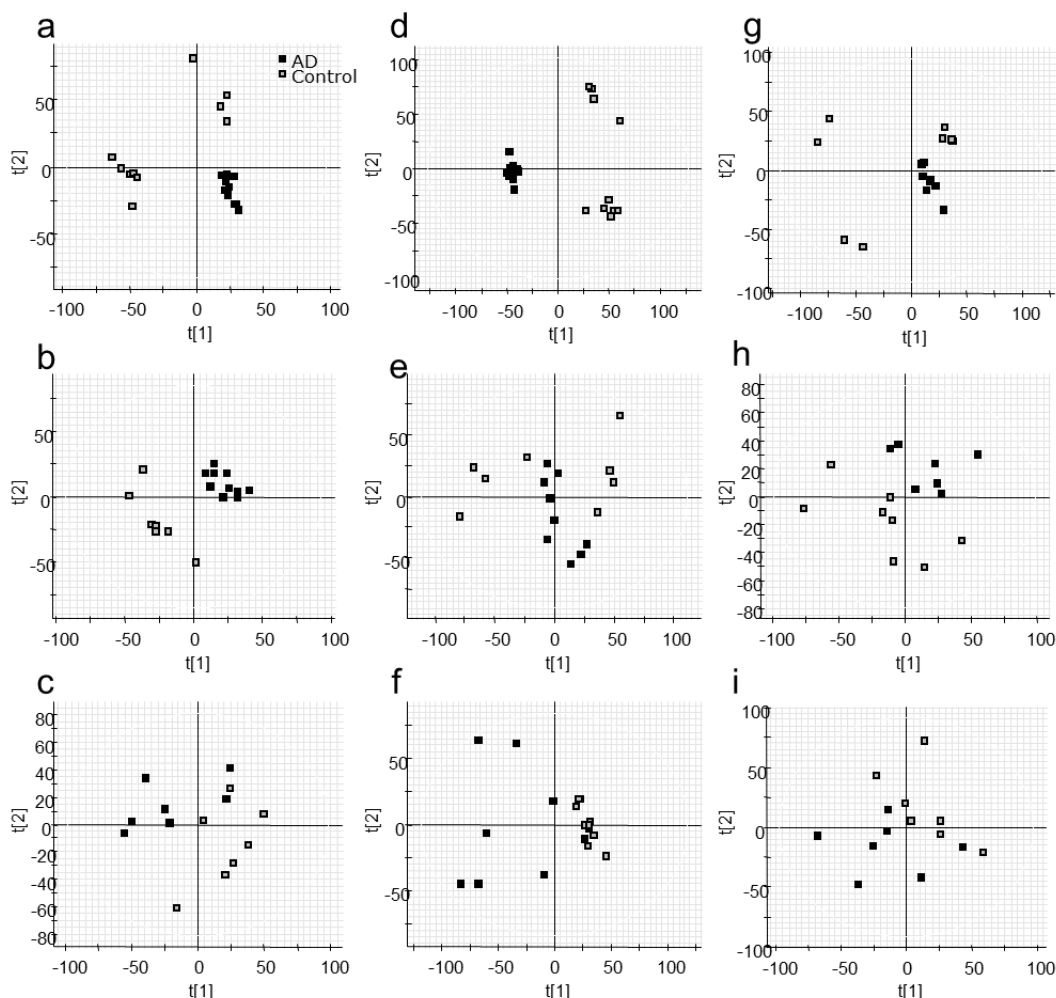


Fig. 3-6 PCA score-plots between AD and Control groups in each brain region.

a, PCA score-plot of FL region on positive ionization with HS-F5 UPLC column (R2: component 1, 0.27 and component 2, 0.45, and Q2: component 1, 0.16 and component 2, 0.23)

b, PCA score-plot of PL region on positive ionization with HS-F5 UPLC column (R2: component 1, 0.16 and component 2, 0.30, and Q2: component 1, 0.02 and component 2, 0.02)

c, PCA score-plot of OL region on positive ionization with HS-F5 UPLC column (R2: component 1, 0.20 and component 2, 0.33, and Q2: component 1, 0.03 and component 2, -0.06)

d, PCA score-plot of FL region on negative ionization with T3-C18 UPLC column (R2: component 1, 0.34 and component 2, 0.55, and Q2: component 1, 0.23 and component 2, 0.40)

e, PCA score-plot of PL region on negative ionization with T3-C18 UPLC column (R2: component 1, 0.27 and component 2, 0.45, and Q2: component 1, 0.06 and component 2, -0.02)

f, PCA score-plot of OL region on negative ionization with T3-C18 UPLC column (R2: component 1, 0.21 and component 2, 0.31, and Q2: component 1, 0.05 and component 2, -0.05)

g, PCA score-plot of FL region on negative ionization with HS-F5 UPLC column (R2: component 1, 0.25 and component 2, 0.41, and Q2: component 1, 0.02 and component 2, 0.02)

h, PCA score-plot of PL region on negative ionization with HS-F5 UPLC column (R2: component 1, 0.30 and component 2, 0.50, and Q2: component 1, 0.11 and component 2, 0.21)

i, PCA score-plot of OL region on negative ionization with HS-F5 UPLC column (R2: component 1, 0.19 and component 2, 0.37, and Q2: component 1, -0.04 and component 2, -0.09)

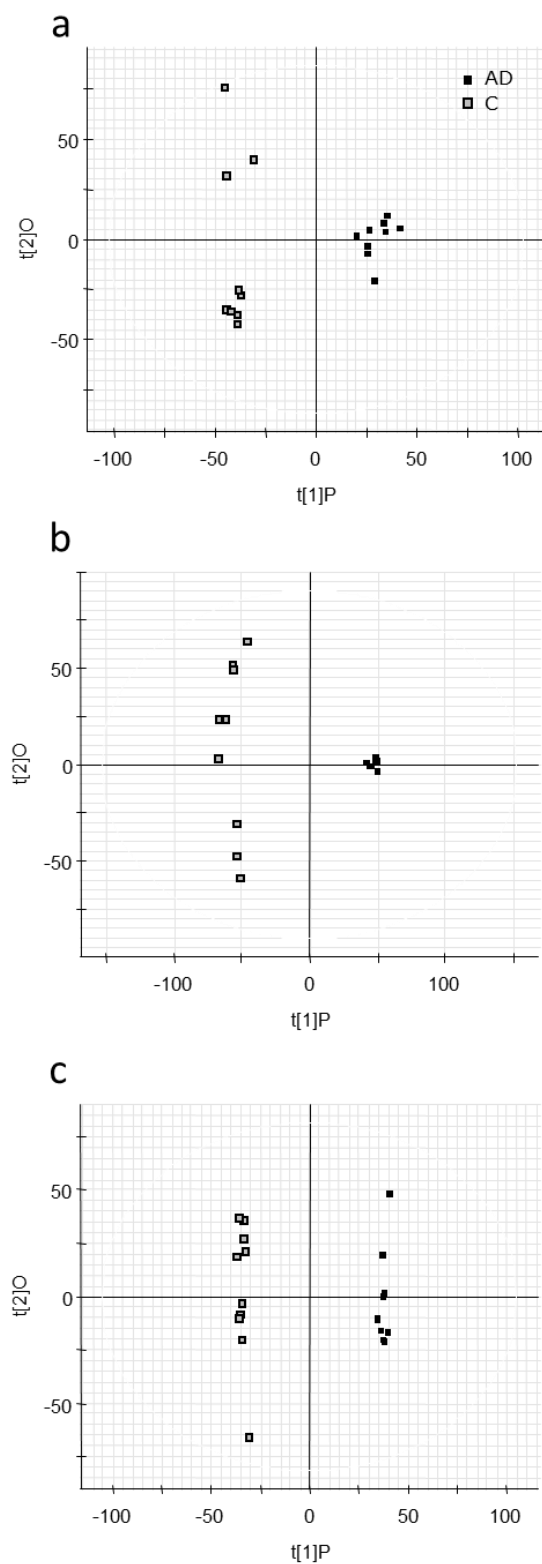


Fig. 3-7 OPLS-DA score-plots between AD and Control groups in each brain region.

a, OPLS-DA score-plot of FL region on positive ionization with T3-C18 UPLC column

b, OPLS-DA score-plot of PL region on positive ionization with T3-C18 UPLC column

c, OPLS-DA score-plot of OL region on positive ionization with T3-C18 UPLC column

Table 3-4 A total of 431 peaks representing possible biomarker candidates based on all brain regions

Ionization	Positive mode				Negative mode			
Column	T3-C18		HS-F5		T3-C18		HS-F5	
	Increase	Decrease	Increase	Decrease	Increase	Decrease	Increase	Decrease
FL	65	62	57	33	21	28	9	5
PL	56	11	32	16	9	0	0	1
OL	0	0	16	3	0	3	1	3

3-3-4 化合物の絞り込み及びデータベース検索

本項目では、Table 3-4 の結果より、AD 群特異的に変化する化合物が多かった FL, PL 部位について詳細に調べた。

FL 及び PL 部位の成分のうち、前項目で見出された 332 化合物に対し、クロマトグラムのピーク形状及び強度の算定を行った。さらに各ピーク面積から AD / 非 AD 比 (%) 及び t 検定における p 値を求めた。その結果、これらのデータをもとに、AD 群特異的に変化する 20 前後の化合物に絞り込んだ。

次に絞り込んだ化合物に対し、精密質量数と MS スペクトルパターンから組成式の予測を行い、組成式を得た。その後、データベースに照合し、予測した化合物名をリストアップすることができた。FL における結果を Table 3-5, PL の結果を Table 3-6 に示した。FL, PL ともに質量数 150-500 の低分子化合物が特定されており、FL では増加 16 種、減少 6 種の化合物が、PL では増加 14 種、減少 5 種の化合物に絞り込まれた。この中で、FL 及び PL で共通に検出されていた 4 種の化合物であった (Table 3-7)。そして、特に m/z 146.16 と m/z 203.22 の化合物については、予測組成式の正確度の指標である i-FIT 値が 0.0 であり、データベース上の予測化合物であった SPD 及び SPM である可能性が高いと思われた。また SPD と SPM は AD 脳で起こる神経毒性に関わると考えられている NMDA 受容体のアゴニストであるという報告があり、同定実験を行い、AD との関連性を詳しく調べる必要があると考えられた¹³²。

NMDA 受容体とは NMDA (N-メチル-D-アスパラギン酸) がアゴニストとして選択的に作用する受容体であり、大脳皮質や海馬に存在し、記憶に関係する長期増強や発達可逆性において中心的な役割を担う受容体である。また AD 脳における神経細胞死には、グルタミン酸の神経毒性が関与しているのではないかと考えられており、 $A\beta$ が NMDA 受容体のグルタミン酸認識部位 (SPD, SPM の結合部位とは別のサブタイプ) に結合し、NMDA 受容体を介した Ca^{2+} 流入が NO 産生と細胞毒性を誘発している可能性が指摘されている¹³³。近年開発された AD 治療薬のメマンチンも NMDA 受容体のアンタゴニストであり、AD との関連性は注目を集めている¹²⁹⁻¹³¹。

Table 3-5 Univariate analysis of metabolites from UPLC-ESI/TOF/MS data based on S-plot in FL brain.

no.	Calculated compound name	Ret. Time	<i>m/z</i>	% increase (AD/C)	<i>p</i> -value
1	Spermidine	0.8	146.16	38.71	0.008822
2	2-Phenoxy pyridine	6.77	172.07	-49.67	8.90×10 ⁻⁷
3	Spermine	0.8	203.22	82.89	0.000587
4	5-Isoquinolinesulfonic acid	3.25	210.02	-51.05	6.27×10 ⁻⁸
5	L-gamma-Glutamyl-L-valine	12.97	247.13	68.13	1.48×10 ⁻⁵
6	3-((R)-(Dimethylamino)[(1R,2R)-2-hydroxycyclohexyl]methyl)phenol	8.57	250.18	29.42	0.008145
7	4-Amino-6-(4-morpholinyl)-N-phenyl-1,3,5-triazine-2-carboxamide	11.21	301.14	68.89	1.22×10 ⁻⁷
8	1-(1,2,2-Tributoxyethoxy)butane	11.92	319.28	39.72	1.44×10 ⁻⁶
9		11.92	341.27	63.79	1.26×10 ⁻⁷
10		11.21	342.17	62.06	1.59×10 ⁻⁵
11	N,N,4-Triethyl-3-phenyl-3a,4,9,9a-tetrahydro-3H-pyrrolo[2,3-b]quinoxalin-2-amine	11.46	349.24	228.83	2.11×10 ⁻⁹
12	3-Pyridinylmethyl (9Z)-9-octadecenoate	12.04	374.3	178.01	8.88×10 ⁻¹⁰
13	Ethyl (8-([5-(diethylamino)-2-pentanyl]amino)pyrido[2,3-b]pyrazin-6-yl)carbamate	11.55	375.25	63.43	0.000152
14		12.26	378.34	71.52	1.97×10 ⁻⁶
15		1.51	395.07	214.23	1.10×10 ⁻⁶
16		11.22	400.41	-33.36	2.69×10 ⁻⁵
17		9.64	417.08	-65.4	1.81×10 ⁻⁹
18		11.66	425.22	131.07	9.61×10 ⁻⁹
19		12.4	425.29	60.65	3.27×10 ⁻⁶
20		8.85	443.23	-42.69	2.82×10 ⁻⁸
21		12.56	554.18	-32.29	0.000211
22		7.48	559.94	-68.51	1.99×10 ⁻⁶

Table 3-6 Univariate analysis of metabolites from UPLC-ESI/TOF/MS data based on S-plot in PL brain.

no.	Calculated compound name	Ret. Time	m/z	% increase (AD/C)	p-value
1		11.39	139.99	-51.23	1.31×10 ⁻⁵
2	Spermidine	0.80	146.17	99.74	1.37×10 ⁻⁵
3	Methyl 2,2-dimethylhydrazinecarbodithioate	0.60	151.04	82.24	2.90×10 ⁻⁵
4	(E)-(4-Nitrophenyl)diazene	10.45	152.05	-66.17	7.77×10 ⁻¹¹
5	3H-2,1-Benzoxathiol-3-one 1,1-dioxide	10.62	184.99	-44.56	5.88×10 ⁻⁶
6	Spermine	0.80	203.22	49.65	6.21×10 ⁻⁵
7	(1,3,5-Triazine-2,4,6-triyltriimino)trimethanol	4.85	217.11	52.25	0.000211
8	1-(4-Morpholinyl)-1-nonanone	8.20	228.20	15.71	0.0413
9	3,6,9,12-Tetraoxatetradecane-1,14-diol	5.12	239.15	96.83	2.66×10 ⁻⁶
10	1,2,3-Propanetriyl tripropanoate	5.13	261.13	32.97	1.85×10 ⁻⁵
11	3-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]-N-(5-methyl-1,2-oxazol-3-yl)propanamide	5.31	283.18	59.66	1.12×10 ⁻⁷
12	1,4,7,10,13-Pentaoxacyclononadecane-14,19-dione	5.31	305.16	22.88	0.00456
13	3,6,9,12,15,18-Hexaoxaicosane-1,20-diol	5.45	327.20	33.41	0.000418
14		5.13	334.14	-43.48	0.000746
15		1.27	346.04	-53.00	2.80×10 ⁻¹²
16	(3E)-N,N-Diisopropyl-3-[(2-nitrobenzoyl)hydrazono]butanamide	5.46	349.19	16.17	0.0178
17		2.22	385.13	40.65	0.00243
18		8.84	387.24	19.13	0.000286
19		8.85	431.26	9.74	0.00428

Table 3-7 Possible biomarkers candidates for AD from increased m/z values based on the metabolomics databases

Brain region	Possible biomarkers	Ret. Time	m/z	Elemental Composition (mDa, i-FIT)
FL	Spermidine	0.6022	146.1656	-0.1, 0.0, C ₇ H ₂₀ N ₃
PL	Spermidine	0.6046	146.1658	0.1, 0.0, C ₇ H ₂₀ N ₃
FL	Spermine	0.6180	203.2221	-1.5, 0.0, C ₁₀ H ₂₇ N ₄
PL	Spermine	0.5938	203.2226	-1.0, 0.0, C ₁₀ H ₂₇ N ₄
FL	3-((R)-(Dimethylamino)[(1R,2R)-2-hydroxycyclohexyl]methyl)phenol	8.5688	250.1775	-3.2, 0.8, C ₁₅ H ₂₄ NO ₂
PL	3-((R)-(Dimethylamino)[(1R,2R)-2-hydroxycyclohexyl]methyl)phenol	8.2020	250.1796	-1.1, 1.8, C ₁₅ H ₂₄ NO ₂
FL	Unknown	10.8745	343.2235	2.9, 1.3, C ₂₂ H ₃₁ O ₃
PL	Unknown	10.4778	343.2286	1.3, 3.5, C ₂₂ H ₃₁ O ₃
FL	Unknown	5.5884	416.2824	3.0, 1.4, C ₁₇ H ₄₂ N ₃ O ₆ S
PL	Unknown	5.8498	416.2840	-0.7, 0.8, C ₁₇ H ₄₂ N ₃ O ₆ S

3-3-5 SPD, SPM の同定実験

SPD, SPM の標品試薬 10 μM を同条件下で UPLC-ESI-TOF-MS 測定し、保持時間、及び MS スペクトルの確認を行った結果、全ての項目に対して一致し、脳組織中の m/z 146.16 と m/z 203.22 の化合物は SPD, SPM であると考えられた (Fig 3-7). しかし、SPD, SPM とともに溶出時間が 0.6~0.8 min と早く保持されていない可能性が高かったため、前章で用いた DBD-F を用いたポリアミン誘導体化分析法を用いて再評価を行った。さらに、標品及び脳内の SPD, SPM について DBD-F 誘導体の MS/MS スペクトルを確認し、同定も行った (第 1 章 1-2-1 及び 1-3-1 参照)。その結果、Fig. 3-8 a に示すように脳組織中に SPD, SPM は確かに検出され、溶出時間も標品と一致し、MS/MS スペクトルも完全に一致した。以上の結果より、脳組織中の m/z 146.16 と m/z 203.22 の化合物は SPD, SPM であると同定できた。

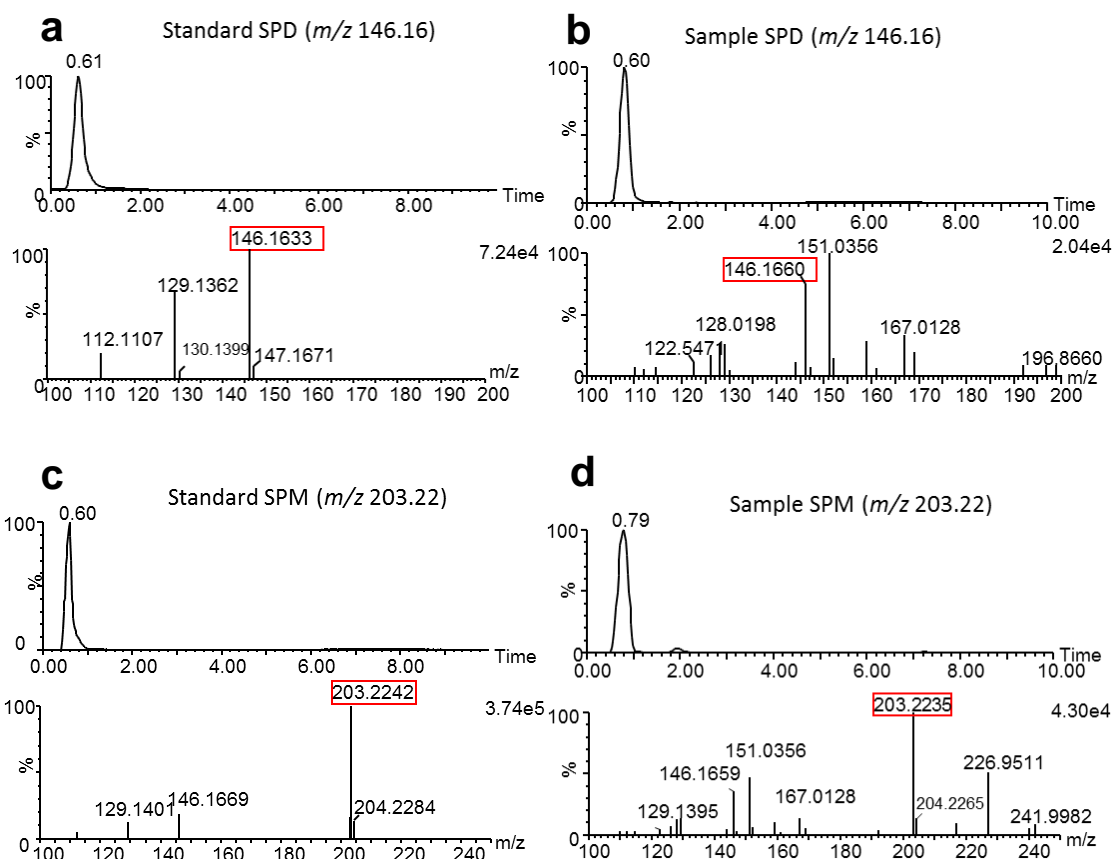


Fig. 3-8 UPLC-ESI/TOF/MS chromatograms and spectra of SPD and SPM standard and brain sample.

a, The chromatogram(extracted ion: m/z 146.16) and mass spectrum of SPD standard on positive mode.

b, The chromatogram chromatogram (extracted ion: m/z 146.16) and mass spectrum of SPD in brain sample (FL region of AD).

c, The chromatogram (extracted ion: m/z 203.22) and mass spectrum of SPM standard on positive mode.

d, The chromatogram (extracted ion: m/z 203.22) and mass spectrum of SPM in brain sample (FL region of AD).

3-3-6 脳組織中 SPD, SPM 及び周辺代謝物の定量

SPD, SPM は NMDA 受容体を介し細胞に作用し, 神経細胞の変性に関与しているとの報告が有り, AD との関連性も十分考えられた¹³⁴⁻¹³⁷. そこで, 既報で開発したポリアミンの定量法を用い, 脳組織中ポリアミン (SPD, SPM, ORN, PUT, Ac-SPD, Ac-SPM) の一斉定量を行い, AD 発症による代謝変化を確認した (Fig. 3-9 a).

その結果, FL において, 非 AD 患者に比べ AD 患者脳組織中では SPD, SPM, PUT, Ac-SPD, Ac-SPM 濃度が有意に増加していることが判明した (Fig. 3-9 b). また, PL についても SPD, SPM, PUT, Ac-SPD について増加傾向であった (Fig. 3-9 c). OL については, ポリアミン濃度の変化は観測されなかった. この結果は PCA や OPLS-DA の結果に矛盾しないものであった (Fig. 3-9 d). 一方, ORN については FL, PL, OL ともに AD 発症による濃度変化は確認されなかった.

したがって, SPD, SPM 周辺の代謝経路では, ORN 代謝産物であるポリアミン (PUT, SPD, SPM, Ac-SPD, Ac-SPM) は AD 発症後上昇し, ORN のみ変化していないことが判明した (Fig. 3-10). これは, ORN から PUT の代謝時に作用するオルニチン脱炭酸酵素 (ODC) が AD 発症時に異常に活性化した結果であると予想された. AD 病理と ODC 活性の関連性については, 直接的ではないが, A β 形成の過程でその活性が上昇することが報告されている¹³⁸⁻¹⁴⁰. 本結果より, AD 発症と ODC 活性の関連性を生化学的に評価することとした.

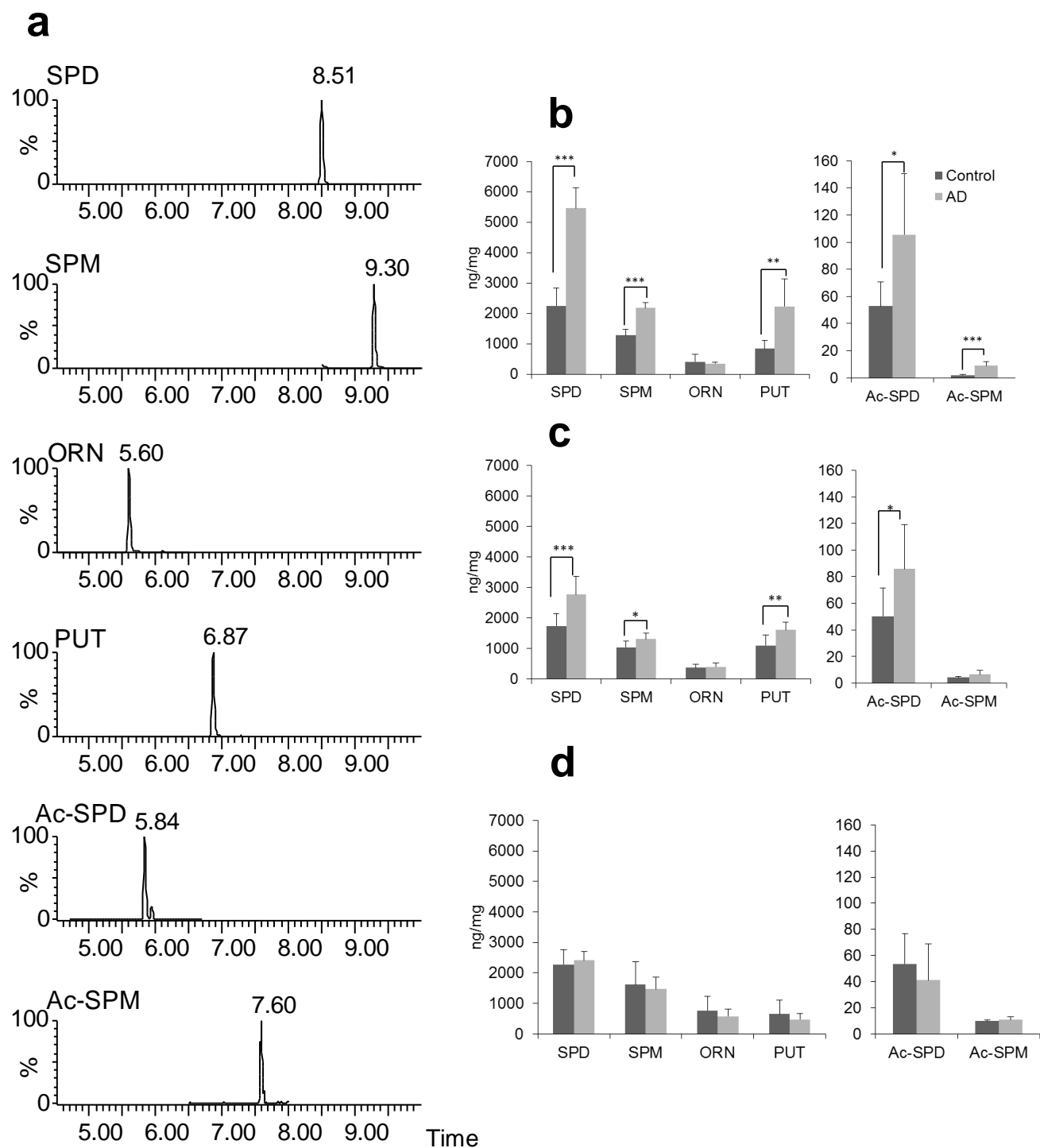


Fig. 3-9 UPLC-ESI/MS/MS with derivatization for the analysis of biogenic polyamine in the brain.

(a), SRM chromatograms of polyamine in AD frontal lobe (No. 11).

(b), Concentration levels of polyamine in frontal lobe (n510 for each sample).

(c), Concentration levels of polyamine in occipital lobe (n 5 10 for each sample).

* P , 0.05, ** P , 0.01, *** P , 0.005.

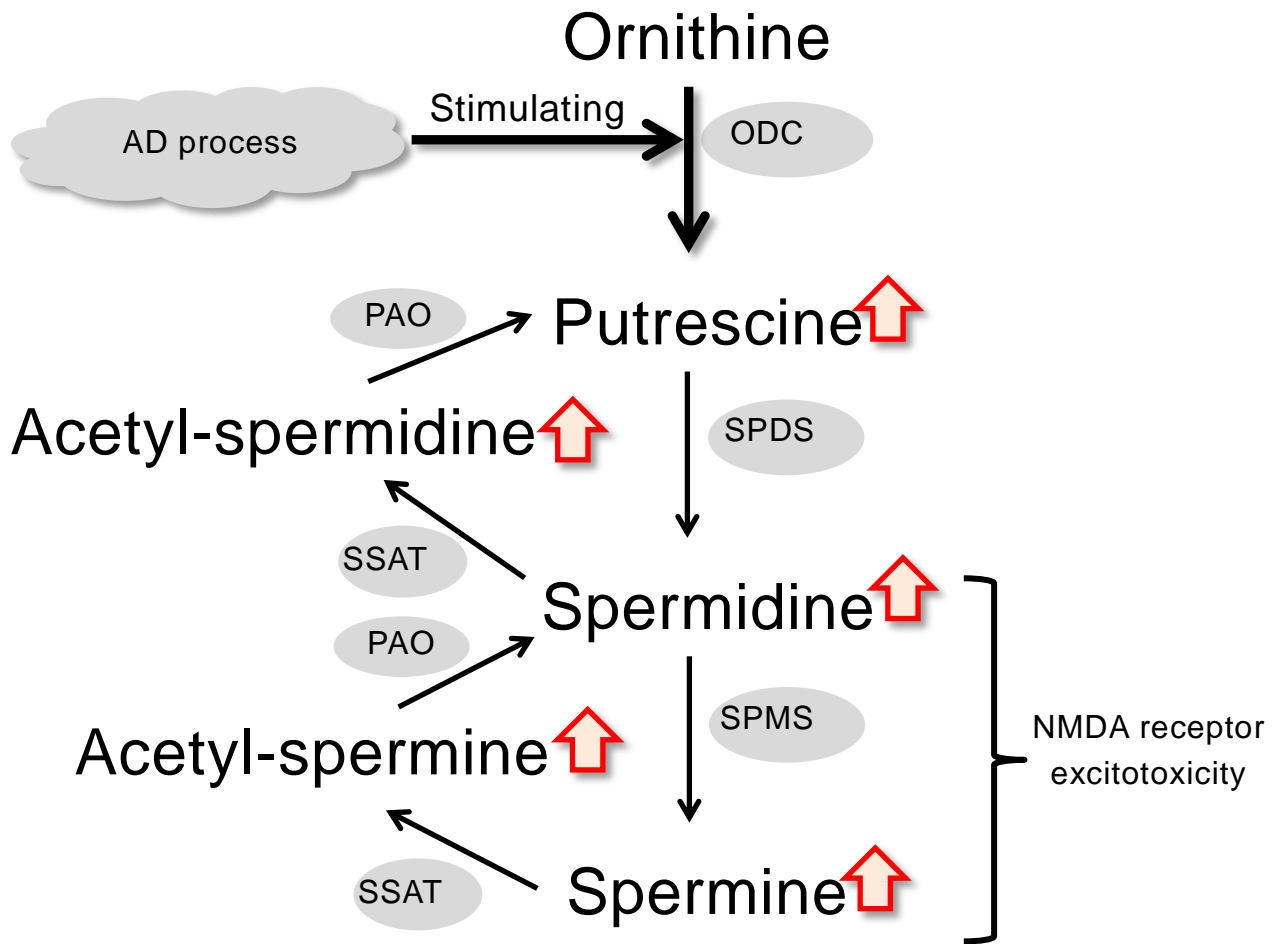


Fig. 3-10 Metabolic pathway of polyamine.

Our results indicate increased SPD, SPM, PUT, Ac-SPD and Ac-SPM without a change of ORN in AD pathology. One theory suggests that the NMDA receptor excitotoxicity is caused by an excess of SPD and SPM due to ODC activity induced by plaque and/or tangle deposition in specific brain regions.

3-3-7 生化学的追加実験

ヒト脳の FL, PL, OL 及び海馬 (Hippocampus: H) の部位ごとの各ポリアミン代謝酵素及び NMDA 受容体の発現の有無を, AD 群 (n=5) 及び非 AD 群 (n=5) の脳を用い, 組織免疫染色にて評価した.

FL, H 部位での染色の様子を Fig 3-11, 3-12 に示し, すべての染色の評価を Table 3-8 にまとめた. その結果, ODC は他のポリアミン代謝酵素に比べ頻繁に発現しており, さらに全ての部位で, AD 群の方が比較的多く発現している様子が確認された. これより, AD により ODC 活性が上昇するという 3-2-6 での考察に矛盾しない結果となった.

SPDS, SPMS はともに AD 群でわずかな発現が確認され, 非 AD 群では発現が確認できない検体も見られた. しかし, AD 群と非 AD 群間に ODC と同定程度の差は確認されなかった.

一方, 2 種の NMDA 受容体の発現は, 個人差はあったが非 AD 群に比べ AD 群の脳組織で強い発現が確認された. NMDA 受容体の活性は, 脳内に過剰なグルタミン酸を送り込み, その神経細胞毒性により神経変性を起こしていると考えられおり, 神経原線維変化と思われる所見に一致して抗体反応を認めたことは, これまでの報告に矛盾しないものであった.

また AD 群における, 各酵素及び受容体発現の局所性を考慮すると, ODC は一部の脳検体で FL, PL, H 部位に比較的多く発現しており, 老人斑沈着の頻度に比例していた. さらに, NMDA 受容体についても, NMDAR1 に比べ NMDAR2 が A β 蓄積量及び ODC の発現が比較的多い FL, H での発現が多い傾向が見られた. これらのことより, NMDAR2 の局所的発現は A β 及び ODC より代謝されたポリアミンに関連していることが示唆された. しかし, この現象が, 原因的なのか, 結果的なのかは不明であるためさらなる検討が必要であると考えられた.

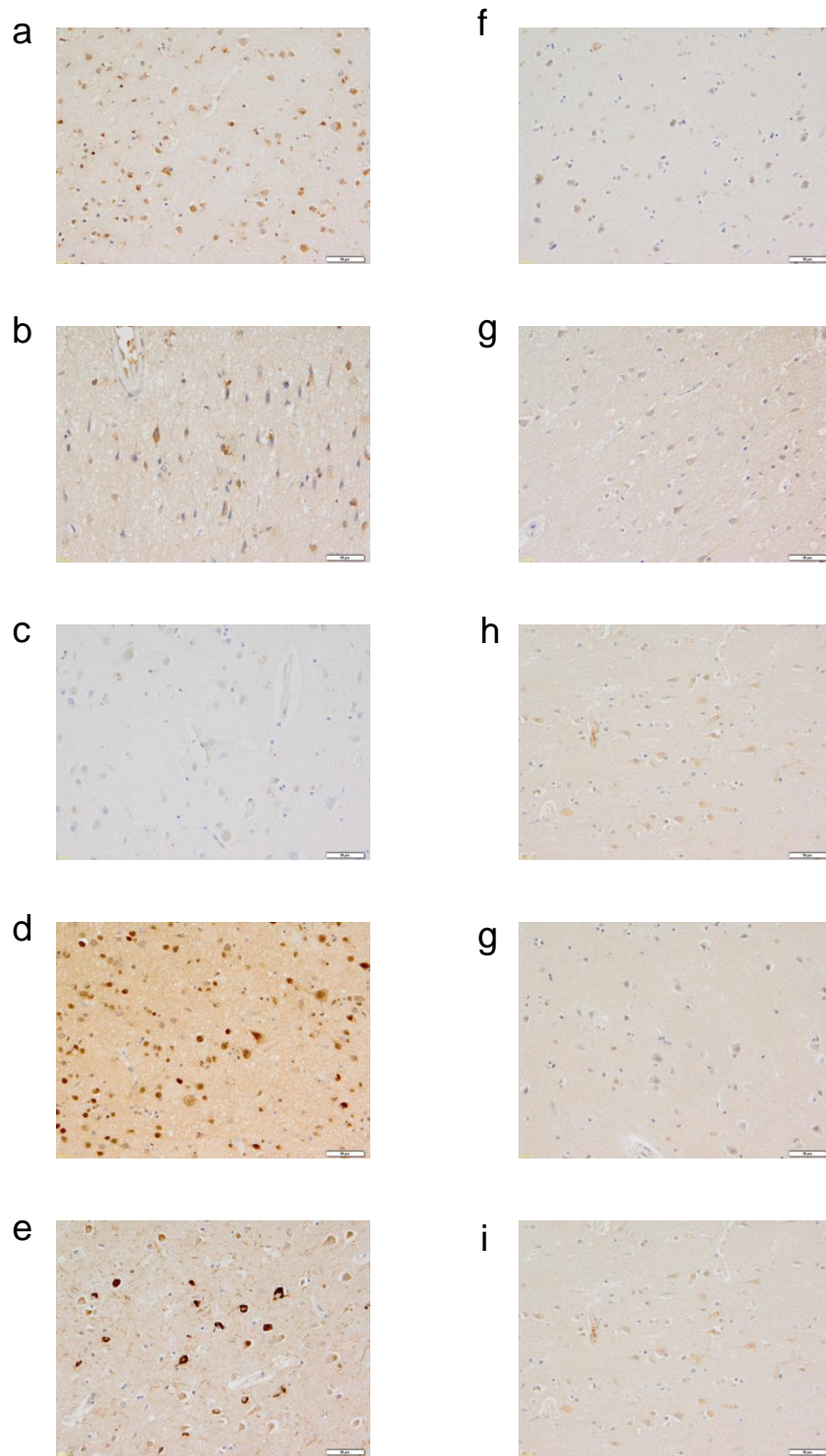


Fig. 3-11 The immunostaining pictures of the enzymes around ODC metabolism and NMDA receptors from FL area of representative AD/Control brain tissues

AD: a-e, Control: f-i, ODC: a/f, SPDS: b/g, SPMS: c/h, NMDAR1: d/g, NMDAR2A: e/i

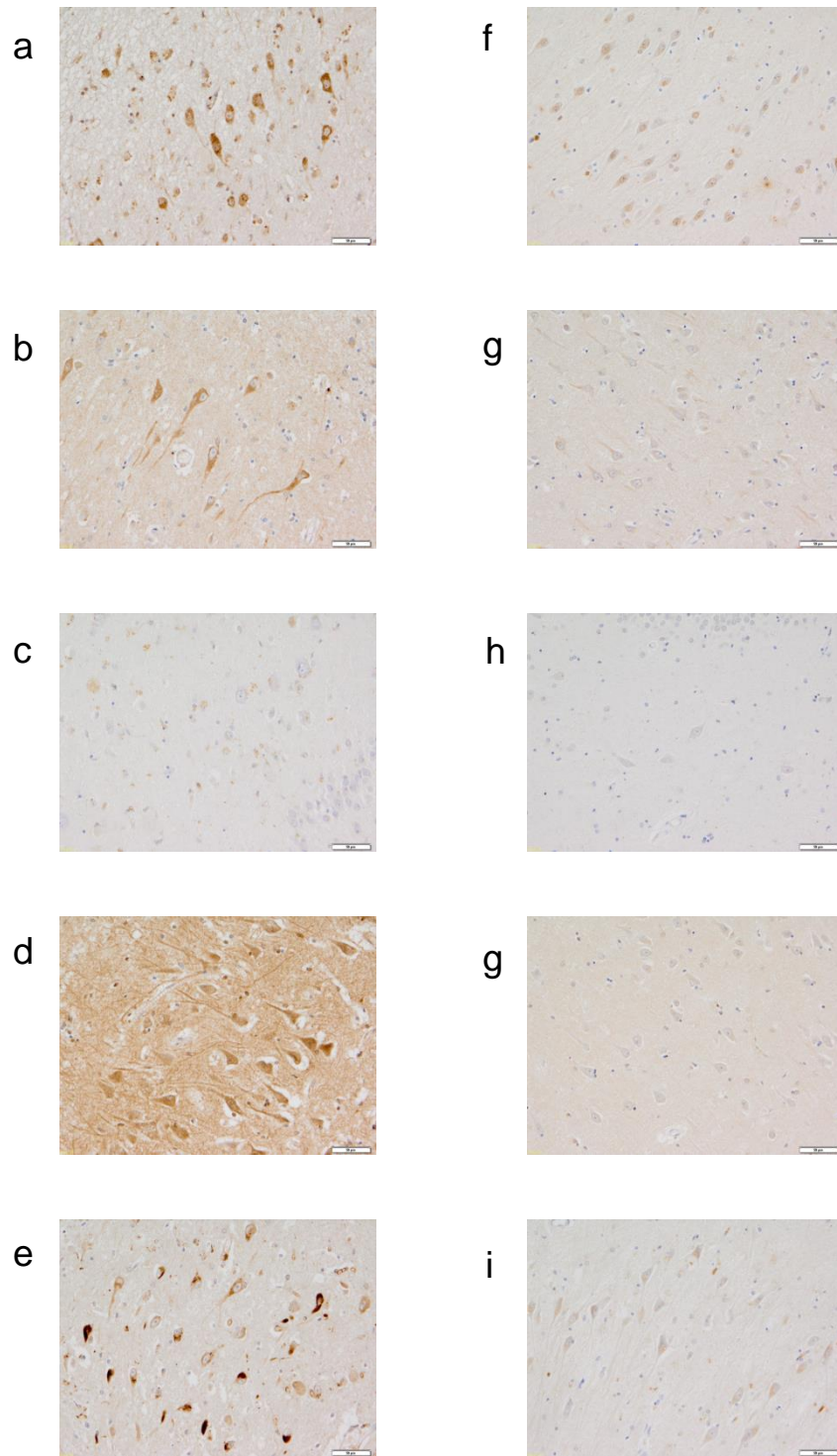


Fig. 3-12 The immunostaining pictures of the enzymes around ODC metabolism and NMDA receptors from Hippocampus area of representative AD/Control brain tissues
 AD: a-e, Control: f-i, ODC: a/f, SPDS: b/g, SPMS: c/h, NMDAR1: d/g, NMDAR2A: e/i

Table 3-8 The immunostaining of the enzymes around ODC metabolism and NMDA receptors from representative AD/Control brain tissues

		ODC	SPDS	SPMS	NMDAR1	NMDAR2A
AD1	FL	+++	++	+	+	++
	PL	+++	+	+	+	+
	OL	+++	+	+	++	++
	H	++	+	-	+	++
AD2	FL	++	+/-	+/-	+/-	+++
	PL	++	+	+/-	+	+
	OL	++	+/-	+/-	+	+/-
	H	++	+++	+/-	++	+++
AD3	FL	++	+	+	++	+/-
	PL	++	+/-	+	++	+/-
	OL	++	+	+	++	+/-
	H	++	+	+/-	+	+++
AD4	FL	+++	+	+/-	++	++
	PL	+++	+	+	++	+
	OL	+++	+	+	++	+++
	H	+++	+	+/-	++	++
AD5	FL	+++	+	+	+++	+
	PL	+++	+	+/-	+++	++
	OL	++	+	+	+++	+
	H	+++	+	+	++	+++
Control 1	FL	+/-	+/-	-	+/-	+/-
	PL	+	+/-	-	+	-
	OL	+	+/-	-	-	+/-
	H	+	+/-	+	+/-	+
Control 2	FL	+	+	+/-	+	+/-
	PL	+	+/-	-	+	+/-
	OL	+	+	+/-	+	+/-
	H	+	+	+	++	+/-
Control 3	FL	++	+/-	-	++	+
	PL	++	+	+	++	+
	OL	++	+/-	+/-	++	+
	H	++	+/-	+	+	+
Control 4	FL	++	+/-	+	+/-	+
	PL	++	+/-	+	++	+
	OL	++	+	+/-	+	+
	H	++	+	+	+	++
Control 5	FL	+	+	-	+	+
	PL	+	+	-	++	+
	OL	++	+	+	++	+
	H	++	+	+	++	++

第4節 小括

本章では、LC-MS を用いたメタボローム解析技術を応用し、病変組織中の低分子バイオマーカー探索および、病態メカニズム解析を試みた。対象疾患は、有効な低分子マーカー化合物は未だ報告が少なく、生前における検査手法の開発が強く望まれている AD とし、死後のヒト剖検脳用いることにより確定診断された認知症患者の直接的 AD 脳メタボライトプロファイリングをおこなった。また脳部位に FL, PL, OL の3部位を用いることにより、部位による低分子成分の違いも同時に確認した。測定機器には精密質量を測定可能な UPLC-ESI-TOF-MS/MS を用い AD 脳、非 AD 脳組織抽出液中の低分子代謝物を測定した。得た代謝物のデータを多変量解析し、AD 脳組織中で特異的に変化する 41 種の化合物を見出した。その中でも、AD 脳 FL, PL 部位中で増加傾向にあった m/z 146.16 と m/z 203.22 の化合物に対し標品を用いた同定実験を行い、それぞれ SPD, SPM であることが判明した。SPD, SPM は、現在の AD 治療薬であるメマンチンの標的受容体である NMDA 受容体のアゴニストであることが知られており、SPD, SPM 周辺の AD 脳における代謝変化をさらに詳しく調査する必要があると考えられた。そこで、UPLC-ESI-MS/MS を用いた脳中ポリアミン 6 種 (SPD, SPM, ORN, PUT, Ac-SPD, Ac-SPM) の一斉定量を行い、脳内の ORN より始まる SPD, SPM の周辺代謝変化を調査した。結果、非 AD 脳と比較し AD 脳では ORN 以外のポリアミン濃度が上昇していた。さらに、AD 脳組織切片を用い、免疫染色により ORN 代謝経路における各酵素 (ODC, SPDS, SPMS) の発現を確認したところ、ORN から PUT の代謝酵素である ODC は AD 脳で高頻度に発現していた。これらの結果から、脳内での SPD, SPM の AD 特異的増加は、AD 発症により ODC が異常に発現しておこった結果であることが示唆された。AD 発症による ODC 活性のメカニズムについては、 $A\beta$ 形成の過程で ODC 活性が上昇を裏付ける報告がされていたが、確証には至っておらず、さらなる研究の必要性が感じられた。

このように、LC-MS を用いたメタボローム解析技術は疾患の新規バイオマーカー探索および、今回の成果の様に新規疾患メカニズム解析研究にも有用であることが証明された。今後さらに様々な疾患に応用され、この技術を用い発見されたバイオマーカーや疾患メカニズムをもとに、疾患の新診断法や新薬開発につながることを期待する。

総括

バイオマーカーとは生体の様々な生理的な状態, 疾患の病態の変動や治療に対する反応等と相関する化学的, 物理学的, または生物学的指標である¹⁴⁾. 具体的には, 血液や尿, 組織中に含まれる生体物質で, DNA, RNA, タンパク質, またそれらの断片, 低分子代謝物などが該当する. さらに, 生体物質だけでなく生体から得られる情報 (心電図や PET 画像など) もバイオマーカーの概念に含まれる. バイオマーカーは, 生命現象を解明するための基礎ツールであり, 同時に医学・薬学における実用ツールとなりうる. 特定の疾患や体の状態に相関する鋭敏なバイオマーカーを探し出すことができれば, 疾患の診断や効率的な治療法の確立に大きな影響を及ぼすことができる. また疾患治療後の効果の測定だけでなく, 早期診断・予防のための日常的な指標, さらに医薬品に対する副作用反応の確認や, 疾患メカニズムの解明による医薬品ターゲット識別など様々な応用への展開が期待されている.

このようにバイオマーカーに対するニーズと期待が高まる一方で, ゲノム解析やプロテオーム解析をはじめとするバイオマーカー探索技術もまた, 急速な成長が見られ, 様々なバイオマーカーが見出されるようになった. 特に低分子マーカーの探索分野では, MS の開発が進み, より高感度で選択的な分析が可能になり, 様々な分野での研究が行われるようになった. これにより, 低分子代謝物を標的としたメタボライトプロファイリングは, プロテオーム解析に続くバイオマーカー探索法として注目を集めている. そこで本研究では, この様な代謝物解析技術を用い, 疾患バイオマーカー探索を目的とした LC-MS による代謝物解析として, 二つの方向から実験を行った. 1 つ目は代謝物として, 対象疾患と関連性の強い目的化合物を絞り込み, 疾患との関連性を評価する標的代謝物解析. 2 つ目は, 疾患特異的に変化する低分子化合物を化合物を絞らず解析していく, メタボローム解析技術を用いた網羅的代謝物解析を行った.

第 1 章では標的代謝物解析として, 乳がん患者尿での含量増加が報告されたポリアミンをマーカー候補化合物とし, 誘導体化 LC-MS/MS 分析による定量法の開発を試みた. さらに実試料として無侵襲かつ簡便に採取可能な唾液を採用し, 乳がん患者と健常人の唾液中 11 種ポリアミン濃度を比較することにより, 本格的な乳がん検診を行う前に初期スクリーニングとして行えるような, 簡易乳がん検査法の開発を行った.

ポリアミンはアミノ基を持つため高感度誘導体化試薬の DBD-F で標識することで, 逆相カラムでの保持を強くし, LC-MS/MS を用い MRM により質量分析を行った. 11 種ポリアミン[ORN, DAP, PUT, CAD, SPD, SPM, Ac-PUT, Ac-SPD, Ac-SPM, DAc-SPD, DAc-SPD] を対象とし, I.S.として DAH を用いた.

唾液は約 1 mL 直接試験管に採取し, 直ちに -20°C で凍結保存した. 使用直前に遠心分離 (3000rpm, 10 min) し変性したムチンを沈殿させた後上清をサンプルとして用いた. 被験者には採取 30 分前から飲食を, さらには唾液中の血液の混入を防ぐため, 1 時間前から歯磨きを控えてもらった. 測定時には唾液 30 μL を使用し, I.S.を

含むアセトニトリルを用いて除タンパク後，遠心エバポレーターにより乾固し DBD-F を pH9.3 下で誘導体化し LC-MS/MS により測定した．測定条件等は標品を用い検討し，移動相 H₂O/MeCN 系溶媒 (0.1%ギ酸含有) 80/20-40/60-10/90% (0-8-10 min) の条件で 11 種ポリアミン誘導体を 10 分以内に分離することに成功した．同様な条件で唾液試料を測定した結果，11 種ポリアミンの一斉分離検出に成功した．定量法の精度・正確度を確認したところ，日内・日間変動ともに RSD 値 15%以下，添加回収試験も 84~102%と良好な値を示した．

乳がん患者検体を用いた検討では，初発患者 8 名，再発患者 22 名の唾液中ポリアミンを定量し，同年代の健常人 14 名との唾液中ポリアミン量の比較を行った．結果，初発，再発患者において特にジアセチルポリアミン濃度が増加傾向にあった．しかし，定量値に個人差が大きく，単一ポリアミンをバイオマーカーとすることは難しいと考えられた．そこで各群内の総ポリアミン量に対する各ポリアミンの割合を比較した結果，CAD と DAc-SPD, DAc-SPM の割合が乳がん患者で上昇しており，ORN の割合が減少していた．今後，このように 11 種同時に測定することにより，単一ではなく複数のポリアミンの比などを利用した乳がんの簡易診断への応用などを検討し，開発した定量法が，より信頼性の高い診断法へと発展していくことを期待する．

第 2 章では，様々な代謝疾患における生体内変化が報告されている LA や HA を標的化合物とし，誘導体化 LC-MS/MS 分析による定量法を確立した．また LA や HA は光学活性を持つため，誘導体化試薬にキラルなアミンを用いることにより，光学異性体間の発現の差も確認可能な状態での分析を行った．対象疾患は，現在，早期診断につながるバイオマーカーの発見が望まれている DM とし，糖尿病バイオマーカーとしての有用性を評価した．

キラル分離誘導体化試薬には，市販の 8 種のキラルなアミンからスクリーニングにより見出した LC-MS/MS 用キラル誘導体化試薬を用いた．試薬スクリーニングには，キラルなカルボン酸として NSAIDs を使い，LC-MS/MS における誘導体の感度，分離度等の項目により評価した．その結果，4 種のアミンが有用であることが判明したが，LA, HA を用いたさらなる検討の結果，分離度等を考慮し，LA には PMP, AI を，HA には PMP が最適であると判断した．

生体試料は前述と同様の理由から唾液を採用した．唾液の前処理は使用直前に有機溶媒を加え除タンパク処理を行った．得た唾液サンプル 100 μ L と LC-MS/MS 用キラル誘導体化試薬を縮合剤存在下で反応させ，標品の DL-LA, DL-HA と比較し，唾液中の LA, HA それぞれの検出を確認した．またこれらの誘導体化試薬を用いた LC-MS/MS による唾液中 LA 及び HA の定量法バリデーションとしては，日内変動係数は 9.89%以下，日間変動係数は 9.27%以下であり，さらに添加回収率は 97.7%以上と本法が精度，正確度に優れていることが証明され，唾液中 DL-LA は 2.5-250 (ng/mL), DL-HA は 0.5-50 (ng/mL) の範囲で定量可能であった．

確立した定量法を用い，健常人，DM 患者の唾液 10 検体を用い唾液中 D-LA, L-LA

および D-HA, L-HA の定量を行い, D 体/L 体比を算出し, 唾液中濃度あるいは光学異性体間比の DM との相関性を確認した. 結果, 定量値としては, LA, HA とともに DM 患者において, D 体 L 体ともに増加傾向であった. また HA は D/L-HA 比が健常人と DM 患者でそれほど変化がなかった一方で, LA に関しては, DM 患者において D 体の増加が極端に大きかったため, D/L-LA 比が DM 患者で上がる傾向にあった. これより LA の光学異性体間比が DM 診断の新たな指標となる可能性が示唆された. 今後はメカニズムの解明やバイオマーカーとしての診断法への応用等が期待される.

第 3 章では, 標的化合物を絞らずに疾患特異的に変化する代謝物を網羅的に解析するメタボローム解析技術を用いてバイオマーカー探索を行った. 対象疾患は, 生前の診断に応用可能な新規低分子バイオマーカーの発見が求められているアルツハイマー型認知症 (AD) とした. さらに今回, ヒト剖検脳用いることにより, AD による脳内の代謝変化についても解析し, AD のメカニズム解明も同時に目的とし研究を進めた.

ヒト剖検脳は死後の病理検査で, 脳組織の老人斑及びタウタンパク質の存在を Gallyas-Braak 変法による組織染色により視覚的に評価した非 AD 群, AD 群のヒト脳 10 検体ずつ [部位: FL, PL, OL] を用いた. 前処理は, 緩衝液と有機溶媒の混合液でホモジナイズ抽出・除タンパク処理を行い, 限外ろ過により, 分子量 3000 以下の化合物のみを含む脳抽出液を調製した. サンプルを UPLC-ESI-TOF-MS により分析し, 採取したデータをもとに, まず PCA により成分比較を行った. 結果, 老人斑の発現が多い前頭葉, 頭頂葉では, 対照群と比較して AD 群の脳組織中低分子成分に明らかに差があり, さらに AD 群 10 検体は全て主成分が類似していたため, 低分子バイオマーカーの存在が高い確率で示唆された. 続いて, OPLS-DA により得た S-plot を用いてマーカー候補化合物を抽出した結果, AD 脳組織中で特異的に変化する 41 種の化合物を見出した. その中でも, FL, PL 部位中で増加傾向にあった m/z 146.16 と m/z 203.22 の化合物に対し標品を用いた同定実験を行い, それぞれ SPD, SPM であることが判明した.

SPD, SPM は, 現在の AD 治療薬であるメマンチンの標的受容体である NMDA 受容体のアゴニストであることが知られており, SPD, SPM 周辺の AD 脳における代謝変化をさらに詳しく調査する必要があると考えられた. そこで, UPLC-ESI-MS/MS を用いた脳中ポリアミン 6 種 (SPD, SPM, ORN, PUT, Ac-SPD, Ac-SPM) の一斉定量を行い, 脳内の ORN より始まる SPD, SPM の周辺代謝変化を調査した. 結果, 非 AD 脳と比較し AD 脳では ORN 以外のポリアミン濃度が上昇していた. さらに, AD 脳組織切片を用い, 免疫染色により ORN 代謝経路における各酵素 (ODC, SPDS, SPMS) の発現を確認したところ, ORN から PUT の代謝酵素である ODC は AD 脳で高頻度に発現していた. これらの結果から, 脳内での SPD, SPM の AD 特異的増加は, AD 発症により ODC が異常に発現しておこった結果であることが示唆された. AD 発症による ODC 活性のメカニズムについては, A β 形成の過程で ODC 活性が上昇を裏付け

る報告がされていたが、確証には至っておらず、さらなる研究の必要性が感じられた。

ここまでの本研究成果から、LC-MS による生体試料の低分子代謝物解析技術は、疾患バイオマーカー探索および、疾患メカニズム解析において、有用な手段であることが明らかとなった。本研究で開発された定量法及び、マーカー探索法が、多くの分野で採用され、疾患の新たな診断法の確立及び、メカニズム解明の一助となることを期待する。

参考文献

1. Biomarkers Definitions Working Group. et al. "Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework." *Clin. Pharmacol. Ther.* ;**69**:89-95 (2001)
2. Loukopoulos P., Thornton J. R. , Robinson W. F. "Clinical and pathologic relevance of p53 index in canine osseous tumors". *Veterinary Pathology* ;**40**: 237-248. (2003)
3. Loukopoulos P., Mungall B.A., Straw R.C., Thornton J.R., Robinson W.F. "Matrix metalloproteinase-2 and -9 involvement in canine tumors." *Veterinary Pathology* ;**40**: 382-394. (2003)
4. Akilesh S, Shaffer DJ, Roopenian D. "Customized molecular phenotyping by quantitative gene expression and pattern recognition analysis." *Genome Res.* ;**13**: (7) 1719 (2003).
5. 4 Andersson T, Borang S, Unneberg P, Wirta V, Thelin A, Lundeberg J, Odeberg J. "Shotgun sequencing and microarray analysis of RDA transcripts." *Gene* ;**310**: 39 (2003)
6. Anderson NL, Anderson NG "Proteome and proteomics: new technologies, new concepts, and new words". *Electrophoresis* ;**19** (11): 1853–1861 (1998).
7. Blackstock WP, Weir MP "Proteomics: quantitative and physical mapping of cellular proteins". *Trends Biotechnol.* **17** (3): 121–127 (1999).
8. B. Daviss, "Growing pains for metabolomics," *The Scientist* ;**19**[8]:25-28, (2005)
9. Woo HM, Kim KM, Choi MH, Jung BH, Lee J, Kong G, et al. "Mass spectrometry based metabolomic approaches in urinary biomarker study of women's cancers." *Clin. Chim. Acta.*; **400**:63-69.(2009)
10. Thal LJ, Kantarci K, Reiman EM, Klunk WE, Weiner MW, Zetterberg H, et al. "The role of biomarkers in clinical trials for Alzheimer disease." *Alzheimer Dis. Assoc. Disord.*; **20**:6-15. (2006)
11. Wikoff WR, Gangoiti JA, Barshop BA, Siuzdak G. "Metabolomics identifies perturbations in human disorders of propionate metabolism." *Clin. Chem.*; **53**:2169-2176. (2007)
12. Shaw LM, Korecka M, Clark CM, Lee VMY, Trojanowski JQ. "Biomarkers of neurodegeneration for diagnosis and monitoring therapeutics." *Nat. Rev. Drug Discovery*; **6**:295-303. (2007)
13. Dettmer K, Arnov PA, Hammock BD. "Mass spectrometry-based metabolomics." *Mass Spectrom. Rev.*; **26**:51-78. (2007)
14. Lenz EM, Wilson ID. "Analytical strategies in metabonomics." *J. Proteome Res.* ; **6**:443-458. (2007)
15. Lenz EM, Bright J, Knight R, Wilson ID, Major H. "A metabonomic investigation of

- the biochemical effects of mercuric chloride in the rat using H-1 NMR and HPLC-TOF/MS: time dependant changes in the urinary profile of endogenous metabolites as a result of nephrotoxicity.” *Analyst*; **129**:535-541. (2004)
16. Idborg-Björkman H, Edlund PO, Kvalheim OM, Schuppe-Koistinen I, Jacobsson SP. “Screening of biomarkers in rat urine using LC/electrospray ionization-MS and two-way data analysis.” *Anal. Chem.* ;**75**:4784-4792. (2003)
 17. Plumb RS, Granger JH, Stumpf CL, Wilson ID, Evans JA, Lenz EM. “Metabonomic analysis of mouse urine by liquid-chromatography-time of flight mass spectrometry (LC-TOFMS): detection of strain, diurnal and gender differences.” *Analyst*;**128**:819-823. (2003)
 18. Plumb RS, Granger JH, Stumpf CL, Johnson KA, Smith BW, Gaultz S, et al. “A rapid screening approach to metabonomics using UPLC and oa-TOF mass spectrometry: application to age, gender and diurnal variation in normal/Zucker obese rats and black, white and nude mice.” *Analyst*;**130**:844-849. (2005)
 19. Hodson MP, Dear GJ, Roberts AD, Haylock CL, Ball RJ, Plumb RS, et al. “A gender-specific discriminator in Sprague -Dawley rat urine: the deployment of a metabolic profiling strategy for biomarker discovery and identification.” *Anal. Biochem.*; **362**:182-192. (2007)
 20. Bijlsma S, Bobeldijk I, Verheij ER, Ramaker R, Kochhar S, Macdonald IA, et al. “Large-scale human metabolomics studies: a strategy for data (pre-) processing and validation.” *Anal. Chem.* ;**78**:567-574. (2006)
 21. Yang J, Xu G, Zheng Y, Kong H, Pang T, Lv S, et al. « Diagnosis of liver cancer using HPLC-based metabonomics avoiding false-positive result from hepatitis and hepatocirrhosis diseases.” *J. Chromatogr. B*; **813**:59-65. (2004)
 22. Dunn WB, Ellis D. “Metabolomics: current analytical platforms and methodologies.” *TrAC Trends Anal. Chem.* ; **24**:285-294. (2005)
 23. Lindon JC, Holmes E, Nicholson JK. “Pattern recognition methods and applications in biomedical magnetic resonance.” *Prog. NMR Spectrosc.* ;**39**:1-40. (2001)
 24. Hollywood K, Brison DR, Goodacre R. “Metabolomics: current technologies and future trends.” *Proteomics*; **6**:4716-23. (2006)
 25. Jordan KW, Cheng LL. “NMR-based metabolomics approach to target biomarkers for human prostate cancer.” *Expert Rev. Proteomics*; **4**:389-400. (2007)
 26. Reo NV. “NMR-based metabolomics.” *Drug Chem. Toxicol.*; **25**:375-82. (2002)
 27. Ma SG, Chowdhury SK, Alton KB. “Application of mass spectrometry for metabolite identification.” *Curr. Drug Metab.*; **7**:503-523. (2006)
 28. Chen J, Zhao X, Fritsche J, Yin P, Schmitt-Kopplin P, Wang W, et al. “Practical approach for the identification and isomer elucidation of biomarkers detected in a metabonomic study for the discovery of individuals at risk for diabetes by integrating

- the chromatographic and mass spectrometric information.” *Anal. Chem.*; **80**:1280-1289. (2008)
29. Coulier L, Bas R, Jespersen S, Verheij E, van der Wert MJ, Hankemeier T. “Simultaneous quantitative analysis of metabolites using ion-pair liquid chromatography–electrospray ionization mass spectrometry.” *Anal. Chem.*; **78**: 6573-6582. (2006)
 30. Gika HG, Theodoridis GA, Wilson ID. “Hydrophilic interaction and reversed-phase ultra-performance liquid chromatography TOF-MS for metabonomic analysis of Zucker rat urine.” *J. Sep. Sci.*; **31**:1598-1608. (2008)
 31. Maurer HH. “Liquid chromatography mass spectrometry in forensic and clinical toxicology.” *J. Chromatogr. B*; **713**:3-25. (1998)
 32. Roy SM, Anderle M, Lin H, Becker CH. “Differential expression profiling of serum proteins and metabolites for biomarker discovery.” *Int. J. Mass Spectrom.*; **238**:163-171. (2004)
 33. Yang J, Xu G, Zheng WF, Kong HW, Wang C, Zhao XJ, et al. “Strategy for metabonomics research based on high-performance liquid chromatography and liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry.” *J. Chromatogr. A*; **1084**:214-221. (2005)
 34. Wilson ID, Plumb R, Granger J, Major H, Williams R, Lenz EM. “HPLC-MS-based methods for the study of metabonomics.” *J Chromatogr B*; **817**:67-76. (2005)
 35. Govorukhina NI, Reijmers TH, Nyangoma SO, Van der Zee AGJ, Jansen RC, Bischoff R. “Analysis of human serum by liquid chromatography-mass spectrometry: improved sample preparation and data analysis.” *J. Chromatogr. A*; **1120**: 142-150. (2006)
 36. Idborg H, Zamani L, Edlund PO, Schuppe-Koistinen I, Jacobsson SP. “Metabolic fingerprinting of rat urine by LC/MS Part 2. Data pretreatment methods for handling of complex data.” *J. Chromatogr. B*; **828**:14-20. (2005)
 37. Toyooka T. “Determination methods for biologically active compounds by ultra-performance liquid chromatography coupled with mass spectrometry: application to the analyses of pharmaceuticals, foods, plants, environments, metabonomics, and metabolomics.” *J. Chromatogr. Sci.*; **46**:233-247. (2008)
 38. Yuan KL, Kong HW, Guan YF, Yang J, Xu GX. “A GC-based metabonomics investigation of type 2 diabetes by organic acids metabolic profile.” *J. Chromatogr. B*; **850**:236-240. (2007)
 39. Major HJ, Williams R, Wilson AJ, Wilson ID. “A metabonomic analysis of plasma from Zucker rat strains using gas chromatography/mass spectrometry and pattern recognition.” *Rapid. Commun. Mass Spectrom.*; **20**:3295-3302. (2006)
 40. Benavente F, van den Heijden R, Tjaden UR, van den Greef J, Hankemeier T. “Metabolite profiling of human urine by CE-ESI-MS using separation electrolytes at

- low pH.” *Electrophoresis*; **27**:4570-4584. (2006)
41. 豊岡 利正 : 個人対応栄養指標確立に向けたメタボライトプロファイリング法の重要性と可能性. テーラーメイド個人対応栄養学 (日本栄養・食料学会監修, 合田敏尚, 岡崎光子 責任編集), 建帛社, ; p83-106 (2009)
 42. Jemal, A.; Siegel, R.; Xu, J.; Ward, E. CA ”Breast cancer mortality in neighbouring European countries with different levels of screening but similar access to treatment: trend analysis of WHO mortality database” *Cancer J. Clin.*; **60** (5), 277–300. (2010)
 43. Tabor, C. W.; Tabor, H. “1,4-Diaminobutane (putrescine), spermidine, and spermine.” *Annu. Rev. Biochem.*; **45**, 285–306. (1976)
 44. Janne, J.; Poso, H.; Raina, A. “Polyamines in rapid growth and cancer.” *Biochim. Biophys. Acta.*; **473**, 241–293. (1978)
 45. Pegg, A. E. “Recent advances in the biochemistry of polyamines in eukaryotes.” *Biochem. J.*; **234**, 249–262. (1986)
 46. Russell DH at al; “Increased polyamine concentrations in the urine of human cancer patients.” *Nat. New Biol.*; **233**, 144-145 (1971)
 47. Pere G at al; “Arginase activity in patients with breast cancer: an analysis of plasma, tumors, and its relationship with the presence of the estrogen receptor.” *Onkologie*; **35**, 570-574 (2012)
 48. Suh, J. W.; Lee, S. H.; Chung, B. C.; Park, J. “Urinary polyamine evaluation for effective diagnosis of various cancers.” *J. Chromatogr., B*; **688**, 179–186. (1997)
 49. Lee, S. H.; Kim, S. O.; Lee, H.; Chung, B. C.” Estrogens and polyamines in breast cancer: their profiles and values in disease staging.” *Cancer Lett.*; **133**, 47–56. (1998)
 50. Hiramatsu, K.; Miura, H.; Kamei, S.; Iwasaki, K.; Kawakita, M. “Development of a sensitive and accurate enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) system that can replace HPLC analysis for the determination of N1,N12-diacetylspermine in human urine.” *Biochemistry*; **124**, 231–236. (1998)
 51. Gröschl, M.” Current status of salivary hormone analysis.” *Clin. Chem.*; **54**, 1759–1769. (2008)
 52. Avogaro, A.; Toffolo, G.; Miola, M.; Valerio, A.; Cobelli, C.; Del Prato, S. ” Intracellular lactate- and pyruvate-interconversion rates are increased in muscle tissue of non-insulin-dependent diabetic individuals.” *J. Clin. Invest.*; **98**, 108–115. (1996)
 53. Sugimoto, M.; Saruta, J.; Matsuki, C.; To, M.; Onuma, H.; Kaneko, M.; Soga, T.; Tomita, M.; Tsukinoki, K. “Intracellular lactate- and pyruvate-interconversion rates are increased in muscle tissue of non-insulin-dependent diabetic individuals.” *Metabolomics*; **9**, 454–463. (2013)
 54. Neyraud, E.; Tremblay-Franco, M.; Fregoire, S.; Berdeaux, O.; Canlet, C. “In vitro strain measurements in cerebral aneurysm models for cyber-physical diagnosis.” *Metabolomics*; **9**, 213–222 (2013)Keshaviah A, Dellapasqua S, Rotmensz N, Lindtner J,

- Crivellari D, Collins J, Colleoni M, Thurlimann B, Mendiola C, Aebi S, Price K. N., Pagani O., Simoncini E., Gertsch, M. C., Gelber R. D., Coates A. S., Goldhirsch A. "Relationship between Preoperative Serum Markers CA 15-3 and CEA and Relapse of the Disease in Elderly (>65 years) Women with Breast Cancer" *Ann. Oncol.*; **18**, 701–708. (2007)
55. T. Toyo'oka et al. "Fluorogenic reagent for thiols: 4-(N,N-dimethylaminosulphonyl)-7-fluoro-2,1,3-benzoxadiazole." *Analyst*; **114**, 413 (1989)
56. Yamamoto, S.; Itano, H.; Kataoka, H.; Makida, M. "Gas-liquid chromatographic method for analysis of Di- and polyamines in foods." *J. Agric. Food Chem.*; **30**, 435–439.(1982)
57. Choi, M. H.; Kim, K.-R.; Chung, B. C. "Determination of hair polyamines as N-ethoxycarbonyl-N-pentafluoropropionyl derivatives by gas chromatography-mass spectrometry." *J. Chromatogr. A*; **897**, 295–305. (2000)
58. Minocha, S. C.; Minocha, R.; Robie, C. A. "High-performance liquid chromatographic method for the determination of dansyl-polyamines" *J. Chromatogr. A*; **511**, 177–183. (1990)
59. Moret, S.; Bartolomeazzi, R.; Lercker, G. "Improvement of extraction procedure for biogenic amines in foods and their high-performance liquid chromatographic determination." *J. Chromatogr. A*; **591**, 175–180. (1992)
60. Watanabe, S.; Saito, T.; Sato, S.; Nagase, S.; Ueda, S.; Tomita, M. "Investigation of interfering products in the high-performance liquid chromatographic determination of polyamines as benzoyl derivatives." *J. Chromatogr. A*; **518**, 264–267. (1990)
61. Campins-Falco, P.; Molins-Legua, C.; Sevillano-Cabeza, A.; Genaro, L. A. T. " " *J. Chromatogr. B*; **759**, 285–297. (2001)
62. Einarsson, S.; Josefsson, B.; Lagerkvist, S. "Amino acid analysis utilizing phenylisothiocyanate derivatives" *Anal. Chem.*; **58**, 1638–1643. (1986)
63. Bellagamba, F.; Moretti, V. M.; Mentasti, T.; Albertini, A.; Luzzana, U.; Valfre, F. "High-performance liquid chromatographic determination of polyamines in milk as their 9-fluorenylmethoxycarbonyl derivatives using a column-switching technique." *J. Chromatogr. A*; **791**, 79–84. (1997)
64. Lozanov, V.; Petrov, S.; Mitev, V. "Simultaneous analysis of amino acid and biogenic polyamines by high-performance liquid chromatography after pre-column derivatization with N-(9-fluorenylmethoxycarbonyloxy)succinimide." *J. Chromatogr. A*; **1025**, 201–208. (2004)
65. Oguri, S. "Electromigration methods for amino acids, biogenic amines and aromatic amines." *J. Chromatogr. B*; **747**, 1–19. (2000)
66. Ibanez, C.; Simo, C.; Garcia-Canas, V.; Gomez-Martinez, A.; Ferragut, J. A.; Cifuentes, A. "CE/LC-MS multiplatform for broad metabolomic analysis of dietary polyphenols

- effect on colon cancer cells proliferation.” *Electrophoresis*; **33**, 2328–2336. (2012)
67. Toyo’oka T., Ed.; Wiley: Chichester, U.K.; Modern Derivatization Methods for Separation Sciences; (1999).
 68. Sugiura, K.; Min, J. Z.; Toyo’oka, T.; Inagaki, S. ”Rapid, sensitive and simultaneous determination of fluorescence-labeled polyamines in human hair by high-pressure liquid chromatography coupled with electrospray-ionization time-of-flight mass spectrometry.” *J. Chromatogr. A*; **1205**, 94–102. (2008)
 69. Min, J. Z.; Yano, H.; Matsumoto, A.; Yu, H.; Shi, Q.; Higashi, T.; Inagaki, S.; Toyo’oka, T. “Simultaneous determination of polyamines in human nail as 4-(N,N-dimethylaminosulfonyl)-7-fluoro-2,1,3-benzoxadiazole derivatives by nano-flow chip LC coupled with quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry.” *Clin. Chim. Acta.*; **412**, 98–106. (2011)
 70. Toyo’oka, T.; Suzuki, T.; Saito, Y.; Uzu, S.; Imai, K. “Evaluation of benzofurazan derivatives as fluorogenic reagents for thiols and amines using high-performance liquid chromatography” *Analyst*; **114**, 1233–1240. (1989)
 71. Kawanishi, H.; Toyo’oka, T.; Ito, K.; Maeda, M.; Hamada, T.; Fukushima, T.; Kato, M.; Inagaki, S. “Rapid determination of histamine and its metabolites in mice hair by ultra-performance liquid chromatography with time-of-flight mass spectrometry.” *J. Chromatogr. A*; **1132**, 148–156. (2006)
 72. Sugimoto, M.; Wong, D. T.; Hirayama, A.; Soga, T.; Tomita, M. “Capillary electrophoresis mass spectrometry-based saliva metabolomics identified oral, breast and pancreatic cancer-specific profiles.” *Metabolomics*; **6**, 78–95. (2010)
 73. Hiramatsu, K.; Sugimoto, M.; Kamei, S.; Hoshino, M.; Kinoshita, K.; Iwasaki, K.; Kawakita, M. “Diagnostic and prognostic usefulness of N1,N8-diacetylspermidine and N1,N12-diacetylspermine in urine as novel markers of malignancy.” *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*; **123**, 539–545. (1997)
 74. 西川 徹 生化学; **80**, 267-276. (2008)
 75. Miyoshi Y, Hamase K. “Determination of D-serine and D-alanine in the tissues and physiological fluids of mice with various D-amino-acid oxidase activities using two-dimensional high-performance liquid chromatography with fluorescence detection.” *J. Chromatogr. B*; **877**, 2506-2512, (2009)
 76. Toyo’oka, T.,” Development of chiral derivatization reagents having benzofurazan (2,1,3-benzoxadiazole) fluorophore for HPLC analysis and their application to the sensitive detection of biologically important compounds” *Bunseki Kagaku*; **51**, 339–358. (2002)
 77. Toyo’oka, T., “Derivatization for resolution of chiral compounds,in: Toyo’oka, T. (Ed.), Modern Derivatization Methods for Separation Sciences”, Wiley, Chichester, UK, pp. 217–289. (1999)

78. Toyo'oka, T., "Recent progress in liquid chromatographic enantioseparation based upon diastereomer formation with fluorescent chiral derivatization reagents." *Biomed. Chromatogr.*; **10**, 265–277. (1996)
79. Sun, X. X., Sun, L. Z., Aboul-Enein, H. Y., "Chiral derivatization reagents for drug enantioseparation by high-performance liquid chromatography based upon pre-column derivatization and formation of diastereomers: enantioselectivity and related structure." *Biomed. Chromatogr.*; **15**, 116–132. (2001)
80. Srinvas, N. R., Igwemezie, L. N. "Chiral separation by high performance liquid chromatography. I. Review on indirect separation of enantiomers as diastereomeric derivatives using ultraviolet, fluorescence and electrochemical detection." *Biomed. Chromatogr.*; **6**, 163–167. (1992)
81. Srinvas, N. R. "Evaluation of experimental strategies for the development of chiral chromatographic methods based on diastereomer formation." *Biomed. Chromatogr.*; **18**, 207–233. (2004)
82. Toyo'oka, T. "Fluorescent tagging of physiologically important carboxylic acids, including fatty acids, for their detection in liquid chromatography" *Anal. Chim. Acta.*; **465**, 111–130. (2002)
83. Ilisz, I., Berkecz, R., Peter, A. "Application of chiral derivatizing agents in the high-performance liquid chromatographic separation of amino acid enantiomers: a review." *J. Pharm. Biomed. Anal.*; **47**, 1–15. (2008)
84. Bhushan, R., Kumar, V., "Synthesis of chiral hydrazine reagents and their application for liquid chromatographic separation of carbonyl compounds via diastereomer formation." *J. Chromatogr. A*; **1190**, 86–94. (2008)
85. Bhushan, R., Dixit, S., "Application of Hydrazino Dinitrophenyl-Amino Acids as Chiral Derivatizing Reagents for Liquid Chromatographic Enantioresolution of Carbonyl Compounds" *Chromatographia.*; **74**, 189–196. (2011)
86. Toyo'oka, T. "Determination methods for biologically active compounds by ultra-performance liquid chromatography coupled with mass spectrometry: application to the analyses of pharmaceuticals, foods, plants, environments, metabonomics, and metabolomics." *J. Chromatogr. Sci.*; **46**, 233–247. (2008)
87. Nozawa, Y., Sakai, N., Arai, K., Kawasaki, Y., Harada, K., "Reliable and sensitive analysis of amino acids in the peptidoglycan of actinomycetes using the advanced Marfey's method." *J. Microbiol. Methods*; **70**, 306–311. (2007)
88. Fujii, K., Ikai, Y., Mayumi, T., Oka, H., Suzuki, M., Harada, K. "A Nonempirical Method Using LC/MS for Determination of the Absolute Configuration of Constituent Amino Acids in a Peptide: Elucidation of Limitations of Marfey's Method and of Its Separation Mechanism." *Anal. Chem.*; **69**, 3346–3352. (1997)
89. Racker E. "The mechanism of action of glyoxalase." *J. Biol. Chem.* ; **190**:685–696

- (1951)
90. Thornalley PJ “The glyoxalase system: new developments towards functional characterization of a metabolic pathway fundamental to biological life.” *Biochem. J.* ; **269**:1–11 (1990)
 91. Kondoh Y, Kawase M, Kawamaki Y, Ohmori S, “Concentrations of D-lactate and its related metabolic intermediates in liver, blood, and muscle of diabetic and starved rats.” *Res. Exp. Med.* ; **192**:407–414 (1992)
 92. Christopher MM, Broussard JD, Fallin CW, Drost NJ, Peterson ME, “Increased serum D-lactate associated with diabetic ketoacidosis.” *Metab. Clin. Exp.* ; **44**:287–290 (1995)
 93. McLellan AC, Phillips SA, Thornalley PJ “Fluorimetric assay of D-lactate.” *Anal. Biochem.* ; **206**:12–16 (1992)
 94. Thornalley PJ, Hooper NI, Jennings PE, Florkowski CM, Jones AF, Lunec J, Barnett AH, “The human red blood cell glyoxalase system in diabetes mellitus.” *Diabetes Res. Clin. Prac.* ; **7**:115–120 (1989)
 95. McLellan AC, Phillips SA, Thornalley PJ “The assay of methylglyoxal in biological systems by derivatization with 1,2-diamino-4,5-dimethoxybenzene.” *Anal. Biochem.* **206**:17–23(1992)
 96. Thornalley PJ “Methylglyoxal, glyoxalases and the development of diabetic complications.” *Amino Acids* **6**:15–23 (1994)
 97. McLellan AC, Thornalley PJ, Benn J, Sonksen PH “Glyoxalase system in clinical diabetes mellitus and correlation with diabetic complications.” *Clin. Sci.* ; **87**:21–29 (1994)
 98. Thornalley PJ, McLellan AC, Lo TWC, Benn J, Sonksen PH “Negative association between erythrocyte reduced glutathione concentration and diabetic complications.” *Clin. Sci.*; **91**:575–582 (1996)
 99. Chiappin S, Antonelli G, Gatti R, De Palo EF “Saliva specimen: a new laboratory tool for diagnostic and basic investigation.” *Clin. Chim. Acta.* ; **383**:30–40 (2007)
 100. Gröschl M “Current status of salivary hormone analysis.” *Clin. Chem.*; **54**:1759–1769 (2008)
 101. Toyo’oka, T., Ishibashi, M., Takeda, Y., Nakashima, K., Imai, K. “Precolumn fluorescence tagging reagent for carboxylic acids in high-performance liquid chromatography: 4-substituted-7-aminoalkylamino-2,1,3-benzoxadiazoles.” *J. Chromatogr.*; **588**, 61–71 (1991)
 102. Toyo’oka, T., Ishibashi, M., Terao, T., ”Fluorescent chiral derivatization reagents for carboxylic acid enantiomers in high-performance liquid chromatography.” *Analyst*; **117**, 727–733 (1992)
 103. Hasegawa H, Fukushima T, Lee J-A, Tsukamoto K, Moriya K, Ono Y, Imai K “Determination of serum D-lactic and L-lactic acids in normal subjects and diabetic

- patients by column-switching HPLC with pre-column fluorescence derivatization.” *Anal. Bioanal. Chem.* ; **377**:886–891, (2003)
104. Avogaro A, Toffolo G, Miola M, Valerio A, Cobelli C, Del Prato S “Intracellular lactate- and pyruvate-interconversion rates are increased in muscle tissue of non-insulin-dependent diabetic individuals.” *J. Clin. Invest.*; **98**:108–115 (1996)
 105. Avogaro A, Crepalgi C, Miola M, Maran A, Pengo V, Tiengo A, Del Prato S “High blood ketone body concentration in type 2 non-insulin dependent diabetic patients.” *J. Endocrinol. Invest.*; **19**:99–100 (1996)
 106. Nicholson JK, Lindon JC, Holmes E. “ ‘Metabonomics’ : understanding the metabolic responses of living systems to pathophysiological stimuli via multivariate statistical analysis of biological NMR spectroscopic data.” *Xenobiotica*; **29**: 1181-1189. (1999)
 107. Hirayama A, Kami K, Sugimoto M, Sugawara M, Toki N, Onozuka H, Kinoshita T, Saito N, Ochiai A, Tomita M, Esumi H, Soga T. “Quantitative metabolome profiling of colon and stomach cancer microenvironment by capillary electrophoresis time-of-flight mass spectrometry.” *Cancer Res.*; **69**:4918 (2009)
 108. Nohta H, Satozono H, Koiso K, Yoshida H, Ishida J, Yamaguchi M. “Highly selective fluorometric determination of polyamines based on intramolecular excimer-forming derivatization with a pyrene-labeling reagent.” *Anal. Chem.*; **72**, 4199-4204 (2000)
 109. Zimmet P, Alberti KGMM, Shaw J. Global and societal implications of the diabetes epidemic. “Global and societal implications of the diabetes epidemic.” *Nature* ; **414**:782–787. (2001)
 110. Yoon KH, Lee JH, Kim JW, Cho JH, Choi YH, Ko SH, et al. “Epidemic obesity and type 2 diabetes in Asia.” *Lancet.*; **368**:1681–1688. (2006)
 111. Tsutsui H, Maeda T, Toyooka T, Min JZ, Inagaki S, Higashi T, et al. “Practical Analytical Approach for the Identification of Biomarker Candidates in Prediabetic State Based upon Metabonomic Study by Ultraperformance Liquid Chromatography Coupled to Electrospray Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry.” *J. Proteome. Res.*; **9**:3912–3922 (2010)
 112. Tsutsui H, Maeda T, Jun Zhe Min, Inagaki S, Higashi T, Kagawa Y, Toyooka T: “Biomarker discovery in biological specimens (plasma, hair, liver and kidney) of diabetic mice based upon metabolite profiling using ultraperformance liquid chromatography with electrospray ionization time-of-flight mass spectrometry.” *Clin. Chim. Acta.* ; **412**, 861–872 (2011).
 113. Hardy J. A., Higgins G. A. “Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis” *Science* ; **256**, 184-185 (1992)
 114. Bateman, R. J. et al. “Clinical and biomarker changes in dominantly inherited Alzheimer’s disease.” *N. Engl. J. Med.* ; **367**, 795–804 (2012).
 115. Aisen, P. S. et al. “Report of the task force on designing clinical trials in early

- (predementia) AD.” *Neurology* ; **76**, 280–286 (2011).
116. Ringman, J.M. et al. “Cerebrospinal fluid biomarkers and proximity to diagnosis in preclinical familial Alzheimer’s disease.” *Dement. Geriatr. Cogn. Disord.* **33**, 1–5 (2012).
117. Mattsson, N. et al. “Age and diagnostic performance of Alzheimer disease CSF biomarkers.” *Neurology* **78**, 468–476 (2012).
118. Yang et al. “Quantifying the pathophysiological timeline of Alzheimer’s disease.” *J. Alzheimers Dis.* **26**, 745–753 (2011).
119. Vemuri, P. et al. “Serial MRI and CSF biomarkers in normal aging, MCI, and AD.” *Neurology* **75**, 143–151 (2010).
120. Tauber, C. et al. “Brain [18F]FDDNP Binding and Glucose Metabolism in Advanced Elderly Healthy Subjects and Alzheimer’s Disease Patients.” *J. Alzheimers Dis.* in press (2013).
121. Wirth, M. et al. “Alzheimer’s disease neurodegenerative biomarkers are associated with decreased cognitive function but not b-amyloid in cognitively normal older individuals.” *J. Neurosci.* **33**, 5553–5563 (2013).
122. Mosconi, L., Andrews, R. D. & Matthews, D. C. “Comparing Brain Amyloid Deposition, Glucose Metabolism, and Atrophy in Mild Cognitive Impairment with and without a Family History of Dementia.” *J. Alzheimers Dis.* **35**, 509–524 (2013).
123. Haight, T. J. et al. “Relative contributions of biomarkers in Alzheimer’s disease.” *Ann. Epidemiol.* **22**, 868–875 (2012).
124. Mishur, R. J. & Rea, S. L. “Applications of mass spectrometry to metabolomics and metabonomics: detection of biomarkers of aging and of age-related diseases.” *Mass Spectrom. Rev.* **31**, 70–95 (2012).
125. Chan, R. B. et al. “Comparative lipidomic analysis of mouse and human brain with Alzheimer disease.” *J. Biol. Chem.* **287**, 2678–2880 (2012).
126. Guo, S. et al. “UHPLC-TOFMS coupled with chemometric method as a powerful technique for rapid exploring of differentiating components between two Ziziphus species.” *J. Sep. Sci.* **34**, 659–666 (2011).
127. Li, S. L. et al. “A novel strategy to rapidly explore potential chemical markers for the discrimination between raw and processed Radix Rehmanniae by UHPLC-TOFMS with multivariate statistical analysis.” *J. Pharm. Biomed. Anal.* **51**, 812–823 (2010).
128. Fleischhacker WW, Buchgeher A, Schubert H. “Memantine in the treatment of senile dementia of the Alzheimer type.” *Prog. Neuropsychopharmacol Biol. Psychiatry.* ;**10**(1):87-93. (1986)
129. Kornhuber J, Weller M, Schoppmeyer K, Riederer P. “Amantadine and memantine are NMDA receptor antagonists with neuroprotective properties.” *J. Neural Transm Suppl.*;**43**:91-104. Review.(1994)

130. Berger W, Deckert J, Hartmann J, Krotzer C, Kornhuber J, Ransmayr G, Heinsen H, Beckmann H, Riederer P. "Memantine inhibits [3H] MK-801 binding to human hippocampal NMDA receptors." *Neuroreport.* ;**5**(10):1237-1240. (1994)
131. Rao TS, Cler JA, Oei EJ, Emmett MR, Mick SJ, Iyengar S, Wood PL. "The polyamines, spermine and spermidine, negatively modulate N-methyl-d-aspartate (NMDA) and quisqualate receptor mediated responses in vivo : Cerebellar cyclic GMP measurements." *Neurochem Int.*;**16**(2):199-206. (1990)
132. Harris EW, Ganong AH, Cotman CW. "Long-term potentiation in the hippocampus involves activation of N-methyl-D-aspartate receptors." *Brain Res.* ;**323**(1):132-137. (1984)
133. Nankai, M., Klarica, M., Fage, D. & Carter, C. "The pharmacology of native N-methyl-D-aspartate receptor subtypes: different receptors control the release of different striatal and spinal transmitters." *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* **22**, 35–64 (1998).
134. Takano, K., Ogura, M., Nakamura, Y. & Yoneda, Y. "Neuronal and glial responses to polyamines in the ischemic brain." *Curr. Neurovasc. Res.* **2**, 213–223 (2005).
135. Igarashi, K. & Kashiwagi, K. "Modulation of cellular function by polyamines." *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **42**, 39–51 (2010).
136. Paschen, W. "Polyamine metabolism in different pathological states of the brain." *Mol. Chem. Neuropathol.* **16**, 241–271 (1992).
137. Yatin, S. M. et al. "Alzheimer's amyloid beta-peptide associated free radicals increase rat embryonic neuronal polyamine uptake and ornithine decarboxylase activity: protective effect of vitamin E." *Neurosci. Lett.* **263**, 17–20 (1999).
138. Yatin, S. M. et al. "Role of spermine in amyloid beta-peptide-associated free radical-induced neurotoxicity." *J. Neurosci. Res.* **63**, 395–401 (2001).
139. Ma"kitie, L. T. et al. "Brain neurons express ornithine decarboxylase-activating antizyme inhibitor 2 with accumulation in Alzheimer's disease." *Brain Pathol.* **20**, 571–580 (2010).
140. Biomarkers Definitions Working Group: *Clin Pharmacol Ther.*; **69**(3): 89-95, (2001)

謝辞

このような研究の機会を賜り、また本研究を遂行するにあたり終始懇切なる御指導、御鞭撻を賜りました 豊岡 利正 教授に心より深く感謝いたします。

本論文に関し、懇切丁寧なご指導と御助言を頂きました静岡県立大学薬学部 臨床薬効解析学分野 伊藤 邦彦 教授、生物薬品化学分野 武田 厚司 教授、薬局管理学分野 前田 利男 教授に深く感謝の意を表します。

また、乳がん患者の唾液試料をご提供して下さった名古屋市立大学医学部 乳腺内分泌外科 部長 遠山 竜也 先生、糖尿病患者の唾液試料を提供して下さった沼津市立病院 薬剤部 部長 野毛 一郎 先生、そしてヒト剖検脳を提供して下さり、脳組織染色等で多大なご協力をして下さった福祉村病院 赤津 裕康 先生、各先生方に心より感謝いたします。

また、実験のみならず日頃からのご指導と共に激励して下さった 轟木 堅一郎 准教授、井之上 浩一 講師、関 俊哲 助教、ならびに研究の遂行のみならず、研究生活においても実に多くのお力添えをいただきました 坂本 亮 君、藤井 慎也 君、望月 俊樹 君をはじめとする生体機能分子分析学講座の皆様我心から深く感謝いたします。

さらに、組織提供にご協力くださった患者の皆様方 及び、そのご家族方々に、感謝の意を込めて深く御礼申しあげます。

最後に、これまで暖かく見守り育ててくださり、このような機会を与えて下さった両親をはじめとする家族、また大切な友人に心より深く感謝いたします。

2014年 3月
筒井 陽仁