

博士論文

LC/MS/MS を用いた疾患関連低分子バイオマーカーの新規測定法開発

2016 年 3 月

静岡県立大学大学院 薬食生命科学総合学府

杉本 宏史

LC/MS/MS を用いた疾患関連低分子バイオマーカーの新規測定法開発

Development of novel analytical methods for the determination of
disease-related small molecule biomarkers by LC/MS/MS

本論文は静岡県立大学大学院 薬食生命科学総合学府
博士論文である

2016 年 3 月

March, 2016

静岡県立大学大学院 薬食生命科学総合学府
博士後期課程薬食生命科学専攻 薬物動態学講座

杉本 宏史

Hiroshi Sugimoto

略 語

本論文中に用いた略語は下記の通りである.

24S-HC	24 <i>S</i> -Hydroxycholesterol
APCI	Atmospheric pressure chemical ionization
CE	Collision energy
CH24H	Cholesterol 24-hydroxylase
CV	Coefficient of variation
CXP	Collision cell exit potential
CYP46A1	Cytochrome P450 family 46A1
DAO	D-Amino acid oxidase
DP	Declustering potential
EMA	European Medicines Agency
EP	Entrance potential
FDA	U.S. Food and Drug Administration
GC/MS	Gas chromatography/mass spectrometry
HER2	Human epidermal growth factor receptor 2
HPLC	High performance liquid chromatography
HQC	High quality control sample
IS	Internal standard
LC/MS/MS	High performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry
LLOQ	Lower limit of quantification
LLQC	Lower limit quality control sample
LQC	Low quality control sample
MF	Matrix factor
MQC	Middle quality control sample
MRM	Multiple reaction monitoring
MS/MS	Tandem mass spectrometer
NMDA	<i>N</i> -Methyl-D-aspartate
PBS	Phosphate-buffered saline
PhRMA	Pharmaceutical Research and Manufacturers of America
QC	Quality control
SD	Standard deviation
RE	Relative error
ULOQ	Upper limit of quantification

目次

緒論	1
第 1 章 LC/MS/MS を用いた 24S-hydroxycholesterol のヒト血漿中濃度測定法の開発	
1.1 序論	5
1.2 実験材料と試験方法	7
1.2.1 実験材料	7
1.2.2 LC/MS/MS 分析条件	7
1.2.3 標準溶液, 検量線標準用試料, QC 試料および内標準溶液の調製	8
1.2.4 サンプル前処理方法	9
1.2.5 評価項目	9
1.2.6 データ処理	10
1.3 実験結果	11
1.3.1 24S-HC の LC/MS/MS 分析条件の設定	11
1.3.2 ヒト血漿中に存在するエステル型 24S-HC の鹸化条件検討	13
1.3.3 ヒト血漿中 24S-HC 濃度測定法のサンプル前処理方法	14
1.3.4 ヒト血漿中 24S-HC 濃度測定法	14
1.3.5 健康成人の血漿中 24S-HC 濃度測定	17
1.4 考察	19
第 2 章 LC/MS/MS を用いた D- および L-serine のヒト血漿中濃度同時測定法の開発	
2.1 序論	21
2.2 実験材料と試験方法	22
2.2.1 実験材料	22
2.2.2 LC/MS/MS 分析条件	22
2.2.3 標準溶液, 検量線標準用試料, QC 試料および内標準溶液の調製	22
2.2.4 サンプル前処理方法	23
2.2.5 評価項目	23
2.2.6 データ処理	24
2.3 実験結果	25
2.3.1 D- および L-serine の LC/MS/MS 分析条件の設定	25
2.3.2 ヒト血漿中 D- および L-serine 濃度測定法のサンプル前処理方法	28
2.3.3 ヒト血漿中 D- および L-serine 濃度測定法	28
2.3.4 健康成人の血漿中 D- および L-serine 濃度測定	30
2.4 考察	32

第 3 章 LC/MS/MS を用いた D- および L-leucine のヒト血漿中濃度測定法の開発および動物血漿試料への応用	
3.1 序論	33
3.2 実験材料と試験方法	34
3.2.1 実験材料	34
3.2.2 LC/MS/MS 分析条件	34
3.2.3 標準溶液, 検量線標準用試料, QC 試料および内標準溶液の調製	34
3.2.4 サンプル前処理方法	35
3.2.5 評価項目	36
3.2.6 データ処理	37
3.3 実験結果	38
3.3.1 D- および L-leucine の LC/MS/MS 分析条件の設定	38
3.3.2 DL-Leucine と DL-isoleucine および DL- <i>allo</i> -isoleucine の識別	38
3.3.3 ヒト血漿中 D- および L-leucine 濃度測定法のサンプル前処理方法	41
3.3.4 ヒト血漿中 D- および L-leucine 濃度測定法	41
3.3.5 健康成人の血漿中 D- および L-leucine 濃度測定	45
3.3.6 D-Leucine および D-leucine の DL-leucine 濃度に対する比の種差検討	45
3.4 考察	47
総論	49
謝辞	52
引用文献	53

緒 論

近年の生命科学関連分野の飛躍的な発展にも拘らず、医薬品開発の成功率の低下が指摘されている。医薬品に求められる安全性および有効性の基準が高まり、さらに、既存薬や競合品との明確な差別化が要求される中、承認医薬品目あたりの研究開発費は、過去 30 年間で 20 倍以上に増加した [1, 2]。2013 年に実施された米国研究製薬工業協会 (Pharmaceutical Research and Manufacturers of America; PhRMA) の調査では、創薬研究開発投資に占める臨床開発 (第 I 相から第 III 相試験) の割合は 57.0% であり、特に第 III 相試験は 35.8% を占める (Table 1) [3]。すなわち、医薬品開発効率の向上には、臨床開発段階での成功率を上げることが重要である。また、医薬品臨床開発の中止原因の約 56% は有効性の欠如、約 28% は安全性に問題があることから [4]、これらの原因を創薬の探索研究段階で判定できれば、効率的な医薬品開発が可能になる。

医薬品開発の成功率向上への対応策にバイオマーカーの活用が注目されている。2006 年に米国食品医薬品局 (U.S. Food and Drug Administration; FDA) から発出された対応策のうち、バイオマーカーが関与するテーマが半数程度を占めた [5]。バイオマーカーとは、正常な生物学的過程、病理学的過程、または治療的処置に対する薬理学的反応の指標として、客観的に測定、評価される特性値であると Biomarkers Definitions Working Group (National Institutes of Health Director's Initiative on Biomarkers and Surrogate Endpoints) で定義された [6]。広義では医療現場で用いられるバイタルサイン、生化学および血液検査値などの各種臨床検査値も含まれる [6]。

Table 1 The cost of research and development by function in PhRMA member companies in 2011

Function	Cost (million dollar)	Share (%)
Preclinical	10,466.3	21.5
Phase I	4,211.0	8.7
Phase II	6,096.4	12.5
Phase III	17,392.9	35.8
Approval	4,033.4	8.3
Phase IV	4,760.9	9.8
Uncategorized	1,684.0	3.5
Total	48,645.0	100.0

Note: All figures include company-financed R&D only. Total values may be affected by rounding. Source: Pharmaceutical Research and Manufacturers of America, PhRMA Annual Membership Survey, 2013. [3]

バイオマーカーは医薬品の研究開発への貢献も期待されている。創薬の探索研究段階では、標的疾患を分子病理学的に評価する *mechanistic marker*, 薬剤作用機序を評価する *pharmacodynamic marker* が用いられ、医薬候補品が絞られた段階では *safety* および *toxicity marker* が利用される。また、医薬候補品の標的分子が明確な場合、標的分子自身が臨床試験における患者層別化を可能にする *stratification marker* として利用できる可能性がある。臨床試験段階では、疾病診断に用いる *diagnostic marker*, 薬剤治療効果を予測する *predictive marker*, 臨床試験のエンドポイントを評価する *surrogate marker* などが利用される [7]。

近年、バイオマーカーを利用した臨床試験数は増加しており、疾病の診断および医薬品開発効率の改善に貢献している (Table 2)。特に癌領域では分子標的薬の増加に伴い、バイオマーカーを利用した事例が多く報告されている [8]。一例として *Human epidermal growth factor receptor 2 (HER2)* 分子標的治療薬が挙げられる。HER2 は乳癌症例の約 15–25% を占める HER2 陽性乳癌に関与しているタンパクであり、HER2 陽性の乳癌患者を対象に分子標的薬である *Trastuzumab* を投与することで、予後不良と考えられていた HER2 陽性乳癌患者の予後を劇的に改善させた [9]。他疾患領域でもバイオマーカーの活用により、薬効の期待できる患者層を特定し、有効性および安全性を早期に確認し臨床試験を加速させることが期待される。今後創薬の探索研究段階および臨床開発初期段階からバイオマーカーを利用した創薬研究 (*translational research*) の重要性はより高くなると共に、臨床開発後期における用量設定根拠や有効性および安全性評価のために、精度の高いバイオマーカーの定量性が求められる。

Table 2 Examples of currently used biomarkers

Biomarker	Disease	Application	Reference
α -Fetoprotein	Liver cancer	Diagnosis	[10]
Brain natriuretic peptide	Acute heart failure	Diagnosis	[11]
C-C chemokine receptor type 5	Human immunodeficiency virus type 1	Patient selection	[12]
C-reactive protein	Inflammation	Detection	[13]
Creatine phosphokinase	Muscular injury	Detection	[14]
Epidermal growth factor receptor	Lung cancer	Patient selection	[15]
Glycosylated hemoglobin A1c	Diabetes mellitus	Monitor glycemic control	[16]
Human epidermal growth factor receptor 2	Breast cancer	Patient selection	[9]
Programmed death–ligand 1	Melanoma, lung and renal cancer	Prediction	[17]
Prostate-specific antigen	Prostate cancer	Diagnosis	[18]
Troponin T and I	Myocardial infarction	Diagnosis	[19]

医薬品の研究開発における生体試料中低分子薬物濃度測定には、測定対象物質を高感度かつ高選択的に測定可能な高速液体クロマトグラフィー/タンデム質量分析 (high performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry; LC/MS/MS) 法が汎用されている。特に、医薬品候補化合物やその代謝物の有効性および安全性を評価する上で、ヒトに投与された薬物の臨床動態試験やトキシコキネティクス試験等の非臨床薬物動態試験における生体試料中薬物濃度分析は、分析法の妥当性および信頼性が担保されていることが必要である。近年、生体試料中における薬物濃度分析に関して、FDA、欧州医薬品庁 (European Medicines Agency; EMA) および厚生労働省医薬食品局より、分析法の堅牢性を保証するためのバリデーションおよび実試料分析に関する指針が発出された [20-22]。さらに、2013 年に FDA から発出された医薬品開発における生体試料中薬物濃度分析法のバリデーションに関するドラフトガイダンスでは、バイオマーカー測定値が安全性・薬効評価および投与量決定に関与する場合に、低分子薬物濃度測定と同様のバリデーション試験が求められている [23]。しかし、バイオマーカーなどの生体内因性物質は、生体内試料中に構造類似物質、構造異性体および光学異性体などが存在しているため、特に他の内因性物質との分離を正確に行い、分析法の特異性を担保する必要がある [24, 25]。

血液および組織中内因性代謝物である糖、アミノ酸、脂質、cholesterol 代謝物、有機酸および nucleotide などの低分子化合物には、病態により変動するものが報告されており、医薬品開発効率向上への貢献が期待される [26]。その中でも、cholesterol 代謝物およびアミノ酸は中枢神経疾患またはアミノ酸代謝異常疾患に関連する低分子バイオマーカーである [27-32]。

Cholesterol 水酸化代謝物である 24S-hydroxycholesterol (24S-HC) は、脳内神経細胞内に特異的に存在する cholesterol 24-hydroxylase によって産生される cholesterol の主代謝物である [33]。主観的認知機能障害、軽度認知障害およびアルツハイマー病と認知症疾患の進行に伴い、24S-HC の血漿中総濃度は 58.4 ± 9.8 ng/mL, 51.0 ± 7.8 ng/mL および 47.5 ± 11.0 ng/mL に低下することが報告され [34, 35]、中枢神経疾患の有用なバイオマーカーであると考えられている [27-29]。また、生体中に極微量に存在する D-アミノ酸である D-serine は、N-methyl-D-aspartate (NMDA) 型グルタミン酸受容体のコアゴニストであり、グルタミン酸神経伝達に重要である [36, 37]。NMDA 受容体機能障害である統合失調症患者における D-serine の血漿中濃度 (0.449 ± 0.360 μ g/mL) は、健康成人 (0.723 ± 0.474 μ g/mL) と比較して約 38% 減少し、また、D-serine の血漿中濃度と統合失調症の陰性症状に負の相関関係が認められた [38]。さらに、D-アミノ酸の酸化的脱アミノ反応を触媒する D-amino acid oxidase (DAO) 活性が減弱した肝硬変患者において、D-leucine の血漿中濃度は健康成人の 3 倍以上に上昇し、アミノ酸代謝異常疾患のバイオマーカーとして有用であると報告された [32]。しかし、生体試料中に同一の分子量を有する構造類似物質、構造異性体および光学異性体を有する cholesterol 代謝物やアミノ酸分析の場合、煩雑な誘導体化反応が求められる場合が多く、誘導体化試薬の純度および反応効率による定量性の低下が懸念される [39]。

そこで、本研究では、生体試料中薬物濃度分析と同様の精度が求められるバイオマーカー測定において、煩雑な誘導体化を必要としない LC/MS/MS を用いた分離分析法の開発を目的とした。

第 1 章では、ヒト血漿中に遊離型および脂肪酸や硫酸エステル体で存在している 24S-HC の総濃度を測定可能な LC/MS/MS を用いた高感度かつ高選択的な新規測定法を開発した。第 2 章では、D-serine およびその光学異性体である L-serine の誘導体化を必要としない堅牢性の高いヒト血漿中濃度測定法を開発した。第 3 章では、誘導体化を必要としない、より堅牢性の高いヒト血漿中 D- および L-leucine 濃度測定法を開発し、さらに動物血漿中 D- および L-leucine 濃度測定に応用した。

第1章 LC/MS/MS を用いた 24S-hydroxycholesterol のヒト血漿中濃度測定法の開発

1.1 序論

24S-hydroxycholesterol (24S-HC) は cholesterol の水酸化代謝物 (oxysterols) であり, 脳内神経細胞内に特異的に存在する cholesterol 24-hydroxylase (CH24H または cytochrome P450 family 46A1; CYP46A1) により産生される [33]. 24S-HC はほぼ脳内でのみ産生され, 血液脳関門を通過し循環血中へ到達するため, 脳内 cholesterol の主要な消失経路であると共に, 血漿中 24S-HC 濃度は脳内 cholesterol 恒常性のマーカーとして考えられている [40-42]. さらに, アルツハイマー病および多発性硬化症患者における 24S-HC の血漿中総濃度は健康成人と比較した場合, それぞれ約 18% および 28% 減少したため, 中枢神経疾患のバイオマーカーであると考えられている [27-29, 34, 35, 43, 44]. しかし, 血漿中の 24S-HC 濃度は, 類縁化合物である cholesterol と比較して微量であり, 血漿中 24S-HC の正確な定量には分析の前処理段階での cholesterol 除去が必要である [45]. また, 24S-HC はヒト血漿中で遊離型とエステル型で存在しており, 約 70% が脂肪酸エステル, 約 10% がスルホン酸エステルであるため [33, 46], ヒト血漿中 24S-HC の総濃度測定にはアルカリ加水分解 (鹼化) 条件の最適化が必要である.

ヒト血漿中には 24S-HC の構造異性体として水酸化位置の異なる 4 α -hydroxycholesterol (4 α -HC), 4 β -hydroxycholesterol (4 β -HC), 7 α -hydroxycholesterol (7 α -HC), 7 β -hydroxycholesterol (7 β -HC), 22R-hydroxycholesterol (22R-HC), 25-hydroxycholesterol (25-HC) および 27-hydroxycholesterol (27-HC) が存在する (Figure 1). これらは 24S-HC と同一の分子量を有するため, 24S-HC 濃度の正確な定量には, クロマトグラム上において分離が必要である.

これまで報告されているヒト血漿中 24S-HC 濃度測定法の多くは, 極性基が少なくイオン化効率の低い oxysterols をイオン化するため, 誘導体化反応が必要であった [46-48]. LC/MS/MS を用いた低分子バイオマーカー測定において誘導体化法を用いる場合, 複数の測定対象物を同時に測定可能な点, 他の内因性成分との分離改善および検出感度の向上などの利点があるが, 誘導体化試薬の純度および反応効率に起因した定量値への影響が問題となる場合がある [39]. DeBarberらは大気圧化学イオン化法による液体クロマトグラフィータンデム質量分析法 (HPLC/atmospheric pressure chemical ionization (APCI)-MS/MS; LC/APCI-MS/MS) を用いてヒト血漿中 oxysterols の濃度を誘導体化することなく定量した [49]. しかし, 22R-HC および 27-HC との分離は評価されておらず, また, 24S-HC の定量下限は 30 ng/mL であり, 神経変性疾患患者のヒト血漿中 24S-HC の濃度測定には定量感度が不十分である [49]. 従ってヒト血漿中 24S-HC 定量法開発には, 他の内因性 oxysterols との正確な分離および更なる感度向上が必要とされる.

本章では, 誘導体化を行わないより堅牢性の高いヒト血漿中 24S-HC 定量法開発を目的とした. また, 本分析法の汎用性を確認するため健康成人の血漿中 24S-HC 濃度を測定した.

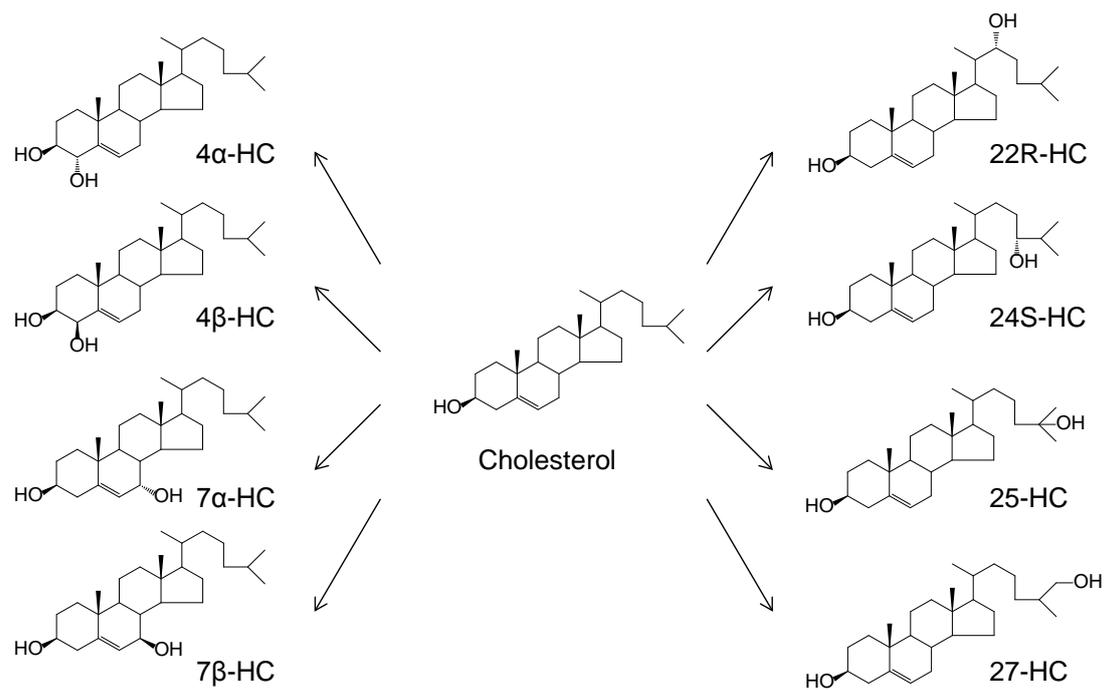


Figure 1: The biosynthetic pathways for key oxysterols from cholesterol

1.2 実験材料と試験方法

1.2.1 実験材料

4 α -HC (純度 95%) は Toronto Research Chemicals (North York, ON, Canada) より購入した。4 β -HC, 7 α -HC, 7 β -HC, 22R-HC, 24S-HC, 25-HC, 27-HC および内標準物質である 24-hydroxycholesterol-*d*₇ (24-HC-*d*₇) は Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL, USA) より購入した。Avanti Polar Lipids 社より購入した標準品の純度は全て 99% 以上であった。Butylated hydroxytoluene は Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) より購入した。K₂EDTA 含有ヒト (白色人種, 男性, 22–62 歳および女性, 17–61 歳) 血漿は日本生物材料センター (東京) および Bioreclamation (Westbury, NY, USA) より購入した。その他の試薬は分析用グレードを使用した。

1.2.2 LC/MS/MS 分析条件

High performance liquid chromatography (HPLC) は Agilent 1200 system, カラムコンパートメント, ミクロデガッサ, コントロールモジュール (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) および CTC PAL autosampler (CTC Analytics, Zwingen, Switzerland) から構成されたシステムを用いた。分析カラムは, CAPCELL PAK C18 系カラム (CAPCELL PAK C18 MGII, 3 μ m, 2.0 mm ID x 100 mm; CAPCELL PAK C18 AQ, 3 μ m, 3.0 mm ID x 100 mm; CAPCELL PAK CORE C18, 2.7 μ m, 2.1 mm ID x 100 mm, 資生堂, 東京), Inertsil ODS-3 C18 系カラム (Inertsil ODS-3, 3 μ m, 2.1 mm ID x 150 mm, ジーエルサイエンス, 東京), Phenomenex Kinetex core-shell 系カラム (Phenomenex Kinetex C18, 2.6 μ m, 2.1 mm ID x 100 mm, 島津ジーエルシー, 東京) および L-column プレカラムフィルターを接続した L-column2 ODS 系カラム (2.0 μ m, 2.1 mm ID x 100 mm または 150 mm, 化学物質評価研究機構, 東京) を使用した。移動相は A (acetonitrile/water/propionic acid, 50:950:1, v/v/v) および B (acetonitrile/water/propionic acid, 950:50:1, v/v/v) を用い, カラム温度 50°C, 流速 0.5 mL/min で分析した。移動相組成比は Table 3 の条件に従い直線的に変化させた。

Table 3 HPLC gradient program for oxysterols

Time (min)	A (%)	B (%)
0.0	30	70
2.0	30	70
10.0	10	90
10.1	0	100
12.0	0	100
12.1	30	70
15.0	30	70

Table 4 Mass spectrometric parameters for oxysterols

Compound	Molecular weight	Precursor ion (<i>m/z</i>)	Product ion (<i>m/z</i>)	Mass spectrometric parameters			
				DP (V)	EP (V)	CE (eV)	CXP (V)
24S-HC	402.65	367.6	105.0	121	10	63	12
24S-HC- <i>d</i> ₇	409.70	374.6	105.0	131	10	71	12

DP, declustering potential; EP, entrance potential; CE, collision energy; CXP, collision cell exit potential

質量分析装置は APCI プローブを装着した, API5000 トリプル四重極質量分析装置を使用した. 検量線の作成および化合物濃度の算出には解析ソフトウェア Analyst ver.1.4.2 を使用した. ヒートガス温度は 400°C, カーテンガスは 15 psi, イオンソースガス 1 は 15 psi, イオンソースガス 2 は 60 psi, コリジョンガスは 6 psi, nebulizer current は 1 μ A に設定した. Multiple reaction monitoring (MRM) イオンや各種パラメータは Table 4 に記載した.

1.2.3 標準溶液, 検量線標準用試料, QC 試料および内標準溶液の調製

4 α -HC, 4 β -HC, 7 α -HC, 7 β -HC, 22R-HC, 24S-HC, 25-HC, 27-HC および 24-HC-*d*₇ を 1 mg 秤量して褐色メスフラスコに採取し, acetonitrile を加えて正確に 10 mL とし, 100 μ g/mL の標準原液を調製した. 100 μ g/mL の内標準原液をさらに acetonitrile で希釈して 500 ng/mL の内標準溶液を調製した. すべての溶液は 4°C 設定の冷蔵庫に保管した. 24S-HC を含む oxysterols は生体内因性物質であり, これらを完全に除いたブランク血漿を調製するのは困難である. そこで, ブランク血漿の代替マトリックスである Dulbecco's phosphate-buffered saline (PBS, 2.7 mmol/L KCl, 1.5 mmol/L KH₂PO₄, 136.9 mmol/L NaCl and 8.9 mmol/L Na₂HPO₄·7H₂O) を用いて検量線用標準試料を調製した. PBS 200 μ L に終濃度を 1, 2, 4, 10, 20, 40 および 100 ng/mL となるように, 標準溶液を添加した. なお, 検量線用標準試料は用時調製した. QC 試料は, チューブへの吸着回避のため 1% (w/v) Tween 80 を添加した PBS に, 終濃度を 1 (lower limit QC, LLQC), 3 (low-QC, LQC), 15 (medium-QC, MQC) および 80 ng/mL (high-QC, HQC) となるように標準溶液を添加して調製した. 生体試料中における薬物濃度分析に関する各局の指針に従い [20-23], 定量下限における分析対象物質のレスポンスは, ブランクサンプルの 5 倍以上で設定した. また, QC 試料の濃度については, LQC は定量下限の 3 倍以内, MQC は検量線の間付近, HQC は検量線の最高濃度の 75% 以上で設定した. また, ヒト血漿中 24S-HC 濃度を定量する上で, 代替マトリックスに使用した 1% (w/v) Tween 80 含有 PBS の妥当性を検証するため, ヒトブランク血漿に既知濃度 [3 (LQC), 15 (MQC) および 80 ng/mL (HQC)] の 24S-HC を添加, およびヒト血漿を PBS で 2 倍希釈したヒト血漿 QC 試料を調製した. 調製した QC 試料は分析まで -30°C 設定の冷凍庫に保存した.

1.2.4 サンプル前処理方法

血漿試料または PBS 200 μL をガラス試験管に採取し、検量線用標準溶液および 500 ng/mL 24-HC- d_7 10 μL (ブランクサンプルには acetonitrile を 10 μL) を添加した。さらに 8 mol/L sodium hydroxide 2 mL, methanol 5 mL を加えて攪拌後、50°C に設定した水浴中で 1 時間緩やかに振盪し、鹼化処理した。鹼化後のサンプルに飽和食塩水溶液 1 mL を添加し、hexane 3 mL を加えて液液抽出した。液液抽出操作は 2 回繰り返した。抽出後の上清 (2.5 mL \times 2 回) は、室温条件下で窒素ガス気流下で濃縮乾固後、acetonitrile/water/propionic acid (500:500:1, v/v/v) 100 μL で再溶解した。再溶解液を Ultra-free MC centrifugal filter unit (0.45 μm , Millipore Corporation, Billerica, MA, USA) に移しかえ、21,600 $\times g$ で 5 分間遠心分離後のろ液 20 μL を LC/MS/MS にて分析した。

また、血漿中に存在する cholesterol が分析前処理および鹼化処理中で酸化し、24S-HC 濃度値に影響を与える可能性がある。そこで、ヒトブランク血漿に既知濃度 (3 および 80 ng/mL) の 24S-HC を添加したヒト血漿 QC 試料を用いて、酸化防止剤である butylated hydroxytoluene (BHT, 1.5 mmol/L) [50] の有無による、濃度値への影響を評価した。

1.2.5 評価項目

LC/MS/MS を用いたヒト血漿中 24S-HC 濃度測定法の妥当性を評価するために、method qualification を実施した。検量線用標準試料の直線性、分析日内および日間での真度および精度、マトリックス効果および安定性を評価した。さらに、生体内因性物質の定量に特異的な項目 [25, 51] として、ヒト血漿 QC 試料の真度および精度を評価した。

検量線は検量線用標準試料を測定したピーク面積比 (24S-HC/24S-HC- d_7) と調製濃度の関係から作成した。検量線は $1/x^2$ の重み付けを行い、最小二乗法により直線回帰した。

検量線モデル: $y = ax + b$, 最小二乗法

x : 調製濃度 (ng/mL): $C_{nominal}$

y : ピーク面積比 (24S-HC 面積値/24S-HC- d_7 面積値)

a : 傾き

b : y -切片

r : 相関係数

検量線の直線性は、検量線用標準試料の実測濃度の真度 (%RE) および相関係数を求めて評価した。各濃度の真度の基準は、理論値の $\pm 15\%$ 以内とし、定量下限のみ $\pm 20\%$ 以内とした。

分析日内および日間での真度および精度を評価するため、1% (w/v) Tween 80 含有 PBS に 24S-HC (LLQC, LQC, MQC および HQC) を添加して調製し、3 回の異なる分析単位で繰り返し分析した。さらに、代替マトリックスとして使用した PBS の妥当性を検証するため、ヒトブランク血漿または既知濃度 (LQC, MQC および HQC) の 24S-HC を添加、および PBS で 2 倍

希釈したヒト血漿 QC 試料を調製し、3 回の異なる分析単位で繰り返し分析した。QC 試料の実測濃度の平均値の真度 (%RE) および精度 (%CV) を算出して日内再現性を評価した。また、3 日間の実測濃度の平均値について真度および精度を求め、日間再現性を評価した。QC 試料の真度の基準は、理論値の ±15% 以内とし、定量下限のみ ±20% 以内とした。各濃度における定量値の精度は 15% 以下とした。ただし、定量下限では 20% 以下とした。

24S-HC のレスポンスについて、ヒト血漿中のマトリックス由来の成分による影響を評価した。マトリックス効果は、マトリックスファクター (MF) の算出により評価した。MF を算出前にあらかじめブランク血漿中 24S-HC 濃度を定量した。24S-HC の MF は、マトリックスに既知濃度 (15 ng/mL, MQC) を加えたピーク面積比と、マトリックス非存在下で 24S-HC の内因性濃度と既知濃度 (15 ng/mL, MQC) を加えたピーク面積比を比較して算出した。また、IS-normalized MF は 24S-HC の MF を内標準物質の MF で補正して算出した。

$$\text{MF} = \frac{\text{Peak area of sample for matrix effect}^{*1}}{\text{Mean peak area of reference}^{*2}} \quad \text{IS-normalized MF} = \frac{\text{MF of analyte}}{\text{MF of IS}}$$

*¹ Human plasma for matrix effect was prepared by spiking standard solution in processed sample.

*² Reference was prepared by spiking standard solution at the concentration of the endogenous level plus 15 ng/mL of 24S-HC in acetonitrile/water/propionic acid (500:500:1) solution.

さらに、24S-HC の溶液中およびヒト血漿中安定性を評価した。標準溶液の安定性は、調製直後の溶液と 4°C 設定の冷凍庫に一定期間保存した溶液中 24S-HC 濃度を比較して評価した。1% (w/v) Tween 80 含有 PBS (LQC および HQC) およびヒト血漿 (ブランク, MQC 添加および 2 倍希釈血漿) 中の室温短期保存 (6 時間), オートサンプラー中 (10°C, 3 日間), 長期保存 (-30°C, 56 日間), 5 回凍結融解安定性を評価した。各濃度における初期値の ±15% 以内を基準とした。

1.2.6 データ処理

質量分析データ、ピーク面積値、検量線および実測濃度は、Analyst version 1.4.2 (Sciex) により算出した。真度とは 24S-HC の定量値と理論値との一致の程度のことを指し、相対誤差 (%RE) で表示した。精度とは繰り返し分析で得られる定量値のばらつきのことを指し、%CV で評価した。

相対誤差：Relative error (%RE)

$$\%RE = \frac{(x_i - C_{nominal})}{C_{nominal}} \times 100 \quad x_i: \text{実測濃度}$$

精度：Precision (%CV)

$$\%CV = \frac{\text{標準偏差}}{\text{平均値}} \times 100$$

1.3 実験結果

1.3.1 24S-HC の LC/MS/MS 分析条件の設定

24S-HC などの oxysterols は極性基をほとんど有していないため、一般的なエレクトロスプレーイオン化による液体クロマトグラフィータンデム質量分析法 (HPLC/electrospray ionization (ESI)-MS/MS; LC/ESI-MS/MS) 法ではイオン化効率が低い。このため、前処理過程に誘導体化を含まない分析法により、ヒト血漿中 24S-HC を高感度かつ高選択的に分析するのは困難である。そこで、24S-HC のイオン化により適した LC/APCI-MS/MS に着目した [52]。24S-HC はイオン化の過程で 1 または 2 分子の脱水反応が起こるため、脱水したフラグメントイオンをプリカーサーイオンに選択した。4 α -HC, 4 β -HC, 7 α -HC, 7 β -HC, 22R-HC, 24S-HC, および 25-HC では m/z 367.6>105.0, 27-HC では m/z 385.6>105.0 の MRM モードで検出した場合に、最も感度が高かった。また、24S-HC- d_7 は m/z 374.6>105.0 の MRM モードで検出した (Figure 2)。

ヒト血漿中には 24S-HC に加えて、4 α -HC, 4 β -HC, 7 α -HC, 7 β -HC, 22R-HC, 25-HC および 27-HC 等の水酸化位置の異なる構造類似化合物が存在し、24S-HC と同一の分子量を有するため、LC/APCI-MS/MS を用いた MRM モードでは分離が困難である。そこで、24S-HC 濃度の正確な定量には、クロマトグラム上での分離分析が重要である。分析カラムとして CAPCELL PAK C18 系カラム, Inertsil ODS-3 C18 系カラム, Phenomenex Kinetex core-shell 系カラムおよび L-column2 ODS 系カラムの中から、24S-HC と 27-HC の良好な分離を示した L-column2 ODS を選択し、acetonitrile/water/propionic acid の混液からなる HPLC 移動相を用いたグラジエントモードにより分析した。4 α -HC, 4 β -HC, 7 α -HC, 7 β -HC, 22R-HC, 24S-HC, 25-HC および 27-HC の混合溶液 (10 ng/mL) を分析した代表的な MRM クロマトグラムを Figure 3 に示した。24S-HC および 27-HC の保持時間は比較的近いものの、27-HC は m/z 367.6>105.0 ではほとんど検出されないため、MRM トランジションの違いでも分離分析が可能であった。本分析法を用いた場合、既報の分析法と比較して [49], より良好な 24S-HC の分離分析が可能となった。

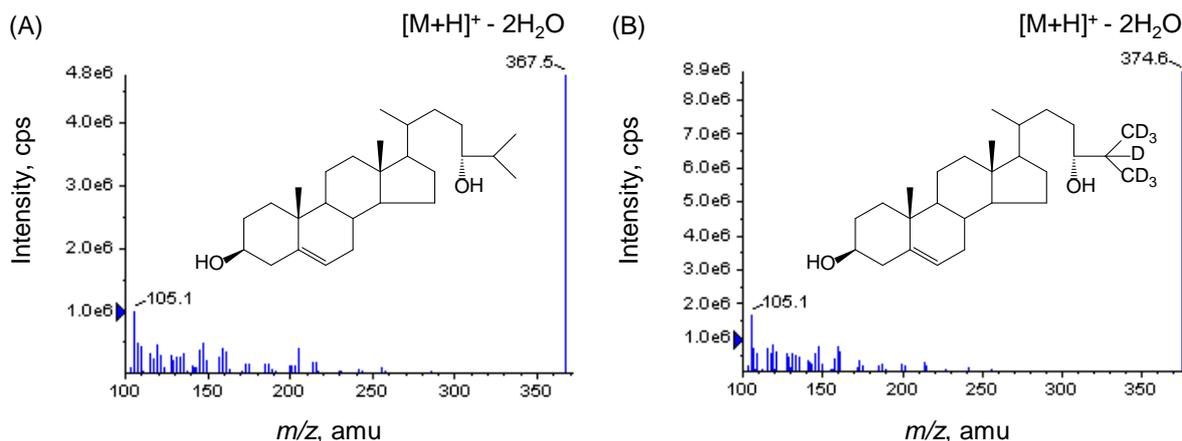


Figure 2: Chemical structure and positive product ion spectra

(A): The positive product ion spectrum of the precursor ion for 24S-HC and (B) for 24S-HC-*d*₇.

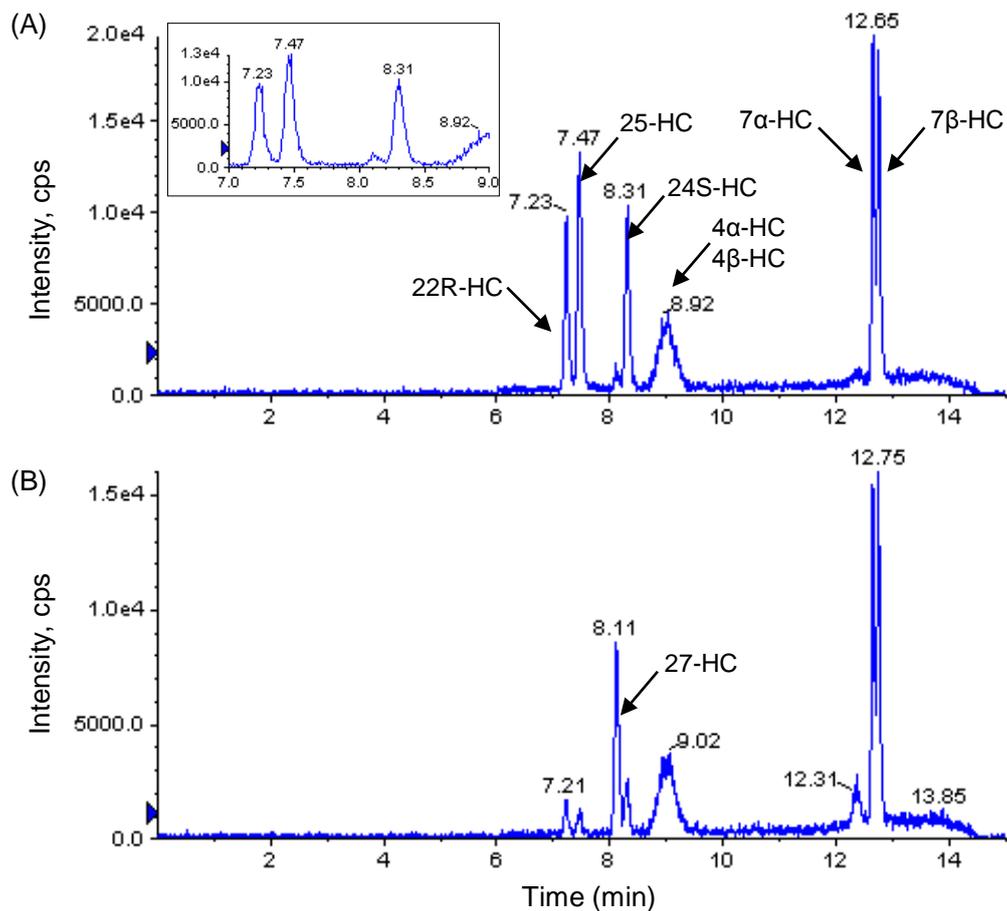


Figure 3: The representative MRM chromatogram of the mixture of 4 α -HC, 4 β -HC, 7 α -HC, 7 β -HC, 22R-HC, 24S-HC, 25-HC, and 27-HC solution (10 ng/mL).

(A): m/z 367.6 > 105.0. (B): m/z 385.6 > 105.0. The inserted MRM chromatogram is enlarged illustration at the retention time from 7.0 to 9.0 min at m/z 367.6 > 105.0.

1.3.2 ヒト血漿中に存在するエステル型 24S-HC の鹼化条件検討

ヒト血漿中の総 24S-HC (遊離型およびエステル型) 濃度の定量には, エステル型で存在する 24S-HC を鹼化し, 遊離型 24S-HC に変換する必要がある. 鹼化処理に用いた sodium hydroxide 濃度および鹼化時間を検討し, ヒト血漿中の 24S-HC 総濃度を安定的に測定できる条件を最適化した. 8 mol/L sodium hydroxide 存在下で 10 分以上処理した場合, ピーク面積比 (24S-HC/24S-HC- d_7) がほぼ一定になった. 一方, 1 mol/L sodium hydroxide 存在下では, 鹼化が不十分であった (Figure 4). 従って以後の鹼化条件は, より安定的に 24S-HC の血漿中総濃度を定量するため, 8 mol/L sodium hydroxide 存在下で 1 時間処理した.

鹼化反応および分析前処理中にヒト血漿中内因性 cholesterol が酸化し, 24S-HC の濃度値に与える影響を評価した. ヒト血漿 QC サンプル (LQC および HQC) に, 酸化防止剤である 1.5 mmol/L の BHT を添加して 24S-HC 濃度を測定した. その結果, BHT の有無に拘らず 24S-HC 濃度値は変化しなかったため, 鹼化反応および分析前処理中にヒト血漿中 cholesterol が酸化し, 24S-HC 濃度値に与える影響は限定的であった (Table 5).

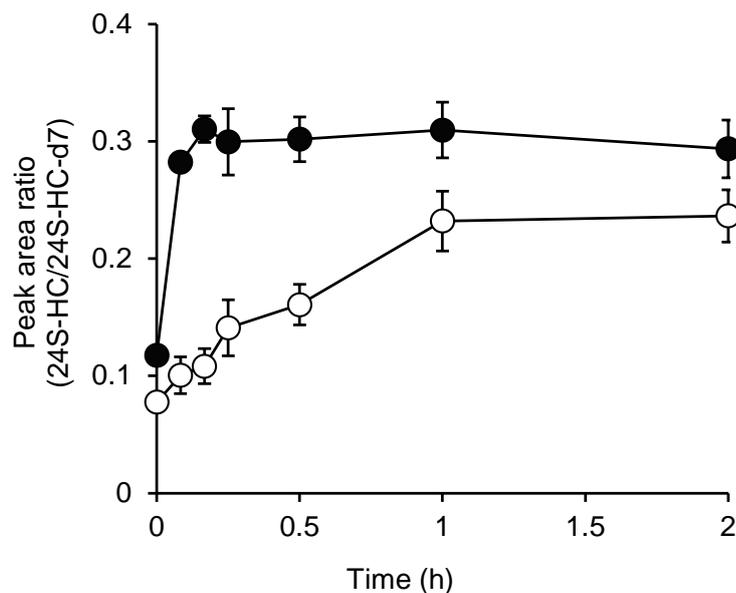


Figure 4: The profile of saponification time versus peak area ratios of 24S-HC to 24S-HC- d_7 in human plasma.

The saponification process was conducted in the presence of 1 mol/L sodium hydroxide and 5 mL methanol (open circle) and 8 mol/L sodium hydroxide and 5 mL methanol (closed circle) at 50°C. Each data point represents the mean \pm standard deviation (n=3).

1.3.3 ヒト血漿中 24S-HC 濃度測定法のサンプル前処理方法

鹼化処理後のヒト血漿試料または 1% (w/v) Tween 80 含有 PBS 中 24S-HC は hexane による液液抽出法により抽出した。飽和食塩水溶液添加により、24S-HC の baseline が約 70% に低減し signal-to-noise 比の向上に寄与した。また、液液抽出過程における 24S-HC の回収率を上げるため、抽出操作を 2 回繰り返した。1% (w/v) Tween 80 含有 PBS で調製した QC 試料の回収率は 75.2–84.9% と良好であり、添加濃度 (LQC, MQC および HQC) に拘らず安定した値を得た。

1.3.4 ヒト血漿中 24S-HC 濃度測定法

検量線は検量線用標準試料を測定したピーク面積比 (24S-HC/24S-HC- d_7) と調製濃度の関係から作成した。検量線は $1/x^2$ の重み付けを行い最小二乗法により直線回帰した。検量線範囲はヒト血漿中 24S-HC 濃度を定量できる 1–100 ng/mL に設定した。検量線の相関係数 (r) は 0.9978–0.9992 であり、検量線用標準試料の実測濃度の真度 (%RE) は $\pm 10\%$ 未満であった。LLOQ 試料のクロマトグラムは Figure 5A に示した。また、最高濃度の検量線用標準試料に続けてブランクサンプルを測定したが、キャリアオーバーによるピークは検出されなかった。

1% (w/v) Tween 80 含有 PBS に 24S-HC (LLQC, LQC, MQC および HQC, 各 $n=5$) を添加して調製した QC 試料の 24S-HC 濃度の真度および精度は、Table 5 に示した。分析日内および日間での真度 (%RE) および精度 (%CV) は -0.5 – 2.7% および 6.5% 以下であり、本分析法の堅牢性を示した。さらに、代替マトリックスを使用する妥当性を示すために、ヒトブランク血漿または既知濃度 (LQC, MQC および HQC) の 24S-HC を添加したヒト血漿 QC 試料 (各 $n=5$) を分析した。さらに、アルツハイマー病などの神経変性疾患患者で 24S-HC 濃度が減少する報告もあるため [29], PBS で 2 倍希釈したヒト血漿 QC 試料も分析した。分析日内および日間での真度 (%RE) および精度 (%CV) は -0.7 – 6.6% および 7.6% 以下であり、“1.2.5 評価項目”に記載した基準を満たした。さらに、4 個体のヒトブランク血漿の IS で補正した MF は 0.916–1.08, CV は 5.9% 以下であり、ヒト血漿中存在下および非存在下におけるピーク面積比 (24S-HC/24S-HC- d_7) は同等で、マトリックス効果は認められなかった (Table 6)。以上より、1% (w/v) Tween 80 含有 PBS が代替マトリックスとして科学的に妥当であることを示した。

24S-HC の標準溶液, surrogate matrix である 1% (w/v) Tween 80 含有 PBS およびヒト血漿中における安定性を評価した。24S-HC の標準溶液は acetonitrile 中で室温 6 時間および 4°C 保存で 4 ヶ月間保存後の残存率は、105.5 および 102.7% であった。また、1% (w/v) Tween 80 含有 PBS およびヒト血漿 (ブランク, MQC 添加および 2 倍希釈血漿) 中 24S-HC の残存率は、室温 6 時間, オートサンプラー (10°C , 3 日間) 中, 長期保存 (-30°C , 56 日間) および 5 回の凍結融解条件下で 92.4–110.4% であり 24S-HC は安定であった (Table 7)。

Table 5 Intra & inter-assay precision and accuracy for 24S-HC

Matrix		Nominal conc. (ng/mL)	Intra-assay (n=5)			Inter-assay (n=15)		
			Average conc. (ng/mL)	CV (%)	RE (%)	Average conc. (ng/mL)	CV (%)	RE (%)
PBS	LLQC	1	1.01	3.1	0.7	1.01	4.4	1.0
	LQC	3	3.00	6.5	-0.1	3.00	5.3	0.1
	MQC	15	15.2	5.4	1.6	15.4	4.7	2.7
	HQC	80	79.6	1.5	-0.5	80.9	3.3	1.2
Human plasma	Unspiked	-	34.7	5.1	-	34.4	6.6	-
	+LQC	37.7	38.4	5.3	1.8	37.4	7.6	-0.7
	+MQC	49.7	50.5	1.4	1.7	49.6	4.8	-0.3
	+HQC	115	120	3.3	4.6	118	5.8	3.1
	Diluted with PBS	17.4	18.5	5.6	6.6	18.1	6.1	4.4
Human plasma (+)BHT	+LQC	37.7	38.1	9.0	1.2	-	-	-
	+HQC	115	119	4.7	4.0	-	-	-

Intra- and inter-day assay precision and accuracy in the surrogate matrix were evaluated using the 24S-HC spiked PBS samples at levels of 1 (LLQC), 3 (LQC), 15 (MQC), and 80 (HQC) ng/mL.

Intra- and inter-day assay precision and accuracy in human plasma were evaluated using the unspiked human plasma, 24S-HC spiked human plasma samples at levels of LQC, MQC, HQC and two-fold diluted human plasma with PBS. The effect of 1.5 mmol/L of BHT as antioxidant on the 24S-HC concentrations was evaluated in the 24S-HC spiked human plasma samples at levels of LQC and HQC. For the determination of 24S-HC spiked human plasma at a level of HQC, the partial volume (100 μ L) analysis was conducted.

Table 6 Matrix factor (MF)

Human plasma (Lot No.)	MF		IS-normalized MF		
	Analyte	IS	Mean	SD	CV (%)
MT134913	1.08	1.01	1.07		
	1.22	1.07	1.15	1.08	5.9
	1.05	1.03	1.02		
WX041699F	0.971	1.08	0.900		
	0.977	1.04	0.939	0.919	2.2
	0.922	1.00	0.919		
MT134912	1.05	1.03	1.02		
	1.07	1.00	1.07	1.08	5.7
	1.15	1.00	1.15		
GX030019	0.945	1.01	0.938		
	0.939	1.04	0.899	0.916	2.2
	0.947	1.04	0.910		

MF = Peak area of sample for matrix effect*¹/mean peak area of reference*²

IS-normalized MF = MF of analyte/MF of IS

*¹ Human plasma for matrix effect was prepared by spiking standard solution in processed sample.

*² Reference was prepared by spiking standard solution at the concentration of the endogenous level plus 15 ng/mL.

Table 7 Stability study of 24S-HC

Matrix	Analyte concentration	Temperature	Period	% of remaining
Acetonitrile	100 µg/mL	Room temperature	6 h	105.5
		4°C	142 days	102.7
Surrogate matrix	3, 80 ng/mL	Room temperature	6 h	100.4, 93.4
		10°C*	3 days	109.3, 96.4
		-30°C	56 days	96.5, 98.4
		-30°C	5 freeze/thaw cycles	106.8, 102.8
Human plasma	Unspiked, +MQC, diluted with PBS	Room temperature	6 h	99.6, 96.4, 109.2
		10°C*	3 days	90.9, 102.0, 110.4
		-30°C	56 days	98.8, 92.4, 104.2
		-30°C	5 freeze/thaw cycles	100.3, 98.6, 97.8

* in the autosampler

1.3.5 健康成人の血漿中 24S-HC 濃度測定

上記で構築した定量法を用いて、男性および女性健康成人の血漿中 24S-HC 濃度を定量した。ヒト血漿中 24S-HC 濃度を測定した時のクロマトグラムを Figure 5B に示した。24S-HC の peak intensity は LLOQ 試料より十分に高く、内因性に存在する oxysterols との分離も良好であった。さらに本分析法の選択性を示すため、24S-HC 定量分析用の mass transition (m/z 367.6 > 105.0) および、別の mass transition (m/z 385.6 > 105.0) により得られたピーク面積比 (transition ratio) を比較した。 m/z 385.6 > 105.0 を用いた場合、24S-HC の検出感度が顕著に低かったため、ヒトブランク血漿に既知濃度 (HQC) の 24S-HC を添加したヒト血漿を用いて、transition ratio を評価したところ、 3.99 ± 0.31 (n=5) と安定した値であった。従って、本分析法はヒト血漿中 24S-HC 濃度を測定する上で十分な特異性を有していると考えられた。男性 (n=20, 22–62 歳) および女性 (n=20, 17–61 歳) 健康成人の血漿中 24S-HC 濃度は 32.0 ± 9.0 ng/mL および 32.8 ± 10.0 ng/mL であり、顕著な性差は認められなかった (Figure 6)。これらの濃度値は、既報値と同程度であった [29, 47]。

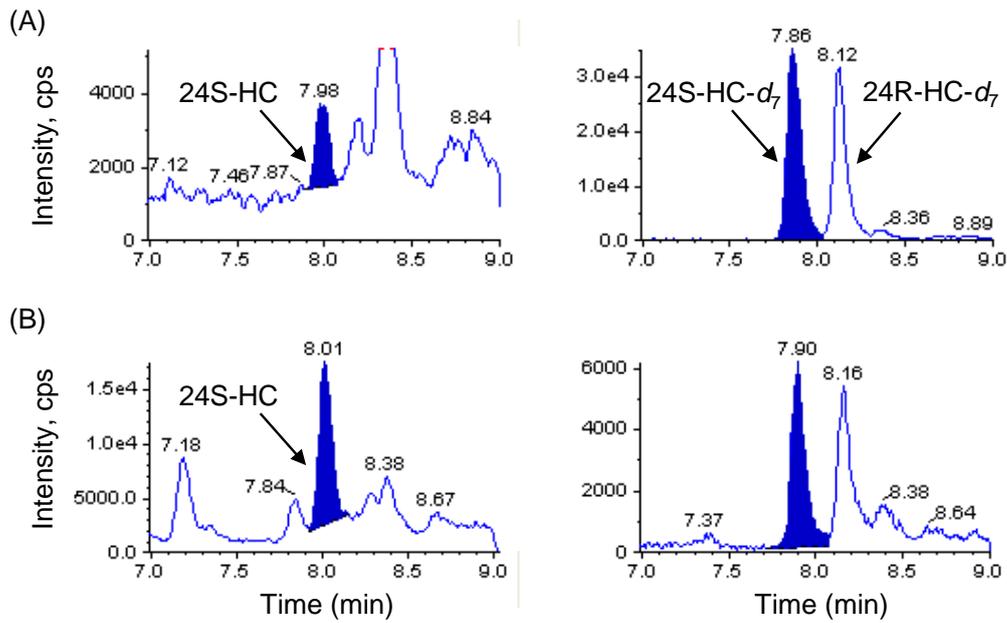


Figure 5: MRM chromatograms of 24S-HC and 24S-HC-d₇.

(A) Representative MRM chromatograms of 24S-HC and the 24S-HC-d₇ from the LLOQ sample in PBS and (B) the human plasma sample, respectively.

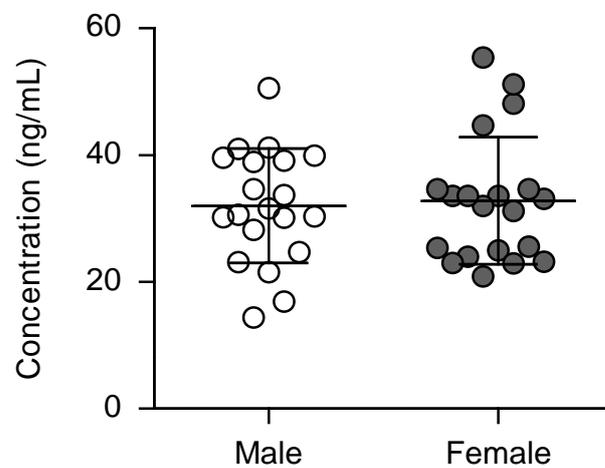


Figure 6: 24S-HC concentrations in human plasma.

The male and female plasma 24S-HC concentrations were indicated. Horizontal lines indicate average 24S-HC concentrations in plasma from male and female volunteers. (mean \pm standard deviation, n=20 individual human plasma)

1.4 考察

本章では LC/MS/MS を用いた APCI 法による、ヒト血漿中 24S-HC の高感度かつ高選択的な定量法を開発した。24S-HC は生体内因性物質であるため、検量線用標準試料は代替マトリックスに 1% (w/v) Tween 80 含有 PBS を用いて作成した。

生体試料中に存在する生体内因性物質を測定する上で重要な点は、分析対象物質を除去したマトリックスの準備、もしくは分析対象物質を含まない代替マトリックスを用いる妥当性を示すことである [23]。活性炭処理血漿を分析対象物質を含まない生体試料に使用する場合があるが [24]、24S-HC を完全に除去することは極めて困難である。生体内因性物質を定量する上で、安定同位体標識した分析対象物質を実際の生体試料に添加する方法も有用である。しかし、本手法の場合、さらに内標準物質に用いる安定同位体標識体が必要な点、定量対象物質と安定同位体標識体との感度調整が必要な点、および検量線上限以上の試料の希釈が出来ない問題点がある。さらに、定量対象物質を実際の生体試料に添加する方法も報告がある。この方法は、実際の生体試料を用いて検量線用標準試料を作成するため、マトリックス効果を考慮する必要がない。しかし、全ての分析試験で検量線の傾きから内因性物質の濃度値を算出するため、同一ロットの大量の血漿を準備する必要がある [23]。本研究では、検量線用標準試料に 1% (w/v) Tween 80 含有 PBS を用いてヒト血漿中 24S-HC 濃度測定法を開発した。

これまで複数の 24S-HC のヒト血漿中濃度測定法が誌上報告されている。紫外可視吸光検出器を用いた HPLC 法は、oxysterols を定量する上で最も汎用されてきた。HPLC 法は 24S-HC を誘導体化することなく定量可能であるが、検出感度や特異性は劣る欠点がある [53]。ガスクロマトグラフィー質量分析法 (gas chromatography/mass spectrometry; GC/MS) はヒト血漿中 oxysterols 測定に適しているが、oxysterols の揮発性を向上させるために trimethylsilane や methyl 誘導体化が必須である [46]。また頻繁に分析カラムを保守する必要がある。LC/ESI-MS/MS を用いた場合も、極性基が少なくイオン化効率の低い oxysterols を分析するためには、picolinyl ester を用いて誘導体化する必要がある [47, 48]。そこで本研究では、oxysterols を直接イオン化可能な LC/APCI-MS/MS に着目した。また、L-column2 ODS カラムを用いることで、24S-HC と他の内因性 oxysterols を分離可能な 24S-HC の定量分析法を構築した。

24S-HC はヒト血漿中で遊離型とエステル型で存在しており、神経変性疾患関連バイオマーカーとして有用と考えられている 24S-HC のヒト血漿中総濃度の測定には、エステル型を鹼化する必要がある [29, 33, 46]。ヒト血漿中の 24S-HC 総濃度を安定的に測定できる条件を検討したところ、血漿 200 μ L に対し、8 mol/L sodium hydroxide 2 mL, methanol 5 mL を加えて攪拌後、50°C で 1 時間処理した場合、安定的に 24S-HC の血漿中総濃度を定量することが可能となった。本結果は、ヒト血漿中 cholesterol 総濃度測定用に最適化された鹼化条件と比較しても、反応時間および塩基の添加量共に十分と考えられる [54]。

24S-HC のヒト血漿中濃度同時測定法の method qualification を実施したところ、ヒト血漿 200 μ L を用いて、血漿中 24S-HC 濃度を十分定量可能な 1–100 ng/mL の範囲で良好な直線性を示した。本分析法は、煩雑な誘導体化を必要としないだけでなく、既存の非誘導体化法と比較しても 75 倍の感度向上を達成した [49]。さらに本分析法を用いて、男性および女性健康成人の血漿中 24S-HC 濃度を定量した結果、これまでの文献値を再現した [29]。本研究により、堅牢性の高いヒト血漿中 24S-HC 定量法を開発した。本定量法は、臨床試験における血漿中 24S-HC 測定に有用であると考えられる。ヒト血漿中 24S-HC は CH24H による脳内 cholesterol の代謝によって生成されるため、アルツハイマー病、パーキンソン病および多発性硬化症など様々な中枢神経細胞変性疾患の臨床研究および医薬品開発への応用が期待される。

第 2 章 LC/MS/MS を用いた D- および L-serine のヒト血漿中濃度同時測定法の開発

2.1 序論

哺乳類の生体を構成するアミノ酸は全て L-アミノ酸であり、D-アミノ酸は細菌や真菌など限られた生体にのみ存在すると信じられてきた [55]。しかし、近年のキラル分析技術の発展により、哺乳類にも D-アミノ酸が存在することが発見された。その後、D-アミノ酸はさまざまな生理機能を担っていることが明らかになり、精神神経疾患の病態解明や薬物治療法開発におけるバイオマーカーとしての役割が期待される [30, 31]。

D-アミノ酸の一種である D-serine は、Hashimoto らによってラット脳内に遊離型で存在することが発見された [56]。D-serine は記憶や学習機能を司る NMDA 型グルタミン酸受容体のグリシン結合部位に作用し、受容体機能の発現・調節に重要な役割を果たしている [36, 37]。近年、ヒト血漿中 D-serine 濃度および D-serine の DL-serine に対する割合は、統合失調症 [38, 57, 58]、筋萎縮性側索硬化症 [59, 60]、てんかん発作 [61] および虚血性神経細胞死 [62] 等の NMDA 受容体機能障害に起因する疾患と関連することが報告された。従って、生体試料中に存在する D- および L-serine の高感度な分析法は、新たな薬物治療法開発に非常に有用である。

一方で D-serine のヒト血漿中濃度は、光学異性体である L-serine の血漿中濃度の 5% 未満と顕著に低いため [38, 57, 63]、ヒト血漿中 D- および L-serine の定量には選択性の高い分析法が求められる。これまで D- および L-serine のヒト血漿中分離定量法が誌上発表されているが [38, 57, 63-65]、既報の定量法はすべて光学異性体分離のためにキラル誘導体化試薬を用いた方法である。誘導体化は分析前処理過程に時間がかかるだけでなく、先述のような定量性の低下、さらに誘導体化反応における副生成物形成の可能性がある [39]。また大腸菌、出芽酵母およびニワトリ組織から精製した D-serine dehydratase を用いた D-serine の酵素定量法が報告されている [66-68]。しかし、これら酵素定量法の定量下限は 2 $\mu\text{mol/L}$ であり、既報のヒト血漿中 D-serine 濃度 (0.07–0.34 $\mu\text{g/mL}$) と比較した場合、感度が不十分である [57]。

そこで本章では、D- および L-serine の分離分析に誘導体化を必要としない、より堅牢性の高いヒト血漿中 D- および L-serine 定量法を開発した。

2.2 実験材料と試験方法

2.2.1 実験材料

D-Serine (純度; 100%), L-serine (純度; 99.9%) および内標準物質である DL-serine (2,3,3- d_3) (DL-serine- d_3 , 純度; 98.0%) は和光純薬工業 (大阪), K_2EDTA 含有ヒト (白色人種, 男性および女性) 血漿は日本生物材料センターより購入した. その他の試薬は分析用グレードを使用した.

2.2.2 LC/MS/MS 分析条件

HPLC は“1.2.2 LC/MS/MS 分析条件”に記載したシステムを用いた. 質量分析装置は ESI プロブを装着した, API5000 トリプル四重極質量分析装置を使用した. 分析カラムはガードフィルターを接続したクラウンエーテル型キラルカラム CROWNPAK CR-I(+) (5 μ m, 3 mm ID \times 150 または 250 mm, ダイセル, 東京) を使用した. 移動相は 0.3% trifluoroacetic acid in 10% acetonitrile を用い, カラムは氷冷下, 流速 0.15 mL/min のアイソクラティックモードで分析した. ヒートガス温度は 600°C, イオン Sprey 電圧は 5,500 V, カーテンガスは 15 psi, イオンソースガス 1 は 60 psi, イオンソースガス 2 は 60 psi, コリジョンガスは 6 psi に設定した. MRM イオンや各種パラメータは Table 8 に記載した.

2.2.3 標準溶液, 検量線標準用試料, QC 試料および内標準溶液の調製

D-, L-Serine および DL-serine- d_3 を 10, 100 および 1 mg 秤量して褐色メスフラスコに採取し, 水を加えて正確に 10 mL とし, それぞれ 1, 10 および 0.1 mg/mL の標準原液を調製した. 0.1 mg/mL の内標準原液をさらに水で希釈して 10 μ g/mL の内標準溶液を調製した. すべての溶液は 4°C 設定の冷蔵庫に保管した. 生体内因性物質である D- および L-serine の血漿中濃度測定に用いる代替マトリックスに PBS を選択した. D- および L-serine の検量線用標準試料は, PBS 100 μ L に終濃度を 0.01, 0.02, 0.05, 0.2, 1, 2, 10 および 0.1, 0.2, 0.5, 2, 10, 20, 50, 100 μ g/mL となるように標準溶液を添加した. なお, 検量線用標準試料は用時調製した. QC 試料の濃度は“1.2.3 標準溶液, 検量線標準用試料, QC 試料および内標準溶液の調製”に記載した設定方法に従った. PBS に D-serine の終濃度を 0.01 (LLQC), 0.03 (LQC), 0.5 (MQC) および 8 μ g/mL (HQC), L-serine の終濃度を 0.1 (LLQC), 0.3 (LQC), 5 (MQC) および 80 μ g/mL (HQC) となるように標準溶液を添加した. また, 代替マトリックスに使用した PBS の妥当性を検証するため, ヒトブラunk血漿に既知濃度 (D-serine; 0.03, 0.5 および 8 μ g/mL, L-serine; 0.3, 5 および 80 μ g/mL) の D- および L-serine を添加, およびヒト血漿を PBS で 2 倍希釈したヒト血漿 QC 試料を調製した. 調製した QC 試料は分析まで -30°C 設定の冷凍庫に保存した.

Table 8 Mass spectrometric parameters for D- and L-serine

Compound	Molecular weight	Precursor ion (m/z)	Product ion (m/z)	Mass spectrometric parameters			
				DP (V)	EP (V)	CE (eV)	CXP (V)
D-serine	105.09	106.1	60.0	51	10	17	12
L-serine	105.09	106.1	60.1	51	10	38	12
DL-serine- d_3	108.11	109.1	63.0	31	10	19	24

DP, declustering potential; EP, entrance potential; CE, collision energy; CXP, collision cell exit potential

2.2.4 サンプル前処理方法

血漿試料または PBS 100 μ L をガラス試験管に採取し、検量線用標準溶液および 10 μ g/mL DL-serine- d_3 10 μ L (ブランクサンプルには水を 10 μ L) を添加した。さらに acetonitrile 1 mL を加えて攪拌後、21,600 $\times g$ で 5 分間遠心した。遠心後の上清を acetonitrile 1 mL および water/formic acid (50:1, v/v) で前処理したミックスモードの逆相-強陽イオン交換ポリマー (OASIS MCX cartridge, 30 mg/1 cc, Waters, Milford, MA, USA) に添加した。OASIS MCX cartridge を 50% acetonitrile および 95% acetonitrile で洗浄後、methanol/25% ammonium solution (19:1, v/v) を用いて D-, L-serine および DL-serine- d_3 を溶出した。溶出液は室温で窒素ガス気流下濃縮乾固後、0.3% trifluoroacetic acid in 10% acetonitrile 100 μ L で再溶解した。再溶解液を Ultra-free MC centrifugal filter unit に移しかえ、21,600 $\times g$ で 5 分間遠心分離後のろ液 5 μ L を LC/MS/MS にて分析した。

2.2.5 評価項目

LC/MS/MS を用いたヒト血漿中 D- および L-serine 濃度測定法の妥当性を評価するために、method qualification を実施した。実施項目は“1.2.5 評価項目”に記載した内容に準じた。

検量線は検量線用標準試料を測定したピーク面積比 (D-serine/D-serine- d_3 および L-serine/L-serine- d_3) と調製濃度の関係から作成した。検量線は $1/x^2$ の重み付けを行い、以下の検量線モデルを用いて最小二乗法により直線回帰した。

検量線モデル: $y = ax + b$, 最小二乗法

x : 調製濃度 (μ g/mL): $C_{nominal}$

y : ピーク面積比

a : 傾き

b : y -切片

r : 相関係数

検量線の直線性は、検量線用標準試料の実測濃度の真度 (%RE) および相関係数を求めて評価した。各濃度の真度の基準は、理論値の ±15% 以内とし、定量下限のみ ±20% 以内とした。

分析日内および日間での真度および精度を評価するため、PBS に D- および L-serine (LLQC, LQC, MQC および HQC) を添加して調製し、3 回の異なる分析単位で繰り返し分析した。さらに、代替マトリックスとして使用した PBS の妥当性を検証するため、ヒトブランク血漿または既知濃度 (LQC, MQC および HQC) の D- および L-serine を添加、および PBS で 2 倍希釈したヒト血漿 QC 試料を調製し、3 回の異なる分析単位で繰り返し分析した。QC 試料の実測濃度の平均値の真度 (%RE) および精度 (%CV) 算出して日内再現性を評価した。また、3 日間の実測濃度の平均値について真度および精度を求め、日間再現性を評価した。QC 試料の真度の基準は、理論値の ±15% 以内とし、定量下限のみ ±20% 以内とした。各濃度における定量値の精度は 15% 以下とした。ただし、定量下限では 20% 以下とした。

D- および L-serine の回収率は、D- および L-serine を PBS に添加して (D-serine の終濃度; 0.03, 0.5 および 8 µg/mL, L-serine の終濃度; 0.3, 5 および 80 µg/mL) 前処理したピーク面積比と、対照サンプルのピーク面積比から回収率を求めた。DL-serine-*d*₃ の回収率は、DL-serine-*d*₃ を PBS に添加して (1 µg/mL) 前処理したピーク面積比と、対照サンプルのピーク面積比から回収率を求めた。回収率の基準は設定しないが、各濃度で再現性があることが重要である。

D- および L-serine のレスポンスについて、ヒト血漿中のマトリックス由来成分による影響を評価した。マトリックス効果は、マトリックスファクター (MF) の算出により評価した。MF を算出前にあらかじめブランク血漿中 D- および L-serine 濃度を定量した。D- および L-serine の MF は、マトリックスに既知濃度 (D-serine: 0.5 µg/mL, L-serine: 5 µg/mL) を加えたピーク面積比と、マトリックス非存在下で D- および L-serine の内因性濃度に既知濃度 (D-serine: 0.5 µg/mL, L-serine: 5 µg/mL) を加えたピーク面積比を比較して算出した。

D- および L-serine の溶液中およびヒト血漿中安定性を評価した。PBS (LQC および HQC) およびヒト血漿 (ブランク, MQC, HQC 添加および 2 倍希釈血漿) 中の室温短期保存 (6 時間), オートサンプラー中 (10°C), 長期保存 (-30°C, 1 ヶ月間), 3 回凍結融解安定性を評価した。

2.2.6 データ処理

D- および L-serine のピーク分離度 (*R*_s) は以下の式より算出した。その他のデータ処理は“1.2.6 データ処理”に記載した方法に準じた。

$$R_s = 1.18 \times \frac{t_{R1} - t_{R2}}{W_{0.5h1} + W_{0.5h2}}$$

*t*_{R1}, *t*_{R2}: 各ピークの保持時間

*W*_{0.5h1}, *W*_{0.5h2}: 各ピークの半値幅

2.3 実験結果

2.3.1 D- および L-serine の LC/MS/MS 分析条件の設定

LC/MS/MS を用いた D- および L-serine のヒト血漿中濃度の同時測定には、D-serine と L-serine との正確な光学異性体分離分析が求められる。D-Serine と L-serine の分離分析には、キラルカラム、酸性移動相およびカラム温度を適切に選択することが重要である。本研究では、誘導体化を必要としない新規ヒト血漿中 D- および L-serine 定量法を開発した。

D- および L-serine のキラル分離分析条件を最適化するため、異なる種類のクラウンエーテル型キラルカラムを検討した。クラウンエーテル型キラルカラムは、不斉中心付近に第一級アミノ基を有するアミノ酸やアミン類を光学分離するのに適したカラムである [69, 70] (Figure 7)。本検討では、酸性条件下でアンモニウムイオン化された D- および L-serine を binaphthyl による不斉環境で光学異性体を分離した。また、ヒト血漿中 L-serine 濃度は D-serine の少なくとも 20 倍以上であると報告されている [38, 57, 63]。より正確な定量を行うために、クラウンエーテル型キラルカラムを用いて D-serine, L-serine の順で溶出させた。

溶解溶媒および移動相の酸性度は、D- および L-serine の第一級アミノ基のイオン化状態を決める因子である。HPLC 法による α -アミノ酸類縁体の光学異性体分離には、移動相に perchloric acid が汎用されているが [69], perchloric acid は不揮発性の酸であるため LC/MS/MS を用いた分析には適していない。本研究では、0.3% trifluoroacetic acid in 10% acetonitrile をサンプル前処理後の溶解溶媒および移動相に用いることで、クラウンエーテル型キラルカラムによる D- および L-serine の最良な分離が得られた。一方、その他の揮発性酸である acetic acid や formic acid を用いた場合は、D- および L-serine の分離が出来なかった。また、0.3% trifluoroacetic acid in methanol 系移動相を用いた場合も D- および L-serine の分離分析は可能であるが、分析中における serine のメチルエステル化の懸念があるため、0.3% trifluoroacetic acid in 10% acetonitrile を選択した。

適切なカラム温度の設定も D- および L-serine の分離分析に必須である。氷冷下において、serine 由来のアンモニウムイオンとクラウンエーテル型キラルカラムのクラウンエーテルとの複合体形成が安定化されるため、D- および L-serine のピーク分離度はカラム温度の上昇によって低下した。D-Serine では m/z 106.1 > 60.0, L-serine では m/z 106.1 > 60.1, DL-serine- d_3 では m/z 109.1 > 63.0 の MRM モードで検出した。D-Serine および DL-serine- d_3 の代表的なマススペクトルは Figure 8 に示した。また、D- および L-serine の混合溶液 (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) を分析した代表的な MRM クロマトグラムを Figure 9 に示した。氷冷下でクラウンエーテル型キラルカラム (5 μm , 3.0 mm ID \times 150 mm) を 2 本連結した場合、D- および L-serine のピーク分離度 (R_s) は 2.25 と、良好な分離を示した (Figure 9D)。一方、クラウンエーテル型キラルカラム (5 μm , 3.0 mm ID \times 150 mm または 250 mm) を 1 本用いた場合では、十分な分離は得られなかった (Figure 9A, 9B)。さらに、クラウンエーテル型キラルカラム (5 μm , 3.0 mm ID \times 150 mm) を 2 本連結した場合でも、室温条件下では良好なピーク分離は得られなかった (Figure 9C)。

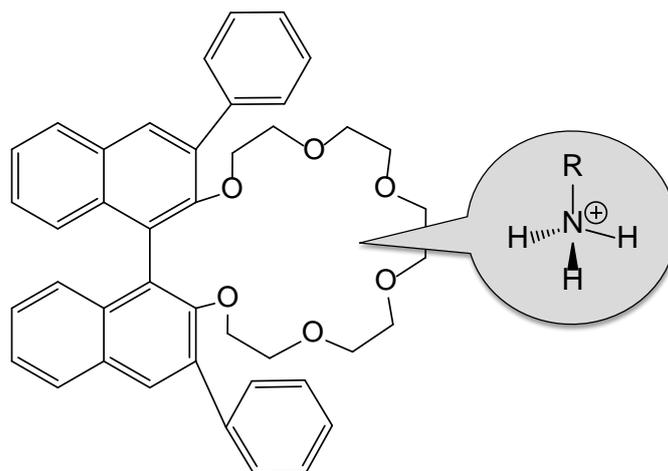


Figure 7: Chiral recognition of primary amine by chiral crown ether coated column

The chiral recognition of DL-serine is achieved when a complex is formed between the ammonium ion derived from DL-serine and the cavity of the chiral crown ethers containing binaphthyls.

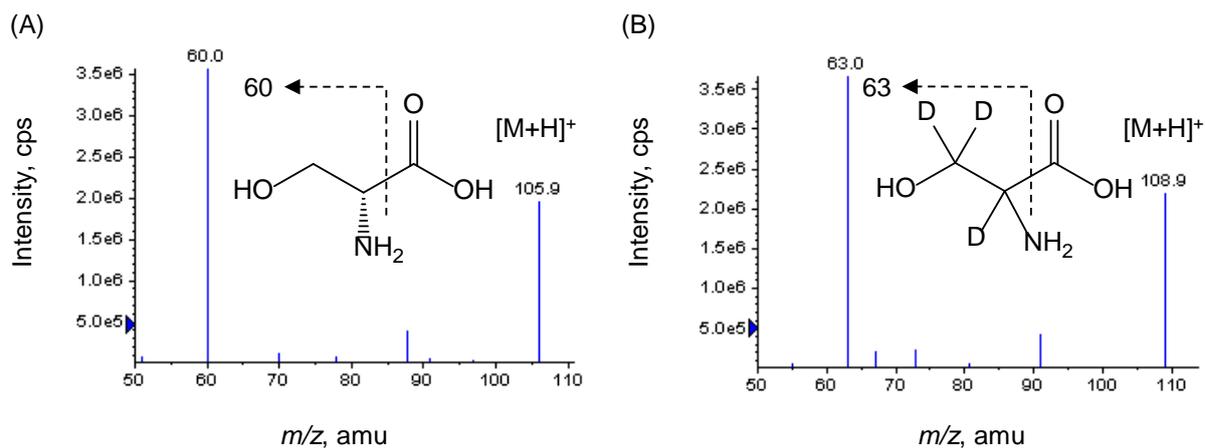


Figure 8: Postulated fragment pattern and positive product ion spectra

(A) The postulated fragment pattern and positive product ion spectrum of the precursor ion for D-serine and (B) for DL-serine-*d*₃.

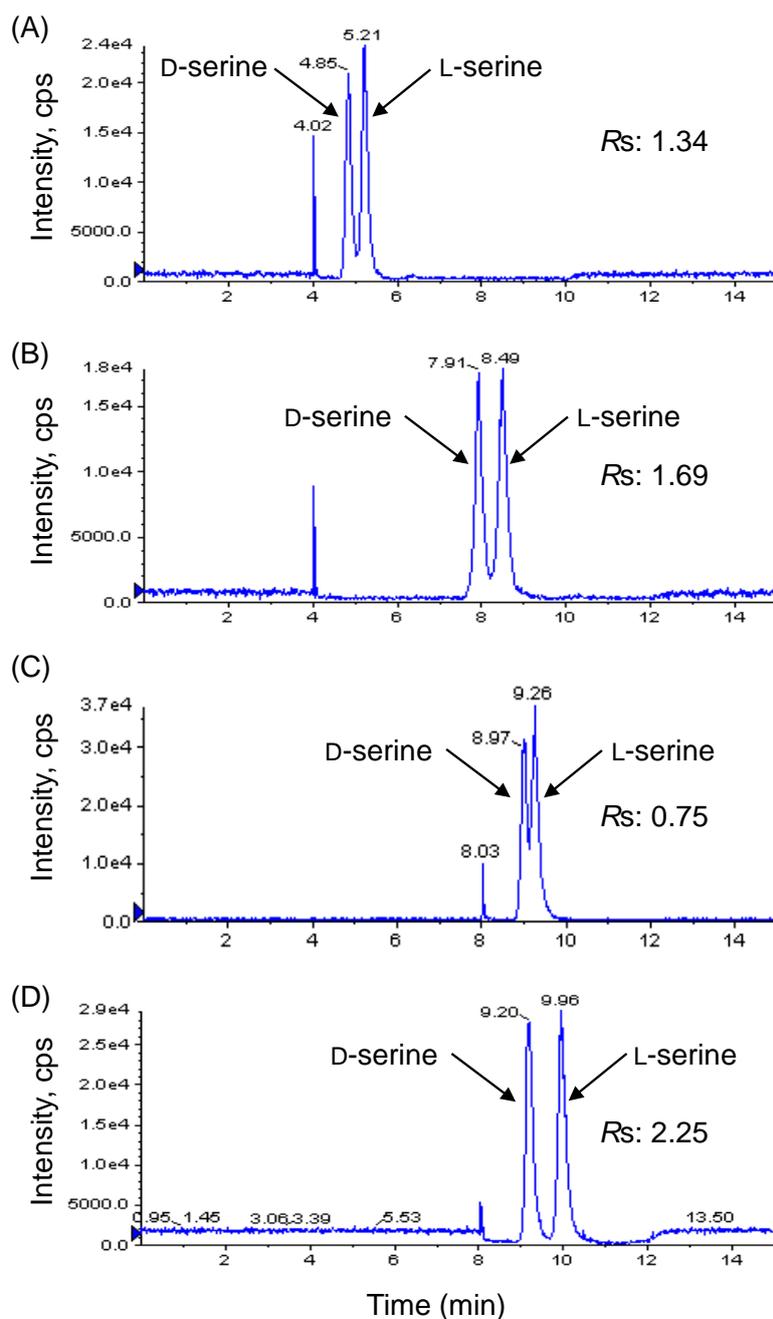


Figure 9: Representative MRM chromatograms of D- and L-serine solution (1 $\mu\text{g/mL}$).

(A) MRM chromatograms of the mixture of D- and L-serine at m/z 106.1 > 60.0, respectively using ice-cold CROWNPAK CR-I(+) (5 μm , 3 mm ID \times 150 mm), (B) ice-cold CROWNPAK CR-I(+) (5 μm , 3 mm ID \times 250 mm), (C) tandemly-arranged CROWNPAK CR-I(+) (5 μm , 3 mm ID \times 150 mm) at room temperature, and (D) tandemly-arranged and ice-cold CROWNPAK CR-I(+) (5 μm , 3 mm ID \times 150 mm). R_s indicates the resolution degree.

2.3.2 ヒト血漿中 D- および L-serine 濃度測定法のサンプル前処理方法

ヒト血漿試料または PBS (100 μ L) 中の D- および L-serine は acetonitrile 1 mL で抽出した後、さらに OASIS MCX cartridge を用いた固相抽出により、分析カラム圧の低減を達成した。サンプル前処理でより良好な回収率を得るために、D- および L-serine の第一級アミノ基を酸性条件でイオン化した後、塩基を含む有機溶媒を用いて溶出させた。また、acetonitrile で抽出後の上清中の水分含有量を 10% 以下に抑えることで、各添加濃度 (LQC, MQC および HQC) において 90.1–106.8% と良好な回収率が得られた。D- および L-serine および内標準物質の回収率に顕著な濃度依存は認められなかった。

2.3.3 ヒト血漿中 D- および L-serine 濃度測定法

検量線は検量線用標準試料を測定したピーク面積比 (D-serine/D-serine- d_3 および L-serine/L-serine- d_3) と調製濃度の関係から作成した。検量線は $1/x^2$ の重み付けを行い最小二乗法により直線回帰した。D- および L-serine の検量線範囲は、それぞれヒト血漿中内因性濃度を定量可能な 0.01–10 μ g/mL および 0.1–100 μ g/mL に設定した。D- および L-serine を同じ前処理方法を用いて定量分析するため、D- および L-serine の検量線の直線性が担保できるよう、collision energy のパラメータを最適化し、D-serine の検出感度を L-serine の約 10 倍に設定した (Table 8)。

検量線の相関係数は 0.9965–0.9994 であり、標準試料の実測濃度の真度 (%RE) は $\pm 15\%$ 未満であった。D- および L-serine の LLOQ 試料のクロマトグラムは Figure 10A および 10C に示した。

代替マトリックスである PBS に D- および L-serine (LLQC, LQC, MQC および HQC, 各 n=5) を添加して調製した QC 試料の D- および L-serine 濃度の真度および精度を Table 9 に示した。分析日内および日間での真度 (%RE) および精度 (%CV) は -7.7–6.4% および 6.6% 以下であり、本分析法の堅牢性を示した。さらに、代替マトリックスを使用する妥当性を示すために、ヒトブランク血漿または既知濃度 (LQC, MQC および HQC) の D- および L-serine を添加したヒト血漿 QC 試料 (各 n=5) を分析した。また、PBS で 2 倍希釈したヒト血漿 QC 試料同時に分析した。分析日内および日間での真度 (%RE) および精度 (%CV) は -7.8–8.1% および 6.3% 以下であり、“2.2.5 評価項目”に記載した基準を満たした。さらに、D- および L-serine のヒトブランク血漿の IS で補正した MF はそれぞれ 0.853–0.982 および 0.648–0.829 であった。以上より、PBS が代替マトリックスとして科学的に妥当であることを示した。

D- および L-serine の標準溶液、PBS およびヒト血漿中における安定性を評価した。PBS (LQC および HQC) およびヒト血漿 (ブランク, LQC, MQC 添加および 2 倍希釈血漿) 中における D- および L-serine の残存率は、室温 6 時間、オートサンプラー (10°C, 8 日間) 中、長期保存 (-30°C, 1 ヶ月)、3 回凍結融解条件下で 90.3–106.6% であり安定性に問題はなかった。

Table 9 Intra & inter-assay precision and accuracy for D- and L-serine

Analyte	Matrix	Nominal conc. (µg/mL)	Intra-assay (n=5)			Inter-assay (n=15)			
			Average conc. (µg/mL)	CV (%)	RE (%)	Average conc. (µg/mL)	CV (%)	RE (%)	
D-serine	PBS	LLQC	0.01	0.00974	5.6	-2.6	0.00955	6.6	-4.5
		LQC	0.03	0.0316	3.8	5.2	0.0308	3.3	2.6
		MQC	0.5	0.503	1.6	0.6	0.514	3.8	2.8
		HQC	8	7.43	0.9	-7.2	7.38	1.8	-7.7
	Human plasma	Unspiked	-	0.210	4.5	-	0.211	3.6	-
		+LQC	0.240	0.233	4.2	-2.8	0.229	3.9	-4.5
		+MQC	0.710	0.767	1.4	8.0	0.713	6.3	0.4
		+HQC	8.21	7.79	4.3	-5.1	7.57	3.6	-7.8
		Diluted with PBS	0.105	0.108	4.5	3.0	0.104	6.1	-0.8
	L-serine	PBS	LLQC	0.1	0.106	3.5	6.4	0.102	5.3
LQC			0.3	0.306	1.8	2.1	0.305	2.6	1.6
MQC			5	5.06	2.4	1.3	5.07	2.0	1.4
HQC			80	75.1	1.8	-6.1	74.7	2.1	-6.6
Human plasma		Unspiked	-	8.30	3.3	-	8.27	3.7	-
		+LQC	8.60	8.63	2.8	0.4	8.68	2.6	1.0
		+MQC	13.3	14.4	1.3	8.1	13.5	5.4	1.9
		+HQC	88.3	86.4	3.5	-2.1	85.0	2.7	-3.7
		Diluted with PBS	4.15	4.30	1.6	3.7	4.28	3.3	3.2

Intra- and inter-day assay precision and accuracy in the surrogate matrix were evaluated using the D-serine spiked PBS samples at levels of 0.01 (LLQC), 0.03 (LQC), 0.5 (MQC), and 8 (HQC) µg/mL and the L-serine spiked PBS samples at levels of 0.1 (LLQC), 0.3 (LQC), 5 (MQC) and 8 (HQC) µg/mL, respectively.

Intra- and inter-day assay precision and accuracy in human plasma were evaluated using the unspiked human plasma, D-serine spiked human plasma samples at levels of 0.03 (LQC), 0.5 (MQC), 8 (HQC) and L-serine spiked human plasma samples at levels of 0.3 (LQC), 5 (MQC) 80 (HQC) µg/mL, respectively, and 2-fold diluted human plasma with PBS.

2.3.4 健康成人の血漿中 D- および L-serine 濃度測定

上記で構築した定量法を用いて、5 ロットのヒト血漿中 D- および L-serine 濃度を定量した。ヒト血漿中 D- および L-serine の代表的なクロマトグラムを Figure 10B および 10D に示した。D- および L-serine の peak intensity は LLOQ 試料より十分に高く、D- および L-serine の分離も良好であった。ヒト血漿中 D- および L-serine 濃度は 0.124–0.199 および 7.97–13.1 $\mu\text{g/mL}$ であり、これらの濃度値は、既報値と同程度であった [38, 57, 63] (Table 10)。

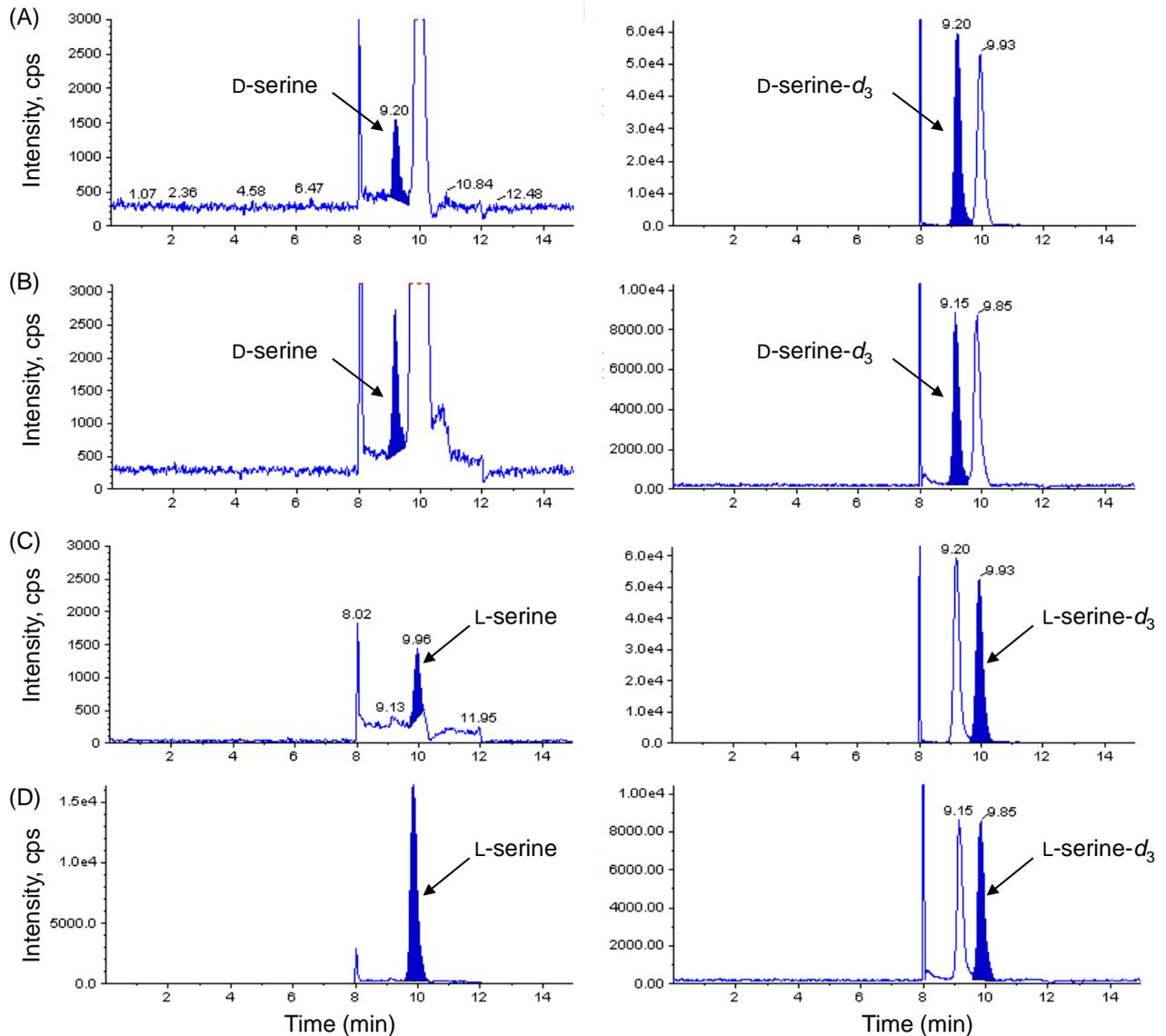


Figure 10: MRM chromatograms of D- and L-serine and the IS.

(A) Representative MRM chromatograms of D-serine and the IS from the LLOQ sample and (B) the human plasma sample, respectively. (C) Representative MRM chromatograms of L-serine and the IS from the blank sample, and (D) the human plasma sample, respectively.

Table 10 Determination of D- and L-serine in individual human plasma

Human plasma (Lot No.)	Calculated concentration ($\mu\text{g/mL}$)	
	D-serine	L-serine
MT134912	0.124 \pm 0.003	9.95 \pm 0.24
MT134913	0.155 \pm 0.013	13.1 \pm 0.2
MT136184	0.199 \pm 0.005	8.16 \pm 0.32
MT136189	0.184 \pm 0.020	7.97 \pm 0.38
WX014699F	0.140 \pm 0.015	12.3 \pm 1.2

Mean \pm SD (n=3)

2.4 考察

本章では LC/ESI-MS/MS による、誘導体化を必要としない D- および L-serine のヒト血漿中濃度同時測定法を開発した。これまで、複数のヒト血漿中 D-serine 濃度測定法が報告されている。Brückner らは、ヒト血清および尿中 D-serine およびその他アミノ酸を *N(O)*-pentafluoropropionyl-(2)-propyl ester 体に誘導体化し、GC/MS を用いて定量した [71]。また、4-fluoro-7-nitro-2,1,3-benzoxadiazole または *o*-phthaldialdehyde 等の誘導化剤を用いたヒト血漿中 D-serine 濃度測定法が報告された [57, 63]。Visser らは、キラル誘導体化試薬である (*S*)-*N*-(4-nitrophenoxycarbonyl)-L-phenylalanine 2-methoxyethyl ester を用いて、LC/ESI-MS/MS によりヒト生体試料中 D-アミノ酸濃度を定量した [64]。最近では、(*R*)-1-*tert*-butoxycarbonyl-2-piperidine carbonyl chloride により D-serine を誘導体化し、LC/ESI-MS/MS を用いたヒト血漿中 D-serine 濃度測定法が確立された [65]。しかし、これら現有の分析法を用いた場合、定量値が誘導化試薬の純度や誘導体化反応効率および副生成物生成により影響を受ける問題点があった [39]。この問題点を解決するため、本研究では誘導体化を必要としない D- および L-serine のヒト血漿中濃度同時測定法を開発した。分析カラムとして、キラル固定相に binaphthyl 基を有するクラウンエーテル誘導体を有するクラウンエーテル型キラルカラムを用い、0.3% trifluoroacetic acid in 10% acetonitrile を移動相に用いることで、D- および L-serine の良好な分離が得られた。

D- および L-serine のヒト血漿中濃度同時測定法の method qualification を実施したところ、ヒト血漿 100 μ L を用いて、血漿中 D- および L-serine を十分定量可能な 0.01–10 μ g/mL および 0.1–100 μ g/mL の範囲で良好な直線性を示した。本章により、これまで報告事例のなかった、誘導体化を必要としないヒト血漿中 D- および L-serine 分離分析が可能となった。また誘導体化を経ないことで、サンプル前処理方法が簡便になるだけでなく、堅牢性の高い D- および L-serine の定量法開発に至った。NMDA 型グルタミン酸受容体機能調節により、統合失調症や認知機能障害に対する新規治療薬開発が進められる中、ヒト血漿中 D-serine 濃度および D-serine の DL-serine に対する割合により、薬物治療効果の高い患者層別化の可能性が示唆されている [38]。本研究で構築した D- および L-serine の分離分析法は、新たな医薬品開発に有用であると考えられる。

第 3 章 LC/MS/MS を用いた D- および L-leucine のヒト血漿中濃度測定法の開発 および動物血漿試料への応用

3.1 序論

生体試料中の D- および L-アミノ酸は病態やアミノ酸代謝異常症の診断に有用なバイオマーカーと報告されている [30, 31, 72]. Leucine は分岐鎖アミノ酸であり, 骨格筋等の筋肉維持やエネルギーバランスの調整を司る必須アミノ酸である [73-76]. D-Leucine は D-serine と同様に生体中にごく微量に存在する D-アミノ酸であり, ラット尿中に存在することが最初に報告され [77], 続いてマウス脳内組織に D- および L-leucine が存在することが報告された [78-80]. さらに Hamase らは, 脳内ではグリア細胞等に発現する DAO 活性を欠損したマウスの脳および血清中 D-leucine 濃度が, 野生型マウスと比較して顕著に上昇することを見出した [79]. 臨床レベルでも DAO 活性が減弱した肝硬変患者で, D-leucine の血漿中濃度が少なくとも健康成人の 3 倍以上に上昇した [32]. また, メープルシロップ尿症と呼ばれる分岐鎖アミノ酸の常染色体劣性遺伝疾患の診断には, L-leucine およびその他 L-分岐鎖アミノ酸のヒト血液中濃度測定が汎用されている [81, 82]. 以上のことから, 生体試料中の D- および L-leucine の分離分析法は, DAO 活性評価に応用できるだけでなく, 病態診断および創薬研究に有用である.

ヒト血漿中 D- および L-leucine 濃度測定法設定には, クロマトグラム上での D- および L-leucine の光学分割に加えて, DL-isoleucine および DL-*allo*-isoleucine の構造異性体との分離が求められる. さらに, 生体試料中に存在する L-leucine は D-leucine と比較して顕著に多いため, クロマトグラム上で十分に分離し, 濃度値に影響を及ぼさないことが重要である. 既存の分析法では健康成人のヒト血漿中 D-leucine を測定するには感度が不十分, もしくは煩雑な誘導体化が必須である等の欠点がある [32, 64, 77-80, 83, 84].

そこで本章では, 誘導体化を必要としないより堅牢性の高いヒト血漿中 D- および L-leucine 定量法を開発した. さらに, 本定量法を用いて各種動物血漿中 D- および L-leucine の濃度測定に応用し, D-leucine および D-leucine の DL-leucine 濃度に対する比の種差について検討した.

3.2 実験材料と試験方法

3.2.1 実験材料

D-Leucine (純度; 100%), L-leucine (純度; 99.8%), DL-isoleucine (純度; 100%) および D-*allo*-isoleucine (純度; 99.5%) は和光純薬工業より購入した. L-*allo*-isoleucine (純度>99.0%) は Sigma-Aldrich, 内標準物質である DL-leucine-*d*₇ (純度>98.9%) は C/D/N Isotopes (Quebec, Canada) より購入した. ヘパリンナトリウム含有マウス (8 週齢, 雄), ラット (8 週齢, 雄) およびサル (3 年齢, 雄) 血漿はハムリー (茨城) より購入した. ヘパリンナトリウム含有イヌ (12 ヶ月齢, 雄) 血漿は, 北山ラベス (長野) より購入した. K₂EDTA 含有ヒト (白色人種, 男性および女性) 血漿 は日本生物材料センターより購入した. その他の試薬は分析用グレードを使用した.

3.2.2 LC/MS/MS 分析条件

HPLC は“1.2.2 LC/MS/MS 分析条件”に記載したシステムを用いた. 質量分析装置は ESI プロブを装着した, API5000 トリプル四重極質量分析装置を使用した. 分析カラムはガードフィルターを接続した両性イオン型キラルカラム CHIRALPAK ZWIX(-) (3 μm, 4.0 mm ID×250 mm, ダイセル, 東京) を使用した. 移動相は methanol/acetonitrile/1 mol/L ammonium formate/formic acid (500:500:25:2, v/v/v/v) を用い, カラム温度 25°C, 流速 0.5 mL/min のアイソクラティックモードで分析した. ヒートガス温度は 650°C, イオンスプレー電圧は 5,500 V, イオンソースガス 1 は 40 psi, イオンソースガス 2 は 45 psi に設定した. MRM イオンおよび各種パラメータは Table 11 に記載した.

3.2.3 標準溶液, 検量線標準用試料, QC 試料および内標準溶液の調製

D-Leucine, DL-isoleucine, D-*allo*-isoleucine, L-*allo*-isoleucine および DL-leucine-*d*₇ を 1 mg 秤量して褐色メスフラスコに採取し, 水を加えて正確に 10 mL とし, それぞれ 0.1 mg/mL の標準原液を調製した. L-Leucine を 100 mg 秤量して褐色メスフラスコに採取し, 水を加えて正確に 10 mL とし, 10 mg/mL の標準原液を調製した. なお, L-leucine の 0°C の水に対する溶解度は, 22.7 mg/mL と報告されている [85]. 標準原液に acetonitrile 等の有機溶媒を添加すると, 化合物の析出等が認められたため, 水を用いて標準原液を作成した. DL-Leucine-*d*₇ の内標準溶液は, 0.1 および 100 μg/mL に調製した. すべての溶液は 4°C 設定の冷蔵庫に保管した.

Table 11 Mass spectrometric parameters for D- and L-leucine

Compound	Molecular weight	Precursor ion (<i>m/z</i>)	Product ion (<i>m/z</i>)	Mass spectrometric parameters			
				DP (V)	EP (V)	CE (eV)	CXP (V)
D-leucine	131.17	132.1	43.0	45	10	35	8
L-leucine	131.17	132.1	43.0	45	10	35	8
DL-leucine- <i>d</i> ₇	138.22	139.2	93.0	81	10	17	12

DP, declustering potential; EP, entrance potential; CE, collision energy; CXP, collision cell exit potential

D- および L-leucine の検量線用標準試料は、PBS 100 μ L に終濃度として 0.001, 0.002, 0.005, 0.02, 0.1, 0.2, 1 および 1, 2, 5, 20, 100, 200, 500, 1,000 μ g/mL となるように標準溶液を添加した。なお、検量線用標準試料は用時調製した。QC 試料の濃度は“1.2.3 標準溶液, 検量線標準用試料, QC 試料および内標準溶液の調製”の設定方法に従った。QC 試料は PBS に D-leucine の終濃度として 0.001 (LLQC), 0.003 (LQC), 0.05 (MQC) および 0.8 μ g/mL (HQC), L-leucine の終濃度として 0.1 (LLQC), 3 (LQC), 50 (MQC) および 800 μ g/mL (HQC) となるように標準溶液を添加して調製した。また、代替マトリックスとして使用した PBS の妥当性を検証するため、ヒトブランク血漿に既知濃度 (D-leucine; 0.003, 0.05 および 0.8 μ g/mL, L-leucine; 3, 50 および 800 μ g/mL) の D- および L-leucine を添加, およびヒト血漿を PBS で 2 倍希釈したヒト血漿 QC 試料を調製した。調製した QC 試料は分析まで -30°C 設定の冷凍庫に保存した。

3.2.4 サンプル前処理方法

血漿試料または PBS 100 μ L をガラス試験管に採取し、検量線用標準溶液および 0.1 μ g/mL (D-leucine 測定時) または 100 μ g/mL (L-leucine 測定時) の DL-leucine-*d*₇ 10 μ L (ブランクサンプルには水を 10 μ L) を添加した。さらにりん酸 4 μ L および acetonitrile 1 mL を加えて攪拌後、21,600 \times g で 5 分間遠心した。遠心後の上清を acetonitrile 1 mL および water/formic acid (50:1, v/v) で前処理したミックスモードの逆相-強陽イオン交換ポリマー (OASIS MCX cartridge, 30 mg/1 cc, Waters) に供した。OASIS MCX cartridge を 50% acetonitrile および 95% acetonitrile で洗浄後、methanol/25% ammonium solution (19:1, v/v) を用いて D-, L-leucine および DL-leucine-*d*₇ を溶出した。溶出液は室温で窒素ガス気流下濃縮乾固した。D-Leucine 測定用サンプルは methanol/acetonitrile/1 mol/L ammonium formate/formic acid (500:500:25:2, v/v/v/v) 100 μ L で再溶解し、20 μ L を LC/MS/MS にて分析した。L-Leucine 測定用サンプルは水 1 mL で再溶解後、希釈溶媒である methanol/acetonitrile/1 mol/L ammonium formate/formic acid (500:500:25:2, v/v/v/v) を用いてさらに 10 倍希釈し、2 μ L を LC/MS/MS にて分析した。

3.2.5 評価項目

LC/MS/MS を用いたヒト血漿中 D- および L-leucine 濃度測定法の妥当性を評価するために、method qualification を実施した。実施項目は“1.2.5 評価項目”に記載した内容に準じた。

検量線は検量線用標準試料を測定したピーク面積比 (D-leucine/D-leucine- d_7 および L-leucine/L-leucine- d_7) と調製濃度の関係から作成した。検量線は $1/x^2$ の重み付けを行い、以下の検量線モデルを用いて最小二乗法により直線回帰した。

検量線モデル: $y = ax + b$, 最小二乗法

x : 調製濃度 ($\mu\text{g/mL}$): $C_{nominal}$

y : ピーク面積比

a : 傾き

b : y -切片

r : 相関係数

検量線の直線性は、検量線用標準試料の実測濃度の真度 (%RE) および相関係数を求めて評価した。各濃度の真度は、理論値の $\pm 15\%$ 以内とし、定量下限のみ $\pm 20\%$ 以内とした。

分析日内および日間での真度および精度を評価するため、PBS に D- および L-leucine (LLQC, LQC, MQC および HQC) を添加して調製し、3 回の異なる分析単位で繰り返し分析した。さらに、代替マトリックスとして使用した PBS の妥当性を検証するため、ヒトブランク血漿または既知濃度 (LQC, MQC および HQC) の D- および L-leucine を添加、および PBS で 2 倍希釈したヒト血漿 QC 試料を調製し、3 回の異なる分析単位で繰り返し分析した。QC 試料の実測濃度の平均値の真度 (%RE) および精度 (%CV) を算出して日内再現性を評価した。また、3 日間の実測濃度の平均値について真度および精度を求め、日間再現性を評価した。QC 試料の真度の基準は、理論値の $\pm 15\%$ 以内とし、定量下限のみ $\pm 20\%$ 以内とした。各濃度における定量値の精度は 15% 以下とした。ただし、定量下限では 20% 以下とした。

D- および L-leucine の回収率は、D- および L-leucine を PBS に添加して (D-leucine, 0.003, 0.05 および $0.8 \mu\text{g/mL}$, L-leucine; 3, 50 および $800 \mu\text{g/mL}$) 前処理したピーク面積比と、対照サンプルのピーク面積比から回収率を求めた。DL-leucine- d_7 の回収率は、DL-leucine- d_7 を PBS に添加して (0.1 および $100 \mu\text{g/mL}$) 前処理したピーク面積比と、対照サンプルのピーク面積比から回収率を求めた。回収率の基準は設定しないが、各濃度で再現性があることが重要である。

D- および L-leucine のレスポンスについてヒト血漿中のマトリックス由来成分による影響を評価した。マトリックス効果は、マトリックスファクター (MF) の算出により評価した。MF を算出前にあらかじめブランク血漿中 D- および L-leucine 濃度を定量した。D- および L-leucine の MF は、マトリックスに既知濃度 (D-leucine; $0.05 \mu\text{g/mL}$, L-leucine; $50 \mu\text{g/mL}$) を加えたピーク面積比と、マトリックス非存在下で D- および L-leucine の内因性濃度に既知濃度 (D-leucine;

0.05 µg/mL, L-leucine; 50 µg/mL) を加えたピーク面積比を比較して算出した。

D- および L-leucine の標準溶液中およびヒト血漿中安定性を評価した。ヒト血漿 (ブランク, MQC 添加および 2 倍希釈血漿) 中の長期保存 (-30°C, 45 日間) および 3 回凍結融解安定性を評価した。安定性評価は初期濃度値の ±15% 以内を基準とした。

3.2.6 データ処理

“2.2.6 データ処理” に記載した方法に準じた。

3.3 実験結果

3.3.1 D- および L-leucine の LC/MS/MS 分析条件の設定

LC/MS/MS を用いた D- および L-leucine のヒト血漿中濃度測定には、D- および L-leucine と光学異性体および leucine の構造異性体との正確な分離分析が求められる。本研究では、誘導体化を経ずに高感度かつ高選択的な D- および L-leucine の分離条件を最適化した。

trans-2-aminocyclohexane sulfonic acid と chinchona alkaloid から構成される、両性イオン型キラルカラムを用いて分離条件を検討した [86, 87] (Figure 11)。キラル固定相と両性イオン状態の D- および L-leucine の静電的相互作用により光学異性体分離が可能になる [88, 89]。D- および L-leucine の分離分析には、移動相に用いる有機溶媒、添加剤および水分量の最適化が求められる。

分析カラムとして上述した両性イオン型キラルカラム (3 μ m, 4.0 mm ID \times 250 mm)、移動相として methanol/acetonitrile/1 mol/L ammonium formate/formic acid (500:500:25:2, v/v/v/v) を用い、0.5 mL/min のアイソクラティックモードで分析したところ、D- および L-leucine のピーク分離度 (R_s) は 4.76 と、良好な分離が得られた。Leucine の第一級アミノ基をイオン化させるためには、methanol や水などのプロトン性溶媒の添加が必須である。さらに、キラル固定相と両性イオン状態の D- および L-leucine の静電的相互作用のためには、酸および添加剤を適切な割合で添加する必要がある [86]。検討の結果、formic acid と ammonium formate を上記の割合で添加することで、良好な D- および L-leucine の分離が得られた。

3.3.2 DL-leucine と DL-isoleucine および DL-*allo*-isoleucine の識別

生体試料中に存在する leucine に化学的性質が類似したアミノ酸は、D- および L-leucine の分離分析をより複雑化する [64]。クロマトグラム上での正確な分離分析を行うために、DL-leucine の構造異性体である DL-isoleucine および DL-*allo*-isoleucine との分離は重要である。Leucine および isoleucine の分子量は同じで、かつ MS/MS において CO_2H_2 が脱離した m/z 86 の immonium ion をフラグメントイオンとして有するが、DL-leucine に特異的な m/z 43 のフラグメントイオンを用いることで DL-isoleucine および DL-*allo*-isoleucine との識別が可能であった (Figure 12)。DL-leucine, DL-isoleucine および DL-*allo*-isoleucine の各溶液 (10 ng/mL) を分析した代表的な MRM クロマトグラムを Figure 13 に示した。

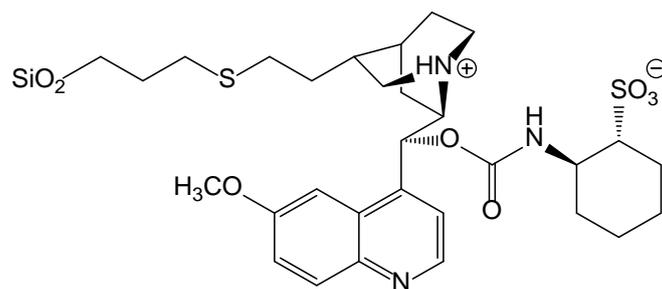


Figure 11: Chemical structure of zwitterionic chiral selector

The chiral recognition of DL-leucine is achieved when a complex is formed between the zwitterionic chiral selectors and ampholytic DL-leucine based on the synergistic double electrostatic interaction.

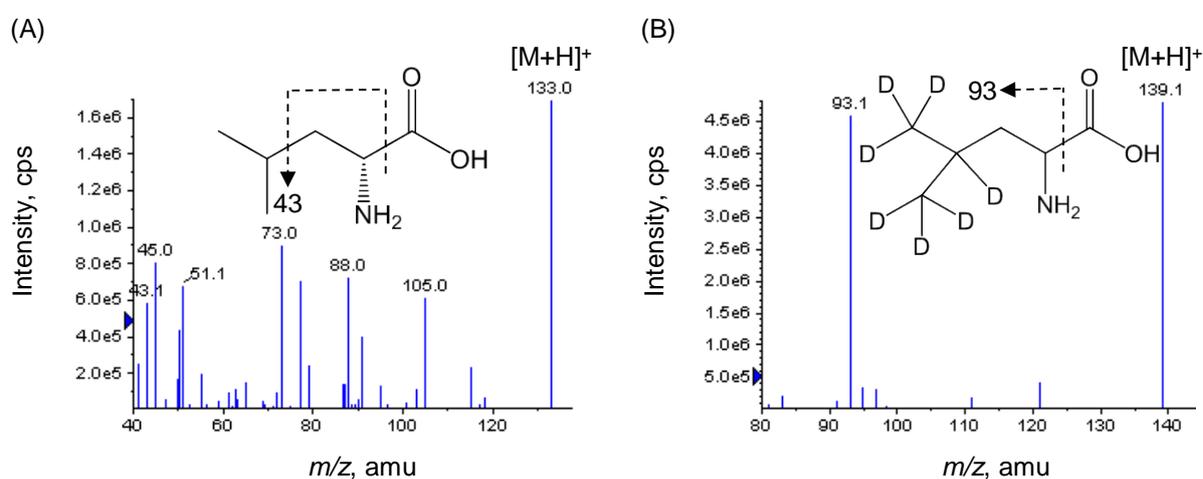


Figure 12: Postulated fragment pattern and positive product ion spectra

(A) The postulated fragment pattern and positive product ion spectrum of the precursor ion for D-leucine and (B) for DL-leucine-*d*₇.

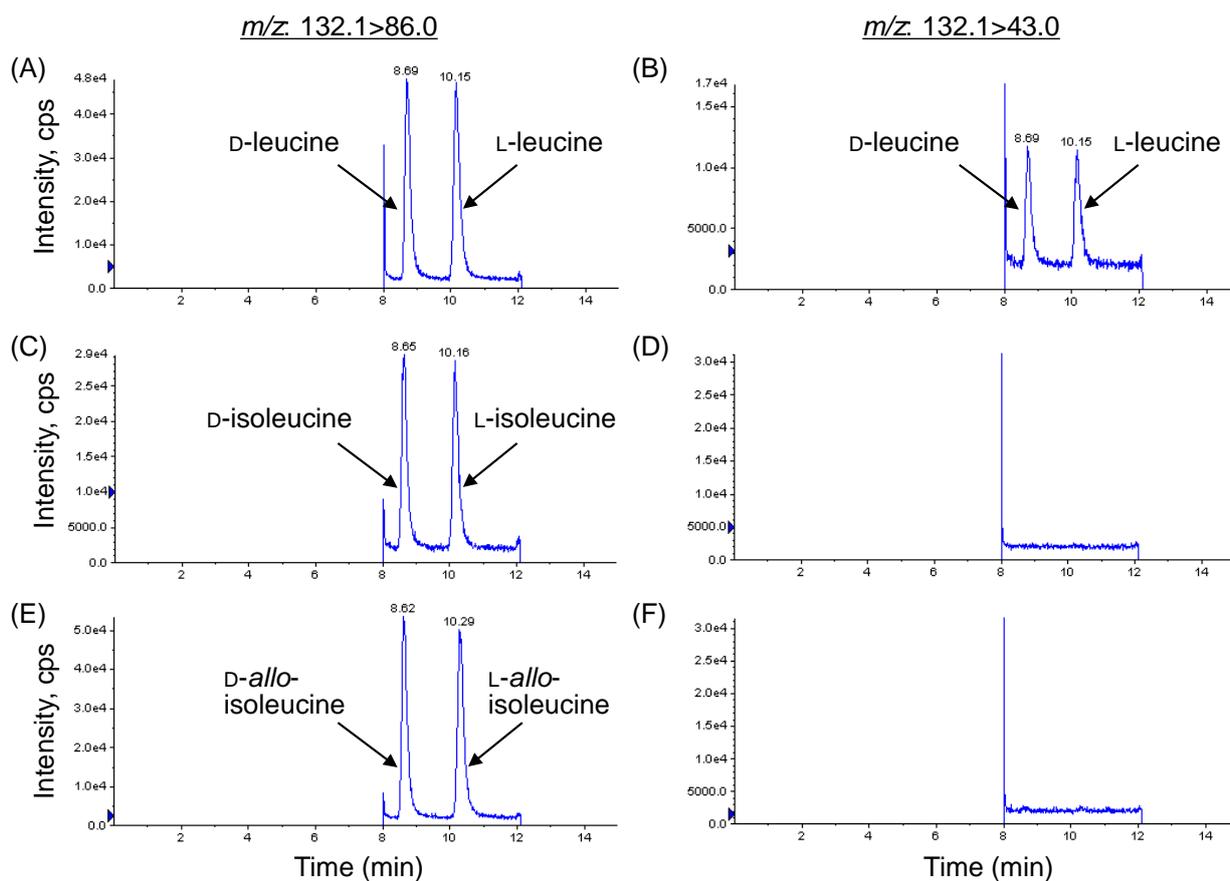


Figure 13: Representative MRM chromatograms of DL-leucine, DL-isoleucine and DL-*allo*-leucine solution (10 ng/mL).

(A) Representative MRM chromatograms of the mixture of D- and L-leucine solution at m/z 132.1 > 86.0, (B) m/z 132.1 > 43.0, (C) the mixture of D- and L-isoleucine solution at m/z 132.1 > 86.0, (D) m/z 132.1 > 43.0, and (E) the mixture of D- and L-*allo*-isoleucine solution at m/z 132.1 > 86.0, and (F) m/z 132.1 > 43.0, respectively.

3.3.3 ヒト血漿中 D- および L-leucine 濃度測定法のサンプル前処理方法

ヒト血漿試料または PBS (100 μ L) 中の D- および L-leucine は、りん酸 4 μ L を添加後 acetonitrile 1 mL で抽出し、さらに OASIS MCX cartridge を用いて固相抽出を行った。サンプル前処理で良好な回収率を得るために、D- および L-leucine の第一級アミノ基を酸性条件下でイオン化した後、OASIS MCX cartridge (30 mg/1 cc) を用いて、塩基を含む有機溶媒を用いて溶出させた。ヒト血漿中 D-leucine 濃度は L-leucine と比較して顕著に低いため、D- および L-leucine 濃度を定量可能な検量線範囲を設定するには、D- および L-leucine 測定用サンプルを別の希釈方法で準備する必要があった。PBS で調製した QC 試料 (LQC, MQC および HQC) からの D- および L-leucine の回収率 87.4–99.8%, D-leucine- d_7 (0.01 μ g/mL) および L-leucine- d_7 (10 μ g/mL) の回収率は 95.3% および 88.3% と良好であった。また、D-, L-leucine および内標準物質の回収率に濃度依存は認められなかった。

3.3.4 ヒト血漿中 D- および L-leucine 濃度測定法

検量線は検量線用標準試料を測定したピーク面積比 (D-leucine/D-leucine- d_7 および L-leucine/L-leucine- d_7) と調製濃度の関係から作成した。検量線は $1/x^2$ の重み付けを行い最小二乗法により直線回帰した。D- および L-leucine の検量線範囲は、それぞれヒト血漿中内因性濃度を定量可能な 0.001–1 μ g/mL および 1–1,000 μ g/mL に設定した。検量線の相関係数 (r) は 0.9967–0.9996 であり、検量線用標準試料の実測濃度の真度 (%RE) は $\pm 15\%$ 未満であった。D- および L-leucine の LLOQ 試料のクロマトグラムは Figure 14A および 14C に示した。また、最高濃度の検量線用標準試料に続けてブランクサンプルを測定したが、キャリアオーバーによる D- および L-leucine のピークは検出されなかった。

代替マトリックスである PBS に D- および L-leucine (LLQC, LQC, MQC および HQC, 各 $n=5$) を添加して調製した QC 試料の D- および L-leucine 濃度の真度および精度は、Table 12 に示した。分析日内および日間での真度 (%RE) および精度 (%CV) は -7.6–5.8% および 10.8% 以下であり、本分析法の堅牢性を示した。さらに、代替マトリックスを使用する妥当性を示すために、ヒトブランク血漿または既知濃度 (LQC, MQC および HQC) の D- および L-leucine を添加したヒト血漿 QC 試料 (各 $n=5$) を分析した。また、PBS で 2 倍希釈したヒト血漿 QC 試料も分析した。分析日内および日間での真度 (%RE) および精度 (%CV) は -2.0–9.8% および 8.9% 以下であり、“3.2.5 評価項目”に記載した基準を満たした。以上の結果、ヒト血漿中 D- および L-leucine 濃度測定に、PBS が代替マトリックスとして科学的に妥当であった。

D- および L-leucine の水溶液およびヒト血漿中における安定性を評価した。D- および L-leucine は水溶液中 4°C 保存下で 120 日間安定であった。また、ヒト血漿 (ブランク, MQC 添加および 2 倍希釈血漿) 中における D- および L-leucine の残存率は、長期保存 (-30°C, 45 日間), 3 回凍結融解条件下で 94.4–108.9% であり安定性に問題はなかった (Table 13)。

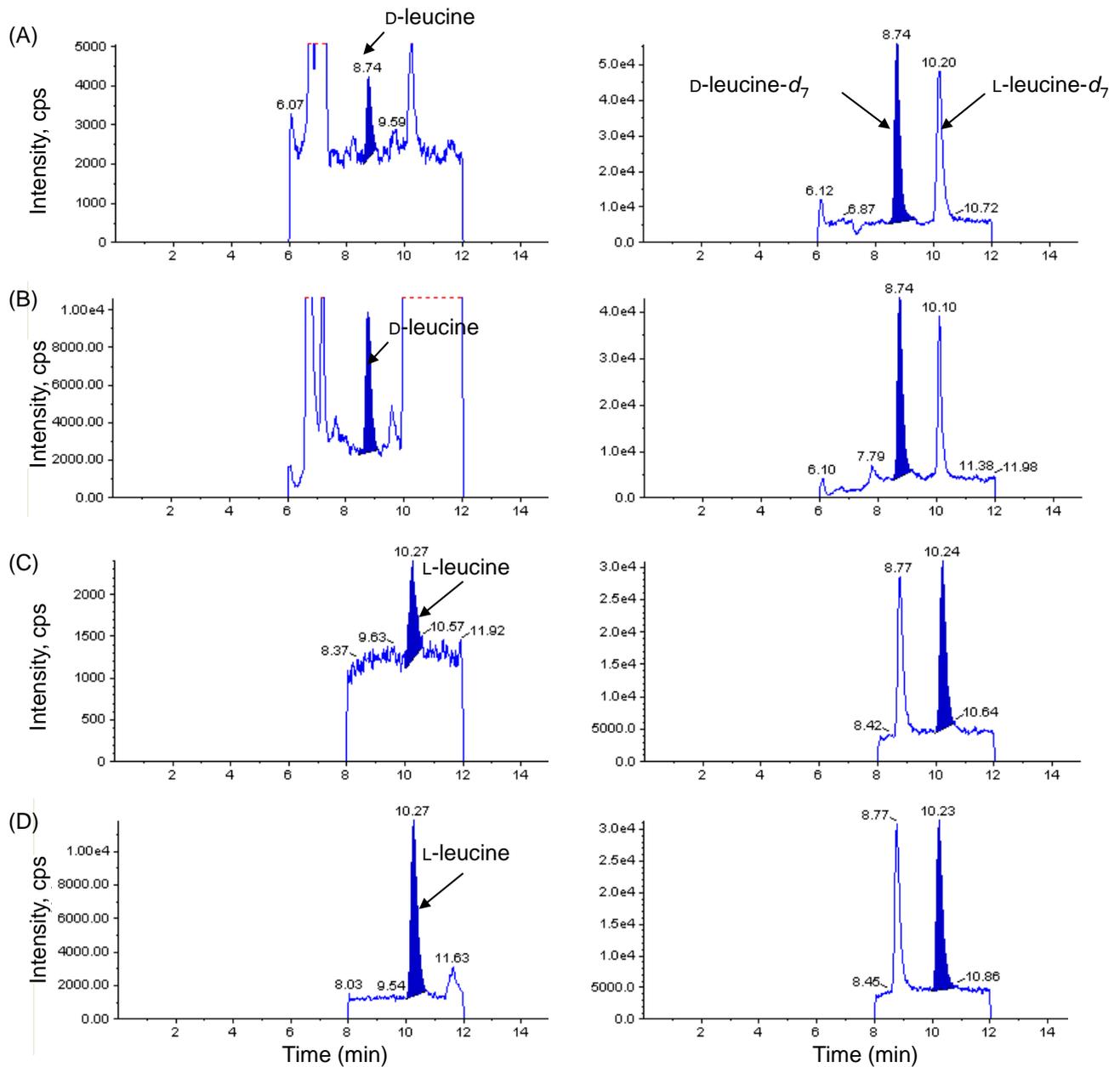


Figure 14: MRM chromatograms of D- and L-leucine and the IS.

(A) Representative MRM chromatograms of D-leucine and the IS from the LLOQ sample in PBS and (B) the human plasma sample, respectively. (C) Representative MRM chromatograms of L-leucine and the IS from the LLOQ sample in PBS and (D) the human plasma sample, respectively.

Table 12 Intra & inter-assay precision and accuracy for D- and L-leucine

Analyte	Matrix	Nominal conc. (µg/mL)	Intra-assay (n=5)			Inter-assay (n=15)			
			Average conc. (µg/mL)	CV (%)	RE (%)	Average conc. (µg/mL)	CV (%)	RE (%)	
D-leucine	PBS	LLQC	0.001	0.000975	4.8	-2.5	0.000964	7.0	-3.6
		LQC	0.003	0.00317	4.3	5.8	0.00317	4.0	5.6
		MQC	0.05	0.0518	1.7	3.5	0.0521	2.6	4.3
		HQC	0.8	0.742	2.6	-7.2	0.739	2.8	-7.6
	Human plasma	Unspiked	-	0.00464	8.5	-	0.00471	6.0	-
		+LQC	0.00764	0.00781	6.6	2.3	0.00778	5.6	1.9
		+MQC	0.0546	0.0600	3.5	9.8	0.0594	3.0	8.7
		+HQC	0.805	0.831	3.0	3.3	0.815	3.4	1.3
		Diluted with PBS	0.00232	0.00227	8.9	-2.0	0.00235	8.2	1.2
	L-leucine	PBS	LLQC	1	0.950	10.8	-5.0	0.983	8.4
LQC			3	3.02	5.0	0.6	3.01	5.8	0.4
MQC			50	51.1	2.0	2.2	50.8	1.6	1.5
HQC			800	785	1.5	-1.8	769	2.9	-3.9
Human plasma		Unspiked	-	10.0	4.6	-	10.1	4.7	-
		+LQC	13.0	13.7	4.4	4.7	13.4	5.1	2.4
		+MQC	60.0	64.9	5.3	8.1	63.3	4.9	5.5
		+HQC	810	821	2.4	1.3	812	4.5	0.3
	Diluted with PBS	5.02	5.17	8.8	3.0	5.19	6.7	3.3	

Intra- and inter-day assay precision and accuracy in the surrogate matrix were evaluated using the D-leucine spiked PBS samples at levels of 0.01 (LLQC), 0.03 (LQC), 0.5 (MQC), and 8 (HQC) µg/mL and the L-leucine spiked PBS samples at levels of 0.1 (LLQC), 0.3 (LQC), 5 (MQC) and 8 (HQC) µg/mL, respectively.

Intra- and inter-day assay precision and accuracy in human plasma were evaluated using the unspiked human plasma, D-leucine spiked human plasma samples at levels of 0.03 (LQC), 0.5 (MQC), 8 (HQC) and L-leucine spiked human plasma samples at levels of 0.3 (LQC), 5 (MQC) 80 (HQC) µg/mL, respectively, and 2-fold diluted human plasma with PBS.

Table 13 Summary of stability test of D- and L-leucine

Analyte	Matrix	Analyte conc. ($\mu\text{g/mL}$)	Temperature	Period	% of remaining	
D-leucine	water	100	4°C	120 days	101.7	
		Unspiked			108.9	
	Human plasma	+MQC	-30°C	45 days	105.3	
		Diluted with PBS			106.6	
		Unspiked			97.1	
		+MQC	Freeze/thaw	3 cycles	100.7	
		Diluted with PBS			105.1	
		water	100	4°C	120 days	103.1
	L-leucine	Human plasma	Unspiked			94.4
			+MQC	-30°C	45 days	95.4
Diluted with PBS				99.6		
Unspiked				101.3		
+MQC		Freeze/thaw	3 cycles	98.6		
Diluted with PBS				98.9		

Mean \pm SD (n=3)

Table 14 Determination of D- and L-leucine in individual human plasma

Human plasma (Lot No.)	Calculated concentration ($\mu\text{g/mL}$)	
	D-leucine	L-leucine
WX014699F	0.00368 \pm 0.00025	21.0 \pm 1.5
GX025236	0.00281 \pm 0.00021	18.9 \pm 0.8
MT134912	0.00591 \pm 0.00042	13.8 \pm 0.7
MT136184	0.00466 \pm 0.00024	9.63 \pm 0.15
MT136190	0.00197 \pm 0.00017	24.7 \pm 0.6

Mean \pm SD (n=3)

3.3.5 健康成人の血漿中 D- および L-leucine 濃度測定

上記で構築した定量法を用いて、5 ロットのヒト血漿中 D- および L-leucine 濃度を定量した。ヒト血漿中 D- および L-leucine の代表的なクロマトグラムは Figure 14B および 14D に示した。D- および L-leucine の peak intensity は LLOQ 試料より十分に高く、D- および L-leucine の分離も良好であった。ヒト血漿中 D- および L-leucine 濃度は 0.00197–0.00591 および 9.63–24.7 µg/mL であり (Table 14), これらの濃度値は既報値と同程度であった [64]。

3.3.6 D-leucine および D-leucine の DL-leucine 濃度に対する比の種差検討

マウスおよびヒトにおいて DAO 活性により D-leucine の血漿中濃度が影響を受けることが報告された [32, 79]。そこで、本研究で開発した定量法を各種動物血漿中 D- および L-leucine の濃度測定に応用し、D-leucine および D-leucine の DL-leucine 濃度に対する比の種差を検討した。

代替マトリックスである PBS に D- および L-leucine (LLQC, LQC, MQC および HQC) を添加して調製した QC 試料および各種動物ブランク血漿, または既知濃度 (MQC) の D- および L-leucine を添加した血漿および PBS で 2 倍希釈した動物血漿 QC 試料を分析したところ, 分析日内での真度 (%RE) および精度 (%CV) は -7.6–6.6% および 10.8% 以下であり, 基準を満たした。さらにヒトおよび各種動物ブランク血漿の IS で補正した MF は 0.920–1.23, CV は 8.1% 以下であり, 顕著なマトリックス効果は認められなかった (Table 15)。以上より, 本定量法は各種動物血漿中 D- および L-leucine の濃度測定にも適応可能であることが確認された。

ヒトおよび各種動物血漿中 D- および L-leucine 濃度および D-leucine の DL-leucine 濃度に対する比を Table 16 に示した。ヒトおよび各種動物種に拘らず, D-leucine の血漿中濃度は L-leucine と比較して顕著に低い値であった。D-Leucine および D-leucine の DL-leucine 濃度に対する比には顕著な種差が認められた。マウスおよびラット血漿中 D-leucine 濃度は, ヒト血漿中濃度の約 116 および 34 倍であったものの, L-leucine 濃度はヒト血漿中濃度の 2 倍以内であった。さらに, マウスおよびラット血漿中 D-leucine の DL-leucine 濃度に対する比は, ヒトの 97–142 および 25–44 倍であった。イヌおよびサル血漿中 D-leucine の DL-leucine 濃度に対する比は, げっ歯類とヒトの中間程度であったが, 特にサルで顕著な個体差が認められた。

Table 15 IS-normalized MF of D- and L-leucine in pooled plasma samples

Species	IS-normalized MF	
	D-leucine	L-leucine
Mouse	1.23 ± 0.05	1.07 ± 0.01
Rat	1.23 ± 0.08	1.05 ± 0.03
Dog	0.920 ± 0.047	1.07 ± 0.03
Monkey	1.06 ± 0.09	1.10 ± 0.01
Human	0.973 ± 0.059	1.03 ± 0.02

Mean±SD (n=3)

MF = Peak area of sample for matrix effect^{*1}/mean peak area of reference^{*2}

IS-normalized MF = MF of analyte/MF of IS

^{*1} Pooled plasma for matrix effect was prepared by spiking standard solution in processed sample.

^{*2} Reference was prepared by spiking standard solution at the concentration of the endogenous level plus 0.05 and 50 µg/mL of D- and L-leucine, respectively.

Table 16 Concentrations of D- and L-leucine and their corresponding ratios of D-leucine to DL-leucine from individual plasma concentrations in humans and animals

Species	D-leucine (µg/mL)	L-leucine (µg/mL)	Ratios of D-leucine to DL-leucine
Mouse	0.441 ± 0.237	15.9 ± 2.9	1.13×10^{-2} – 4.71×10^{-2}
Rat	0.129 ± 0.070	16.4 ± 1.8	3.51×10^{-3} – 1.21×10^{-2}
Dog	0.0243 ± 0.0048	24.5 ± 4.3	7.29×10^{-4} – 1.40×10^{-3}
Monkey	0.211 ± 0.181	38.7 ± 37.0	3.86×10^{-4} – 8.49×10^{-3}
Human	0.00380 ± 0.00155	17.6 ± 6.0	7.95×10^{-5} – 4.83×10^{-4}

Mean±S.D. (n=5 individual animals or human plasma)

3.4 考察

本章では LC/ESI-MS/MS による、誘導体化を必要としない D- および L-leucine のヒト血漿中濃度測定法を開発した。生体試料中 D- および L-leucine 濃度測定法構築には、D- および L-leucine の光学分割に加えて、構造異性体である DL-isoleucine および DL-*allo*-isoleucine との分離が求められる。これまで、複数の生体試料中 D-leucine 濃度測定法が誌上発表されている。Armstrong らは、*o*-phthalic dicarboxaldehyde で誘導体化した D-leucine および他の D-アミノ酸を、クラウンエーテル型キラルカラム CROWNPAK CR(+) と C₁₈ reversed phase column (100×4.6 mm, Advanced Separation Technology) を用いて分離し、蛍光検出 HPLC 法によって検出した [77]。また誘導体化剤として 4-fluoro-7-nitro-2,1,3-benzoxadiazole (NBD-F) および 1-fluoro-2,4-dinitrophenyl-5-L-alanine amide (Marfey's reagent) を用いた HPLC 法による D- および L-leucine の分離分析法も報告されている [78-80, 90-92]。ヒト尿および血清中 D-leucine および他の D-アミノ酸を *N*(*O*)-pentafluoropropionyl-(2)-propyl ester または heptafluorobutyl chloroformate に誘導体化した後、GC/MS を用いた定量法が報告された [71, 83, 84]。さらに、methyl chloroformate に誘導体化した D- および L-アミノ酸を 2 次元ガスクロマトグラフィー飛行時間型質量分析法 (Gas chromatography/time-of-flight mass spectrometry; GC×GC/TOF-MS) により分析する定量法も報告されている [32]。Visser らは、キラル誘導体化試薬である (*S*)-*N*-(4-nitrophenoxycarbonyl)-L-phenylalanine 2-methoxyethyl ester を用いて、LC/ESI-MS/MS によりヒト生体試料中 D-leucine 濃度を定量した [64]。これらの分析法はいずれも D- および L-leucine を分離分析するために、誘導体化剤を用いたものである。先述の通り、誘導体化反応を必要とする分析法は定量性の低下、副生成物生成のリスク、さらにはサンプル前処理が煩雑になるなどの問題点がある。そこで、本研究では誘導体化を必要としない D- および L-leucine のヒト血漿中濃度測定法を開発した。両性イオン型キラルカラムを使用し、methanol/acetonitrile/ammonium formate/formic acid 混液を移動相に用いることで、D- および L-leucine の良好な分離が得られた。さらに DL-leucine 特異的なフラグメントイオンにより DL-isoleucine および DL-*allo*-isoleucine との識別が可能であった。

D- および L-leucine のヒト血漿中濃度測定法の method qualification を実施したところ、ヒト血漿 100 μL を用いて、血漿中 D- および L-leucine 濃度を十分定量可能な 0.001–1 μg/mL および 1–1,000 μg/mL の範囲で良好な直線性を示した。さらに、本定量法を用いて各種動物血漿中 D- および L-leucine の濃度測定に応用し、D-leucine および D-leucine の DL-leucine 濃度に対する比の種差について検討した。その結果、げっ歯類における D-leucine 濃度および D-leucine の DL-leucine に対する割合は、ヒトと比較して顕著に高い値を示したため、DAO 活性には顕著な種差が存在することが示唆された。DAO 活性欠損マウスの脳および血清中 D-leucine 濃度が、野生型マウスと比較して顕著に上昇したことから [79, 93]、本研究で認められた種差および個体差の原因の一つとして DAO 活性差が考えられ、アミノ酸代謝の種差に関する新たな知見が得られた。

本章により，これまで報告事例のなかった，誘導体化を必要としないヒト血漿中 D- および L-leucine の分離分析が可能となった．本定量法は，非臨床および臨床試験における血漿中 D- および L-leucine 測定に有用であると考えられる．

総 論

医薬品開発における前臨床および臨床試験段階での適切なバイオマーカーの利用は、医薬品候補化合物の選択、適切な投与量選択、薬効がより期待される患者層の特定、薬物間相互作用および安全性評価等を可能にする。特に、生体内因性物質として存在する低分子生理活性物質のうち、特定の病態により変動するものは、疾患関連バイオマーカーとして医薬品開発効率向上への貢献が期待される。一例として、cholesterol 代謝物である 24S-HC およびアミノ酸 (DL-serine および DL-leucine) は中枢神経疾患またはアミノ酸代謝異常疾患に関連する低分子バイオマーカーと報告されており、創薬研究に活用できると考えられる [27-32]。しかし、これまで、これら低分子バイオマーカーのヒト血漿中濃度測定には、定量性の低下の懸念がある煩雑な誘導体化が必須であった。そこで、本研究では中枢神経疾患およびアミノ酸代謝異常疾患のバイオマーカーである 24S-HC、DL-serine および DL-leucine のヒト血漿中濃度測定法において、煩雑な誘導体化を必要としない、LC/MS/MS を用いた高感度かつ高選択的な分離分析法を開発した。

2013 年に発出された FDA ドラフトガイダンスでは、バイオマーカーの測定値を医薬品候補化合物の有効性および安全性評価ならびに投与量設計等承認申請に用いる場合、生体試料中薬物濃度分析試験と同様に、分析法バリデーションの必要性が明記された [23]。また、分析法構築における評価項目は、生体試料中薬物濃度分析と同様に選択性、検量線用標準試料の直線性、分析日内および日間での真度および精度、再現性および安定性評価が挙げられる。さらに、バイオマーカー測定の場合は、測定対象物質を含まない生体試料を入手することが困難なため、分析法を構築する過程で、使用する代替マトリックスの妥当性を示すことが必要である。これら堅牢性の高い分析法により精度の高い測定値を得ることは、医薬品開発における安全性や有効性評価あるいは薬物治療効果の高い患者の層別化に重要である。

第 1 章では、脳内 cholesterol 恒常性マーカーおよび中枢神経疾患であるアルツハイマー病や多発性硬化症のバイオマーカーとして注目される、ヒト血漿中 24S-HC の高感度かつ高選択的な新規定量法を開発した。24S-HC の検量線用標準試料は、代替マトリックスに 1% (w/v) Tween 80 含有 PBS を用いて作成した。今回開発したヒト血漿中 24S-HC 分析法は、サンプル前処理段階で誘導体化を経ずに、他の生体内因性 oxysterols である 4 α -HC, 4 β -HC, 7 α -HC, 7 β -HC, 22R-HC, 25-HC および 27-HC との分離分析を初めて可能にした。本分析法の 24S-HC に対する選択性は、クロマトグラム上での分離に加えて、24S-HC 定量分析用の mass transition (m/z 367.6 > 105.0) および、別の mass transition (m/z 385.6 > 105.0) により得られたピーク面積比 (transition ratio) が一定であることで確認した。さらに既存の 24S-HC 分析法では、ヒト血漿中に遊離体、脂肪酸エステルおよび硫酸エステルで存在する 24S-HC の鹸化が不十分な点に着目し、鹸化条件を最適化した。検量線範囲は中枢神経疾患が進行した患者の血漿中 24S-HC 濃度も測定可能な 1–100 ng/mL に設定した。また、代替マトリックスで作成した QC 試料およびヒトブランク血漿または既知濃度の 24S-HC を添加したヒト血漿 QC 試料の分析日間および日内の真度および精度は良好であり、

使用した代替マトリックスが科学的に妥当であることが確認出来た。さらに、本分析法を用いて得られた男性および女性健康成人の血漿中 24S-HC 濃度値は既報と同等であり、本分析法の妥当性が確認されるとともに、実際のヒト血漿試料分析にも適応可能であった。本研究により、LC/APCI-MS/MS を用いた堅牢性の高いヒト血漿中 24S-HC 濃度測定法を開発した。

第 2 章では、統合失調症等の NMDA 受容体機能障害疾患のバイオマーカーとして注目される、D- および L-serine のヒト血漿中濃度同時測定法を開発した。D- および L-serine は水溶性が高いため、検量線用標準試料は代替マトリックスに PBS を用いて作成した。今回開発したヒト血漿中 D- および L-serine 分析法は、サンプル前処理段階で誘導体化を経ずに、氷冷下で 2 本連結したクラウンエーテル型キラルカラムを用いて、最適化した移動相 (0.3% trifluoroacetic acid in 10% acetonitrile) 条件下で、良好な分離分析 (分離度 2.25) を可能にした。D- および L-serine の検量線範囲は 0.01–10 µg/mL および 0.1–100 µg/mL に設定し、代替マトリックスで作成した QC 試料およびヒトブランク血漿または既知濃度の D- および L-serine を添加したヒト血漿 QC 試料の分析日間および日内の真度および精度は良好であった。さらに、本分析法を用いて得られた、ヒト血漿中 D- および L-serine 濃度値は既報と同等であった。本研究により、LC/ESI-MS/MS を用いた堅牢性の高いヒト血漿中 D- および L-serine 濃度測定法を開発した。

第 3 章では、遺伝性のアミノ酸代謝異常のバイオマーカーとして報告される D- および L-leucine のヒト血漿中濃度測定法を開発した。D- および L-serine と同様に、検量線用標準試料は代替マトリックスに PBS を用いて作成した。本研究により開発したヒト血漿中 D- および L-leucine 分析法は、サンプル前処理段階で誘導体化を経ずに、両性イオン型キラルカラムを用い、最適化した移動相 (methanol/acetonitrile/1 mol/L ammonium formate/formic acid, 500:500:25:2, v/v/v/v) 条件下で、良好な分離分析 (分離度: 4.76) が可能になった。さらに DL-leucine に特異的なプロダクトイオンを用いることで、生体試料中に内因性成分として存在する構造異性体 DL-isoleucine および DL-allo-isoleucine との分離分析を同時に達成した。検量線範囲はヒト血漿中 D- および L-leucine 濃度を定量可能な範囲に設定し、代替マトリックスで作成した QC 試料およびヒトブランク血漿または既知濃度の D- および L-leucine を添加したヒト血漿 QC 試料の分析日間および日内の真度および精度は良好であった。さらに、本分析法を用いて得られた、ヒト血漿中 D- および L-leucine 濃度値は既報と同等であった。本研究により、LC/ESI-MS/MS を用いた堅牢性の高いヒト血漿中 D- および L-leucine 濃度測定法を開発し、さらに動物血漿中 D- および L-leucine 濃度の種差検討に適応した。その結果、げっ歯類における D-leucine 濃度および D-leucine の DL-leucine に対する割合は、ヒトと比較して顕著に高く、DAO 活性には種差が存在することが示唆された。本分析法は、非臨床から臨床試験における D- および L-leucine 血漿中濃度測定法に有用であろう。一方で、創薬初期の非臨床におけるバイオマーカー探索を主目的とした D-アミノ酸濃度の網羅的測定には、既報の誘導体化試薬を用いた D-アミノ酸一斉分析を用いることが high throughput の観点から適切な場合も想定される [94]。その場合は、医薬品研究開発の効率も考慮の上、分析法の妥当性の検証を限定的な内容とし、臨床試験前の段階で本研究で

開発した分析法を用いて、バリデーション評価項目を取得する段階的アプローチが望ましい。

本研究により、分析前処理過程で煩雑な誘導体化を必要としない、LC/MS/MS を用いた 24S-hydroxycholesterol, DL-serine および DL-leucine のヒト血漿中濃度測定法を開発した。これらの分析法は、生体試料中低分子薬物濃度測定に関する FDA ドラフトガイダンスのバリデーション評価項目にも準じているため、中枢神経疾患およびアミノ酸代謝異常疾患等の臨床試験におけるバイオマーカー測定に有用である。

謝 辞

本研究を遂行するに際し、終始御懇篤なる御指導と御鞭撻を賜りました静岡県立大学 薬学部 薬物動態学分野 尾上 誠良 教授に謹んで感謝の意を表します。

本論文の作成にあたり、御校閲、御助言を賜りました静岡県立大学 薬学部 生体機能分子分析学分野 豊岡 利正 教授、静岡県立大学 薬学部 衛生分子毒性学分野 吉成 浩一 教授ならびに静岡県立大学 薬学部 実践薬学分野 内田 信也 准教授に深謝いたします。

本研究の機会を与えてくださり、御高配を賜りました武田薬品工業株式会社 医薬研究本部 薬物動態研究所 所長 朝日 知博士に厚く御礼申し上げます。

本研究を遂行するにあたり、終始御指導と御鞭撻を賜りました同研究所 リサーチマネージャー 森脇 俊哉博士に厚く御礼申し上げます。

本研究を遂行するにあたり、終始御指導と御鞭撻、ならびに貴重な御意見を頂きました同研究所 主席研究員 神野 文宏博士に感謝申し上げます。さらに、本研究の遂行にあたりご協力頂きました同研究所 主任研究員 掛樋 真彰修士、同社 医薬研究本部 基盤技術研究所 主席研究員 上口 英則修士、主任研究員 里見 佳典博士に深謝いたします。また、数々の御指導および御助言を頂きました同社 医薬研究本部 薬物動態研究所 主席研究員 天野 信之修士、平林 英樹博士に感謝申し上げます。業務と並行して本研究を遂行するに際し、御理解と御協力頂きました武田薬品工業株式会社 医薬研究本部 薬物動態研究所の皆様に深謝いたします。

引用文献

- [1] Scannell, J.W., Blanckley, A., Boldon, H., Warrington, B., Diagnosing the decline in pharmaceutical R&D efficiency, *Nat. Rev. Drug Discov.*, **11** (3): 191–200 (2012)
- [2] Mathieu, M.P., PAREXEL Biopharmaceutical R&D Statistical Sourcebook 2012/2013 (2012)
- [3] PhRMA, Pharmaceutical Research and Manufacturers of America, 2013 Biopharmaceutical Research Industry Profile (Washington, DC: PhRMA, July 2013). (2013)
- [4] Arrowsmith, J., Miller, P., Trial watch: phase II and phase III attrition rates 2011–2012, *Nat. Rev. Drug Discov.*, **12** (8): 569 (2013)
- [5] FDA, Critical Path Opportunities List (2006)
<http://www.fda.gov/downloads/ScienceResearch/SpecialTopics/CriticalPathInitiative/CriticalPathOpportunitiesReports/UCM077258.pdf>
- [6] Atkinson, A.J., Colburn, W.A., DeGruttola, V.G., DeMets, D.L., DO, G.J.D., Hoth, D.F., Oates, J.A., Peck, C.C., Schooley, R.T., Spilker, B.A., Woodcock, J., Zeger, S.L., Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework, *Clin. Pharmacol. Ther.*, **69** (3): 89–95 (2001)
- [7] Bough, K.J., Amur, S., Lao, G., Hemby, S.E., Tannu, N.S., Kampman, K.M., Schmitz, J.M., Martinez, D., Merchant, K.M., Green, C., Sharma, J., Dougherty, A.H., Moeller, F.G., Biomarkers for the development of new medications for cocaine dependence, *Neuropsychopharmacology*, **39** (1): 202–19 (2014)
- [8] La Thangue, N.B., Kerr, D.J., Predictive biomarkers: a paradigm shift towards personalized cancer medicine, *Nat. Rev. Clin. Oncol.*, **8** (10): 587–96 (2011)
- [9] Murphy, C.G., Modi, S., HER2 breast cancer therapies: a review, *Biologics*, **3**: 289–301 (2009)
- [10] el-Houseini, M.E., Mohammed, M.S., Elshemey, W.M., Hussein, T.D., Desouky, O.S., Elsayed, A.A., Enhanced detection of hepatocellular carcinoma, *Cancer Control*, **12** (4): 248–53 (2005)
- [11] Mukoyama, M., Nakao, K., Hosoda, K., Suga, S., Saito, Y., Ogawa, Y., Shirakami, G., Jougasaki, M., Obata, K., Yasue, H., Kambayashi, Y., K., I., Imura, H., Brain natriuretic peptide as a novel cardiac hormone in humans. Evidence for an exquisite dual natriuretic peptide system, atrial natriuretic peptide and brain natriuretic peptide, *J. Clin. Invest.*, **87** (4): 1402–12 (1991)
- [12] Dorr, P., Westby, M., Dobbs, S., Griffin, P., Irvine, B., Macartney, M., Mori, J., Rickett, G., Smith-Burchnell, C., Napier, C., Webster, R., Armour, D., Price, D., Stammen, B., Wood, A., Perros, M.,

Maraviroc (UK-427,857), a potent, orally bioavailable, and selective small-molecule inhibitor of chemokine receptor CCR5 with broad-spectrum anti-human immunodeficiency virus type 1 activity, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **49** (11): 4721–32 (2005)

[13] Clyne, B., Olshaker, J.S., The C-reactive protein, *J. Emerg. Med.*, **17** (6): 1019–25 (1999)

[14] Shell, W.E., Sobel, B.E., Biochemical markers of ischemic injury, *Circulation*, **53** (3 Suppl): I98–106 (1976)

[15] Kosaka, T., Yatabe, Y., Endoh, H., Yoshida, K., Hida, T., Tsuboi, M., Tada, H., Kuwano, H., Mitsudomi, T., Analysis of epidermal growth factor receptor gene mutation in patients with non-small cell lung cancer and acquired resistance to gefitinib, *Clin. Cancer Res.*, **12** (19): 5764–9 (2006)

[16] Gabbay, K.H., Hasty, K., Breslow, J.L., Ellison, R.C., Bunn, H.F., Gallop, P.M., Glycosylated hemoglobins and long-term blood glucose control in diabetes mellitus, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **44** (5): 859–64 (1977)

[17] Topalian, S.L., Hodi, F.S., Brahmer, J.R., Gettinger, S.N., Smith, D.C., McDermott, D.F., Powderly, J.D., Carvajal, R.D., Sosman, J.A., Atkins, M.B., Leming, P.D., Spigel, D.R., Antonia, S.J., Horn, L., Drake, C.G., Pardoll, D.M., Chen, L., Sharfman, W.H., Anders, R.A., Taube, J.M., McMiller, T.L., Xu, H., Korman, A.J., Jure-Kunkel, M., Agrawal, S., McDonald, D., Kollia, G.D., Gupta, A., Wigginton, J.M., Sznol, M., Safety, activity, and immune correlates of anti-PD-1 antibody in cancer, *N. Engl. J. Med.*, **366** (26): 2443–54 (2012)

[18] Serdar, M.A., Oguz, O., Olgun, A., Seckin, B., Ilgan, S., Hasimi, A., Salih, M., Peker, F., Kutluay, T., Diagnostic approach to prostate cancer using total prostate specific antigen-based parameters together, *Ann. Clin. Lab. Sci.*, **32** (1): 22–30 (2002)

[19] Mueller, M., Vafaie, M., Biener, M., Giannitsis, E., Katus, H.A., Cardiac troponin T: from diagnosis of myocardial infarction to cardiovascular risk prediction, *Circ. J.*, **77** (7): 1653–61 (2013)

[20] FDA, Guidance for Industry, Bioanalytical Method Validation (2001)

www.fda.gov/downloads/drugs/guidancecomplianceregulatoryinformation/guidances/ucm070107.pdf

[21] EMA, Guideline on bioanalytical method validation (2011)

[http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2011/08/WC500109686.p
df](http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2011/08/WC500109686.pdf)

[22] 厚生労働省医薬食品局審査管理課長通知, 医薬品開発における生体試料中薬物濃度分析法のバリデーションに関するガイドライン (2013)

http://www.nihs.go.jp/drug/BMV/250711_BMV-GL.pdf

[23] FDA, Guidance for Industry, Bioanalytical Method Validation (2013)

<http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/UCM368107.pdf>

[24] Lee, J.W., Devanarayan, V., Barrett, Y.C., Weiner, R., Allinson, J., Fountain, S., Keller, S., Weinryb, I., Green, M., Duan, L., Rogers, J.A., Millham, R., O'Brien, P.J., Sailstad, J., Khan, M., Ray, C., Wagner, J.A., Fit-for-purpose method development and validation for successful biomarker measurement, *Pharm. Res.*, **23** (2): 312–28 (2006)

[25] Jones, B.R., Schultz, G.A., Eckstein, J.A., Ackermann, B.L., Surrogate matrix and surrogate analyte approaches for definitive quantitation of endogenous biomolecules, *Bioanalysis*, **4** (19): 2343–56 (2012)

[26] Zhao, X., Modur, V., Carayannopoulos, L.N., Laterza, O.F., Biomarkers in Pharmaceutical Research, *Clin. Chem.*, **61** (11): 1343–53 (2015)

[27] Bretillon, L., Lutjohann, D., Stahle, L., Widhe, T., Bindl, L., Eggertsen, G., Diczfalusy, U., Bjorkhem, I., Plasma levels of 24S-hydroxycholesterol reflect the balance between cerebral production and hepatic metabolism and are inversely related to body surface, *J. Lipid Res.*, **41** (5): 840–5 (2000)

[28] Papassotiropoulos, A., Lutjohann, D., Bagli, M., Locatelli, S., Jessen, F., Rao, M.L., Maier, W., Bjorkhem, I., von Bergmann, K., Heun, R., Plasma 24S-hydroxycholesterol: a peripheral indicator of neuronal degeneration and potential state marker for Alzheimer's disease, *Neuroreport*, **11** (9): 1959–62 (2000)

[29] Leoni, V., Caccia, C., 24S-hydroxycholesterol in plasma: a marker of cholesterol turnover in neurodegenerative diseases, *Biochimie.*, **95** (3): 595–612 (2013)

[30] Hamase, K., Morikawa, A., Zaitso, K., D-Amino acids in mammals and their diagnostic value, *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.*, **781** (1–2): 73–91 (2002)

[31] Kirschner, D.L., Green, T.K., Separation and sensitive detection of D-amino acids in biological matrices, *J. Sep. Sci.*, **32** (13): 2305–18 (2009)

[32] Waldhier, M.C., Almstetter, M.F., Nurnberger, N., Gruber, M.A., Dettmer, K., Oefner, P.J., Improved enantiomer resolution and quantification of free D-amino acids in serum and urine by comprehensive two-dimensional gas chromatography-time-of-flight mass spectrometry, *J. Chromatogr. A.*, **1218** (28): 4537–44 (2011)

[33] Lutjohann, D., Breuer, O., Ahlborg, G., Nennesmo, I., Siden, A., Diczfalusy, U., Bjorkhem, I.,

Cholesterol homeostasis in human brain: evidence for an age-dependent flux of 24S-hydroxycholesterol from the brain into the circulation, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **93** (18): 9799–804 (1996)

[34] Solomon, A., Leoni, V., Kivipelto, M., Besga, A., Oksengard, A.R., Julin, P., Svensson, L., Wahlund, L.O., Andreasen, N., Winblad, B., Soininen, H., Bjorkhem, I., Plasma levels of 24S-hydroxycholesterol reflect brain volumes in patients without objective cognitive impairment but not in those with Alzheimer's disease, *Neurosci. Lett.*, **462** (1): 89–93 (2009)

[35] Bretillon, L., Siden, A., Wahlund, L.O., Lutjohann, D., Minthon, L., Crisby, M., Hillert, J., Groth, C.G., Diczfalusy, U., Bjorkhem, I., Plasma levels of 24S-hydroxycholesterol in patients with neurological diseases, *Neurosci. Lett.*, **293** (2): 87–90 (2000)

[36] Schell, M.J., Molliver, M.E., Snyder, S.H., D-serine, an endogenous synaptic modulator: localization to astrocytes and glutamate-stimulated release, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **92** (9): 3948–52 (1995)

[37] Mothet, J.P., Parent, A.T., Wolosker, H., Brady, R.O., Jr., Linden, D.J., Ferris, C.D., Rogawski, M.A., Snyder, S.H., D-serine is an endogenous ligand for the glycine site of the *N*-methyl-D-aspartate receptor, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **97** (9): 4926–31 (2000)

[38] Calcia, M.A., Madeira, C., Alheira, F.V., Silva, T.C., Tannos, F.M., Vargas-Lopes, C., Goldenstein, N., Brasil, M.A., Ferreira, S.T., Panizzutti, R., Plasma levels of D-serine in Brazilian individuals with schizophrenia, *Schizophr. Res.*, **142** (1–3): 83–7 (2012)

[39] Karakawa, S., Shimbo, K., Yamada, N., Mizukoshi, T., Miyano, H., Mita, M., Lindner, W., Hamase, K., Simultaneous analysis of D-alanine, D-aspartic acid, and D-serine using chiral high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry and its application to the rat plasma and tissues, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **115**: 123–9 (2015)

[40] Bjorkhem, I., Lutjohann, D., Breuer, O., Sakinis, A., Wennmalm, A., Importance of a novel oxidative mechanism for elimination of brain cholesterol. Turnover of cholesterol and 24(S)-hydroxycholesterol in rat brain as measured with $^{18}\text{O}_2$ techniques in vivo and in vitro, *J. Biol. Chem.*, **272** (48): 30178–84 (1997)

[41] Lund, E.G., Guileyardo, J.M., Russell, D.W., cDNA cloning of cholesterol 24-hydroxylase, a mediator of cholesterol homeostasis in the brain, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **96** (13): 7238–43 (1999)

[42] Ramirez, D.M., Andersson, S., Russell, D.W., Neuronal expression and subcellular localization of cholesterol 24-hydroxylase in the mouse brain, *J. Comp. Neurol.*, **507** (5): 1676–93 (2008)

[43] Leoni, V., Masterman, T., Diczfalusy, U., De Luca, G., Hillert, J., Bjorkhem, I., Changes in human

plasma levels of the brain specific oxysterol 24S-hydroxycholesterol during progression of multiple sclerosis, *Neurosci. Lett.*, **331** (3): 163–6 (2002)

[44] Wang, Y., Jiang, H., Huang, H., Xie, Y., Zhao, Y., You, X., Tang, L., Yin, W., Qiu, P., Yan, G., Hu, H., Determination of neuroprotective oxysterols in *Calculus bovis*, human gallstones, and traditional Chinese medicine preparations by liquid chromatography with mass spectrometry, *J. Sep. Sci.*, **38** (5): 796–803 (2015)

[45] Björkhem, I., Lutjohann, D., Diczfalusy, U., Stahle, L., Ahlborg, G., Wahren, J., Cholesterol homeostasis in human brain: turnover of 24S-hydroxycholesterol and evidence for a cerebral origin of most of this oxysterol in the circulation, *J. Lipid Res.*, **39** (8): 1594–600 (1998)

[46] Dzeletovic, S., Breuer, O., Lund, E., Diczfalusy, U., Determination of cholesterol oxidation products in human plasma by isotope dilution-mass spectrometry, *Anal. Biochem.*, **225** (1): 73–80 (1995)

[47] Honda, A., Yamashita, K., Hara, T., Ikegami, T., Miyazaki, T., Shirai, M., Xu, G., Numazawa, M., Matsuzaki, Y., Highly sensitive quantification of key regulatory oxysterols in biological samples by LC-ESI-MS/MS, *J. Lipid Res.*, **50** (2): 350–7 (2009)

[48] Sidhu, R., Jiang, H., Farhat, N.Y., Carrillo-Carrasco, N., Woolery, M., Ottinger, E., Porter, F.D., Schaffer, J.E., Ory, D.S., Jiang, X., A validated LC-MS/MS assay for quantification of 24(S)-hydroxycholesterol in plasma and cerebrospinal fluid, *J. Lipid Res.*, **56** (6): 1222–33 (2015)

[49] DeBarber, A.E., Lutjohann, D., Merkens, L., Steiner, R.D., Liquid chromatography-tandem mass spectrometry determination of plasma 24S-hydroxycholesterol with chromatographic separation of 25-hydroxycholesterol, *Anal. Biochem.*, **381** (1): 151–3 (2008)

[50] Xu, Y., Yuan, Y., Smith, L., Edom, R., Weng, N., Mamidi, R., Silva, J., Evans, D.C., Lim, H.K., LC-ESI-MS/MS quantification of 4beta-hydroxycholesterol and cholesterol in plasma samples of limited volume, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **85**: 145–54 (2013)

[51] Houghton, R., Horro Pita, C., Ward, I., Macarthur, R., Generic approach to validation of small-molecule LC-MS/MS biomarker assays, *Bioanalysis*, **1** (8): 1365–74 (2009)

[52] Razzazi-Fazeli, E., Kleineisen, S., Luf, W., Determination of cholesterol oxides in processed food using high-performance liquid chromatography-mass spectrometry with atmospheric pressure chemical ionisation, *J. Chromatogr. A.*, **896** (1–2): 321–34 (2000)

[53] Csallany, A.S., Kindom, S.E., Addis, P.B., Lee, J.H., HPLC method for quantitation of cholesterol and four of its major oxidation products in muscle and liver tissues, *Lipids*, **24** (7): 645–51 (1989)

- [54] Mendiara, I., Domeno, C., Nerin, C., Development of a fast sample treatment for the analysis of free and bonded sterols in human serum by LC-MS, *J. Sep. Sci.*, **35** (23): 3308–16 (2012)
- [55] Corrigan, J.J., D-amino acids in animals, *Science*, **164** (3876): 142–9 (1969)
- [56] Hashimoto, A., Nishikawa, T., Hayashi, T., Fujii, N., Harada, K., Oka, T., Takahashi, K., The presence of free D-serine in rat brain, *FEBS Lett.*, **296** (1): 33–6 (1992)
- [57] Hashimoto, K., Fukushima, T., Shimizu, E., Komatsu, N., Watanabe, H., Shinoda, N., Nakazato, M., Kumakiri, C., Okada, S., Hasegawa, H., Imai, K., Iyo, M., Decreased serum levels of D-serine in patients with schizophrenia: evidence in support of the *N*-methyl-D-aspartate receptor hypofunction hypothesis of schizophrenia, *Arch. Gen. Psychiatry*, **60** (6): 572–6 (2003)
- [58] Hashimoto, K., Engberg, G., Shimizu, E., Nordin, C., Lindstrom, L.H., Iyo, M., Reduced D-serine to total serine ratio in the cerebrospinal fluid of drug naive schizophrenic patients, *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry*, **29** (5): 767–9 (2005)
- [59] Sasabe, J., Chiba, T., Yamada, M., Okamoto, K., Nishimoto, I., Matsuoka, M., Aiso, S., D-serine is a key determinant of glutamate toxicity in amyotrophic lateral sclerosis, *EMBO J.*, **26** (18): 4149–59 (2007)
- [60] Sasabe, J., Miyoshi, Y., Suzuki, M., Mita, M., Konno, R., Matsuoka, M., Hamase, K., Aiso, S., D-amino acid oxidase controls motoneuron degeneration through D-serine, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **109** (2): 627–32 (2012)
- [61] Harai, T., Inoue, R., Fujita, Y., Tanaka, A., Horio, M., Hashimoto, K., Hongou, K., Miyawaki, T., Mori, H., Decreased susceptibility to seizures induced by pentylentetrazole in serine racemase knockout mice, *Epilepsy Res.*, **102** (3): 180–7 (2012)
- [62] Nishikawa, T., Analysis of free D-serine in mammals and its biological relevance, *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.*, **879** (29): 3169–83 (2011)
- [63] Grant, S.L., Shulman, Y., Tibbo, P., Hampson, D.R., Baker, G.B., Determination of D-serine and related neuroactive amino acids in human plasma by high-performance liquid chromatography with fluorimetric detection, *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.*, **844** (2): 278–82 (2006)
- [64] Visser, W.F., Verhoeven-Duif, N.M., Ophoff, R., Bakker, S., Klomp, L.W., Berger, R., de Koning, T.J., A sensitive and simple ultra-high-performance-liquid chromatography-tandem mass spectrometry based method for the quantification of D-amino acids in body fluids, *J. Chromatogr. A.*, **1218** (40): 7130–6 (2011)
- [65] Xie, Y., Alexander, G.M., Schwartzman, R.J., Singh, N., Torjman, M.C., Goldberg, M.E., Wainer,

- I.W., Moaddel, R., Development and validation of a sensitive LC-MS/MS method for the determination of D-serine in human plasma, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **89**: 1–5 (2014)
- [66] Ito, T., Hemmi, H., Kataoka, K., Mukai, Y., Yoshimura, T., A novel zinc-dependent D-serine dehydratase from *Saccharomyces cerevisiae*, *Biochem. J.*, **409** (2): 399–406 (2008)
- [67] Ito, T., Takahashi, K., Naka, T., Hemmi, H., Yoshimura, T., Enzymatic assay of D-serine using D-serine dehydratase from *Saccharomyces cerevisiae*, *Anal. Biochem.*, **371** (2): 167–72 (2007)
- [68] Suzuki, C., Murakami, M., Yokobori, H., Tanaka, H., Ishida, T., Horiike, K., Nagata, Y., Rapid determination of free D-serine with chicken D-serine dehydratase, *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.*, **879** (29): 3326–30 (2011)
- [69] Peter, A., Olajos, E., Casimir, R., Tourwe, D., Broxterman, Q.B., Kaptein, B., Armstrong, D.W., High-performance liquid chromatographic separation of the enantiomers of unusual alpha-amino acid analogues, *J. Chromatogr. A.*, **871** (1–2): 105–13 (2000)
- [70] Shinbo, T., Yamaguchi, T., Nishimura, K., Sugiura, M., Chromatographic separation of racemic amino acids by use of chiral crown ether-coated reversed-phase packings, *J. Chromatogr.*, **405**: 145–53 (1987)
- [71] Brückner, H., Schieber, A., Determination of amino acid enantiomers in human urine and blood serum by gas chromatography-mass spectrometry, *Biomed. Chromatogr.*, **15** (3): 166–72 (2001)
- [72] Piraud, M., Vianey-Saban, C., Petritis, K., Elfakir, C., Steghens, J.P., Morla, A., Bouchu, D., ESI-MS/MS analysis of underivatized amino acids: a new tool for the diagnosis of inherited disorders of amino acid metabolism. Fragmentation study of 79 molecules of biological interest in positive and negative ionisation mode, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **17** (12): 1297–311 (2003)
- [73] Buse, M.G., Reid, S.S., Leucine. A possible regulator of protein turnover in muscle, *J. Clin. Invest.*, **56** (5): 1250–61 (1975)
- [74] Bohe, J., Low, J.F., Wolfe, R.R., Rennie, M.J., Latency and duration of stimulation of human muscle protein synthesis during continuous infusion of amino acids, *J. Physiol.*, **532** (Pt 2): 575–9 (2001)
- [75] Ham, D.J., Caldwell, M.K., Lynch, G.S., Koopman, R., Leucine as a treatment for muscle wasting: a critical review, *Clin. Nutr.*, **33** (6): 937–45 (2014)
- [76] McAllan, L., Cotter, P.D., Roche, H.M., Korpela, R., Nilaweera, K.N., Impact of leucine on energy balance, *J. Physiol. Biochem.*, **69** (1): 155–63 (2013)
- [77] Armstrong, D.W., Gasper, M.P., Lee, S.H., Ercal, N., Zukowski, J., Factors controlling the level and

determination of D-amino acids in the urine and plasma of laboratory rodents, *Amino Acids*, **5** (2): 299–315 (1993)

[78] Hamase, K., Homma, H., Takigawa, Y., Fukushima, T., Santa, T., Imai, K., Regional distribution and postnatal changes of D-amino acids in rat brain, *Biochim. Biophys. Acta.*, **1334** (2–3): 214–22 (1997)

[79] Hamase, K., Inoue, T., Morikawa, A., Konno, R., Zaitso, K., Determination of free D-proline and D-leucine in the brains of mutant mice lacking D-amino acid oxidase activity, *Anal. Biochem.*, **298** (2): 253–8 (2001)

[80] Hamase, K., Morikawa, A., Ohgusu, T., Lindner, W., Zaitso, K., Comprehensive analysis of branched aliphatic D-amino acids in mammals using an integrated multi-loop two-dimensional column-switching high-performance liquid chromatographic system combining reversed-phase and enantioselective columns, *J. Chromatogr. A.*, **1143** (1–2): 105–11 (2007)

[81] Miller, J.H.t., Poston, P.A., Karnes, H.T., Direct analysis of dried blood spots by in-line desorption combined with high-resolution chromatography and mass spectrometry for quantification of maple syrup urine disease biomarkers leucine and isoleucine, *Anal. Bioanal. Chem.*, **400** (1): 237–44 (2011)

[82] Deng, C., Deng, Y., Diagnosis of maple syrup urine disease by determination of L-valine, L-isoleucine, L-leucine and L-phenylalanine in neonatal blood spots by gas chromatography-mass spectrometry, *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.*, **792** (2): 261–8 (2003)

[83] Simek, P., Husek, P., Zahradnickova, H., Heptafluorobutyl chloroformate-based sample preparation protocol for chiral and nonchiral amino acid analysis by gas chromatography, *Methods Mol. Biol.*, **828**: 137–52 (2012)

[84] Alterman, N.A., Hutzinger, P., Amino Acid Handbook, *Springer Media & Business Media, New York*, Chapter 13 (2012)

[85] O'Neil, M.J., The Merck Index: An Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals, 15th Edition (2013)

[86] Hoffmann, C.V., Reischl, R., Maier, N.M., Lammerhofer, M., Lindner, W., Investigations of mobile phase contributions to enantioselective anion- and zwitterion-exchange modes on quinine-based zwitterionic chiral stationary phases, *J. Chromatogr. A.*, **1216** (7): 1157–66 (2009)

[87] Hoffmann, C.V., Pell, R., Lammerhofer, M., Lindner, W., Synergistic effects on enantioselectivity of zwitterionic chiral stationary phases for separations of chiral acids, bases, and amino acids by HPLC, *Anal. Chem.*, **80** (22): 8780–9 (2008)

- [88] Zhang, T., Holder, E., Franco, P., Lindner, W., Method development and optimization on cinchona and chiral sulfonic acid-based zwitterionic stationary phases for enantiomer separations of free amino acids by high-performance liquid chromatography, *J. Chromatogr. A.*, **1363**: 191–9 (2014)
- [89] Zhang, T., Holder, E., Franco, P., Lindner, W., Zwitterionic chiral stationary phases based on cinchona and chiral sulfonic acids for the direct stereoselective separation of amino acids and other amphoteric compounds, *J. Sep. Sci.*, **37** (11): 1237–47 (2014)
- [90] Tojo, M., Murakami, M., Nagata, Y., Simple and low-cost high-performance liquid chromatographic method for determination of D- and L-amino acids, *J. Chromatogr. Sci.*, **50** (5): 393–5 (2012)
- [91] Nagata, Y., Yamamoto, K., Shimojo, T., Determination of D- and L-amino acids in mouse kidney by high-performance liquid chromatography, *J. Chromatogr.*, **575** (1): 147–52 (1992)
- [92] Marfey, P., Determination of D-amino acids. II. Use of a bifunctional reagent, 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzene, *Carlsberg Res. Commun.*, **49**: 591–96 (1984)
- [93] Yamanaka, M., Miyoshi, Y., Ohide, H., Hamase, K., Konno, R., D-Amino acids in the brain and mutant rodents lacking D-amino-acid oxidase activity, *Amino Acids*, **43** (5): 1811–21 (2012)
- [94] Mochizuki, T., Takayama, T., Todoroki, K., Inoue, K., Min, J.Z., Toyo'oka, T., Towards the chiral metabolomics: Liquid chromatography-mass spectrometry based DL-amino acid analysis after labeling with a new chiral reagent, (*S*)-2,5-dioxopyrrolidin-1-yl-1-(4,6-dimethoxy-1,3,5-triazin-2-yl)pyrrolidine-2-carboxylate, and the application to saliva of healthy volunteers, *Anal. Chim. Acta.*, **875**: 73–82 (2015)