

氏 名 たましま えりな
玉嶋 江莉奈

学 位 の 種 類 博士（薬学）

報 告 番 号 甲第 1613 号

学位授与の日付 平成 28 年 3 月 22 日

学位授与の要件 学位規則第 4 条第 1 項該当（課程博士）

学 位 論 文 題 目

生体成分分析のための新規前処理技術の開発とその応用

論文審査委員（主 査）	福岡大学	教授	山口 政俊
（副 査）	福岡大学	教授	能田 均
	福岡大学	教授	藤岡 稔大
	福岡大学	准教授	吉田 秀幸

【緒言】

本研究では、生体成分を測定対象とした新規かつ有用な前処理技術の開発を行った。一般に、複雑な組成をした生体試料を直接機器分析に供することはほとんどない。あらかじめ、何らかの「前処理」を施し、実試料マトリックスからの精製、あるいは測定対象の濃縮などを行う必要がある。その前処理は、分析の目的に応じて効率的かつ効果的に行う必要があるが、既存の方法のみでは必ずしも満足できる結果が得られるとは限らず、より有用な方法論の技術開発を行っていくことが強く求められている。

そこで本研究では、第1章にて微量生体成分の効率的濃縮を可能とする分散液液マイクロ抽出法 (Dispersive liquid liquid microextraction, DLLME) を利用する前処理法の開発を行った。先ずは、DLLME 法をヒト唾液中 Cortisol 及び Cortisone 測定のための前処理法として適用し (1-1)、次に、ヒト血中における微量 5-Hydroxyindole 類 (5-HIs) の高感度測定を実現すべく、蛍光誘導体化と濃縮を協奏的に行う分析法の開発を行った (1-2)。第2章では、パーフルオロアルキル基同士がもつ特異的な親和性 (フルオラス) に着目し、それを試料前処理のためのツールとして利用する方法の開発を行った。生体成分の正確かつ高精度な分析のためには、測定対象の濃縮というよりはむしろ、実試料マトリックスからの効果的かつ効率的な精製が求められる。とくに、質量分析装置 (MS) においては、マトリックス効果と呼ばれる実試料マトリックスの共溶出に伴うレスポンスの変動が定量を妨げる場合があり、試料精製の重要性とその技術開発に大きな注目が集められている。そこで先ずは、測定対象物質にパーフルオロアルキル基を導入することで選択性を向上させる「フルオラス誘導体化法」をヒト血漿中ポリアミン類の分析に適用した (2-1)。さらに、血漿試料中アミノ酸を迅速かつ高精度に分析すべく、フルオラス誘導体化法とフルオラス固相抽出法 (Fluorous solid-phase extraction, F-SPE) を組み合わせたタンデムマス分析法の開発を行った (2-2)。

【第1章】

1-1. DLLME を利用したヒト唾液中 Cortisol 及び Cortisone の濃縮と LC/UV 分析

生体内 Cortisol 及び Cortisone 濃度は、ストレス負荷状態の客観的指標として利用されている。従来より血中濃度測定が行われているが、近年、非侵襲的に採取可能な唾液試料を用いた分析に注目が集められている。しかしながら、唾液中 Cortisol 及び Cortisone は極微量しか存在していないことから、測定の際には固相抽出などの煩雑な前処理による濃縮過程を要するという問題点がある。そこで本研究では、唾液中 Cortisol 及び Cortisone を迅速かつ効率的に濃縮すべく、DLLME を利用した方法の開発を行った。DLLME とは、極少量の低極性有

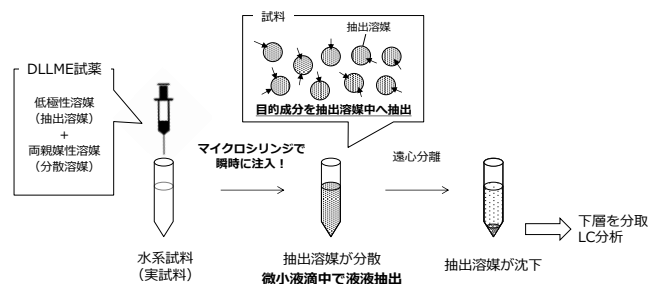


Fig. 1 Principle of DLLME method.

機溶媒（抽出溶媒）と両親媒性（有機）溶媒（分散溶媒）の混液を水系試料溶液に瞬時に注入するとき、分散した微小液滴（抽出溶媒）へ目的成分を迅速かつ効率的に抽出できることに基づく方法である（Fig. 1）。本法では、抽出溶媒として 1,1,2,2-テトラクロロエタンを、分散溶媒としてアセトニトリルを用い、DLLME を行った。その結果、Cortisol 及び Cortisone をそれぞれ 18 倍及び 37 倍に濃縮することが可能であり（Fig. 2）、また、十分な検量線の直線性（ $r^2 \geq 0.9988$ ）及び再現性（ $\leq 6.1\%$ ）をも有していた。本法を唾液試料に適用したところ、微量の Cortisone を検出・定量（3.5-13.3 ng/mL saliva）することが可能であったことから、その有用性と実用性を証明することができた。

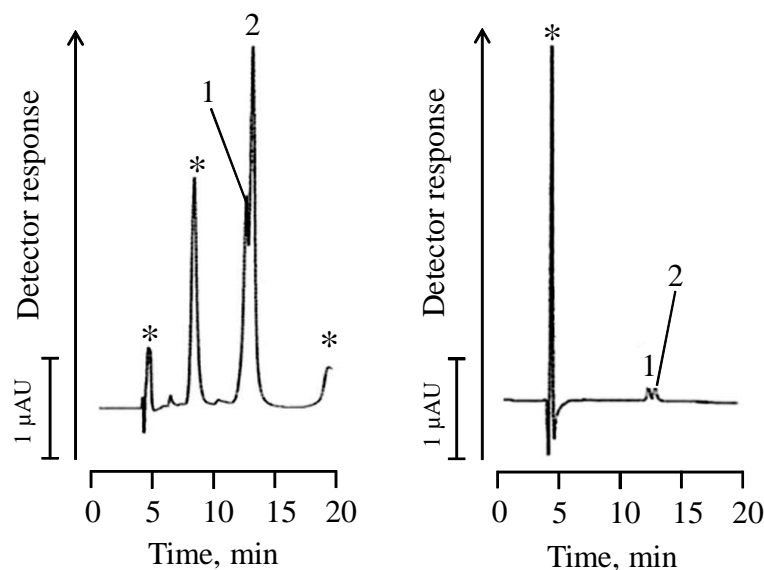


Fig. 2 Chromatograms obtained with the standard solution (each 100 ng/mL) treated (a) with DLLME and (b) without DLLME.

Peaks : 1, Cortisol ; 2, Cortisone ; *, unknown.

1-2. DLLME を利用したヒト血清中 5-HIs の蛍光誘導体化と試料濃縮

生体内 5-HIs の LC 分析には、Benzylamine (BA) を用いた蛍光誘導体化法が利用されているが、試料によっては十分な感度が得られない場合もある。そこで本研究では、DLLME を利用し、BA による 5-HIs の蛍光誘導体化と試料濃縮を協奏的に進行させる方法の開発を行った。本法は、あらかじめ DLLME 試薬中に誘導体化試薬類を溶解させておき、発生させた微小液滴表面において抽出（濃縮）と誘導体化を同時に行

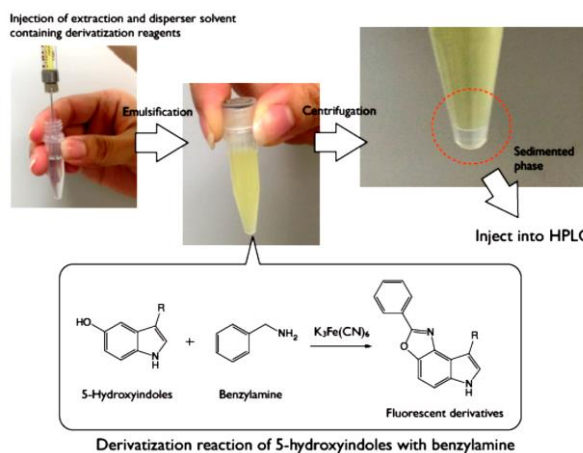


Fig. 3 Concerted derivatization and concentration method for 5-HIs with DLLME.

うという方法である (Fig. 3)。今回、5-Hydroxytryptamine (5-HT)、5-Hydroxyindole-3-acetic acid (5-HIAA)、*N*-Acetyl-5-hydroxytryptamine (NAS)、5-Hydroxytryptophol (5-HTOL) 及び内部標準物質として 5-Hydroxyindole-3-acetamide (5-HIA) を対象に、検討を行った。その結果、抽出溶媒としてイオン液体である 1-Hexyl-3-methylimidazolium hexafluorophosphate を、分散溶媒としてメタノールを用い、その混合溶液に BA 及び $K_3Fe(CN)_6$ を溶解させて DLLME 用試薬としたとき、5-HIs の蛍光誘導体化と濃縮を同時に行うことが可能であった。本法により、DLLME を行わない場合と比較して、2.7-21 倍のピーク強度向上を達成することができた。また、本法における 5-HIs の検出限界は 0.03-0.09 nM と高感度であり、検量線の直線性 ($r^2 \geq 0.9974$) 及び再現性 ($\leq 9.1\%$) についても良好な結果が得られた。本法をヒト血清試料分析に適用したところ、微量に存在する 5-HT 及び 5-HIAA を十分なピーク強度をもって検出・定量 (それぞれ 12 pmol/mL serum 及び 5.5 pmol/mL serum) することができた (Fig. 4)。

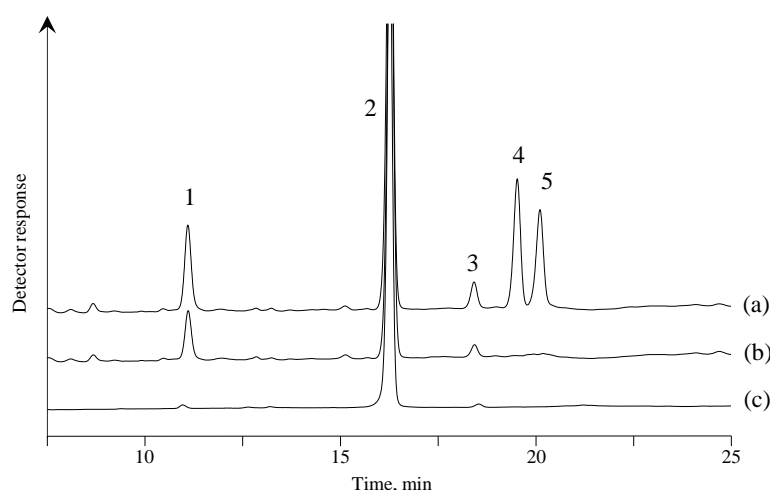


Fig. 4 Chromatograms obtained for (a) 10 pmol/mL serum spiked and (b) non-spiked serum samples treated with concerted derivatization and concentration, and (c) non-spiked serum sample treated with pre-derivatization with BA.
Peaks: 1, 5-HT; 2, 5-HIA (IS); 3, 5-HIAA; 4, NAS; and 5, 5-HTOL.

【第2章】

2-1. フルオラス誘導体化によるポリアミン類の選択的 LC/MS/MS 分析

当研究室ではこれまでに、フルオラスの性質を利用した新しい誘導体化 LC 法を開発した (フルオラス誘導体化法)。フルオラスとは、パーフルオロアルキル基同士の特異的な親和性のことであり、測定対象にパーフルオロアルキル基を導入 (誘導体化) することで、その誘導体のみをフルオラス LC カラムに選択的に保持させることが可能となる。緒言で述

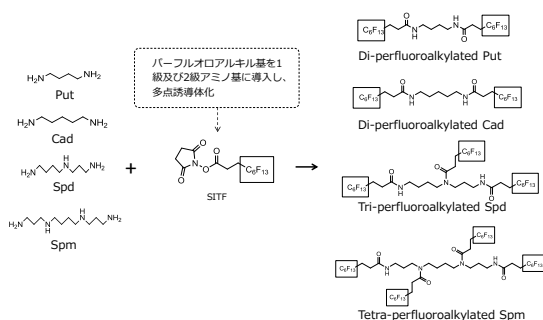


Fig. 5 Multi-fluorous derivatization of polyamines with SITF.

べた通り、MS 分析においては、マトリックス効果が問題となる場合があるため、試料精製の技術開発に大きな注目が集められている。そのため、本研究では、フルオラス誘導体化法を「前処理」の一つとして位置付け、ヒト血漿中ポリアミン類の高精度 LC/MS/MS 分析法の開発を試みた。Putrescine (Put)、Cadaverine (Cad)、Spermidine (Spd) 及び Spermine (Spm) を対象とし、パーフルオロアルキル試薬として *N*-Succinimidyl 4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,9,9,9-tridecafluoro nonanoate (SITF) を用いて多点誘導体化した (Fig. 5)。その結果、対象ポリアミン類のアミノ基の数に応じてパーフルオロアルキル基が導入され、それらはフルオラス LC カラムに良好に保持された。本法における検出限界は 0.34-1.4 nM であり、検量線の直線性 ($r^2 \geq 0.9985$) 及び再現性 ($\leq 13\%$) は共に良好であった。さらに、本法をヒト血漿試料分析に適用したところ、試料中夾雑成分によるマトリックス効果を受けることなく、対象としたポリアミン類を選択的に検出・定量することが可能であった (Fig. 6)。

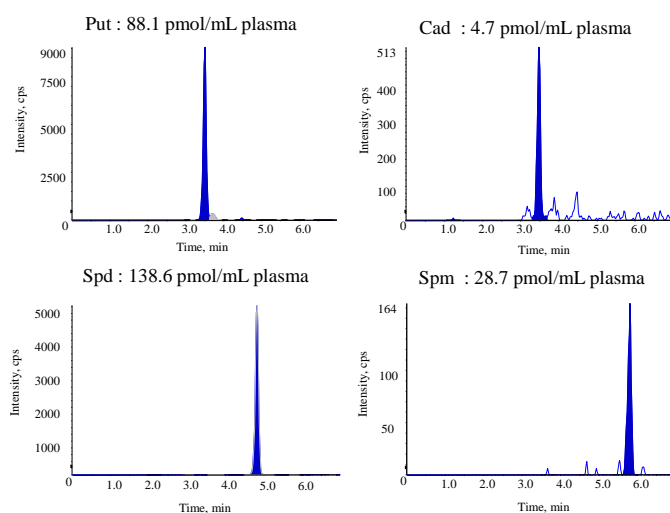


Fig. 6 Typical chromatograms of polyamines obtained from human plasma sample.

2-2. フルオラス相互作用を利用した血中アミノ酸の精製とタンデムマス分析

さらに、フルオラス誘導体化法を利用し、血中アミノ酸のタンデムマス分析法を開発した。本法は、アミノ酸をフルオラス体へと誘導体化した後、その誘導体を F-SPE により選択的に精製し、LC 分離を介さずに直接タンデムマス分析する方法である (Fig. 7)。本法では、固相抽出を行うにあたり、モノリス型の F-SPE (monolithic F-SPE) スピンカラムを利用し、固相抽出操作の簡便化を図った。本

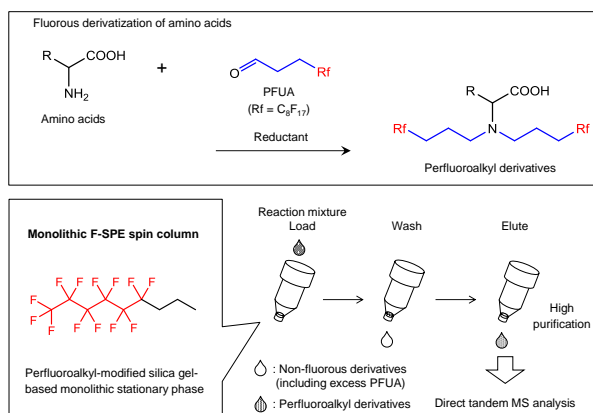


Fig. 7 Fluorous derivatization of amino acids followed by purification with F-SPE.

法にて、アミノ酸のフルオラス誘導体は、monolithic F-SPE にて簡便かつ迅速に精製・回収することが可能であり、LC 分離を介さずとも、十分な検量線の直線性 ($r \geq 0.9901$) 及び再現性 ($RSD \leq 19\%$) を有していた。本法を健常人より採取した血漿試料に適用したところ、マトリックス効果を受けない高精度なタンデムマス分析が可能であったことから、実試料分析への有用性を確認できた。さらに、病態モデルとしてメイプルシロップ尿症 (MSUD) 及びフェニルケトン尿症 (PKU) のマウス血漿試料に適用したところ、それぞれの疾患に関連した特定のアミノ酸濃度が上昇していることを確認できたことから、その実用性をも証明することができた (Fig. 8)。

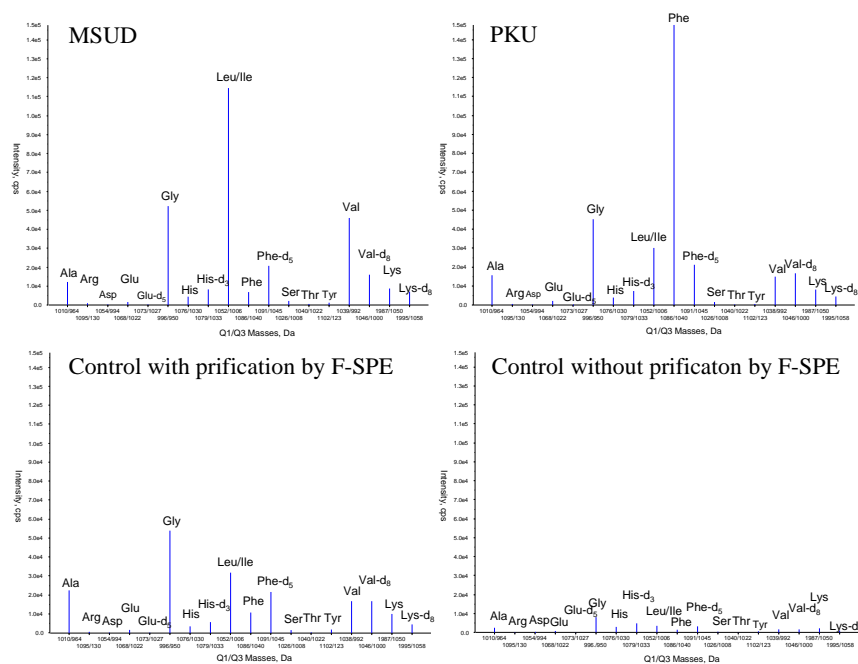


Fig. 8 MRM profiles obtained from MSUD model and PKU model, and control mouse plasma samples with purification and without purification by monolithic F-SPE spin column.

【総括】

本研究では、第 1 章にて DLLME を利用し、唾液中 Cortisol 及び Cortisone の迅速かつ効率的な濃縮法の開発を行い、さらにヒト血清試料中 5-HIs 分析において濃縮と誘導体化を協奏的に行うことに成功した。第 2 章では、フルオラス誘導体化法を利用することにより、血漿中ポリアミン類の高精度 LC/MS/MS 分析及びアミノ酸の高精度タンデムマス分析法の開発に成功した。これらの分析法はいずれも、特殊な前処理器具や装置を必要とせず、簡便な操作のみで従来までの感度不足やマトリックス効果といった問題を解決し得るものである。従って、本研究は今後の関連分野の発展に大きく貢献できるものと考ええる。

近年、分析機器の進歩はめざましく、高感度化、高精度化、多機能化のみでなく、新たな特性を評価できる装置も盛んに開発されている。それに対して、複雑な組成の分析対象試料を分析装置に供せるように精製・濃縮する前処理は、旧態依然とした方法が採用されている。申請者は、独創的な発想により、以下の新規かつ有用な前処理技術を開発し、その方法の有用性と実用性を実証した。

第 1 章にて微量生体成分の効率的濃縮を可能とする分散液液マイクロ抽出法 (Dispersive liquid liquid microextraction, DLLME) を利用する前処理法の開発を行った。まずは、DLLME 法をヒト唾液中 Cortisol 及び Cortisone 測定のための前処理法として適用し (1-1)、次に、ヒト血中における微量 5-Hydroxyindole 類 (5-HIs) の高感度測定を実現すべく、蛍光誘導体化と濃縮を分散液液分散液液系において協奏的に行う分析法の開発を行った (1-2)。

第 2 章では、パーフルオロアルキル基同士がもつ特異的な親和性 (フルオラス) に着目し、それを利用する方法の開発を行った。生体成分の正確かつ高精度な分析のためには、濃縮よりも精製が求められる場合が多い。とくに、質量分析装置 (MS) においては、マトリックス効果と呼ばれる実試料マトリックスの共溶出に伴うレスポンスの変動が定量を妨げる場合がある。そこで、測定対象物質にパーフルオロアルキル基を導入することで選択性を向上させる「フルオラス誘導体化法」をヒト血漿中ポリアミン類の分析に適用した (2-1)。さらに、血漿試料中アミノ酸を迅速かつ高精度に分析するため、フルオラス誘導体化法とフルオラス固相抽出法 (Fluorous solid-phase extraction, F-SPE) を組合わせたタンデムマス法の開発を行った (2-2)。

【第 1 章】

1-1. DLLME を利用したヒト唾液中 Cortisol 及び Cortisone の濃縮と LC/UV 分析

生体内 Cortisol 及び Cortisone 濃度は、ストレス負荷状態の客観的指標として利用されている。従来より血中濃度測定が行われているが、近年、非侵襲的に採取可能な唾液試料を用いた分析に注目が集められている。しかしながら、唾液中に Cortisol 及び Cortisone は極微量しか存在していないことから、効果的な濃縮法が求められている。申請者は DLLME の適用を着想し、抽出溶媒として 1,1,2,2-テトラクロロエタンを、分散溶媒としてアセトニトリルを用いると、Cortisol 及び Cortisone をそれぞれ 18 倍及び 37 倍に濃縮することが可能であった。本法を唾液試料に適用したところ、微量の Cortisone が定量された。

1-2. DLLME を利用したヒト血清中 5-HIs の蛍光誘導体化と試料濃縮

生体内 5-HIs の LC 分析には、Benzylamine (BA) を用いた蛍光誘導体化法が利用されているが、試料によっては感度不足な場合もある。申請者は、分散液液系において、BA

による 5-HIs の蛍光誘導体反応が促進されることを見出し、誘導体化反応とその誘導体の抽出を協奏的に進行させる方法を試みた。5 種 5-HIs を用いて検討を行った結果、抽出溶媒としてイオン液体である 1-Hexyl-3-methylimidazolium hexafluorophosphate を、分散溶媒としてメタノールを用い、その混合溶液に BA 及び $K_3Fe(CN)_6$ を溶解させて DLLME 用試薬としたとき、5-HIs の蛍光誘導体化と濃縮を同時に行うことが可能であった。DLLME を行わない場合と比較して、2.7-21 倍のピーク強度が得られ、ヒト血清試料に適用できた。

【第 2 章】

2-1. フルオラス誘導体化によるポリアミン類の選択的 LC-MS/MS 分析

当研究室では、フルオラス誘導体化が特定官能基をもつ物質の選択的分離に有用であることを見いだしている。申請者は、更に選択性を高めて、ポリアミンをモノアミンから分離分析できる方法を検討した。Putrescine、Cadaverine、Spermidine 及び Spermine を対象とし、パーフルオロアルキル試薬として *N*-Succinimidyl 4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,9,9,9-tridecafluorononanoate (SITF) を用いて誘導体化した。その結果、対象ポリアミン類の全てのアミノ基にパーフルオロアルキル基が導入され、その数に応じて、フルオラス LC カラムにより強く保持された。本法をヒト血漿試料分析に適用したところ、マトリックス効果を受けることなく、ポリアミンが定量された。

2-2. フルオラス相互作用を利用した血中アミノ酸の精製とタンデムマス分析

フルオラス誘導体化法を利用し、LC 分離を用いない迅速な血中アミノ酸のタンデムマス分析を試みた。本法は、アミノ酸をフルオラス体へと誘導体化した後、その誘導体を F-SPE により選択的に抽出し、直接タンデムマス分析する方法である。本法では、固相抽出を行うにあたり、モノリス型の F-SPE (monolithic F-SPE) スピンカラムを開発し、固相抽出が簡便化・効率化した。アミノ酸のフルオラス誘導体は、monolithic F-SPE にて効率的に抽出され、LC 分離を介さずとも MS 分析が可能であった。本法は、健常人血漿試料、病態モデル [メイプルシロップ尿症 (MSUD) 及びフェニルケトン尿症 (PKU)] マウスの血漿試料に適用できた。

以上、申請者の開発した前処理法は、独創的で画期的なものであり、かつ実用性が極めて高く、学会発表や学術論文でも高い評価を得ている。更に、公聴会における発表及び質疑応答も適切なものであり、申請者は、学位授与に値する能力・資質を有するものと評価できる。