

生体成分の高選択・高感度分子内エキシマー 蛍光誘導体化法の開発と医療分析への展開

Highly selective and sensitive derivatization method for biogenic substances, based on intramolecular excimer-forming fluorescence and its application to medical analysis

福岡大学薬学部 教授 山口 政俊

MASATOSHI YAMAGUCHI (Professor)

教授 能田 均

HITOSHI NOHTA (Professor)

助教 吉田 秀幸

HIDEYUKI YOSHIDA (Assistant Professor)

助教 轟木堅一郎

KENICHIRO TODOROKI (Assistant Professor)

Faculty of Pharmaceutical Sciences, Fukuoka University

1. はじめに

医療の発展には、生体試料や医薬品中の様々な成分の効果的な分析法の開発が欠かせない。しかし、それら生体関連物質の多くは、生体試料という複雑なマトリックス中に極微量で存在しているため、それら生体関連物質の分析には高感度かつ高選択性が要求される。

高速液体クロマトグラフィー (HPLC) は、近年、医療、環境、食品などの多くの分野で最も広く適用されている分離分析法の一つである。HPLC用の検出方法は、測定対象物質の物理的・化学的性質を検知することに基づいており、吸光度、電気化学、質量分析、蛍光、化学発光などの検出器が用いられている。しかしながら、目的成分がこれら検出法に対して、必ずしも強い応答を示すとは限らず、全く応答を示さないこともある。この場合、誘導体化が必要である。誘導体化の大きな目的の一つは、検出器に対し目的物質が十分な応答を示さないときに、化学反応などにより検出器に強い応答を示す物質へ変換することである。使用される試薬は誘導体化(ラベル化、標識)試薬と呼ばれ、それぞれの検出器に対応する誘導体化法・誘導体化試薬が開発されている。その中で、蛍光誘導体化法は、感度、選択性の点で優れているため、生体成分分析に汎用され、そのために必要な試薬類¹⁻⁴⁾も国内外の様々なメーカーから市販されている。

蛍光誘導体化試薬の多くは、目的物質を標識するための反応部位と発蛍光に関与する蛍光部位(発蛍光団)から構成されており、様々な蛍光試薬が開発されている。これらの蛍光性試薬を用いて実試料中の微量成分を分

析する場合、多種多量に存在する共存物質や誘導体化反応の際に過剰に加えられた蛍光性試薬が、目的物質の選択的分析を妨げる。それらの問題点を解決するために、前処理法や分離手法の改善が行われている。また、無蛍光性の試薬を用いる発蛍光誘導体化法の開発や特殊な蛍光現象(蛍光偏光、時間分解蛍光、蛍光共鳴エネルギー移動など)を導入した誘導体化法の開発⁵⁻⁷⁾も試みられている。本稿では、特殊蛍光現象の一つであるエキシマー蛍光を誘導体化分析法に導入することに基づく「分子内エキシマー蛍光誘導体化法」の原理および同誘導体化法による生体関連物質(内因性生理活性成分、医薬品、環境ホルモンなど)の測定法の開発と医療分析への展開について述べる。

2. エキシマー蛍光誘導体化

2.1 エキシマー蛍光

ピレンやアントラセンのような蛍光寿命の比較的長い芳香族蛍光分子が互いに近接して存在するとき、基底状態では安定な二量体を作らないが、一つの分子が励起光を吸収して励起状態となると、他の基底状態の分子と会合して励起二量体(excited-state dimer、エキシマー)を形成する。このエキシマーからの発光現象をエキシマー蛍光という(図1)。エキシマー蛍光は2個の蛍光分子間から生じる分子間エキシマー蛍光(図1A)と同一分子内に存在する2か所の蛍光団の間で生じる分子内エキシマー蛍光(図1B)が知られており、前者が高濃度(一般に1 mM以上)溶液中でしか観測されないのに対し、後者は

低濃度条件においても観測される。代表的なエキシマー蛍光発現化合物であるピレンの場合、励起光345 nmを照射すると、モノマーからの通常蛍光は375 nm付近に蛍光極大があるが、エキシマー蛍光の極大波長は475 nm付近へ長波長シフトする。このように、エキシマー蛍光はストークスシフトが大きいという、蛍光分析をするうえで優れた蛍光特性を有している。

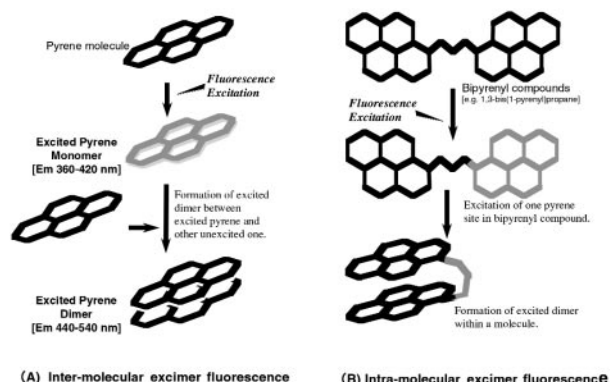


図1 エキシマー蛍光現象
(A) 分子間エキシマー蛍光 (B) 分子内エキシマー蛍光

2.2 ピレン蛍光の分析学的利用

前項で述べたように、エキシマー蛍光はストークスシフトが大きいという特性を有している。エキシマー蛍光は、比較的古くから知られている物理化学的現象であるが、その分析学的な利用は近年になってからのことである。エキシマー蛍光の分析学的な利用として、これまでに、タンパク質間相互作用の解析^{8,9)}や遷移金属イオンの検出¹⁰⁾、核酸のハイブリダイゼーションへの適用¹¹⁾や三重らせん構造発現の確認¹²⁾などが報告されている。また、膜の溶解の状態を調べるために、ピレン標識された脂肪酸やリン脂質が用いられ、そのエキシマー蛍光が観測されている^{13,14)}。しかしながら、これらの手法はいずれもエキシマー蛍光とモノマー蛍光の比を測定するレシオメトリックなものである。

一方、HPLCあるいはキャピラリー電気泳動を分離手段とする様々な化合物の誘導体化分析法が開発され、その誘導体化試薬として多くのピレン試薬 (図2) が利用されている¹⁵⁻¹⁷⁾。しかしながら、それらはいずれもピレンモノマー蛍光を検出するものであり、エキシマー蛍光を検出に利用した誘導体化分析法は、皆無である。

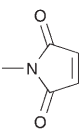
Pyrene reagents			
R	Abbreviation	Analytes	
$-(CH_2)_3CO-Cl$	PBC	Phenol, amine	
$-(CH_2)_3CO-O-N$	PBH	Amine	
$-(CH_2)_3CO-NHNH_2$	PBH	Carboxylic acid	
$-(CH_2)_4NH_2$	PBA	Carboxylic acid	
$-CH_2NH-COCH_2I$	PIAA	Thiol	
$-NH-COCH_2I$	PMIAA	Thiol	
	NPM	Thiol	

図2 ピレン試薬

(注) PBC: 4-(1-Pyrene)butanoyl chloride, PBH: 4-(1-Pyrene)butanoic acid hydrazide
PBA: 4-(1-Pyrene)butylamine, PIAA: N-(1-Pyrene)iodoacetamide
PMIAA: N-(1-Pyrenemethyl)iodoacetamide, NPM: N-(1-Pyrenyl)maleimide

2.3 分子内エキシマー蛍光誘導体化法

本法は、通常の蛍光誘導体化にエキシマー蛍光現象を導入することに基づくものである。分子内に2個以上の官能基を有するポリ置換基成分では、これをピレン試薬で誘導体化することにより複数個のピレン分子が導入される (図3)。その結果、ピレン分子がエキシマーを形成し、ピレンモノマーからの蛍光より長波長側に新たな蛍光が発現する。これがエキシマー蛍光で、この蛍光を測定することにより過剰に加えた試薬やモノ置換成分の影響を抑えた状態で、選択的にポリ置換基成分を分析できる。筆者らは、これに基づく生体関連化合物の簡便、高感度かつ高選択的分析法を開発し、医療研究に実用した。次の項では、生体関連物質の持つ官能基ごとに実用例を記す。

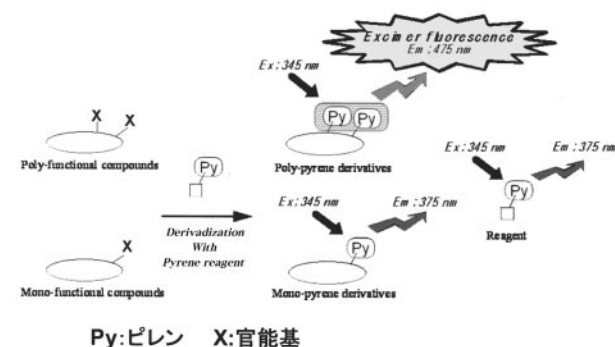


図3 エキシマー蛍光誘導体化法の原理

3. カルボン酸の分析

生体には多くのカルボン酸が存在しており、様々な生理的役割を担っている。その多くはモノカルボン酸(1個のカルボキシル基を有する)であるが、ポリカルボン酸(複数個のカルボキシル基を有する)も多く存在している。ポリカルボン酸の選択的な分析は極めて困難で、これまで有効な分析手段はほとんどない。筆者らは、ポリカルボン酸分析に、エキシマー蛍光誘導体化法を適用し、簡便かつ高選択的な定量法を開発した。誘導体化試薬に4-(1-Pyrene)butanoic acid hydrazide (PBH)、反応の触媒に1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド(EDC)およびピリジンを用いて(図4)^{18,19)}、以下に述べる臨床診断への適用を試みた。

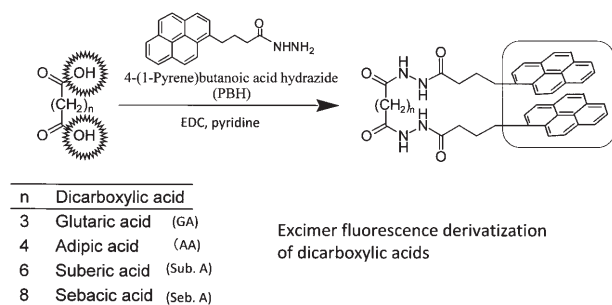


図4 ジカルボン酸類のエキシマー蛍光誘導体化

3.1 ジカルボン酸

3.1.1 グルタル酸尿(血)症診断への適用

ヒト尿中のジカルボン酸は、脂肪酸の代謝異常などの有機酸尿症発症時に増加する。従って、その測定は有機酸尿症の診断や病因の究明に利用できる。そのため、簡便なマススクリーニング法の検討および精査診断法の開発が望まれている。そこで、尿中ジカルボン酸の分析にエキシマー蛍光誘導体化法を適用し、有機酸尿症マススクリーニングのための蛍光スペクトル分析法(パッチ法)および精査診断のためのHPLC分析法を開発した。以下にグルタル酸尿症診断への適用²⁰⁾について概説する。

蛍光スペクトル分析(マススクリーニング):尿中には種々のジカルボン酸類が存在している。尿試料をEDCおよびピリジンの存在下、ピレン試薬で誘導体化(図4)し、反応液のエキシマー蛍光強度を測定することにより、添加した試薬や尿中に存在するモノカルボン酸の妨害を受けることなく、ジカルボン酸総量を迅速に概算することができた。II型

グルタル酸尿症患者および健常人の尿試料から得られた蛍光発光スペクトルを図5Aに示す。それらの尿中の総ジカルボン酸量(アジピン酸換算)は、それぞれ10.7および0.38 $\mu\text{mol/mL}$ であった。患者尿中の総ジカルボン酸量は健常人尿の数十倍に及ぶので、反応液のスペクトル分析を行うことで、有機酸尿症の簡便なマススクリーニングが可能であった。

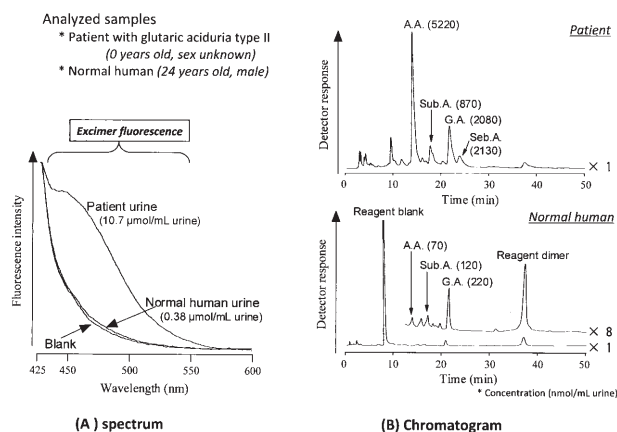


図5 健常人およびII型グルタル酸尿症患者の(A)エキシマー蛍光スペクトルおよび(B)クロマトグラム

HPLC分析(精査診断法):マススクリーニングにより有機酸尿症患者を抽出した後、その精査診断を行う必要があるため、HPLCを利用して各ジカルボン酸の分別定量を行った。先程と同一の尿試料を逆相分配系HPLCで分析したところ、グルタル酸、アジピン酸、スベリン酸およびセバシン酸が分離・検出され、いずれも nmol/mL レベルまで高感度に定量できた(図5B)。健常人およびII型グルタル酸尿症患者のいずれの場合も、HPLC分析における4種ジカルボン酸濃度の積算値と蛍光スペクトル分析で算出したジカルボン酸総量の概算値は、ほぼ同程度の値であった。これらの結果は本誘導体化法を行うことで、蛍光スペクトル分析での簡便・迅速なマススクリーニングおよびHPLC分析での精査分析が可能であり、本法が有機酸尿症の診断に極めて有効であることを示している。

一方、サウジアラビアKing Faisal専門病院・研究センターのAl-Dirbashiらは、エキシマー蛍光誘導体化の原理に基づいてグルタル酸と3-ヒドロキシグルタル酸の同時HPLC定量法を開発し、I型グルタル酸血症患者を含む多検体の乳幼児尿試料を分析した²¹⁾。5年間以上凍結保存されていた患者尿試料からも両化合物が検出・定量され、本法

がI型グルタル酸血症の遡及的診断にも利用できることが示された。

3.1.2 メチルマロン酸血症診断への適用

メチルマロン酸血症は、メチルマロン酸が体内に蓄積し、生命の危険に及ぶ重症のアシドーシスやケトーシスを起こす一種の遺伝性代謝異常症である。前出のAl-Dirbashiらはマロン酸を内標準物質とするメチルマロン酸のエキシマー蛍光誘導体化-HPLC定量法を検討し、ヒト尿中および乾燥ろ紙血に含まれる同酸の分析を行った^{22,23)}。3.2 mm四方の乾燥ろ紙血からメタノール抽出されたメチルマロン酸をエキシマー蛍光定量すると、メチルマロン酸血症患者とプロピオン酸血症患者の血中濃度には有意な差が認められた。従来のメチルマロン酸血症の診断指標であったアシルカルニチンと異なり、メチルマロン酸自体は極めて安定性が高いので、エキシマー蛍光誘導体化法は長期間保存されている試料の遡及的分析にも十分適用できるものと期待される。

最近、筆者らは誘導体化試薬に4-(1-Pyrene)butylamine (PBA)を用いる改良法を確立した^{24,25)}。この改良法により、さらに多数検体のマスクリーニングが可能になった。

3.2 他のジカルボン酸

PBHを誘導体化試薬とするエキシマー蛍光誘導体化法により、酸性アミノ酸類(グルタミン酸、アスパラギン酸およびN-メチルアスパラギン酸)の分析も可能であった²⁶⁾。この方法は、他のアミノ酸の妨害を受けない選択的定量法であり、各酸性アミノ酸の検出限界は、注入量当たり数十fmolレベルであった。

4. アミンの分析

アミンおよびアミノ酸関連化合物は生体中に数多く存在し、多様な役割を果たしている。多くの生体アミンはアミノ基を1カ所のみ有するモノアミンであるが、複数のアミノ基を有するポリアミン類もまた生体中で極めて重要な機能を担っている。しかしながら、それらポリアミン類のみを対象とした選択的な分析は極めて困難で、従来は、試料の煩雑な前処理と高い分解能を持つ分離手段が不可欠であった。そこで、ポリアミン分析に4-(1-Pyrene)butanoyl chloride(PBC)や4-(1-Pyrene)butanoic acid N-hydroxysuccinimidyl ester (PSE)を誘導体化試薬とするエキシマー蛍光法を導入し、

簡便かつ高選択的な分析手法の開発を行った²⁷⁻²⁹⁾。

4.1 ポリアミン

生体中のポリアミン(プトレシン、スペルミジンおよびスペルミン)およびその誘導体は、癌などの腫瘍診断における指標の一つとされている。生体中にはアミノ酸のようなアミノ基含有化合物が多量に存在しており、通常分析法でポリアミン化合物を選択的に検知することは極めて困難である。そこで、生体ポリアミンのエキシマー蛍光誘導体化-HPLC分析法を開発した(図6)²⁹⁾。内標準物質を添加後、

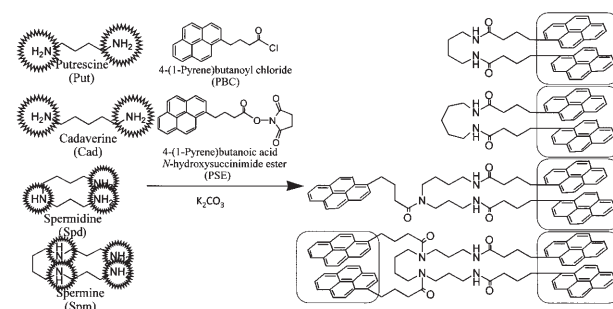


図6 ポリアミン類のエキシマー蛍光誘導体化

水で希釈した健常人尿を二分し、一方の試料はそのまま、他方の試料は塩酸で加水分解した。無処理尿および加水分解尿を用いてエキシマー蛍光誘導体化し、逆相分配HPLC分析したときのクロマトグラムを、それぞれ図7Aおよび図7Bに示す。前者は遊離ポリアミンを、後者は加水分解することで検出された総ポリアミンを示す。これらの定量値は従来報告されている値と良く一致しており、本分析法の有用性が実証された。極めて簡便な前処理操作で、pmol/mLレベルのポリアミンが高感度に検出された。

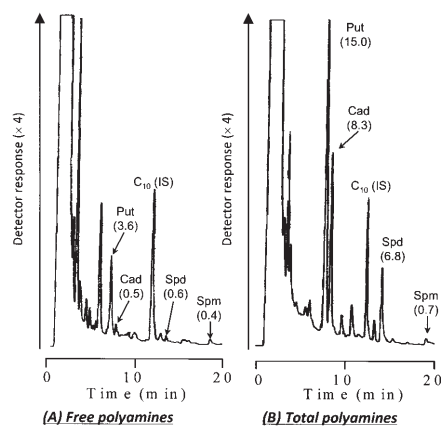


図7 尿中ポリアミン類のクロマトグラム
(A) 無処理尿(遊離ポリアミン) (B) 加水分解尿(総ポリアミン)

またエキシマー蛍光誘導体化法の有用性に着目し、キャピラリー電気泳動による分離も行われている。カナダ Alberta大学のPaproskiらは、PSEでピレン誘導体化した反応液をミセル導電クロマトグラフィーで分離した後、レーザー誘起蛍光検出することで、数nmol/L レベルのポリアミン分析を可能としている³⁰⁾。

一方、魚介類中のポリアミン類は腐敗に基づく悪臭の原因物質の一つであり、これまでの人の嗅覚に頼った簡易判定法よりも優れた定量的な分析法の開発が望まれていた。米国食品医薬品局 (FDA) のMarksらは、エキシマー蛍光誘導体化法の適用により、極めて簡便な前処理操作のみで魚介類中のプトレシンおよびカダベリンを高選択的に分析する方法を報告している³¹⁾。一連の分析手順は、ホモジナイズした数gの魚介類試料からホウ酸とトリクロ酢酸の混合液でアミン成分を抽出し、遠心分離後、PSEで誘導体化、逆相HPLCで分離、エキシマー蛍光検出するというものである。同分析法により、ツナ缶や生エビ、冷凍鮭などからppmレベルのプトレシンが検出された。

4.2 ヒスタミン

ヒスタミン (図8) は生体組織中に広く分布し、末梢における血管透過性亢進、平滑筋収縮、胃酸分泌の三大薬理作用をはじめ、アレルギー疾患、潰瘍などの発症にケミカルメディエーターとして作用している。また、最近になって哺乳類の脳にヒスタミン作動神経系が存在することが明らかになり、ヒスタミンとアルツハイマー病、ダウン症候群、ストレス、てんかんなどの病態との関わりについても報告がなされている。また、ヒスタミンとアレルギー・神経機能のメカニズムの解明や有効な治療薬 (抗ヒスタミン薬など) の開発が進められている。

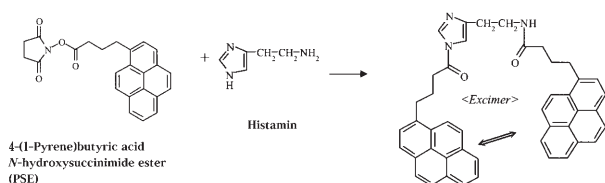


図8 ヒスタミンのエキシマー蛍光誘導体化

ヒスタミンは分子内に2個のアミノ基を有する。これに着目し、ヒスタミンのエキシマー蛍光HPLC法を開発した。エキシマー蛍光誘導体化試薬としてPSEを用いた。

ヒスタミン分子の第一および第二アミンは、PSEにより誘導体化され、強いエキシマー蛍光を発する (図8)。ヒス

タミン誘導体は、逆相分配系HPLCにより、30分以内に単一のピークとして分離・検出された。検出限界は、注入量あたり0.5 fmolと極めて高感度で、尿、血漿、組織中ヒスタミン分析に適用できた。

4.2.1 ヒト尿およびラット血漿、組織中ヒスタミンの定量

生体内のヒスタミンは、その大部分が組織の肥満細胞および血中の好塩基球に貯蔵されており、アレルギー反応や組織傷害時に放出され、心血管系をはじめ、生体に強力な生理活性を示す。ヒト尿や血漿中ヒスタミンの測定は、気管支ぜんそくや過敏症など様々な疾病の臨床診断、病態解析に有意義である。筆者らは、PSEを用いたHPLC・エキシマー蛍光検出法に基づく標記の生体試料中ヒスタミンの高感度、高選択的な分析法を開発した^{32,33)}。

ヒト尿を水で10倍希釈し、フィルター濾過という簡便な前処理のみでヒスタミンの測定が可能であった³²⁾。本法で測定した健常人 (9名) の尿中ヒスタミン値 (145.4 ± 90 nmol/day (平均値 $\pm$ S.D.)) は、従来法による測定値とほぼ同等であり、本法は尿中ヒスタミンの定量に極めて有効であった。

ラット組織 (皮膚、肺、胃、心臓および肝臓) については水による希釈および限外濾過、ラット血漿についてはアセトリル除タンパク操作のみという極めて簡便な前処理によりヒスタミンの定量が可能であった³³⁾。本法により得られたラット皮膚、肺、胃、心臓および肝臓におけるヒスタミン定量値 (平均値 $\pm$ S.D., n=9) は、それぞれ 39.0 ± 12.5 、 2.69 ± 0.69 、 10.2 ± 1.5 、 2.83 ± 0.40 および 1.22 ± 0.45 μ g/g (湿重量, n=3) であり、いずれもこれまでの報告値とよく一致する。

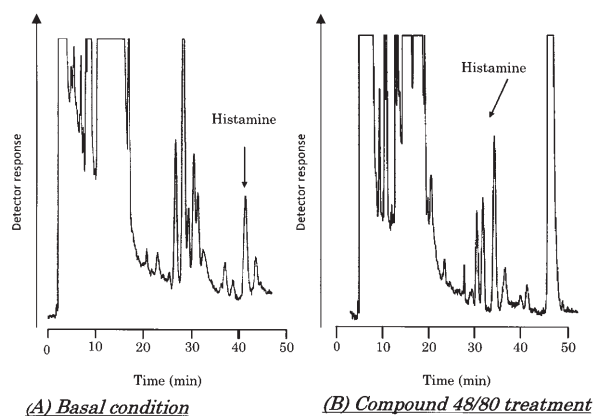


図9 ラット血漿ヒスタミンのクロマトグラム
(A) 通常血漿 (B) compound 48/80 処理 (4,850 ng/mL) 血漿

また、ラット血漿中ヒスタミン定量値 (平均値 $\pm$ S.D.) についても雄および雌でそれぞれ 38.9 ± 7.8 および 23.5 ± 15.0

ng/mL (n=4)となり、これまでの報告値とよく一致した。さらに、ヒスタミンの遊離促進因子であるcompound 48/80をラットに静脈内および皮下投与することで血漿中ヒスタミンが顕著に増加することを確認した(図9)。

4.2.2 ラット脳内微小透析液中ヒスタミンの定量

前述のように、医療分析の一つに臨床化学分析がある。これは、健常あるいは病態時において、ある一時刻で尿あるいは血液を採取し、その中の生体成分を測定し、その質的・量的差異を求めることに基づき、疾病の診断を行うものである。従って、このような臨床化学分析は、インビトロ静的分析と言える。しかし、医療分析、特に生体機能を解析するとき、刻々と変化する生体機能を生きたままで経時的に分析(インビボ動的分析)することは極めて重要である。

近年の高ストレス化、高齢化などの社会現象に伴い、うつ病、パーキンソン病、アルツハイマー病などの精神および神経疾患が深刻な問題となっている。これらの疾患には、セロトニンやカテコールアミンの他にヒスタミンが深く関与している。これらの神経生理活性アミン類を生合成するニューロン(神経細胞)は脳内に特定の極在を持ち、脳の各部位での多様な神経生理作用は上記の種々の精神および神経疾患と密接に関係している。従って、脳機能や精神・神経疾患研究には、脳内限局部位における神経伝達アミン類の分子レベルでのインビボモニタリング(動態)解析が必須である。

現在、脳内の神経伝達物質、神経修飾物質およびその代謝物のインビボモニタリングに、高感度な分析法と組み合わせた微小透析法(図10)が広く利用されている。

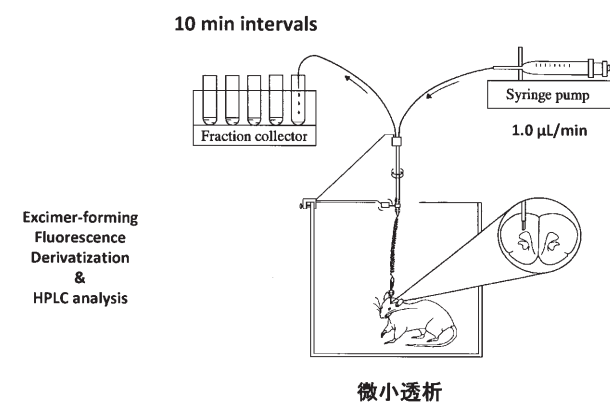


図10 微小透析法

すなわち、実験動物脳の限局部位から微小透析法で採取した神経伝達アミン類をHPLCにより分離・高感度検出することに基づく方法である。しかし、微小透析法で採

取された透析液が極めて微量(μL レベル)であるため、前・後処理が不可能である。さらに、透析液中の神経伝達アミン類は超微量(pg レベル)である。従って、インビボ動的分析を可能にするためには、採取した試料を直接誘導体化でき、さらに検出は超高感度、かつ特異的蛍光誘導体化が可能であることが要求される。カテコールアミンおよびセロトニンについては、筆者らが開発した分子認識蛍光試薬により、これらのインビボ動的分析に成功し³⁴⁾、重要な脳機能や神経薬理に関する新知見を見出している³⁵⁾。ヒスタミンについては、エキシマー蛍光誘導体化法が極めて有効で、これを利用し次の脳内ヒスタミンのインビボ測定法を開発し、脳機能研究に展開した³⁶⁾。前述のヒスタミンのHPLCエキシマー蛍光検出法をmicrobore HPLCに適応するよう改良し、ラット脳の視床下部、前頭葉、海馬および線条体における微小透析液中のヒスタミン測定を行った(図11)。その結果、ヒスタミンは30分以内に単一のピークとして分離・検出され、検出限界は、注入量あたり0.3 fmolと極めて高感度であった。

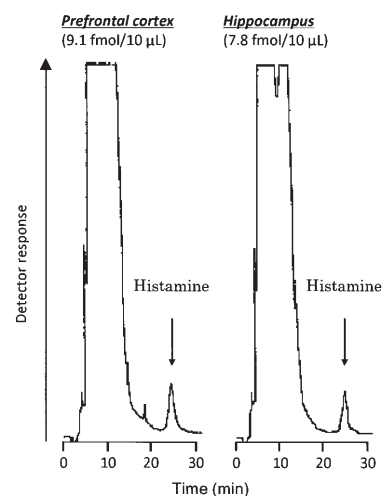


図11 ラット脳微小透析液のクロマトグラム

本定量操作による無処置ラットの10分毎の微小透析サンプル($10 \mu\text{L}$)中ヒスタミン定量値の平均値 $\pm$ S.D. (n=10)は、視床下部、前頭葉、海馬および線条体でそれぞれ 35.45 ± 4.56 , 9.05 ± 1.56 , 7.83 ± 0.86 および 6.54 ± 0.66 fmolであった(図11)。また、高カリウム灌流液による脳内ヒスタミンの増加、無カルシウム灌流液およびテトロドトキシンによる脳内ヒスタミンの減少を観測できたほか、強制水泳におけるストレス負荷により、ラット脳の各部位におけるヒスタミン量が有意に増加することも確認できた(図12)。

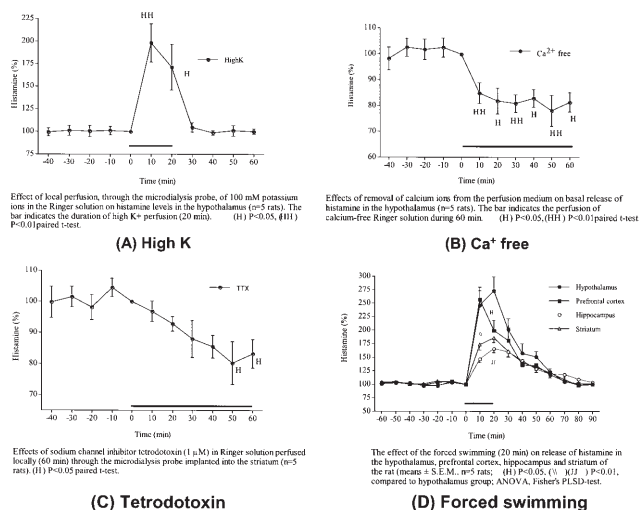


図12 各種処理によるラット脳ヒスタミン量の影響

(A)高カリウム灌流液、(B)無カルシウム灌流液、(C)テトロドトキシン、(D)強制水泳におけるストレス負荷

脳内ヒスタミンの効果的なインビボ動的分析法が無かったため、脳内ヒスタミンとストレスとの関連を解明する研究は、かなり遅れている。本研究により、セロトニンやカテコールアミンと同様に、ストレスによりヒスタミン量は大きく変化することが分かった。これは、ストレスによる新しい神経メカニズム(例えば、ヒスタミン神経系)の存在を示唆するものである。この事実、今後、この新規なメカニズムに基づく抗不安薬や抗うつ薬の開発に寄与すると思われる。

4.3 他のポリアミン

PSEを用いるエキシマー蛍光誘導体化法を塩基性アミノ酸の測定に適用した。シスチン尿症や高リジン血症患者において尿(血)中濃度が高値を示すオルニチンおよびリジンの同時分析³⁷⁾を行い、いずれもヒト尿1μL中に存在するそれら化合物を選択的に定量できた。同様の方法を、ヒスチジンおよびヒスタミンの同時分析にも適用した³⁸⁾。

さらに同誘導体化法の医薬品分析への適用について検討し、一級あるいは二級アミノ基を複数有するトリエンチン³⁸⁾やエタンブトール³⁹⁾の高感度・高選択的分析法の確立にも成功した。これらの定量法により、薬物投与時の血中濃度モニタリングも可能であった。

4.4 生理活性アミン類

4-(1-Pyrene) butanoyl chloride (PBC)は、アミノ基だけでなくフェノール性水酸基とも反応する。つまり、同試薬を用いることで、分子内にアミノ基およびフェノール性水酸基を有する生理活性アミン類(5-ヒドロキシインドールアミン類、カテコールアミン類やその代謝物など)も、エキシマー蛍光誘導体化分析を行うことができる^{40,41)}。

5. フェノールの分析

フェノール化合物は、環境や食品中に数多く存在している。その多くはモノフェノールであるが、現在ではポリフェノール化合物の様々な機能が注目されている。そこでポリフェノール分析にPBCを用いるエキシマー蛍光誘導体化法を導入し、簡便かつ高選択的な分析法を検討した^{42,43)}。

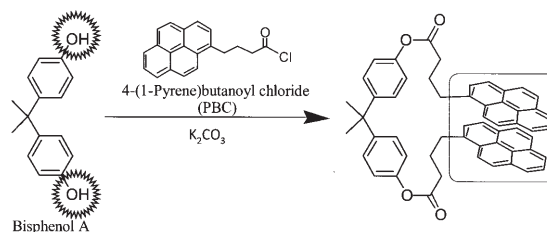


図13 ビスフェノールAのエキシマー蛍光誘導体化

5.1 ビスフェノールA

外因性内分泌攪乱化学物質(環境ホルモン)の疑いが指摘されているビスフェノールAは、ポリカーボネート樹脂やエポキシ樹脂の原料として用いられている。そのため、各種樹脂製品からのビスフェノールAの溶出が大きな社会問題となっており、特に乳幼児に対する影響が懸念されている。そこで、エキシマー蛍光誘導体化HPLCによるビスフェノールA測定法(図13)を開発し、ほ乳びん溶出液中のビスフェノールA定量を行った(図14)⁴⁴⁾。ほ乳びん溶出液(100 mL)を塩酸でpH 3に調整した後、内標準物質を加え、フェノール成分を逆相系カートリッジで固相抽出し、誘導体化-HPLCで分析したところ、未使用未洗浄のポリカーボネート製ほ乳びんから極微量(ppbレベル)のビスフェノールAの溶出が確認された(図14A)。一方、同様の操作を行ったガラス製ほ乳びんからはビスフェノールAの溶出は全く見られなかった(図14B)。

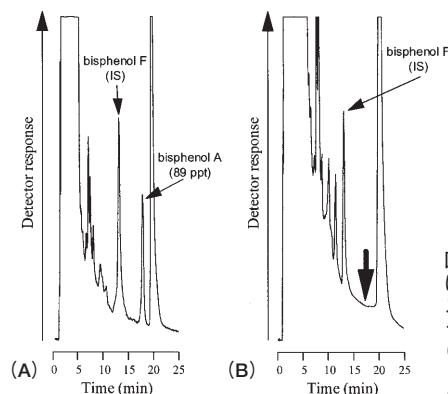


図14
ほ乳びん溶出液中のビスフェノールAのクロマトグラム
(A)ポリカーボネート製ほ乳びん
(B)ガラス製ほ乳びん

5.2 他のポリフェノール

テトラプロモビスフェノールAは、日本国内で最も多量に使用されている臭素系難燃剤成分である。近年では、ヒト血液の中から検出され、話題になっている⁴²⁾。テトラプロモビスフェノールAなどのハロゲン化ビスフェノール化合物についても、同様にエキシマー蛍光HPLC法による分析法を確立した^{45,46)}。

6. プレカラム誘導体化法

生体内に存在するチオール化合物として、グルタチオンやホモシステイン(生体内酸化・還元反応に関与)、オキシトシンやバズプレッシン(システイン含有生理活性ペプチド)、リポ酸関連化合物(補酵素として機能)などが知られている。エキシマー蛍光誘導体化によるポリチオール化合物の高選択的測定法開発を行った。N-(1-Pyrenemethyl) iodoacetamide (PMIAA) やN-(1-Pyrene) iodoacetamide (PIAA) を用いるプレカラム誘導体化法⁴⁷⁾およびN-(1-Pyrenyl) maleimide (NPM) を用いるポストカラム誘導体化法⁴⁸⁾を開発した。

6.1 プレカラム誘導体化法

ジチオスレイトールおよびジメルカプロールをジチオール化合物のモデル化合物として、誘導体化反応やHPLC条件を最適化した。PIAAを用いる反応系で、fmolレベルの検出限界を達成した。この反応系に、トリブチルホスフィンによる還元反応を組み込むことで、システイン含有ペプチドや特定保健用食品であるリポ酸の高感度・高選択的測定が可能となった。図15に、リポ酸含有のサプリメントを服用した前後におけるヒト血漿中リポ酸の分析をしたクロマトグラムを示す。サプリメント服用30分後に、ヒト血中のリポ酸レベルは服用前の約5倍となった。本法は極めて高感度で、ヒト血漿あるいは尿10 μ L中のリポ酸レベルを測定することが可能である。

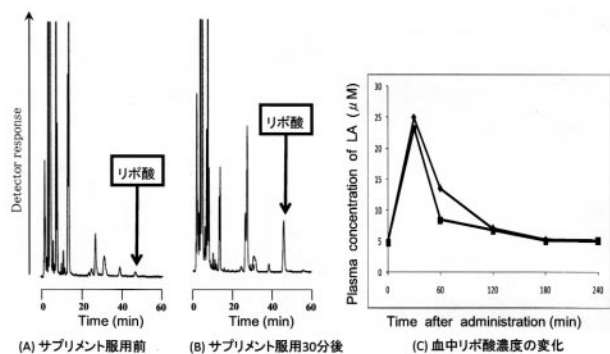


図15 プレカラム誘導体化法による血中リポ酸のクロマトグラムおよびその濃度変化

6.2 ポストカラム誘導体化法

前述のプレカラム誘導体化法は、ジチオール化合物の超高感度分析が可能であるが、酸化型および還元型チオール化合物の分別定量には適さない。そこで、オンライン還元・ポストカラム誘導体化・エキシマー蛍光検出法を開発し、酸化型・還元型チオール化合物の同時分析を可能とした。その原理は、逆相分配系分析カラムでチオール化合物(酸化型・還元型)を分離した後、還元カラムで酸化型チオールを還元する。その後、還元された酸化型チオールと元々の還元型チオールをNPMでエキシマー蛍光誘導体化分析する、というものである。本システムを用いることで、前述のサプリメントを服用したときの血中リポ酸(酸化型・還元型)を同時に定量することが可能となった(図16)。

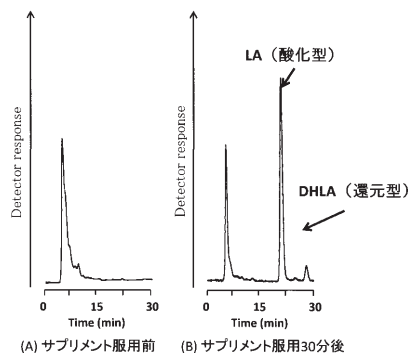


図16
ポストカラム誘導体化法による血中リポ酸(酸化型および還元型)のクロマトグラム

7. まとめおよび展望

分子内エキシマー蛍光誘導体化法は、同一分子内に同一官能基を複数個有する生体関連物質の高選択・高感度測定に極めて有効で、特に医療分野において高い実用性を有することを示した。現在、同一分子内に異なる官能基を持つ生体関連物質に適用している。例えば、アミノ基とチオール基、アミノ基とフェノール性水酸基を有するペプチドやタンパク質の選択的分析で、これをプロテオームへと展開中である。分子内エキシマー蛍光誘導体化法の有効性をさらに拡大することにより、医療分野への展開が大きいと期待される。

引用文献

- 1) M. Yamaguchi, J. Ishida: "Modern derivatization methods for separation sciences", Edited by T. Toyooka, p. 99 (1999), (John Wiley and Sons Ltd, New York).

- 2) 山口政俊:「最新の分離・精製・検出法-原理から応用まで-」ラベル化試薬, p.160, エヌ・ティー・エス(1997).
- 3) 山口政俊ほか、ぶんせき, **3**, 204 (1999).
- 4) 山口政俊:「環境測定のための最新分析技術」HPLCにおける誘導体化法, p.276, シーエムシー出版(1997).
- 5) 阿部一智, 石田淳一, 中村優, 山口政俊: 分析化学, **44**, 555 (2005).
- 6) K. Matsumoto, Y. Tsukahara, T. Umehara, K. Tsunoda, H. Kume, S. Kawasaki, J. Tadano, T. Matsuya: *J. Chromatogr. B*, **773**, 135 (2002).
- 7) M. Yoshitake, H. Nohta, H. Yoshida, T. Yoshitake, K. Todoroki, M. Yamaguchi: *Anal. Chem.*, **78**, 920 (2006).
- 8) S. L. Betcher-Lange, S. S. Lehrer: *J. Biol. Chem.*, **253**, 3757 (1978).
- 9) Y. Ishii, S. S. Lehrer: *Biochemistry*, **26**, 4922 (1987).
- 10) B. Bodenant, F. Fages: *Tetrahedron Lett.*, **36**, 1451 (1995).
- 11) K. Ebata, M. Masuko, H. Ohtani, M. Kashiwasake-Jibu: *Photochem. Photobiol.*, **62**, 836 (1995).
- 12) S. Mohammadi, A. Slama-Schwok, G. Leger, D. E. Monouni, A. Shchyolkina, Y. Leroux, E. Taillandier: *Biochemistry*, **36**, 14836 (1997).
- 13) D. E. Yarger, C. B. Patrick, S. I. Rapoport, E. J. Murphy: *J. Neurosci. Methods*, **100**, 127 (2000).
- 14) P. Somerharju: *Chem. Phys. Lipids*, **116**, 57 (2002).
- 15) N. Nimura, T. Kinoshita, T. Yoshida, A. Uetake, C. Nakai: *Anal. Chem.*, **60**, 2067 (1988).
- 16) F.-T. A. Chen, R. A. Evangelista: *Anal. Biochem.*, **230**, 273 (1995).
- 17) L. A. Lidnour, R. A. Ercal, N. Ercal, D. R. Spitz: *Method. Enzymol.*, **299**, 258 (1999).
- 18) 能田均, 里園浩, 園田純一郎, 吉田秀幸, 山口政俊: 日本特許公開公報, 平11-281578 (1999.10.15).
- 19) H. Nohta, J. Sonoda, H. Yoshida, H. Satozono, J. Ishida, M. Yamaguchi: *J. Chromatogr. A*, **1010**, 37 (2003).
- 20) H. Yoshida, J. Araki, J. Sonoda, H. Nohta, J. Ishida, S. Hirose, M. Yamaguchi: *Anal. Chim. Acta*, **534**, 177 (2005).
- 21) O. Y. Al-Dirbashi, M. Jacob, Z. Al-Hassnan, F. El-Badaoui, M. S. Rashed: *Clin. Chem.*, **51**, 235 (2005).
- 22) O. Y. Al-Dirbashi, M. Jacob, M. Al-Amoudi, K. Al-Kahtani, A. Al-Odaib, F. El-Badaoui, M. S. Rashed: *Clin. Chim. Acta*, **359**, 179 (2005).
- 23) O. Y. Al-Dirbashi, M. Jacob, Z. Al-Hassnan, R. W. Chabayta, F. El-Badaoui, M. S. Rashed: *Biomed. Chromatogr.*, **20**, 54 (2006).
- 24) 古賀雅子, 興津暁央, 山口政俊, 能田均, 吉田秀幸, 轟木堅一郎: 第68回分析化学討論会講演要旨集, **188** (2007).
- 25) 古賀雅子, 興津暁央, 吉田秀幸, 轟木堅一郎, 能田均, 山口政俊: 日本マス・スクリーニング学会誌, **17**, 67 (2007).
- 26) 吉田秀幸, 堀田佳代子, 轟木堅一郎, 能田均, 山口政俊: 分析化学, **52**, 1113 (2003).
- 27) 里園浩, 能田均: 日本特許公開公報, 平10-142228 (1998.5.29).
- 28) H. Nohta, H. Satozono, K. Koiso, H. Yoshida, J. Ishida, M. Yamaguchi: *Anal. Chem.*, **72**, 4199 (2000).
- 29) H. Yoshida, H. Harada, Y. Nakano, H. Nohta, J. Ishida, M. Yamaguchi: *Biomed. Chromatogr.*, **18**, 687 (2004).
- 30) R. E. Paproski, K. I. Roy, C. A. Lucy: *J. Chromatogr. A*, **946**, 265 (2002).
- 31) H. S. Marks (Rupp), C. R. Anderson: *J. Chromatogr. A*, **1094**, 60 (2005).
- 32) T. Yoshitake, F. Ichinose, H. Yoshida, K. Todoroki, J. Kehr, O. Inoue, H. Nohta, M. Yamaguchi: *Biomed. Chromatogr.*, **17**, 509 (2003).
- 33) 一瀬文雄, 吉武尚, 吉田秀幸, 能田均, 山口政俊: 第17回バイオメディカル分析科学シンポジウム講演要旨集, 15 (2004).
- 34) T. Yoshitake, J. Kehr, K. Todoroki, H. Nohta, M. Yamaguchi: *Biomed. Chromatogr.*, **20**, 267 (2006).
- 35) Y. Yoshitake, F.-H. Wang, E. Kuteeva, K. Holmberg, M. Yana, J.N. Grawley, R. Steiner, T. Batfai, S.O. Ogren, T. Hokfelt, J. Kehr: *PNAS*, **101**, 354, (2004).
- 36) T. Yoshitake, M. Yamaguchi, H. Nohta, F. Ichinose, H. Yoshida, S. Yoshitake, K. Fuxe, J. Kehr: *J. Neurosci. Methods*, **127**, 11 (2003).
- 37) H. Yoshida, Y. Nakano, K. Koiso, H. Nohta, J. Ishida, M. Yamaguchi: *Anal. Sci.*, **17**, 107 (2001).
- 38) H. Yoshida, F. Kido, M. Yoshitake, M. Yoshitake, K. Todoroki, H. Nohta, M. Yamaguchi: *Anal. Sci.*, **23**, 485 (2007).
- 39) Y. Nakano, H. Nohta, H. Yoshida, T. Saita, H. Fujito, M. Mori, M. Yamaguchi: *J. Chromatogr. B*, **774**, 165 (2002).
- 40) Y. Nakano, H. Nohta, H. Yoshida, T. Saita, H. Fujito, M. Mori, M. Yamaguchi: *Anal. Sci.*, **20**, 489 (2004).
- 41) H. Yoshida, H. Nohta, Y. Harada, M. Yoshitake, K. Todoroki, M. Yamaguchi: *J. Chromatogr. B*, **821**, 88 (2005).
- 42) 能田均, 吉田秀幸, 山口政俊: 日本特許公開公報, 2001-165859 (2001.6.22).
- 43) H. Yoshida, H. Harada, H. Nohta, M. Yamaguchi: *Anal. Chim. Acta*, **488**, 211 (2003).
- 44) C. Thomsen, K. Janak, E. Lundanes, G. Becher: *J. Chromatogr. B*, **750**, 1 (2001).
- 45) H. Yoshida, S. Tsunetomo, T. Hayama, K. Todoroki, H. Nohta, H. Kuroki, M. Yamaguchi: *Organoharogen Compd.*, **66**, 305 (2004).
- 46) 常友盛勝, 吉田秀幸, 轟木堅一郎, 巴山忠, 能田均, 黒木広明, 山口政俊: 分析化学, **53**, 1501 (2004).
- 47) H. Yoshida, T. Inoue, H. Umemura, M. Sudo, K. Todoroki, H. Nohta, M. Yamaguchi: *Abstract of The 33rd International Symposium on High Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques*, Unknown (2008).
- 48) 井上高志, 梅村弘毅, 首藤麻希, 吉田秀幸, 轟木堅一郎, 能田均, 山口政俊: 日本分析化学会第57年会講演要旨集, **360** (2008).