

三次元キラルHPLCを用いるリシンおよび代謝物のヒト血漿・尿中における含量解析

Three-dimensional chiral HPLC analysis of lysine and its metabolites in human plasma and urine

○松尾 あかり¹、古賀 鈴依子¹、三田 真史²、井手 友美³、吉田 秀幸¹、能田 均¹、浜瀬 健司⁴
○Akari Matsuo¹, Reiko Koga¹, Masashi Mita², Tomomi Ide³, Hideyuki Yoshida¹, Hitoshi Nohta¹, Kenji Hamase⁴

1. 福岡大薬、2. KAGAMI、3. 九大院医、4. 九大院薬

1. Fac. Pharm. Sci., Fukuoka Univ., 2. KAGAMI, Inc., 3. Grad. Sch. Med. Sci., Kyushu Univ., 4. Grad. Sch. Pharm. Sci., Kyushu Univ.

【目的】近年、哺乳類におけるD-アミノ酸の存在が明らかとなったことにより、アミノ酸の鏡像異性体を区別した新規生理活性物質やバイオマーカーの探索が進められている。リシン（Lys）はタンパク質構成アミノ酸の一種であり、生体内でピペコリン酸経路によってピペコリン酸（PA）へ、サッカロピン酸経路によって2-アミノアジピン酸（2-AAA）へと代謝される。Lysおよびこれらの代謝物は骨疾患や神経疾患などの様々な疾患に関与することが報告されているが、D-アミノ酸の生体内含量が極めて低いこと、多種多様な生体成分により分析が妨害されやすいことなどを理由として、これまで鏡像異性体を区別した生体内含量解析はほとんど行われてこなかった。本研究では、高選択的な分析が可能な三次元キラルHPLC法を用いてヒト血漿・尿試料におけるLysおよび代謝物であるPA、2-AAAのキラル識別含量解析を行い、性差や食事に伴う日内の含量変化の有無などについて検討した。

【実験】アミノ酸標品水溶液にホウ酸塩緩衝液（pH 8.0）および4-Fluoro-7-nitro-2,1,3-benzoxadiazole（NBD-F）のアセトニトリル溶液を加えて60°Cで2分間加熱し、蛍光誘導体化を行った。血漿試料はメタノールにより除タンパクして得た上清を減圧乾固した後に水で再溶解したものを、尿試料は水で希釈したものを誘導体化に用いた。希トリフルオロ酢酸水溶液を加えて反応を停止させ、反応液の一部を三次元HPLCに注入した。NBD誘導体化アミノ酸の検出は、励起波長470 nmにおける530 nmの蛍光発光により行った。

【結果】本分析法では、一次元目の逆相分配においてNBD誘導体化Lys、PAおよび2-AAAを他の生体成分より分離・分取して二次元目の陰イオン交換カラムへと導入する。更に二次元目において再び夾雑成分から対象アミノ酸のピークを分離し、分取した各アミノ酸画分を三次元目の光学分割カラムに導入することでD体とL体の分離・検出を行う。一次元目にSingularity RP18カラム（1.0 mm i.d.×250 mm）を、二次元目にSingularity AXカラム（1.5 mm i.d.×250 mm）を、三次元目にSingularity CSP-001Sカラム（1.5 mm i.d.×250 mm）を用いて三次元HPLCシステムを構築した。標品アミノ酸を分析した結果、三次元目においてLys、PA、2-AAA鏡像異性体のベースライン分離が得られ、分離度はそれぞれ2.52、2.63、3.02であった。本分析法をヒト血漿および尿試料へ適用した結果、いずれの生体試料においても夾雑成分の影響を受けることなく良好な分析が可能であった。血漿中にはD/L-Lys、D/L-PAおよびL-2-AAAが存在し、LysおよびPAの%D値はそれぞれ0.035%、17%であった。一方、尿中には対象アミノ酸の鏡像異性体が全て存在し、Lys、PAおよび2-AAAの%D値はそれぞれ6.5%、68%、1.5%といずれも血漿試料と比較して高い値を示した。また、食事に伴う尿中の含量変化を検討した結果、LysおよびPAについては%D値がほとんど変化しなかったのに対し、2-AAAは食後に%D値の減少が認められた。これらの結果は、Lysおよび代謝物の鏡像異性体を区別した生理機能や由来の解明、バイオマーカーの探索へ貢献する知見となることが期待され、現在更なる臨床検体を用いた検討を進めている。

Three-dimensional chiral HPLC analysis of lysine and its metabolites in human plasma and urine

○Akari Matsuo¹, Reiko Koga¹, Masashi Mita², Tomomi Ide³, Hideyuki Yoshida¹, Hitoshi Nohta¹, Kenji Hamase⁴

1. Fac. Pharm. Sci., Fukuoka Univ., 2. KAGAMI, Inc., 3. Grad. Sch. Med. Sci., Kyushu Univ., 4. Grad. Sch. Pharm. Sci., Kyushu Univ.

【目的】近年、哺乳類におけるD-アミノ酸の存在が明らかとなったことにより、アミノ酸の鏡像異性体を区別した新規生理活性物質やバイオマーカーの探索が進められている。リシン (Lys) はタンパク質構成アミノ酸の一種であり、生体内でピペコリン酸経路によってピペコリン酸 (PA) へ、サッカロピン酸経路によって2-アミノアジピン酸 (2-AAA) へと代謝される。Lysおよびこれらの代謝物は骨疾患や神経疾患などの様々な疾患に関与することが報告されているが、D-アミノ酸の生体内含量が極めて低いこと、多種多様な生体成分により分析が妨害されやすいことなどを理由として、これまで鏡像異性体を区別した生体内含量解析はほとんど行われてこなかった。本研究では、高選択的な分析が可能な三次元キラルHPLC法を用いてヒト血漿・尿試料におけるLysおよび代謝物であるPA、2-AAAのキラル識別含量解析を行い、性差や食事に伴う日内の含量変化の有無などについて検討した。

【実験】アミノ酸標品水溶液にホウ酸塩緩衝液 (pH 8.0) および4-Fluoro-7-nitro-2,1,3-benzoxadiazole (NBD-F) のアセトニトリル溶液を加えて60°Cで2分間加熱し、蛍光誘導体化を行った。血漿試料はメタノールにより除タンパクして得た上清を減圧乾固した後に水で再溶解したものを、尿試料は水で希釈したものを誘導体化に用いた。希トリフルオロ酢酸水溶液を加えて反応を停止させ、反応液の一部を三次元HPLCに注入した。NBD誘導体化アミノ酸の検出は、励起波長470 nmにおける530 nmの蛍光発光により行った。

【結果】本分析法では、一次元目の逆相分配においてNBD誘導体化Lys、PAおよび2-AAAを他の生体成分より分離・分取して二次元目の陰イオン交換カラムへと導入する。更に二次元目において再び夾雑成分から対象アミノ酸のピークを分離し、分取した各アミノ酸画分を三次元目の光学分割カラムに導入することでD体とL体の分離・検出を行う。一次元目にSingularity RP18カラム (1.0 mm i.d.×250 mm) を、二次元目にSingularity AXカラム (1.5 mm i.d.×250 mm) を、三次元目にSingularity CSP-001Sカラム (1.5 mm i.d.×250 mm) を用いて三次元HPLCシステムを構築した。標品アミノ酸を分析した結果、三次元目においてLys、PA、2-AAA鏡像異性体のベースライン分離が得られ、分離度はそれぞれ2.52、2.63、3.02であった。本分析法をヒト血漿および尿試料へ適用した結果、いずれの生体試料においても夾雑成分の影響を受けることなく良好な分析が可能であった。血漿中にはD/L-Lys、D/L-PAおよびL-2-AAAが存在し、LysおよびPAの%D値はそれぞれ0.035%、17%であった。一方、尿中には対象アミノ酸の鏡像異性体が全て存在し、Lys、PAおよび2-AAAの%D値はそれぞれ6.5%、68%、1.5%といずれも血漿試料と比較して高い値を示した。また、食事に伴う尿中の含量変化を検討した結果、LysおよびPAについては%D値がほとんど変化しなかったのに対し、2-AAAは食後に%D値の減少が認められた。これらの結果は、Lysおよび代謝物の鏡像異性体を区別した生理機能や由来の解明、バイオマーカーの探索へ貢献する知見となることが期待され、現在更なる臨床検体を用いた検討を進めている。