

令和 2 年 6 月 9 日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08462

研究課題名(和文) 精神疾患患者における脳内活性アミノ酸類の血中濃度測定

研究課題名(英文) Blood concentration measurement of amino acids levels in brain of psychiatric patients.

研究代表者

関根 正恵 (SEKINE, MASAE)

北里大学・薬学部・助教

研究者番号：60226652

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：タンパク質を構成しているのは20種類のアミノ酸であり、あらゆる生体活動に重要な役割を担っている。血液中のアミノ酸濃度は恒常性が維持されているが、最近、特定の疾患に罹患した場合、血液や尿におけるD,L-アミノ酸濃度のバランスが崩れていることがいくつか報告されている。そこで、健康者および統合失調症患者血液中のD,L-アミノ酸についてHPLCを用いて定量を行った。定量を行ったアミノ酸のうちD,L-セリンおよびD,L-アラニンについて臨床症状との関連について解析を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヒト体内に存在するアミノ酸をD型とL型に分離し定量することは、疾患の病態生理の解明や早期診断バイオマーカーの開発へ貢献できると考えられる。統合失調症の病態は複雑で、病態の把握は経験豊かな精神科医の診断に委ねられているところが大きい。客観的な指標を得ることができれば、診断はより正確性を増し、治療法の確立にも大きく貢献できると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Proteins are composed of 20 kinds of amino acids, which play an important role in all biological activities. Although homeostasis of the amino acid concentration in blood is maintained, it has recently been reported that the balance of D,L-amino acid concentrations in blood and urine is unbalanced when a particular disease is involved. Therefore, quantification of D,L-amino acids in blood of healthy persons and schizophrenia patients was performed using HPLC. Among the quantified amino acids, D,L-serine and D,L-alanine were further analyzed to investigate their association with clinical symptoms.

研究分野：医療系薬学

キーワード：D-アミノ酸 L-アミノ酸 統合失調症 血中濃度測定

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

近年の光学異性体分離技術の向上により、ヒトを含めた哺乳類体内に含まれるアミノ酸は L 型のみではなく、D 型アミノ酸も高濃度に存在している事が明らかになってきた。特に、遊離型の D-セリン (D-Ser) や D-アスパラギン酸 (D-Asp) は、哺乳類組織における含量や分布、また、その由来や生理学的役割について解明されつつある。D-Ser は、中枢神経系において NMDA (N-methyl-D-aspartate) 型グルタミン酸受容体の興奮調節に働いていることが明らかになり、統合失調症改善薬開発の標的とされている。

統合失調症は、世界のどの地域でも約 1% の罹患率を有する疾患で、青年期の早期に発症して社会機能の喪失をもたらす慢性疾患である。患者のみならず家族へ与える苦悩が非常に大きく、この疾患の克服は急務といえる。本質的な病態は未だ不明であるが、統合失調症の症状発現について、薬理学的研究結果よりいくつか仮説が提唱されており、NMDA 受容体の機能低下仮説は一定の支持を得ている。NMDA 受容体は、イオンチャンネル型 L-グルタミン酸受容体のサブタイプの一つであり、神経伝達物質である L-グルタミン酸 (L-Glu) やグリシン (Gly)、D-Ser が結合する。L-Glu が結合して受容体のチャンネルが開くためには D-Ser が結合していなければならず、D-Ser は神経伝達に必須の物質であることからコアゴニストと呼ばれている。また、興味深い点として D-Ser 結合部位に D-アラニン (D-Ala) が結合しコアゴニストとして作用することである。最近では、L-Glu と同様に D-Asp もアゴニストとして機能することが明らかになっている。このように、NMDA 受容体の機能には、さまざまな種類の D 型アミノ酸が関わっており、その濃度バランスが受容体機能へ影響していると考えられる。

### 2. 研究の目的

血液中のアミノ酸濃度は恒常性が維持されているが、最近、特定の疾患に罹患した場合、血液や尿における D,L-アミノ酸濃度のバランスが崩れていることがいくつか報告されている [Ozeki Y et al., *Neurosci Res.*, **69**(2): 154-160, 2011, Sasabe J et al., *PNAS*, **109**(2): 627-632, 2012, Kimura T et al., *Sci Rep.*, **6**: 26137, 2016]。従って、ヒト体内に存在するアミノ酸を D 型と L 型に分離し定量することは、疾患における病態生理の解明や早期診断バイオマーカーの開発へ貢献できると考えられる。

本研究の目的は、健常者および統合失調症患者血液中のアミノ酸を D 型と L 型に分離し、網羅的に濃度測定を行ったのち、得られた定量結果を比較し統計処理を行うことにより、血液中 D,L-アミノ酸濃度とその症状や治療状況との関連について解析することである。

### 3. 研究の方法

#### (1) 試料中 D,L-アミノ酸を定量する新規カラムスイッチング HPLC システムの確立

試料中のアミノ酸を定量する方法として、蛍光誘導体化試薬 4-fluoro-7-nitro-2,1,3-benzoxadiazole (NBD-F) を用いて蛍光誘導体化し、逆相 (C8 または ODS) カラムと Pirkle 型キラルカラムを連結したカラムスイッチング HPLC システムにより分離定量する方法を用いている。これまでに、D,L-Asp、D,L-Glu、D,L-Ser と 3 種類のアミノ酸についてはカラムスイッチング HPLC システムを用いた定量法を確立しているが、上記以外の D,L-アミノ酸を分離・定量する HPLC システムは構築できていなかったため、新規カラムスイッチング HPLC システムの構築を行った。

D,L-アミノ酸標準溶液の NBD 化は、一定量の 50mM ホウ酸緩衝液 (pH8.0) および NBD-F 溶液を添加後よく攪拌し、60°C で 5 分間反応を行ったのち、1% トリフルオロ酢酸溶液を加えて行った。NBD 蛍光誘導体化したアミノ酸標準溶液を用いて、すでに確立している D,L-アミノ酸定量法の HPLC 条件を参考にし、分析に使用するカラム、カラムオープン温度、移動相条件の組成、流速などを改良し、新たに構築する HPLC 条件を決定した。

#### (2) 新たに確立した D,L-アミノ酸 HPLC 定量法におけるバリデーションの実施

新規 D,L-アミノ酸 HPLC 分析法において、真度、精度、特異性、検出限界、定量限界、直線性および範囲といった分析能パラメーターについて検討し、確立した分析法の妥当性について評価を行なった。

#### (3) 健常者および統合失調症患者血漿中 D,L-アミノ酸濃度の定量

健常者または統合失調症患者血漿 50  $\mu$ L に H<sub>2</sub>O 150  $\mu$ L、40 w/v% トリクロロ酢酸溶液 10  $\mu$ L を添加し、除タンパク操作を行なった。その後、遠心分離し、得られた上清の一部を採取し、水酸化ナトリウム溶液およびホウ酸緩衝液を添加しアルカリ性とした。溶液の一部に NBD-F 溶液を加え試料中のアミノ酸を NBD 蛍光誘導体化したのち、1% トリフルオロ酢酸を加えて反応を停止させた。NBD 化した試料 10  $\mu$ L を確立した HPLC システムにインジェクションし、D,L-アミノ酸の定量を行なった。

#### (4) 血漿中 D,L-アミノ酸濃度の解析

(3)で得られた健常者および統合失調症患者における血液中 D,L-アミノ酸濃度定量結果を用いて、患者と健常者間でアミノ酸濃度に違いが見られるか比較・検討を行った。また、統合失調症の患者背景や臨床症状、使用している薬物などの臨床情報との関連について解析を行ない、統合失調症の診断や病態評価などの指標として使用可能か検討を行った。

#### 4. 研究成果

##### (1) 試料中 D,L-アミノ酸を定量する新規カラムスイッチング HPLC システムの確立

これまでに構築している D,L-アミノ酸分析法を改良し、Ala、アスパラギン (Asn)、グルタミン (Gln)、Gly、スレオニン (Thr)、プロリン (Pro)、バリン (Val)、ロイシン (Leu)、イソロイシン (Ile)、リジン (Lys)、フェニルアラニン (Phe)、メチオニン (Met) について、カラムスイッチング HPLC システムを利用した新規 D,L-アミノ酸分析法を確立した。

##### (2) 新たに確立した D,L-アミノ酸 HPLC 定量法におけるバリデーションの実施

新たに確立した分析法において、真度、精度、特異性、検出限界、定量限界、直線性および範囲といった分析能パラメーターについて検討し、分析法の妥当性を評価した。その結果、確立した分析法は、精度、感度ともに優れ、良好な直線性を示す分析法であることを確認した。

##### (3) 健常者および統合失調症血漿中 D,L-アミノ酸濃度の定量

健常者 47 名 (男性 27 名、女性 20 名 平均年齢  $46.3 \pm 13.3$ ) および薬物治療を行っている統合失調症患者 67 名 (男性 40 名、女性 27 名 平均年齢  $53.4 \pm 13.5$ ) の血漿中アミノ酸 (Ser, Ala, Asp, Glu, Asn, Gln, Gly, Pro, Thr, Phe, Val, Leu, Met) 濃度について、確立したカラムスイッチング HPLC システムを用いて、試料中の D 体と L 体に分離し定量を行った。

定量を行った結果、健常者および統合失調症患者血漿中に D-Ser、D-Ala、D-Asp、D-Asn を検出した。また、D-Glu、D-Pro、D-Met については、血漿中に存在すると思われる結果が得られているが、今回行った分析条件ではサンプルによって検出限界以下となってしまう明確な結果を得ることが出来なかった。今後、分析を行う試料の調製方法や HPLC に注入する量を変更し再検討を行う予定である。

定量を行った D,L-アミノ酸のうち Ser および Ala について、患者と健常者で血漿中アミノ酸濃度に違いがみられるか、また、性別、年齢および薬剤投与量との関連について解析を行った。

##### ① 健常者および統合失調症患者血漿中 D,L-Ser および D,L-Ala 濃度

健常者と患者血漿中 D,L-Ser 濃度について比較した結果、有意差はみられなかったが、健常者に比べ患者において D-Ser および L-Ser 濃度はわずかではあるが増加傾向にあると思われた。

次に、健常者と患者血漿中 D,L-Ala 濃度について比較した結果、血漿中 Ala (D-Ala+L-Ala) 濃度は、健常者に比べ患者において有意に減少していた。また、血漿中 Ala 濃度を D-Ala および L-Ala に分けて解析を行った結果、どちらの濃度も有意差はみられなくなるが、健常者に比べ患者において減少傾向にあった。

##### ② 健常者および統合失調症患者血漿中 D,L-Ser および D,L-Ala 濃度 一性別による解析一

血漿中アミノ酸濃度が性別により影響がみられるか男性と女性にわけて解析を行った。

血漿中 D,L-Ser 濃度について、健常者間および患者間で男女別に解析を行った。その結果、D-Ser および L-Ser は、健常者間、患者間共に女性の方がわずかではあるが高値傾向にあった。

次に、血漿中 D,L-Ser 濃度について、男性間および女性間において健常者と患者で比較したところ、D-Ser は、男性間、女性間共に健常者に比べ患者の方が高値傾向であった。また、L-Ser は、男性間において健常者に比べ患者の方が高値傾向であり、女性間においては健常者に比べ患者の方が減少傾向にあった。

血漿中 D,L-Ala 濃度について、健常者間および患者間で男女別に解析を行った結果、D-Ala 濃度は、健常者においては女性の方が高値傾向にあり、患者においては男女でほぼ変わらない値であった。また、L-Ala 濃度は、健常者男女でほぼ変わらない値であったが、患者においては女性の方が減少傾向にあった。

次に、血漿中 D,L-Ala 濃度について、男性間および女性間において健常者と患者で比較したところ、D-Ala 濃度は、男性間において健常者に比べ患者の方がわずかではあるが高値傾向にあり、女性間においては健常者に比べ患者の方が減少傾向にあった。また、L-Ala 濃度は、男性間、女性間共に健常者に比べ患者において減少傾向にあり、女性間における L-Ala 濃度は患者において有意に減少していた。

##### ③ 健常者および統合失調症患者血漿中 D,L-Ser および D,L-Ala 濃度 一年齢による解析一

加齢によって血漿中アミノ酸濃度に影響がみられるか健常者間および患者間で年代別にわけて解析を行った。

血漿中 D-Ser 濃度について年代別に解析を行った結果、健常者および患者共に有意差はみられないが加齢とともに増加傾向にあると思われた。また、血漿中 L-Ser 濃度については、健常者においては加齢と共に増加し高齢者（60 歳代以降）になると減少傾向にあると思われたが、患者においては 40 歳代以降ほぼ一定の濃度であった。

血漿中 D,L-Ala 濃度について年代別に解析を行った結果、健常者および患者共に血漿中 D-Ala 濃度は、加齢に伴って増加傾向にあり、患者における D-Ala 濃度の増加傾向は緩やかであると思われた。L-Ala 濃度については、健常者および患者共に加齢と共に緩やかな増加傾向にあるが、高齢者（健常者では 60 歳代以降、患者では 70 歳代以降）になると減少傾向にあると思われた。

#### ④ 健常者および統合失調症患者血漿中 D,L-Ser および D,L-Ala 濃度 —薬物投与による解析—

多くの場合、薬物治療を行なっている統合失調症患者は多剤併用での治療を行っている。薬物投与は血漿中アミノ酸濃度に影響を与えている可能性があるのではないかと考え、血漿中アミノ酸濃度と薬物投与との相関について解析を行った。

多種類の薬剤を一つの薬剤に換算して抗精神病薬の力価を算出するために「クロロプロマジン（CP）換算」という換算方法がある。今回は、投与されている薬剤情報を元に CP 換算値を算出し、算出した投与量を 5 つのグループ（グループ 1：薬剤投与が行われていない健常者群、グループ 2：薬剤投与量 300mg 未満の患者群、グループ 3：薬剤投与量 300～600mg 未満の患者群、グループ 4：薬剤投与量 600～1000mg 未満の患者群、グループ 5：薬剤投与量 1000mg 以上の患者群）に分類し、薬剤投与量と患者血漿中 D,L-Ser および D,L-Ala 濃度との関連について解析を行った。

血漿中 D,L-Ser 濃度と薬剤投与量との相関について解析を行った結果、患者血漿中 D-Ser 濃度は、健常者（グループ 1）と比べ薬剤投与量が異なる場合（グループ 2～5）であっても増加傾向にあり、グループ 2～5 における D-Ser 濃度の増加量はほぼ一定であった。また、患者血漿中 L-Ser 濃度については、薬物投与量の増加（グループ 2～4）に伴って増加傾向にあると思われるが、薬物を過剰量投与（グループ 5）した場合、健常者における血漿中 L-Ser 濃度と変化はみられないようなと思われた。

次に、血漿中 D,L-Ala 濃度と薬剤投与量との相関について解析を行った。その結果、患者血漿中 D-Ala 濃度は、薬剤投与量が異なっている場合（グループ 2～4）でも健常者（グループ 1）と血漿中濃度に変化がみられなかったが、薬物を過剰量投与した場合（グループ 5）では減少傾向にあると思われた。また、患者血漿中 L-Ala 濃度は、薬剤投与量が異なっても（グループ 2～5）健常者（グループ 1）に比べ減少傾向にあると思われた。

さらに、投与されている薬剤を薬効別に分類し、患者血漿中アミノ酸濃度との相関について解析を行った。

統合失調症治療薬は治療効果により定型抗精神病薬と非定型抗精神病薬に分けることができる。今回は、グループ 1（薬剤投与が行われていない健常者）、グループ 6（定型抗精神病薬のみを服用している患者群）、グループ 7（非定型抗精神病薬のみを服用している患者群）、グループ 8（定型抗精神病薬および非定型抗精神病薬どちらも服用している患者群）と 4 つのグループに分類し、投与されている抗精神病薬の分類と患者血漿中 D,L-Ser および D,L-Ala 濃度との関連について解析を行った。

血漿中 D,L-Ser 濃度と投与されている薬剤の薬効との相関について解析を行った結果、患者血漿中 D-Ser 濃度は、健常者（グループ 1）と比べ、定型抗精神病薬のみを服用している患者群（グループ 6）、非定型抗精神病薬のみを服用している患者群（グループ 7）において増加傾向にあった。また、患者血漿中 L-Ser 濃度については、薬効の異なる薬剤が投与（グループ 6～8）されていても健常者と血漿中濃度に変化はみられなかった。

血漿中 D,L-Ala 濃度と投与されている薬剤の薬効との相関について解析を行った結果、患者血漿中 D-Ala 濃度は、健常者（グループ 1）と比べ薬効の異なる薬剤が投与（グループ 6～8）されていても血漿中濃度に変化はみられないように思われた。また、患者血漿中 L-Ala 濃度は、健常者（グループ 1）と比べ患者群では、薬効の異なるいずれのグループ（グループ 6～8）においても減少傾向にあった。

これまでの解析結果をまとめると、血漿中 D,L-Ser および D,L-Ala 濃度は、加齢により増加傾向にあるが、統合失調症患者においては薬剤投与による影響を受け、血漿中 D,L-Ser および D,L-Ala 濃度に変動がみられるのではないかと考えられた。

今回解析に使用した患者血漿は、抗精神病薬にて治療中であり比較的症状が落ち着いた慢性期の患者であるため、健常者と血漿中アミノ酸濃度に大きな差が見られていないのではないかとと思われる。

今後、薬剤未投与の急性期患者における血漿中濃度アミノ酸濃度を測定することができれば、血漿中 D,L-アミノ酸濃度の変動から統合失調症治療薬による治療効果の客観的評価が可能となり、統合失調症患者における治療満足度の向上につながると思われる。さらに、本研究において血漿中 D,L-アミノ酸濃度の定量が完了しているアミノ酸についても組み合わせ網羅的に血漿中アミノ酸バランスについて解析し考察することができれば、統合失調症の病態発現との関連についても新たな知見が得られるのではないかとと思われる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

〔学会発表〕 計46件（うち招待講演 1件／うち国際学会 6件）

1. 発表者名 関根正恵、野中聖子、尾関祐二、藤井久彌子、齋藤康昭、宮本哲也、片根真澄、秋山一文、下田和孝、本間 浩
2. 発表標題 統合失調症患者血漿におけるメチルアルギニン類
3. 学会等名 第39回白金シンポジウム
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 関根正恵、野中聖子、尾関祐二、藤井久彌子、角田 誠、齋藤康昭、宮本哲也、片根真澄、秋山一文、下田和孝、本間 浩
2. 発表標題 統合失調症患者血漿中メチルアルギニン類濃度の解析
3. 学会等名 日本薬学会第138年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 関根正恵、大西穂ノ佳、小山内美音、尾関祐二、藤井久彌子、齋藤康昭、宮本哲也、片根真澄、秋山一文、下田和孝、加藤くみ子、本間 浩
2. 発表標題 統合失調症患者血漿におけるD,L-アミノ酸
3. 学会等名 第63回日本薬学会関東支部大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 関根正恵、尾関祐二、藤井久彌子、片根真澄、齋藤康昭、宮本哲也、秋山一文、下田和孝、加藤くみ子、本間 浩
2. 発表標題 ヒト血漿中D,L-アミノ酸の解析
3. 学会等名 第43回白金シンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 関根正恵、大西穂ノ佳、小山内美音、尾関祐二、藤井久彌子、片根真澄、齋藤康昭、宮本哲也、秋山一文、下田和孝、加藤くみ子、本間浩
2. 発表標題 統合失調症患者血漿中D,L-アミノ酸濃度の解析
3. 学会等名 日本薬学会第140年会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

北里大学薬学部生体分子解析学教室ホームページ <a href="http://www.pharm.kitasato-u.ac.jp/ac/SeitaiHP2019/">http://www.pharm.kitasato-u.ac.jp/ac/SeitaiHP2019/</a>
---

6. 研究組織		
氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考