

令和 6 年 9 月 10 日現在

機関番号：33804
研究種目：基盤研究(C)（一般）
研究期間：2018～2023
課題番号：18K11059
研究課題名（和文）母乳に含まれるビタミン候補物質ピロロキノリンキノンの高感度分析法の開発とその応用
研究課題名（英文）Development and application of a highly sensitive analytical method for pyrroloquinoline quinone (PQQ) as a candidate vitamin contained in breast milk
研究代表者
熊澤 武志（Kumazawa, Takeshi）
聖隷クリストファー大学・看護学部・教授
研究者番号：00186470
交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、ビタミン候補物質であるピロロキノリンキノ（PQQ）について、生体成分からの分離分析法とヒト母乳からの高感度検出法の詳細を検討した。PQQ標準品を用いたHPLCの分離条件の検討では、分析カラムは逆相系ODSカラムが適していることが明らかとなった。また、イオン交換樹脂固相抽出法及びHPLC-タンデム質量分析（MS/MS）-エレクトロスプレーイオン化法によるPQQの選択反応モニタリング法により、ngオーダーの範囲で良好な定量性が得られた。さらに、本法を母乳に適用したところ、PQQが検出されたことから、今回開発された高感度分析法は、母乳中PQQ検出に有用であることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

PQQはメタノール資化性微生物におけるメタノール脱水素酵素の補酵素として1979年に発見され、ほ乳類においても多彩な作用が報告されている。研究代表者は哺乳類の細胞におけるPQQの増殖作用やヒトの各種組織にPQQが存在することを明らかにしているが、ヒトでの生理作用、成長、栄養との関連の詳細は明らかになっていない。本研究では、迅速・簡便なPQQの分離・抽出法並びにHPLC-MS/MS法によるPQQの高感度検出法を開発し、母乳に含まれるPQQの同定・定量を確立させる。乳児の発育と新規の生理活性物質の関連性を論じる上では、本研究の基礎的知見の学術的価値は非常に高い。

研究成果の概要（英文）：In the present study, we developed highly sensitive analytical method for pyrroloquinoline quinone (PQQ) in breast milk. Examination of HPLC separation conditions using PQQ standards revealed that a reversed-phase ODS column was optimal for the analytical column. The selected reaction monitoring method methods for PQQ by HPLC-MS/MS-electrospray ionization and the ion-exchange solid-phase extraction method provided good linearity in the ng-order range. The present method was successfully applied to qualify and quantify PQQ in human breast milk.

研究分野：生命科学

キーワード：ピロロキノリンキノ 母乳 抽出法 HPLC タンデム質量分析法

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ピロロキノリンキノン (pyrroloquinoline quinone, PQQ) はメタノール資化性微生物におけるメタノール脱水素酵素の補酵素として 1979 年に発見された (Salisbury *et al.*, 1979)。その後、PQQ の化学構造が決定されたほか、ほ乳類においても多彩な作用が報告されている (Killgore *et al.*, 1989, Yamaguchi *et al.*, 1993, Naito *et al.*, 1993, Kasahara and Kato, 2003, Stites *et al.*, 2006, Nakano *et al.*, 2016)。研究代表者は線維芽細胞における PQQ の増殖作用 (Kumazawa *et al.*, 2007) やヒトの各種組織中 PQQ の存在を明らかにしている (Kumazawa *et al.*, 1992, Kumazawa *et al.*, 2007)。しかし、その詳細な生理作用は明らかとなっていないのが現状である。本研究では、高感度分析法である液体クロマトグラフィー (HPLC) - タンデム質量分析 (MS/MS) 法によるヒト母乳に含まれる PQQ の検索とその定量性を検討するが、得られた結果は PQQ の生理作用を乳児の栄養と発育との関連性から論じる上で重要な知見となる。

2. 研究の目的

PQQ は、ヒトを含む哺乳類の体内での存在が明らかになっているほか、日常摂取する多くの食品にも含まれており、ほ乳類の成長に欠かせない必須栄養素と考えられている。また、PQQ はほ乳類の新しいビタミンであるとする報告もなされ脚光を浴びている。本研究は、ほ乳類の新しいビタミン候補物質である PQQ について、ヒトの母乳から簡便に検索できる高感度分析システムを構築し正確な含有量を決定することを目的とする。母乳から PQQ を抽出し存在を明らかにすることは、世界的にも初の試みであり、本研究によって、母乳の栄養学的価値は一層高まるといえる。

3. 研究の方法

(1) 本研究では、MS (/MS) 法による PQQ 関連物質のスペクトルライブラリーの作成、PQQ の精製・抽出法の検討、最適な MS (/MS) 法による PQQ の検出及び同定法の検討、最適な HPLC-MS/MS 法による母乳中 PQQ の高感度定量法について、研究方法を構築した。

(2) PQQ の分析に用いる標準品は、市販されている PQQ ニナトリウム塩 (PQQ-2Na) を使用した。また、PQQ の検出にはエレクトロスプレーイオン化法による HPLC-MS/MS 法を使用したほか、スペクトル解析によるスペクトルライブラリーを作成し、PQQ の同定に使用した。さらに、プロダクトイオンスキャンから得られたデータより、PQQ の高感度検出に相応しい選択反応モニタリング (SRM) 法を開発した。しかし、PQQ が微量であることから、プロダクトイオンスキャンに十分なイオン強度を得ることができない場合は、SRM で検出したピーク強度パターンと標準品のイオン強度パターンが一致することを確認して同定・検出を行った。

(3) 分析対象の PQQ 標準品について、分離能が高い HPLC の分析条件の設定では、最適な分離用カラム (ジオール基、アミド基、ODS などの固定相) と移動相を選択し、PQQ の迅速な HPLC 分離条件を選定した。ジオール基カラム (長さ 150mm x 内径 2.1mm, 粒径 5 μ m) はギ酸 (pH 2) / アセトニトリル (1:1)、アミド基カラム (長さ 50mm x 内径 3.0mm, 粒径 3 μ m) 及び ODS カラムは酢酸アンモニウム溶媒をベースにしたアセトニトリルのリニアグラジエント法などを用いた。

(4) 生体試料から物質を精製・抽出する際には、事前に、生体試料に対象の物質を添加し最適な条件を設定する必要がある。本研究の場合は母乳が貴重であることから、代替品として人工乳 (粉ミルク) を用いた添加実験を実施した。人工乳を用いた PQQ の精製・抽出法の開発では、QuEChERS 法や簡易除タンパク・リン脂質除去カートリッジ ISOLUTE PLD + カラム等の液-液抽出法、逆相及びイオン交換などの各種モードの固相抽出 (SPE) カラムを利用し、PQQ の精製・抽出を試みた。特に、人工乳の除蛋白及び脂質除去の必要性、より簡便な精製・抽出法の選択など、MS 分析への適用性の観点から最良な方法の確立をめざした。なお、HPLC-MS/MS 法の諸条件が確立した後に、日内変動率及び日間変動率を指標とした再現性の検討、検出限界及び検量線の作成による定量性の検討等を行った。

(5) 授乳婦からの母乳の採取では、母乳採取バッグ (25 mL 容量) に搾乳し、その 1mL ~ 5 mL をプラスチックチューブ (2mL 容量) に入れ、-20 の家庭用フリーザーに保存した。その後、超低温フリーザー (-50) に PQQ 分析まで冷凍保存する方法を設定した。なお、母乳は解凍後の再凍結を避けるために、冷凍保存前に、プラスチックチューブに小分けにして保存した。

4. 研究成果

(1) 本研究では、MS (/MS) 法並びに HPLC-MS/MS 法による PQQ 関連物質に関するスペクトルライブラリーを作成した。ネガティブモードの MS では m/z 329 の脱プロトン分子をベースピークとし、MS/MS ではカルボキシ基開裂による m/z 241 (ベースピーク) 及び 285 などのプロダクトイオンが出現したことから、本研究では m/z 329 をプリカーサーイオンに、m/z 241 をプロダクトイオンとする組み合わせによる SRM 法がバックグラウンドノイズの観点から良好な検出条件であることが明らかとなった。

(2) HPLCによる分離条件の検討では、ジオール基、アミド基、ODSなどの固相を検討したところ、PQQの分離には、逆相系のC18あるいはC8カラムの使用が可能であった。その結果、特に、長さ150mm x 内径2.0mm、粒径5 μ mのODSカラムであるL-column3 (metal free) 及び長さ150mm x 内径2.1mm、粒径3 μ mのODSカラムであるAQ C18使用がPQQの分離に良好であった。移動相については、10mM酢酸アンモニウム溶媒とアセトニトリルのリニアグラジエント法を用いることで、比較的シャープなPQQピークがほぼ2分以内に検出することができた。また、このHPLC-MS/MS分析条件において、数ng~数十ngの範囲で良好な検量線が得られた。なお、本研究で用いたL-column3 metal freeカラムでは、バックグラウンドノイズの低減と分離性の向上に寄与することが分かった。

(3) PQQの添加実験による各種分析には、市販の人工乳(粉ミルク、0カ月~1歳頃用)を母乳の代替品として使用した。この人工乳には母乳に近い量のタンパク質、脂質、炭水化物、食塩、カルシウムなどが配合されており、栄養成分の量とバランスを母乳に近づけている。人工乳の調整では、適量をお湯(70 $^{\circ}$ C)で溶かし、使用するまで-80 $^{\circ}$ Cで冷凍保存した。一方、母乳の採取について授乳婦に協力を求めたところ、採取方法の不徹底、保存方法のミスなどが明らかとなり、産後の状況下での正確な採取条件の徹底は困難な状況にあった。本研究では、当初予定した産後1~60日までの多数の搾乳は困難と判断し、産後1か月の授乳婦ボランティアからの採取に変更した。今後、授乳婦からの母乳の採取に関し、ストレスのかからない採取方法に変更することで、母乳中PQQの詳細な動態を明らかにできる可能性があり、さらに検討する予定である。

(4) ヒト組織からのPQQの抽出法は、従来より、Kumazawaらの方法(Kumazawa et al., 1995)に準じて行われている。しかし、従来法は液-液抽出の過程で多くの有機溶媒が必要であること、液-液抽出法と固相抽出法を組み合わせた抽出方法が煩雑である欠点などがあつた。本研究では、簡便かつ効率よくPQQを精製する方法の開発を試みた。QuEChERS法を用いた液-液抽出法では、人工乳200 μ LをQuEChERS tubeにて攪拌し、上清は抽出液精製用dSPEを用いたサンプルのクリーンアップを施した。また、ISOLUTE PLD+カラムによる除タンパク・リン脂質除去法では、人工乳100 μ Lをギ酸/アセトニトリル液を用いて抽出を行った。しかし、QuEChERS法及びISOLUTE PLD+カラムによる方法では抽出効率が1%以下であつた。一方、C18シリカモノリス SPEチップ(200 μ Lサイズ)による抽出では、人工乳200 μ Lにメルカプトエタノール水溶液を加え混和した後、塩酸水溶液を加え、遠心処理を施した。その後、上清をスピンチップC18 SPEにロードし、ピリジン溶液による溶出を行った。溶出液は蒸発乾固後、その残渣を移動相で溶解しHPLC-MS/MS分析に供した。C18シリカモノリス SPEチップはモノリス固相を使用した微量迅速抽出が可能で新規のSPEカラムであり、抽出効率は約50%が得られた。また、同様の検討をイオン交換樹脂カートリッジカラムを用いたSPE法に適用したところ、約60%の抽出効率が得られた。本検討により、母乳中PQQの分析に関して、QuEChERS法やISOLUTE PLD+は簡便であるものの、抽出効率の低さが問題となったが、SPE法、特にイオン交換樹脂カートリッジとHPLC-MS/MS法との組み合わせは、従来法よりも簡便で迅速なPQQ精製・抽出法であることが明らかとなった。また、蛋白質変性を行う前に試料へのメルカプトエタノールの添加は抽出効率の改善に影響することも明らかとなった。

(5) 本研究において開発されたPQQの高感度分析法の品質管理を行ったところ、溶出時間は約1.5分、20-1000pg/注入量の範囲で相関係数0.995の良好な直線性が得られた。また、検出限界は10pg/注入量、日内変動が約9%、日間変動(1週間)が約9%であつた。

(6) 本研究では、開発されたSPE-HPLC/MS/MS-SRM法を母乳中PQQの高感度分析法に応用した。その結果、数十ng/mLの母乳中PQQの検出と定量に成功した。これは研究代表者が従来法の抽出法とガスクロマトグラフィーMS分析(選択イオンモニタリング法)を組み合わせたPQQ分析法の結果とほぼ合致するものであり、本研究において母乳中PQQの存在を明らかにしたことは、乳児の栄養と発育の関連性を論じる上で重要な基礎的知見となった。

<引用文献>

- Salisbury S.A., Forrest H.S., Cruse W.B.T. and Kennard O., A novel coenzyme from bacterial primary alcohol dehydrogenases, *Nature*, 280, 843-844, 1979
- Killgore J., Smidt C., Duich L., Romero-Chapman N., Tinker D., Reiser K., Melko M., Hyde D., Rucker R.B., Nutritional importance of pyrroloquinoline quinone, *Science*, 245, 850-852, 1989
- Yamaguchi Y., Sasano A., Urakami T., Tsuji T., Kondo K., Stimulation of nerve growth factor production by pyrroloquinoline quinone and its derivatives in vitro and in vivo, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 57, 1231-1233, 1993
- Naito Y., Kumazawa T., Kino I., Suzuki O., Effects of pyrroloquinoline quinone (PQQ) and PQQ-oxazole on DNA synthesis of cultured human fibroblasts, *Life Sci.*, 52, 1909-1915, 1993
- Kasahara T. and Kato, T., A new redox-cofactor vitamin for mammals, *Nature*, 422, 832, 2003

Stites T.E., Mitchell A.E., Rucker R.B. Physiological importance of quinoenzymes and the o-quinone family of cofactors, *J. Nutr.*, 136, 390-396, 2006

Nakano M., Murayama Y., Hu L., Ikemoto K., Uetake T., Sakatani K., Effects of antioxidant supplements (BioPQQ™) on cerebral blood flow and oxygen metabolism in the prefrontal cortex, *Adv. Exp. Med. Biol.*, 923, 215-222, 2016

Kumazawa T., Hiwasa T., Takiguchi M., Suzuki O., Sato K., Activation of Ras signaling pathways by pyrroloquinoline quinone in NIH3T3 mouse fibroblasts, *Int. J. Mol. Med.*, 19, 765-770, 2007

Kumazawa T., Seno H., Urakami T., Matsumoto T., Suzuki O. Trace levels of pyrroloquinoline quinone in human and rat samples detected by gas chromatography/mass spectrometry. *Biochim. Biophys. Acta*, 1156, 62-66, 1992

Kumazawa T., Sato K., Seno H., Ishii A., Suzuki O., Levels of pyrroloquinoline quinone in various foods, *Biochem. J.*, 307, 331-333, 1995

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
研究分担者	久保田 君枝 (Kubota Kimie) (40331607)	聖隷クリストファー大学・助産学専攻科・教授 (33804)	
研究分担者	中内 暁博 (Akihiro Nakauchi) (90245829)	東都大学・沼津ヒューマンケア学部・教授 (32428)	

	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
研究協力者	藤城 雅也 (Fujishiro Masaya) (00527161)	昭和大学・医学部・講師 (32622)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関