

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年3月20日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21590043

研究課題名（和文）動脈硬化予防マーカーとしての葉酸関連化合物の化学発光計測法の開発と
実用展開研究課題名（英文）Development and application of a chemiluminescent measurement method
folic acid related compounds as an arteriosclerosis marker

研究代表者

中島 憲一郎（NAKASHIMA KENICHIRO）

長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号：30039656

研究成果の概要（和文）：

動脈硬化予防マーカーとしての葉酸関連化合物のルテニウム錯体化学発光計測法を検討し、HPLC-CL 定量法を開発した。これを、葉酸製剤やサプリメント中の葉酸定量に適用し、良好な結果を得ることができ、これらの品質評価等に十分活用できることが分かった。一方、生体中の葉酸関連化合物の定量を試みたが、葉酸がやや不安定な化合物であることや、生体試料中での検出感度がまだ不足していたため、5-メチルテトラヒドロ葉酸を除いて、検出することはできなかった。今後、安定剤の検討等、分析条件の改善が必須である。

研究成果の概要（英文）：

A ruthenium(II)-bipyridine complex chemiluminescent measurement of folic acid related compounds has been examined and developed a useful HPLC-CL method. The developed method was successfully applied to quantify folic acid in tablets and supplements. This means the method might be useful for the quality control of these materials. On the other hand, application of the method to folic acid related compounds except for 5-methyltetrahydrofolic acid in biomaterials was not always successful due to the less stability of these compounds and the lower sensitivity of the method. Improvement of the method concerning the conditions such as stabilizing agent and so on, are required.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学、物理系薬学

キーワード：分析化学、臨床分析化学

1. 研究開始当初の背景

動脈硬化性疾患の新たな危険因子として、含硫アミノ酸であるホモシステインが注目されている。ホモシステインは生体内で葉酸の代謝サイクルと密接に関連しており、代謝サイクルに含まれる一部の酵素等の遺伝子

変異により血中濃度の濃度が上昇し、動脈硬化性疾患の危険性が高まるとの報告がなされた。申請者らは長崎県住民の集団検診で得られた血液試料を用いて、血中ホモシステイン濃度を測定し、離島と非離島における濃度の相違や、年齢、性別あるいは遺伝子多形等

に関する解析・評価を行い、それぞれの要素において生活環境の相違がホモシステイン濃度に影響を与える可能性を示唆した¹⁻³⁾。

一方、図に示すように葉酸関連化合物はホモシステインがメチオニンに代謝される過程に深く関係し、5,10-メチレンテトラヒドロ葉酸還元酵素の遺伝子変異によりホモシステイン値が上昇し、動脈硬化のリスクが上昇する。また、葉酸はビタミンB群の一つとして、胎児の発育促進や脳卒中あるいは認知症のリスク軽減に有効とされ、米国FDAが1日の摂取推奨量として400マイクログラムを設定している。我が国においても、葉酸による健康増進への期待が高まっており、医薬品やサプリメント中の葉酸の定量や葉酸関連化合物の血中濃度測定が品質評価や動脈硬化症の解析評価に重要となっており、簡便で高感度な分析法の開発が急がれている。

Metabolic pathway of FA and Hcy

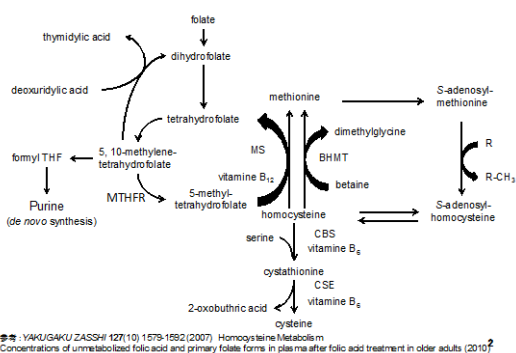


図1 葉酸及びホモシステインの代謝経路

参考文献

- 1) T. Hara et al., *Clin. Chem. Lab. Med.*, **44**, 824 (2006)
- 2) N. Takamura et al., *Asia Pac. J. Clin. Nutr.*, **16**, 69 (2007)
- 3) K. Kadota et al., *Circ. J.*, **72**, 304 (2008)

2. 研究の目的

これまで多くの研究者により葉酸関連化合物の計測法が開発されている。大別すると、FIA法、微生物学的方法、免疫学的方法、HPLC法等である。これらの方法はそれぞれ一長一短があり、感度の点では化学発光検出FIA法が優れているが、分離ができない欠点を持つ^{4,5)}。他の方法は感度や精度の点で改良が必要である。そこで、本研究では葉酸関連化合物の簡便で高感度な化学発光検出HPLC法を開発することにした。化学発光検出にはこれまで葉酸類で検討されていないルテニウム(II)-ジピリジン錯体化学発光反応を利用することにした。さらに開発した方法を用い

て、医薬品やサプリメント中の葉酸の定量、血液試料中の葉酸関連化合物の定量を行い、血液試料中の葉酸濃度とホモシステイン濃度との関連性を調べることで、動脈硬化症のマーカーとしての葉酸値を評価することを目的とした。

参考文献

- 4) S. Zao et al., *J. Chromatogr., A*, **1107**, 290 (2006)
- 5) Z. Song et al., *Phytochem. Anal.*, **14**, 216 (2003)

3. 研究の方法

(1) 本研究ではルテニウム錯体化学発光を利用したが、その発光メカニズムは図2に示すように、2価のルテニウム錯体を硫酸セリウムで酸化し3価の錯体とした後、還元剤(ここでは葉酸類)で2価に還元する際に、遷移状態となった錯体が元の基底状態の錯体に戻る際に発光するものである。発光の総量が還元剤の濃度に比例することを利用して、還元剤を定量する。

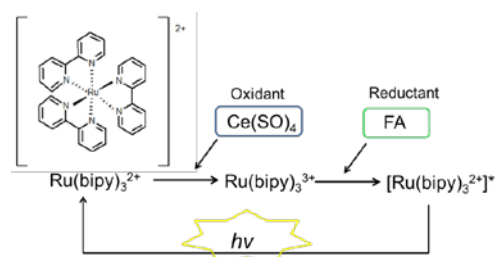


図2 ルテニウム錯体の発光メカニズム

(2) バッチ法による葉酸類の定量。初めに葉酸の還元能力をバッチ法で検討した。標準操作: キュベット(70x10 mm, i. d.)に4 mM Ru(bipy)₃²⁺水溶液及び試料溶液を200 μLを加え、5秒間攪拌する、キュベットを測定チャンパーに挿入後、オートインジェクションを用いて1 mM Ce(SO₄)₂ in 2M H₂SO₄水溶液を100 μL注入し、直後から4秒間の発光量を測定する。測定にはLumat LB9507 (Berthold社)を用いた。サプリメントの前処理: 市販の葉酸サプリメントを粉碎後、約50 mgを秤量し、MeOHを加え15分間超音波抽出後、MeOHで定容量とした。メンブランフィルター(0.45 μm)で濾過したものを試料溶液に供した。

(3) FIA-ルテニウム錯体化学発光検出による葉酸サプリメントの定量。標準操作: キャリヤー溶液には20 mM phosphate buffer (pH 5.5)/acetonitrile=96/4(v/v%)を用い、流速は0.3 mL/minとした。発光試薬溶液は1.5 mM

Ru(bipy)₃²⁺水溶液を 0.04 mL/min で送液、1.5 mM Ce(SO₄)₂ in 0.4 M H₂SO₄水溶液を 0.26 mL/min で送液した。反応コイルは I=500x0.17 mm, i. d.; II=28x0.25 mm, i. d., 検出コイルは 700x0.25 mm, i. d. とした。システムは図 3 に示した。

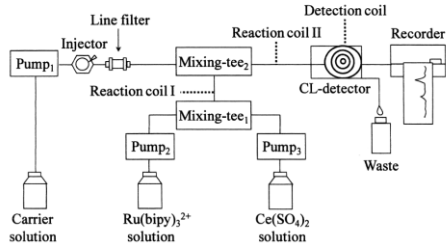


図 3 FIA system

(3) HPLC-ルテニウム錯体化学発光検出による葉酸製剤及びサプリメントの定量。HPLC-化学発光検出システムを図 4 に示す。カラムにはDaisopak-SP-120-5-ODS-BP (250x2 mm, i. d., 5 μm) を使い、移動相は 20 mM phosphate buffer (pH 5.7)/acetonitrile (=96:4, v/v%) を 0.30 mL/min で送液した。化学発光試薬は 1.5 mM Ru(bipy)₃²⁺水溶液及び 1.0 mM Ce(SO₄)₂ in 0.4 M H₂SO₄水溶液を用い、溶離液と混和直前で混合した。流速はそれぞれ 0.04 mL/min 及び 0.26 mL/min とした。試料の調製：抽出液として 50 mM リン酸水溶液及び 0.2% アスコルビン酸水溶液の混液 (50:50, v/v%) を用いた。錠剤は 1 錠の重さを精秤し、粉碎後、適量を精密に採取し、10 mL のメスフラスコにとり、定容量とする。10 分間超音波抽出後メンブランフィルター (0.45 μm) で濾過したものを試料とした。

[HPLC - CL system]

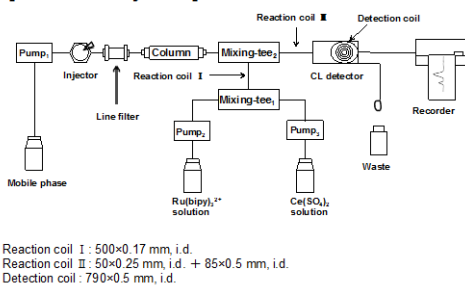


図 4. HPLC-CL system

4. 研究成果

(1) バッチ法による葉酸サプリメントの定量。酸化剤にCe(SO₄)₂を用いるルテニウム錯

体化学発光を利用して、葉酸により化学発光が生じることを初めて明らかにした。積算発光量は葉酸の濃度依存的に増加しており、葉酸の定量が可能であった。1-50 μM の標準溶液を用いた検量線は良好な直線となった (r=0.993)。ブランク発光の 3SD における検出下限は 0.42 μM であった。本法を用いてサプリメント錠剤中に含まれる葉酸の定量を行った結果、表示値に比べ約 2 倍の高値が得られた。その原因を追及した結果、サプリメント中に含まれる添加物が発光に影響を与えることが分かった。精査の結果、図 5 に示すようにラクトース、セルロース、スクロース及びステアリン酸などが発光を増強することが分かった。従って、葉酸を定量するにはこれらを分離する必要があった

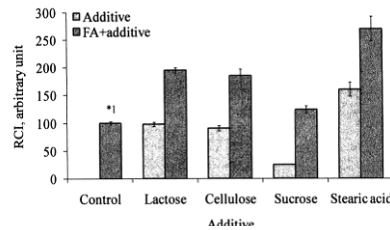


図 5 添加物が発光に与える影響

(2) FIA 法の条件を種々検討し、標準操作法を求め、これに従って葉酸関連化合物の標準品について検量線を作成した。葉酸 (1-50 μM)、ジヒドロ葉酸 (0.5-50 μM)、テトラヒドロ葉酸 (1-50 μM)、5-メチルテトラヒドロ葉酸 (0.05-10 μM) はそれぞれの範囲で良好な直線となり (r>0.993)、ブランク発光の 3SD における検出下限は、それぞれ 0.34 μM, 0.14 μM, 0.26 μM 及び 0.01 μM であった。このことから、5-メチルテトラヒドロ葉酸が還元剤としては最も有力であることが示唆された。

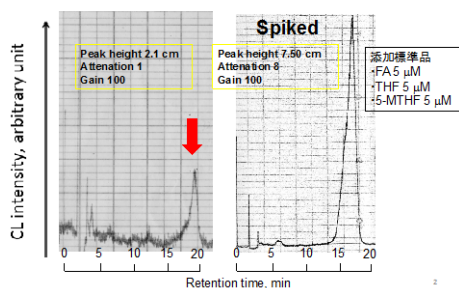
(3) HPLC-CL 法の最適化を行うために、化学発光用試薬の濃度や HPLC 溶離条件等を検討して標準操作法を決めた。葉酸関連化合物の標準品の保持時間はそれぞれ、テトラヒドロ葉酸 (8 min)、葉酸 (18 min)、5-メチルテトラヒドロ葉酸 (21 min) であった。ジヒドロ葉酸は他の夾雑物と十分に分離することができなかった。検量線を作成したところ、葉酸 (5-100 μM)、テトラヒドロ葉酸 (10-500 μM)、5-メチルテトラヒドロ葉酸 (0.5-50 μM) の範囲で良好な直線となった (r>0.995)。また、シグナル/ノイズ比が 3 の場合の検出下限は、それぞれ 1.1 μM, 4.3 μM, 0.1 μM であった。

次に、葉酸製剤及びサプリメント中の葉酸の定量を試みた。試料はフォリアミン錠 (FA 5

mg/Tab)、フォリアミン注射液(15 mg/mL)、FA サプリメント(FA 200 µg/Tab)、ビタミン B コМПレックス(FA 200 µg/Tab)を用いた。葉酸製剤(フォリアミン錠、フォリアミン注射液)中の葉酸は表示値の 100-103%であり、日本薬局方の規定値内であった。2種のサプリメントも表示値に対し 100-102%であり、良好な値が得られた。従って、本法は葉酸製剤やサプリメントの品質管理・評価に十分使用できるものと考えられる。

(4) ラット血液試料中の葉酸類の定量。HPLC-CL 法を用いて、血液試料中の葉酸類の定量を試みた。葉酸類がホモシステイン濃度と連動して動脈硬化のマーカーになることを期待したものである。ラット全血試料に葉酸、テトラヒドロ葉酸、5-メチルテトラヒドロ葉酸の標準品を添加し、MeOH で除タンパク後、直接注入してクロマトグラムを得た。図 6 に示すように 5-メチルテトラヒドロ葉酸が未添加の試料から検出されたが、葉酸及びテトラヒドロ葉酸は検出できなかった。現在、葉酸類が不安定な性質であることから安定剤を含め、検出条件を再検討しているところである。少なくとも本検討条件化で 5-メチルテトラヒドロ葉酸の定量が可能であることが示唆されたので、今後この化合物を中心にホモシステイン濃度との関連性を検討する

Chromatograms of rat whole blood



予定である。

図 6. ラット全血のクロマトグラム

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 5 件)

1. S. Ichinose, M. Nakamura, M. Maeda, R. Ikeda, M. Wada, M. Nakazato, Y. Ohba, N. Takamura, T. Maeda, R. Ikeda, K. Aoyagi, K. Nakashima: A validated HPLC-fluorescence method with a semi-micro column for routine determination of homocysteine,

cysteine and cysteamine, and the relation between the thiol derivatives in normal human plasma, Biomed. Chromatogr., 査読有、23, 935-939 (2009).

2. 和田光弘、中島憲一郎: 蛍光および化学発光法と臨床分析化学、臨床化学、査読有、39(1), 6-14 (2010).

3. K. Nakashima: Development and application of sensitive methods with luminescence detection of biologically active compounds, J. Health Sci., 査読有、57, 10-21 (2011).

4. M. Nakazato, N. Takamura, K. Kadota, H. Yamasaki, H. Mukae, Y. Kusano, K. Nakashima, Y. Ozono, K. Aoyagi, S. Kohno, T. Maeda: The association between atherosclerosis and plasma homocysteine concentration in the general population residing on remote islands in Japan, Acta Med. Nagasaki, 査読有、55, 47-54 (2011)

5. 田淵直人、池田理恵、和田光弘、黒田直敬、中島憲一郎: HPLC-ルテニウム錯体化学発光定量による葉酸含有医薬品及びサプリメントの分析、長崎県総合公衆衛生研究会誌、査読無、44, 12-13 (2012).

〔学会発表〕(計 5 件)

1. 一山公佑、池田理恵、和田光弘、前田隆浩、中島憲一郎: ルテニウム錯体化学発光を用いる新規葉酸定量法の開発の基礎的検討、日本薬学会第 130 年会、2010 (岡山)

2. 前田麻由、中村真裕美、池田理恵、和田光弘、中里未央、前田隆浩、高村昇、青柳潔、中島憲一郎: 健康人血漿チオール化合物の定量とその解析、第 49 回日本臨床化学会年次学術集会、2009 (長崎)

3. 一山公佑、池田理恵、和田光弘、前田隆浩、中島憲一郎: ルテニウム錯体化学発光によるサプリメント錠剤中葉酸の定量、第 27 回日本薬学会九州支部大会、2010 (長崎)

4. 中島憲一郎、一山公佑、池田理恵、和田光弘、前田隆浩、黒田直敬: ルテニウム錯体-Ce 化学発光系による葉酸の簡便分析法の開発、生物発光化学発光研究会第 27 会学術講演会、2010 (東京)

5. 田淵直人、池田理恵、和田光弘、黒田直敬、中島憲一郎: 第 49 回長崎県公衆衛生研究会、2012 (長崎)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

名称:

発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中島 憲一郎 (NAKASHIMA KENNICHIRO)
長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授
研究者番号：30039656

(2) 研究分担者

和田 光弘 (WADA MITSUHIRO)
長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・准教授
研究者番号：40295093

(3) 連携研究者

()

研究者番号：