

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25年4月22日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22390116

研究課題名（和文）キノン選択的化学発光分析法による生体キノンの定量・探索とその臨床化学的応用

研究課題名（英文）Development of selective chemiluminescence assay for biological quinones and its application to clinical investigation

研究代表者

黒田 直敬 (NAOTAKA KURODA)

長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号：50234612

研究成果の概要（和文）：生体にはコエンザイム Q_{10} やビタミン K などのキノン類が存在し、電子伝達系や血液凝固に関わるなど重要な役割を担っている。一方で、ある種のキノンは生体成分との付加体形成による機能阻害や、活性酸素発生作用による酸化ストレスを通じて生体へと様々な悪影響を与えるとされている。本研究では、キノンに特徴的な光化学反応及び酸化還元反応を利用して、生体関連キノンの高感度かつ選択的な化学発光分析法を開発した。さらに、開発した方法を実際に生体試料へと応用し、その臨床化学研究における有用性を評価した。

研究成果の概要（英文）：Quinones are interesting compounds which have several important roles in biological functions such as mitochondrial electron transport chain and blood coagulation. On the other hand, quinones are regarded as a class of toxins which can cause a variety of hazardous effects on living health by the covalent binding to the protein and DNA, or the generation of reactive oxygen species through the redox cycle in biological system. In this study, sensitive and selective determination methods for biological quinones were developed based on the specific photoreaction and redox reaction of quinone and applied to biological samples to evaluate the usefulness of the developed method in clinical investigation.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	5,300,000	1,590,000	6,890,000
2011年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2012年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	7,700,000	2,310,000	10,010,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：病態検査学

キーワード：臨床化学、生体キノン、化学発光、ハイスループット分析、高速液体クロマトグラフィー

1. 研究開始当初の背景

生体にはコエンザイム Q_{10} (CoQ_{10}) やビタミン K などのキノン類が存在し、電子伝達系や血液凝固に関わるなど重要な役割を担っている。また、最近になって酸化還元酵素の

補酵素として働くピロロキノリンキノンが発見されたことを契機に、キノン型補酵素であるトパキノン、トリプトファントリプトフィルキノン等が発見され、これらキノンやこれを含むキノプロテインの生理機能にも関心が注がれている。一方、最近になってキノ

ンの毒性が注目されつつある。すなわち、17 β -estradiol などのエストロゲンは、代謝経路の一つとしてチトクローム p450(CYP) 1A1 や 1B1 によってカテコールエストロゲンへと酸化され、さらにキノン体になることが知られている。これらのキノンには高い反応性が有り、DNA の核酸塩基やタンパク質のアミノ基やチオール基に対して容易に付加反応を起こし、結果として DNA の修飾やタンパク質の機能阻害をもたらすとされている。このようなキノンと生体成分との反応により、乳癌を代表とする種々の癌の発癌リスクが高まるものと考えられる。一方、キノンは環境中にも広く存在しており、大気粉じんやディーゼル排気微粒子中には 9,10-フェナンスレンキノンなどの多環芳香族炭化水素 (PAH) キノンが見出されており、一部の農薬もキノン構造を有している。また、PAH 自体も生体に取り込まれた際に、その一部は CYP による酸化を受け、カテコール体を経由してキノンとなることが提唱されている。これらのキノンも DNA 修飾やタンパク質の機能阻害を引き起こすと言われており、今後、環境汚染や喫煙による肺癌等との関連性に注目が集まるものと考えられる。さらに、キノンは生体内でその酸化還元サイクルに組み込まれることで、NADPH レダクターゼ等と反応して活性酸素 (ROS) を産生することが知られている。このキノンの酸化還元サイクルに伴って発生する ROS も DNA をはじめとする生体成分に酸化的な傷害を与える一因であると考えられる。従って、生体試料中に存在するキノンの種類や濃度を明らかにし、その生体影響を評価することは臨床化学的、毒性学的な観点から極めて重要であり、そのためのキノンの高感度かつ選択的な分析法が必要とされている。

2. 研究の目的

申請者らはこれまでに、様々なキノンに紫外線を照射すると特異的な分解物である 3,6-ジヒドロキシフタル酸が生じ、これがルミノール化学発光や過シュウ酸エステル化学発光を著しく増強することを見出してきた。また、キノンへの UV 照射に伴って ROS が生じることも証明している。このように UV 照射によって発光増強剤 (エンハンサー) と ROS を同時に与える化合物はキノンのみである。従って、この 2つの現象を組み合わせることで、複雑なマトリクスで構成される生体試料からキノンのみを選択的に検出できる高感度な化学発光分析法の構築が可能である。

さらに申請者は、上記の方法とは異なった原理に基づくキノンの選択的定量法として、キノンの酸化還元サイクルを利用する化学発光分析法を開発している。本法は、キノン

をジチオスレイトール (DTT) のような化学的還元剤により還元することで、その酸化還元サイクルを誘起させ、これにより発生する ROS をルミノールにより化学発光検出するという原理に基づく方法であり、共存成分の影響を受けることなく生体内のキノンの定量が可能である。

本研究では、キノンの生体影響評価を目的として、上記の原理に基づく生体キノンの簡便かつ迅速な新規化学発光分析法の開発を行う。さらに、開発した試料を生体試料へと応用し、生体成分に付加したキノンの一斉分析と探索を行うことが本研究の目的である。

3. 研究の方法

(1) 時間分解蛍光プレートリーダーによるキノンの迅速定量法

最初に、キノンへの紫外線照射とそれに伴う ROS の発生を利用する簡便かつ迅速なキノンの化学発光分析法の開発を行った。このとき、測定操作の省力化とさらなる迅速化のために、キノンへのパルス紫外線照射とそれに続く発光検出を時間分解蛍光測定が可能でプレートリーダーを用いて行った。

96 穴マイクロプレートのウェルにキノンの炭酸緩衝液溶液 (pH 9.4) 及びルミノール誘導体 L-012 の炭酸緩衝液溶液 (pH 9.4) を添加した後、プレートリーダーにセットし、波長 250 nm の紫外線をパルス照射する。紫外線照射後 500 μ s から 2000 μ s の間に生じる発光を波長 450 nm において測定する。この測定操作を 100 回繰り返して、得られた発光量について積算することにより定量を行った。

(2) ビタミン K 類のオンライン紫外線照射 HPLC 化学発光定量法

紫外線照射を利用するキノンの化学発光分析法を高速液体クロマトグラフィー (HPLC) と組み合わせることにより、重要な生体内キノンであるビタミン K 類の高感度な定量法を開発した。すなわち、カラムで分離後のビタミン K 類にオンラインで紫外線を照射後、ルミノール誘導体 L-012 を含む溶液と混合し、生じる発光を検出するという方法である。HPLC の移動相には 500 mM imidazole-硝酸緩衝液 (pH 9.0) とアセトニトリルの混液を用い、分離カラムとして Capcellpack ODS UG 120 (35 x 1.5 mm, i.d.) を使用した。ビタミン K 類への紫外線照射は、カラムからの溶出液を紫外線ランプ (254 nm, 16W) に巻き付けたテフロンチューブに導入することにより行った。

(3) 酸化還元サイクルを利用する HPLC-化学発光定システムの確立とキノン及びその生体成分付加体の一斉分析への応用

酸化還元サイクルを利用するキノンの化学発光分析法により、キノンとその生体成分付加体とを同時分析することが可能な HPLC システムの開発を行った。本 HPLC システムは、3 台の送液ポンプ、試料注入部、分離カラム、反応コイル、化学発光検出器及び記録計により構成される。キノン類の分離に用いる移動相として 5 mM 臭化テトラブチルアンモニウムを含む 5 mM Tris-硝酸緩衝液 (pH7.4) とアセトニトリルの混液、分離カラムとして Cosmosil 5C18-AR-II (250 x 4.6 mm, i.d.) を選択した。カラムからの溶出液に、還元剤として 1 mM DTT のアセトニトリル溶液及び 1 mM ルミノールの 20 mM 水酸化ナトリウム水溶液を混合した。酸化還元反応を十分に進行させてから検出を行うために、混合溶液を内径 0.5 mm 及び長さ 15 m の反応コイルに通過後で化学発光検出器に導入し、発光強度をクロマトグラムとして記録する。得られたクロマトグラムを解析することにより、生体内でのキノン及びその付加体の探索・定量を行った。

4. 研究成果

(1) 時間分解蛍光プレートリーダーによるキノンの迅速定量法の開発と生体分析への応用

9,10-アントラキノン等のキノン溶液と L-012 溶液を混合したウェルに対し、パルス紫外線照射を行うことにより、キノン濃度に比例してその強度が上昇する発光が観察された。本法においては、9,10-アントラキノンをはじめとする *p*-キノンでは強い発光が得られるのに対し、9,10-フェナンスレンキノン等の *o*-キノンは発光を示さないという結果となった。より高い感度を得る目的で各種反応条件の最適化を行った。その結果、最も高い発光が得られる紫外線の照射波長は 250 nm であり、この波長は用いたキノンの吸収波長とよく一致していた。したがって、キノンが紫外線を吸収することによりセミキノンラジカルへと変化していると考えられた。一方で、最適な測定発光波長は L-012 の発光波長である 450 nm 付近であったことから、本法で観察される発光は L-012 の酸化分解に由来するものだと考えられた。これらの結果及び各種活性酸素の選択的消去剤を用いた検討により、本発光反応のメカニズムを考察したところ、キノンに紫外線をパルス照射することでキノンはセミキノンラジカルへ

と変化し、これに伴って発生するスーパーオキシドアニオン (O_2^-) がルミノール誘導体 L-012 を酸化することで発光が生じたと考えられた (Fig. 1)。

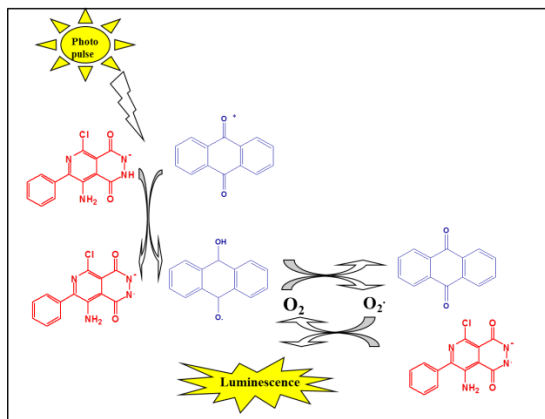


Fig. 1. キノンの推定化学発光反応機構

測定 pH、L-012 濃度、測定時間及び測定回数といった条件の最適化を行った後で、本法で高い発光を示した 3 種のキノン (9,10-アントラキノン、1,4-ナフトキノン及び メナジオン) について検量線を作成した結果、いずれのキノンについても 0.05-150 μ M の濃度範囲で発光強度と濃度との間に相関係数 0.999 以上の直線関係が得られた。また、本法におけるメナジオンの検出下限 (Blank + 3SD) は 0.01 μ M であり、この値は吸光度法や GC-MS 法といった既存の方法と比較して 3-2000 倍程度高感度であった。また、本法の 1 試料あたりの測定時間は 5 秒と、他の方法よりも 10-480 倍短い時間で測定可能であり、本法がキノンのハイスループット分析法として有用であることが明らかとなった。

さらに、本法をヒト血清中のメナジオンの測定へと応用した結果、89%以上の良好な回収率で血清内在成分の影響を受けることなく、メナジオンを測定することが可能であった。

(2) ビタミン K 類のオンライン紫外線照射 HPLC 化学発光定量法

HPLC カラムで分離後の 3 種類のビタミン K 類にオンラインで紫外線を照射した後で L-012 溶液と混合することにより、これらのビタミン K の濃度に依存的な化学発光ピークが観察された。紫外線照射及び化学発光反応条件を最適化後のビタミン K 類の検出下限 (S/N=3) は 0.03-0.10 ng/mL と高感度であり、さらに生体成分の影響を受けず極めて選択的に血漿中のビタミン K 類を定量可能であった (Fig. 2)。本法により、健康人及び関節リウマチ患者より得られた血漿試料中

ビタミン K 濃度を測定し、その値を比較した。その結果、ビタミン K₁ 濃度に有意な差は観察されなかった一方で、ビタミン K₂ 濃度は健常人と比較して関節リウマチ患者で有意に低値を示した。さらに、関節リウマチの重症度に伴って血漿中 ビタミン K₂ 濃度が低下していく傾向が見られた。したがって、関節リウマチの発症に血漿中ビタミン K₂ 濃度が関係することが示唆された。

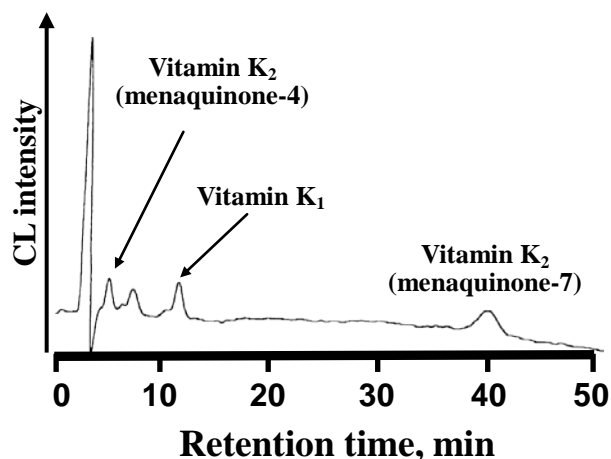


Fig. 2. ヒト血漿中ビタミン K 類の化学発光クロマトグラム

(3) 酸化還元サイクルを利用する HPLC-化学発光定システムの確立とキノン及びその生体成分付加体の一斉分析への応用

本研究では、メナジオンをキノンのモデル化合物として選択した。また、キノンの生体成分付加体の研究モデルとして、生体内でのキノンの解毒に関与すると考えられている *N*-アセチルシステイン及びグルタチオン、チオール基とメナジオンがマイケル付加を起こして生じる化合物 MQ-NAC 及び MQ-GS を合成して標準物質として使用した (Fig. 3)。

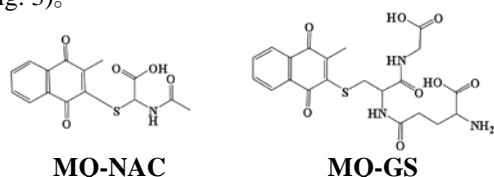


Fig. 3. メナジオン付加体 MQ-NAC 及び MQ-GS の構造

最初に、ルミノメーターを用いて、メナジオン、MQ-NAC 及び MQ-GS について、ルミノール及び DTT と混合後の発光強度を測定した。その結果、これらの化合物すべてで強い発光が観察され、これらが DTT によりセミキノンラジカルへと還元され、このラジカルが溶存酸素を活性酸素へと変換するこ

とで発光が生じたと考えられた。また、MQ-NAC 及び MQ-GS の与える発光強度はメナジオンと比較して高いという結果となった。この結果より、メナジオンへの *N*-アセチルシステイン及びグルタチオンへの付加はメナジオンの活性酸素発生能を増強している可能性が示唆され、生体内でのキノン付加体の測定の重要性が改めて確認された。

次に、キノン及びその付加体の同時分析を目的とする HPLC システムの確立を行った。分離条件を検討した結果、移動相にイオン対試薬として臭化テトラブチルアンモニウムを添加することでキノン付加体は逆相カラムへと保持され、MQ-NAC, MQ-GS 及びメナジオンはそれぞれ保持時間 10、14 及び 36 分に検出された。各種化学発光反応条件を最適化後、検量線を作成した結果、5-240 nM の濃度範囲で濃度とピーク高さとの間に良好な直線性が得られた。また、本法による MQ-NAC, MQ-GS 及びメナジオンの検出下限 (S/N=3) はそれぞれ 1.4, 0.8 及び 128 fmol/injection であった。

開発した HPLC 定量法を、メナジオンを投与後のラット血清試料へと応用した。その結果、ラット血清より MQ-NAC 及び MQ-GS のピークが検出され (Fig. 4)、投与されたメナジオンがラットの体内に存在する *N*-アセチルシステイン及びグルタチオンと反応することで MQ-NAC 及び MQ-GS が生成したと考えられた。また、ラット血清より得られたクロマトグラムには MQ-NAC 及び MQ-GS 以外にもメナジオン投与後にはじめて検出されるピークの存在が見出されており、これらが MQ-NAC 及び MQ-GS と同様にキノンにより修飾された生体成分だと考えられた。本研究で開発した HPLC システムは生体内に存在するキノン付加体を選択的かつ一斉に測定することが可能であり、これら付加体の生成が生体に与える影響を調査するために有用である。

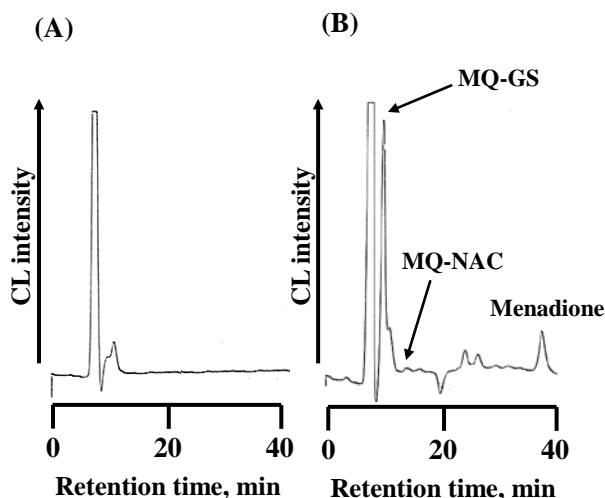


Fig. 4. (A) メナジオン投与前及び (B) 投与後のラット血漿クロマトグラム

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 26 件)

1. Elgawish MS, Shimomai C, Kishikawa N, Ohyama K, Nakashima K, Kuroda N: Microplate analytical method for quinones by pulse photo-irradiation and chemiluminescence detection. *Analyst* 137: 4802-4808, 2012. [査読あり]

2. Ohyama K, Shiokawa A, Ito K, Masuyama R, Ichibangase T, Kishikawa N, Imai K, Kuroda N: Toxicoproteomic analysis of a mouse model of nonsteroidal anti-inflammatory drug-induced gastric ulcers. *Biochem Biophys Res Commun* 420: 210-215, 2012 [査読あり]

3. Chihara K, Kishikawa N, Ohyama K, Nakashima K, Kuroda N: Determination of glyoxylic acid in urine by liquid chromatography with fluorescence detection, using a novel derivatization procedure based on the Petasis reaction. *Anal Bioanal Chem* 403: 2765-2770, 2012. [査読あり]

4. Ohyama K, Kawakami A, Tamai M, Baba M, Kishikawa N, Kuroda N: Serum immune complex containing thrombospondin-1: a novel biomarker for early rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 71: 1916-1917, 2012. [査読あり]

5. Wada M, Ochi Y, Nogami K, Ikeda R, Kuroda N, Nakashima K: Evaluation of hair roots for detection of methamphetamine and 3,4-methylenedioxymethamphetamine abuse by use of an HPLC-chemiluminescence method. *Anal Bioanal Chem* 403: 2569-2576, 2012. [査読あり]

6. Wada M, Kira M, Nakaji Y, Ikeda R, Kuroda N, Nakashima K: Development of a novel method for monitoring the antioxidative effect of ascorbic acid in rat blood. *Food Chem* 134: 546-552, 2012. [査読あり]

7. Kuroda N: Current Topics, Challenge of mass spectrometry toward the elucidation of life phenomena –Foreword–. *Biol Pharm Bull* 35: 1392, 2012. [査読あり]

8. Ohyama K, Kuroda N: Proteomic approaches to profile the humoral immune response and identify disease-associated antigens. *Biol Pharm Bull* 35: 1409-1412, 2012. [査読あり]

9. 今里孝宏, 植木幸孝, 平方尚之, 黒田直敬, 岸川直哉, 矢野正生, 柴輝男, 大西紀子, 井越尚子, 下村弘治, 足立哲夫, 鈴木直季, 谷山松雄, 前畑英介: 関節リウマチ (RA) 患者の酸化ストレス度: ものさし “GAP 比” の導入とその応用について-Sampled Studies のアプローチ-, *生物試料分析* 35 (3): 225-233, 2012. [査読あり]

10. Kishikawa N, Ohkuma M, Wada M, Ohyama K, Ikeda R, Nakashima K, Kuroda N: Labeling of alprenolol with fluorescent aryl iodide as a reagent based on Mizoroki-Heck coupling reaction. *J Chromatogr A* 1218 (20): 3002-3006, 2011. [査読あり]

11. Ohyama K, Ueki Y, Kawakami A, Kishikawa N, Tamai M, Osaki M, Kamihira S, Nakashima K, Kuroda N: Immune complexome analysis of serum and its application in screening for immune complex antigens in rheumatoid arthritis. *Clin Chem* 57 (6): 905-909, 2011. [査読あり]

12. Kishikawa N, Ohkubo N, Ohyama K, Nakashima K, Kuroda N: Selective determination of ubiquinone in human plasma by HPLC with chemiluminescence reaction based on the redox cycle of quinine. *Anal Bioanal Chem* 400 (2): 381-385, 2011. [査読あり]

13. Ahmed S, Kishikawa N, Ohyama K, Imazato T, Ueki Y, Kuroda N: Selective chemiluminescence method for monitoring of vitamin K homologues in rheumatoid arthritis patients. *Talanta* 85 (1): 230-236, 2011. [査読あり]

14. Kishikawa N, Nakao M, Elgawish MS, Ohyama K, Nakashima K, Kuroda N: 4-Carbomethoxybenzaldehyde as a highly sensitive pre-column fluorescence derivatization reagent for 9,10-phenanthrenequinone. *Talanta* 85 (1): 809-812, 2011. [査読あり]

15. Ohyama K, Horiguchi D, Kishikawa N, Kuroda N: Monolithic poly(butyl methacrylate-ethylene dimethacrylate-methacrylic acid) column for capillary electrochromatography. *J Sep Sci* 34 (16-17): 2279-2283, 2011. [査読あり]

16. Ohyama K, Oyamada K, Kishikawa N, Wada M, Ohba Y, Nakashima K, Kuroda N: Effects of temperature and mobile phase condition on chiral recognition of poly(L-phenylalanine) chiral stationary phase. *Chromatographia* 74 (5-6):

467-470, 2011. [査読あり]

17. Wada M, Abe K, Ikeda R, Kikura-Hanajiri R, Kuroda N, Nakashima K: HPLC determination of methylphenidate and its metabolite, ritalinic acid, by high-performance liquid chromatography with peroxyoxalate chemiluminescence detection. Anal Bioanal. Chem. 400 (2): 387-393, 2011. [査読あり]

18. Wada M, Kira M, Kido H, Ikeda R, Kuroda N, Nishigaki T, Nakashima K: Semi-micro flow injection analysis method for evaluation of quenching effect of health foods or food additive antioxidants on peroxydinitrite. Luminescence 26 (3): 191-195, 2011. [査読あり]

19. Ohyama K, Fukahori Y, Nakashima K, Sueyoshi T, Kishikawa N, Kuroda N: Adamantyl-functionalized polymer monolith for capillary electrochromatography. J Chromatogr A 1217: 1501-1505, 2010. [査読あり]

20. Yamaguchi S, Kishikawa N, Ohyama K, Ohba Y, Kohno M, Masuda T, Takadate A, Nakashima K, Kuroda N: Evaluation of chemiluminescence reagents for selective detection of reactive oxygen species. Anal Chim Acta 665: 74-78, 2010. [査読あり]

21. Ohyama K, Sueyoshi T, Kishikawa N, Nakashima K, Kuroda N: Study on the timing of degassing for reproducible preparation of polymer-based monolithic columns. Chromatographia 71: 971-973, 2010. [査読あり]

22. Kishikawa N, Nakashima H, Ohyama K, Nakashima K, Kuroda N: Determination of 9,10-phenanthrenequinone in airborne particulates by high-performance liquid chromatography with post-column fluorescence derivatization using 2-aminothiophenol. Talanta 81: 1852-1855, 2010. [査読あり]

23. Kishikawa N, Ohyama K, Yao J, Miyamoto A, Imazato T, Ueki Y, Nakashima K, Maehata E, Kuroda N: Automated analysis of the serum antioxidative activities against five different reactive oxygen species by sequential injection system with a chemiluminescence detector. Clin Chim Acta 41: 1111-1115, 2010. [査読あり]

24. Ohyama K, Tomonari M, Ichibangase T, To H, Kishikawa N, Nakashima K, Imai K, Kuroda N: A toxicoproteomic study on cardioprotective effect of pre-administration of docetaxel in a mouse model of adriamycin-induced

cardiotoxicity. Biochem Pharmacol 80: 540-547, 2010. [査読あり]

25. Lawrence LA, Kishikawa N, Ohyama K, Harada S, Nakashima K, Kuroda N: Peroxyoxalate chemiluminescence detection for the highly sensitive determination of fluorescence labeled chlorpheniramine with Suzuki coupling reaction. Anal Bioanal Chem 398: 823-829, 2010. [査読あり]

26. Wada M, Abe K, Ikeda R, Harada S, Kuroda N, Nakashima K: Enhancement of peroxyoxalate chemiluminescence intensity by surfactants and its application to detect detergent. Talanta 81: 1133-1136, 2010. [査読あり]

[学会発表] (計 15 件)

1. 黒田直敬、下舞千香子、Elgawish Mohamed Saleh、岸川直哉、大山 要: 生体キノンの化学発光マイクロプレートアッセイのための基礎的検討, 第 24 回日本臨床化学会九州支部総会, 那覇, 2013 年 2 月 9 日.

2. 岸川直哉、下舞千香子、Elgawish Mohamed Saleh、大山 要、中島憲一郎、黒田直敬: マイクロプレートリーダーを用いるパルス紫外線照射によるキノンの化学発光分析法, 第 72 回分析化学討論会, 鹿児島, 2012 年 5 月 19 日.

3. 樋口 翔, 岸川直哉, 大山 要, 中島憲一郎, 黒田直敬: パーキンソン病誘発物質 MPP⁺ の SIA/紫外線照射/化学発光検出, 第 29 回日本薬学会九州支部大会, 熊本, 2012 年 12 月 9 日.

4. 樋口 翔, 岸川直哉, 大山 要, 中島憲一郎, 黒田直敬: シーケンシャルインジェクションに基づくパーキンソン病誘発物質 MPP⁺ の全自動化学発光分析法の開発, 日本薬学会第 132 年会, 札幌, 2012 年 3 月 30 日.

5. 黒田直敬: 臨床化学への薬学的アプローチ, 第 51 回日本臨床化学会年次学術集会, 札幌, 2011 年 8 月 27 日.

6. 樋口 翔, 岸川直哉, 大山 要, 中島憲一郎, 黒田直敬: パラコート[®]のオンサイト分析を目的とするルミノール化学発光定量法の開発, 日本法中毒学会第 30 年会, 長崎, 2011 年 6 月 10 日.

7. Elgawish MS, Shimomai C, Kishikawa N, Ohyama K, Nakashima K, Kuroda N: Microplate analytical method for quinines by pulse

photo-irradiation and chemiluminescence detection, 生物発光化学発光研究会第 28 回学術講演会, 長崎, 2011 年 10 月 8 日.

8. 樋口 翔, 岸川直哉, 大山 要, 中島憲一郎, 黒田直敬: パーキンソン病誘発物質 MPP⁺ のシーケンシャルインジェクション化学発光分析法の開発, 生物発光化学発光研究会第 28 回学術講演会, 長崎, 2011 年 10 月 8 日.

9. 野上久美, 池田理恵, 和田光弘, 黒田直敬, 中島憲一郎: ラット血漿・毛根・毛幹中のメタンフェタミンの HPLC-化学発光定量と毛髪移行性評価, 生物発光化学発光研究会第 28 回学術講演会, 長崎, 2011 年 10 月 8 日.

10. 小林ちひろ, 池田理恵, 和田光弘, 天島道夫, 黒田直敬, 中島憲一郎: ルミノール化学発光による簡便・迅速なブルーベリーの抗酸化活性評価, 生物発光化学発光研究会第 28 回学術講演会, 長崎, 2011 年 10 月 8 日.

11. 黒田直敬: 化学発光と臨床化学分析, 生物発光化学発光研究会第 27 回学術講演会, 東京, 2010 年 10 月 30 日.

12. Kuroda N, Ohkubo N, Kishikawa N, Ohyama K, Nakashima K: "Selective determination of ubiquinone in human plasma by HPLC with a chemiluminescence reaction based on the redox cycle of quinone" XIV. International Symposium on Luminescence Spectrometry. Prague, Czech Republic, 2010 年 7 月 14 日.

13. 岸川直哉, Adutwum Lawrence Asamoah, 大山 要, 中島憲一郎, 黒田直敬: Suzuki coupling 反応を利用するクロルフェニラミン及び代謝物の HPLC-過シュウ酸エステル化学発光定量法の開発, 第 17 回クロマトグラフィシンポジウム, 広島, 2010 年 6 月 4 日.

14. 岸川直哉, Sameh Ahmed, 大山 要, 今里孝宏, 植木幸孝, 中島憲一郎, 黒田直敬: リウマチ患者血清中ビタミン K 類の光誘起ルミノール化学発光定量, 日本分析化学会第 59 年会, 仙台, 2010 年 9 月 17 日.

15. 岸川直哉, 大山 要, 今里孝宏, 中島憲一郎, 前畑英介, 黒田直敬: 血清アルブミンに対する発光測定試薬を用いる血清中酸化・還元アルブミン比の測定法の開発, 第 50 回日本臨床化学会年次学術集会, 甲府, 2010 年 9 月 24 日.

[図書] (計 2 件)

1. Ahmed S, Kishikawa N, Ohyama K, Kuroda N: Quantification of vitamin K in foods. In Fortified Foods with Vitamins: Analytical Concepts to Assure Better and Safer Products (Rychlik Meds; Wiley & Sons, New York) pp. 237-256, 2011

2. 黒田直敬, 岸川直哉, 大山 要: キノンの選択的発光検出法とその臨床化学的応用. 臨床化学, 39, 15-21 (2010).

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称: 免疫複合体の網羅的解析方法および新規調節リウマチバイオマーカー

発明者: 黒田直敬, 大山 要, 岸川直哉

権利者: 長崎大学

種類: 特許権

番号: 特願 2010-231935

出願年月日: 2011 年 10 月 14 日

国内外の別: 国内

○取得状況 (計 1 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

6. 研究組織

(1)研究代表者

黒田 直敬 (KURODA NAOTAKA)

長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号: 50234612

(2)研究分担者

大山 要 (OHYAMA KANAME)

長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・准教授

研究者番号: 50437860