

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 17 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590044

研究課題名(和文) 赤血球中葉酸類の超高感度定量法の開発とその臨床応用

研究課題名(英文) Determination of folates in human blood by LC-MS/MS

研究代表者

和田 光弘 (Wada, Mitsuhiro)

長崎大学・医歯(薬)学総合研究科・准教授

研究者番号：40295093

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：研究期間を通してヒト全血中 4 種の葉酸類(葉酸、テトラヒドロ葉酸、5-メチルテトラヒドロ葉酸および5-ホルミルテトラヒドロ葉酸)の定量が可能な液体クロマトグラフィータンデム質量分析法を開発することができた。本法は全血中葉酸の定量に必要なバリデーションを備えていた。さらに本法を 479 検体の健康人血液に適用し、その実用性を示すことができた。

研究成果の概要(英文)：An LC-MS/MS method was developed for determination of 4 folate derivatives such as folic acid, tetrahydrofolate, 5-methyltetrahydrofolate and 5-formyltetrahydrofolate in human whole blood. The method was enough sensitive to determine the folates in blood. The limit of detection were in the range of 0.13 nM-1.10 nM at signal-to-noise ratio of 3. Furthermore, the method could be successfully applied to determine the folate in healthy human blood.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：物理系薬学

キーワード：葉酸 LC-MS/MS ヒト血液

1. 研究開始当初の背景

葉酸 (FA) は、ビタミン B 群に属する水溶性ビタミンであり、生体内では DNA 合成や細胞分裂に必須な補酵素である。近年、新生児の神経管閉鎖障害 (Zhang et al., Exp. Neurol., 212, 515-521(2008)) やアルツハイマー痴呆症 (Clarke et al., Arch. Neurol., 55, 1449-1455 (1998))、動脈硬化性疾患 (Durga et al., Atherosclerosis, 179, 285-292(2005)) 及びダウン症候群 (Takamura et al., Eur. J. Clin. Nutr., 43, 285-287 (2006)) 等との関連性が明らかになってきており、これらに対する予防因子として FA が注目されている。

一方、動脈硬化性疾患やダウン症候群の危険因子として含硫アミノ酸の一種であるホモシステイン (Hcy) が注目されている。Hcy は代謝サイクルに参与する一部の酵素の遺伝子変異により血中濃度が上昇し、これが疾患を引き起こす原因の 1 つと考えられている。申請者はこれまで、血中 Hcy 及びその関連物質測定法を開発し、これを長崎県の特定地域での住民集団検診で得られた血液試料に適用し、年齢・性別あるいは遺伝多型等の要因に関する解析を実施した。さらにこれらの要因において生活環境の異差が Hcy 濃度に影響を与えている可能性を示唆した。

生体に摂取された FA は、還元されジヒドロ葉酸 (DHT)、テトラヒドロ葉酸 (THF) となり、さらに 5,10-メチレンテトラヒドロ葉酸 (5,10-DMTHF) を経て 5-メチルテトラヒドロ葉酸 (5-MTHF) となる(図 1)。5-MTHF は、前述の Hcy をメチオニンに再メチル化する際のメチル基供与体となることから Hcy 代謝過程に不可欠である(図 1)。血漿中 Hcy 濃度の上昇は、FA の摂取により改善することから FA 関連化合物も Hcy と何らかの関連性があると考えられる。そこで FA 代謝経路中の各化合物を定量することで、Hcy の代謝状況に関する情報が得られ、ひいては動脈硬化症等との関連性を明らかにするための重要な知見が得られると考えた。

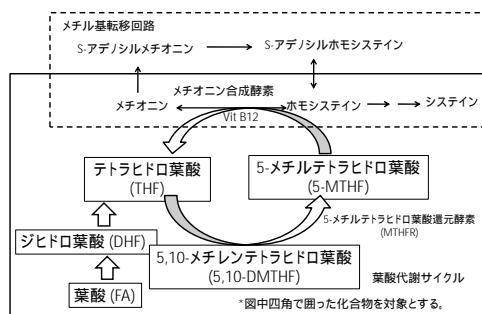


図 1 FA の代謝経路と Hcy 代謝との関連性

2. 研究の目的

FA による血中の高総葉酸状態の有害性についてはさらなる研究が必要であるが、これを明らかにするには血中の総葉酸量を正しく評価する必要がある。血中総葉酸量の指標としては、血清中総葉酸量と赤血球中総葉酸

量が用いられている。前者は直近の葉酸類摂取状況を反映し、後者は赤血球の寿命である 4 か月間の平均葉酸類摂取状況を反映する。神経管閉鎖障害を例にとると、そのリスク低減には妊娠前 4 週からの葉酸類摂取が肝要であるが、検査直前の摂取状況に左右される血清中の総葉酸量では体内総葉酸量が本当に適切な値まで上昇したかが判断できない。従ってより臨床的に測定意義があるのは赤血球中の総葉酸量であると考えられる。

しかし、赤血球を全血から分離後、測定する方法では、ポリグルタミン酸 (Glu) 型をモノ Glu 型に分解するのに一日を要し、全血中総葉酸量から血漿中総葉酸量を差し引いて hematocrit (Ht) で補正する方法では、2 種類の試料を処理し、測定するため時間を要する。

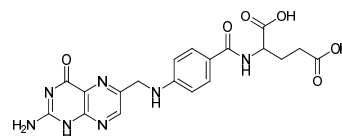
本研究では、全血中の葉酸類はその 90% を赤血球中葉酸類が占めていることから全血中総葉酸量をもって赤血球中総葉酸量と近似することが可能であると考え、測定対象に全血を選定した。生体内の葉酸類の測定には古くから微生物学的定量法が用いられてきたが、菌の培養に一日以上を要するなど時間がかかる。最近では液体クロマトグラフィー-タンデム質量分析計 (LC-MS/MS) による測定が多く報告されており、そのほとんどは安定同位体希釈法を用いたものである。しかし安定同位体標識葉酸類は市販されておらず、入手には試薬メーカーに特注するか、自ら合成する必要がある。

そこで本法は、試薬として市販されている、葉酸類代謝拮抗薬で構造類似体である methotrexate (MTX) を内標準物質として使用し、安価で簡便、迅速な全血中葉酸類の LC-MS/MS 定量方法の開発を目的とした。さらに、開発した方法を健常ヒト全血に適用した。

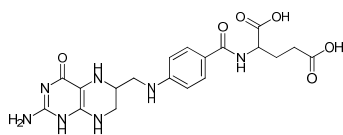
3. 研究の方法

分析対象及び内標準物質

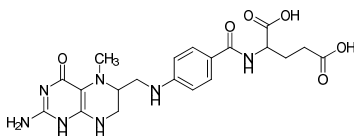
今回分析対象とした葉酸類及び内標準物質 (internal standard, IS) として用いた MTX の構造式を図 2 に示す。また、それぞれの保存標準溶液は 1% (w/v) アスコルビン酸および 0.5% (w/v) ジチオトレイトールを含む 50 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0、以下 solution A と呼称) に溶解し、メタノールと 1:1 で混合して 100 μM になるよう調製した。



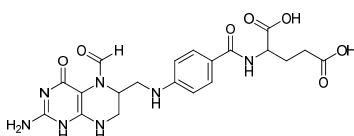
葉酸 (FA)



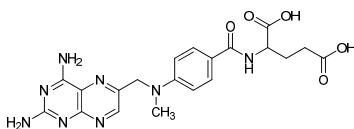
テトラヒドロ葉酸 (THF)



5-メチルテトラヒドロ葉酸 (5-MTHF)



5-ホルミルテトラヒドロ葉酸 (5-FTHF)



メトトレキサート (MTX, IS)

図2 葉酸類及び内標準物質

HPLC システム及び測定条件

分析対象物の分離・定量に用いた LC-MS/MS システム及び測定条件を以下に示す。

HPLC systems and conditions

Spectrometer: Micromass Quattro micro™ API

HPLC: Waters 2695 Separation Module

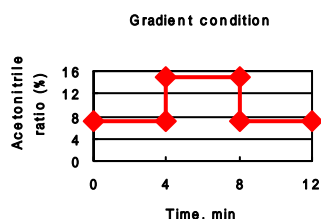
Column: Luna 3u C18 (2) (100 × 4.6 mm, i.d., 3 µm, Phenomenex)

Column temperature: 30

Mobile phase: 1%(w/v) acetic acid/acetonitrile (gradient)

Flow rate: 0.5 mL/min

Injection volume: 10 µL



MS/MS conditions

Ionization: ESI⁺ (electro spray ionization positive mode)

Detection mode: SRM (selected reaction monitoring)

Capillary voltage: 3.5 kV

Cone voltage: 19 V

Collision energy: 18eV

Ion energy 1: -0.5 V

Ion energy 2: 3.0 V

SRM transitions

	m/z	
	Precursor ion	Product ion
5-FTHF	474	327
5-MTHF	460	313
THF	446	299
FA	442	295
MTX	455	308

全血試料の保存及び前処理

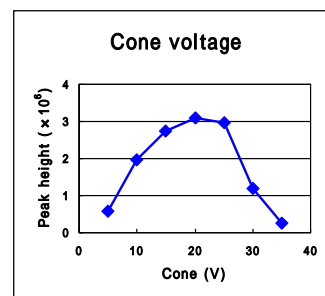
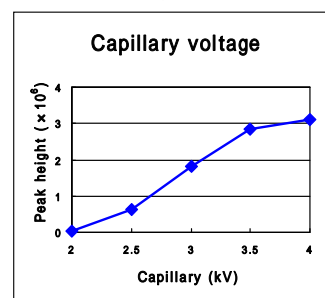
全血試料は、抗凝固剤を含む全血を 1% (w/v) アスコルビン酸 (ASA) 水溶液で 10 倍希釈し、静かに転倒混和する。これを室温、暗所で 30 分間静置後、-30 で保存した。

解凍した全血を遠心分離し、分取した上清 450 µL に、IS (MTX) 溶液 25 µL、1 M の NaOH 6 µL を加え、室温、暗所で 4 時間静置する。4 時間後、0.1% (w/v) ASA - 0.1% (w/v) EDTA 溶液 (以下 solution B と呼称) 500 µL を加え、固相抽出 (SPE) に供した。SPE 溶出液を窒素乾固後、solution A で再溶解し、0.45 µm membrane filter でろ過後、LC-MS/MS に供した。SPE 条件は中村らの報告を参考にした。

4. 研究成果

MS/MS 条件の検討

まず、キャピラリー電圧、コーン電圧、コリジョンエネルギー、イオンエナジー 1 について最適化を行った。これらの結果を図 3 に示す。同濃度の standard 溶液を測定した際、最も強度が小さい THF に合わせて最適化を行い、各項目とも矢印の値を選択した (前述の通り)。最適化の際の THF 濃度は 5 µM である。なお、Ion energy 2 は強度に影響を及ぼさなかったため、他化合物の強度が大きくなった 3.0 V を選択した。



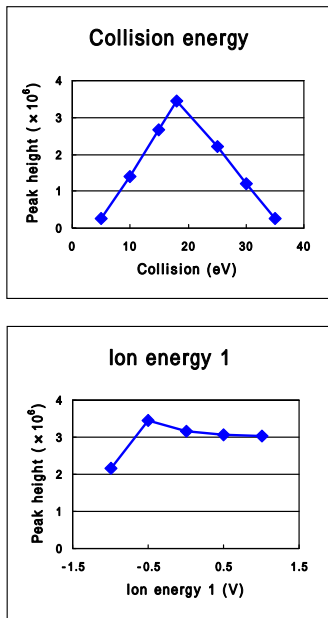


図3 MS/MS条件の最適化

クロマトグラム

葉酸標準品のクロマトグラム及び葉酸標準品添加全血のクロマトグラムを以下に示す。図4.1は標準品各100 nM (IS 25 nM)のクロマトグラム、図4.2は血中濃度として各1 μM (IS 250 nM)の標準品を添加した全血のクロマトグラムである。保持時間は9.4分(5-FTHF)、4.4分(5-MTHF)、9.4分(IS)、3.7分(THF)、9.6分(FA)であった。標準品及びISは全てsolution Aで希釈した。

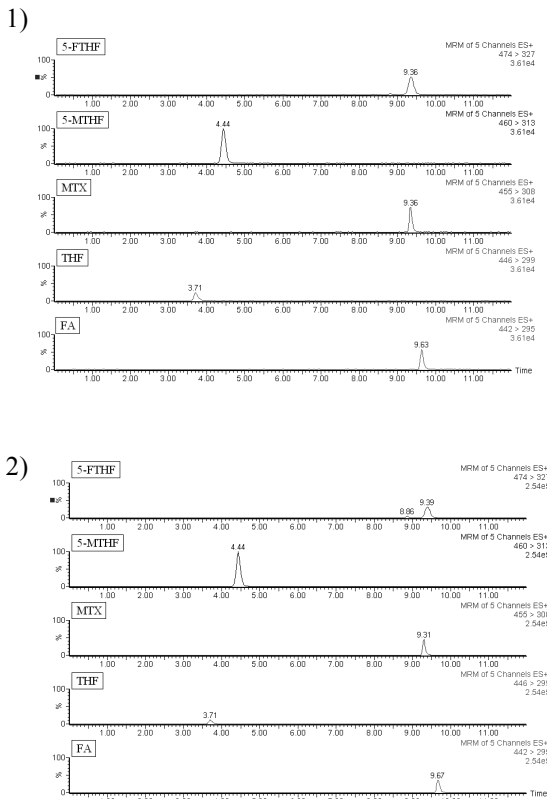


図4 葉酸類のクロマトグラム

バリデーション

各葉酸類標準品を添加した全血試料を用いて添加検量線を作成したところ、表中の濃範囲において良好な直線性 ($r \geq 0.997$) を示した(表1)。回収率は標準品に対するものであり、全血に添加した濃度は5-MTHFが2500 nM、5-FTHF, THF, FAが250 nMである。

表1 添加検量線、検出下限及び回収率

	Range (nM)	r^{*1}	LOD ^{*2} (nM)	Recovery ^{*3} (%)
5-FTHF	5 – 250	0.999	0.24	102.0 ± 5.6
5-MTHF	50 – 2500	0.999	0.13	93.3 ± 5.7
THF	5 – 250	0.997	1.10	46.0 ± 6.0
FA	5 – 250	0.999	0.70	114.7 ± 7.5

*1 Correlation coefficient

*2 LOD: limit of detection at a signal-to-noise ratio of 3

*3 Recovery vs. standard (n=5).

一方、表2には、日内の繰り返し測定における精度を示す。低、中、高の3濃度を添加し、RSD (relative standard deviation) 値で16.3%以下という結果が得られた。

表2 日内・日間測定における精度 (n=5)

	Spiked concentration (nM)	Intra-day precision (RSD%)
5-FTHF	20	3.1
	100	3.7
	250	4.2
5-MTHF	200	16.3
	1000	7.8
	2500	3.4
THF	20	15.1
	100	14.3
	250	11.8
FA	20	15.5
	100	6.8
	250	4.5

ヒト全血中葉酸類濃度の測定結果

本法を健常人血液試料 (n=479) 中の葉酸類の定量(中央値、括弧内は第1四分位点 Q1 および第3四分位点 Q3)に適用したところ、5-MTHFは477検体から186.0 nM (Q1=121.27 nM, Q3=246.06 nM)、5-FTHFは455検体から3.61 nM (Q1=2.15 nM, Q3=6.21 nM)、FAは399検体から13.82 nM (Q1=3.48 nM, Q3=7.31 nM)およびTHFは353検体から13.82 nM (Q1=7.88 nM, Q3=45.27 nM)の値を得た。全血葉酸の内、5-MTHFが主要な成分を占めており(割合79%)、これは既報の割合とほぼ一致していた(85.9%)。本研究ではLC-MS/MSを用いたヒト全血中葉酸類の定量法の開発を行い、これを健常ヒト全血に適用した。内在性の葉酸コンジュゲートによるポリGlu型からモノGlu型への転換と、SPEによる前処理により、ヒト全血中葉酸類4種を12分以内に分離・定量することができた。

近年の葉酸類定量は安定同位体希釈法を用いた LC-MS/MS 法が主流である。しかし安定同位体葉酸標準品は市販されておらず入手は困難である。本研究では内標準物質として葉酸構造類似体である MTX を用いているため、安価で安定的に供給されているというメリットがある。

本研究を健常ヒト全血に適用したところ、全血中葉酸類の主要な形態は 5-MTHF であるという、既報と一致する結果が得られた。また *MTHFR* 677C>T 変異をホモにもつヒトは、5-MTHF を始めとするメチル化葉酸類の比率が下がり、THF を始めとする非メチル化葉酸類の比率が大きく上昇するという事実から、THF を同時に測定することで、簡易的な *MTHFR* 変異のスクリーニング検査としても利用可能であると考えられる。

今後、全血中総葉酸量と赤血球中総葉酸量の相関を確認していくことで、本法が安価なスクリーニング法として実用できると考える。

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 14 件)

1. M.S. Elgawish, C. Shimomai, N. Kishikawa, K. Ohyama, M. Wada, N. Kuroda: Development and validation of the first assay method coupling liquid chromatography with chemiluminescence for the simultaneous determination of menadione and its thioether conjugates in rat plasma. *Chem. Res. Toxicol.*, **26**, 1409-1417 (2013). DOI:10.1021/tx400253k 査読有
2. M.G. Hassan, R. Ikeda, M. Wada, N. Kuroda, H.M. Abdel-Wadood, H.A. Mohamed, K. Nakashima: Interaction study of acetylcholinesterase inhibitors on pharmacokinetics of memantine in rat plasma by HPLC-fluorescence method. *Biomed. Chromatogr.*, **27**, 1685-1689 (2013). DOI: 10.1002/bmc.2980 査読有
3. N. Kishikawa, K. Ohyama, A. Saiki, A. Matsuo, M.F.B. Ali, M. Wada, K. Nakashima, N. Kuroda: A novel lophine-based fluorescence probe and its binding to human serum albumin. *Anal. Chim. Acta*, **780**, 1-6 (2013). DOI: 10.1016/j.aca.2013.04.003 査読有
4. Y. Fuchigami, R. Ikeda, M. Kuzushima, M. Wada, N. Kuroda, K. Nakashima: Warning against co-administration of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) with methamphetamine from the perspective of pharmacokinetic and pharmacodynamic evaluations in rat brain. *Eur. J. Pharm. Sci.*, **49**, 57-64 (2013). DOI: 10.1016/j.ejps.2013.01.014 査読有
5. M. Wada, M. Hirose, M. Kuroki, R. Ikeda, Y. Sekitani, N. Takamura, N. Kuroda, K. Nakashima: Simultaneous determination of homocysteine, methionine and cysteine in maternal plasma after delivery by HPLC-fluorescence detection with DBD-F as a label. *Biomed. Chromatogr.*, **27**, 708-713 (2013). DOI: 10.1002/bmc.2848 査読有
6. Y. Sekitani, N. Hayashida, T. Ikeoka, A. Yoshida, M. Nakazato, M. Wada, A. Fujita, A. Matsuo, T. Miyamura, M. Obama, K. Nakashima, T. Maeda, H. Masuzaki, N. Takamura: Determinants of homocysteine concentrations in mother and neonatal girl pairs. *Clin. Chem. Lab. Med.*, **3**, 1-4 (2013). DOI: 10.1515/cclm-2012-0685 査読有
7. M. Wada, Y. Sugimoto, B.L. Crabtree, C. Evans, J.H. Montgomery, R. Ikeda, N. Kuroda, K. Nakashima: Simultaneous determination of amphetamine-type stimulants in abusers' hair: clinical usefulness of hair analysis in pre-hospitalization for abusers. *Forensic Toxicol.*, **31**, 2-8 (2013). DOI: 10.1007/s11419-012-0153-6 査読有
8. E. Sonemoto, N. Kono, R. Ikeda, M. Wada, Y. Ueki, K. Nakashima: Practical determination of methotrexate in serum of rheumatic patients by LC-MS/MS. *Biomed. Chromatogr.*, **26**, 1297-1300 (2012). DOI: 10.1002/bmc2700 査読有
9. M. Wada, Y. Ochi, K. Nogami, R. Ikeda, N. Kuroda, K. Nakashima: 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). DOI: 10.1007/s00216-012-6054-z 査読有
10. M. Wada, M. Kira, Y. Nakaji, R. Ikeda, N. Kuroda, K. Nakashima: Development of a novel method for monitoring the antioxidative effect of ascorbic acid in rat blood. *Food Chem.*, **134**, 546-552 (2012). DOI: 10.1016/j.foodchem.2012.02.117 査読有
11. M. Wada, Y. Sugimoto, R. Ikeda, K. Isono, N. Kuroda, K. Nakashima: Determination of methamphetamine in neonatal hair and meconium samples: estimation of fetal drug abuse during pregnancy. *Forensic Toxicol.*, **30**, 80-83 (2012). DOI: 10.1007/s11419-011-0129-y 査読有
12. A. Hamada, R. Akiyoshi, J. Ishii, N. Hamada, C. Miyazaki, T. Hamada, Y. Ohwaki, R. Ikeda, M. Wada, K. Nakashima: Influence of calcium channel blocker in patients with gastrointestinal disease in Japanese community pharmacies. *J. Clin. Pharm. Ther.*, **37**, 74-77 (2012). DOI: 10.1111/j.1365-2710.2011.01253.x 査読有
13. M.G. Hassan, K.M. Emara, H.A. Mohamed, H.M. Abdel-Wadood, R. Ikeda, M. Wada, N. Kuroda, K. Nakashima: Determination of memantine in rat plasma by HPLC-fluorescence method and its application

to study of the pharmacokinetic interaction between memantine and methazolamide, *Biomed. Chromatogr.*, **26**, 214-219 (2012). 10.1002/bmc.1648 査読有

14. M. Wada, K. Yamahara, R. Ikeda, R. Kikura-Hanajiri, N. Kuroda, K. Nakashima: Simultaneous determination of *N*-benzylpiperazine and 1-(3-trifluoromethylphenyl)piperazine in rat plasma by HPLC-fluorescence detection and its application to monitoring of these drugs, *Biomed. Chromatogr.*, **26**, 21-25 (2012). DOI: 10.1002/bmc.1619 査読有

[学会発表](計 22 件)

1. 前川祐亮: 液体クロマトグラフィー-タンデム質量分析計を用いたヒト尿中 mazindol 定量法の開発, 第 30 回日本薬学会九州支部大会, 2013 年 12 月 7-8 日, 長崎.
2. Mohamed A. El Hamd: HPLC-MS/MS for simultaneous determination of propofol and remifentanyl in rat plasma. 第 30 回日本薬学会九州支部大会, 2013 年 12 月 7-8 日, 長崎.
3. Yuki Fuchigami: Dose-dependent increase of dopamine and serotonin concentration of nucleus accumbens after ethcathinone administration in mice. 第 7 回次世代を担う若手医療薬科学シンポジウム, 2013 年 11 月 23 日, 宮城.
4. 中島憲一郎: 過シウ酸エステル化学発光用マイクロカプセル化蛍光試薬の開発に関する基礎研究, 生物発光化学発光研究会第 30 回学術講演会, 2013 年 11 月 2 日, 東京.
5. 樋口麻美: Azadirachta indica (ニーム) 製品の活性酸素種消去能評価, 日本分析化学会第 62 年会, 2013 年 9 月 10-13 日, 大阪.
6. 和田美暁: 抗酸化剤 Trolox の体内動態とその ex vivo 抗酸化能評価, 日本分析化学会第 62 年会, 2013 年 9 月 10-13 日, 大阪.
7. 南 悠: 新生児乾燥ろ紙血中ホモシステイン関連化合物の HPLC-蛍光定量, 日本分析化学会第 62 年会, 2013 年 9 月 10-13 日, 大阪.
8. Yusuke Maegawa: Development of determination method for mazindol in human urine by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Asianalysis XII*, Aug 22-24, 2013, Fukuoka.
9. Yujiro Yamasaki: HPLC-UV quantification of two iridoids in Noni (*Morinda citrifolia*) products. *Asianalysis XII*, Aug 22-24, 2013, Fukuoka.
10. 田淵直人: HPLC-Ru(bpy)₃²⁺ 化学発光による葉酸含有医薬品及びサプリメントの定量, 第 16 回日本医薬品情報学会総会・学術大会, 2013 年 8 月 10-11 日, 名古屋.
11. 安川 徹: *p*-Methoxymethamphetamine のラット毛根移行性評価, 日本法中毒学会第 32 年会, 2013 年 7 月 5-7 日, 千葉.
12. 池田理恵: 乱用薬物の中樞神経系に対する PK-PD 評価, 日本薬学会第 133 年会, 2013 年 3 月 27-30 日, 横浜.

13. 樋口麻美: オリーブオイル製品の活性酸素種消去能評価法の開発, 第 50 回長崎県総合公衆衛生研究会, 2013 年 3 月 18 日, 長崎.
14. 和田光弘: 新生児乾燥ろ紙血中含硫アミノ酸の HPLC-蛍光定量法の開発, 第 24 回日本臨床学会九州支部会, 2013 年 2 月 9 日, 沖縄.
15. 田淵 直人: 葉酸医薬品及びサプリメントの HPLC-Ru(bpy)₃²⁺ 化学発光定量 第 29 回日本薬学会九州支部大会, 2012 年 12 月 8-9 日, 熊本.
16. 葛島 美季: MDMA 錠剤中に混在が確認されているメタンフェタミンとの相互作用リスクの評価, 第 29 回日本薬学会九州支部大会, 2012 年 12 月 8-9 日, 熊本.
17. 中島 憲一郎: HPLC-ルテニウム化学発光法による医薬品及びサプリメント中の葉酸定量, 生物発光化学発光研究会第 29 回学術講演会, 2012 年 11 月 17 日, 東京.
18. 永松 久実: 複合抽出 - GC/MS 法による酸性薬物・塩基性薬物の一斉分析. 日本分析化学会第 61 年会, 2012 年 9 月 19-21 日, 金沢, 石川.
19. 和田 美暁: マイクロダイアリス-セミマイクロフローインジェクション分析法を利用する Trolox 投与後のラット ex vivo 抗酸化能モニタリング. 日本分析化学会第 61 年会, 2012 年 9 月 19-21 日, 金沢, 石川.
20. 黒木 真菜: HPLC-蛍光検出によるヒト血漿中ホモシステイン, メチオニン及びシステインの同時定量法の開発. 日本分析化学会第 61 年会, 2012 年 9 月 19-21 日, 金沢, 石川.
21. 曾根本 恵美: メトトレキサートの LC-MS/MS 定量法の開発と患者血清への適用. 医療薬学フォーラム 2012/第 20 回クリニカルファーマシーシンポジウム, 2012 年 7 月 14-15 日, 福岡.
22. Ning Ima Arie WARDAYANIE: アスタキサンチンの HPLC-UV 定量法の開発とアスタキサンチンサプリメントへの適用. 第 19 回クロマトグラフィーシンポジウム, 2012 年 5 月 23 日-25 日, 八王子.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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

(2) 研究分担者

中島 憲一郎 (NAKASHIMA Kenichiro)

長崎国大薬学部・教授

研究者番号: 30039656

高村 昇 (TAKAMURA Noboru)

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号: 30295068

池田 理恵 (IKEDA Rie)

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号: 40513312