

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 12 日現在

機関番号：32661

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23617027

研究課題名(和文) 血清中トリプトファン代謝物定量による中枢性疾患の臨床化学的研究

研究課題名(英文) Clinical research on the central nervous system disorder by quantitative determination of serum tryptophan metabolites

研究代表者

飯塚 英昭 (IIZUKA, Hideaki)

東邦大学・薬学部・助教

研究者番号：10057771

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円、(間接経費) 900,000円

研究成果の概要(和文)：統合失調症モデル動物(フェンサイクリジン処置マウス)の側坐核および海馬では、L-トリプトファン(L-Trp)濃度が減少が見られ、側坐核および海馬では、L-Trp代謝異常が示唆された。

健康人の血清L-Trp濃度について検討した結果、男性のL-Trp濃度が高く、男女で有意差が見られた。L-TrpとL-キヌレニン(KYN)濃度では、男性で有意な相関があったが、女性では無相関であった。年齢とKYN濃度については、男女ともに負の相関を示した。統合失調症患者と健康人の血清L-Trp、KYNおよびセロトニン濃度では有意差が見られ、臨床化学上重要な知見であると考えられた。

研究成果の概要(英文)：In the brain tissue (nucleus accumbens and hippocampus) of phencyclidine-treated mice which is an animal model of schizophrenia, the L-tryptophan (L-Trp) concentration was significantly decreased. This result suggested that dysregulation of L-Trp metabolism occurred in these brain regions.

In the present study, a significant gender difference was observed, namely, L-Trp concentration in the sera of male healthy subjects was higher than that of female healthy subjects. A significant correlation was observed between L-Trp and L-KYN concentrations in male, but not in female subjects. The serum levels of L-Trp, KYN, and serotonin were significantly different between controls and schizophrenia patients, suggesting that determinations of L-Trp, KYN, and 5-HT in serum might be crucial for clinical diagnosis.

研究分野：時限

科研費の分科・細目：総合栄養科学

キーワード：中枢性精神疾患 統合失調症 L-トリプトファン L-キヌレニン セロトニン LC-MS HPLC 蛍光検出

1. 研究開始当初の背景

生体内にてL-トリプトファン(L-Trp)は、セロトニン経路により1~2%が代謝され、残りのほとんどがキヌレニン(KYN)経路により代謝される。これらの代謝経路により生じる幾つかの代謝物は、L-Trp にない生理活性を有する。例をあげると、KYN 経路の代謝物であるキヌレン酸(KYNA)は、NMDA 受容体のアンタゴニストとして作用する。KYNAは、統合失調症患者の死後脳では上昇し、アルツハイマー病患者血清中では、その濃度の減少が報告されている。これらより、Trp 代謝物のキヌレン酸が中枢性疾患と何らかの関連性があり、正常な状態では、Trp 代謝物のバランスが正常に保たれていると考えられるが、中枢性疾患患者では、これらのバランスが崩れている可能性がある。

一方で、我々は、D-Trp から KYNA が生成する経路があることを見出している。近年、ヒトや哺乳類での D-アミノ酸の存在が明らかになっている。D-Trp についてもヒト尿や脳脊髄液中で存在することが報告されており、D-Trp の代謝物にも着目する必要があると考えられる。こうした背景より、研究代表者は、Trp 光学異性体および Trp 代謝物の KYN 光学異性体の HPLC による分離定量法を開発し、下記(1) (2)を本研究の目的とした。

2. 研究の目的

(1)統合失調症モデルマウスとしてフェンサイクリジン(PCP)連続投与処置マウスを使用して、脳組織および血漿中の Trp 濃度を調べ、正常マウスとの差を解析する。これにより、統合失調症病態時の脳 Trp 濃度の変動を解析する。Trp および KYN 光学異性体毎の定量も試みる。

(2)ヒト健常人血清中の Trp およびその代謝物濃度を調べ、次にヒト患者血清中でのそれぞれの濃度を調べて統計解析を行なう。これにより、Trp およびその代謝物の病態マーカーとしての可能性を探る。

3. 研究の方法

(1) 統合失調症モデルマウス脳組織中の L-Trp の定量

PCP 処置マウス

PCP は生理食塩水に溶解し、マウスに PCP(10 mg/kg/day, s.c.)を14日間投与して統合失調症モデルマウスを作製する。

脳試料の調製

マウスを断頭し、氷冷下で前頭皮質(Fc)、側座核(Nac)、線条体(Str)、海馬(Hip)、扁桃体(Amy)、小脳(Ce)、視床(Tha)、視床下部(HyTh)を摘出し、使用するまで-80 で保管

した。重量を測定し、約 10 倍量のリン酸緩衝液(pH 7.4)を加え、ホモジナイズした。遠心分離(3000 x g, 10 分、2)後、上清を回収した。この上清を使用して L-Trp 濃度を測定する。

L-Trp 濃度の定量

血漿中タンパク質を除いた後、DBD-PyNCS を蛍光試薬として用いる HPLC-蛍光検出法で定量した。各脳組織中の L-Trp 濃度は、血漿と同様の方法で定量し、タンパク濃度で補正する。

タンパク濃度の測定

ブラッドフォード法により、BSA 標準液を用いて作成した検量線を用いて、タンパク濃度を計算する。

(2) ヒト血清

ヒト血清採取

東邦大学薬学部生命倫理委員会の承認を得た(No. 23-1)後、空腹時血清を血清分離剤入りのベノジェクト 真空採血管を用いて調製した。得られた血清は、-80 で凍結保存した。研究に参加したボランティアの血液採取にあたり、本研究の趣旨を説明し、インフォームドコンセントを得て匿名性に十分配慮した。

L-TrpおよびL-KYNの定量

(1) と同様に、血清を除タンパク後、DBD-PyNCSによる蛍光誘導体として、LC-MSで定量する。

セロトニン(5-HT)の定量

血清5-HT濃度は、HPLC-電気化学検出器を用いて定量する。

4. 研究成果

(1) 統合失調症モデルマウス

PCP 処置マウスの前頭皮質(Fc)、側坐核(Nac)、線条体(Str)、海馬(Hip)、扁桃体(Amy)、小脳(Ce)、視床(Tha)、視床下部(HyTh) (計 8 部位) の L-Trp を定量した結果、側坐核 ($p = 0.024$)、海馬 ($p = 0.027$) でコントロール群と PCP 処置マウス群の間で有意差が見られた(図 1)。前頭皮質、線条体、血漿では、側坐核、海馬と同様に PCP 処置マウス群で L-Trp 濃度が減少する傾向が見られたが、有意な差は得られなかった(図 1, 2)。長期連続 PCP 処置が、特定の脳領域(側坐核および海馬)での L-Trp 濃度を減少させたことより、これらの脳領域では、Trp 代謝物のキノリン酸、キヌレン酸、セロトニンの濃度も変化し、神経伝達の調節異常が生じている可能性が示唆された。PCP 処置マウスの脳組織中で L-Trp 濃度の減少を見出したことは、新しい知見である。

また、本研究により、DBD-PyNCS による蛍光誘導体法がマウス脳内の L-Trp 定量に有用な方法であることが分かった。

一方、Trp および KYN 光学異性体 (D-Trp, D-KYN) は、マウス脳ホモジネート中では検出されなかった。

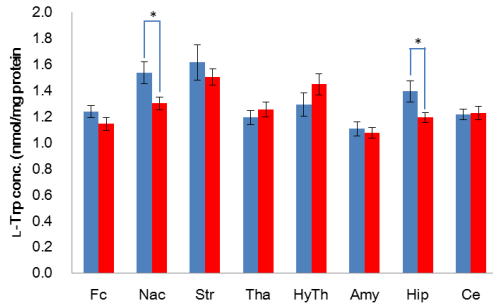


図 1 PCP 処置マウス脳組織中 L-Trp 濃度
青:コントロール($n = 8$)、赤:PCP 処置マウス($n = 10$) * < 0.05

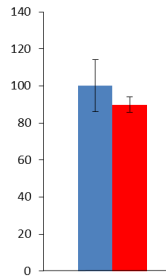


図 2 血漿中の L-Trp 濃度
青:コントロール($n = 8$)、赤:PCP 処置マウス($n = 10$)

(2) ヒト血清

健常人血清

L-Trp および L-KYN の同時定量を HPLC-質量分析法 (LC-MS) により行った。その結果、血清 L-Trp 濃度は、女性に比べて男性の方が濃度が高かった ($p < 0.05$)。Tryptophan 2,3-dioxygenase (TDO) および Indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) の活性指標となる L-Trp に対する L-KYN の濃度比 (L-KYN/L-Trp) は、男女で差がなかった (図 3)。図 4 に血清 L-Trp 濃度と L-KYN 濃度の相関プロット図を示した。健常人では、L-Trp 濃度と L-KYN 濃度に有意な相関が見られ、L-Trp の分解に TDO と IDO が役割を果たしていることが示唆された。しかしながら、男女別に見ると、男性では、強い相関であったが、女性では、相関を示さなかった。これは、女性特有の月経周期の影響と考えているが、今後、詳細について検討する必要がある。図 5 に年齢と血清 L-KYN 濃度の相関プロット図を示した。男女とも負の相関が示されたが、今回のボランティアの年齢が、30 歳未満であるため、今後、年齢範囲

を広げて検討する必要がある。

今回使用した LC-MS 法では、血清中の Trp および KYN の D 体は検出されなかった。

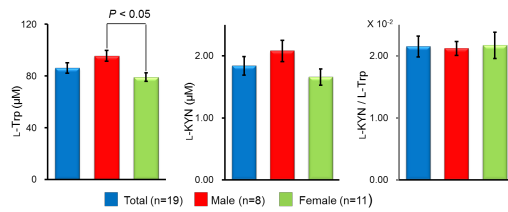


図 3 血清 L-Trp、L-KYN 濃度とその濃度比

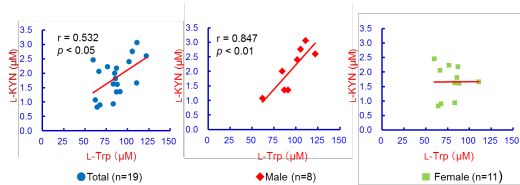


図 4 血清 L-Trp と L-KYN 濃度の相関プロット図

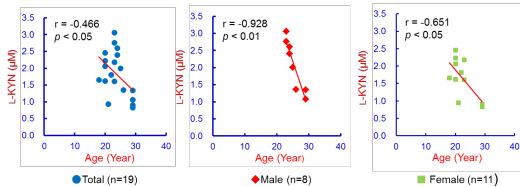


図 5 血清 L-KYN 濃度と年齢の相関プロット図

統合失調症患者血清

健常人と統合失調症患者では、Mann-Whitney U 検定により、血清中 L-Trp ($p = 0.0010$)、KYN ($p = 0.0057$) および 5-HT 濃度 ($p = 0.0131$) で有意な差があった (図 6)。今回の統合失調症患者は、抗精神病薬を服用している患者のみである。抗精神病薬の影響により、血清 Trp 濃度が増加する報告があり、今回の結果は、服用している精神病薬による影響も考えられる。Trp は、主に KYN 経路とセロトニン経路によって代謝され、KYN、5-HT は、更に生理活性を持つ Trp 代謝物に代謝される。5-HT の代謝物としてメラトニンがある。メラトニンは抗酸化物質であり、統合失調症患者の酸化ストレス軽減にメラトニンが使われ、その結果、統合失調症患者血清中 5-HT 濃度が減少していることが推測された。

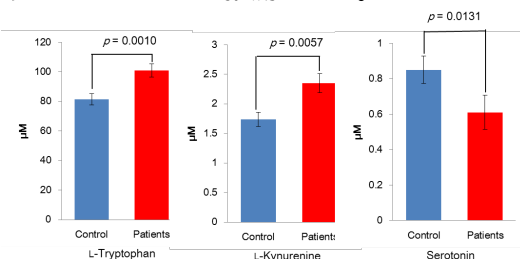


図 6 健常人および統合失調症患者血清中 Trp、KYN および 5-HT 濃度

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3件)

Kono Y, Iizuka H, Isokawa M, Tsunoda M, Ichiba H, Sadamoto K, Fukushima T: HPLC-fluorescence determination of thiol compounds in the serum of human male and female subjects using HILIC-mode column. Biomedical Chromatography. 28: 589-593, 2014. 査読有、DOI: 10.1002/bmc.3086

Iizuka H, Watanabe S, Koshikawa M, Matsumoto Y, Aoyama Y, Ichiba H, Nabeshima T, Fukushima T: Decreased L-tryptophan concentration in distinctive brain regions of mice treated repeatedly with phencyclidine. Analytical Bioanalytical Chemistry. 405: 8137-8141, 2013. 査読有、DOI: 10.1007/s00216-013-7010-2

Ohashi H, Iizuka H, Yoshihara S, Otani H, Kume M, Sadamoto K, Ichiba H, Fukushima T: Determination of L-tryptophan and L-kynurenine in human serum by using LC-MS after derivatization with (R)-DBD-PyNCS. International Journal of Tryptophan Research, 6: 9-14, 2013. 査読有、DOI: 10.4137/IJTR.S11459

[学会発表](計16件)

河野 由美子: HPLC-蛍光検出法による統合失調症患者血清中チオール化合物の定量、日本薬学会第134年会、2014年3月30日、熊本市民体育館(熊本県)

大野 千尋: HPLC-蛍光検出法による統合失調症患者血清中D-乳酸及び3-ヒドロキシ酪酸の定量、日本薬学会第134年会、2014年3月30日、熊本市民体育館(熊本県)

敏蔭 望美: HPLC-蛍光検出法によるフェンシクリジン慢性投与マウス脳ホモジネート中N-アセチルアスパラギン酸の定量、日本薬学会第134年会、2014年3月30日、熊本市民体育館(熊本県)

錦織 南美: HPLC-蛍光検出法によるヒト血清中遊離脂肪酸の定量、第24回クロマトグラフィー科学会議、2013年11月12日、東京大学本郷キャンパス(東京都)

飯塚 英昭: HPLCによる統合失調症患者の血清中アミノ酸定量、第23回日本臨

床精神神経薬理学会・第43回日本神経精神薬理学会合同年会、2013年10月25日、沖縄コンベンションセンター(沖縄県)

飯塚 英昭: (R)-DBD-PyNCSによる誘導体化およびLC-MSを用いるヒト血清中L-TrpおよびL-キヌレニンの定量、日本Trp研究会第35回学術集会、2013年9月29日、京都大学吉田キャンパス(京都府)

河野 由美子: HPLC-蛍光検出法によるヒト血清中グルタチオンおよびシステインの定量、第26回バイオメディカル分析科学シンポジウム(BMAS 2013)、2013年8月2日、昭和大学旗の台キャンパス(神奈川県)

葛 丹: HPLC-蛍光検出法による生体試料中N-アセチルアスパラギン酸の定量、日本薬学会第133年会、2013年3月28日、パシフィコ横浜(神奈川県)

福島 健: ケタミン連続投与ラット血漿中トリプトファン及びその代謝物濃度の変動解析、日本薬学会第133年会、2013年3月28日、パシフィコ横浜(神奈川県)

Takeshi Fukushima: Determination of tryptophan and kynurenic acid concentrations in rats after intraperitoneal administration of tryptophan enantiomers. 13th International Society for Tryptophan Research (ISTRY 2012) 2012. 11. 09, Sydney(Australia)

Takeshi Fukushima: Increased kynurenic acid concentration in rat plasma by repeated ketamine administration. 13th International Society for Tryptophan Research (ISTRY 2012), 2012. 11. 09, Sydney(Australia)

Hideaki Iizuka: Fluorimetric determination of L-tryptophan in serum or brain homogenate of Sprague-Dawley rats by HPLC using precolumn fluorescence derivatization with R(-)-DBD-PyNCS. 13th International Society for Tryptophan Research (ISTRY 2012), 2012. 11. 08, Sydney(Australia)

Dan Ge: Determination of N-acetylaspartic acid in serum sample by HPLC with fluorescence detection. 新アミノ酸分析研究会 第2

回学術講演会 2012年10月26日、東京
大学本郷キャンパス(東京都)

大谷 隼斗：ラット線条体マイクロダイ
アリシスによるD-およびL-トリプトファン
投与時における脳内トリプトファン
およびドパミン濃度の変動解析、第56
回 日本薬学会関東支部大会、2012年10
月13日、昭和大学旗の台キャンパス(神
奈川県)

渡邊祥子：(R)-(-)-DBD-PyNCS を用いる
プレカラム蛍光誘導体化法によるマウス
脳内トリプトファンのHPLC-蛍光定
量 第33回 日本トリプトファン研究会
学術集会、2011年12月4日、東邦大学
習志野キャンパス(千葉県)

飯塚 英昭：R(-)-DBD-PyNCS を用いる
プレカラム蛍光誘導体化によるトリプト
ファン光学異性体腹腔内投与におけるラ
ット血漿中のD-およびL-TrpのHPLCによ
る蛍光定量 第55回 日本薬学会関東支
部大会、2011年10月8日、東邦大学習
志野キャンパス(千葉県)

[その他]

ホームページ等

<http://www.lab.toho-u.ac.jp/phar/Analche/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

飯塚 英昭 (IIZUKA, Hideaki)
東邦大学・薬学部・助教
研究者番号：10057771

(2) 研究分担者

福島 健 (FUKUSHIMA, Takeshi)
東邦大学・薬学部・教授
研究者番号：00272485

一場 秀章 (ICHIBA, Hideaki)
東邦大学・薬学部・講師
研究者番号：80120236

定本 清美 (SADAMOTO, Kiyomi)
東邦大学・薬学部・教授
研究者番号：00297673
(平成25年度より連携研究者)

(3) 連携研究者

()

研究者番号：