

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 27 日現在

機関番号：32676

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011 ～ 2012

課題番号：23790204

研究課題名（和文） 唾液試料を用いた生活習慣病のスクリーニング評価

研究課題名（英文） Assessment of utility of saliva for lifestyle related disease screening

研究代表者

岩崎 雄介（IWASAKI YUSUKE）

星薬科大学・薬学部・助教

研究者番号：10409360

研究成果の概要（和文）：

生活習慣病は酸化ストレスが関与していることから、カラムスイッチング-親水性相互作用クロマトグラフィー/質量分析法によるチオール化合物の一斉分析法の開発を行った。試料の前処理操作を自動化したため、精度の高い方法が構築され、マウス血清中還元型および酸化型チオール化合物の同時定量を達成した。チオール化合物は自動酸化を受け、正確な定量が困難であったことから、さまざまな誘導体化試薬の比較検討を行った。構築した分析法を糖尿病マウス血清に適用したところ、還元型および酸化型グルタチオンの濃度が増加していた。これらの結果からグルタチオン類を測定することは酸化ストレスの指標となりえることが示唆されたため、非侵襲的に採取が可能な唾液試料への適用を試みた。その結果、血液中と唾液中グルタチオン類の濃度に相関性が認められたため、唾液試料は血液試料に代わる生体試料として適用可能であることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：

An automated online solid-phase extraction method for the determination of the reduced and oxidized forms of thiols in mouse serum was developed and validated. Analysis was performed with column-switching hydrophilic interaction chromatography coupled with mass spectrometry (CS-HILIC-MS). The proposed CS-HILIC-MS method enabled the simultaneous determination of reduced and oxidized thiols in mouse serum samples. In addition, interference from endogenous compounds was removed by means of the column-switching technique. We also compared the effects of derivatization before and after preparing serum from blood samples and found that it was necessary to perform the derivatization immediately before preparing serum from blood samples. Serum reduced and oxidized glutathione levels were significantly increased in diabetes mice. Our method is expected to be useful for the assessment of the roles of reduced and oxidized glutathione in the oxidative state.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2011 年度	600,000	180,000	780,000
2012 年度	600,000	180,000	780,000
総計	1,200,000	360,000	1,560,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・医療系薬学

キーワード：酸化ストレス、糖尿病

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

1. 研究開始当初の背景

チオール含有アミノ酸の分析法は、比色定量法が用いられていた。また、高感度分析を目的に、高速液体クロマトグラフィーを用いた方法も汎用されているが、高極性物質であるため、他の共存物質の影響を受け、精度の高い高感度分析法は構築されていなかった。

親水性相互作用クロマトグラフィーは1990年に Alpert によって報告された新しい分離方法で、固定相であるシリカゲルの表面をポリスクシンイミド等で保護し、水やアセトニトリルなどの極性溶媒を移動相として極性の高い物質を分離させる方法である。固定相および移動相ともに高極性の状態にすることで、高極性化合物を保持させることが可能となるばかりでなく、質量分析計においても分析対象化合物のイオン化の向上がみられると考えられた。

唾液は非侵襲的な採取が可能な検体であり、血液試料の代替試料としてモニタリング分析に有用性があると考えられる。一般に、唾液中の化学物質は血液中より濃度が低いことから報告例が少ない。

これらの背景から、濃度が低い物質と推定される当該物質についても高感度分析法を構築し、唾液中の濃度が低いと推定される抗酸化物質の一斉分析法の構築も可能であると考え研究を試みた。

2. 研究の目的

近年、我が国においても生活習慣病である、糖尿病やがん患者の罹患率が急増している。この原因として、数々の環境要因や遺伝要因が密接に関係しているとされているが、疾病の発病に酸化ストレスが大きく関与するとの研究成果が報告されている。酸化ストレスとは生体内における酸化状態と還元状態のバランスが崩れ、酸化状態に傾くこととされている。この酸化ストレスの原因物質である、活性酸素またはフリーラジカルは生体膜や細胞を損傷し、各種疾患を誘発する。従って、酸化状態において生成する物質（酸化ストレスマーカー）を測定することで、生体内の酸化状態が把握できることが期待される。一方、酸化ストレスに対応するために、生体はさまざまな防御機構を備えており、抗酸化物質が反応することで過剰に生成した活性酸素などを消去する。抗酸化物質として、尿酸やアスコルビン酸が挙げられるが、特に還元型グルタチオンなど、主にチオール基を有する化合物はレドックス制御に関与し、生体内の酸化還元状態をコントロールすることで酸化ストレスに対応することが知られている。そ

のため、酸化ストレスに陥ると、還元型チオール類の濃度が減少し、酸化型チオール類の濃度が上昇するため、還元型と酸化型の比をとることで生体中の酸化ストレスの指標として用いることが可能であると考えられる。そのため、還元型および酸化型チオール化合物を同時に測定することで、生体内の酸化ストレス状態が把握できるとされ、疾病の早期診断への応用が期待されている。

一方、グルタチオンに代表されるチオール化合物は血液を分析することで、その動態を明らかにすることは可能であるが、採血に伴う被験者への負担が大きく、感染症の危険性も懸念される。また、採血権を持つ人が限られているため、酸化ストレス状態を把握するためのスクリーニング法として応用が難しい。

本研究では、血液試料に代わり、簡便で非侵襲的な採取が可能な唾液試料を用い、高極性物質である還元型および酸化型チオール化合物の同時定量の開発を試みる。さらに、血液中のグルタチオン濃度と比較を行い、その相関性を検討する。また、生活習慣病の一つである糖尿病を発症したマウスを使用し、グルタチオン分析の有用性を調べた。

3. 研究の方法

(1) 親水性相互作用クロマトグラフィー/質量分析法によるチオール化合物の分析

チオール化合物の測定には、親水性相互作用クロマトグラフィー/質量分析法

(HILIC/MS) を使用した。分析カラムには Merck 社製 ZIC pHILIC (100 × 2.1 mm, 5 μm) を採用し、前処理カートリッジに Waters 社製 Oasis HLB (20 × 2.1 mm) を用いて、カラムスイッチング法を検討した。チオール化合物は、まず、還元型を *N*-ベンジルマレイミドで誘導体化し、次いで酸化型を *N*-シクロヘキシルマレイミドで反応させる。2段階の誘導体化反応を行うことにより同時分析を試みた。また、マウス血液（全血）は採血直後に誘導体化を行い、血清を調製する過程での自動酸化を防いだ。

(2) 生体試料中のチオール化合物の分析による酸化ストレス評価

構築した分析法を用いて血清中のチオール化合物測定の有用性を検証した。また、糖尿病モデルマウスを用い、血清中チオール化合物の動態評価を試みた。糖尿病の疾患モデル実験には、II型糖尿病モデルマウスである BKS.Cg-m+/+ *Lepr^{db}/J* (db/db) を用い、健常マウスには BKS.Cg-*Dock^{7m}* (db/+) の雄を飼

育した。

4. 研究成果

(1) MS における高感度分析のための誘導体化試薬の比較

極性の高いチオール化合物は、高極性物質の保持に優れた HILIC を用いることで、良好な相互分離が達成された。また、カラムスイッチング法を採用することで、オンラインの前処理操作を行い、閉鎖系での処理が可能となった。この際、前処理カラムでのチオール化合物の保持と MS におけるイオン化の促進を目的に、各種誘導体化試薬を比較検討した。その結果、*N*-ベンジルマレイミド、*N*-シクロヘキシルマレイミドでイオン化の促進が見られ、HLB カラムでの各誘導体の保持が可能であった (図 1)。また、2 段階で誘導体化反応を行うことにより、還元型および酸化型チオール化合物の同時分析を達成した。

Derivatization reagent	Relative intensity	Reaction rate (25°C; M ⁻¹ s ⁻¹)
Maleimide	11.3	0.144
<i>N</i> -methylmaleimide	16.1	0.405
<i>N</i> -ethylmaleimide	17.6	0.466
<i>N</i> -propylmaleimide	18.1	0.180
<i>N</i> - <i>tert</i> -butylmaleimide	18.7	0.070
<i>N</i> -phenylmaleimide	16.4	0.248
<i>N</i> -cyclohexylmaleimide	18.8	0.460
<i>N</i> -benzylmaleimide	17.9	0.492
<i>N</i> -(<i>o</i> -chlorophenyl)maleimide	12.2	0.352

図 1 チオール化合物における誘導体化試薬の比較

(2) 生体試料の前処理方法の検討

生体試料の分析において、血液中の還元型グルタチオンは、血清を調製する操作過程で自動酸化されることが明らかとなった。しかし、採血直後に誘導体化を行うことにより、血清を調製する段階での自動酸化を防ぐことが可能となった (図 2)。

構築した分析法の定量限界は、1~10 μM (S/N > 10、精度 < 20%) であり、マウス血清および肝臓の分析に本法を適用した結果、夾雑物質と良好に相互分離が達成された (図 3)。血清の添加回収試験において、平均回収率はそれぞれ 87.6~107.5%、R.S.D.は 5 %程度と良好な結果が得られた (図 4)。以上の結果から、血清中チオール化合物の測定において、高精度な分析法の構築が達成された。

Analyte	Derivatization step	
	After	Before
GSH	Trace (4.1 ± 1.2)	241.7 ± 54.9
GSSG	103.9 ± 23.5	43.1 ± 16.7
Cys	16.0 ± 2.9	40.7 ± 6.0
CysSS	75.7 ± 11.1	53.8 ± 7.8
Hcy	N.D.	Trace (0.6 ± 0.2)
HcySS	1.0 ± 0.5	1.1 ± 0.2

(μM)

図 2 血清調製段階における自動酸化の割合

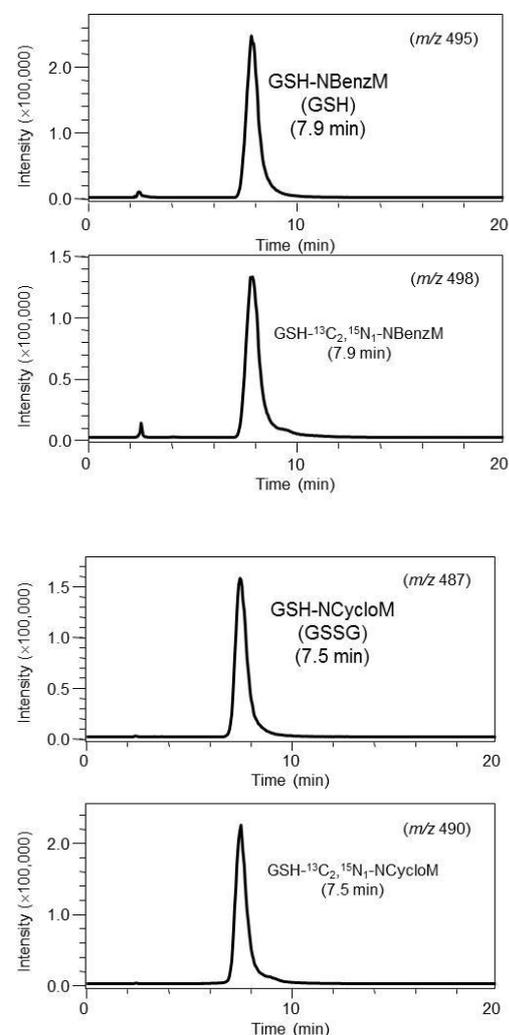


図 3 血清中グルタチオンのクロマトグラム

Analyte	Added conc. (μM)	Intra-assay (n = 6)		Inter-assay (n = 9)	
		Precision (%RSD)	Accuracy (%)	Precision (%RSD)	Accuracy (%)
GSH	30	2.8	98.8	1.1	97.6
	50	3.2	97.5	2.4	96.7
	100	1.6	107.5	3.9	106.6
GSSG	30	2.9	107.4	1.7	105.5
	50	3.3	90.2	4.3	93.0
	100	1.5	90.2	4.0	93.2
Cys	30	3.9	99.3	0.4	99.0
	50	2.0	97.1	4.0	94.6
	100	1.5	102.8	3.1	100.3
CysSS	30	2.4	100.2	1.0	100.2
	50	2.5	97.9	3.7	93.6
	100	1.5	99.2	3.3	96.0
Hey	3	1.6	92.7	0.7	93.3
	5	2.6	87.6	7.5	92.5
	10	2.3	93.7	2.4	96.4
HeySS	3	1.3	109.6	1.0	108.5
	5	2.6	95.1	9.2	101.7
	10	3.7	94.9	11.4	106.9

図4 分析法のバリデーション

(3) 糖尿病モデルマウスの血清中グルタチオンの測定

糖尿病マウス血清中チオール化合物を測定した結果、グルタチオンにおいて健常マウスとの差を確認することができた(図5)。また、還元型および酸化型がともに減少していることから、本分析法により、酸化ストレスの糖尿病への関与を支持する結果が得られた。

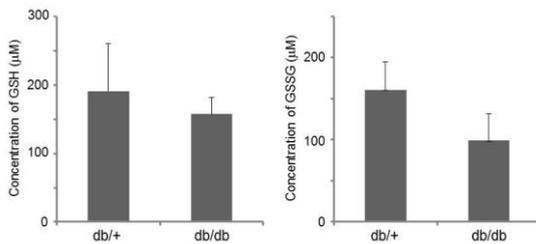


図5 糖尿病マウス中グルタチオンの測定

(4) 唾液中グルタチオンの測定

構築した分析法を用い、健常者10名の血液および唾液中GSH、GSSG濃度を定量した(図6)。その結果、血液においては既報の濃度と比較してほぼ同様の値が得られたことから、本分析法の定量値は妥当であると考えられる。また、唾液試料の有用性を確認するために、GSSG/GSHを算出し、全血と唾液の相関性をみたところ、有意な相関性($r = 0.806$)が認められた(図7)。従って、唾液中GSHおよびGSSGを測定することは血液試料に代わり、酸化および窒素化ストレスを

評価できる有用なバイオマーカーであることが示唆された。

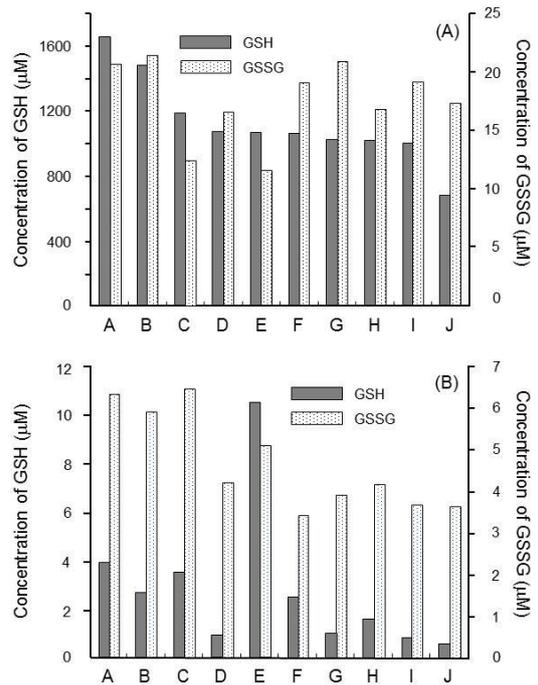


図6 ヒト血液および唾液中グルタチオンの測定

(A) : 血液試料 (B) : 唾液試料

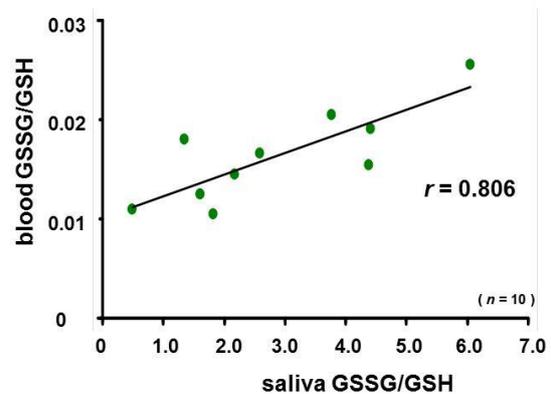


図7 ヒト血液および唾液中グルタチオン濃度の相関性

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2件)

① Iwasaki Y, Nakano Y, Mochizuki K, Ogawa T, Oda M, Ito R, Saito K, Nakazawa H.

Quantification of reduced and oxidized thiols in mouse serum by column-switching hydrophilic interaction chromatography coupled with mass spectrometry. J. Pharm. Biomed. Anal. 56(1), 103-113 (2011).

② Iwasaki Y, Nakano Y, Mochizuki K, Nomoto M, Takahashi Y, Ito R, Saito K, Nakazawa H. A new strategy for ionization enhancement by derivatization for mass spectrometry. J. Chromatogr. B 879(17-18), 1159-1165 (2011).

〔学会発表〕(計3件)

①岩崎 雄介、中野 有紀、伊藤 里恵、斉藤 貢一、中澤 裕之(星薬大)
親水性相互作用クロマトグラフィー/質量分析法による唾液中グルタチオンの分析
日本分析化学会 第59年会、2010年9月15日～17日

②中野 有紀、岩崎 雄介、伊藤 里恵、斉藤 貢一、中澤 裕之(星薬大)
酸化ストレス評価のための血清中チオール化合物の分析
第55回 日本薬学会関東支部会、2011年10月8日 千葉県

③中野 有紀、岩崎 雄介、伊藤 里恵、斉藤 貢一、中澤 裕之(星薬大)
質量分析法によるチオール化合物測定のためのマレイミド系誘導体化試薬の検討
日本薬学会 第132年会、2012年3月28日～30日 北海道

〔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
岩崎 雄介 (IWASAKI YUSUKE)
星薬科大学・薬学部・助教
研究者番号：10409360

(2)研究分担者
()

研究者番号：

(3)連携研究者
()

研究者番号：