

令和元年6月18日現在

機関番号：25503

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08387

研究課題名(和文)毛髪中ホモシステイン濃度を指標とした新規疾患スクリーニング法の確立とその臨床応用

研究課題名(英文)New screening method using homocysteine in hair and its clinical application

研究代表者

和田 光弘 (Wada, Mutsuhito)

山陽小野田市立山口東京理科大学・薬学部・教授

研究者番号：40295093

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：血液中ホモシステイン濃度は様々な疾患の危険因子であったり、治療の指針として利用されている。そこで毛髪中のホモシステイン濃度の測定法を開発することで非侵襲的な疾患スクリーニング法の開発を試みた。その結果、毛髪試料の前処理に還元剤としてトリス(2-カルボキシエチル)ホスフィンを用いることで毛髪中のホモシステイン類のHPLC-蛍光検出法を用いる定量法を確立することができた。これによりメチオニンおよびシステインを定量可能であったが、ホモシステインは血漿試料のレベルで毛髪中には存在しないことが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヒト毛髪中のメチオニンおよびシステインのHPLC-蛍光検出定量法を確立した。本法により毛髪の前処理条件を詳細に検討することによりメラニン結合性のメチオニンおよびシステインの定量が可能であった。またヒト毛髪に含まれるホモシステイン濃度が血漿などに比べて非常に低濃度であることが明らかとなった。今後はこれらの化合物濃度と血漿中ホモシステイン濃度との相関性を明らかにすることで、診断マーカーとしての有用性を評価していく。

研究成果の概要(英文)：Homocysteine (Hcy), a sulfur-containing amino acid, is a representative intermediate metabolite of methionine (Met) to cysteine (Cys) via several intermediates. An elevated level of Hcy in plasma plays an important role in diseases such as neural tube defects and Down syndrome. In this study, development of Hcy and its related compounds in hair was examined. As a result, HPLC-fluorescence detection coupled with tris(2-carboxylethyl)phosphine could determine Met and Cys in human hair. And it's clarified that the Hcy concentration in hair was less than that in plasma.

研究分野：臨床分析化学

キーワード：homocysteine HPLC hair analysis

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

ホモシステイン (Hcy) は含硫アミノ酸の一種であり、生体内で必須アミノ酸であるメチオニン (Met) からシステイン (Cys) への代謝過程で生成される代謝中間体である。Hcy は再メチル化経路により Met へ、あるいは硫黄転移経路により Cys へと代謝される。

Hcy とさまざまな疾患に関して多くの研究がなされており、高 Hcy 血症は心血管疾患のほか、高齢者の認知症及びアルツハイマー病 [1]、妊娠合併症である子癇前症 [2] を引き起こし、妊婦の高 Hcy 血症は新生児の神経管閉鎖障害 [3] 及びダウン症 [4] のリスクとなることも示唆されている。これらの背景から生体中の Hcy 類のモニタリングは、これら疾患の診断などに重要と考えるが、通常これらの化合物の定量には血液試料が用いられる。申請者はこれまで毛髪中の医薬品などの定量を手掛けてきており、スクリーニング試料として毛髪試料を用いることで非侵襲的な方法とすることができると着想した。併せて高 Hcy 血症治療のモニタリング試料としての毛髪の有用性も併せて評価する。

### 2. 研究の目的

ヒトあるいは実験動物毛髪中 Hcy およびその代謝に関連する Met、Cys の高感度定量法の確立

毛髪中の Hcy 類の定量法の確立は、非侵襲的に、動脈硬化やアルツハイマー病などを簡便・迅速に発見できると考えられ、その実現は臨床的に非常に有意義である。そこで健常人及び高 Hcy 血症を呈する疾患患者の毛髪試料、及び病態モデル動物を用いて有用な知見を蓄積し、毛髪分析の臨床的な有意性を評価する。

### 3. 研究の方法

毛髪試料：健常人毛髪を用いた。毛髪の本研究での使用は、所属研究機関の倫理委員会にて承認を得た研究計画に則って行った。

HPLC 条件：カラム、DAISOPAK SP-120-5-ODS-BP (250 x 2.0 mm i.d., 5 µm)；溶離液、25 mM リン酸緩衝液 (pH 2.0)/アセトニトリル/メタノール (=57:37:6, v/v/v%)、0.3 mL/min；測定波長、400 nm (励起)、570 nm (蛍光)；カラムオープン温度、35 °C；注入量、20 µL

毛髪の前処理：ピーズ破砕機で粉砕した毛髪を用いて、以下の抽出法について検討を行った。

(1) アルカリ分解；6 M 水酸化ナトリウムを加え、80 °C で 1 時間加熱した。(2) 酸分解；6 M 塩酸を加え、110 °C で 24 時間加熱した。(3) 酸 - メタノール抽出；5%塩酸 - メタノールを加え、1 時間超音波処理後、終夜静置した。(4) 酸 - メタノール抽出；5%トリフルオロ酢酸 - メタノールを加え、1 時間超音波処理後、終夜静置した。

還元：前処理後、0.4 M ホウ酸緩衝液 (pH 8.5) に溶解した 4 mM ジチオエリスリトールを 100 µL 加え、80 °C で 15 分間還元を行った。

誘導体化：還元後、0.4 M ホウ酸緩衝液 (pH 8.5) 及び 60 mM 4-(*N,N*-dimethylaminosulfonyl)-7-fluoro-2,1,3-benzoxadiazole (DBD-F) アセトニトリル溶液をそれぞれ 60 µL 加え、80 °C で 15 分間、誘導体化を行った。冷却後、0.65 M 過塩素酸を加え、遠心分離を行った。上清 150 µL に酢酸エチルを 300 µL 加え、攪拌、遠心分離を行った後、上清 250 µL を減圧乾固した。残渣を溶離液 150 µL で溶解し、HPLC 分析に供した。

### 4. 研究成果

毛髪中の Hcy 類の高効率かつ高精度な抽出法の確立を目指して条件の検討を行った。毛髪中の Hcy 類は次の 3 つの様式で存在していると考えた。

- 1) 毛髪の構成成分として含硫アミノ酸があるが、これに Hcy が含まれる場合
- 2) 医薬品などの対外異物同様、メラニンに保持される形で毛髪にとどまる場合
- 3) ホモシステインからホモシステインチオラクトンに変換された形で毛髪中に存在している場合

これらの仮説に伴い、1) では 6 M 塩酸および 6 M 水酸化ナトリウム水溶液を用いて、毛髪を加熱融解し、融解液に対して、還元および蛍光誘導体化試薬である DBD-F を用いて誘導体化を行った。酸およびアルカリ濃度、融解温度および時間を検討したが、誘導体化反応が阻害され、Hcy 類に相当するピークは再現性良く検出されなかった。2) では医薬品の抽出法にならいメタノール、塩酸含有メタノール、トリフルオロ酢酸含有メタノールを用いて、超音波抽出を行った後、還元および誘導体化を行った。こちらも Hcy のピークを検出することはできなかった。さらに抽出の高効率化を目的としてマイクロ破砕を行った毛髪試料を用いたが、ピークの検出には至らなかった。3) では溶解液あるいは有機溶媒抽出液にホモシステインチオラクトン標準品を添加し、誘導体化を行った。ホモシステイン標準品を用いた場合と同じ保持時間のピークを得た。毛髪試料からはホモシステインのピークは検出されなかったことから、酸およびアルカリ溶解によってホモシステインチオラクトンとして溶出されないことが分かった。

次に対象を毛髪内の含硫タンパク質にジスルフィド結合を介して保持されているホモシステイン類を還元により溶出させ、これを誘導体化後、定量する方針をさらに詳細に検討することを行った。具体的には、還元剤として水素化ホウ素ナトリウム、ジチオエリスリトール(DTE) およびトリス(2-カルボキシエチル)ホスフィン塩酸塩(TCEP)を用いてホモシステイン関連化合物の溶出を試みた。還元剤濃度、反応温度および時間を検討し、50 mM TCEP を用いて 80 °C、15 分で還元をすることで毛髪中のメチオニンおよびシステインを定量可能であった。残念ながら

ホモシステインを検出することはできなかった。  
今後は、LC-MS/MS を用いて検討を重ねていく予定である。

#### 参考文献

- [1] Seshadri et al., *N. Engl. J. Med.*, **346**, 476 (2002).
- [2] Breakke et al., *Pediatr. Res.*, **62**, 319 (2007).
- [3] Zhao et al., *Birth Defects Res. A*, **76**, 230 (2006).
- [4] Coppede, *Mutat. Res.*, **682**, 54 (2009).

#### 5 . 主な発表論文等

##### 〔雑誌論文〕(計 4 件)

- 1) Y. Miura, Y. Fuchigami, M. Hagimori, H. Sato, K. Ogawa, C. Munakata, M. Wada, K. Maruyama, S. Kawakami: Evaluation of the targeted delivery of 5-fluorouracil and ascorbic acid into the brain with ultrasound-responsive nanobubbles. *Journal of Drug Targeting*, **26**, 684-691 (2018). 査読有 DOI: 10.1080/1061186X.2017.1419354
- 2) M. Wada, A. Yamaguchi, A. Ogawa, H. Kido, S. Nakamura, M. Takada, S. Kawakami, N. Kuroda, K. Nakashima: Luminol chemiluminescence profile of O/W emulsions during thermal oxidation. *Anal. Sci.*, **33**, 1-4 (2017). 査読有 DOI: 10.2116/analsci.33.249.
- 3) Wada M., Ikeda R., Fuchigami Y., Koyama H., Ohkawara S., Kawakami S., Kuroda N., Nakashima K.: Quantitation and determination of the antioxidative effect of trolox in rat blood and brain using HPLC-UV and SMFIA-CL methods. *Luminescence*, **31** (2016) 414-418. 査読有 DOI: 10.1002/bio.2975
- 4) Wada M., Yamasaki Y., Nakamura S., Takada M., Kawakami S., Nakashima K.: Determination of asperulosidic acid and deacetylasperulosidic acid in rat plasma after administration of *Morinda citrifolia* juice. *Chromatography*, **37** (2016) 141-145. 査読有 DOI: 10.15583/jpchrom.2016.014

##### 〔学会発表〕(計 14 件)

- 1) Kenichiro Nakashima, Shinichi Nakamura, Hisahiro Kai, Koji Matsuno, Mitsuhiro Wada: Determination of three triterpenic acids in dried rosemary by HPLC-fluorescence detection with DIB-Cl, XVIIIth International Symposium on Luminescence Spectrometry (ISLS2018), Brest, France, 19-22 June (2018).
- 2) Mitsuhiro Wada, Shinichi Nakamura, Kenichiro Nakashima: Determination of homocysteine and its related compounds in hair by HPLC-fluorescence method (1) -Estimation of extraction conditions-, XVIIIth International Symposium on Luminescence Spectrometry (ISLS2018), Brest, France, 19-22 June (2018).
- 3) 和田光弘 : 発光分析を用いた食品の機能性評価への応用、生物発光化学発光研究会 第 34 回学術講演会 (福岡) 2018.9.15。
- 4) 和田光弘、佐藤 舞、中村心一、西垣敏明、中島憲一郎 : プアメラオイル中カロテノイド類の HPLC 定量:品質評価への有用性の考察、日本分析化学会第 66 年会(東京) 2017.9.8-12、東京。
- 5) Wijaya Hendra, Wardyanie Ning Ima Arie, Aviana Tita, Nishigaki Toshiaki, Nakamura Shinichi, Nakashima Kenichiro, Wada Mitsuhiro : Determination of scopoletin in tubers using HPLC with fluorescence detection、日本分析化学会第 66 年会 (東京) 2017.9.8-12、東京。
- 6) 中村心一、和田光弘、中島憲一郎 : HPLC-蛍光検出による毛髪中ホモシステイン関連成分の分析法の開発:抽出法の検討、日本分析化学会第 66 年会 (東京) 2017.9.8-12、東京。

- 7) Mitsuhiro Wada, Naotaka Kuroda, Kenichiro Nakashima: Antioxidative behavior of trolox and ascorbic acid in rats' blood and brain by SMFIA-CL methods. 19th International Symposium on Bioluminescence & Chemiluminescence (ISBC2016), 2016. May. 29-Jun. 2, Tsukuba, Japan.
- 8) Mitsuhiro Wada, Naotaka Kuroda, Kenichiro Nakashima: Estimation of oxidative and antioxidative activity of foods by chemiluminescence method. XVII International Symposium on Luminescence Spectrometry (ISLS 2016), 2016. Nov. 22-26, Taipei, Taiwan.
- 9) Kenichiro Nakashima, Mitsuhiro Wada, Naotaka Kuroda: Estimation of healthy risk for drugs of abuse. XVII International Symposium on Luminescence Spectrometry (ISLS 2016), 2016. Nov. 22-26, Taipei, Taiwan.
- 10) Shinichi Nakamura, Saori Nakamura, Yoshihito Ohba, Kenichiro Nakashima, Mitsuhiro Wada: Characterization of dissolved organic carbon in coastal marine environment using 3 dimensional excitation emission matrix (3DEEM), XVII International Symposium on Luminescence Spectrometry (ISLS 2016), 2016. Nov. 22-26, Taipei, Taiwan.
- 11) 有嶋祐未、大河原 晋、坂本 彩、河野みどり、中村心一、和田光弘：BEAS-2B 細胞におけるイソチアゾリン系抗菌剤の IL-8 発現誘導機構、第 43 回日本毒性学会学術年会、2016. 6. 29-7. 1、名古屋。
- 12) 東條 唯、中村心一、甲斐久博、松野康二、和田光弘、中島憲一郎：ローズマリー抽出物 3 種のトリテルペン類の HPLC-蛍光定量法の確立、日本分析化学会第 65 年会、2016. 9. 14-16、札幌。
- 13) 中村心一、東條 唯、前田明寛、甲斐久博、松野康二、和田光弘、中島憲一郎：HPLC-蛍光検出によるローズマリー中の機能性トリテルペン酸類の定量、日本薬学会九州支部大会第 65 年会、2016. 12. 3-4、鹿児島。
- 14) 和田光弘、中村心一、東條 唯、前田明寛、甲斐久博、松野康二、中島憲一郎：市販乾燥ローズマリー中の美白活性を有するトリテルペン酸類の HPLC-FL 定量、日本薬学会第 137 年会、2017. 3. 24-27、仙台。

〔図書〕(計 3 件)

- 1) Mitsuhiro Wada, Shinichi Nakamura, Kenichiro Nakashima: HPLC analysis of homocysteine and its related compounds in Non-Proteinogenic Amino Acids, ed. Nina Filip, Cristina-Elena Iancu, Intech, Rijeka, pp 11-29, 2018. 査読有
- 2) 和田光弘：「酸化還元滴定」パートナー分析化学 I -改訂第 3 版-、萩中 淳、能田 均、山口政俊 編、pp 170-186、南江堂、2017。
- 3) 和田光弘、黒田直敬、中島憲一郎：機能性食品及びサプリメントの有効成分の分析と機能性評価、*分析化学*、65、1-8 (2016)。査読有

〔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：  
 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：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

研究分担者氏名：中島憲一郎

ローマ字氏名：Nakashima Kenichiro

所属研究機関名：長崎国際大学

部局名：薬学部

職名：教授

研究者番号(8桁): 30039656

### (2) 研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。