

令和 3 年 7 月 12 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06599

研究課題名(和文)チロシンを特異的に検出可能な化学発光分析法の開発と創薬・診断技術への展開

研究課題名(英文) Development of a highly specific chemiluminescence assay for tyrosine and its application to drug development and diagnosis

研究代表者

岸川 直哉 (KISHIKAWA, Naoya)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(薬学系)・准教授

研究者番号：90336181

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、チロシンと化学発光試薬であるルミノール誘導体との混合溶液に紫外線照射を行うという操作で、チロシン濃度に応じて増大する発光が生じることを見出した。本研究では、この現象を利用するチロシンの簡便・迅速な化学発光分析法の開発を行った。さらに、本化学発光反応はチロシンに特異的であり、L-ドーパや O-ホスホチロシンといったチロシン類縁化合物では弱い発光しか与えないことを見出した。そこで、本反応をチロシナーゼやアルカリホスファターゼといったチロシン変換酵素の活性測定法へと応用した。また、チロシンペプチドを対象としてオンライン紫外線照射 HPLC 化学発光検出システムに関する検討も行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

チロシナーゼはメラニンの生成に関与している酵素であり、効果的なチロシナーゼ阻害剤は美白成分としての利用が進められている。本研究で開発したチロシナーゼ活性測定法は簡便かつ迅速であるため、天然成分からの美白成分の探索に有用であると考えられる。一方、アルカリホスファターゼは免疫アッセイにおける抗体の標識酵素の一つとして用いられており、本化学発光分析法は免疫アッセイにおける高感度検出法としても有用である。本化学発光反応に基づく酵素活性測定法は容易に他の酵素の活性測定へと応用可能であり、フェニルアラニンヒドロキシラーゼやチロシンキナーゼといった重要な酵素の活性測定法への応用が期待される。

研究成果の概要(英文)：In the present study, we found for the first time that an ultraviolet irradiation to a mixture of luminol and tyrosine, resulted in the generation of chemiluminescence that increased with tyrosine concentration. Therefore, we developed a simple and rapid chemiluminescence microplate assay for tyrosine based on this phenomenon. Furthermore, we found that other amino acids and tyrosine analogues such as phosphotyrosine or tyrosinase, do not give significant chemiluminescence. By using the specificity of the present chemiluminescence reaction to tyrosine, a simple method for the measurement of tyrosinase or alkali phosphatase activity were developed. In addition, we attempted to develop an HPLC with chemiluminescence detection coupled with on-line photo-reactor to measure tyrosine peptides such as oxytocin.

研究分野：分析化学

キーワード：キノン 化学発光 紫外線照射 チロシナーゼ チロシナーゼ阻害剤 アルカリホスファターゼ リン酸化チロシン

1. 研究開始当初の背景

タンパク質は生命機能維持に関わる重要な生体分子であり、その効果的な定量・解析法は様々な分野で必要とされている。タンパク質を構成するアミノ酸の中でもチロシンは、キナーゼをはじめとする様々な酵素の標的となるアミノ酸残基であり、チロシンリン酸化の異常が発がんに関与することやチロシン代謝異常が種々の疾患の原因となることが知られている。このようなことから、チロシンに特化した分析法は、疾患の発症機構の解明や早期診断法の開発に有用であると考えられる。しかしながら、現在用いられている分析法では様々な生体成分の中から特定のアミノ酸のみを検出することは非常に困難であった。

我々はこれまでに、紫外線照射反応と化学発光反応との組み合わせにより様々な生体成分の測定法の開発を行ってきた。この過程において、ルミノールと各種アミノ酸の混合溶液に紫外線照射を行ったところ、チロシンのみが特異的に発光を示すことを見出した。さらに、チロシン含有タンパク質においても発光が観察され、タンパク質中のチロシン数の増加に伴って発光強度が増大することも確認した。そこで、この現象を利用することで多数の生体成分中からチロシン含有成分のみを特異的に検出して定量できると考えた。

また、この結果を受けて様々なチロシン類縁化合物の発光も同様に測定した結果、わずかに構造が異なる類縁体でも発光が大幅に減少することを見出した。この結果より、本化学発光反応を利用してチロシン及び類縁体の変換に関わる酵素の活性測定も可能であると考えた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、チロシンに特異的に応答して化学発光を生じる反応を利用して、チロシンやチロシン関連酵素活性の化学発光分析法を開発することにある。

(1) 簡便かつ迅速なチロシン関連酵素活性測定用マイクロプレートアッセイの開発

マイクロプレートウェル中のチロシンあるいはチロシン類縁体溶液に、酵素を含む試料溶液を添加して酵素反応を行わせる。反応停止後、ウェルにルミノール溶液を添加してから紫外線照射を行い、生じる化学発光を測定する。酵素反応前後での化学発光量を比較することにより酵素活性を測定することができる。

Fig. 1 に示すように、チロシンは数多くの重要な酵素の標的基質である。本化学発光法はチロシンに特異的であり、フェニルアラニン、リン酸化チロシンや L-ドーパのような、わずかに構造が異なる類縁体であっても発光を示さない。従って、これらをチロシンへと変換あるいは逆変換する酵素の活性を簡便かつ迅速に測定可能である。例えば、アルカリホスファターゼはリン酸化チロシンをチロシンへと脱リン酸化する酵素である。本反応では、リン酸化チロシンは発光を示さない一方でチロシンは発光を示す。従って、アルカリホスファターゼの活性に応じて、リン酸化チロシンからチロシンが生成すると強い発光が生じる。結果として、酵素活性を発光強度の強さとして捉えることができる。同様に、フェニルアラニンを基質とすることでフェニルアラニンヒドロキシラーゼの活性測定が可能となる。逆に、チロシンを基質として用いることにより、発光量の減衰に基づくチロシンキナーゼやチロシナーゼの活性測定が可能となる。このように、本法は基質の種類を変えるだけで同様の測定操作により、チロシンの産生・代謝・修飾に関わる様々な酵素の活性を網羅的に測定できる。

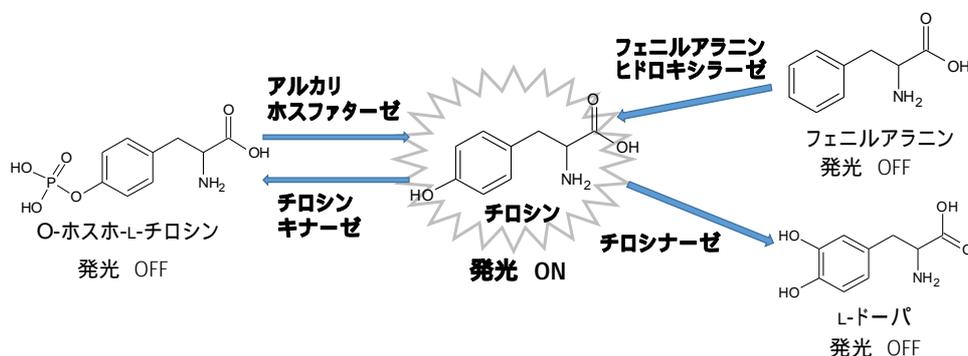


Fig. 1 チロシン特異的な化学発光反応によるチロシン関連酵素の活性測定

(2) チロシンペプチドの特異的かつ高感度な HPLC 化学発光検出システムの開発

チロシンペプチドの HPLC 化学発光分析法を開発する。HPLC カラムから溶出したチロシンペプチドにオンラインで紫外線照射を行ってからルミノール溶液と混合し、生じる発光を検出する。これにより、生体試料から目的のチロシンペプチドのみを高感度かつ選択的に化学発光検出することが可能である。

3. 研究の方法

(1) チロシンの化学発光マイクロプレートアッセイ

96 穴マイクロプレートのウェルにチロシンの PBS 溶液と 10 μ M のルミノール誘導体 L-012 水酸化ナトリウム水溶液 50 μ L を添加した後、プレートリーダーの時間分解蛍光測定モードで測定を行った。各ウェルに波長 250 nm の紫外線をパルス照射し、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。この操作を繰り返し、得られた発光量を積算して定量に用いた。

(2) チロシナーゼ活性測定

100 μ M チロシンの PBS 溶液とチロシナーゼの PBS 溶液を順次添加し、37 $^{\circ}$ C で 15 分間インキュベーションを行った。その後、酵素反応溶液 50 μ L 及び 10 μ M の L-012 水酸化ナトリウム水溶液 50 μ L を 96 穴マイクロプレートのウェルに添加し、上記の操作に従って化学発光測定を行った。

(3) アルカリホスファターゼ活性測定

100 μ M の O-ホスホ-L-チロシン水溶液 75 μ L およびアルカリホスファターゼ溶液を添加し、トリス塩酸緩衝液中にて 37 $^{\circ}$ C で 30 分間インキュベーションを行った。その後、酵素反応溶液 50 μ L および 5 μ M の L-012 水酸化ナトリウム水溶液 50 μ L を 96 穴マイクロプレートのウェルに添加してプレートリーダーにセットして上記の操作に従って化学発光測定を行った。

(4) チロシンペプチドの HPLC 化学発光検出法

チロシンおよびオキシチン(Cys-Tyr-Ile-Gln-Asn-Cys-Pro-Leu-Gly) を分離カラムとして ODS カラム、移動相としてアセトニトリルと水の混液を用いて分離を行う。カラムより溶出したチロシンおよびオキシチンを紫外線ランプ (10W, 254 nm) に巻きつけたテフロンチューブを通過させることによりオンラインで紫外線照射を行う。その後、ルミノールの水酸化ナトリウム溶液と混合してから化学発光検出器に導入し、生じる発光をクロマトグラムとして記録した。

4. 研究成果

(1) チロシンの化学発光マイクロプレートアッセイ

最適条件で L-チロシン標準溶液の検量線を作成したところ、0.1-100 μ M の濃度範囲において濃度と化学発光強度の間に相関係数 $r = 0.998$ の良好な直線関係が得られ、検出下限 (blank + 3SD) は 0.1 μ M であった。次に、様々なチロシン類縁化合物およびフェノール類について化学発光を測定したところ、フェノール構造を分子内に持つ化合物において強い化学発光が観察されることを見出した。一方で、水酸基を持たないフェニルアラニンやカテコール体である L-ドーパといった類縁化合物は、チロシンとわずかしが構造が異ならないにも関わらず発光を示さなかった (Fig. 2)。続いて、20 種類のアミノ酸の化学発光測定を測定したところ、チロシン以外のアミノ酸からは顕著な発光は観察されず、本発光はアミノ酸の中でもチロシンにのみ選択的であることが確認された。次に、本法をいくつかのペプチドやタンパク質に応用したところ、チロシンを含むペプチドやタンパク質においても発光が観察され、またチロシン含有量の多いタンパク質ほど強い発光を与える傾向が見られた。この結果より、本法はチロシン含有タンパク質の高感度化学発光定量法の開発に有用であると考えられた。

さらに、紫外線照射によるチロシンの化学発光反応機構の解明を目的として、化学発光に関与する活性酸素種の種類の確認と紫外線照射後のチロシンの分解物の推定を行った。各種活性酸素の選択的消去剤を用いて、その消光効果を調べた結果より、チロシンの発光にはスーパーオキシドアニオンと過酸化水素が関与していることが確認された。次に、HPLC を用いた解析よりチロシンに紫外線を照射することで主に生成する分解物は L-ドーパであることが確認された。これらの結果より、チロシンへの紫外線照射によりチロシラジカルが生成し、これが L-ドーパへと分解する過程で生じるスーパーオキシドアニオンと過酸化水素がルミノールを酸化することで発光が生じるという機構が推定された。

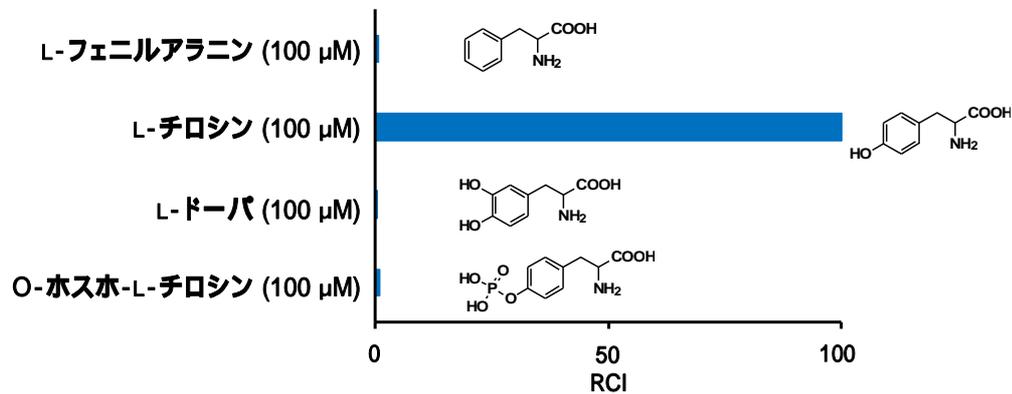


Fig. 2 チロシン特異的な化学発光反応によるチロシン関連酵素の活性測定

(2) チロシナーゼ活性測定

本法において、L-ドーパが与える発光はチロシンの発光と比較して著しく低下していることが確認された。さらに、チロシン溶液にチロシナーゼ溶液を添加して酵素反応を起こさせて、チロシンをL-ドーパへと変換することにより発光が減少することを見出した。そこで、この現象に基づいて、チロシンを基質とするチロシナーゼの活性の新規測定法を開発した。基質であるチロシン濃度や酵素反応時間といった各種測定条件の最適化を行い、測定操作を確立した。最適条件下で検量線を作成したところ、0.5-4.5 U/mL の濃度範囲においてチロシナーゼ濃度と化学発光減衰率の間に相関係数 $r = 0.993$ の直線関係が得られ、その検出下限 (blank + 3SD) は 0.1 U/mL であった。

次に、本化学発光法のチロシナーゼ活性阻害剤探索への応用性を検討した。すなわち、チロシナーゼ阻害剤によるチロシンからL-ドーパへの酵素変換の阻害効果を化学発光の回復量として評価する方法である。コウジ酸や安息香酸といった既知のチロシナーゼ阻害剤を、チロシン及びチロシナーゼとともにインキュベーションしてから化学発光を測定した結果、阻害剤の濃度の増加とともに発光強度が増大することが確認された。したがって、コウジ酸及び安息香酸によりチロシナーゼが阻害された結果、チロシンがL-ドーパへと変換されずに残存して発光が生じたと考えられた。阻害曲線から算出したコウジ酸及び安息香酸の IC_{50} 値はそれぞれ 0.24 mM および 2.86 mM であり、この結果は他の論文の値とも一致していた。

(3) アルカリホスファターゼ活性測定

リン酸化チロシンであるO-ホスホ-L-チロシンが与える発光がチロシンの発光と比較して著しく低下していることに着目し、O-ホスホ-L-チロシンを基質とするアルカリホスファターゼ活性の新規測定法の開発を行った。Fig. 3 に示すようにO-ホスホ-L-チロシンの与える発光強度は低いですが、アルカリホスファターゼ処理後に発光を測定すると発光強度が増大することが確認された。この発光強度の増大はアルカリホスファターゼによりO-ホスホ-L-チロシンがチロシンへと脱リン酸化されることで生じたと考えられた。アルカリホスファターゼ活性測定におけるO-ホスホ-L-チロシンの濃度や化学発光試薬濃度、酵素反応時間などの検討を行った。最適条件下でアルカリホスファターゼ活性の検量線を作成したところ、15-3000 U/L の濃度範囲において活性と化学発光強度の間に相関係数 $r=0.996$ の良好な直線関係が得られ、15 U/L の検出下限 (blank + 3SD) が得られた。本法はアルカリホスファターゼ活性測定法として広く用いられている比色測定法と比較して高感度であった。さらに、アルカリホスファターゼに対するO-ホスホ-L-チロシンの K_m 値を算出したところ、その親和性は比色法で用いられている *p*-ニトロフェニルリン酸と比較して優れているという結果であった。

本研究によりアルカリホスファターゼの活性測定法における新たな基質としてO-ホスホ-L-チロシンの有用性が示された。アルカリホスファターゼはイムノアッセイにおいて利用されている標識酵素であることから、アルカリホスファターゼ標識抗体に対してO-ホスホ-L-チロシンを基質として用いる新たな化学発光イムノアッセイ開発への応用可能性が示唆された。

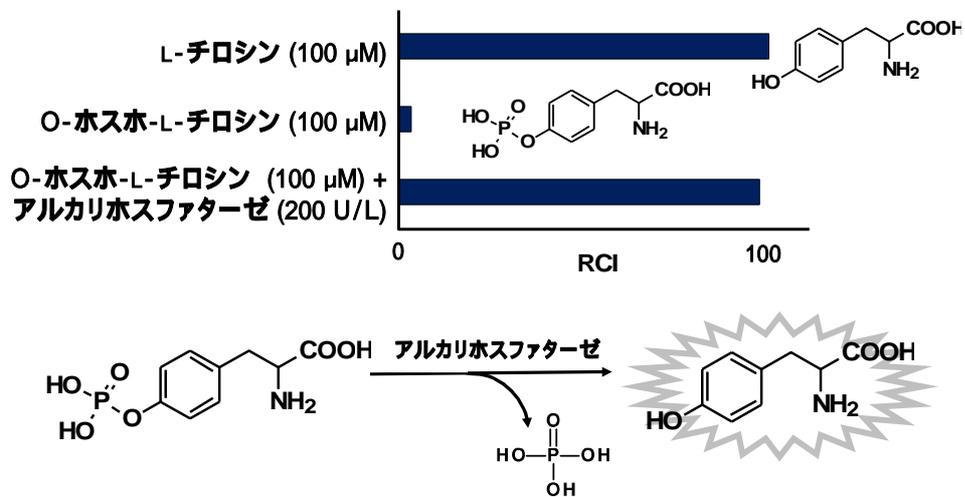


Fig. 3 アルカリホスファターゼ処理による化学発光強度の増大

(4) チロシンペプチドの HPLC 化学発光検出法

チロシンおよびチロシン含有ペプチドであるオキシトシンを測定対象モデルとして、オンライン紫外線照射 HPLC 化学発光定量システム開発のための検討を行った。チロシンおよびオキシトシンを ODS カラムで分離後、オンラインで紫外線照射後にルミノール溶液と混合することでチロシンおよびオキシトシンに由来する化学発光ピークが検出された。また、この発光ピークは紫外線を照射しない条件では検出されなかった。同濃度のチロシンとオキシトシンを比較した結果、オキシトシンのピーク面積はチロシンの 6 分の 1 程度という結果であった。今後は、各種発光反応条件を最適化後に検量線を作成して検出下限を算出して、本 HPLC 法の分析性能を評価していく予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計15件（うち査読付論文 15件 / うち国際共著 11件 / うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Kishikawa Naoya, El-Maghrabey Mahmoud, Nagamune Yuusuke, Nagai Kaishu, Ohyama Kaname, Kuroda Naotaka	4. 巻 92
2. 論文標題 A Smart Advanced Chemiluminescence-Sensing Platform for Determination and Imaging of the Tissue Distribution of Natural Antioxidants	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Analytical Chemistry	6. 最初と最後の頁 6984 ~ 6992
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.analchem.0c00044	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 El-Maghrabey Mahmoud, Kishikawa Naoya, Kamimura Shuhei, Ohyama Kaname, Kuroda Naotaka	4. 巻 329
2. 論文標題 Design of a dual functionalized chemiluminescence ultrasensitive probe for quinones based on their redox cycle. Application to the determination of doxorubicin in lyophilized powder and human serum	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Sensors and Actuators B: Chemical	6. 最初と最後の頁 129226 ~ 129226
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.snb.2020.129226	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 El-Maghrabey Mahmoud, Kishikawa Naoya, Harada Shiori, Ohyama Kaname, Kuroda Naotaka	4. 巻 160
2. 論文標題 Quinone-based antibody labeling reagent for enzyme-free chemiluminescent immunoassays. Application to avidin and biotinylated anti-rabbit IgG labeling	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biosensors and Bioelectronics	6. 最初と最後の頁 112215 ~ 112215
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bios.2020.112215	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Ali Marwa F.B., Uejo Yurina, Kishikawa Naoya, Ohyama Kaname, Kuroda Naotaka	4. 巻 1628
2. 論文標題 A selective and highly sensitive high performance liquid chromatography with fluorescence derivatization approach based on Sonogashira coupling reaction for determination of ethinyl estradiol in river water samples	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Chromatography A	6. 最初と最後の頁 461440 ~ 461440
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.chroma.2020.461440	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Ali Marwa F.B., Kishikawa Naoya, Kuroda Naotaka	4. 巻 1143
2. 論文標題 Development of HPLC method for estimation of glyoxylic acid after pre-column fluorescence derivatization approach based on thiazine derivative formation: A new application in healthy and cardiovascular patients' sera	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Chromatography B	6. 最初と最後の頁 122054 ~ 122054
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jchromb.2020.122054	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 HIGASHIJIMA Takumi, KISHIKAWA Naoya, KURODA Naotaka	4. 巻 36
2. 論文標題 Long-wavelength Fluorogenic Derivatization of Aryl Halides Based on the Formation of Stilbene by Heck Reaction with Vinylbenzenes	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Analytical Sciences	6. 最初と最後の頁 997 ~ 1001
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2116/analsci.20P031	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 El Maghrabey Mahmoud H., Kishikawa Naoya, Kuroda Naotaka	4. 巻 34
2. 論文標題 Current trends in isotope coded derivatization liquid chromatographic mass spectrometric analyses with special emphasis on their biomedical application	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biomedical Chromatography	6. 最初と最後の頁 e4756
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/bmc.4756	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 El-Maghrabey Mahmoud H., Watanabe Riho, Kishikawa Naoya, Kuroda Naotaka	4. 巻 1057
2. 論文標題 Detection of hydrogen sulfide in water samples with 2-(4-hydroxyphenyl)-4,5-di(2-pyridyl)imidazole-copper(II) complex using environmentally green microplate fluorescence assay method	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Analytica Chimica Acta	6. 最初と最後の頁 123-131
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.aca.2019.01.006	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Kishikawa Naoya, El-Maghrabey Mahmoud, Kuroda Naotaka	4. 巻 175
2. 論文標題 Chromatographic methods and sample pretreatment techniques for aldehydes determination in biological, food, and environmental samples	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis	6. 最初と最後の頁 112782
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jpba.2019.112782	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Fukuda Mizuho, Qianjun Liu, Ohyama Kaname, Kishikawa Naoya, Kuroda Naotaka	4. 巻 1510
2. 論文標題 Development of ultrafast colorimetric microplate assay method for ubiquinone utilizing the redox cycle of the quinone	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Microchemical Journal	6. 最初と最後の頁 104104
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.microc.2019.104104	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 YASAKA Naoyuki, KISHIKAWA Naoya, HIGASHIJIMA Takumi, OHYAMA Kaname, KURODA Naotaka	4. 巻 34
2. 論文標題 The Utility of Sonogashira Coupling Reaction for the Derivatization of Aryl Halides with Fluorescent Alkyne	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Analytical Sciences	6. 最初と最後の頁 1183 ~ 1188
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2116/analsci.18P117	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 El-Maghrabey Mahmoud H., Nakatani Taro, Kishikawa Naoya, Kuroda Naotaka	4. 巻 158
2. 論文標題 Aromatic aldehydes as selective fluorogenic derivatizing agents for dicarbonyl compounds. Application to HPLC analysis of some advanced glycation end products and oxidative stress biomarkers in human serum	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis	6. 最初と最後の頁 38 ~ 46
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jpba.2018.05.012	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 El-Maghrabey Mahmoud、Mine Masaki、Kishikawa Naoya、Ohyama Kaname、Kuroda Naotaka	4. 巻 180
2. 論文標題 A novel dual labeling approach enables converting fluorescence labeling reagents into fluorogenic ones via introduction of purification tags. Application to determination of glyoxylic acid in serum	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Talanta	6. 最初と最後の頁 323 ~ 328
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.talanta.2017.12.023	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 El-Maghrabey Mahmoud、Kishikawa Naoya、Kuroda Naotaka	4. 巻 90
2. 論文標題 Novel Isotope-Coded Derivatization Method for Aldehydes Using 14N/15N-Ammonium Acetate and 9,10-Phenanthrenequinone	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Analytical Chemistry	6. 最初と最後の頁 13867 ~ 13875
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.analchem.8b02458	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 KISHIKAWA Naoya	4. 巻 34
2. 論文標題 Derivatization Techniques for Chromatographic Analysis	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Analytical Sciences	6. 最初と最後の頁 1109 ~ 1110
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2116/analsci.highlights1810	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計33件 (うち招待講演 3件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 丹下愛佳理、東 杏澄、岸川直哉、大山 要、黒田直敬
2. 発表標題 Benzofuran-2-boronic acid の蛍光性二量体化反応に基づくアミンの定量法開発とクロマトグラフィーへの応用の試み
3. 学会等名 第 31 回クロマトグラフィー科学会議
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 福田貴之、岩田 光、岸川直哉、大山 要、黒田直敬、川上 茂
2. 発表標題 蛍光性アリアルキドを用いるミスチシンの蛍光誘導体化 HPLC 定量法の開発とナツメグへの応用
3. 学会等名 第 31 回クロマトグラフィー科学会議
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 坪上彩香、岸川直哉、Mahmoud H. El-Maghrabey、黒田直敬
2. 発表標題 チロシン選択的な紫外線照射化学発光分析法の開発とチロシン関連酵素活性測定への応用
3. 学会等名 新アミノ酸分析研究会第10回学術講演会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 長坂東奈、岸川直哉、Mahamoud H.El-Maghrabey、真木俊英、黒田直敬
2. 発表標題 HPLC 分析を目的とした α-アミノ酸に選択的な新規誘導体化反応の開発
3. 学会等名 新アミノ酸分析研究会第10回学術講演会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 岸川直哉、坪上彩香、El-Maghrabey Mahmoud、黒田直敬
2. 発表標題 チロシン選択的発光反応に基づくチロシナーゼ阻害剤のスクリーニング法の検討
3. 学会等名 日本薬学会第141年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 El-Maghrabey Mahmoud、鈴木 朝、岸川直哉、黒田直敬
2. 発表標題 2,4-ジニトロフェニルヒドラジンを試薬として用いる食用油中アルデヒド類のオンライン紫外線照射 HPLC 化学発光定量法
3. 学会等名 日本薬学会第141年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 高田 誠、原田 元、武藤純平、岸川直哉、北原隆志、黒田直敬、和田光弘
2. 発表標題 蒸気化カフェインのLC-MS/MS分析法の開発
3. 学会等名 日本薬学会第141年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 岸川直哉、出口華菜子、Mahmoud Hamed El-Maghrabey、黒田直敬
2. 発表標題 イミダゾール誘導体の生成に基づく α -アミノ酸に選択的な蛍光誘導体化
3. 学会等名 第79回分析化学討論会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 岸川直哉、Mahmoud Hamed El-Maghrabey、中谷太郎、黒田直敬
2. 発表標題 ターピリジンへの変換に基づくベンズアルデヒドの蛍光定量法の開発とsemicarbazide-sensitive amine oxidase 活性測定への応用
3. 学会等名 第32回バイオメディカル分析科学シンポジウム (BMAS2019)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 佐藤雄大、岸川直哉、Mahmoud H.El-Maghrabey、黒田直敬
2. 発表標題 キノンをシグナル発生タグとして用いる化学発光免疫測定法の開発
3. 学会等名 第17回次世代を担う若手のためのフィジカル・ファーマフォーラム (PPF2019)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 竇徳亮太、Mahmoud H.El-Maghrabey、岸川直哉、黒田直敬
2. 発表標題 14N/15N-酢酸アンモニウムを質量タグとして用いる α -ジカルボニル化合物の安定同位体誘導体 LC-MS/MS 定量法
3. 学会等名 第17回次世代を担う若手のためのフィジカル・ファーマフォーラム (PPF2019)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 岸川直哉、Mahmoud H.El-Maghrabey、黒田直敬
2. 発表標題 イミダゾール生成反応に基づく脂質過酸化アルデヒドの誘導体化LC-MS/MS定量法の開発
3. 学会等名 第44回日本医用マススペクトル学会年会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 岸川直哉、黒田直敬
2. 発表標題 酸化ストレス評価を目的とする脂質過酸化物の誘導体化 HPLC 定量法の開発
3. 学会等名 第59回日本臨床化学会年次学術集会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 清野奨太、岸川直哉、黒田直敬
2. 発表標題 銅イオン及び亜鉛イオンに対して異なる発色応答を示す比色プローブの開発
3. 学会等名 第36回日本薬学会九州支部大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 東嶋拓海、岸川直哉、黒田直敬
2. 発表標題 Heck couplingに基づくアリールハライドの長波長発蛍光誘導体化の検討
3. 学会等名 第36回日本薬学会九州支部大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 坪上彩香、岸川直哉、黒田直敬
2. 発表標題 チロシンを選択的に検出可能な化学発光分析法によるチロシナーゼ活性測定法の開発
3. 学会等名 第36回日本薬学会九州支部大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山道 彩、Mahmoud Hamed El-Maghrabey、岸川直哉、黒田直敬
2. 発表標題 2,2'-ビミダゾールへの変換に基づくグリオキサールの蛍光マイクロプレートアッセイの開発
3. 学会等名 第36回日本薬学会九州支部大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Mahmoud El -Maghrabey、Yudai Sato、Naoya Kishikawa、Naotaka Kuroda
2. 発表標題 A non-enzymatic approach for immunoassay based on using quinones as chemiluminescence signal generators
3. 学会等名 第36回日本薬学会九州支部大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 鈴木 朝、Mahmoud Hamed El-Maghrabey、岸川直哉、黒田直敬
2. 発表標題 2,4-ジニトロフェニルヒドラジンによる誘導体化と紫外線照射反応を組み合わせたアルデヒドのHPLC-化学発光定量法の開発
3. 学会等名 第36回日本薬学会九州支部大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 長坂東奈、出口華菜子、Mahmoud Hamed El-Maghrabey、岸川直哉、黒田直敬
2. 発表標題 9,10-フェナンスレンキノン及び酢酸アンモニウムを用いる α -アミノ酸に選択的な新規発光誘導体化反応
3. 学会等名 第36回日本薬学会九州支部大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 岸川直哉、坂元優介、黒田直敬
2. 発表標題 一酸化炭素検出を目的とする quinazolinone 型蛍光プローブの開発
3. 学会等名 日本薬学会第140年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 岸川直哉
2. 発表標題 生体分析試薬としてのキノンの利用
3. 学会等名 第31回九州分析化学若手の会春の講演会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 黒田直敬、岸川直哉
2. 発表標題 -ケトカルボニル化合物の発蛍光誘導体化 HPLC 定量法の開発と疾患患者血清への応用
3. 学会等名 第58回日本臨床化学会年次学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 東嶋拓海、岸川直哉、黒田直敬
2. 発表標題 Sonogashira coupling 及び Heck coupling によるアリールハライドの長波長発蛍光誘導体化
3. 学会等名 第31回バイオメディカル分析科学シンポジウム (BMAS2018)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 牛島成美、岸川直哉、福田瑞穂、El-Maghrabey MH、池本一人、黒田直敬
2. 発表標題 血漿中ピロロキノリンキノン (PQQ) の HPLC 化学発光定量法の開発と親油化 PQQ の経口吸収性評価への応用
3. 学会等名 第31回バイオメディカル分析科学シンポジウム (BMAS2018)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 竇徳亮太、El-Maghrabey MH、岸川直哉、黒田直敬
2. 発表標題 -ジカルボニル化合物の15N-酢酸アンモニウムによる安定同位体誘導体化 LC-MS/MS定量法の開発
3. 学会等名 第31回バイオメディカル分析科学シンポジウム (BMAS2018)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 岡本悠祐、岸川直哉、萩森政頼、川上 茂、黒田直敬
2. 発表標題 ヒドラジドによる off/on 制御に基づく銅イオン選択的蛍光プローブの開発
3. 学会等名 第16回次世代を担う若手のためのフィジカル・ファーマフォーラム (PPF2018)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 出口華菜子、El-Maghrabey MH、岸川直哉、黒田直敬
2. 発表標題 9,10-フェナンスレンキノンを試薬として用いるアミノ酸選択的蛍光誘導体化 HPLC 定量法の開発
3. 学会等名 第16回次世代を担う若手のためのフィジカル・ファーマフォーラム (PPF2018)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 岸川直哉、永井海舟、秋武将俊、黒田直敬
2. 発表標題 抗酸化物質の探索を目的とする化学発光イメージング / HPLCシステムの開発と食品への応用
3. 学会等名 日本分析化学会第67年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 佐藤雄大、El-Maghrabey MH、岸川直哉、黒田直敬
2. 発表標題 新規化学発光イムノアッセイ開発を目的とするピオチン導入ナフトキノンの合成と評価
3. 学会等名 生物発光化学発光研究会第 34 回学術講演会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 岸川直哉、沼田 翔、梅野智大、大山 要、田中正一、黒田 直敬
2. 発表標題 非天然型アミノ酸を含むペプチドにより修飾した新規HPLC用固定相の調製とその評価
3. 学会等名 第29回クロマトグラフィー科学会議
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 河村麻由、岸川直哉、黒田直敬
2. 発表標題 ルテニウム-ピピリジン錯体を用いるキノンの HPLC 化学発光定量法の開発
3. 学会等名 第35回日本薬学会九州支部大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 岸川直哉、渡辺凜歩、El-Maghrabey MH、岸川直哉、黒田直敬
2. 発表標題 ロフィン類似誘導体-銅錯体を用いる硫化水素の蛍光定量法の開発
3. 学会等名 日本薬学会第139年会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 El-Maghrabey Mahmoud, El-Shaheny Rania, Belal Fathalla, Kishikawa Naoya, Kuroda Naotaka	4. 発行年 2020年
2. 出版社 Springer, Cham	5. 総ページ数 27
3. 書名 Nanosensor Technologies for Environmental Monitoring. Nanotechnology in the Life Sciences.	

1. 著者名 El-Maghrabey M, El Hamd MA, El-Shaheny R, Kishikawa N, Kuroda N	4. 発行年 2021年
2. 出版社 Elsevier, Netherlands	5. 総ページ数 27
3. 書名 Green Sustainable Process for Chemical and Environmental Engineering and Science: Green Solvents for Environmental Remediation	

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 チロシンの検出方法、チロシン関連酵素の活性測定方法およびチロシン関連酵素の活性阻害剤のスクリーニング方法	発明者 岸川直哉、黒田直敬、堀 裕輝、坪上彩香	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、2020-104314	出願年 2020年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

長崎大学生命医科学域（薬学系）薬品分析化学研究室 http://www.ph.nagasaki-u.ac.jp/lab/analysis/index-j.html

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関			
エジプト	Mansoura University	Assiut University		