

機関番号：	37111
研究種目：	若手研究（B）
研究期間：	2008～2010
課題番号：	20790417
研究課題名（和文）	有機酸代謝異常症を対象とした簡易マススクリーニング法のシステム化に関する研究
研究課題名（英文）	Development of simple mass screening method for the diagnosis of organic aciduria
研究代表者	
	吉田 秀幸（YOSHIDA HIDEYUKI）
	福岡大学 ・ 薬学部 ・ 准教授
	研究者番号： 20301690

## 研究成果の概要（和文）：

エキシマー蛍光誘導体化法を用いることで、有機酸代謝異常症（グルタル酸尿症、メチルマロン酸尿症や Canavan 病など）に起因する生体中のポリカルボン酸（アジピン酸、グルタル酸、メチルマロン酸や *N*-アセチルアスパラギン酸など）を効率的に一斉計測する手法を開発した。蛍光プレートリーダーを用いる総ジカルボン酸量の一斉概算計測によるスクリーニングと HPLC を用いる各ジカルボン酸の精密分析の組み合わせにより、上記疾病の簡便・迅速なマススクリーニング法を構築することに成功した。

## 研究成果の概要（英文）：

A simple screening method of organic aciduria by fluorometric measurement of total dicarboxylic acids in human urine is developed. This method is based on an intramolecular excimer-forming fluorescence derivatization with a pyrene reagent. This technique is so selective that it permits fluorometric measurement of total amount of dicarboxylic acids by the direct derivatization of diluted urine samples. The same reaction mixture was also served as a high-performance liquid chromatographic sample for the separative determination of individual dicarboxylic acids.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野： 分析化学

科研費の分科・細目： 医歯薬学・境界医学・病態検査学

キーワード： 分析化学・マススクリーニング・ジカルボン酸・有機酸代謝異常症・エキシマー蛍光・蛍光誘導体化・生体計測

### 1. 研究開始当初の背景

現在、グルタル酸尿症やメチルマロン酸尿症のような有機酸代謝異常症を対象としたスクリーニング法として、MS/MS法が汎用されている。しかしながら、そのランニングコストは高価で、また単検体ごとの分析しかできないために、多検体の分析を不得手としている。

一方、我々が先に開発した「エキシマー蛍光誘導体化法」は、分子内に複数の同一官能基を有する化合物群を極めて特異的に検知することができる手法である。これまでに、ポリアミン（腫瘍マーカー）やヒスタミン、ビスフェノール（内分泌攪乱化学物質）やポリチオール性医薬品の分析に適用し、それらの高感度・高選択的定量を達成している。

有機酸代謝異常症の診断マーカーとされているいくつかはジカルボン酸構造（分子内にカルボキシル基が2つ）を有しているので、5年前に私は、異常症診断のためのスクリーニングにエキシマー蛍光誘導体化法の導入を試みた。H18・19年度に行ったジカルボン酸標品を用いての予備的検討の結果を受けて、今回の研究では方法論の最適化並びにスクリーニング法としてのシステム化を目指している。

### 2. 研究の目的

本研究の最終的な目標は、「有機酸代謝異常症診断のためのマススクリーニングシステムを構築すること」である。即ち、グルタル酸尿症に起因するグルタル酸やアジピン酸、メチルマロン酸尿症時に増大するメチルマロン酸、あるいはCanavan病に由来するN-アセチルアスパラギン酸等の生体中ポリカルボン酸のトータル存在量をエキシマー蛍光法で迅速・瞬時に多検体計測し、健康人領域のカットオフ値を超えた一部の試料（陽性・擬陽性）についてのみ精査診断を実施する、という効率的なスクリーニングプロトコルの確立を目指す。

なお、スクリーニング後の精査診断にもエキシマー蛍光反応を行ったものを用いる。陽性（擬陽性）サンプルのみをHPLC-蛍光法で分析することで、圧倒的に多数に存在する陰性サンプルの分析に時間をかけることなく、各ジカルボン酸の選択的分別定量のハイスループット化を試みる。

### 3. 研究の方法

カルボキシル基反応性のピレン試薬で誘導体化した生体試料を蛍光プレートリーダー解析し、エキシマー蛍光発現の有無を調べることで、多検体中の総ジカルボン酸量を一斉に測定することが可能となる。この方法を用いることで、一段階目のスクリーニングに要する分析時間をタンデムMS法の1/100程度

に短縮できる。このスクリーニングでカットオフ値を超えた試料についてのみHPLC分析を実施し、試料中に存在するポリカルボン酸種の特定及びその定量を行う。このようなスクリーニングプロトコルを確立するため、多試料を分析したときの結果を統計的に処理し、本法の有用性や実用性等を多面的に評価する。

#### (1) エキシマー蛍光誘導体化（図1）による特異的ジカルボン酸計測

ポリカルボン酸化合物をピレン試薬で処理すると、分子内の各カルボキシル基それぞれにピレン構造が導入される。これをピレン励起波長345 nmで励起すると、ピレン構造が二量体を形成し、ピレン骨格通常より長波長域のエキシマー蛍光（Em. 360-420 nm）より長波長域のエキシマー蛍光（Em. 420-520 nm）を発する。そのためエキシマー蛍光強度を観測することにより、添加された試薬あるいは生体内に多種多量に存在するモノカルボン酸類（これらはピレンモノマー蛍光を発する）の妨害を受けることなく、ポリカルボン酸類を選択的かつ高感度に分析できる。エキシマー蛍光誘導体化は、蛍光スペクトル分析やプレートリーダー解析による全ポリカルボン酸総量の迅速な概算計測を可能とし、またその試料の精密HPLC分析により各ポリカルボン酸を個別定量することもできる。

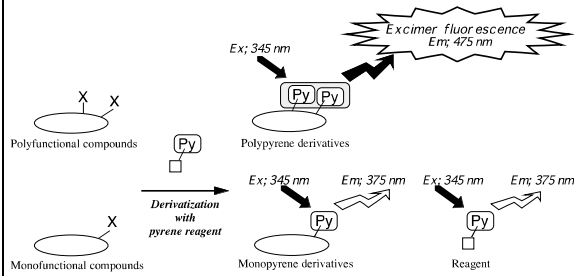


図1 エキシマー蛍光誘導体化の原理

- (2) 蛍光プレートリーダーを用いるハイスループット・スクリーニング
- (3) HPLC-蛍光検出法によるジカルボン酸の高感度計測

適当な方法で除タンパクした血液あるいは尿試料に対してカルボキシル基反応性の試薬でピレン誘導体化を行い、反応液を蛍光プレートリーダー解析（あるいは蛍光スペクトル測定）することで、エキシマー蛍光の発現の有無を観測する（図2上段の左右）。生体サンプルからのエキシマー蛍光の発現は、その試料中に大量のポリカルボン酸類（種類は不明）が存在していることを示しており、何らかの異常代謝が起きていることを示唆するものである。

蛍光プレートリーダーは多検体からのエキシマー蛍光の発現を一斉検知するに最適の装置である。スペクトル分析（図2上段の右

側) でジカルボン酸量を計測するためには 1 検体に 1 分程度かかるが、プレートリーダー(図 2 上段の左側) では 1 プレート (96 もしくは 386 検体) につき 3 分間の計測時間で十分であり、極めてハイスループットな有機酸代謝異常症マスキングが可能である。

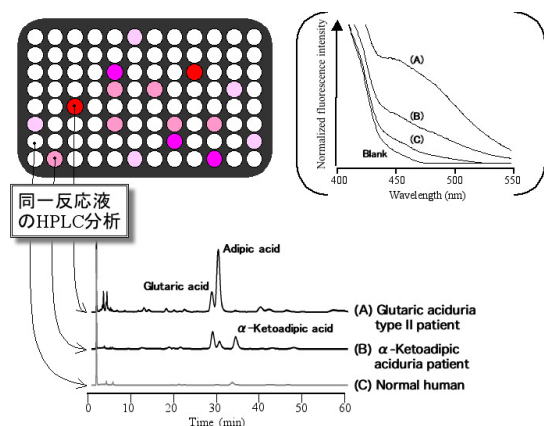


図 2 本スクリーニングの概念図

前述のプレートリーダー解析 (あるいはスペクトル分析) によるマスキングで総ポリカルボン酸量がカットオフ値を超えた試料について、同一反応液に対する HPLC 分析を実施し、試料中に存在するカルボン酸種の特定及びその個別定量を行う。HPLC 分析は一試料毎に 40 分間程度の測定時間 (上図の下段のクロマトグラム) を要するが、プレートリーダー解析によるサンプルの抽出をかけることで、絶対的多数の割合で存在する健常人の分析に無駄な労力、時間やコストを割かなくて済むという大きな利点が得られる。

#### (4) 有機酸代謝異常症診断のためのマスキングシステム構築

多数の生体試料に対する蛍光プレートリーダー解析と HPLC 精査分析を併行実施する。両計測法による分析結果の相関性を統計的に解析することで、本法のマスキング法としての有用性・有効性・実用性を多面的かつ機能的に評価する。

設定した蛍光プレートリーダー解析における暫定的カットオフ値の妥当性も検証可能であり、その値の見直しについても検討する。最終的なカットオフ値 (蛍光強度) を設定することで、生体中ポリカルボン酸のトータル存在量をプレートリーダー法で迅速・瞬時に計測し、健常人領域値を超えた一部の試料についてのみ HPLC 精査診断を実施する、というスクリーニングプロトコルを確立する。

#### 4. 研究成果

これまでの検討で見出していた 4-(1-pyrene)butanoic acid hydrazide や 4-(1-

pyrene)butylamine と脱水縮合剤 EDC の組み合わせではメチルマロン酸 (MMA) や  $\alpha$ -ケトアジピン酸 (KAA) の分析が困難だったが、新たに設定した(1-pyrene)methylamine とアミド化選択的な縮合剤 DMT-MM の組み合わせに変更した結果、疾患の診断指標となる 5 種のジカルボン酸 (アジピン酸, グルタル酸, MMA, KAA 及び *N*-アセチルアスパラギン酸) を感度・再現性良くエキシマー蛍光検出することができた。

そこでこの方法を健常者尿試料に適用し、HPLC での定量値との間で正確性を算出したところ、極めて良好な値 (103~108 %) を示した。しかしながら、健常者尿試料からはクエン酸 (CA) に由来する大きなピークが検出された。トリカルボン酸である CA は健常者尿中にも比較的多量に存在するため、総ジカルボン酸量の算出を妨害する可能性がある。そこで反応液の固相抽出による CA 除去を試みたところ、疾患の診断指標となる 5 種のジカルボン酸のみを良好に回収 (90~111 %) しつつ、CA を除去することができた。HPLC 及び蛍光プレートリーダーを用いた添加検量線の直線性 ( $r^2 \geq 0.991$ ) 及び再現性 (R. S. D. < 8.2 %) はともに良好な値を示したことから、本法を  $\alpha$ -ケトアジピン酸尿症患者及び複数の健常者の尿試料に適用した (Table 1)。蛍光プレートリーダーでは、患者及び健常者間における総ジカルボン酸量の定量値には明瞭な差が確認された。また同一反応液を HPLC で測定したところ、疾患の診断指標となる各ジカルボン酸種の同定・定量が可能であった。蛍光プレートリーダーで求めた尿中総ジカルボン酸量と HPLC で求めた各ジカルボン酸種の積算量には、患者に顕著なジカルボン酸の増加が見られたという点で相関が確認された。

表 1 ヒト尿中ジカルボン酸量

Group	Age, Sex	Dicarboxylic acid concentration ( $\mu\text{mol/g Cr}$ )					Microplate reader analysis <sup>a</sup>
		NAA	KAA	GA	AA	MMA	
3, male	40	590	10	80	20	540	200
4, male	N.D. <sup>b</sup>	520	50	500	50	820	4600
7, male	N.D.	1530	320	80	60	1990	4900
8, female	N.D.	620	180	70	30	900	2900
23, male	4	180	20	10	20	230	2300
24, male	4	180	50	20	20	270	3100
25, male	5	160	50	10	20	240	3000
26, male	5	180	50	10	20	260	3100
39, male	N.D. <sup>b</sup>	910	90	60	70	1100	1600
30, male	N.D. <sup>b</sup>	59100	29600	1100	2100	91900	129000

<sup>a</sup> Keesalipic

<sup>b</sup> The amount was calculated as AA.

<sup>c</sup> Not determined.

以上の結果から、本法はジカルボン酸の増加を伴う疾患のマスキングに有用であり、有機酸代謝異常症マスキングの可能性が示唆された。

#### 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. Yoshitake, H. Nohta, N. Sejima, K. Todoroki, H. Yoshida, M. Yamaguchi;

- Selective Determination of Cysteines through Precolumn Double-labeling and Liquid Chromatography Followed by Detection of Intramolecular FRET; *Analytical and Bioanalytical Chemistry* (査読有), **399** (2011) 1665-1675.
- (2) S. Ijiri, K. Todoroki, H. Yoshida, T. Yoshitake, H. Nohta, M. Yamaguchi; Sensitive Determination of Rhodamine 110-labeled Monosaccharides in Glycoproteins by Capillary Electrophoresis with Laser-induced Fluorescence Detection; *Journal of Chromatography A* (査読有), **1217** (2010) 3161-3166.
- (3) K. Todoroki, H. Hashimoto, T. Mikawa, M. Itoyama, T. Hayama, E. Kojima, H. Yoshida, H. Nohta, M. Yamaguchi; Reagent Peak-free Liquid Chromatography-Fluorescence Analysis of Carboxylic Acids Using Fluorous Scavenging-Derivatization Method; *Analytical and Bioanalytical Chemistry* (査読有), **397** (2010) 2409-2416.
- (4) T. Hayama, Y. Sakaguchi, H. Yoshida, M. Itoyama, K. Todoroki, M. Yamaguchi, H. Nohta; Fluorous Derivatization Combined with LC-MS/MS: A Method for the Selective and Sensitive Determination of Sialic Acids in Biological Samples; *Rapid Communication in Mass Spectrometry* (査読有), **24** (2010) 2868-2874.
- (5) Y. Sakaguchi, H. Yoshida, K. Todoroki, H. Nohta, M. Yamaguchi; Separation-oriented Derivatization of Native Fluorescent Compounds through Fluorous Labeling Followed by LC with Fluorous-phase; *Analytical Chemistry* (査読有), **81** (2009) 5039-5045.
- (6) T. Inoue, M. Sudo, H. Yoshida, K. Todoroki, H. Nohta, M. Yamaguchi; Liquid Chromatographic Determination of Polythiols Based on Pre-column Excimer Fluorescence Derivatization and Its Application to  $\alpha$ -Lipoic Acid Analysis; *Journal of Chromatography A* (査読有), **1216** (2009) 7564-7569.
- (7) F. Ichinose, T. Yoshitake, H. Yoshida, K. Todoroki, J. Kehr, O. Inoue, H. Nohta, M. Yamaguchi; Determination of Histamine in Rat Plasma and Tissue Extracts by Intramolecular Excimer-forming Derivatization and LC with Fluorescence Detection; *Chromatographia* (査読有), **70** (2009) 575-580.
- (8) H. Yoshida, M. Sudo, K. Todoroki, H. Nohta, M. Yamaguchi; Highly Selective and Simple Method for Determination of Polythiols Based on Liquid Chromatography with Post-column Excimer Fluorescence Derivatization; *Analytical Sciences* (査読有), **25** (2009) 829-832.
- [学会発表] (計 58 件)
- (1) 櫻井雄一郎, 佐々木桃子, 吉田秀幸, 糸山美紀, 巴山忠, 轟木堅一郎, 能田均, 山口政俊; エキシマー蛍光誘導体化によるジカルボン酸分析に基づく有機酸代謝異常症マススクリーニング法の開発(3) ~メチルマロン酸尿症診断への適用~; 第 27 回日本薬学会九州支部大会 (2010 年 12 月 11 日), 長崎大学 (長崎市)
- (2) 橋本裕輝, 内藤展江, 森俊訓, 轟木堅一郎, 糸山美紀, 巴山忠, 吉田秀幸, 能田均, 中島学, 山口政俊; FSD 法による高極性有機酸の蛍光誘導体化 HPLC 分析(2) ~TCA サイクル中間体分析への適用~; フルオラス科学研究会第 3 回シンポジウム (2010 年 10 月 8 日), 長良川国際会議場 (岐阜市)
- (3) 櫻井雄一郎, 佐々木桃子, 古賀雅子, 吉田秀幸, 糸山美紀, 巴山忠, 轟木堅一郎, 能田均, 山口政俊; エキシマー蛍光誘導体化によるジカルボン酸分析に基づく有機酸代謝異常症マススクリーニング法の開発; 日本分析化学会第 59 年会 (2010 年 9 月 15 日), 東北大学 (仙台市)
- (4) 橋本裕輝, 轟木堅一郎, 糸山美紀, 巴山忠, 吉田秀幸, 能田均, 山口政俊; Fluorous Scavenging Derivatization (FSD) 法による試薬ピークの検出されない高極性有機酸の蛍光誘導体化-HPLC 分析『模範ポスター発表』; 第 28 回九州分析化学若手の会夏季セミナー (2010 年 7 月 30 日), 雲仙みかどホテル (長崎県南島原市)
- (5) K. Todoroki, H. Hashimoto, T. Mikawa, M. Itoyama, T. Hayama, H. Yoshida, H. Nohta, M. Yamaguchi; Reagent Peak-Free Liquid Chromatography-Fluorescence Analysis of Carboxylic Acids Using Fluorous Scavenging Derivatization Method; *The 35th International Symposium on High Performance Liquid Phase Separations & Related Techniques* (2010 年 6 月 22 日), The Hynes

- Convention Center (Boston, MA, USA)
- (6) 吉田秀幸; 蛍光分子間相互作用を利用する生体成分の高選択的分析『招待講演』; 第23回九州分析化学若手の会春の研究講演会(2010年5月22日), 福岡女子大学(福岡市)
  - (7) 坂口洋平, 吉田秀幸, 巴山忠, 糸山美紀, 轟木堅一郎, 能田均, 山口政俊; フルオラス化学を基盤とする分離指向性誘導体化LC法の開発; 第26回日本薬学会九州支部大会(2009年12月12日), 九州大学(福岡市)
  - (8) 橋本裕輝, 轟木堅一郎, 糸山美紀, 巴山忠, 吉田秀幸, 能田均, 山口政俊; Fluorous Scavenging Derivatization (FSD)法による高極性有機酸の蛍光誘導体化HPLC分析; 第2回フルオラス科学研究会シンポジウム(2009年11月27日), ITビジネスプラザ武蔵(金沢市)
  - (9) 櫻井雄一郎, 吉田秀幸, 糸山美紀, 巴山忠, 轟木堅一郎, 能田均, 山口政俊; エキシマー蛍光誘導体化を用いるジカルボン酸分析に基づく有機酸代謝異常症マスキング法の開発; 第27回九州分析化学若手の会夏季セミナー(2009年7月31日), 宮崎観光ホテル(宮崎市)
  - (10) 坂口洋平, 吉田秀幸, 轟木堅一郎, 能田均, 山口政俊; フルオラス誘導体化による自然蛍光性カルボン酸の高選択的分析(3)~尿中腫瘍マーカー計測への適用~; 第46回化学関連支部合同九州大会(2009年7月11日), 北九州国際会議場(北九州市)
  - (11) 轟木堅一郎, 美川智彦, 吉田秀幸, 能田均, 山口政俊; Fluorous Scavenging Derivatization法による試薬ピークを出さない有機酸の蛍光誘導体化-HPLC分析; 第16回クロマトグラフィーシンポジウム(2009年5月29日), 長崎大学(長崎市)
  - (12) 轟木堅一郎, 美川智彦, 吉田秀幸, 能田均, 山口政俊; Fluorous Scavenging Derivatization法による有機酸の蛍光誘導体化-HPLC分析; 第70回分析化学討論会(2009年5月16日), 和歌山大学(和歌山市)
  - (13) H. Yoshida, T. Inoue, H. Umemura, M. Sudo, K. Todoroki, H. Nohta, M. Yamaguchi; Liquid Chromatographic Determination of Lipoic Acid-related Compounds based on Intramolecular Excimer-forming Derivatization and Fluorescence Detection; *The 33rd International Symposium on High Performance Liquid Phase Separations & Related Techniques*(2008年12月4日), Kyoto University (Kyoto, Japan)

- (14) 坂口洋平, 池永純, 吉田秀幸, 轟木堅一郎, 能田均, 山口政俊; フルオラス誘導体化による自然蛍光性カルボン酸の高選択的分析(2)~医薬品分析への適用~; 第19回クロマトグラフィー科学会議(2008年12月1日), 京都大学(京都市)
- (15) 坂口洋平, 池永純, 吉武誠, 吉田秀幸, 轟木堅一郎, 能田均, 山口政俊; フルオラス誘導体化による自然蛍光性カルボン酸のHPLC分析; 日本分析化学会第57年会(2008年9月10日), 福岡大学(福岡市)
- (16) 山口政俊, 古賀雅子, 吉田秀幸, 轟木堅一郎, 能田均, 廣瀬伸一; 簡便・迅速な有機酸代謝異常症マスキング法の開発; 第21回バイオメディカル分析科学シンポジウム(2008年8月7日), 札幌コンベンションセンター(札幌市)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

○取得状況(計1件)

名称:チオール化合物の同時連続分析方法  
およびそれに使用する同時連続分析装置

発明者:吉田秀幸, 山口政俊, 能田均, 轟木堅一郎, 井上高志

権利者:学校法人 福岡大学

種類:特許

番号:特許公開2010-48568

取得年月日:2010年3月4日

国内外の別:国内

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.pha.fukuoka-u.ac.jp/~bunseki/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

吉田 秀幸 (YOSHIDA HIDEYUKI)  
福岡大学 ・ 薬学部 ・ 准教授  
研究者番号: 20301690

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし