

令和 6 年 6 月 12 日現在

機関番号：26201

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K07394

研究課題名（和文）新規アミノ酸発色法を用いた臨床検査法の開発

研究課題名（英文）Development of clinical test using new amino acid coloring method

研究代表者

徳原 康哲（Tokuhara, Yasunori）

香川県立保健医療大学・保健医療学部・准教授

研究者番号：60746329

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,000,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は、アミノ酸の新規発色法を開発し、生体試料中のアミノ酸を測定する臨床検査法への応用を目的とする。研究期間（2021～2023年度）では、必須アミノ酸の一つであるトリプトファンの新規検出法に関する研究、さらに、エレクトロスプレーイオン化質量分析法（ESI-MS）を用いたアミノ酸の中間代謝産物（ホモゲンチジン酸）の検出に関する研究を実施した。研究期間全体を通じて、研究代表者が責任著者として3編の論文発表そして6件の国内学会発表を行った。さらに、2023年度には日本臨床化学会の奨励賞を受賞する等、アミノ酸やその代謝産物を検出する新たな方法に関する研究成果を国内外に発表することができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

トリプトファンは必須アミノ酸の一つであり、肝疾患や精神疾患等で体内濃度が変化するため、体内動態を観察することが重要である。希塩酸や次亜塩素酸ナトリウム五水和物等を用いてトリプトファンを赤褐色に発色させる我々の方法は、生体試料中のトリプトファン濃度を定量する簡易・迅速な臨床検査法の開発に有用である。ホモゲンチジン酸は、アミノ酸であるフェニルアラニンやチロシンの中間代謝産物であり、アルカプトン尿症患者の尿中に大量に排出される物質である。微量物質を検出できるエレクトロスプレーイオン化質量分析法（ESI-MS）を用いてホモゲンチジン酸を測定することは、アルカプトン尿症患者の発見に有用である。

研究成果の概要（英文）：This study aims to develop a novel colorimetric method for amino acids and apply it to clinical tests for measuring amino acids in biological samples. During the research period (2021-2023), we focused on developing a new detection method for tryptophan, one of the essential amino acids, and conducted research on the detection of amino acid intermediates (homogentisic acid) using electrospray ionization mass spectrometry (ESI-MS).

Throughout the entire research period, the principal investigator (Yasunori Tokuhara) published three papers as the corresponding author and made six presentations at domestic conferences. Furthermore, in 2023, the principal investigator was awarded the Outstanding Young Investigator Award of the Japan Society of Clinical Chemistry (JSCC). These research results on new methods for detecting amino acids and their metabolites were presented both domestically and internationally.

研究分野：臨床検査医学

キーワード：アミノ酸 次亜塩素酸ナトリウム五水和物 吸光度 トリプトファン ホモゲンチジン酸 質量分析 生化学自動分析装置

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、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

アミノ酸代謝異常症には様々な疾患が存在する。種々のアミノ酸代謝経路の異常により、血中や尿中のアミノ酸やその中間代謝産物の濃度が著しく上昇し、中枢神経系等に重大な障害を与えるため、アミノ酸の代謝異常を早期に発見し治療することが重要である。現在は、質量分析装置を用いたタンデムマス法による新生児マススクリーニングの実施により、主な先天性アミノ酸代謝異常症(フェニルケトン尿症、メープルシロップ尿症、ホモシスチン尿症等)の早期発見が可能となっている。しかし、アミノ酸を検査するうえで次の2点の問題がある。

- 生体内のアミノ酸を測定する臨床検査法は確立されていないため、新生児マススクリーニング対象外のアミノ酸代謝異常症の早期発見が困難である。
- 血中や尿中等のアミノ酸分析には、HPLC法や質量分析法が使用されているが、高額な専用分析装置が必要である点や、操作手技が煩雑である点から、多くの病院検査室では臨床検査が実施されておらず、ほとんどが院外検査となっている。

以上の背景から我々は、新生児マススクリーニング対象外の疾患の早期発見や、アミノ酸を検出する簡易・迅速な臨床検査法の開発に関連する研究をおこなった。

2. 研究の目的

(1) **エレクトロスプレーイオン化質量分析法(ESI-MS)によるホモゲンチジン酸(HGA)検出に関する検討**: アルカプトン尿症は、常染色体劣性遺伝のアミノ酸代謝異常症である。病因は、チロシン代謝酵素のひとつであるHGA酸化酵素の遺伝的欠損にある。このため、フェニルアラニンやチロシンがフマル酸やアセト酢酸に代謝される経路において、その中間代謝産物であるHGAの血中濃度が上昇し、尿中に大量に排泄される。アルカプトン尿の特徴として、室温放置によりHGAが酸化し、尿の色調が茶褐色に変化することが知られている。また、アルカプトン尿症はアミノ酸代謝異常症であるが、新生児マススクリーニング対象外の疾患であるため、早期発見が困難であるのが現状である。本研究では、アルカプトン尿症の早期発見を目的に、ESI-MSを用いたHGAの検出に関する基礎的検討をおこなった。

(2) **トリプトファンの新規発色法に関する検討**: 必須アミノ酸のひとつであるトリプトファンは、生命維持に欠かせない栄養素である。トリプトファンは、肝疾患や精神疾患等で体内濃度が変化することが報告されているため、体内動態を観察することが重要と考えられているが、生体試料中のトリプトファン濃度を定量する簡便な臨床検査法は未だ確立されていない。そのため、本研究では、生化学自動分析装置を用いて簡易・迅速にトリプトファン濃度を測定する新規臨床検査法の確立を目的とし、今回は、次亜塩素酸ナトリウム五水和物($\text{NaOCl} \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)を用いた新規トリプトファン発色法に関する基礎的検討をおこなった。

3. 研究の方法

(1) **ESI-MSによるHGA検出に関する検討**

【測定機器】Solarix 9.4 T (Bruker Daltonics)

【試薬】ホモゲンチジン酸(HGA)(東京化成工業)、次亜塩素酸ナトリウム五水和物($\text{NaOCl} \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)(ナカライテスク)、0.5 mol/L水酸化カリウム水溶液(KOH)、0.1 mol/Lリン酸緩衝液(pH6.0, 7.0, 8.0)(以上、富士フイルム和光純薬)

【解析方法】

pHと色調変化の関連性(室温放置とアルカリ溶液添加)

10.0 g/LのHGA水溶液80 μL を、0.1 mol/Lリン酸緩衝液(pH6.0, 7.0, 8.0)720 μL にそれぞれ溶解後、室温で24時間放置し、色調変化の観察をおこなった。次に、1.0 g/L HGA水溶液(pH6.0, 7.0, 8.0)800 μL に、0.5 mol/L KOH 30 μL をそれぞれ添加し、室温で1時間放置後の色調変化を観察した。

ESI-MSによるマスペクトル解析

1.0 g/L HGA水溶液(pH6.0, 7.0, 8.0)800 μL 、1.0 g/L HGA水溶液(pH6.0, 7.0, 8.0)800 μL を室温で24時間放置したもの、そして、1.0 g/L HGA水溶液(pH6.0, 7.0, 8.0)800 μL に0.5 mol/L KOH 30 μL をそれぞれ添加し室温で1時間放置したものを測定試料として、Solarix 9.4 Tを用いESI-MS(負イオンモード)による解析を実施した。

(2) **トリプトファンの新規発色法に関する検討**

【測定機器】分光光度計U-2900(日立ハイテクサイエンス)

【試薬】L-トリプトファン、L-セリン、グリシン、L-アラニン、L-ロイシン、L(+)-アルギニン、L-チロシン、L-メチオニン、L-ヒスチジン、L(-)-トレオニン、L(+)-イソロイシン、L(-)-プロリン、L(+)-リシン、L-バリン、L(-)-フェニルアラニン、L-システイン、L(+)-グルタミン、L-グルタミン酸、L-アスパラギン、L-アスパラギン酸、10%塩酸、(以上、富士フイルム和光純薬)、次亜塩素酸ナトリウム五水和物($\text{NaOCl} \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)、グルタミン酸ナトリウム(MSG)(以上、ナカライテスク)

【解析方法】

トリプトファンの発色反応と吸光度の観察

20 種類 (トリプトファン, セリン, グリシン, アラニン, ロイシン, アルギニン, メチオニン, ヒスチジン, トレオニン, イソロイシン, プロリン, フェニルアラニン, リジン, バリン, システイン, グルタミン, グルタミン酸, アスパラギン, アスパラギン酸, チロシン) の各アミノ酸水溶液 (100 mg/L) 600 μ L に, 200 g/L グルタミン酸ナトリウム (MSG) 水溶液 100 μ L を加え混和, 次に 10%塩酸 10 μ L を加え混和, 最後に 3%次亜塩素酸ナトリウム五水和物 ($\text{NaOCl} \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) 水溶液 10 μ L を加えて混和し, 室温で 10 分間反応させた後に色調変化を確認した. さらに, 様々な濃度 (25, 50, 100 mg/L) のトリプトファン水溶液を発色させ, U-2900 を用いて各試料の吸光度を測定した.

MSG や $\text{NaOCl} \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ の添加濃度の検討

50 mg/L トリプトファン水溶液 600 μ L に, 様々な濃度の MSG 水溶液 (100, 200, 300, 400, 500 g/L) 100 μ L を加え混和, 次に 10%塩酸 10 μ L を加え混和, 最後に 3% $\text{NaOCl} \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 水溶液 10 μ L を加えて混和し, 室温で 10 分間反応させた後に吸光度を測定した. ブランク試料 (Reagent blank) には, 精製水 600 μ L に 400 g/L MSG 水溶液 100 μ L, 10%塩酸 10 μ L, そして, 3% $\text{NaOCl} \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 水溶液 10 μ L を加えたものを使用した. また, 50 mg/L トリプトファン水溶液 600 μ L に, 400 g/L MSG 水溶液 100 μ L を加え混和, 次に 10%塩酸 10 μ L を加え混和, 最後に様々な濃度 (1, 3, 5, 10, 20%) の $\text{NaOCl} \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 水溶液 10 μ L を加えて混和し, 室温で 10 分間反応させた後に吸光度を測定した. ブランク試料 (Reagent blank) には, 精製水 600 μ L に 400 g/L MSG 水溶液 100 μ L, 10%塩酸 10 μ L, そして, 3% $\text{NaOCl} \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 水溶液 10 μ L を加えたものを使用した.

4. 研究成果

(1) ESI-MS による HGA 検出に関する検討

pH と色調変化の関連性 (室温放置とアルカリ溶液添加)

pH6.0, pH7.0, pH8.0 の HGA 水溶液をそれぞれ室温で 24 時間放置した結果, pH6.0 および pH7.0 の HGA 水溶液の色調変化はほとんど見られなかったが, pH8.0 の HGA 水溶液は茶褐色に変化した (図 1A). 次に, pH6.0, pH7.0, pH8.0 の HGA 水溶液にそれぞれアルカリ溶液である KOH を添加し, 室温で 1 時間放置した結果, pH6.0 および pH7.0 の HGA 水溶液の色調はほとんど変化しなかったが, pH8.0 の HGA 水溶液は濃い茶褐色に変化した (図 1B).

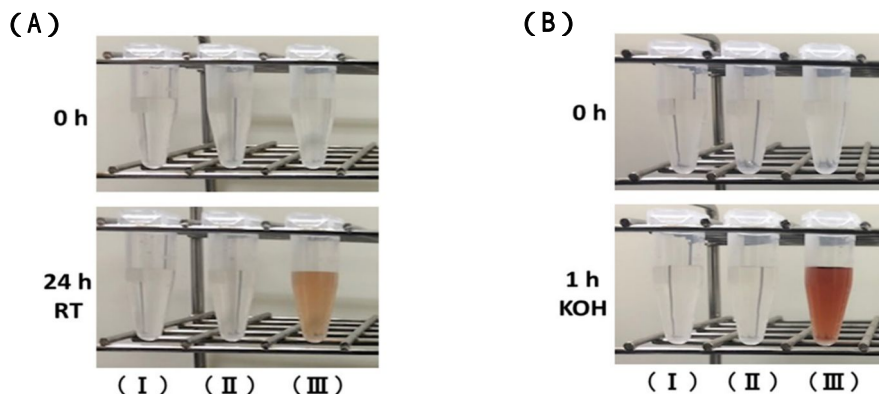


図 1. HGA 水溶液の色調変化

- (A) 室温放置 24 時間後の pH6.0 (), pH7.0 (), pH8.0 () の HGA 水溶液.
(B) KOH 添加 1 時間後の pH6.0 (), pH7.0 (), pH8.0 () の HGA 水溶液.

(文献 1 より引用および改編)

ESI-MS によるマスペクトル解析

室温放置 24 時間後や KOH 添加 1 時間後の HGA 水溶液 (pH6.0, 7.0, 8.0) を用い, ESI-MS による解析をおこなった. 反応前の HGA 水溶液 (pH6.0, 7.0, 8.0) ではそれぞれ, HGA の分子量 168.15 ($\text{C}_8\text{H}_8\text{O}_4$) を示す m/z 167.035 にマスペクトル (負イオンモード) がそれぞれ得られた (図 2A, D, G). また, 室温放置 24 時間後の HGA 水溶液 (pH6.0, 7.0, 8.0) 中では, HGA を示す m/z 167.035 にマスペクトルが得られた (図 2B, E, H). さらに, KOH 添加 1 時間後の HGA 水溶液 (pH6.0, 7.0, 8.0) 中においても, HGA を示す m/z 167.035 にマスペクトルが得られた (図 2C, F, I).

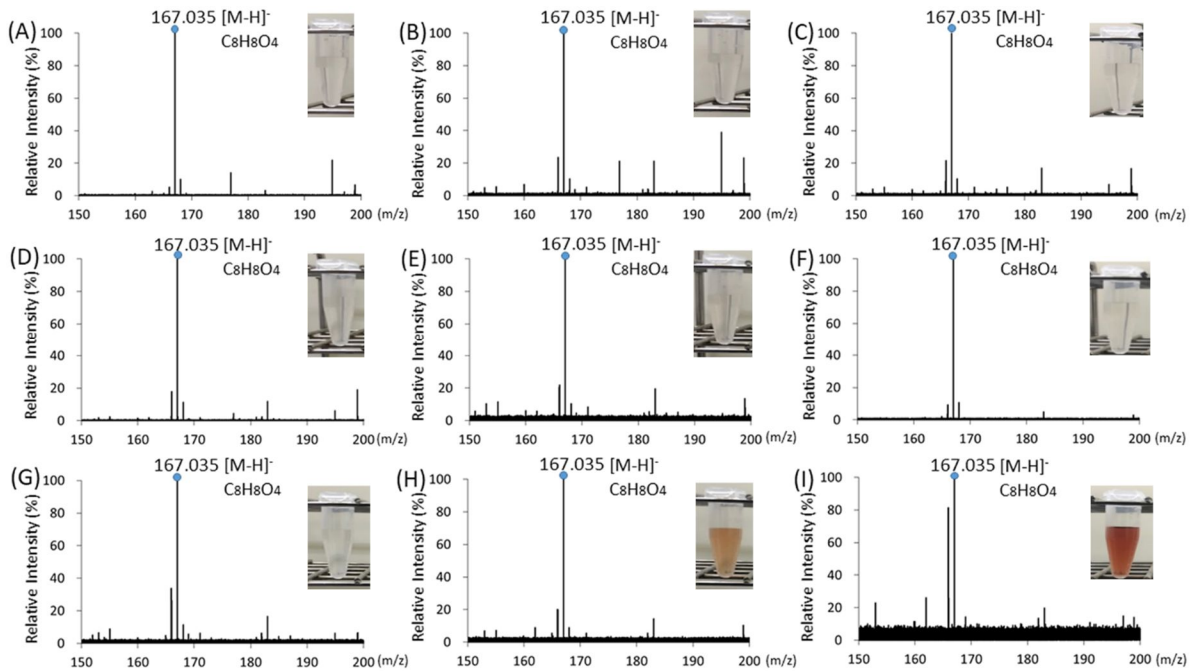


図2. ESI-MSによるHGA水溶液のマスペクトル

pH6.0のHGA水溶液(A).室温放置24時間後のpH6.0HGA水溶液(B).KOH添加1時間後のpH6.0HGA水溶液(C).pH7.0のHGA水溶液(D).室温放置24時間後のpH7.0HGA水溶液(E).KOH添加1時間後のpH7.0HGA水溶液(F).pH8.0のHGA水溶液(G).室温放置24時間後のpH8.0HGA水溶液(H).KOH添加1時間後のpH8.0HGA水溶液(I).

(文献1より引用および改編)

アルカプトン尿症では、室温放置により尿が茶褐色に変化することが広く知られているが、酸性(pH6.0)や中性(pH7.0)の場合は、HGA水溶液の色調は変化しなかった(図1A)。また、アルカプトン尿にアルカリ溶液を添加すると、尿の茶褐色変化が促進されることも広く知られているが、酸性(pH6.0)や中性(pH7.0)条件下では、アルカリ溶液を添加しても、HGA水溶液の色調が変化しないことも確認できた(図1B)。このように、尿の茶褐色変化はアルカプトン尿症の特徴の一つではあるが、pHによる影響を大きく受けるため、尿の色調変化が起こらない場合もあるので注意が必要である。一方、ESI-MSによる解析では、HGA水溶液の色調変化の有無に関わらず、すべての試料においてHGAを検出することができた(図2)。さらに、アルカリ性(pH8.0)のHGA水溶液では、室温放置やKOH添加により茶褐色に変化したが、ESI-MSによる解析結果から、色調変化後も試料中にはHGAが残存していることも明らかとなった(図2H, I)。以上の結果から、尿の色調変化を目視で確認することも大切ではあるが、ESI-MSにより尿に含まれる物質を詳細に解析することは、アルカプトン尿症の早期発見に有用である。

(2) トリプトファンの新規発色法に関する検討

トリプトファンの発色反応と吸光度の観察

20種類のアミノ酸水溶液のうち、トリプトファン水溶液のみが赤褐色に発色した(図4A)。また、様々な濃度のトリプトファン水溶液を発色させ吸光度を測定した結果、520 nm付近にピークをもつ吸収曲線を示し、さらに、濃度依存的にピークの吸光度は変化した(図4B)。

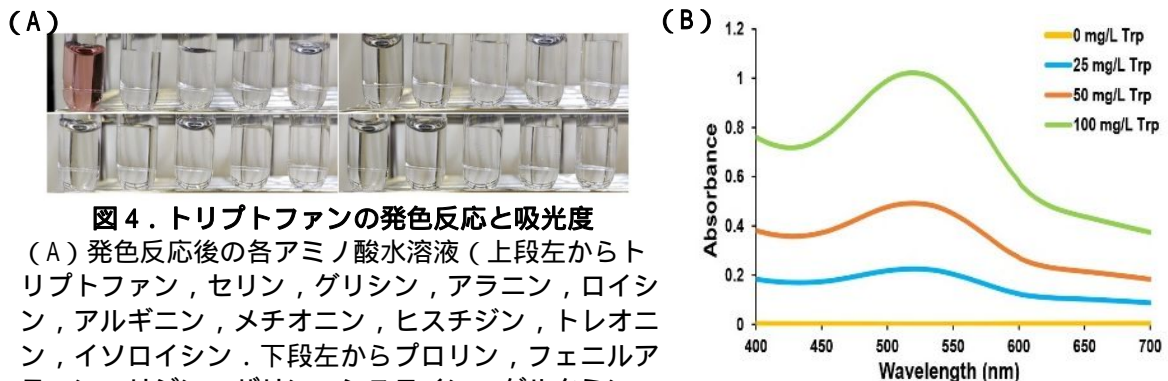


図4. トリプトファンの発色反応と吸光度

(A) 発色反応後の各アミノ酸水溶液(上段左からトリプトファン, セリン, グリシン, アラニン, ロイシン, アルギニン, メチオニン, ヒスチジン, トレオニン, イソロイシン. 下段左からプロリン, フェニルアラニン, リジン, バリン, システイン, グルタミン, グルタミン酸, アスパラギン, アスパラギン酸, チロシン)

(B) 各濃度(0, 25, 50, 100 mg/L)のトリプトファン水溶液(Trp)の吸収曲線

(文献2より引用および改編)

MSG や NaOCl・5H₂O の添加濃度の検討

MSG の濃度がトリプトファン発色反応に与える影響を観察するため、様々な濃度（100～500 g/L）の MSG 水溶液を用いてトリプトファン水溶液を発色させ、吸光度をそれぞれ測定した。その結果、300 g/L まではトリプトファン発色が強くなり、520 nm 付近のピークの吸光度は増加したが、400 g/L 以上の MSG 水溶液では 300 g/L と同程度の吸光度となった（図 5A）。

また、NaOCl・5H₂O の濃度がトリプトファン発色反応に与える影響を観察するため、様々な濃度（1～20%）の NaOCl・5H₂O 水溶液を用いてトリプトファン水溶液を発色させ、吸光度をそれぞれ測定した。その結果、5%まではトリプトファン水溶液の発色が強くなり 520 nm 付近のピークの吸光度は増加したが、10%以上の濃度の NaOCl・5H₂O 水溶液を添加した場合は、520 nm 付近のピークの吸光度は減少した（図 5B）。

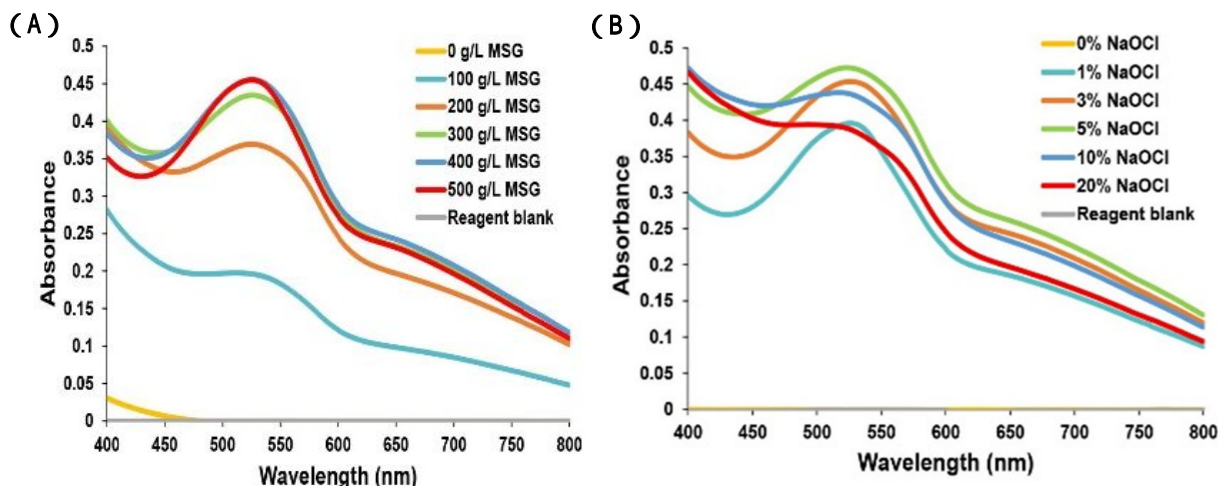


図 5. MSG や NaOCl・5H₂O の添加濃度が発色に与える影響

(A) MSG 水溶液の濃度変化と吸光度の変化

(B) NaOCl・5H₂O 水溶液の濃度変化と吸光度の変化

(文献 2 より引用および改編)

簡易・迅速にトリプトファン濃度を測定する新規臨床検査法の確立を目的とし、今回は、次亜塩素酸ナトリウム五水和物 (NaOCl・5H₂O) を用いたトリプトファンの新規発色法に関する基礎的検討をおこなった。その結果、人体のタンパク質を構成している 20 種類のアミノ酸のうち、トリプトファンのみが赤褐色に発色し、520 nm 付近にピークをもつ吸収曲線を示した（図 4）。また、トリプトファンの発色性は濃度依存的に変化することも明らかとなった（図 4B）さらに、発色に必要な MSG 水溶液や NaOCl・5H₂O 水溶液については、一定の添加濃度以上になると発色性が停滞することが明らかとなった（図 5）。今後、発色反応の至適条件、感度、そして共存物質の影響等、測定系確立のための更なる解析が必要であるが、発色特異性やトリプトファン濃度に比例し吸光度が変化することから、本法は生体試料中のトリプトファンの比色分析に有用である可能性が示唆された。

以上、「(1) ESI-MS による HGA 検出に関する検討」の主な研究成績については、Detection of homogentisic acid by electrospray ionization mass spectrometry と題する原著論文として Journal of Clinical Laboratory Analysis 誌に発表した¹⁾。

以上、「(2) トリプトファンの新規発色法に関する検討」の主な研究成績については、A spectrophotometric method for the determination of tryptophan following oxidation by the addition of sodium hypochlorite pentahydrate と題する原著論文として PLoS ONE 誌に発表した²⁾。

<引用文献>

1) **Tokuhara Y* (*corresponding author)**, Ohara K, Morinishi T, Yamaguchi K, Tada S. Detection of homogentisic acid by electrospray ionization mass spectrometry. J Clin Lab Anal. 2023 Nov;37(21-22):e24976.

2) Hosokawa S, Morinishi T, Ohara K, Yamaguchi K, Tada S, **Tokuhara Y* (*corresponding author)**. A spectrophotometric method for the determination of tryptophan following oxidation by the addition of sodium hypochlorite pentahydrate. PLoS One. 2023 Jan 26;18(1):e0279547.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Tokuhara Yasunori, Ohara Kazuaki, Morinishi Tatsuya, Yamaguchi Kentaro, Tada Satoshi	4. 巻 37
2. 論文標題 Detection of homogentisic acid by electrospray ionization mass spectrometry	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Laboratory Analysis	6. 最初と最後の頁 e24976
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/jcla.24976	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 Hosokawa Sho, Morinishi Tatsuya, Ohara Kazuaki, Yamaguchi Kentaro, Tada Satoshi, Tokuhara Yasunori	4. 巻 18
2. 論文標題 A spectrophotometric method for the determination of tryptophan following oxidation by the addition of sodium hypochlorite pentahydrate	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0279547
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0279547	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 Yasunori Tokuhara, Tatsuya Morinishi, Yasuhiko Ota, Satoshi Tada	4. 巻 13
2. 論文標題 Absorption and Mass Spectrometry Measurements of Aqueous Ammonia after the Addition of Phenol and Sodium Hypochlorite Pentahydrate	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Kagawa Prefectural University of Health Sciences	6. 最初と最後の頁 45-49
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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6件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 徳原康哲, 森西起也, 宿谷賢一, 多田達史
2. 発表標題 尿試験紙における亜硝酸塩の新たな偽陰性要因 次亜塩素酸ナトリウム溶液の混入
3. 学会等名 第71回日本医学検査学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 有田小夏, 久保春華, 徳原康哲
2. 発表標題 亜硝酸塩検査の新たな陰性化要因に関する基礎的検討
3. 学会等名 第16回生物試料分析科学会中国四国支部学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 徳原康哲, 細川翔, 小原一朗, 山口健太郎, 森西起也, 多田達史
2. 発表標題 新規トリプトファン発色法の考案
3. 学会等名 第62回 日本臨床化学会年次学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 徳原康哲, 多田達史
2. 発表標題 次亜塩素酸ナトリウム五水和物を用いたアンモニア発色法の基礎的検討
3. 学会等名 第33回日本臨床化学会四国支部例会・総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 村川晴香, 今治留菜, 徳原康哲
2. 発表標題 次亜塩素酸ナトリウム五水和物を用いた トリプトファンの新規発色法に関する基礎的検討
3. 学会等名 第17回生物試料分析科学会中国四国支部学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 徳原康哲
2. 発表標題 論文投稿の経験から会誌の在り方を考える～若手研究者の視点から～
3. 学会等名 第70回日本臨床検査医学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

2023年度 日本臨床化学会 奨励賞 受賞：新規トリプトファン発色法の考案

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
研究分担者	小原 一朗 (Ohara Kazuaki) (60581775)	徳島文理大学・薬学部・講師 (36102)	

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
---------	---------