

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 3 日現在

機関番号：37111

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2014

課題番号：23615009

研究課題名(和文)酸化型・還元型チオール類同時計測法の開発と生体内レドックスバランス評価への適用

研究課題名(英文) Simultaneous Determination of Oxidized- and Reduced-thiols: Application to the Estimation of Balance of the Red/Ox State

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、ポストカラムエキシマー蛍光誘導体化LC法を用いる γ -リポ酸の特異的分析法を基盤とした、生体内の酸化還元状態(レドックスバランス)を評価するための新規計測技術の確立を目指した。生体内において酸化型・還元型の両形態で存在する γ -リポ酸を、それぞれの形態のままで一斉に計測する分析法を構築し生体計測へ展開することで、生体内レドックスバランスの簡便・高感度・高選択的な分析化学的評価が可能となった。

研究成果の概要(英文)：In this research, a simultaneous determination of reduced and oxidized γ -lipoic acid (LA) has been developed and was applied to the estimation of biological Red/Ox balance. This analysis method involves reversed-phase liquid chromatographic separation of LA-related compounds, on-line reduction of intramolecular disulfide structure to dithiol structure, post-column derivatization with N-(1-pyrenyl)maleimide, and excimer fluorescence detection. Balance of biological Red/Ox state were calculated from the amount of reduced-LA and that of oxidized-LA in samples. Simple, sensitive, and selective estimation of Red/Ox balance could be achieved.

研究分野：分析化学

キーワード：レドックス 分析化学 γ -リポ酸 エキシマー蛍光 蛍光誘導体化法 クロマトグラフィー

1. 研究開始当初の背景

グルタチオンやホモシステインをはじめとする生体チオール化合物は、生体内の多くの酸化・還元(レドックス)反応に関与している。生体チオール化合物の一種である - リポ酸は、細胞内呼吸やエネルギー産生に不可欠なビタミン様化合物であり、様々な酵素の補酵素として機能している。一方、 - リポ酸は美容機能(色素沈着の抑制、繊維芽細胞の増殖)や、動物や試験管レベルにおけるダイエットサポート機能(血糖値の低下、脂肪燃焼の補助)を有することから、化粧品の有効成分や抗肥満サプリメントとしても利用されている。これらの作用は - リポ酸のキレート形成反応(遊離型 ⇄ キレート型)や自己酸化還元反応(酸化型 ⇄ 還元型)(図1)に基づいているので、それらの詳細な機能解明のためにはチオール化合物をそれぞれの形態のままに計測する必要がある。

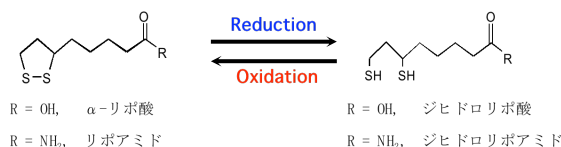


図1. 還元型と酸化型のリポ酸関連化合物

しかし、酸化型・還元型の - リポ酸をその形態のままに一斉に計測できる汎用分析技術としては、LC-MS (LC-MS/MS) 法 [例えば, *Biomed. Chromatogr.*, **18** (2004) 681.] あるいは LC-電気化学検出法 [例えば, *Methods Enzymol.*, **251** (1995) 315.] が報告されているだけである。とは言うものの、前者は装置自体並びにランニングコストが高価で、後者は電極の劣化に伴う再現性の低下が問題視されている。そのため国内外で蛍光誘導体化 LC 法の開発も試みられているが、同時分析法として十分な成果を得られているものは、 - リポ酸のカルボキシル基を蛍光誘導体化する方法 [*J. Chromatogr. A*, **870** (2000) 381.] 並びに 2 つの蛍光誘導体化反応を連続的に実施する方法 [*J. Chromatogr. B*, **854** (2007) 109.] だけに限定される。しかしながら、これらの方法もプレカラムでの複雑な前処理・誘導体化操作が必要であり、簡便な分析法とは言い難いのが実状であった。

そこで、酸化型・還元型のリポ酸関連化合物を同時計測するための簡便かつ高選択的な新規ポストカラム蛍光誘導体化 LC 分析法を開発し、 - リポ酸の分子状態を指標としたレドックス機能評価システムの構築を試みた。

2. 研究の目的

研究期間内に、酸化型・還元型リポ酸関連化合物を対象とした同時計測法を確立し、レドックスバランス評価システムとしての有用性を評価することを研究目的とした。本計測の基盤となるエキシマー蛍光誘導体化法の技術は、複数の反応性官能基を有する化合物群の特異的計測に有効な方法論(図2)で、既にいくつかの特許を保有している極めて独創的かつ有用性の高い分析手法である。この誘導体化法は、特に実試料分析において、高い感度と選択性、簡便な操作性を提供できる実用的な計測法となりうるものである。モデル化合物である - リポ酸を対象とした実験を通じて反応性や操作性について検討し、さらに生体試料計測に導入することでレドックスバランス評価システムとしての有用性を検証する。

用性を評価することを研究目的とした。本計測の基盤となるエキシマー蛍光誘導体化法の技術は、複数の反応性官能基を有する化合物群の特異的計測に有効な方法論(図2)で、既にいくつかの特許を保有している極めて独創的かつ有用性の高い分析手法である。この誘導体化法は、特に実試料分析において、高い感度と選択性、簡便な操作性を提供できる実用的な計測法となりうるものである。モデル化合物である - リポ酸を対象とした実験を通じて反応性や操作性について検討し、さらに生体試料計測に導入することでレドックスバランス評価システムとしての有用性を検証する。

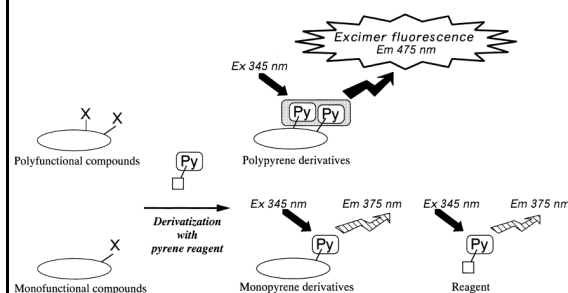


図2. エキシマー蛍光誘導体化法の原理

3. 研究の方法

「酸化型・還元型チオール化合物を対象とした同時計測法の開発」

- (1) ポストカラム誘導体化 LC システムの開発
- (2) 分析法バリデーションに関する検討

「チオール化合物分析を基盤とするレドックスバランス評価法の検証」

- (3) 実試料中チオール化合物の分析に関する研究
- (4) 抗酸化物質のレドックス能評価に関する検討

「レドックスバランス評価のための関連技術の開発」

- (5) 分散液マイクロ抽出を用いるストレスマーカー前処理法の開発
- (6) 生体内低分子化合物の高選択的計測法の開発

4. 研究成果

(1) - リポ酸及びその関連化合物の酸化型・還元型を対象とした同時計測のためのオンライン還元-ポストカラム誘導体化-LC 蛍光検出システム(図3)を構築した。ピレン試薬には *N*-(Pyrenyl)maleimide (NPM) が、還元剤には Tributylphosphine (TBP) が、それぞれ最適だった。分子内エキシマー蛍光誘導体化法の活用により、目的化合物計測のための極めて選択性の高い方法論を開発することができた。

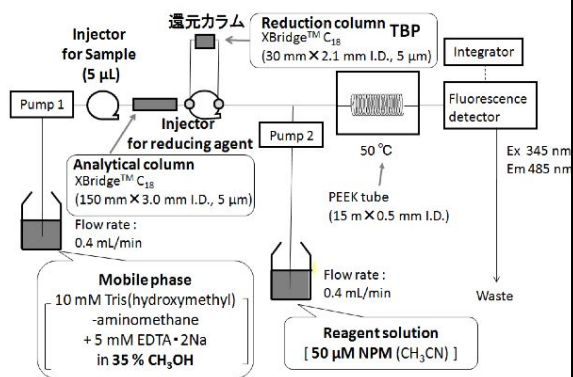


図3．分析システムの流路図

(2) 開発したオンライン還元・誘導体化分析システムについて、還元カラムの耐久性試験を含めた各種条件の最適化を行い、感度や選択性だけでなく、操作性や再現性を検証した。実試料計測に適用可能な頑健性の高いLCシステムを構築することができた。

(3) (2) で最適化した計測法を健常人由来試料の測定に適用した。標準添加の生体試料を測定しただけでなく、 γ -リポ酸含有サプリメントの服用により、血液や尿中のリポ酸濃度の上昇が確認され、酸化型(LA)・還元型(DHLA)リポ酸の血中濃度推移(図4)を追跡することも可能だった。

LA, DHLA 時間-濃度曲線

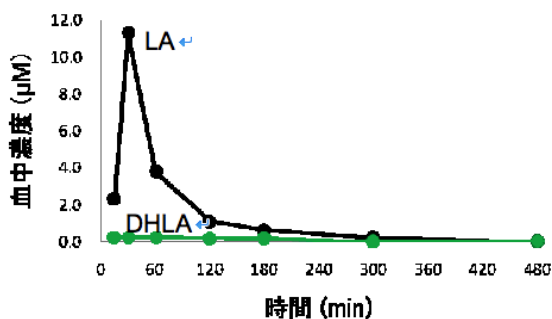


図4．血中リポ酸濃度の推移

(4) レドックスバランス評価のため、抗酸化物質摂取時の生体内リポ酸バランスをLC計測した。(3)と同様、酸化型・還元型リポ酸の血中濃度推移を同時計測ことができ、抗酸化能評価のための一助となることが実証された。

(5) より実践的なレドックスバランス評価のため、試料の前処理として分散液マイクロ抽出法(DLLME)の導入を検討した。ヒト唾液及び血清中のストレス関連物質の抽出・濃縮に適用したところ、極めて簡便かつ再現的に良好な結果を得ることに成功した(図5)。

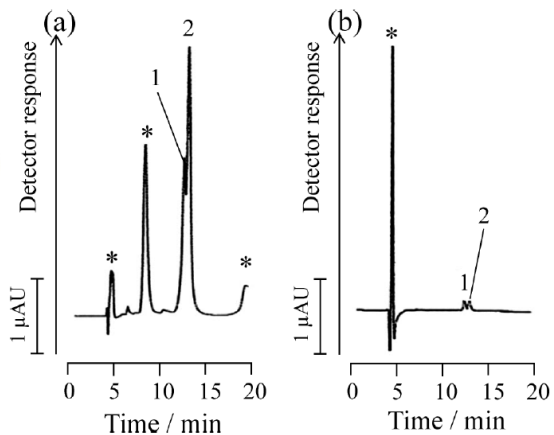


図5．DLLME有無によるクロマトグラムの変化
クロマトグラム：(a) DLLME有り、(b) DLLME無し
ピーク：1、コルチゾール；2、コルチゾン

(6) 生体内レドックスバランスの内因性化合物に対する影響を評価するため、チオール化合物以外の低分子化合物について新たな定量法を開発した。アミノ酸、核酸やシアル酸などの高選択的LC分析法を確立することができ、レドックスバランスとの一斉追跡・評価が可能となった。

5．主な発表論文等

[雑誌論文](計20件)

Selective Extraction of Nucleotides with Fluorous Biphasic System Utilizing Perfluoroalkylamine as an Ion-pair Reagent; T. Hayama, E. Kiyokawa, H. Yoshida, O. Imakyure, M. Yamaguchi, H. Nohta; *Chromatography*, **36** (1), 13-18 (2015). [DOI: 10.15583/jpchrom.2015.001] 査読有

Assessment of the Efficacy of Anticancer Drugs by Amino Acid Metabolomics Using Fluorescence Derivatization-HPLC; R. Tomita, K. Todoroki, K. Machida, S. Nishida, H. Maruoka, H. Yoshida, T. Fujioka, M. Nakashima, M. Yamaguchi, H. Nohta; *Analytical Sciences*, **30** (7), 751-758 (2014). [DOI: 10.2116/analsci.30.751] 査読有

Fluorous Affinity-based Separation Techniques for the Analysis of Biogenic and Related Molecules; T. Hayama, H. Yoshida, M. Yamaguchi, H. Nohta; *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **101** (1), 151-160 (2014). [DOI: 10.1016/j.jpba.2014.04.035] 査読有

Concerted Derivatization and Concentration Method with Dispersive Liquid-liquid Microextraction for Liquid Chromatographic Analysis of 5-Hydroxyindoles in Human Serum; T. Hayama, Y. Yabuuchi, T. Iwamatsu, E. Tamashima, Y. Kawami, M.

Itoyama, H. Yoshida, M. Yamaguchi, H. Nohta; *Talanta*, **117** (1), 27-31 (2013). [DOI: 10.1016/j.talanta.2013.08.035] 査読有
Fully Automated Reagent Peak-free Liquid Chromatography Fluorescence Analysis of Highly Polar Carboxylic Acids Using a Column-switching System and Fluorous Scavenging-derivatization; K. Todoroki, H. Hashimoto, K. Machida, M. Itoyama, T. Hayama, H. Yoshida, H. Nohta, M. Nakashima, M. Yamaguchi; *Journal of Separation Science*, **36** (2), 232-238 (2013). [DOI: 10.1002/jssc.201200692] 査読有
ヒト唾液中コルチゾール及びコルチゾンの分散液液マイクロ抽出/HPLC 分析; 玉嶋江莉奈, 甲斐知美, 轟木堅一郎, 川見祐介, 糸山美紀, 巴山忠, 吉田秀幸, 山口政俊, 能田均; *分析化学*, **62** (8), 719-723 (2013). [DOI: 10.2116/bunsekikagaku.62.719] 査読有
エキシマー蛍光誘導体化法の分析化学的利用; 吉田秀幸; *ぶんせき*, **457** (1), 6-12 (2013). 査読有
Liquid Chromatographic Determination of Microcystins in Water Samples Following Pre-column Excimer Fluorescence Derivatization with 4-(1-Pyrene)butanoic Acid Hydrazide; T. Hayama, K. Katoh, T. Aoki, M. Itoyama, K. Todoroki, H. Yoshida, M. Yamaguchi, H. Nohta; *Analytica Chimica Acta*, **755** (1), 93-99 (2012). [DOI: 10.1016/j.aca.2012.10.009] 査読有
エキシマー蛍光誘導体化によるアルコール類の LC 分析; 井上貴文, 吉田秀幸, 佐々木知美, 坂口洋平, 川見祐介, 糸山美紀, 巴山忠, 能田均, 山口政俊; *Chromatography*, **33** (sup2), 85-86 (2012). 査読無
Determination of Histamine in Microdialysis Samples from Guinea Pig Skin by High-performance Liquid Chromatography with Fluorescence Detection; T. Yoshitake, S. Ijiri, S. Yoshitake, K. Todoroki, H. Yoshida, J. Kehr, H. Nohta, M. Yamaguchi; *Skin Pharmacology and Physiology*, **25** (2), 65-72 (2012). [DOI: 10.1159/000330899] 査読有
Highly Sensitive Capillary Electrophoresis Analysis of N-Linked Oligosaccharides in Glycoproteins Following Fluorescence Derivatization with Rhodamine 110 and Laser-induced Fluorescence Detection; S. Ijiri, K. Todoroki, H. Yoshida, T. Yoshitake, H. Nohta, M. Yamaguchi; *Electrophoresis*, **32** (24), 3499-3509 (2011). [DOI: 10.1002/elps.201100258] 査読有
Highly Sensitive and Selective Derivatization-LC Method for Biomolecules Based on Fluorescence Interactions and Fluorous Separations; K. Todoroki, H. Yoshida, T. Hayama, M. Itoyama, H. Nohta,

M. Yamaguchi; *Journal of Chromatography B*, **879** (17-18), 1325-1337 (2011). [DOI: 10.1016/j.jchromb.2010.11.038] 査読有

〔学会発表〕(計 25 件)

LC-MS/MS によるアミノ酸メタボロミクス -低酸素・栄養飢餓状態で培養した大腸がん細胞株 DLD1 について-; 富田陵子, 西田翔, 巴山忠, 轟木堅一郎, 吉田秀幸, 丸岡博, 中島学, 能田均, 山口政俊, 藤岡稔大; 日本薬学会第 135 年会(神戸サンボーホール, 兵庫県神戸市; 2015 年 3 月 27 日)

モノリス型フルオラス固相カラムを用いたパーフルオロアルキル化アミノ酸の選択的抽出と LC-MS/MS 分析; 玉嶋江莉奈, 巴山忠, 川見祐介, 糸山美紀, 吉田秀幸, 能田均, 山口政俊; 第 21 回クロマトグラフィーシンポジウム(名古屋市工業研究所, 愛知県名古屋市; 2014 年 6 月 5 日)

短鎖パーフルオロアルキル試薬を用いたポリアミン類の多重ラベル化と LC-MS/MS 分析; 玉嶋江莉奈, 兼田直樹, 巴山忠, 川見祐介, 糸山美紀, 吉田秀幸, 能田均, 山口政俊; 日本薬学会第 134 年会(熊本大学, 熊本県熊本市; 2014 年 3 月 28 日)

多重フルオラス誘導体化法によるポリアミン類の選択的 LC-MS/MS 分析; 玉嶋江莉奈, 福田恵未, 巴山忠, 川見祐介, 糸山美紀, 吉田秀幸, 能田均, 山口政俊; 第 11 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(清水テルサ, 静岡県静岡市; 2013 年 8 月 29 日)

Fluorous Derivatization Method for Matrix Effect-free LC-MS/MS Analysis: Application to Biogenic Amine Analysis; T. Hayama, Y. Sakaguchi, E. Tamashima, K. Todoroki, H. Yoshida, H. Nohta, M. Yamaguchi; *The 39th International Symposium on High Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques* (Amsterdam, The Netherlands; 2013 年 6 月 18 日)

バイナリーフルオラス化による生理活性アミン類のマトリックス効果フリー LC-MS/MS 分析; 巴山忠, 坂口洋平, 玉嶋江莉奈, 川見祐介, 糸山美紀, 吉田秀幸, 能田均, 山口政俊; 第 20 回クロマトグラフィーシンポジウム(神戸大学, 兵庫県神戸市; 2013 年 6 月 6 日)

バイナリーフルオラス誘導体化法によるアミノ酸のタンデムマス分析(2): 生体試料分析に対する有用性の検証; 玉嶋江莉奈, 巴山忠, 坂口洋平, 川見祐介, 糸山美紀, 吉田秀幸, 能田均, 山口政俊; 第 73 回分析化学討論会(北海道大学, 北海道函館市; 2013 年 5 月 18 日)

Schotten-Baumann 反応を利用した含水

試料中アルコール類の蛍光誘導体化 HPLC 分析； 清川恵奈，福本麻美，糸山美紀，川見祐介，巴山忠，吉田秀幸，能田均，山口政俊；第29回日本薬学会九州支部大会（熊本大学，熊本県熊本市；2012年12月8日）

バイナリーフルオラス誘導体化によるアミノ酸のタンデムマス分析； 玉嶋江莉奈，巴山忠，坂口洋平，川見祐介，糸山美紀，吉田秀幸，能田均，山口政俊；第23回クロマトグラフィー科学会議（長良川国際会議場，岐阜県岐阜市；2012年11月15日）

エキシマー蛍光誘導体化によるアルコール類の LC 分析；井上貴文，吉田秀幸，佐々木知美，坂口洋平，川見祐介，糸山美紀，巴山忠，能田均，山口政俊；第23回クロマトグラフィー科学会議（長良川国際会議場，岐阜県岐阜市；2012年11月15日）

5-ヒドロキシインドール類の高感度 HPLC-蛍光分析：分散液液マイクロ抽出による誘導体化と試料濃縮； 巴山忠，岩松知美，坂口洋平，川見祐介，糸山美紀，吉田秀幸，能田均，山口政俊；第10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（ホテル平安の森京都，京都府京都市；2012年8月6日）

エキシマー蛍光誘導体化によるジオール類の HPLC 分析； 井上貴文，坂口洋平，佐々木知美，吉田秀幸，糸山美紀，巴山忠，能田均，山口政俊；第28回日本薬学会九州支部大会（福岡大学，福岡県福岡市；2011年12月10日）

フルオラス及び蛍光誘導体化を利用したポリアミン類の選択的 LC 分析；後藤しおり， 巴山忠，糸山美紀，吉田秀幸，能田均，山口政俊；第4回フルオラス科学研究会シンポジウム（大阪府立大学，大阪府堺市；2011年10月7日）

エキシマー蛍光誘導体化による河川水中のビスフェノールAの液体クロマトグラフ分析； 山下晶平，今津佳子，吉田秀幸；第20回環境化学討論会（熊本県立大学，熊本県熊本市；2011年7月17日）
糖タンパク質中N型糖鎖の高感度キャピラリー電気泳動分析； 井尻聡一郎，轟木堅一郎，吉田秀幸，吉武尚，能田均，山口政俊；第18回クロマトグラフィーシンポジウム（福岡大学，福岡県福岡市；2011年6月3日）

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

〔その他〕

特になし

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

轟木 堅一郎 (TODOROKI, Kenichiro)

静岡県立大学 ・ 薬学部 ・ 准教授

(元 福岡大学 ・ 薬学部 ・ 助教)

研究者番号： 70341451

(4) 研究協力者

巴山 忠 (HAYAMA, Tadashi)

福岡大学 ・ 薬学部 ・ 助教

研究者番号： 90549693

玉嶋 江莉奈 (TAMASHIMA, Erina)

福岡大学 ・ 大学院薬学研究科 ・

博士課程（平成24年4月～）

清川 恵奈 (KIYOKAWA, Ena)

福岡大学 ・ 大学院薬学研究科 ・

博士課程（平成26年4月～）