

## 高選択的三次元HPLC分析法の開発と慢性腎臓病における血中キラルアミノ酸の網羅的含量解析

古庄, 仰

<https://hdl.handle.net/2324/4784549>

---

出版情報 : Kyushu University, 2021, 博士 (創薬科学), 課程博士

バージョン :

権利関係 : Public access to the fulltext file is restricted for unavoidable reason (3)

|        |  |        |           |
|--------|--|--------|-----------|
| 氏 名    | 古 庄 仰  |        |           |
| 論 文 名  | 高選択的三次元 HPLC 分析法の開発と慢性腎臓病における血中キラルアミノ酸の網羅的含量解析 |        |           |
| 論文調査委員 | 主 査  | 九州大学   | 教授 濱瀬 健司  |
|        | 副 査  | 九州大学   | 教授 王子田 彰夫 |
|        | 副 査  | 九州大学   | 教授 植田 正   |
|        | 副 査  | 静岡県立大学 | 教授 轟木 堅一郎 |

### 論文審査の結果の要旨

タンパク質を構成するアミノ酸 20 種には、グリシンを除いて鏡像異性体の関係にある D 体と L 体が存在する。分析技術の進歩に伴ってヒトを含む哺乳類の体内で様々な D-アミノ酸が発見され、一部については L 体とは異なる分布や生理機能を有することが明らかになってきた。また、種々の疾患において生体内の D-アミノ酸含量が変動することも報告されている。例えば、慢性腎臓病 (CKD) では D-アミノ酸数種の血中濃度が疾患の進行とともに上昇することが報告されている。現在、CKD の診断には推算糸球体濾過量 (eGFR) が指標の一つとして用いられている。しかし、eGFR は体格、筋肉量等による誤差を生じやすく、また疾患初期での変動が僅かで正確な腎機能評価が困難であるという課題を有している。近年の研究で、CKD 患者血中の D-アスパラギン (Asn)、D-セリン (Ser)、D-アラニン (Ala)、D-プロリン (Pro) 濃度が既存の腎機能マーカーと相関を示すことが報告されている。そのため D-アミノ酸は新規の腎機能マーカー・CKD 診断マーカー候補として注目されている。生体内 D-アミノ酸の分析には高速液体クロマトグラフィー (HPLC) が汎用されており、中でも逆相分離と光学分割を組み合わせた二次元 (2D) HPLC 法は D-アミノ酸を選択的に測定可能である。しかし、ヒト臨床試料中では殆どの場合 D 体は L 体の 1%以下程度でしか存在せず、多種多様な夾雑成分による分析妨害を受けやすいため、選択性の不足に起因して 2D-HPLC 法を用いても精密定量が困難なアミノ酸や試料が存在した。そこで申請者は、分析法の更なる選択性向上を目指して 2D-HPLC 法に新たな分離次元を追加した三次元 (3D) HPLC 法を設計・開発し、CKD における血中キラルアミノ酸 12 種の網羅的含量解析を試みた。

ヒト血漿試料はメタノールを用いて除タンパクし、4-Fluoro-7-nitro-2,1,3-benzoxadiazole (NBD-F) でアミノ酸を誘導体化して HPLC に導入した。3D-HPLC の一次元目では微粒子充填型 ODS カラムである Singularity RP18 (1.5 or 1.0 x 500 mm)、二次元目では陰イオン交換カラムである Singularity AX (1.5 or 1.0 x 150 mm) またはミックスモードカラムである Singularity MX-001 (1.0 x 250 mm)、三次元目では Pirkle 型光学分割カラムである Singularity CSP-001S (1.5 x 250 or 500 mm) を用いた。

申請者は 3D-HPLC 分析法開発の第一段階として、腎不全関連キラルアミノ酸 4 種 (Asn、Ser、Ala、Pro) を分析対象とする分析法を開発した。新規に追加する二次元目には、逆相分離・光学分割とは異なる分離モードとして陰イオン交換分離を選択した。一次元目逆相カラムで対象アミノ酸を他のアミノ酸および共存成分から分離し、D 体と L 体の混合物として分取した画分を二次元目陰イオン交換カラムに導入して夾雑成分との更なる分離を試みた。再度分取した画分を光学分割カラムに導入し、鏡像異性体の分離・定量を行った。各次元における分析条件を精査し、構築した 3D-HPLC 法および逆相分離と光学分割のみを組み合わせた 2D-HPLC 法を用いてヒト血漿試料を分析した。2D-HPLC 法を用いた分析では、一次元目で対象アミノ酸と分離しない夾雑成分が二次元目

においても対象アミノ酸の近傍に溶出し、微量な D 体を正確に定量することが困難であった。一方、3D-HPLC 法ではそれらの夾雑成分が陰イオン交換分離によって取り除かれ、最終次元での夾雑ピークが顕著に減少した。本法を用いて CKD 患者 25 検体の血漿試料を分析した結果、全試料において夾雑成分による分析妨害は認められず、微量 D-アミノ酸を正確に定量可能であった。いずれのアミノ酸も eGFR 値の低下に伴って %D 値 ( $D/(D+L) \times 100$ ) は上昇する傾向を示した。

3D-HPLC 法の高い選択性および臨床試料の分析における有用性が示されたため、申請者は分析対象を拡大し、キラルアミノ酸 12 種を一斉分析可能なシステムを開発した。腎不全関連アミノ酸 4 種に加えて、アスパラギン酸 (Asp)、グルタミン (Gln)、グルタミン酸 (Glu)、ロイシン (Leu)、リジン (Lys)、メチオニン (Met)、フェニルアラニン (Phe) を分析対象として選択し、各次元における分析条件を精査した。一次元目では固定相に Singularity RP18 を使用し、0.05% TFA を含む 15-30% MeCN 水溶液をグラジエント溶離で用いることで、260 分で対象アミノ酸 12 種の相互分離を達成した。二次元目では酸性アミノ酸である Asp および Glu はミックスモードカラムである Singularity MX-001、その他のアミノ酸は Singularity AX カラムを用いて測定した。移動相条件を検討した結果、0.04-0.20%ギ酸を含む MeOH/MeCN 混液 (50/50, v/v) により全ての分析対象アミノ酸が 15-20 分程度で溶出した。三次元目の固定相には Singularity CSP-001S を選択し、0.2-0.9%ギ酸を含む MeOH/MeCN 混液 (50/50 または 10/90, v/v) により全対象アミノ酸の光学分割を 50 分以内に達成した ( $R_s \geq 1.37$ )。構築した 3D-HPLC 法の定量性および再現性を検討した結果、標品を用いた検量線および精度、またヒト血漿試料を用いた精度および回収率についていずれも良好な値が得られた。そこで申請者は健常人 15 検体および CKD 患者 110 検体における血中キラルアミノ酸の網羅的含有解析を行った。測定した全試料について夾雑成分による分析妨害は認められず、キラルアミノ酸 12 種の精密定量を達成した。これまでの報告で CKD との関連が指摘されている Asn、Ser、Ala および Pro は健常人群と CKD 患者群との間に %D 値の有意な増加が認められ ( $P < 0.01$ )、いずれのアミノ酸も eGFR 値の低下に伴って血中 D 体濃度が上昇する傾向を示した。特に Asn と Ser については良好な相関関係が認められ、新規腎機能マーカーとしての有用性が改めて示された。また健常人群では全ての検体で定量限界以下であった一方、CKD 患者群では多くの検体で認められる D-アミノ酸数種を新たに発見した。これらのアミノ酸は新規の CKD 診断マーカー・腎機能マーカーとしての利用が今後期待できる。

申請者の開発した 3D-HPLC 法は従来法と比較して飛躍的に高い選択性を有しており、複雑な臨床試料中の微量 D-アミノ酸を L 体および他の共存成分から分離して正確に分析可能である。今後は分析対象を拡大し、種々の疾患におけるキラルアミノ酸の含量変動を網羅的に解析することで、新規バイオマーカーの探索・有用性評価への応用が期待される。

以上のように、本論文は新規機能性分子やバイオマーカーとして着目されるキラルアミノ酸について、世界に先駆けて三次元の LC 分離軸を有する分析法を開発したもので、超微量な D-アミノ酸について精密定量を可能としている。腎機能低下時における血中含量変化を解析し、世界で初めてとなる鋭敏な腎機能バイオマーカーの発見も報告している。本研究の学問的価値は極めて高く、申請者は博士 (創薬科学) の学位に値すると認める。