

生体物質由来シアン化物の蛍光検出法の開発と応用

2024 年

望月 龍

目 次

略語一覧	2
序論	4
第1章 König 反応の応用範囲の検討	8
第2章 ドパミン分析への応用	12
第3章 グルタチオン分析への応用	25
第4章 抗体医薬品分析への応用	32
総括	42
参考文献	44
論文目録	47
審査委員	48

略語一覽

Ala	alanine
Asn	asparagine
CDR	complementarity determining region
Cys	cysteine
DA	dopamine
DTT	dithiothreitol
EP	epinephrine
Glu	glutamic acid
Gly	glycine
GSH	glutathione (reduced form)
GSSG	glutathione (oxidized form)
HPLC	high-performance liquid chromatography
IAA	iodoacetic acid
IgG	immunoglobulin G
LC-ECD	liquid chromatography coupled with electrochemical detection
LC-FLD	liquid chromatography coupled with fluorescence detection
LC-MS	liquid chromatography-mass spectrometry
LC-MS/MS	liquid chromatography-tandem mass spectrometry
LOD	limit of detection
LOQ	limit of quantification
Lys	lysine
NE	norepinephrine
PC12	rat pheochromocytoma cells
PQ	paraquat
RSD	relative standard deviation
SD	standard deviation
Ser	serine
5-SSA	5-sulfosalicylic acid
Thr	threonine
TNF- α	tumor-necrosis factor- α
Tyr	tyrosine
Val	valine

序 論

CN⁻の検出には König 反応が汎用されている。König 反応は、ハロゲン化剤により CN⁻をハロゲン化シアンに変換し、生成したハロゲン化シアンとピリジンとを反応させてグルタコンアルデヒドを生成する反応と、このジアルデヒドであるグルタコンアルデヒドが活性メチレン基あるいはアミノ基と縮合して色素を生成する反応をいう (Fig. 1)。前者のハロゲン化反応には、臭素水¹、次亜塩素酸ナトリウム²、クロラミン T 等が用いられるが、酸化力や試薬自身の安定性からクロラミン T を用いることが多い。縮合試薬には、バルビツール酸、3-メチル-1-フェニル-5-ピラゾロン、2,4-ジヒドロキシキノリン、2,5-ピペラジンジオン等が使用できる³。シアン定量のためには特に 3-メチル-1-フェニル-5-ピラゾロンを用いることが多くピリジン・ピラゾロン法と呼ばれ、本邦における水道水又はミネラルウォーター類中シアン量を定量する公定法にも採用されている^{4,5}。なお、König 反応は CN⁻以外にも類縁体である塩化シアン (CNCl)、チオシアン酸イオン (SCN⁻) 及びセレノシアン酸イオン (SeCN⁻) にも適用でき、これらの定量にも用いられている。

縮合試薬にバルビツール酸を用いた場合、生成する色素は 583 nm 付近に吸収極大をもつ³。旧薬品分析化学研究室ではこの色素に着目し、607 nm 付近に蛍光極大をもつことを見出した (Fig. 2)⁶。さらに、この蛍光色素の生成反応と HPLC を組み合わせることで、CN⁻、SCN⁻及び SeCN⁻の分離・高感度定量法の開発に成功してきた^{7,8}。

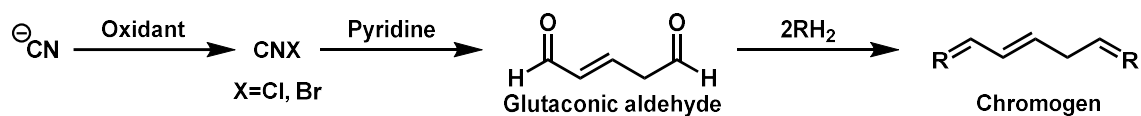


Fig. 1. Reaction flow of the König reaction.

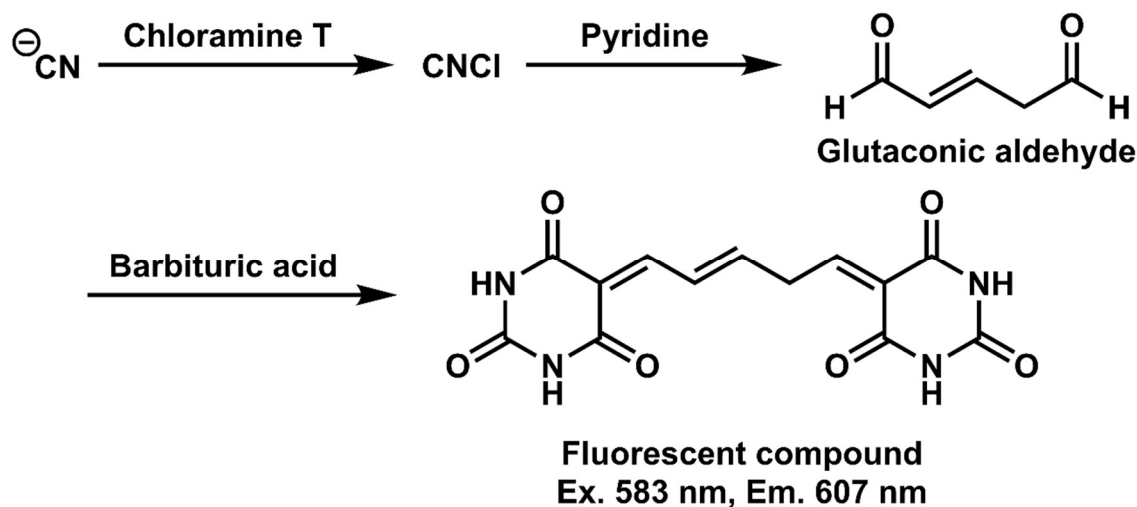


Fig. 2. Reaction flow of the König reaction using chloramine T and barbituric acid.

旧病態分析化学研究室ではこれまでに、この König 反応を用いたポストカラム HPLC 法を用い、培養細胞やヒト血液といった生体試料中 CN^- 、 SCN^- 及び SeCN^- の分析を行ってきた。その際、これらイオン由来ではない夾雑ピークが観測された (Fig. 3)⁸。アミノ酸の1つである Gly は、次亜塩素酸やクロラミン T 等のクロル化剤により CN^- が生成することが知られている (Fig. 4)⁹。本来 König 反応の1段階目にあたるクロル化反応で Gly がクロラミン T により CN^- に分解され、分解されて生じた CN^- が König 反応により検出されたと考えられた。実際、Gly を上述の分析系に供するとピークが検出され、夾雑ピークの溶出位置と一致した (Fig. 5)。

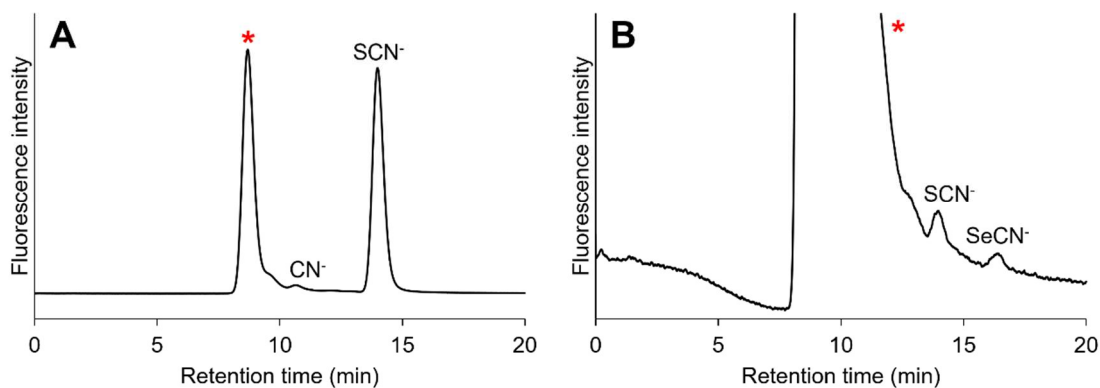


Fig. 3. Unknown peaks observed in biological samples analyzed by the König reaction. (A) Human whole blood from a healthy volunteer and (B) HEK293 cells exposed to selenite. Red asterisks indicate unknown peaks.

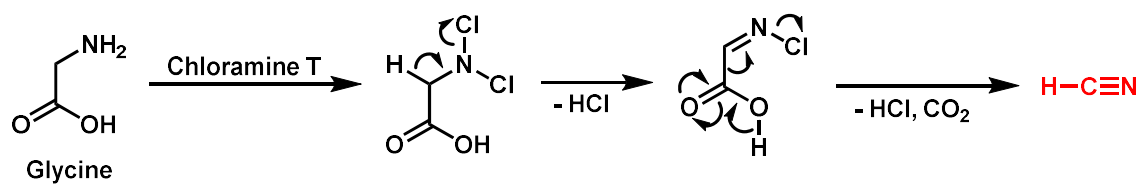


Fig. 4. Speculated reaction mechanism the reaction producing cyanide from glycine by a chlorinating reagent.

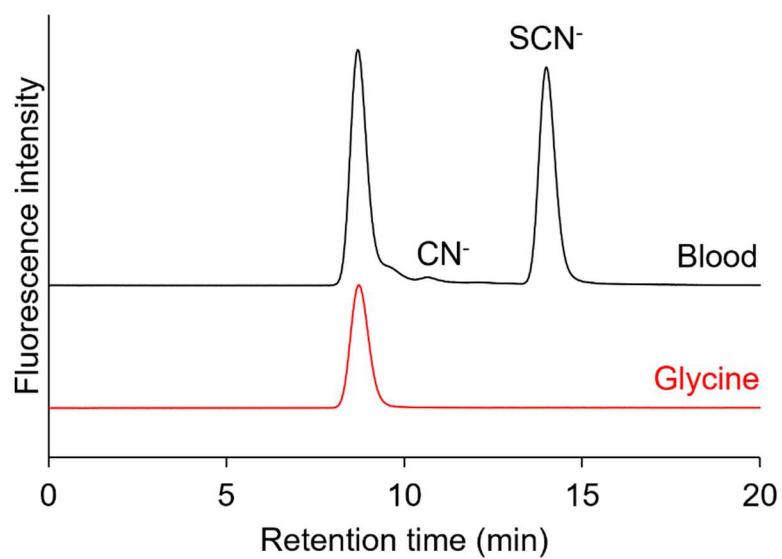


Fig. 5. Comparison of chromatograms between human whole blood from a healthy volunteer and glycine standard solution.

高感度な分析法としては、質量分析法、電気化学検出法及び蛍光検出法が一般に挙げられ、よく HPLC と組み合わせて用いられる。しかし、質量分析法は装置自体や維持のための費用が高価であることや、感度を維持するために頻回のメンテナンスが必要など、簡便な分析法とは言えない。電気化学検出法は、酸化還元反応を起こす様々な化合物を検出してしまうことから、様々な化合物を含む生体試料への分析に適用した際、目的化合物と夾雑化合物の分離が困難になりうる。一方、蛍光法は感度の面で言えば質量分析法に匹敵する。また、適当な蛍光誘導体化反応を行うことにより目的化合物への選択性が向上する。さらに、分析対象化合物の蛍光誘導体化反応をポストカラム (Fig. 6) で行うことにより、試料調製が簡便になり、かつ試料マトリックスの影響を受けにくく再現性の良い分析を行える。ポストカラム蛍光 HPLC 法では、感度の維持のために質量分析法のような頻回のメンテナンスを必要としない。

本研究ではクロラミン T による生体由来物質の CN⁻への分解とそれに引き続く König 反応に着目し、生体由来物質の高感度分析法の開発を試みた (Fig. 7)。

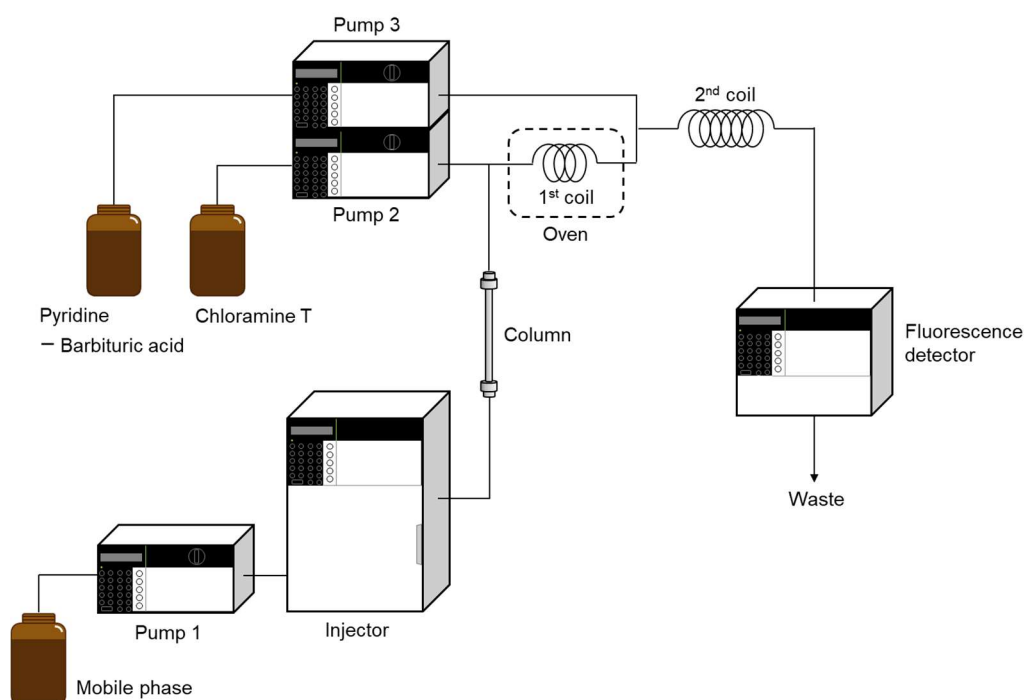


Fig. 6. Schematic diagram of HPLC with post-column derivatization.

Biological compounds

Amino acids
Peptides
Catechol amines
Antibodies
⋮

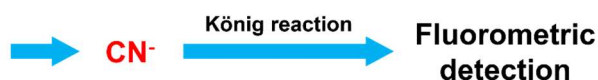


Fig. 7. The concept of this research.

第1章 König 反応の応用範囲の検討

König 反応の応用範囲を拡張するため、本章では Gly 以外のアミノ酸検出に対する König 反応の適用可否について調べた。

1-1. 方法

試薬

試薬は全て市販の特級品又は HPLC グレードのものを用途に応じ使用した。水は Merck の Milli-Q システムにより得られた精製水を用いた。

ピリジン・バルビツール酸溶液の組成

本実験で用いたピリジン・バルビツール酸溶液は、1.5% (w/v) バルビツール酸、15% (v/v) ピリジン、3% (v/v) 濃塩酸の混合水溶液とした。

HPLC 条件

HPLC システムには島津製作所の LC-20 シリーズを用いた (Fig. 6)。カラムは Scherzo SM-C18 又は SW-C18 (いずれも 3 μ m, 150 x 4.6 mm i.d., インタクト社)を用い、移動相は 75 mM 酢酸緩衝液 (pH 5.0) (Scherzo SM-C18 使用時) 又は 100 mM 酢酸緩衝液 (pH 5.0)/メタノール (88/12,v/v) (Scherzo SW-C18 使用時)、その流速は 0.5 mL/min とした。クロロ化反応は 1 台目のポストポンプにより送液された 0.03% (w/v) クロラミン T 水溶液により 80°C に維持したオープン内の反応コイル (3,000 x 0.5 mm i.d.) で行い、蛍光物質への誘導体化は 2 台目のポストポンプにより送液されたピリジン・バルビツール酸溶液により室温下の反応コイル (15,000 x 0.5 mm i.d.) で行った。これらポストポンプ試薬の流速はそれぞれ 0.1 mL/min とした。検出器の励起波長は 583 nm、蛍光波長は 607 nm に設定した。

1-2. 結果及び考察

タンパク質を構成する 20 種のアミノ酸のうち、Gly 以外では Ser, Thr, Tyr, His, Trp が König 反応により検出できることが分かった (Fig. 8)。Ser, Thr, Tyr, His, Trp について CN⁻ への推定分解機構を Fig. 9 に示す。これを踏まえると CN⁻ に分解するためには、アミノ基のジクロロ化及び側鎖のプロトンが脱離して電子が *N,N*-ジクロロアミン部流れ込み、側鎖が脱離すると同時にアミノ基に結合している塩素が脱離できるような構造をもつ必要があることが考えられた。すなわち、Gly, Ser, Thr, Tyr, His, Trp についてはそのような電子の流れを書くことができるが、それ以外のアミノ酸では書くことができない。そのような違いが König 反応による検出可否を決定づけるものと考えられた。また、His 及び Trp については他のアミノ酸に比べ著しく検出感度が悪かった。CN⁻ への分解に必要な側鎖の脱離すべき

プロトンが窒素原子に結合しており、クロラミン T によって塩素原子に置換されうる。塩素原子ではプロトンのように脱離できないことから分解のトリガーにならず (Fig. 10), この反応の競合が König 反応における His や Trp の検出感度低下の原因となっていると考えられた。

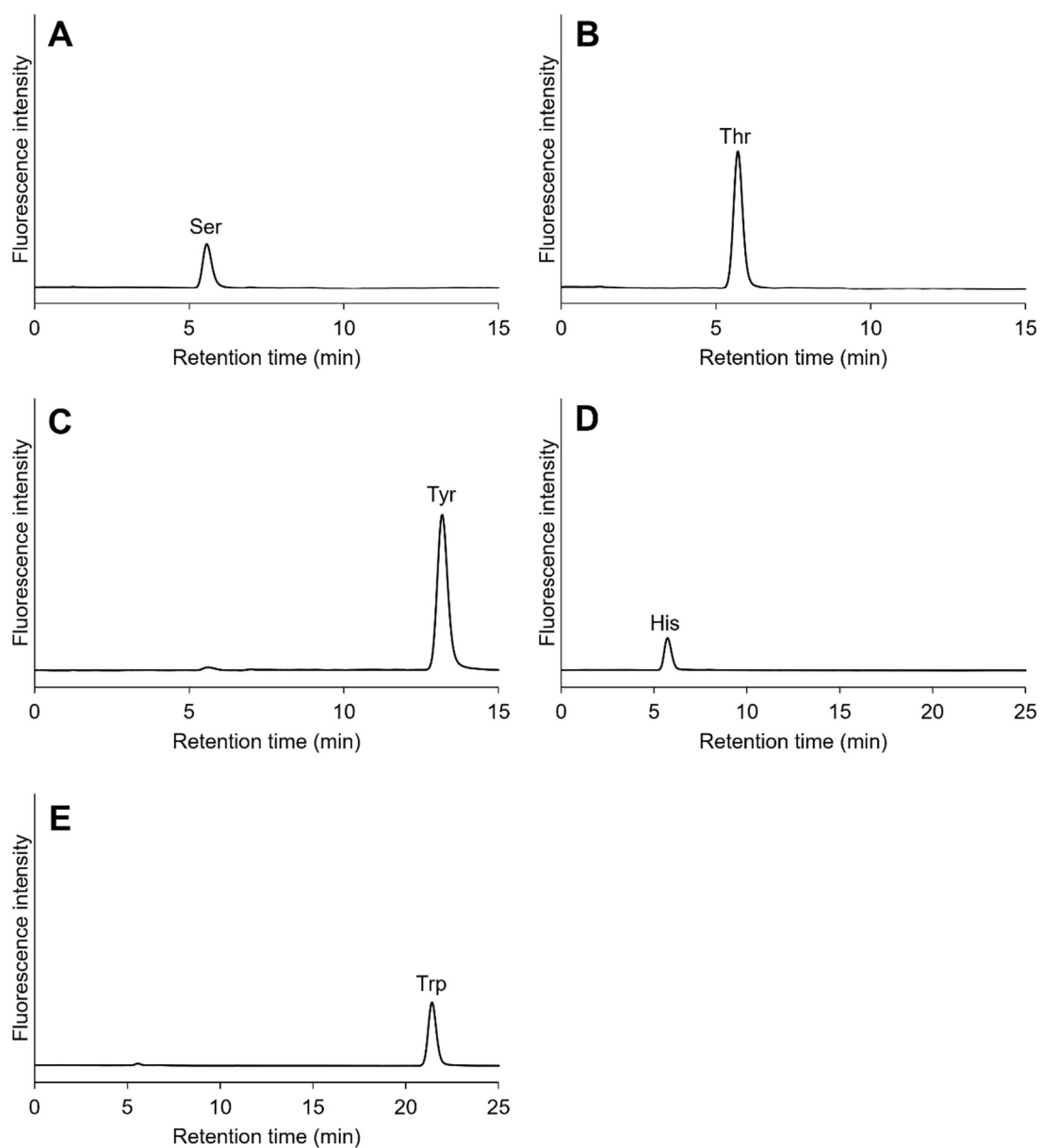


Fig. 8. Fluorescence detection of various amino acids by the König reaction. (A) 5 μ M Ser, (B) 5 μ M Thr, (C) 5 μ M Tyr, (D) 50 μ M His, and (E) 50 μ M Trp. (A–C) Column: Scherzo SM-C18. (D, E) Column: Scherzo SW-C18.

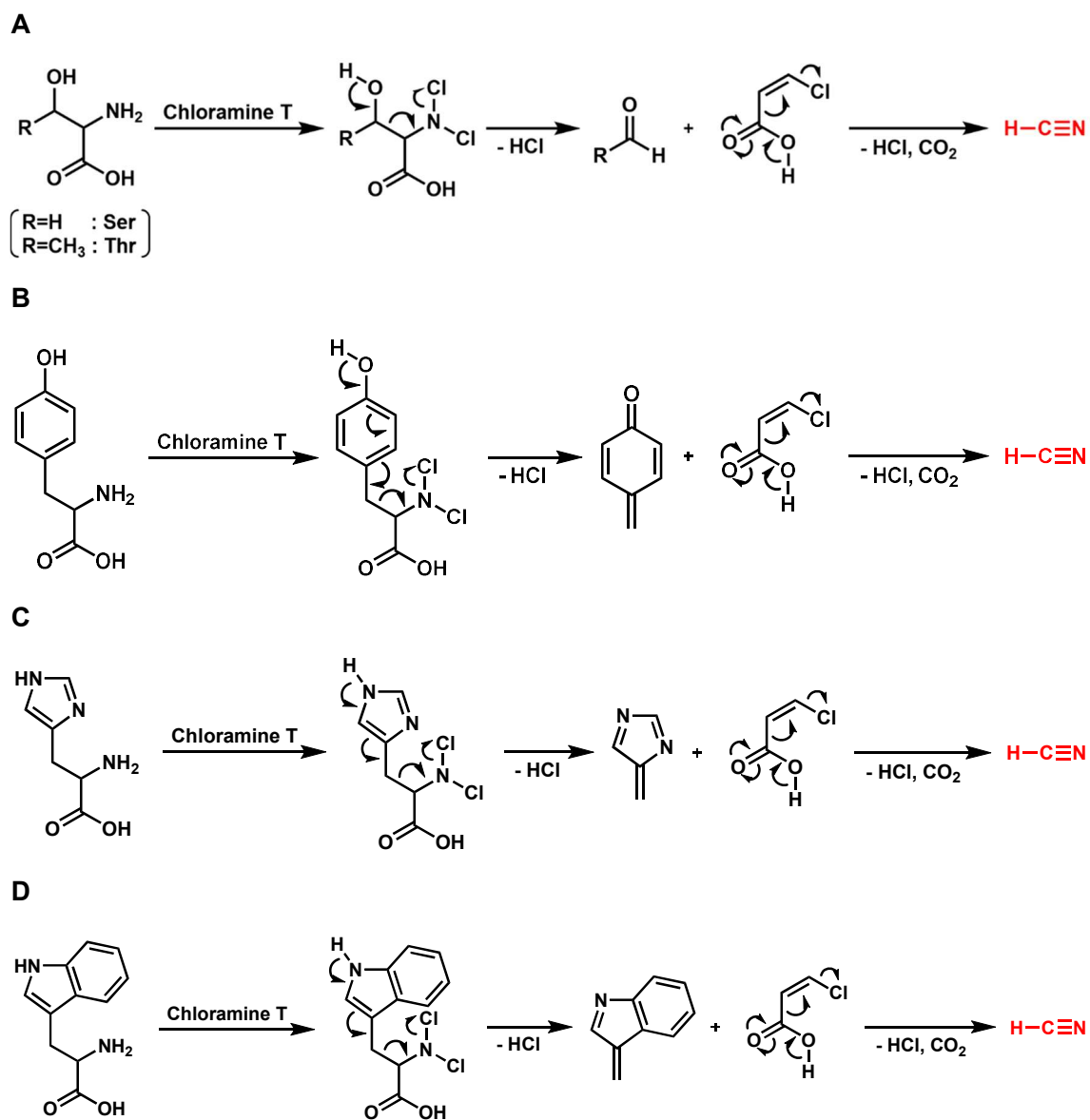


Fig. 9. Speculated reaction mechanism the reaction producing cyanide from various amino acids by a chlorinating reagent. (A) Ser and Thr, (B) Tyr, (C) His, and (D) Trp.

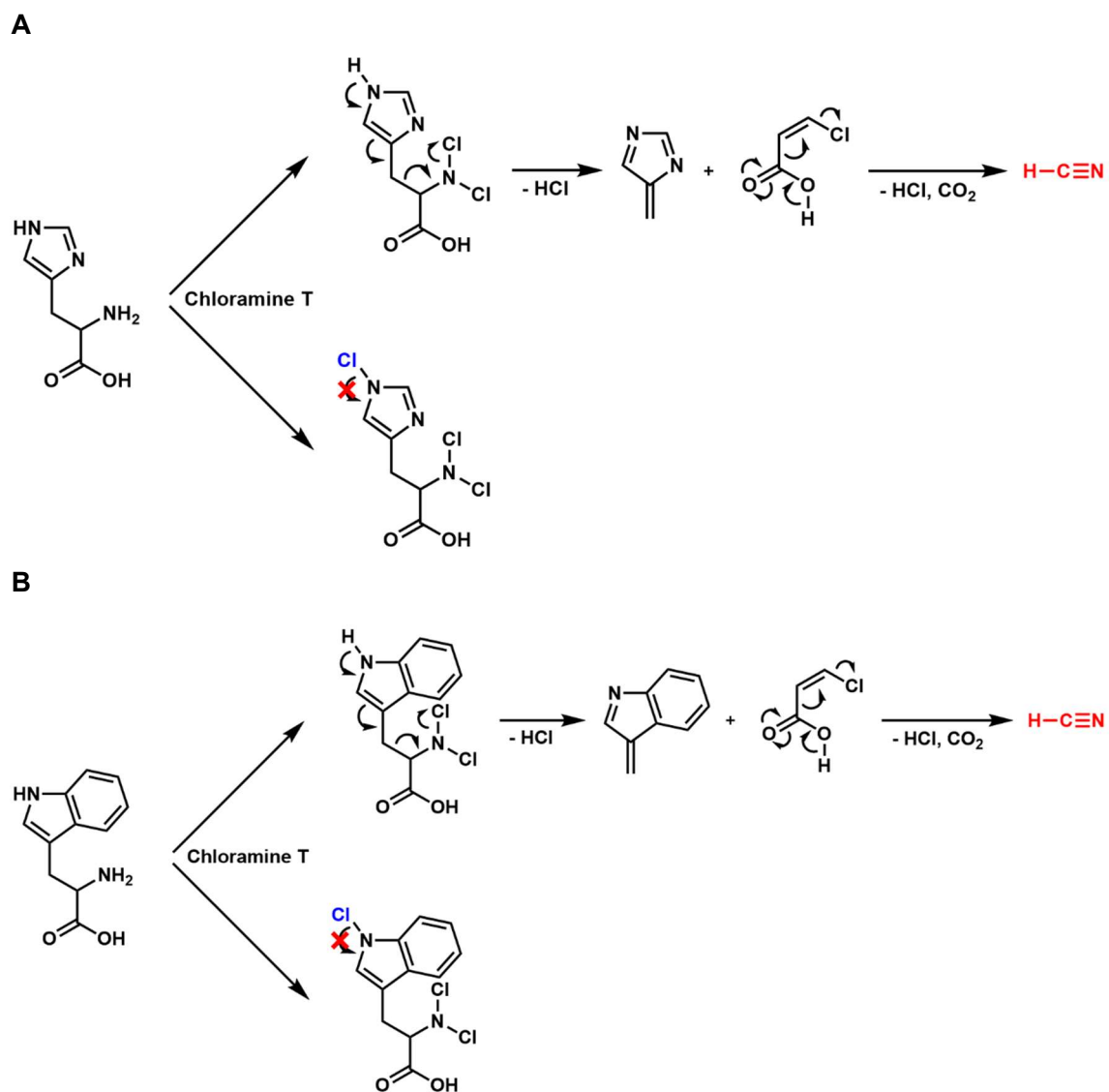


Fig. 10. Competition between the degradation into cyanide and chlorination of amine at a side chain. (A) His and (B) Trp.

第2章 ドパミン分析への応用

ドパミン (DA) は神経伝達物質の1つであり、生体内ではL-ドパを介してTyrから生成するカテコールアミンの1種である。TyrからL-ドパに変換する反応は酵素チロシンヒドロキシラーゼが触媒し、DA産生の律速段階となっている¹⁰。DAは快楽、動機、記憶、運動等の生命活動に関与し、DA恒常性破綻は様々な疾患の原因となりうる¹¹。例えば、DA不足はパーキンソン病を引き起こし、ジスキネジア、硬直、振戦等の症状を示す¹²。不足したDAを補うため、L-ドパがパーキンソン病の治療薬として用いられる。また、DA不足はうつ病発症への関与も示唆されている¹³。反対に、過剰なDAは統合失調症の陽性症状の原因とされ、妄想や幻覚を引き起こす¹⁴。

DA作動性ニューロンの生理活動や上記に挙げたようなDA作動性ニューロンの関与が疑われる疾患の原因解明のために、*in vivo*の実験に加え*in vitro*の実験が必要であり、細胞中のDAを正確に定量できる手法が必要である。これまでに様々なDA定量法が報告されているが、多くは血液や組織中のDA定量を目的としたものである¹⁵⁻²⁵。*in vitro*の実験には培養細胞向けにバリデートされた手法が必要であるが、現在のところ独自の電極を用いた電気化学検出法²⁶及びLC-MS法²⁷が報告されているのみである。

そこで本章では、DAと類似の構造をもつTyrがKönig反応により検出されることに基づき、König反応を用いてより簡便かつ高感度な細胞内DA分析法の開発を試みた。

2-1. 方法

試薬

試薬は全て市販の特級品、HPLC又はLC-MSグレードのものを用途に応じ使用した。水はMerckのMilli-Qシステムにより得られた精製水を使用した。

ピリジン・バルビツール酸溶液の組成

1-1に同じ。

吸収及び蛍光スペクトルの取得

100 μL の 100 μM DA あるいは CN 水溶液を 400 μL の 200 mM の酢酸緩衝液 (pH 5.0) と混合し、さらに 100 μL の 0.03% (w/v) クロラミン T 水溶液を加え、80°C で 10 分間反応させた。反応後は氷上で 5 分間冷却したのち、100 μL のピリジン・バルビツール酸溶液を加え、室温で 10 分間反応させた。反応液の吸収及び蛍光スペクトルを SpectraMax iD3 マイクロプレートリーダー (Molecular Devices 社) により取得した。

蛍光物質及びシアン分解反応中間体の検出

上述の方法により得られた蛍光誘導体化反応液及びクロル化反応液を LC-MS に供した。この際の LC-MS 条件は Table 1 に示す。

CN⁻及び CNCl の検出

100 μ L の 1 mM DA 水溶液を 400 μ L の 200 mM の酢酸緩衝液 (pH 5.0) と混合し、さらに 100 μ L の 0.03% (w/v) クロラミン T 水溶液を加え、80°C で 10 分間反応させた。反応後は氷上で 5 分間冷却したのち、反応液を HPLC に供した。この際の HPLC 条件は過去に確立した条件を用いた⁸。

HPLC 条件

装置構成は 1-1 に同じ。カラムは Scherzo SM-C18 (3 μ m, 150 x 4.6 mm i.d., インタクト社) を用い、移動相は 200 mM 酢酸緩衝液 (pH 5.0)/メタノール (95/5, v/v) とした。

細胞培養

理研セルバンクより入手したラット褐色細胞腫由来 PC12 細胞を、10% ウマ血清 (BioWest 社) 及び 5% ウシ胎児血清 (Biosera 社) を含むダルベッコ変法イーグル培地 (富士フィルム和光純薬社) を用い、5% CO₂, 37°C の条件下で培養した。

試料調製

セルペレットに 200 μ L の 1% (w/v) 5-スルホサリチル酸 (5-SSA) 水溶液を添加し、さらにボルテックスミキサーにより振動を加えることで細胞を破碎した。この細胞破碎液を 10,000 x g で 5 分間遠心分離し、上清を孔径 0.22 μ m のメンブランフィルターでろ過した。ろ液は水又は 0.5% (w/v) 5-SSA で希釈し、HPLC に供する試料とした。

分析法バリデーション

0.5% (w/v) 5-SSA で調製した DA 溶液 (0.025–10 μ M) を注入し検量線を得ることで、LOD, LOQ 及び直線性を評価した。LOD 及び LOQ は、最低濃度 (0.025 μ M) におけるピーク面積の標準偏差を検量線の傾きで除した値に 3.3 及び 10 を乗じた値とした。分析単位内の真度及び精度は、 1.0×10^6 個の PC12 細胞に 2.5, 5, 10 μ M の DA をスパイクし、それらの DA 定量値より求めた。分析単位間の真度及び精度は、これら同一サンプルの DA 値を 3 日間定量することにより求めた。以上の検討は各濃度 5 回ずつ行った。

L-ドパ曝露実験

PC12 細胞をコラーゲンコート 6 ウェルプレートに 1.0×10^6 個/ウェルとなるように播種し一晩かけて定着させたのち、L-ドパを 100 μ M となるように培地に添加して 3 時間培養し

た。細胞は 0.25% トリプシン-EDTA 溶液を用いて回収した。本実験は 3 回繰り返して行った。

CN-曝露実験

PC12 細胞をコラーゲンコート 75 cm² フラスコに 1.2×10^6 個播種し、およそ 90% のコンフルエンスとなるまで培養したのち、CN を 100 又は 250 μM となるように培地に添加して 24 時間培養した。CN の揮散を防ぐために、添加後はフラスコのキャップを閉じて培養した。細胞は 0.25% トリプシン-EDTA 溶液を用いて回収した。本実験は 3 回繰り返して行った。

LC-MS 法との比較

CN-曝露実験にて得られた試料と同一のものを LC-MS に供した。この際の LC-MS 条件は Table 2 に示す。

統計解析

L-ドパ曝露実験における細胞内 DA 量の比較は Welch の t 検定により行った。CN-曝露実験における細胞内 DA 量の比較は Tukey 検定により行った。DA 定量値の LC-MS 法との比較は Pearson の相関分析により行った。これらの統計解析は JMP Pro 16.2.0 ソフトウェア (JMP Statistical Discovery 社) を用いて行った。

Table 1. Parameters for LC-MS analysis for the detection of the derivatized compound and intermediate of the derivatization of DA.

LC condition	
Equipment	UFLC LC-20 Series (Shimadzu)
Column	Scherzo SM-C18 (3 μ m, 150 x 2.0 mm i.d.), temp.: 40°C
Mobile phase	(A) 0.1% (v/v) acetic acid in water (B) 0.1% (v/v) acetic acid in acetonitrile 5–50%B (0–10 min), 50%B (10–20 min), 5%B (20–30 min) Flow rate: 0.2 mL/min
Injection vol.	5 μ L
MS condition	
Equipment	X500R QTOF system (AB Sciex LLC)
Mode	TOFMS
Ion source gas	1: 60 psi, 2: 60 psi
Curtain gas	30 psi
CAD gas	7 a.u.
Heater temp.	400°C
Spray voltage	-4,500 V (for derivatized compound) or 5,500 V (for intermediate)
Declustering potential	-80V (for derivatized compound) or 80 V (for intermediate)
Collision energy	-5 V (for derivatized compound) or 5 V (for intermediate)

Table 2. Parameters for LC-MS analysis for the quantification of DA.

LC condition	
Equipment	UFLC LC-20 Series
Column	Scherzo SS-C18 (3 μ m, 100 x 2.0 mm i.d.), temp.: 40°C
Mobile phase	(A) water/formic acid/methanol (65/0.5/35, by volume) (B) 100 mM ammonium formate/methanol (60/40, by volume) 20–100%B (0–10 min), 100%B (10–15 min), 20%B (15–25 min) Flow rate: 0.2 mL/min
Injection vol.	2 μ L
MS condition	
Equipment	X500R QTOF system
Mode	TOFMS
Ion source gas	1: 60 psi, 2: 60 psi
Curtain gas	30 psi
CAD gas	7 a.u.
Heater temp.	400°C
Spray voltage	5,500 V
Declustering potential	100 V
Collision energy	5 V

2-2. 結果及び考察

König 反応による DA の検出

まず、DA が König 反応により検出が可能であるか検証した。DA をクロラミン T 及びピリジン・バルビツール酸溶液と反応させたときに得られた色素の吸収及び蛍光スペクトルの形状および極大波長は、CN⁻の場合と一致した (Figs. 11A and 11B)。次いで、DA から生成した蛍光色素の検出を LC-TOFMS を用いて試みたところ、CN⁻をピリジン及びバルビツール酸を縮合剤として用いた際に生成する蛍光色素のプロトン脱離体と同一の m/z をもつ化合物が検出された (Figs. 11C and 11D)。また、DA とクロラミン T の反応液から CN⁻及び CNCl が検出された (Fig. 11E)。以上より、DA の蛍光検出は、クロル化反応による DA の CN⁻への分解と、それに引き続く CN⁻の König 反応による検出というメカニズムであることが分かった (Fig. 11F)。

DA の CN⁻への分解機構の検討

DA の CN⁻への推定分解機構を Fig. 12A に示す。この機構が正しいのであれば、CN⁻のほかに 2-ヒドロキシ-4-メチレン-2,5-シクロヘキサジエン-1-オンが DA とクロラミン T の反応液から検出されるはずである。そこで、DA とクロラミン T の反応液を LC-TOFMS に供し、当該化合物のプロトン付加体 m/z (123.0441) で抽出イオンクロマトグラムを描画すると、Fig. 12B のようなクロマトグラムが得られた。ここでは2つのピークが観測された。これは、2-ヒドロキシ-4-メチレン-2,5-シクロヘキサジエン-1-オンがエノール型であり、ケト型の 4-メチル-1,2-ベンゾキノンに互変異性したことによるものと考えられた。それぞれのピークについてマススペクトルを Fig. 12C に示す。いずれも m/z 123.0440 のピークが観測された。ゆえに、Fig. 12A に示す DA の CN⁻への分解機構は妥当であると考えられた。

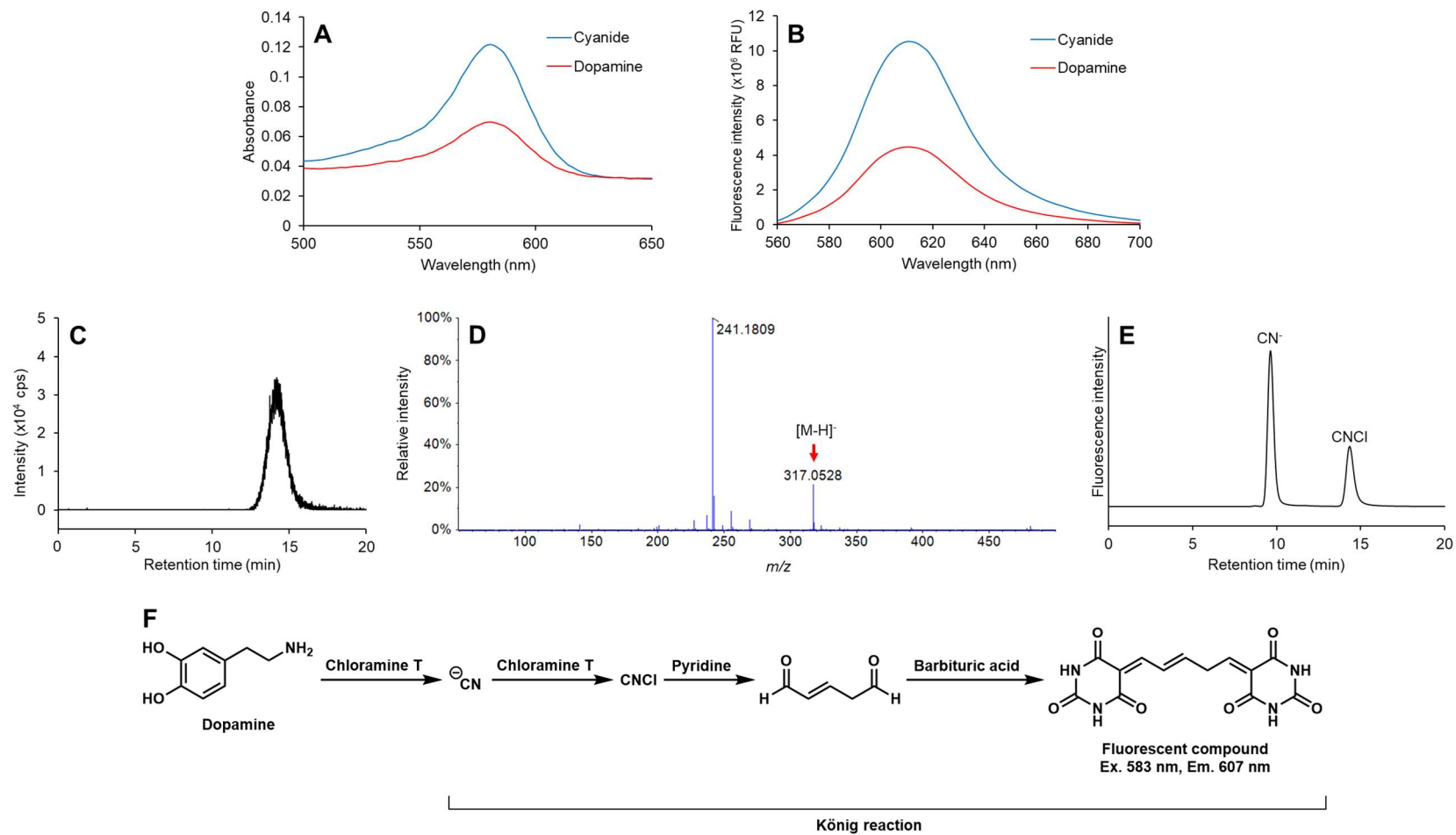


Fig. 11. DA also undergoes the König reaction. (A) Absorbance and (B) fluorescence emission spectra of the derivatized compound from DA (red line) and cyanide (blue line). Excitation wavelength was 520 nm. (C) The extract ion chromatogram at m/z 317.0528. (D) The mass spectrum of the peak at 14.2 min. (E) Chromatogram of cyanide and cyanogen chloride. (F) Reaction scheme of the derivatization of DA.

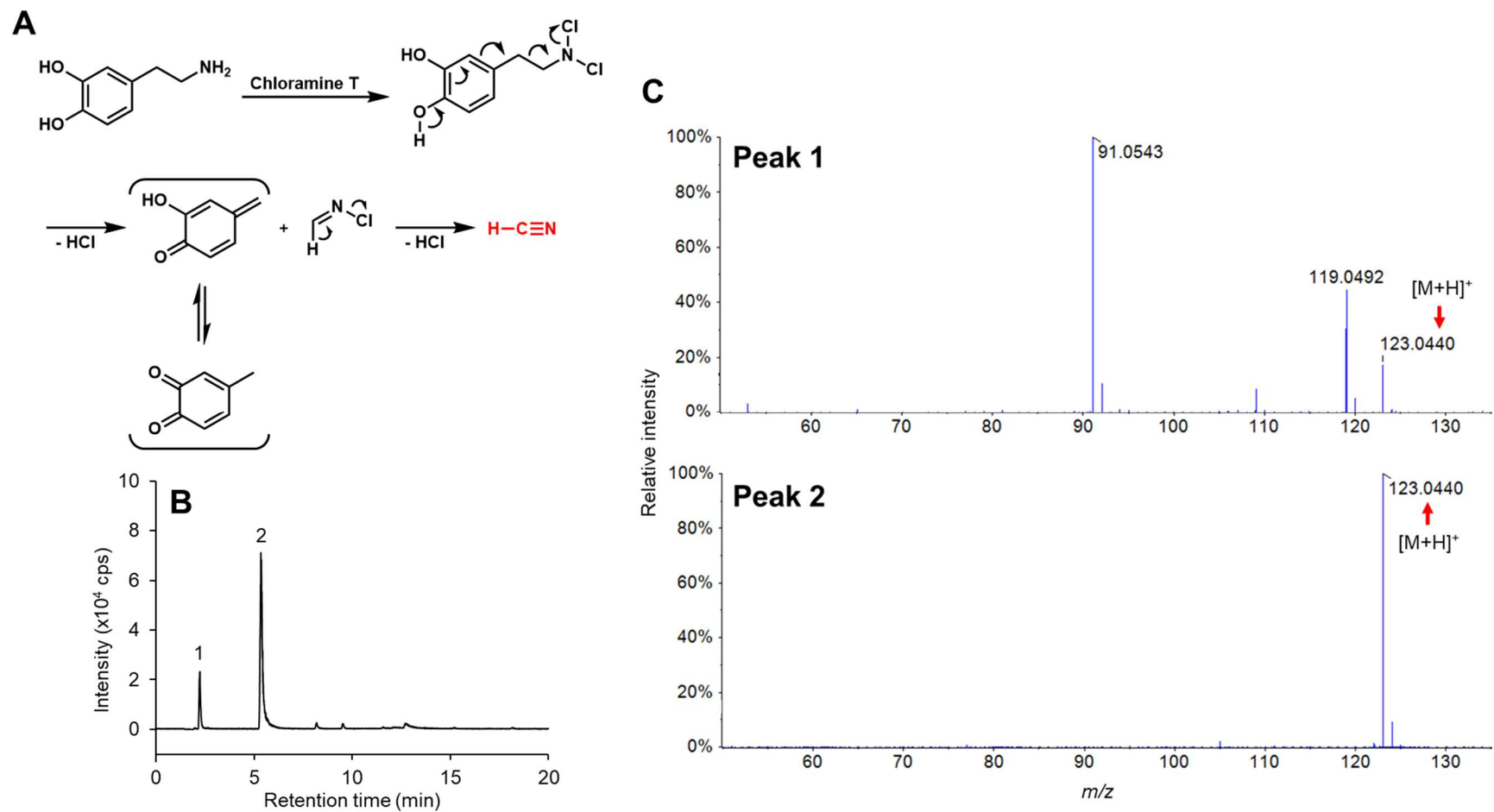


Fig. 12. Conversion of DA to cyanide. (A) Proposed reaction mechanism for the decomposition of DA into cyanide and 2-hydroxy-4-methylene-2,5-cyclohexadin-1-one by chloramine T. (B) The extracted ion chromatogram at m/z 123.0441. (C) Mass spectra of peaks 1 and 2 in Fig. 7B.

ポストカラム誘導体化蛍光 HPLC 法による DA 分析条件の検討

カラムに Scherzo SM-C18 (3 μm , 150 x 4.6 mm i.d.), 移動相に 200 mM 酢酸緩衝液 (pH 5.0) / メタノール (95/5, by volume) を用いると, DA は 11.8 分に溶出することが分かった (Fig. 13). DA を水あるいは 0.5% (w/v) 5-SSA 溶液で調製して HPLC に注入した場合で, ピーク形状が異なることが分かった. 特に, 5-SSA 溶液で調製した場合の方がシャープなピークが得られ, ピークが若干ブロードする水で調製した場合よりも感度の向上が期待できることが示唆された. したがって, 細胞試料への応用では 5-SSA 溶液を用いることにした. ドパミン産生細胞であるラット褐色細胞腫由来 PC12 細胞を 5-SSA 溶液で破碎し得られたクロマトグラムを Fig. 14 に示す. 本条件で, DA は他の夾雑物とよく分離することが分かった.

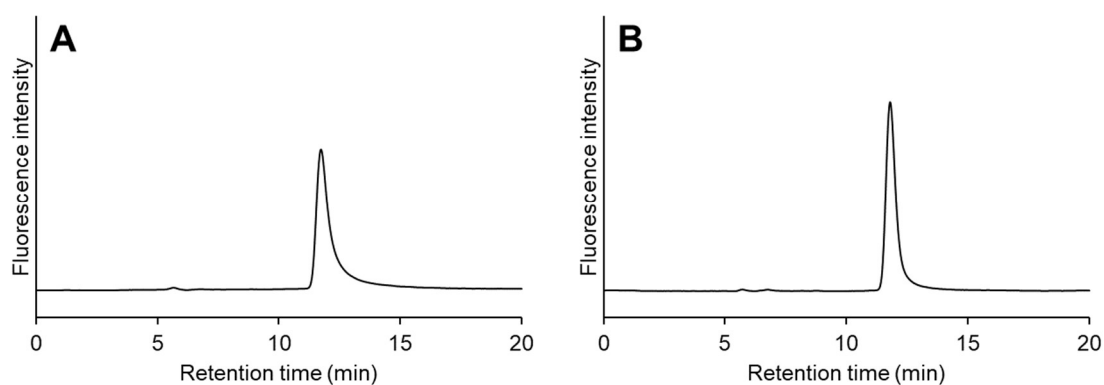


Fig. 13. Effect of solvent on the chromatogram of DA. DA was dissolved in (A) water or (B) 0.5% (w/v) 5-SSA at a concentration of 5 μM .

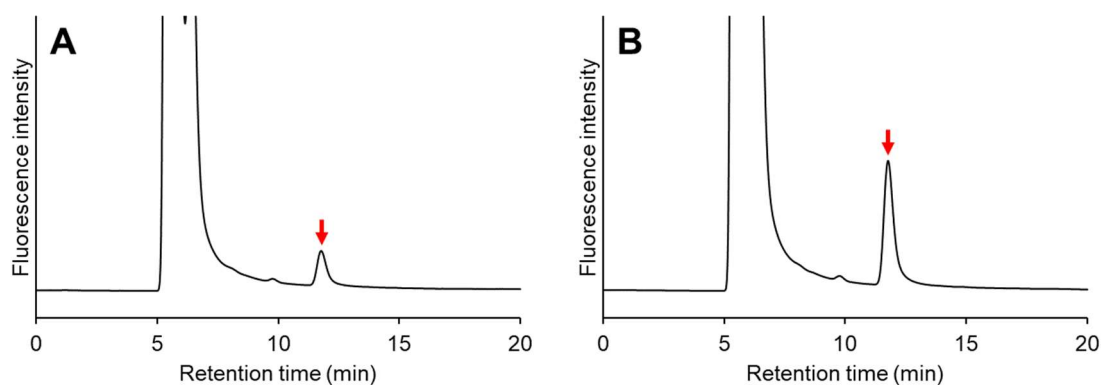


Fig. 14. Typical chromatograms of DA in PC12 cells. (A) Unspiked and (B) spiked with 5 μM DA. Red arrows indicate the peak of DA.

分析法バリデーション

本条件で DA を分析した際の LOD 及び LOQ はそれぞれ 10.8 nM 及び 32.8 nM であった (Table 3). LC-MS を用いた細胞内 DA 定量法として報告されている LOD 及び LOQ はそれぞれ 34.4 nM 及び 44.3 nM であったことから²⁷, 本法の方が感度の点で優れていることが分かった. また, 本法の直線性は 0.05–10 µM の範囲で確認した (決定係数 0.9994). 分析単位内の真度及び精度はそれぞれ 103.9–106.3%及び 0.94–4.37%, 分析単位間の真度及び精度はそれぞれ 101.8–103.4%及び 1.94–3.76%であった (Table 4). 以上の結果から, 本法は高感度な手法であり, かつ信頼できる手法であることが示された.

Table 3. LOD, LOQ, and linearity of the present method.

LOD (nM)	LOQ (nM)	Linearity range (µM)	Equation	R^2
10.8	32.8	0.05–10	$y = 3937031x + 183047$	0.9994

Table 4. Accuracy and precision of the present method.

Spiked (µM)	Intra-day assay ($n = 5$)		Inter-day assay ($n = 15$)	
	Accuracy (% of target)	Precision (%RSD)	Accuracy (% of target)	Precision (%RSD)
2.5	104.7	4.37	103.4	3.76
5	106.3	0.94	102.4	2.66
10	103.9	2.21	101.8	1.94

細胞内 DA 定量への応用

本法の応用としてまず、生体内において DA 前駆体である L-ドパを曝露した PC12 細胞中 DA の定量を行ったところ、DA の増加を確認することができた (Fig. 15). 次いで、CN を曝露した PC12 細胞中 DA の定量を行ったところ、DA の減少を確認した (Fig. 16). CN はカルシウムの細胞内への流入を増大させ DA の細胞外への放出を促進することが報告されており²⁸, その結果としての細胞内 DA 減少であると考えられた. 以上の結果より、本法を用いることで細胞内 DA 変動を確認できることが示された.

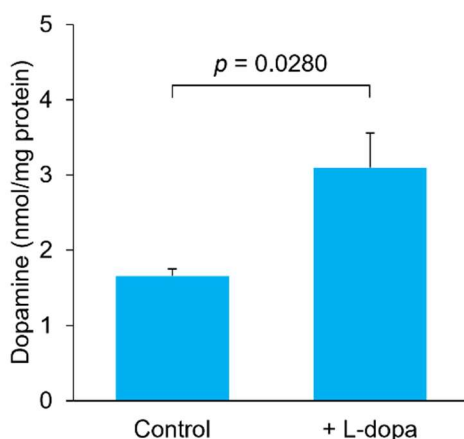


Fig. 15. Effect of L-dopa on intracellular DA levels. PC12 cells were exposed to 0 or 100 μM L-dopa for 3 h. Data are presented as means + SD ($n = 3$). Welch's t -test was performed.

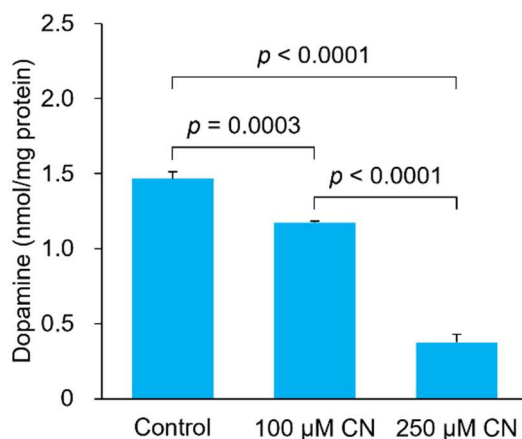


Fig. 16. Effect of cyanide on intracellular DA levels. PC12 cells were exposed to 0, 100, or 250 μM CN for 24 h. Data are presented as means + SD ($n = 3$). Turkey's test was performed.

LC-MS 法との比較

前項において CN を曝露した PC12 細胞中 DA の定量を, LC-MS を用いても行った. その定量値は本法によるものと良好な一致を示した (Fig. 17). この結果及びバリデーション結果を踏まえ, 本法による定量値は妥当であることが示された.

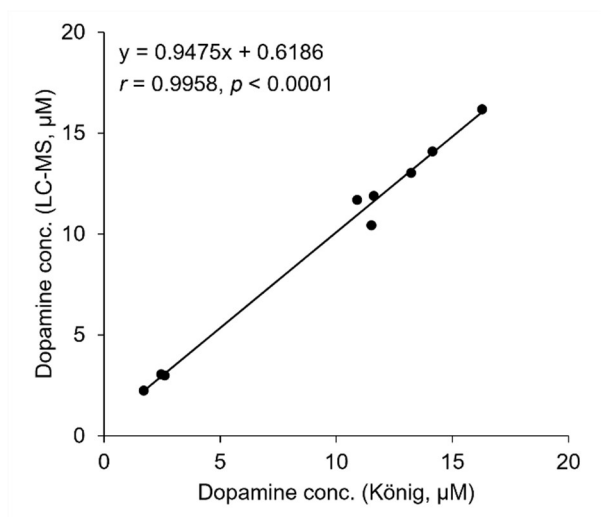


Fig. 17. Correlation between DA concentration quantified by the present method and that by the LC-MS method. DA concentration in the same sample was quantified by the König method (x-axis) and the LC-MS method (y-axis). Pearson's correlation analysis was performed.

他カテコールアミンの検出

生体内における重要なカテコールアミンは DA のほかに, L-ドパ, NE 及び EP があり, これらは全て Tyr を起点として, Tyr, L-ドパ, DA, NE, EP の順に合成される. Tyr 及び DA は König 反応で検出可能であり, これらは全て類似構造をもつことから, L-ドパ, NE 及び EP も König 反応で検出可能かどうか調べた. 全て検出可能であったが, EP は L-ドパ及び NE と比較して著しく感度が低かった (Fig. 18). これは, EP 以外は 1 級アミンであるのに対し, EP は 2 級アミンであることが原因であると考えられた. すなわち, Fig. 9 や Fig. 12A に示すように König 反応で検出されるためにはアミノ基のジクロル化が必要であるが, 2 級アミンの EP ではそのジクロル化ステップが進行しづらいことにより, それに引き続く CN へ分解が進行しにくいことが考えられた.

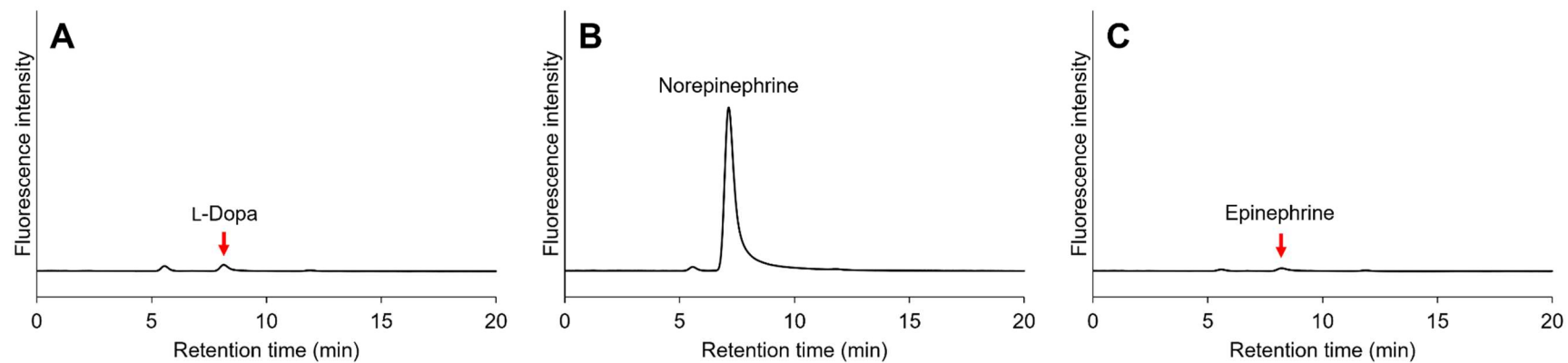


Fig. 18. Fluorescence detection of L-dopa, NE, and EP using the present method. (A) 5 μ M L-dopa, (B) 5 μ M NE, and (C) 50 μ M EP.

第3章 グルタチオン分析への応用

グルタチオンは Glu, Cys 及び Gly からなるトリペプチドで, 細胞内における酸化ストレスの除去に重要な役割を果たしている. グルタチオンは細胞内において主に還元型 (GSH) として存在しているが, 活性酸素種と非酵素的あるいは酵素的に反応すると酸化型 (GSSG) になる. それゆえ, 酸化型に対する還元型の量比 (GSH/GSSG) は細胞内の酸化ストレスの指標となる. 酸化ストレスは加齢やがん, 糖尿病, 循環器疾患, 神経変性疾患, 慢性腎臓病といった様々な疾患の原因とされている^{29,30}. また, PQ やある種の金属の生体への毒性は酸化ストレスによるものと考えられている^{31,32}. したがって, 各種疾患の病態や化学物質の毒性を解明するために細胞内の GSH 及び GSSG を定量することは重要である.

細胞内の GSH 濃度は 0.5–10 mM 程度であるに対し, GSSG 濃度は 5–50 μ M 程度と非常に少なく³³, GSH/GSSG を求めるためには高感度な分析法が必要となる. 代表的なグルタチオンの分析法に, 5,5'-ジチオビス(2-ニトロ安息香酸) (Ellman 試薬) を用いた比色法の DTNB 法があり³⁴, 市販のグルタチオン定量キットにも利用されている. しかし DTNB 法はチオール基を認識する手法であることから GSH は定量することができるが, GSSG は直接定量できない. したがって, GSSG 定量するためには細胞内に存在する GSSG を還元して求めた全 GSH 量から元々の GSH 存在量を引いて求める必要があり, 二度手間となる. また, Ellman 試薬はグルタチオン特異的ではないため, 試料中に含まれる他のチオールの影響を受ける³⁵. GSH 及び GSSG の同時定量法は, LC-FLD³⁶, LC-ECD³⁷ 及び LC-MS³⁸⁻⁴² を用いた様々な手法が報告されている. これまでに報告されている LC-FLD 法は GSH と GSSG で別々の誘導体化を行うため 2 台の蛍光検出器を必要とする. LC-ECD 法はグルタチオン以外にも, 他のチオール化合物, 還元糖類, カテコールアミン類といった電気化学的に反応する他の生体物質も検出するため, グルタチオンをこれらと十分に分離することが難しい. LC-MS 法は装置自体のコストや煩雑なメンテナンスがネックとなる.

そこで本章では, グルタチオンが C 末端に Gly をもち, Gly が König 反応により検出されることに基づき, König 反応を用いてより簡便かつ高感度な細胞内グルタチオン分析法の開発を試みた.

3-1. 方法

試薬

試薬は全て市販の特級品又は HPLC グレードのものを用途に応じ使用した。水は Merck の Milli-Q システムにより得られた精製水を使用した。

ピリジン・バルビツール酸溶液の組成

1-1 に同じ。

吸収及び蛍光スペクトルの取得

100 μL の 100 μM GSH, GSSG あるいは 10 μM CN-水溶液を 400 μL の 75 mM の酢酸緩衝液 (pH 5.0) と混合し, さらに 100 μL の 0.03% (w/v) クロラミン T 水溶液を加え, 80°C で 10 分間反応させた。反応後は 100 μL のピリジン・バルビツール酸溶液を加え, 室温で 10 分間反応させた。反応液の吸収及び蛍光スペクトルを SpectraMax iD3 マイクロプレートリーダーにより取得した。

CN⁻及び CNCl の検出

100 μL の 100 μM GSH あるいは GSSG 水溶液を 400 μL の 75 mM の酢酸緩衝液 (pH 5.0) と混合し, さらに 100 μL の 0.03% (w/v) クロラミン T 水溶液を加え, 80°C で 10 分間反応させた。反応後は氷上で 5 分間冷却したのち, 反応液を HPLC に供した。この際の HPLC 条件は過去に確立した条件を用いた⁸。

HPLC 条件

装置構成は 1-1 に同じ。カラムは Scherzo SM-C18 (3 μm , 150 x 4.6 mm i.d., インタクト社) を用い, 移動相は 75 mM 酢酸緩衝液 (pH 5.0), その流速は 0.5 mL/min とした。

細胞培養

2-1 に同じ。

試料調製

セルペレットに 200 μL の 1% (w/v) 5-スルホサリチル酸 (5-SSA) 水溶液を添加しボルテックスミキサーにより振動を加えることで細胞を破碎したのち, 氷上に 10 分間置いた。この細胞破碎液を 10,000 x g, 4°C で 10 分間遠心分離し, 上清を等量の水で希釈したのち孔径 0.45 μm のメンブランフィルターでろ過した。

分析法バリデーション

GSH 及び GSSG の水溶液 (GSH: 0.05–50 μM , GSSG: 0.05–10 μM) を注入し検量線を得る

ことで、LOD、LOQ 及び直線性を評価した。LOD 及び LOQ は、最低濃度 (0.05 μM) におけるピーク面積の標準偏差を検量線の傾きで除した値に 3.3 及び 10 を乗じた値とした。真度及び精度は、 1.0×10^6 個の PC12 細胞に 40 μM の GSH あるいは 1 及び 10 μM の GSSG をスパイクし、それらの GSH 及び GSSG 定量値より求めた。以上の検討は各濃度 5 回ずつ行った。

PQ 曝露実験

PC12 細胞をコラーゲンコート 6 ウェルプレートに 1.0×10^6 個/ウェルとなるように播種し一晩かけて定着させたのち、PQ を 250 あるいは 500 μM となるように培地に添加して 24 時間培養した。細胞は 0.25% トリプシン-EDTA 溶液を用いて回収した。本実験は 3 回繰り返して行った。

DTNB 法との比較

PQ 曝露実験にて得られた試料と同一のものを、グルタチオン定量キット (同仁化学社) で分析した。

統計解析

PQ 曝露実験における細胞内 GSH/GSSG 比の比較は Tukey 検定により行った。GSH 定量値の DTNB 法との比較は Pearson の相関分析により行った。これらの統計解析は JMP Pro 16.2.0 ソフトウェアを用いて行った。

3-2. 結果及び考察

König 反応によるグルタチオンの検出

まず、グルタチオンが König 反応により検出が可能であるか検証した。GSH 及び GSSG をクロラミン T 及びピリジン・バルビツール酸溶液と反応させたときに得られた色素の吸収及び蛍光スペクトルの形状および極大波長は、CN⁻の場合と一致した (Figs. 19A and 19B)。また、GSH 及び GSSG とクロラミン T の反応液から CNCl が検出された (Fig. 19C)。CN⁻は検出されなかったが、CN⁻から CNCl への変換は速いため⁹、生成した CN⁻は全て CNCl に変換されてしまったと考えられた。以上より、グルタチオンの蛍光検出は、クロル化反応によるグルタチオンからの CN⁻の生成と、それに引き続く CN⁻の König 反応による検出という、DA の場合と同様のメカニズムであることが分かった。

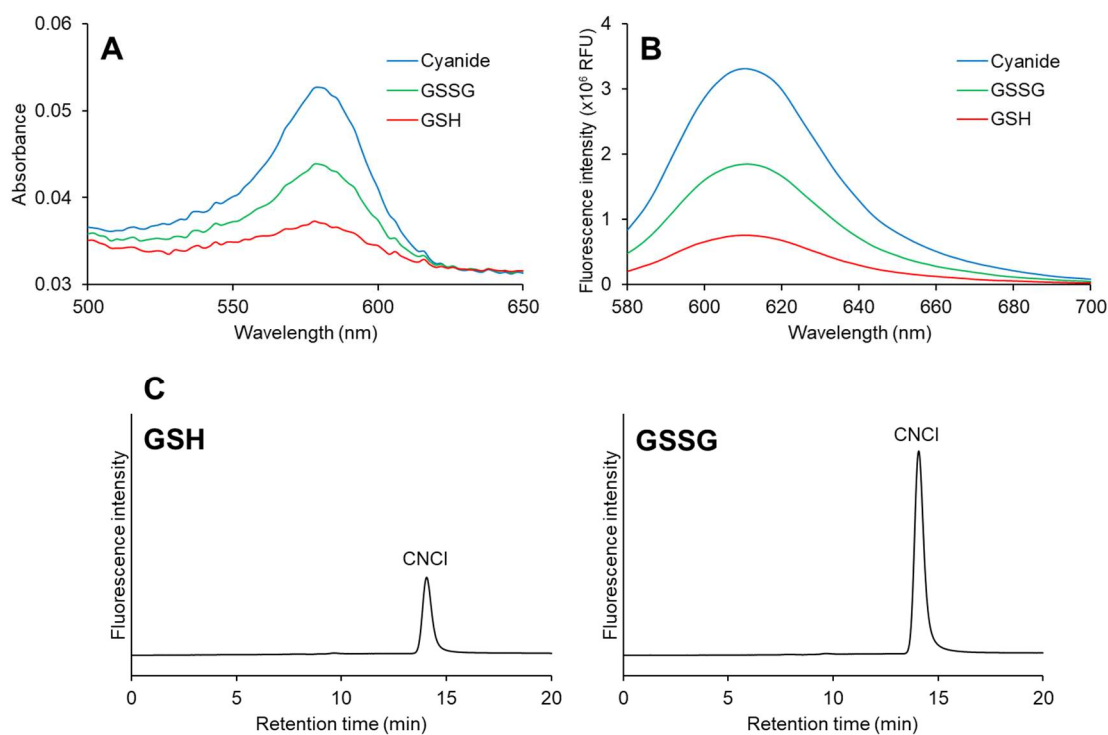


Fig. 19. Glutathione also undergoes the König reaction. (A) Absorbance and (B) fluorescence emission spectra of the derivatized compound from GSH (red line), GSSG (green line) and cyanide (blue line). Excitation wavelength was 540 nm. (C) Chromatograms of cyanide and cyanogen chloride obtained from GSH and GSSG.

ポストカラム誘導体化蛍光 HPLC 法によるグルタチオン分析条件の検討

カラムに Scherzo SM-C18 (3 μm , 150 x 4.6 mm i.d.), 移動相に 75 mM 酢酸緩衝液 (pH 5.0) を用いると, GSH は 7.8 分, GSSG は 9.9 分に溶出し, 互いによく分離することが分かった (Fig. 20). また, PC12 細胞を 5-SSA 溶液で破碎し得られたクロマトグラムを Fig. 21 に示す. 本条件で, GSH 及び GSSG は 5 分付近に溶出する Gly, Ser 及び Thr を主とする夾雑物と良好に分離することも分かった. 本条件により, 細胞内にわずかに存在する GSSG を検出できることも分かり (Fig. 21A), König 反応が細胞内 GSH のみならず, GSSG の定量にも利用できることが期待された.

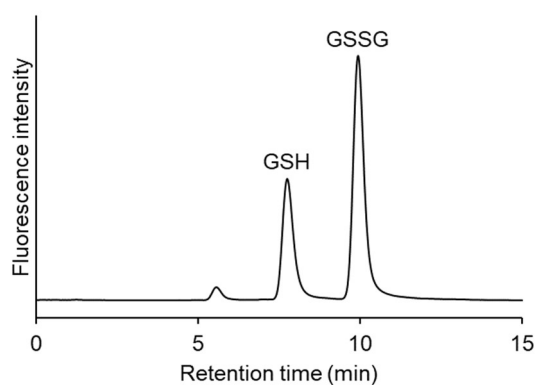


Fig. 20. Typical chromatogram of GSH and GSSG. The mixture of 5 μM GSH and GSSG aqueous solution was injected.

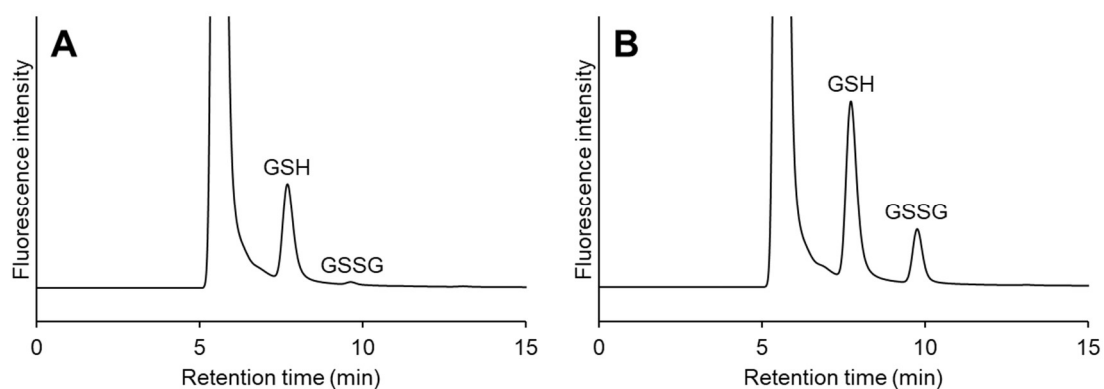


Fig. 21. Typical chromatograms of GSH and GSSG in PC12 cells. (A) Unspiked and (B) spiked with 40 μM GSH and 10 μM GSSG.

分析法バリデーション

本条件で GSH 及び GSSG を分析した際の LOD はそれぞれ 6.04 nM 及び 9.84 nM であり、LOQ はそれぞれ 18.3 nM 及び 29.8 nM であった (Table 5)。これらの結果は DTNB 法及び一部の LC-MS 法よりも高感度であることが分かった (Table 6)^{34, 39, 41, 42}。また、本法の直線性は、GSH は 0.05–50 μM (決定係数 0.9997)、GSSG は 0.05–10 μM (決定係数 0.9992) の範囲で確認した。GSH の真度及び精度はそれぞれ 84.8% 及び 3.21%、GSSG の真度及び精度はそれぞれ 96.0–96.5% 及び 2.39–2.79% であった (Table 7)。以上の結果から、本法は高感度な手法であり、かつ信頼できる手法であることが示された。

Table 5. LOD, LOQ, and linearity of the present method.

Compound	LOD (nM)	LOQ (nM)	Linearity range (μM)	Equation	R^2
GSH	6.04	18.3	0.05–50	$y = 3070457x + 162156$	0.9997
GSSG	9.84	29.8	0.05–10	$y = 6689536x + 770531$	0.9992

Table 6. Comparison of LOQ values of previously reported LC-MS methods.

Reference (method)	GSH	GSSG
34 (DTNB)	100 nM	100 nM
39 (LC-MS)	1,500 nM	100 nM
41 (LC-MS)	30 ng/mL (= 97.6 nM)	1 ng/mL (= 1.63 nM)
42 (LC-MS)	100 ng/mL (= 325 nM)	100 ng/mL (= 163 nM)

Table 7. Accuracy and precision of the present method ($n = 5$).

Compound	Spiked (μM)	Accuracy (% of target)	Precision (%RSD)
GSH	40	84.8	3.21
GSSG	1	96.0	2.79
	10	96.5	2.39

細胞内グルタチオン分析への応用

本法の応用としてまず、何の薬剤も曝露していない PC12 細胞内の GSH 及び GSSG 濃度を求めた。細胞の体積を 1 pL と仮定した場合、細胞内 GSH 濃度は 8.77 ± 0.28 mM, GSSG 濃度は 121.83 ± 13.24 μ M (いずれも $n = 5$) と求められた。GSH については通常想定される細胞内濃度であったが、GSSG についてはやや高い値となった。これは、試料調製中に、空气中に存在する酸素により GSH が GSSG に酸化されてしまったことによるものと考えられた。GSSG は GSH に対して非常に存在量が少ないため、わずかな量の GSH の酸化でも、GSSG の増加に寄与してしまうことが考えられた。

続いて、酸化ストレスを惹起する PQ を曝露した PC12 細胞における GSH 及び GSSG 定量を行い、GSH/GSSG 比を求めた。その結果、PQ の曝露量に応じて GSH/GSSG 比の減少を確認でき (Fig. 22A), 本法は酸化ストレスマーカーとしての GSH/GSSG 比の定量に応用できることが示された。

また、PQ 曝露した細胞における総 GSH 量の定量を、DTNB 法を用いても行った。その定量値は本法によるものと良好な一致を示した (Fig. 22B)。この結果及びバリデーション結果を踏まえ、本法による定量値は妥当であることが示された。

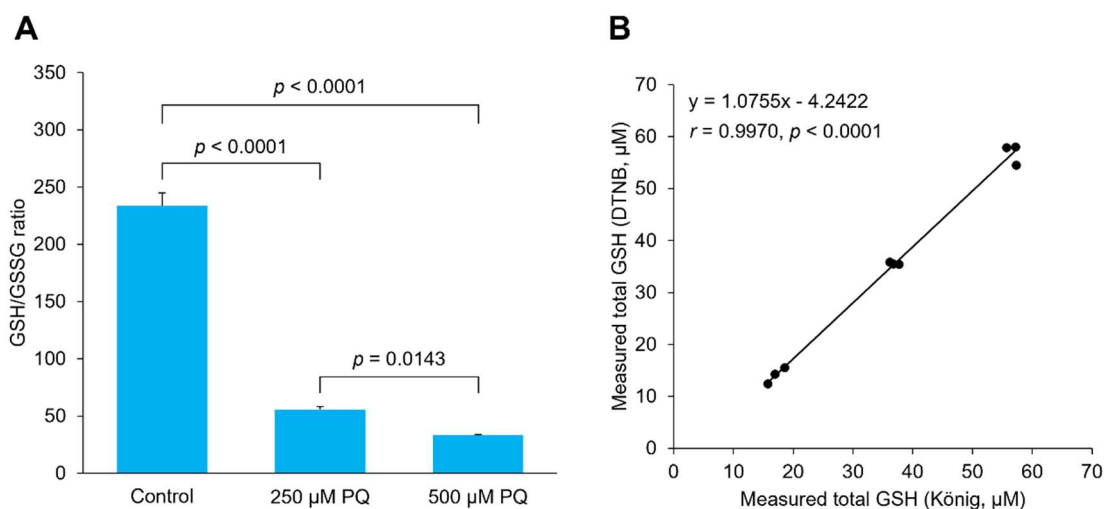


Fig. 22. Determination of intracellular glutathione by the present method. (A) Effect of PQ on intracellular GSH/GSSG ratio. GSH/GSSG ratios were calculated by quantifying GSH and GSSG in PC12 cells exposed to 0, 250, or 500 μ M PQ for 24 h. Data are presented as means + SD ($n = 3$). Turkey's test was performed. (B) Correlation between total GSH concentration quantified by the present method and that by the DTNB method. Total GSH concentration in the same sample was quantified by the König method (x-axis) and the DTNB method (y-axis). Pearson's correlation analysis was performed.

第4章 抗体医薬品分析への応用

抗体医薬品は主にヒト IgG を由来とする分子標的薬であり、遺伝子組み換え技術等を用いて疾患の原因となる標的分子に特異的に結合するような抗体として作製される。そのため化学的に合成できる低分子医薬品と比べて製造コストが高く、一般的に薬価が高い。また、特許切れ製品については先発品と類似構造をもつバイオシミラー製品の開発も活発化してきているが、バイオシミラーは先発品と同じ方法で製造されるとは限らない。

これら製品の有効性を最大化し、予期せぬ副作用を最小限に抑えるためには品質管理が重要となる。そのためには抗体医薬品を正確に定量する手法が必要となる。現在用いられている主な定量法としては、280 nm の吸光度測定法、リガンド結合法及び LC-MS/MS 法がある。280 nm の吸光度を測定する方法は非常に簡便であるが、目的抗体への特異性がない。リガンド結合法は ELISA を基にした手法が主に用いられ、目的抗体を抗原とした別の抗体を用いて定量する方法である⁴³⁻⁴⁵。そのため、280 nm の吸光度測定法に比べ選択性は高いが、試薬のバッチ差が大きく定量値がばらつきやすいことや類似配列をもつ別のタンパク質を誤検出してしまう交差反応といった欠点がある。LC-MS/MS 法は、目的抗体をトリプシン等のプロテアーゼで消化し、目的抗体に特異的なペプチドをサロゲートペプチドとして検出・定量する方法である⁴⁶⁻⁴⁹。ゆえに、非常に特異的な手法であるが、LC-MS/MS 装置自体が高価であることや感度や特異性を維持するために煩雑なメンテナンスを要すること、さらには試料中に共存する塩や他のペプチドによるイオン化抑制により感度低下が起こることといった欠点がある。

そこで本章では、このサロゲートペプチドを質量分析装置ではなく蛍光により検出・定量する手法の確立を試みた。具体的には、抗体をキモトリプシンで消化することにより C 末端に Tyr をもつペプチドを生成し、その中で目的抗体に特異的なものを König 反応で検出・定量できるか試みた。モデル抗体にはヒト型抗ヒト TNF- α 抗体であるアダリムマブを用いた。

4-1. 方法

試薬

検討用のアダリムマブ試薬は PBS(-) に溶解された 5 mg/mL 溶液のものを Selleck Chemicals 社から入手し使用した。サロゲートペプチド Cys(carboxymethyl)-Ala-Lys-Val-Ser-Tyr (C(cm)AKVSY) は Merck 社に合成を依頼し、TFA 塩のものを 98.5% の純度で入手し使用した。ヒュミラ[®] 製剤は規格 20 mg/0.2 mL のものを AbbVie 社より入手し使用した。その他試薬は市販の特級品、HPLC 又は LC-MS グレードのものを用途に応じ使用した。水は Merck の Milli-Q システムにより得られた精製水を使用した。

ピリジン・バルビツール酸溶液の組成

1-1 に同じ.

アダリムマブの *in silico* 消化

アダリムマブのアミノ酸配列は独立行政法人医薬品医療機器総合機構が発行するヒュミラ®の審査報告書から引用した⁵⁰. アダリムマブのキモトリプシン消化により得られるペプチドの予測には, Swiss Institute of Bioinformatics が提供する PeptideMass ツール (https://web.expasy.org/peptide_mass/) を利用した.

吸収及び蛍光スペクトルの取得

100 μ L の 100 μ M C(cm)AKVSY (0.1% 酢酸水溶液に溶解) 又は CN-水溶液を 400 μ L の 100 mM の酢酸緩衝液 (pH 5.0) と混合し, さらに 100 μ L の 0.25% (w/v) クロラミン T 水溶液を加え, 80°C で 10 分間反応させた. 反応後は氷上で 5 分間冷却したのち, 100 μ L のピリジン・バルビツール酸溶液を加え, 室温で 10 分間反応させた. 反応液の吸収及び蛍光スペクトルを SpectraMax iD3 マイクロプレートリーダーにより取得した.

CN⁻及び CNCl の検出

100 μ L の 100 μ M C(cm)AKVSY (0.1% (v/v) 酢酸水溶液に溶解) を 400 μ L の 100 mM の酢酸緩衝液 (pH 5.0) と混合し, さらに 100 μ L の 0.25% (w/v) クロラミン T 水溶液を加え, 80°C で 10 分間反応させた. 反応後は氷上で 5 分間冷却したのち, 反応液を HPLC に供した. この際の HPLC 条件は過去に確立した条件を用いた⁸.

HPLC 条件

装置構成は 1-1 に同じ. カラムは Scherzo SW-C18 (3 μ m, 150 x 4.6 mm i.d., インタクト社) を用い, 移動相は(A) 100 mM 酢酸緩衝液 (pH 5.0)及び(B) メタノールの構成とした. 最初の 35 分間は 12%B を維持し, 次の 10 分間は 50%B としてカラム洗浄を行い, 最後の 10 分間で 12%B に戻しカラムの再平衡化を行った. 移動相の流速は 0.5 mL/min を維持した. クロラミン T の濃度は 0.25% (w/v)とした.

試料調製

10 μ L のアダリムマブ溶液又はヒュミラ®希釈液を 95°C で 5 分間インキュベーションし, 抗体を変性させた. その後, 100 μ L の 100 mM Tris-HCl 及び 10 mM CaCl₂ を含む緩衝液 (pH 8.0) に溶解し, 100 mM DTT を最終濃度 5 mM となるように加えて 60°C で 20 分間インキュベーションし, ジスルフィド結合を切断した. さらに, 100 mM の IAA を最終濃度 15 mM となるように加えて室温暗所で 15 分間インキュベーションし, 遊離チオールをカルボキシメチル化した. 続いて, 5 μ L の 0.5 μ g/mL キモトリプシン (1 mM HCl に溶解) を加え, 25°C

で 2 時間消化した。消化により得られたペプチドは Pierce C18 Spin Column (ThermoFisher Scientific 社)を用いて精製した。得られたペプチド混合物は減圧下 55°Cで 40 分間乾燥させた。乾燥させたペプチドは 50 μ L の 0.1% (v/v) 酢酸水溶液に溶解し、HPLC に供する試料とした。

分析法バリデーション

0.1% 酢酸水溶液に溶解した C(cm)AKVSY (0.01–1 μ M) を注入し検量線を得ることで、LOD 及び LOQ を評価した。LOD 及び LOQ は、最低濃度 (0.01 μ M) におけるピーク面積の標準偏差を検量線の傾きで除した値に 3.3 及び 10 を乗じた値とした。C(cm)AKVSY と TFA は 1:2 で塩を形成するとみなし、その分子量を 955.88 として計算した。アダリムマブの LOD 及び LOQ はアダリムマブの分子量を 148,000 として計算した。直線性はアダリムマブ試薬を PBS(-)で希釈し、5–50 μ g の範囲で確認した。真度はアダリムマブ検量線の回帰式より得られた計算値と真値を比較することにより得た。精度は同一アダリムマブ量の 3 試料を注入した際の面積値から求めた。

4-2. 結果及び考察

サロゲートペプチドの選定

アダリムマブのアミノ酸配列を Fig. 23, *in silico* 消化により得られた C 末端に Tyr をもつペプチドを Table 8 に示し、抗体により特異的な CDR は下線で示す⁵¹。一般に、サロゲートペプチドの長さが長いほど特異性は向上するが、その分逆相カラムへの保持が強くなり溶出のために高濃度の有機溶媒を要する。König 反応を用いた蛍光検出においては、移動相の有機溶媒濃度が高いと感度が低下する傾向を確認した (Fig. 24)。そのため、なるべく低濃度の有機溶媒で溶出できる CDR を含む適度な長さのペプチドが候補となる。Table 8 より、NRAPY, NSGHIDY 及び CAKVSY が候補ペプチドと考えられたが、Asn を含む NRAPY 及び NSGHIDY は脱アミド化により不安定であり定量結果に影響を与える可能性を考慮し、CAKVSY を本検討におけるサロゲートペプチドに採用した。厳密には、Cys のチオール基をカルボキシメチル化した C(cm)AKVSY を本検討におけるサロゲートペプチドとした。

Light chain:

DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQGIR NYLAWYQQKP GKAPKLLIYA
ASTLQSGVPS RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDVATYYCQR YNRAPYTFGQ
GTKVEIKRTV AAPSVFIFPP SDEQLKSGTA SVVCLLNNFY PREAKVQWKV
DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYLSLSTLT LSKADYEKHK VYACEVTHQG
LSSPVTKSFN RGEC

Heavy chain:

EVQLVESGGG LVQPGRSLRL SCAASGFTFD DYAMHWVRQA PGKGLEWVSA
ITWNSGHIDY ADSVEGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRAED TAVYYCAKVS
YLSTASSLDY WGQGTLVTVS SASTKGPSVF PLAPSSKSTS GGTAALGCLV
KDYFPEPVTV SWNSGALTSG VHTFPAVLQS SGLYSLSSVV TVPSSSLGTQ
TYICNVNHKP SNTKVDKKVE PKSCDKTHTC PPCPAPELLG GPSVFLFPPK
PKDTLMISRT PEVTCVVVDV SHEDPEVKFN WYVDGVEVHN AKTKPREEQY
NSTYRVVSVL TVLHQDWLNG KEYKCKVSNK ALPAPIEKTI SKAKGQPREP
QVYTLPPSRD ELTKNQVSLT CLVKGFYPSD IAVEWESNGQ PENNYKTPP
VLDSDGSEFFL YSKLTVDKSR WQQGNVFSCS VMHEALHNHY TQKSLSLSPG
K

Fig. 23. Amino acid sequences of adalimumab. Underlines show CDRs.

Table 8. Putative peptides having C-terminal tyrosine obtained from adalimumab digested with chymotrypsin. Underlines show sequences overlapping with CDRs.

Position	Sequence
<i>From light chain</i>	
1–32	DIQMTQESPSSLSASVGDRVITIC <u>CRASQGIRNY</u>
149–173	KVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTY
72–86	TLTISSLQPEDVATY
37–49	QKPGKAPKLLI <u>Y</u>
174–186	SLSSTLTLSKADY
187–192	EKHKVY
92–96	<u>NRAPY</u>
88–91	<u>CQRY</u>
<i>From heavy chain</i>	
324–353	KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY
131–153	PLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY
283–300	VDGVEVHNAKTKPREEQY
185–202	SLSSVVTVPSSSLGTQTY
81–94	LQMNSLRAEDTAVY
428–440	SCSVMHEALHNHY
69–80	TISRDNAKNSLY
175–184	PAVLQSSGLY
386–395	ESNGQPENNY
102–110	<u>LSTASSLDY</u>
54–60	<u>NSGHIDY</u>
318–323	LNGKEY
96–101	CA <u>KVSY</u>
301–304	NSTY
30–32	DDY
410–411	LY

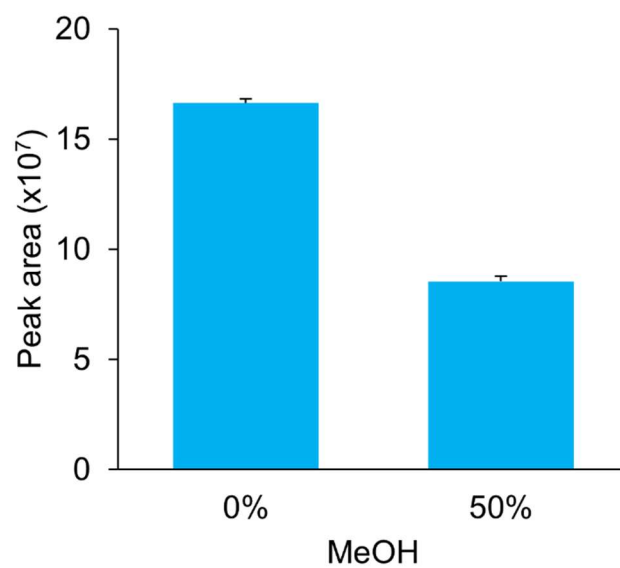


Fig. 24. Effect of organic solvent on the detection sensitivity. Ten micromolar of Gly-Thr-Trp-Tyr was injected into the flow injection system whose mobile phase was 50 mM acetate buffer (pH 5.0) only or acetate buffer containing 50% methanol (MeOH). Data are represented as means + SD ($n = 3$).

König 反応による C(cm)AKVSY の検出

まず、サロゲートペプチド C(cm)AKVSY が König 反応により検出が可能であるか検証した。C(cm)AKVSY をクロラミン T 及びピリジン・バルビツール酸溶液と反応させたときに得られた色素の吸収及び蛍光スペクトルの形状および極大波長は、CN⁻の場合と一致した (Figs. 25A and 25B)。また、C(cm)AKVSY とクロラミン T の反応液から CNCI が検出された (Fig. 25C)。以上より、C(cm)AKVSY の蛍光検出は、クロル化反応による C(cm)AKVSY からの CN⁻の生成と、それに引き続く CN⁻の König 反応による検出という、DA やグルタチオンの場合と同様のメカニズムであることが分かった。

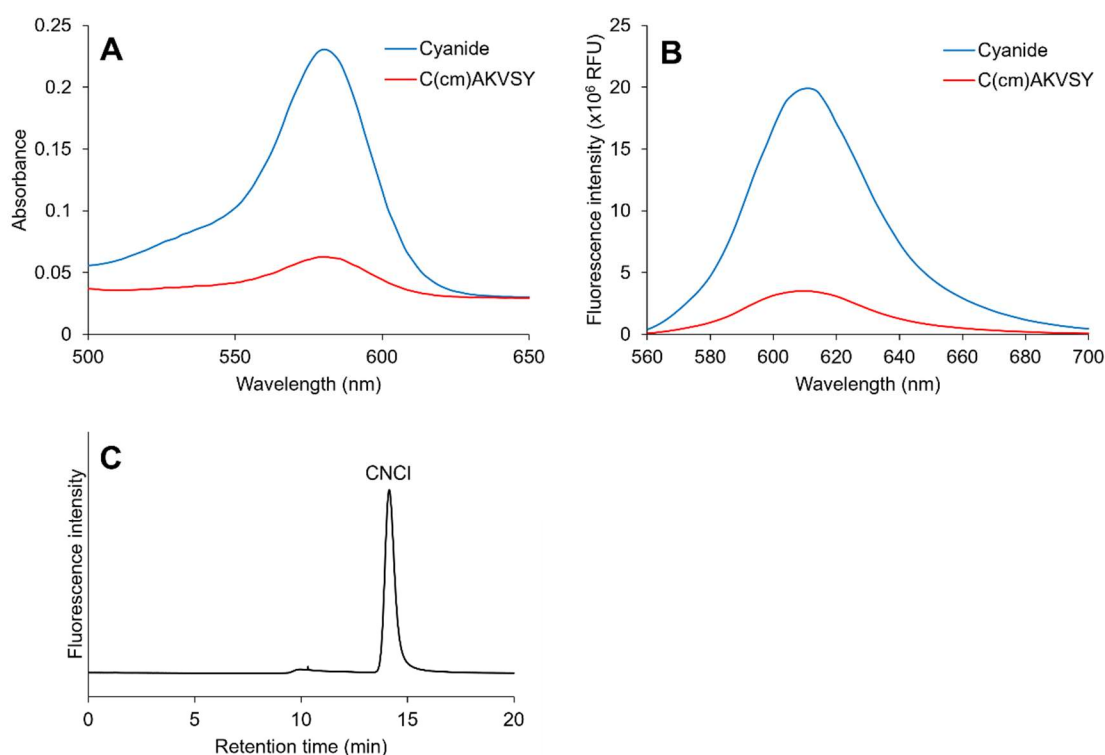


Fig. 25. C(cm)AKVSY also undergoes the König reaction. (A) Absorbance and (B) fluorescence emission spectra of the derivatized compound from C(cm)AKVSY (red line) and cyanide (blue line). Excitation wavelength was 540 nm. (C) Chromatogram of cyanogen chloride obtained from C(cm)AKVSY.

ポストカラム蛍光 HPLC 法による C(cm)AKVSY 分析条件の検討

カラムに Scherzo SW-C18 (3 μ m, 150 x 4.6 mm i.d.), 移動相に 100 mM 酢酸緩衝液 (pH 5.0) / メタノール (88/12, v/v) を用いると, C(cm)AKVSY は 30.4 分に溶出することが分かった (Fig. 26A). また, アダリムマブのキモトリプシン消化物においても 30.4 分にピークが得られた (Fig. 26B). C(cm)AKVSY の合成品をスパイクすると 30.4 分のピークが大きくなったこと及び試料調製時に DTT 及び IAA を添加しなかった消化物については 30.4 分にピークがみられなかったことから (Figs. 26C and 26D), アダリムマブ消化物においてみられた 30.4 分のピークは C(cm)AKVSY 由来であることが分かった.

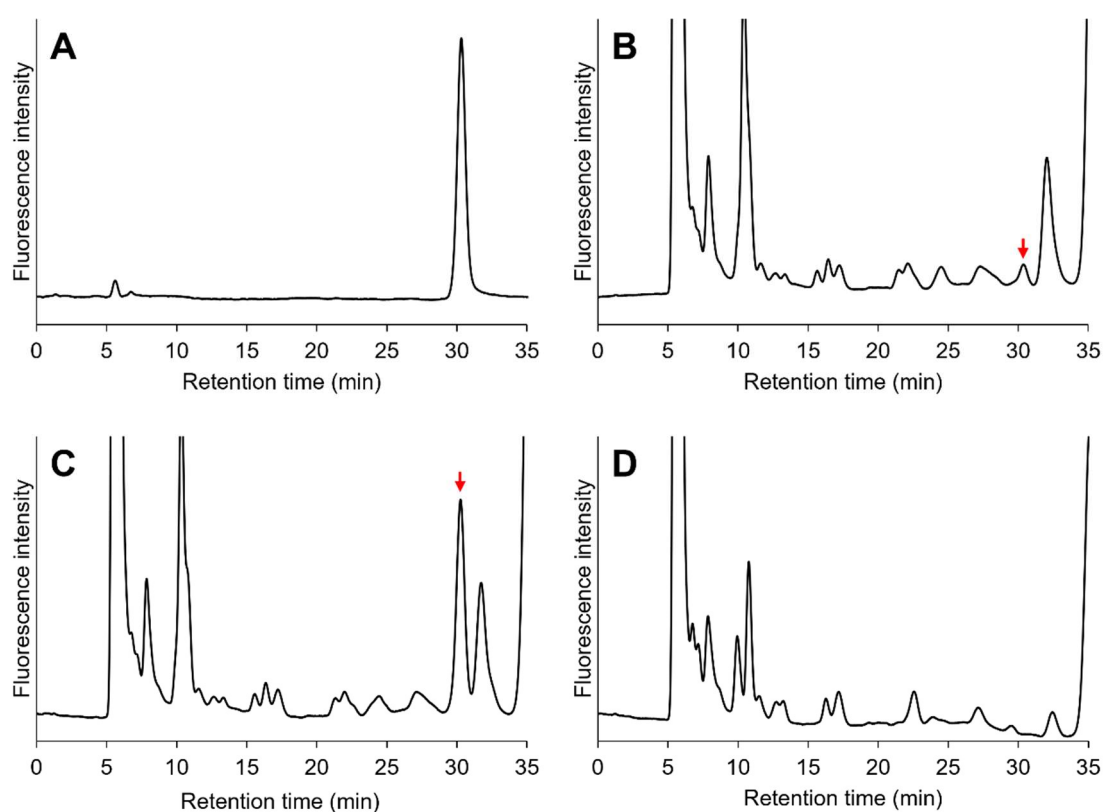


Fig. 26. Chromatograms of C(cm)AKVSY and adalimumab digested by chymotrypsin. (A) 1 μ M C(cm)AKVSY standard solution. Adalimumab unspiked (B) and spiked (C) with C(cm)AKVSY standard. Red arrows indicate the peaks of C(cm)AKVSY. (D) Adalimumab not treated with DTT and IAA.

分析法バリデーション

本条件で C(cm)AKVSY を分析した際の LOD 及び LOQ はそれぞれ 4.17 nM 及び 12.6 nM であり, これらから換算されるアダリムマブの LOD 及び LOQ は 0.31 µg/mL 及び 0.94 µg/mL であった (Table 9). LC-MS/MS を用いたサロゲートペプチド法によるアダリムマブ定量法として報告されている LOQ が 1 µg/mL であったことから⁴⁸, 本法の方が感度の点で優れていることが分かった. また, 本法の直線性はアダリムマブ 5–50 µg の範囲で確認した (決定係数 0.9955). 分析単位内の真度及び精度は下端の 5 µg で 127.1%及び 2.94%, 上端の 50 µg で 101.6%及び 10.3%であった. 分析単位間の真度及び精度は下端の 5 µg で 121.8%及び 5.71%, 上端の 50 µg で 101.8%及び 6.98%であった (Table 10). 以上の結果から, 本法は高感度な手法であり, かつ信頼できる手法であることが示された. ただ, 50 µg アダリムマブを用いた際の分析単位内精度がやや大きかった. これは, 抗体の変性からキモトリプシンによる消化, DTT によるジスルフィド結合の切断, IAA によるチオール基のアルキル化, スピンカラムによるペプチドの精製に至るまでの一連の煩雑な前処理の結果, サンプル間のばらつきがやや大きくなってしまったことが原因と考えられた. この点は適当な内部標準物質を使う等の工夫により改善できると考えられた.

Table 9. LOD and LOQ of the present method.

Compound	LOD	LOQ
C(cm)AKVSY	4.17 nM	12.6 nM
As adalimumab	0.31 µg/mL	0.94 µg/mL

Table 10. Accuracy and precision of the present method.

Content (µg)	Intra-day assay (<i>n</i> = 3)		Inter-day assay (<i>n</i> = 6)	
	Accuracy (% of target)	Precision (%RSD)	Accuracy (% of target)	Precision (%RSD)
5	127.1	2.94	121.8	5.71
50	101.6	10.3	101.8	6.98

ヒュミラ®製剤中アダリムマブ定量への応用

本法の応用として、ヒュミラ®製剤に含まれている有効成分アダリムマブの定量を行った。20 mg/0.2 mL の規格のものを用いたところ、本法による定量値は 22.5 mg/0.2 mL と良好な一致を示した。25 μ g のアダリムマブを含むように調製したアダリムマブ試薬及びヒュミラ®製剤のクロマトグラムを Fig. 27 に示す。ヒュミラ®製剤中のアダリムマブ定量法としては 280 nm の吸光度測定が規定されているが、本法はアダリムマブ特異的なペプチドを検出・定量しているため、より特異的な手法となっている。

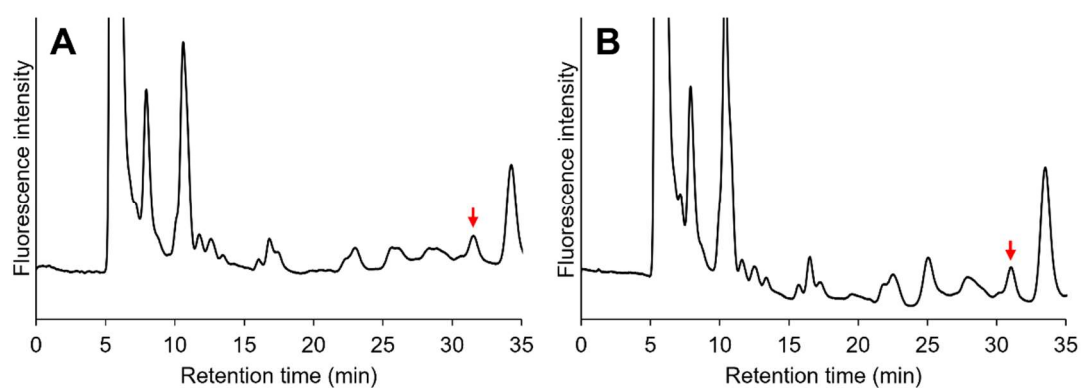


Fig. 27. Chromatograms of adalimumab reagent and Humira® digested by chymotrypsin. (A) 25 μ g of adalimumab. (B) Diluted Humira® drug product containing 25 μ g of adalimumab. Red arrows indicate the peaks of C(cm)AKVSY.

総 括

本研究では、クロル化剤の1つであるクロラミン T によりアミノ酸の1つである Gly が CN⁻に分解され、CN⁻の検出法である König 反応により検出できることに端緒を開き、この König 反応を利用することで LC-MS よりも簡便な生体由来物質の高感度分析法の開発を試みた。特に、ピリジン及びバルビツール酸を用いた König 反応では蛍光色素が生成するため、高感度な分析法の確立が期待された。さらに、König 反応を HPLC のポストカラムで起こすことにより、簡便かつ再現性良く分析対象化合物を蛍光誘導体化できる。

まず、Gly 以外のアミノ酸では、Ser, Thr, Tyr, His 及び Trp が König 反応により検出可能であることが分かった。これらのアミノ酸は Gly 同様、アミノ基のジクロル化とそれに引き続く側鎖のプロトン脱離により最終的に CN⁻に分解されることが推定された。すなわち、そのような反応が進行するか否かが König 反応により検出可否を決定づけるものと考えられた。

次に、Tyr の類縁化合物であり、神経伝達物質の1つである DA が König 反応により検出可能であることを見出した。DA とクロラミン T 及びピリジン・バルビツール酸溶液の反応混合液の分光特性と DA とクロラミン T の反応混合液からの CN⁻及び CNCl の検出から、DA の蛍光検出は確かに König 反応によるものであることが確かめられた。さらに、確立した HPLC メソッドのバリデーション結果から、König 反応による DA の定量感度は、報告されている LC-MS を用いた細胞内 DA 定量法よりも高感度であることが分かった。また、他のカテコールアミンである L-ドパ及び NE も König 反応により検出可能であることが分かり、その他カテコールアミンの分析への応用も期待される。

続いて、Gly を C 末端にもつトリペプチドで、細胞内の重要な抗酸化物質であるグルタチオンも König 反応により検出可能であることを見出した。グルタチオンの一般的な定量法として DTNB を用いた比色法があるが、チオール基に着目した手法のため GSH 以外のチオールが試料中に混在していると定量値に影響を与える恐れがあること、遊離チオールをもたない GSSG は直接定量できないこと、比色法であることから感度があまり高くないことといった欠点がある。本研究にて確立したグルタチオンの分析メソッドは、クロマトグラフィーを用いて GSH 及び GSSG 特異的にかつ同時に定量でき、DTNB 法よりも高感度であった。さらに、一部の LC-MS 法よりも感度の点で凌駕することも分かった。

さらに、抗体医薬品であるアダリムマブの分析にも König 反応が応用できることが分かった。アダリムマブをキモトリプシンで消化することにより C 末端に Tyr をもつペプチドを生成することで König 反応による検出が可能になった。特に、アダリムマブ特異的な配列をもつサロゲートペプチドを分析対象化合物とすることでアダリムマブ特異的な分析法を確立することができた。その感度も、既に報告されている LC-MS/MS 法よりも高感度であることが分かった。

本研究により, König 反応はシアン関連イオンのみならず, 生体由来有機化合物である DA, GSH, GSSG, アダリムマブの分析にも応用できることが分かり, König 反応の汎用性の高さを示した. 本法は蛍光法を採用していることから感度の面では LC-MS 法に匹敵や凌駕する一方, 装置自体や維持のコストが安価であることや感度維持のための煩雑なメンテナンスが不要という簡便性の点で LC-MS 法よりも優位な手法であると考えられた. クロル化反応により CN に分解できれば, 他の有機化合物の分析への応用も期待される. 特に, König 反応がアダリムマブ分析に適用できたことは, 通常 LC-MS/MS を用いて行うサロゲートペプチド法による抗体医薬品の定量が König 反応を用いた蛍光 HPLC 法により可能になりうることを示している. アダリムマブ以外の抗体医薬品及び血清といった生体マトリックスを用いた検討を行うことで, 抗体医薬品の特異的かつ簡便な分析法の構築が期待される.

参考文献

1. M. O. Baker, R. Foster, B. Post and T. Hiatt, *Analytical Chemistry*, 1955, **27**, 448-449.
2. P. Lundquist, H. Rosling and B. Sörbo, *Clinical Chemistry*, 1985, **31**, 591-595.
3. J. L. Lambert, J. Ramasamy and J. V. Paukstelis, *Analytical Chemistry*, 1975, **47**, 916-918.
4. 水質基準に関する省令の規定に基づき厚生労働大臣が定める方法（厚生労働省告示第 261 号）.
5. 清涼飲料水等の規格基準の一部改正に係る試験法について（食安発 1222 第 4 号）.
6. T. Toida, S. Tanabe and T. Imanari, *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 1981, **29**, 3763-3764.
7. T. Toida, T. Togawa, S. Tanabe and T. Imanari, *Journal of Chromatography B*, 1984, **308**, 133-141.
8. R. Mochizuki, K. Higashi, Y. Okamoto, H. Abe, H. Iwase and T. Toida, *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 2019, **67**, 884-887.
9. C. Na and T. M. Olson, *Environmental Science & Technology*, 2006, **40**, 1469-1477.
10. S. C. Daubner, T. Le and S. Wang, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2011, **508**, 1-12.
11. J. D. Berke, *Nature Neuroscience*, 2018, **21**, 787-793.
12. D. T. Dexter and P. Jenner, *Free Radical Biology and Medicine*, 2013, **62**, 132-144.
13. P. Belujon and A. A. Grace, *International Journal of Neuropsychopharmacology*, 2017, **20**, 1036-1046.
14. J. Kesby, D. Eyles, J. McGrath and J. Scott, *Translational Psychiatry*, 2018, **8**, 30.
15. Q. Zhang and M. Gong, *Journal of Chromatography A*, 2016, **1450**, 112-120.
16. C. Muzzi, E. Bertocci, L. Terzuoli, B. Porcelli, I. Ciari, R. Pagani and R. Guerranti, *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2008, **62**, 253-258.
17. E. Rozet, R. Morello, F. Lecomte, G. B. Martin, P. Chiap, J. Crommen, K.-S. Boos and P. Hubert, *Journal of Chromatography B*, 2006, **844**, 251-260.
18. L. Chen, X. Zhu, J. Shen and W. Zhang, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2016, **408**, 4987-4994.
19. X. S. Li, S. Li and G. Kellermann, *Talanta*, 2016, **159**, 238-247.
20. F. Huang, J. Li, H.-l. Shi, T.-t. Wang, W. Muhtar, M. Du, B.-b. Zhang, H. Wu, L. Yang and Z.-b. Hu, *Journal of Neuroscience Methods*, 2014, **229**, 8-14.
21. D. Zhang, L. Wu, D. S. Chow, V. H. Tam and D. R. Rios, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2016, **117**, 227-231.
22. M. A. Fotopoulou and P. C. Ioannou, *Analytica Chimica Acta*, 2002, **462**, 179-185.
23. M. Saraji and A. Shahvar, *Analytical Methods*, 2016, **8**, 830-839.

24. T. Kanamori, T. Funatsu and M. Tsunoda, *Analyst*, 2016, **141**, 2568-2573.
25. B. M. Fonseca, M. Rodrigues, A. C. Cristóvão, D. Gonçalves, A. Fortuna, L. Bernardino, A. Falcão and G. Alves, *Journal of Chromatography B*, 2017, **1049**, 51-59.
26. X. Wang, Y. Ma, X. Yao, J. Wang and M. Yin, *RSC Advances*, 2013, **3**, 24605-24611.
27. V. Carrera, E. Sabater, E. Vilanova and M. A. Sogorb, *Journal of Chromatography B*, 2007, **847**, 88-94.
28. A. Kanthasamy, E. Maduh, R. Peoples, J. Borowitz and G. Isom, *Toxicology and Applied Pharmacology*, 1991, **110**, 275-282.
29. I. Liguori, G. Russo, F. Curcio, G. Bulli, L. Aran, D. Della-Morte, G. Gargiulo, G. Testa, F. Cacciatore and D. Bonaduce, *Clinical Interventions in Aging*, 2018, **13**, 757.
30. J. D. Hayes, A. T. Dinkova-Kostova and K. D. Tew, *Cancer Cell*, 2020, **38**, 167-197.
31. B. K. Barlow, D. W. Lee, D. A. Cory-Slechta and L. A. Opanashuk, *Neurotoxicology*, 2005, **26**, 63-75.
32. K. Jomova and M. Valko, *Toxicology*, 2011, **283**, 65-87.
33. G. K. Balendiran, R. Dabur and D. Fraser, *Cell Biochemistry and Function: Cellular biochemistry and its modulation by active agents or disease*, 2004, **22**, 343-352.
34. M. A. Baker, G. J. Cerniglia and A. Zaman, *Analytical Biochemistry*, 1990, **190**, 360-365.
35. G. L. Ellman, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 1959, **82**, 70-77.
36. A. K. Sakhi, R. Blomhoff and T. E. Gundersen, *Journal of Chromatography A*, 2007, **1142**, 178-184.
37. L.-P. Yap, H. Sancheti, M. D. Ybanez, J. Garcia, E. Cadenas and D. Han, *Methods in Enzymology*, 2010, **473**, 137-147.
38. D. T. Harwood, A. J. Kettle, S. Brennan and C. C. Winterbourn, *Journal of Chromatography B*, 2009, **877**, 3393-3399.
39. T. Moore, A. Le, A.-K. Niemi, T. Kwan, K. Cusmano-Ozog, G. M. Enns and T. M. Cowan, *Journal of Chromatography B*, 2013, **929**, 51-55.
40. D. Carroll, D. Howard, H. Zhu, C. M. Paumi, M. Vore, S. Bondada, Y. Liang, C. Wang and D. K. S. Clair, *Free Radical Biology and Medicine*, 2016, **97**, 85-94.
41. H. Liu, F. Xu, Y. Gao, Y. Pang, C. Xie and C. Jiang, *Analytical Chemistry*, 2020, **92**, 8810-8818.
42. Y.-F. Zhang, Y. Wang, K.-R. Zhang, H.-M. Lei, Y.-B. Tang and L. Zhu, *Journal of Chromatography B*, 2020, **1148**, 122145.
43. B. Cardinali, G. Lunardi, E. Millo, A. Armirotti, G. Damonte, A. Profumo, S. Gori, G. Iacono, A. Levaggi and L. Del Mastro, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2014, **406**, 4557-4561.
44. B. D. Hock, L. K. Stamp, M. W. Hayman, P. E. Keating, E. T. Helms and M. L. Barclay,

- Therapeutic Drug Monitoring*, 2016, **38**, 32-41.
45. I. Suárez, A. Salmerón-García, J. Cabeza, L. F. Capitán-Vallvey and N. Navas, *Journal of Chromatography B*, 2016, **1032**, 155-164.
 46. C. Ji, N. Sadagopan, Y. Zhang and C. Lepsy, *Analytical Chemistry*, 2009, **81**, 9321-9328.
 47. R. Legeron, F. Xuereb, S. Chaignepain, A.-P. Gadeau, S. Claverol, J.-W. Dupuy, S. Djabarouti, T. Couffinhal, J.-M. Schmitter and D. Breilh, *Journal of Chromatography B*, 2017, **1070**, 43-53.
 48. T. Willeman, J.-F. Jourdil, E. Gautier-Veyret, B. Bonaz and F. Stanke-Labesque, *Analytica Chimica Acta*, 2019, **1067**, 63-70.
 49. W.-s. Huang, W.-q. Li, X. Yu, M.-z. Xue, Y.-l. Yuan, C. Chen, Y.-l. Wu, J.-h. Yu and X.-x. Diao, *Journal of Chromatography B*, 2024, **1234**, 123991.
 50. 独立行政法人医薬品医療機器総合機構. ヒュミラ皮下注 40mg 審査報告書. https://www.pmda.go.jp/drugs/2008/P200800019/10015900_22000AMX01598_A100_3.pdf (アクセス日 : 2024 年 7 月 11 日).
 51. H. Rusche, E. Marrani, F. Real-Fernandez, R. Ponti, F. Terzani, I. Maccora, O. Monasson, M. V. Mastrolia, E. Peroni and I. Pagnini, *Scientific Reports*, 2021, **11**, 16393.

論文目録

本学位論文は下記の発表論文による。

1. R. Mochizuki, Y. Ogra, Determination of intracellular dopamine by liquid chromatography–fluorescence detection with post-column derivatization using the König reaction, *Journal of Chromatography B*, 2024, **1232**, 123956.
2. R. Mochizuki, A. Kobayashi, H. Takayama, T. Toida, Y. Ogra, Simultaneous determination of intracellular reduced and oxidized glutathiones by the König reaction, *Analytical Methods*, 2023, **15**, 3426-3431.

審査委員

本学位論文の審査は千葉大学大学院薬学研究院で指名された下記の審査委員により行われた。

主査	千葉大学大学院教授（薬学研究院）	博士（薬学）	上原知也
副査	千葉大学大学院客員教授（薬学研究院）	博士（薬学）	小林弥生
副査	千葉大学大学院准教授（薬学研究院）	博士（薬学）	佐藤洋美