

学会創立20周年記念特集

HPLC-蛍光検出による生体分子の高感度定量法の開発と応用研究

福島 健

1996年に、クロマトグラフィー科学会奨励賞を戴いた。そのタイトルは「生体内 D-アミノ酸の高感度分離分析法の開発」であった。当時、学会の要旨などに、「蛍光試薬 4-fluoro-7-nitro-2,1,3-benzoxadiazole (NBD-F) を用いて D,L-アミノ酸を蛍光誘導体化した後、Pirkle 型キラル固定相である Sumichiral OA-2500(S) を装着した HPLC を使用することで、NBD-D,L-アミノ酸の光学分割[1]が良好に達成された」というフレーズをよく使用していた。この HPLC 法によって、哺乳類生体内からの D-アミノ酸の高感度蛍光検出が可能となり、ラット脳松果体における D-アスパラギン酸の高濃度局在などの発見[2]に役立った。こうした蛍光試薬による誘導体化反応と、適するキラル固定相を活用する方法論により、ラットやヒト血清中の微量 D-乳酸の検出・定量も可能であり[3,4]、糖尿病患者での変動解析を行うことができた[5]。

このように、哺乳類生体内における D-アミノ酸に代表される生体分子の光学異性体が示す生理機能に当時から関心があったが、その一方で、筆者は、様々な蛍光試薬を用いることで、幾つかの生理活性物質、例えば、カンナビノイド受容体アゴニストであるアナンドアミド[6,7]や、ナトリウム利尿作用を有するビタミン E 代謝物 γ -CEHC [8-10]、生理活性ペプチド法[11]などの HPLC-高感度蛍光定量の開発も行い、クロマトグラフィーシンポジウムや同科学会議で発表してきた。

1999年に Snyder ら (John Hopkins University) のグループによりセリンラセマーゼが発見され、2000年以降になると、脳内 D-セリンが特に注目されるようになった。D-セリンは NMDA 受容体のコ・アゴニストとして機能することから、D-セリンの生合成酵素であるセリンラセマーゼおよび代謝酵素である D-アミノ酸酸化酵素 (DAAO) とともに生物学および創薬科学などの研究分野で注目されている。D-セリンが関わる疾患として、統合失調症の発症が挙げられる。筆者は、2003年に橋本教授 (千葉大・医) との共同研究で、統合

失調症患者血清中での D-セリン濃度の減少を見出した[12]。この研究で行ったヒト患者血清中 D-セリン定量も上記の方法論を活用した。

2003-4 年頃から、中枢神経系にて機能する生体分子に的を絞って研究を行うことにした。筆者が最初に着目したのは、NMDA 受容体のグリシン結合部位にアンタゴニストとして機能するキヌレン酸である。キヌレン酸は、亜鉛イオンとの錯体形成による発蛍光が知られていたため、この発蛍光錯体形成を検出に用いて、カラムスイッチング HPLC システムを構築した。この HPLC 法では、蛍光誘導体化の工程がなく、ラット血漿[13]やヒト血清[14,15]、ラット脳ホモジネート[16]などの生体試料へ適用した際に、大きな妨害ピークが出現せず、キヌレン酸の高感度蛍光定量が可能であった。この HPLC 法により、統合失調症モデルラット血漿中での濃度上昇が見出され[13]、また、ラット脳マイクロダイアリシスサンプル中のキヌレン酸変動解析も可能であった[17]。現在、これを活用し、他の脳内分子との相互の関係解明を目指している。

キヌレン酸の前駆物質である L-キヌレニンの蛍光定量法[18,19]、およびその光学異性体である D-キヌレニン定量法の開発も行うことができた[20]。D-アミノ酸の一つである D-キヌレニンの定量法も上記方法論を用いることで、容易に開発できた。同時期に、病態モデルラット[21,22]やヒト患者[23,24]での血漿または血清中アミノ酸変動解析を HPLC-蛍光検出法で行い、その成果を本学会で発表した。最近、新たに開発した HPLC-電気化学検出用の誘導体化試薬 (NPCA) によるモノアミン (MA) 定量法[25]を用いて、ラット尿中への MA 排泄量を検討したところ、興味深いことに、D-キヌレニン投与後、一過性のセロトニン排泄量上昇が確認された[26,27]。

1996年の受賞以降、新たに得られた成果を本学会で発表してきた。筆者の所属する薬学は 6 年制学部となり、分析化学分野としては、医療現場で実際に役立つ、実用性のあるクロ

マトグラフィーの開発研究が、より一層重要視されると思われる。今後も本学会が最新のクロマトグラフィー研究情報の提供、有益な意見交換、交流の場として発展することを期待している。

謝辞

今回、本学会との関わりや自身の研究について執筆の機会を与えて頂きましたクロマトグラフィー科学会記念特集号企画関係の諸先生方に深く感謝いたします。また、これまでの研究を遂行するにあたり、多くのご指導、ご助言を賜りました武蔵野大学薬学研究所教授（東京大学名誉教授）今井一洋先生、東京大学大学院薬学系研究科准教授 三田智文先生、静岡県立大学薬学部教授 豊岡利正先生に感謝いたします。

文献

- [1] Fukushima, T. ; Kato, M. et al. *Biomed. Chromatogr.* **1995**, 9, 10-17.
- [2] Imai, K. ; Fukushima, T. et al. *Biomed. Chromatogr.* **1995**, 9, 106-109.
- [3] Ichihara, H. ; Fukushima, T. et al. *Anal. Biochem.* **1999**, 269, 379-385.
- [4] 第5回クロマトグラフィーシンポジウム（兵庫）1998年, 要旨集 pp. 132-133.
- [5] Hasegawa, H. ; Fukushima, T. et al. *Anal. Bioanal. Chem.* **2003**, 377, 886-891.
- [6] Arai, Y. ; Fukushima, T. et al. *Biomed. Chromatogr.* **2000**, 14, 118-124.
- [7] 第6回クロマトグラフィーシンポジウム（金沢）1999年, 要旨集 pp. 218-219.
- [8] Hattori, A. ; Fukushima, T. et al. *Anal. Biochem.* **2000**, 281, 209-215.
- [9] 第10回クロマトグラフィー科学会議（東京）1999年, 要旨集 pp. 390-391.
- [10] 第11回クロマトグラフィー科学会議（京都）2000年, 要旨集 pp. 340-341.
- [11] Kajiro, T. ; Fukushima, T. et al. *Anal. Biochem.* **2001**, 297, 52-59.
- [12] Hashimoto, K. ; Fukushima, T. et al. *Arch. Gen. Psychiatry* **2003**, 60, 572-576.
- [13] Mitsuhashi, S. ; Fukushima, T. et al. *Anal. Chim. Acta* **2006**, 562, 36-43.
- [14] Fukushima, T. ; Mitsuhashi, S. et al. *Clin. Chim. Acta* **2007**, 377, 174-178.
- [15] 第13回クロマトグラフィーシンポジウム（東京）2006年, 要旨集 pp. 6-7.
- [16] Fukushima, T. ; Mitsuhashi, S. et al. *Biomed. Chromatogr.* **2007**, 21, 514-519.
- [17] Tomiya, M. ; Fukushima, T. et al. *Biomed. Chromatogr.* **2010**, in press.
- [18] Mitsuhashi, S. ; Fukushima, T. et al. *Anal. Chim. Acta* **2007**, 584, 315-321.
- [19] 第17回クロマトグラフィー科学会議（仙台）2006年, 要旨集 pp.127-128.
- [20] Mitsuhashi, S.; Fukushima, T. et al. *Anal. Chim. Acta* **2007**, 587, 60-66.
- [21] Tomiya, M. ; Fukushima, T. et al. *Biomed. Chromatogr.* **2006**, 20, 628-633.
- [22] 第16回クロマトグラフィー科学会議（岐阜）2005年, 要旨集 pp. 91-92.
- [23] Tomiya, M. ; Fukushima, T. et al. *Clin.Chim. Acta* **2007**, 20, 628-633.
- [24] 第17回クロマトグラフィー科学会議（仙台）2006年, 要旨集 pp. 145-146.
- [25] Sasaki, T. ; Fukushima, T. et al. *Biomed. Chromatogr.* **2008**, 22, 888-899.
- [26] Sasaki, T. ; Fukushima, T. et al. *Chirality* **2009**, in press.
- [27] 第20回クロマトグラフィー科学会議（東京）2009年, 要旨集 pp. 124-125.