

腎機能診断を目指したキラルアミノ酸の多次元 LC 一斉計測法開発

九州大学薬学研究院 助教 石井 千晴

1. 研究背景

慢性腎臓病は世界有病率 9%を超え、患者 QOL の向上のみならず予防や早期診断が肝要な加齢性疾患である。しかし、現行の腎機能マーカー（クレアチニン、シスタチン C 等）は早期診断に課題を有し、人々の健康寿命延伸および迅速な治療介入のため鋭敏な診断指標の開発が切望されている。近年、光学識別分離分析技術の進歩により、D-セリン（D-Ser）など数種の D-アミノ酸含量がヒトを含む哺乳類の血中で腎機能低下に伴い増加することが示された^[1-3]。従って様々なアミノ酸のキラル識別分析による新規診断指標探索が期待されているが、D-アミノ酸の内在性含量は極めて微量であり、多様な共存成分によって定量妨害を受けやすく、正確な計測が困難な場合が多い。このような背景から、高い検出感度と選択性を兼備したキラルアミノ酸の網羅的計測法の開発と利用が切望されていた。

2. 研究の目的

本申請研究の目的は、『クロマトグラフィーを駆使したキラルアミノ酸の高選択的計測法を開発し、様々なタンパク質構成アミノ酸の D/L 解析を通して慢性腎臓病における高感度な新規診断指標を探索すること』である。著者らはこれまでに複数の分離モードを組み合わせることで劇的な選択性向上を実現する多次元クロマトグラフィー技術（Fig. 1、二次元 LC-MS/MS 法）を独自に構築してきた^[4-6]。代表的なキラルアミノ酸を対象としてヒト血液や尿などの臨床検体に適用した結果、従来は共存成分の共溶出により正確な

定量が困難であった微量 D-アミノ酸について高感度精密定量を達成し、健常人と比較して腎機能低下にともない D 体含量が増加することを見出した。これらの結果から、著者らの独自技術である多次元クロマトグラフィー技術を駆使することで臨床検体における様々な内在性 D-アミノ酸の探索を推進し、より鋭敏な診断指標候補の発見に繋がると考えた。本研究ではこの二次元 LC-MS/MS 法の基盤技術を進化させ、様々なタンパク質構成アミノ酸を対象とする高選択的かつ網羅的キラル識別分析法を開発し、腎臓病患者血中におけるスクリーニングを行った。

3. 研究の方法

本研究では、逆相分離（一次元目）と光学分割（二次元目）およびタンデム型質量分析装置による検出を組み合わせた二次元 LC-MS/MS 一斉計測法を開発した（Fig. 1）。

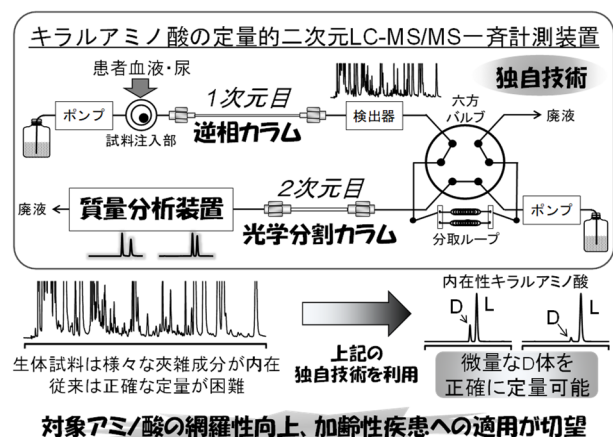


Fig. 1 二次元 LC-MS/MS 法の概略

近年「多次元分析法」は世界で急速に注目されているが、最終次元までターゲット化合物の定量性を維持した分析法は他の研究チームでは実現

できていない。これに対し、著者らはこれまで「定量的多次元クロマトグラフ」を実用化するために様々な基盤技術を構築してきた(特許 4980740 号、6296382 号、US-9266826 等)。これらの技術を駆使することで、一次元目では目的アミノ酸の画分のみを定量性を確保して高精度で自動分取し、妨害成分を大幅に排除する。一次元目で対象アミノ酸分取画分に混入した成分については、二次元目でのクロマトグラフィー分離に加えて検出部にタンデム型質量分析装置による質量フィルター(SRM モード)を用いることで対象化合物と識別し、キラルアミノ酸の高選択的な精密一斉定量を実現する。

4. 研究成果

4.1. 哺乳類血中キラルアミノ酸の正確な計測を可能とする二次元 LC-MS/MS 法の開発

分析対象としてアラニン (Ala)、アスパラギン酸 (Asp)、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)、プロリン (Pro)、Ser およびバリン (Val) の計 10 種を選択した。これらのアミノ酸は 4-Fluoro-7-nitro-2,1,3-benzoxadiazole (NBD-F) を用いてプレカラム誘導体化し、NBD-アミノ酸の全自動二次元 LC-MS/MS 法を構築するため、各次元の分離・検出条件を精査した。その結果一次元目では、微粒子充填型マイクロ ODS カラム Singularity RP18 (1.0 x 500 mm) を固定相とし、0.05 % トリフルオロ酢酸を含む 10–30 % アセトニトリル水溶液 (30 μ L/min) を移動相として、約 270 分ですべての分析対象アミノ酸の相互分離および他の夾雑成分からの粗精製が可能であった。六方バルブの切替えにより分取した各アミノ酸画分を自動で二次元目へ導入した結果、オリジナル Pirkle 型セミマイクロ光学分割カラム Singularity CSP-001S (1.5 x 150 mm) を固定相とし、ギ酸を

含むアセトニトリルとメタノールの混液 (50/50 または 75/25、200 μ L/min) を移動相として、30 分以内に各アミノ酸の良好な光学分割が可能であった ($R_s \geq 1.38$)。三連四重極型質量分析装置 (Triple Quad 5500, Positive ion mode) による検出条件を検討した結果、すべての NBD-アミノ酸が十分な感度で検出され、一度のインジェクション操作でキラルアミノ酸の高選択的一斉分析を可能とする二次元 LC-MS/MS 法を構築可能であった。本分析法を用いて標品アミノ酸およびヒト血中キラルアミノ酸の分析を行った結果、定量性、再現性および真度について良好な値が得られた。

ヒト血中キラルアミノ酸の分析結果を Fig. 2 に示す。

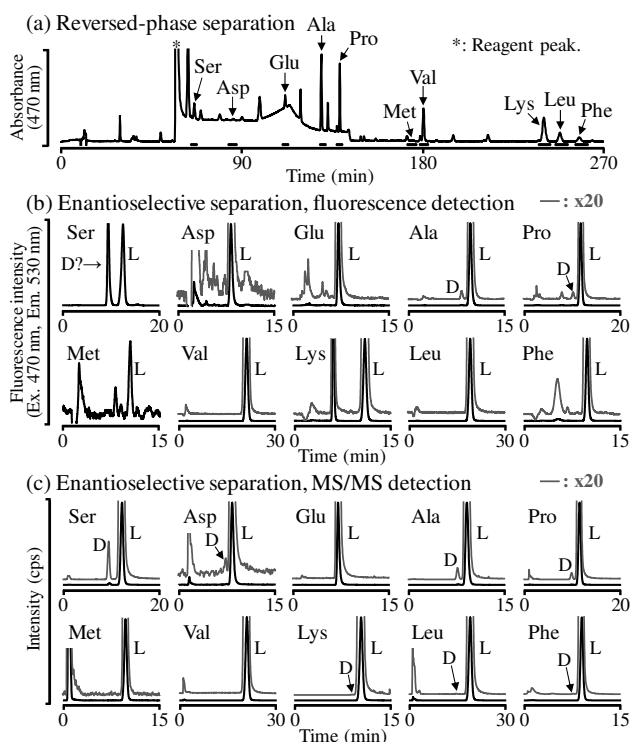


Fig. 2 二次元 LC-MS/MS 法を用いる健康人血中キラルアミノ酸の逆相分離 (a) および光学分割 (b: 蛍光検出、c: 質量分析)

一次元目において対象アミノ酸を夾雑成分から逆相分離し (Fig. 2a)、各アミノ酸画分を二次元

目へ導入して光学分割を行った。従来の二次元LC法と同様に蛍光検出器を用いて分析を行った場合、キラルアミノ酸の近傍に溶出する夾雑成分が認められ、アミノ酸の正確な一斉分析は困難であった (Fig. 2b)。

これに対して二次元 LC-MS/MS 法を用いて分析を行った結果、夾雑成分による定量妨害を殆ど受けずに内在性キラルアミノ酸の精密な一斉分析が可能であった (Fig. 2c)。

Ala、Pro および Ser については健常人の血中で明瞭な D 体のピークが認められ %D 値 ($D/(D+L) \times 100$) は 0.5、0.3、1.7 %であった。また、Asp、Leu、Lys および Phe についても D 体の溶出時間に定量下限以下のピークが確認された。以上のように本二次元 LC-MS/MS システムは生体試料中におけるキラルアミノ酸の全自動精密定量に適用可能であり、幅広いアミノ酸の含量制御機構や疾患との関連解析を推進可能であると考えられる。

4.2. 健常人における血中 D-アミノ酸の含量変動

血中キラルアミノ酸濃度を用いる慢性腎臓病患者の腎機能評価に先立ち、分析対象アミノ酸 10 種について健常人における含量変動を解析した。検体としては、20 代の健常男性 5 名を対象として異なる 4 日間、一晩絶食後に血液（臨床現場で一般的に採血が行われる朝食前の血液）を採取した。得られた血漿について除タンパク操作および NBD-F による誘導体化を行い、二次元 LC-MS/MS 法を用いて分析した。

すべての試料に比較的多量の D 体が認められた Ala、Pro および Ser について、D 体と L 体の血漿中濃度および %D 値を Fig. 3 に示す。

D 体の血漿中濃度は Ala が 0.54–2.90 nmol/mL、Pro が 0.26–1.25 nmol/mL、Ser が 1.51–2.58 nmol/mL であり、L 体の濃度は Ala が 200.82–

467.44 nmol/mL、Pro が 121.60–346.52 nmol/mL、Ser が 62.20–150.62 nmol/mL であった。また、Ala、Pro および Ser の %D 値はそれぞれ 0.1–0.9 %、0.1–0.8 % および 1.2–2.9 % であった。

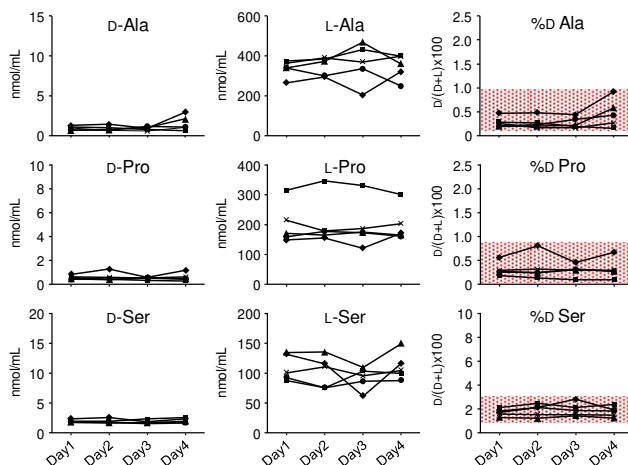


Fig. 3 健常人における血中キラルアミノ酸含量の日間変動

その他の対象アミノ酸についても同様の解析を行った結果、すべての D-アミノ酸含量が一定の低濃度範囲内に制御されており、D 体、L 体の絶対量および %D 値ともに顕著な日間変動は認められなかった。従って、健常人の血漿に内在するこれらのアミノ酸鏡像異性体含量は、同時時間帯においてそれぞれ一定の範囲内に制御されていると考えられる。

4.3. キラルアミノ酸分析を利用する腎機能評価

血中キラルアミノ酸分析により腎機能評価が可能か検討するため、開発した二次元 LC-MS/MS 法を用いて慢性腎臓病患者の血漿試料を測定した。患者検体としては、腎障害の程度が異なる 3 群（軽度、中等度、重度）から 5 名ずつ計 15 検体を選択した。その結果、腎機能の低下に伴う血中含量の増加がすでに報告されている D-Ser、D-Ala および D-Pro について今回の検討でも矛盾しない結果が得られ、二次元 LC-MS/MS 法が腎臓病患者の血中キラルアミノ酸分析に適用可能である

ことが示された。加えて本研究では Glu、Leu および Phe についても患者群と健常人群で%D 値の有意な差があることが初めて示された。特に Glu は健常人のすべての検体において D 体のピークが定量下限以下であったのに対して、殆どの患者検体では定量可能であり、Fig. 4 に示すように中等度の腎障害患者群において健常人群との有意な含量差が確認された ($P<0.05$)。また、Phe についてはすべての患者検体において D 体の明瞭なピークが検出され、軽度腎障害の患者群でも健常人群とのあいだに有意な%D 値の増加が認められた ($P<0.05$)。

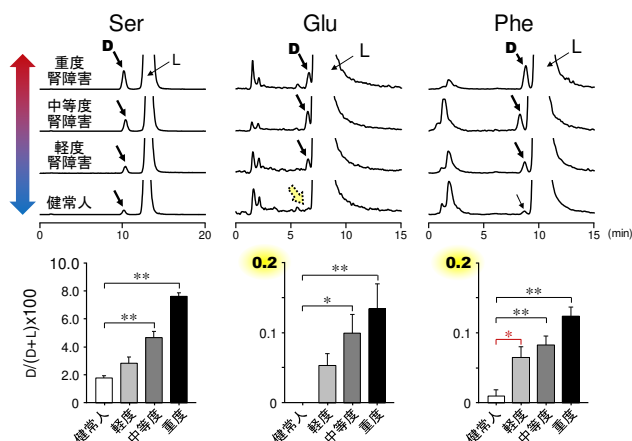


Fig. 4 腎機能低下に伴う超微量な血中 D-アミノ酸の含量変化

5. 結論

本研究で開発した二次元 LC-MS/MS 法は極めて高い選択性を有しており、夾雑成分の存在する血中において従来は選択性不足により解析困難であった微量 D-アミノ酸についても精密定量を達成した。これらの D-アミノ酸は腎機能診断における鋭敏な指標として利用価値が高いと考えられ、今後は検体数を増加させたさらなる検討および臨床応用が期待される。

6. 参考文献

- [1] T. Kimura, A. Hesaka, Y. Isaka; D-Amino acids and kidney diseases, Clin. Exp. Nephrol., **24**, (2020) 404–410.
- [2] Y. Nagata, R. Masui, T. Akino; The presence of free D-serine, D-alanine and D-proline in human plasma, Experientia, **48**, (1992) 986–988.
- [3] T. Kimura, K. Hamase, Y. Miyoshi, R. Yamamoto, K. Yasuda, M. Mita, H. Rakugi, T. Hayashi, Y. Isaka; Chiral amino acid metabolomics for novel biomarker screening in the prognosis of chronic kidney disease, Sci. Rep., **6**, (2016) 26137.
- [4] C. Ishii, T. Akita, M. Mita, T. Ide, K. Hamase; Development of an online two-dimensional high-performance liquid chromatographic system in combination with tandem mass spectrometric detection for enantiomeric analysis of free amino acids in human physiological fluid, J. Chromatogr. A, **1570**, (2018) 91–98.
- [5] C. Ishii, N. Takizawa, T. Akita, M. Mita, T. Ide, R. Konno, K. Hamase; Offline two-dimensional LC-MS/MS determination of tryptophan enantiomers in mammalian urine and alteration of their amounts in D-amino acid oxidase deficient mice, J. Pharm. Biomed. Anal., **219**, (2022) 114919.
- [6] C. Ishii, T. Akita, M. Mita, R. Konno, K. Hamase; Chiral amino acid analysis in the plasma of B6DAO^{-/-} mice lacking D-amino acid oxidase activity, Chromatography, **44**, (2023) 39–43.

7. 本研究にかかわる成果発表等

- ・ C. Ishii, T. Akita, T. Kimura, S. Sakai, M. Mita, T. Ide, Y. Isaka, K. Hamase; Evaluation of individual variation of D-amino acids in human plasma by a two-dimensional LC-MS/MS system and application to the early diagnosis of chronic kidney

- disease, *Anal. Chem.*, **96**, (2024) 4876–4883.
- ・ C. Ishii, K. Hamase; Development of two-dimensional LC-MS/MS methods for highly-selective analysis of chiral amino acids and the evaluation of their intrinsic amounts in mammals and stereoinversion in proteins, *Chromatography*, **45**, (2024) 11–21.
 - ・ C. Ishii, T. Akita, Y. Nakagawa, M. Mita, K. Hamase; Development of Pirkle-type chiral stationary phases for the enantioselective and comprehensive HPLC analysis of all proteinogenic amino acids, *Chromatography*, **47**, (2026) 113–117.
 - ・ 山部真弓, 石井千晴, 清水有紀子, 三田真史, 秋田健行, 岡村匡史, 浜瀬健司, ロイシン連鎖異性体を対象とする二次元キラル HPLC 法の開発と D-アミノ酸酸化酵素欠損に伴う哺乳類血漿・尿中における含量変化解析, 第 31 回クロマトグラフィーシンポジウム, 那覇, 2024 年 6 月 5 日.
 - ・ C. Ishii, M. Yamabe, Y. Shimizu, T. Akita, M. Mita, T. Okamura, K. Hamase, Development of a two-dimensional chiral HPLC system for the simultaneous analysis of leucine chain isomers and their alteration in the plasma and urine of D-amino acid oxidase deficient rats, The 6th International Conference of D-Amino Acid Research, Kanazawa, Japan, August 21st, 2024.
 - ・ 石井千晴, 山部真弓, 清水有紀子, 秋田健行, 三田真史, 岡村匡史, 浜瀬健司, 二次元キラル HPLC 法を用いるロイシン連鎖異性体の一斉識別定量と D-アミノ酸酸化酵素欠損によるラット血漿および尿中含量の変化, 第 36 回バイオメディカル分析科学シンポジウム, 静岡, 2024 年 8 月 29 日.
 - ・ 井上裕貴, 道清祐輝, 石井千晴, 根岸栄一, 井本啓史, 三田真史, 池田昌隆, 井手友美, 秋田健行, 浜瀬健司, NBD-トリプトファンの高感度蛍光分析を可能とする光リアクター搭載高分離能三次元 HPLC 法開発, 日本薬学会第 145 年会, 福岡, 2025 年 3 月 28 日.
 - ・ 中村拓人, 石井千晴, 永田優凜, 小田京香, 三田真史, 秋田健行, 浜瀬健司, アキラル-キラルタンデムカラムを用いるイソロイシン立体異性体の一斉分離法開発, 第 32 回クロマトグラフィーシンポジウム, 長崎, 2025 年 5 月 14 日.
 - ・ 石井千晴, 秋田健行, 三田真史, 池田昌隆, 木村友則, 浜瀬健司, 内在性キラルアミノ酸の多次元 LC 分析法開発と鋭敏な腎機能検査マーカーの探索, 第 68 回日本腎臓学会学術総会, 横浜, 2025 年 6 月 22 日.
 - ・ 中村拓人, 石井千晴, 永田優凜, 三田真史, 秋田健行, 浜瀬健司, アキラル-キラルタンデムカラムを用いるイソロイシン立体異性体の一斉分離法開発と二次元 LC によるマウス・ラット尿中含量の解析, 第 22 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, 北九州, 2025 年 8 月 22 日.
 - ・ 石井千晴, 二次元 LC-MS/MS を用いる内在性微量 D-アミノ酸の分析法開発および疾患における早期診断マーカーのスクリーニング, 第 22 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, 北九州, 2025 年 8 月 22 日.
 - ・ 石井千晴, 生体・食品に存在するキラルアミノ酸の高選択的分析法開発, 日本分析化学会第 74 年会, 札幌, 2025 年 9 月 25 日.
- ## 8. 謝辞
- 本研究は島津科学技術振興財団の助成金によるご支援のもと遂行したものであり、財団のご関係者の皆様に厚く御礼申し上げます。