

学位論文

「HPLC-蛍光検出法を用いた
メチルアルギニン類高感度定量法の開発および
統合失調症患者血漿への応用」

野中聖子

TABLE OF CONTENTS

1. 要約	6
2. HPLC-蛍光検出法を用いたメチルアルギニン類の高感度定量法の開発	11
2.1. 背景	11
2.2. 実験	15
2.2.1. 試薬および機器	15
2.2.2. 生体サンプル	16
2.2.3. 除タンパク	16
2.2.4. 固相抽出法	16
2.2.5. NBD 蛍光誘導体化	17
2.2.6. HPLC 条件	19
2.2.7. バリデーション	21
2.2.7.1. キャリブレーション	21
2.2.7.2. 絶対回収率	21
2.2.7.3. 検出限界	21
2.2.7.4. 日内変動	21
2.2.7.5. 日間変動	21
2.3. 結果および考察	22
2.3.1. スピнкаラムを用いた固相抽出法	22
2.3.1.1. 担体の選択	22
2.3.1.2. MonoSpin SCX を用いた前処理条件の最適化	25
2.3.1.3. 除タンパク操作	28
2.3.1.1. 処理効率	30
2.3.2. NBD-F を用いた蛍光誘導体化	30
2.3.3. HPLC 条件検討	33
2.3.3.1. カラムオープン温度	33
2.3.3.2. 流速	36
2.3.3.3. 移動相条件検討	39
2.3.3.4. 内標準物質	41
2.3.3.5. HPLC 注入前フィルターろ過	43
2.3.4. クロマトグラム	43

2.3.5. 線形性.....	46
2.3.6. 絶対回収率, 検出限界, 真度および精度.....	49
2.3.7. 健常成人における L-NMMA, ADMA, SDMA および L-Arginine の血漿中濃度.....	51
2.4. まとめと考察.....	53
3. 統合失調症患者血漿への応用.....	54
3.1. 背景.....	54
3.2. 実験.....	57
3.2.1. 生体サンプル.....	57
3.2.2. 分析.....	57
3.2.3. 統計解析.....	57
3.3. 結果.....	58
3.3.1. 代表的なクロマトグラム.....	58
3.3.2. 統合失調症患者におけるメチルアルギニン類濃度 (全体比較).....	61
3.3.3. 統合失調症患者におけるメチルアルギニン類濃度 (男女別解析).....	64
3.3.4. 統合失調症患者におけるメチルアルギニン類濃度 (年代別解析).....	67
3.3.5. 統合失調症患者におけるメチルアルギニン類濃度 (薬剤投与量別解析).....	71
3.3.6. 統合失調症患者におけるメチルアルギニン類濃度 (循環器疾患の罹病歴に基づ く比較).....	74
3.4. まとめと考察.....	78
4. 総括.....	81
5. 論文および学会発表の実績.....	82
5.1. 査読付き論文.....	82
5.2. 参考論文.....	82
5.3. 学会発表.....	82
6. 参考文献.....	84
7. 謝辞.....	

略語

本文中では以下に示す略語を使用した。

略号, 用語	省略していない表現または定義
ADMA	N^G, N^G -dimethyl-L-arginine
L-Arginine/(ADMA+L-NMMA)	L-Arginine 濃度と(ADMA+L-NMMA)濃度の比
(ADMA+L-NMMA)/SDMA	(ADMA+L-NMMA)濃度と SDMA 濃度の比
AQC	6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl carbamate
C18	オクタデシルシリル化シリカゲル (ODS)
cGMP	Cyclic guanosine monophosphate
DDAH	dimethylarginine dimethylaminohydrolase
DSM-IV-TR	Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, 4th Edition, Text Revision
Em	emission : 放射光 (蛍光)
eNOS	endothelial NOS
Ex	excitation : 励起光
FL	fluorescence
HPLC	high performance liquid chromatography : 高速液体クロマトグラフィー
iNOS	inducible NOS
LC-MS	HPLC-マススペクトロメトリー
L-NMMA	N^G monomethyl-L-arginine
NBD-F	4-fluoro-7-nitro-2,1,3-benzoxadiazole
NDA	naphthalene-2,3-dicarboxaldehyde
NMDA	N -methyl-D-aspartate
nNOS	neuronal NOS
NO	nitric oxide : 一酸化窒素
NOS	nitric oxide synthase : 一酸化窒素合成酵素
N-PLA	N^G -propyl-L-arginine

OPA	<i>o</i> -phthalaldehyde
略号, 用語	省略していない表現または定義
PITC	phenyl isothiocyanate
SDMA	$N^G, N^{G'}$ -dimethyl-L-arginine
S/N 比	Signal-to-noise ratio

1. 要約

生体内に存在するメチルアルギニン類は、 N^G -Monomethyl-L-arginine (L-NMMA), N^G , $N^G,N^{G\omega}$ -Dimethyl-L-arginine (ADMA)および $N^G,N^{G\omega}$ -Dimethyl-L-arginine (SDMA)の3種類が存在している (Figure 1)。

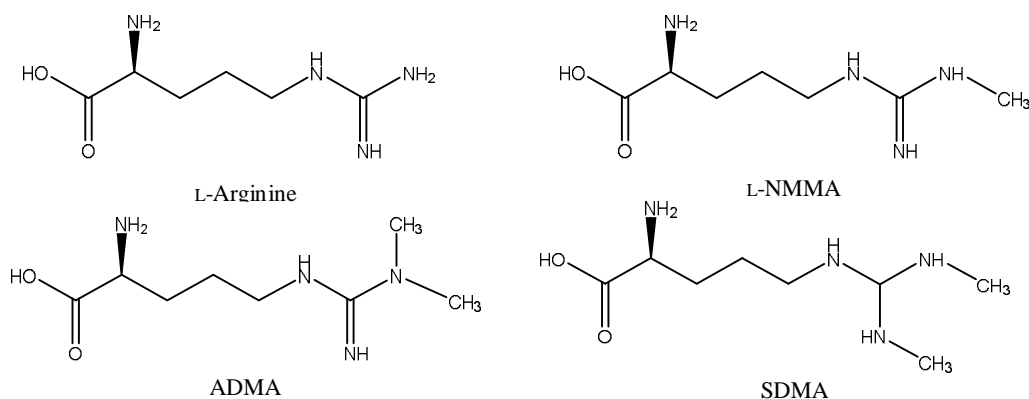


Figure 1. L-Arginine, L-NMMA, ADMAおよびSDMAの化学構造式

これらのメチルアルギニン類は、蛋白質の L-Arginine 残基が protein arginine *N*-methyltransferase (PRMT) によりメチル化され、その後加水分解されることにより遊離型として生成し、生体内循環系に放出される。L-NMMA および ADMA は、全ての一酸化窒素合成酵素 (NOS) アイソフォームを阻害し、特に ADMA は L-NMMA と比べ存在量が多く、その濃度変動が NOS 活性に大きな影響を与えることが明らかにされている。また、SDMA は NOS 阻害作用を有していないが、NOS の基質である L-Arginine の細胞内取り込み機構を阻害するため、間接的に一酸化窒素 (NO) 産生を阻害する可能性が示唆されている。さらに、ADMA および L-NMMA は、主に dimethylarginine dimethylaminohydrolase (DDAH) によって代謝され、SDMA では腎排泄が主な代謝ルートである (Figure 2)。

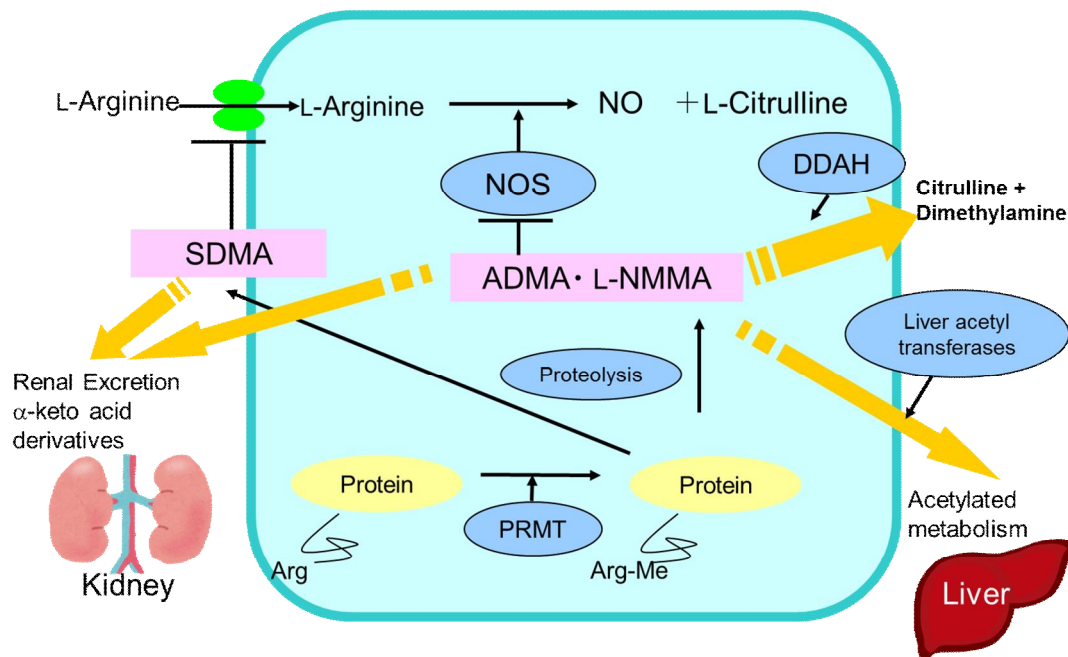


Figure 2. メチルアルギニン類の代謝およびNO合成阻害機構

これまでに、心臓、肝臓および腎臓などの循環器疾患や糖尿病などで血漿中メチルアルギニン類濃度が上昇することが報告されている。また近年では、酸化ストレスの亢進により血中ADMA濃度が上昇することも示唆されており、酸化ストレスがDDAH発現量に強く影響していることがその一因であると考えられている。

メチルアルギニン類は、疾患のバイオマーカーとしての利用が期待されており、これまで多くの定量法が報告されてきているが、固相抽出における煩雑な前処理過程や1サンプルあたりの測定時間が長いこと、また検出感度が低く3種のメチルアルギニン類を同時測定できない等の問題点があった。そこで私は、蛍光誘導体化試薬として4-fluoro-7-nitro-2,1,3-benzoxadiazole (NBD-F)を用い、問題点を改良して、3種のメチルアルギニン類を同時に測定可能な高感度HPLC蛍光検出法の開発を行ってきた [Nonaka S, et al. J Chromatogr A. 2005, Tsunoda M, Nonaka S, et al. Analyst. 2005]。

本研究では、遠心チューブ MonoSpin SCX (GL Sciences Inc.)を用いた簡便な前処理操作の導入および高い理論段数が期待されるモノリス型シリカカラム MonoClad C18-HS (150mm×3mm I.D., GL

Sciences Inc.)を新規に採用し、これまでに私が確立した定量法における前処理の簡略化および測定時間の短縮を試みた。また内標準物質として、生体外物質である *N*-Propyl-L-arginine (N-PLA)を用いて、より精度の高い分析法の確立を試みた。

新たな定量法では、50 μ L 血漿サンプルに等量の 1 μ M N-PLA および 2 倍量のメタノールを添加し、-80°C で 30 分放置し、除蛋白操作を行った。その後、Monospin SCX を用いた固相抽出により L-Arginine およびメチルアルギニン類を抽出し、-0.1 MPa にて 50 分間の減圧乾固を行った。乾燥したサンプルに 100 mM ホウ酸緩衝液(pH9.5)および 20 mM NBD-F を添加し、40°C において 3 分間蛍光誘導体化反応を行い、6% 酢酸を加えて反応を停止させた。その後、遠心およびフィルターろ過により不純物を取り除いた後、サンプル 10 μ L を HPLC にインジェクションし、MonoClad C18-HS にて分離を行い、蛍光検出(Ex: 470 nm/ Em: 530 nm)を行った。なお、L-Arginine の定量においては、NBD 化後のサンプルを 6% 酢酸により 10 倍に希釈し、同様に HPLC で測定した。

今回確立した方法は、L-NMMA, ADMA および SDMA について 10 μ L インジェクションあたり 75~3000 fmol (元の濃度として 0.01~200 μ M) , L-Arginine について 0.6~48 pmol (希釈前の濃度として 4.0~400 μ M) の範囲で相関係数 0.99 以上と良好な直線性を示した。検出限界は 3.75~9.0 fmol, 真度は 97~104% であり、日内変動および日間変動はそれぞれ 4.34~4.78% および 3.00~6.76% であった。さらに本測定法を用いて健常成人の血漿中の L-Arginine, L-NMMA, ADMA および SDMA 濃度を定量したところ、それぞれ 80.3 ± 11.8 , 0.04 ± 0.000 , 0.42 ± 0.003 および 0.51 ± 0.012 μ M であった (n=6)。

以上の結果より、HPLC を用いた短時間かつ簡便な L-Arginine およびメチルアルギニン類の測定法を確立することができた[Nonaka S, et al. J Sep Sci. 2014]。

近年では、統合失調症において、重要な神経伝達物質であるグルタミン酸および D-セリンの関与が報告されており、これらが作用する *N*-methyl-D-aspartate (NMDA)型グルタミン酸受容体の機能低下が統合失調症の発症にかかわっていることが示唆されている。神経系においては、グルタミン酸の NMDA 受容体刺激によってカルシウムが細胞内に流入し、カルシウムがカルモジュリンに結合することで NOS が活性化して NO の産生が誘導される。NO はシナプス間隙を逆行し、シナプス前終末における cGMP の産生を促すことから、NMDA-NO-cGMP 経路がグルタミン酸やドパミンなどの神

経伝達物質の放出を制御していることが明らかにされている。メチルアルギニン類は NOS 阻害作用を有していることから、統合失調症の病態発現に関連しているのではないかと考えた。

今回の研究で、私は新たに開発した分析法を用いて、薬物治療を受けている統合失調症患者血漿を試料として、ADMA, L-NMMA, SDMA および NO 供与体である L-Arginine 濃度を測定し、これまでの報告よりも広範な解析を試みた。

獨協医科大学より提供された、薬物治療中の統合失調症患者 101 名および健常者 63 名の血漿を用いて、今回確立した HPLC 分析法にて測定を行った。患者はすべて、薬物治療中で急性期にはなく、明らかに重篤な合併症はない DSM-IV-TR 診断^aによる組み入れ基準に基づいた統合失調症患者である。また対照群の血漿は、向精神薬の服用はなく、採血時点で精神疾患または重篤な身体疾患に罹患していない健常者より得られたものである。

今回得られた結果において、統合失調症患者血漿中の L-NMMA, ADMA および SDMA 濃度は、健常者と比べて有意な増加が認められた。また年代別に比較したところ、60 代以上の患者で同年代の対照群と比べて L-NMMA と ADMA 濃度の有意な増加が認められ、年代が上昇するにつれて血漿中メチルアルギニン類濃度の増加傾向がみられた。さらに、対照群の上限を超えるメチルアルギニン類濃度の増加が認められた患者についてその背景を調べたところ、身体症状は深刻な状態ではなく良くコントロールされているものの、糖尿病や高血圧、高脂血症などの疾患に罹病している患者が数名いたことが明らかになった。これまでの報告では、薬物未治療の統合失調症患者または最後の投薬から 3 ヶ月以上経過している統合失調症患者において ADMA 濃度の上昇が認められている[Das I, et al. 1996, Celik C, et al. 2011]。したがって、患者のメチルアルギニン類濃度の増加傾向は、統合失調症とともに、糖尿病や高血圧、高脂血症などの疾患の罹病歴が関係している可能性が考えられた。一方 Das らは、統計学的有意差を得ることができなかったものの、薬物治療によって統合失調症患者の ADMA 濃度が減少することを報告している。今回、60 代以上の患者以外では患者血漿中メチルアル

^a Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders (精神障害の診断と統計マニュアル) : アメリカ精神医学会による国際統一診断基準で、2000 年に出版された DSM-IV の「テキスト改訂版」

ギニン類濃度に有意差がみられなかったことから、薬剤投与により血漿中メチルアルギニン類濃度が減少する可能性も考えられた。

統合失調症患者の血漿中 L-Arginine 濃度はいずれの年代においても対照群と比べて高い傾向が認められた。また、NO の生体内利用率を示唆する L-Arginine 濃度と (ADMA+ L-NMMA) 濃度の比である L-Arginine/(ADMA+ L-NMMA) も同様に、対照群と比べて統合失調症患者で高い傾向がみられた。Das らは、薬物未治療の統合失調症患者では対照群と比べて NO 代謝物濃度は低いですが、薬物治療後には対照群と同程度であったと報告している。したがって、今回統合失調症患者でみられた血漿中 L-Arginine 濃度および L-Arginine/(ADMA+ L-NMMA) の増加傾向は、薬剤治療に起因している可能性があると考えられた。

以上のように、今回新たに確立した「HPLC-蛍光検出法を用いたメチルアルギニン類高感度定量法」は、統合失調症患者血漿に応用可能であることが実証された。本法は、他の疾患患者の血漿にも応用可能と考えられ、ADMA の他、L-NMMA、SDMA および L-Arginine の同時測定が可能であることから、疾患バイオマーカーとして期待されているメチルアルギニン類の定量法として、今後臨床の場で広く利用されることが期待される。

2. HPLC-蛍光検出法を用いたメチルアルギニン類の高感度定量法の開発

2.1. 背景

L-Arginine は生体利用性の高いアミノ酸であり, 5 種類の酵素によって代謝され, 一酸化窒素 (NO), 尿素, クレアチン, ポリアミン, アグマチンといった代謝物に変換される[1]。その中でも NO は L-Arginine から NO 合成酵素(NOS)によって生合成され, 生体内において血管拡張作用, 血小板凝固抑制作用などの重要な役割を果たしている[2]。NOS には血管内皮細胞で働く endothelial NOS (eNOS), 神経細胞に局在する neuronal NOS (nNOS), そして炎症時に誘導される inducible NOS (iNOS)の 3 種類が存在する[3]。その中でも eNOS は恒常的に血管拡張作用に関与しており, 動脈硬化や循環器疾患など様々な疾患においてその活性が有意に低下することが報告されている[4,5,6]。

1992 年, Vallance らの研究により, *in vivo* および *in vitro* において L-Arginine のメチル化誘導体である N^G -Monomethyl-L-arginine (L-NMMA) および N^G, N^G -Dimethyl-L-arginine (ADMA) が全ての NOS アイソフォームを阻害することが報告され, 特に ADMA は L-NMMA と比べ存在量が多く, その濃度変動が NOS 阻害に大きな影響を与えることが明らかになった[7,8]。これらのメチルアルギニン類は, 蛋白質の L-Arginine 残基が protein arginine *N*-methyltransferase (PRMT) によりメチル化され, その後加水分解されることにより遊離型として生成し, 生体内循環系に放出される[7]。これらのメチルアルギニン類はグアニジノ基のメチル化の違いにより 3 種類のアイソフォームが存在し, ADMA と L-NMMA は非対称な構造を持ち, $N^G, N^{G\alpha}$ -Dimethyl-L-arginine (SDMA) は対称な構造をしている

(Figure 1)。L-NMMA と ADMA は NOS 阻害作用の他, それ自身が内皮細胞を傷害して活性酸素を過剰に産生することにより, 内皮機能を低下させることも知られている[9]。また, SDMA は NOS 阻害作用を有していないが, L-Arginine の細胞内取り込み機構を阻害するため, 間接的に NO 産生を阻害するといわれている[10]。これまでに心臓[11], 肝臓[12,13], 腎臓[14]および糖尿病[15,16]などの循環器疾患で血漿中メチルアルギニン類濃度が上昇すると報告されている。さらに, 様々な疾患と ADMA との関連性について研究が行われた結果, 近年では酸化ストレスの亢進により ADMA 濃度が上昇することが示唆されている[17-19]。一方で, ADMA および SDMA と比べ更に低い濃度域でしか血漿中に存在しない L-NMMA については測定方法が限定され, 3 種メチルアルギニン類の濃度と疾患の関連性を解析した文献はほとんどない。したがって, これら 3 種類のメチルアルギニン類の同時分析は, 酸化ストレスや病態のメカニズム解明に有益であると考えられる。

これまでに電気泳動法[20], イオン交換クロマトグラフィー法[21], モノクローナル抗体分析法[22], 高速液体クロマトグラフィー (HPLC) -UV 検出法[23]および HPLC-電気化学検出法[24]などを用いたメチルアルギニン類分析法が開発されてきた。これらの分析法は, 血漿中に $1 \mu\text{M}$ 未満しか存在しないメチルアルギニン類を測定するためには, 感度や精度に問題があった。近年では, HPLC-マスマスペクトロメトリー法(LC-MS) [25-36], タンデム質量分析法(MS-MS) [37], キャピラリー電気泳動(CE)-MS法[38]およびキャピラリー電気泳動-レーザー蛍光検出法(CE-LIF) [39]などがメチルアルギニン類の分析法として用いられている。さらに, 超高速液体クロマトグラフィー(UHPLC)と MS を組み合わせた高感度分析法なども開発されている[30]。一方で, 経済性・汎用性等の観点において多くの実験施設に導入可能な分析方法として, 広く HPLC-蛍光検出法が用いられており, これまでに様々な臨床研究にも応用されている[40-43]。蛍光誘導体化試薬としては, *o*-phthalaldehyde (OPA) [44-56], naphthalene-2,3-dicarboxaldehyde (NDA) [57], 6-aminoquinolyl-*N*-hydroxysuccinimidyl carbamate (AQC) [58-60]および phenyl isothiocyanate (PITC) [61]などが用いられ, 特に OPA を用いた蛍光誘導体化法は最も古くから用いられている手法であり, 少しずつ改良されながらその感度・精度の向上, 測定時間短縮が試みられてきた。しかしながら, これまでに挙げた蛍光誘導体化法では, メチルアルギニン類を測定するには感度が不十分であることから, 多量の生体試料が必要とされてきた。L-NMMA は ADMA および SDMA と比べて半分以下の濃度でしか血漿中に存在せず, HPLC を用いた分析法では測定することができなかった。さらに蛍光誘導体化物質が不安定であるために再現性に劣り, ADMA と SDMA は構造の類似により分離が困難であったため, 実用的な 3 種の同時分析法が確立されていなかった。これらの問題点を改良するため, 私はこれまでに蛍光誘導体化試薬として 4-fluoro-7-nitro-2,1,3-benzoxadiazole (NBD-F) を用いて, メチルアルギニン類を測定する HPLC 蛍光検出法を開発してきた[62-64]。NBD-F は他の蛍光誘導体化試薬と比較して感度に優れ, 蛍光誘導体化後も室温で数日は安定であることから高精度な分析が可能である。また試薬の取り扱いも簡便であり, アセトニトリル溶液中で安定であることから, 蛍光誘導体化反応直前に用時調製する必要もない。これらのことから, 本研究においても NBD-F を蛍光誘導体化試薬として採用した。

血漿中にはメチルアルギニン類の他にも蛍光誘導体化物質と反応する物質が多く含まれていることから, 通常メチルアルギニン類を抽出するための前処理が必要となる。一連の操作の中で最も煩雑で時間を要するメチルアルギニン類の抽出に関しては, 主に陽イオン交換カートリッジを用いた吸引

ろ過法が採用されており、一部自動化などの改良はなされているものの[52]、10年以上同じ手法が用いられている。そこで我々は、近年 GL Sciences により開発された MonoSpin SCX を用い、簡便で高精度な新しい前処理方法を開発した。MonoSpin SCX は均一な連続孔を持つシリカモノリスを用いた前処理用のスピнкаラムで、すべての操作は遠心機による簡便な処理が可能であり、高い通液性により生体試料でも高速処理可能、微量サンプルでも希釈されずに回収可能という特徴を有している。

HPLC においては、測定時間の短縮のためにモノリス型シリカカラムを分離カラムとして採用した。モノリス型シリカカラムは、3次元ネットワーク上の骨格とその空隙が一体となった構造をしている (Figure 3) [65,66]。この流路と骨格の共連続構造のため、従来の分析法で用いられていたシリカ充填型カラム (Figure 4) と比べ、モノリス型シリカカラムは低圧送液が可能となり、高い分離能を維持したまま高流速での分離が可能となる。しかしながら、モノリス型シリカカラムの短所として、シリカカラムとその化学修飾の過程を含むカラム調製の煩雑さ、厳密な再現性を得ることの困難さ、および空隙率が大きく試料の負荷量と保持用量が小さいことなどが挙げられる。これまでに我々は理論段数の比較的高い Chromolith™ (Merck) [67]を用いたメチルアルギニン類の分析法の確立を試みた。が、当時の技術ではシリカ充填型カラムの性能に達するモノリス型シリカカラムは存在せず、測定対象は血漿中 ADMA のみに限定された[64]。近年開発された MonoClad C18-HS (GL Sciences) は、シリカ充填型カラムにおける 5 μm 粒子相当の圧力で 3 μm 粒子相当の理論段数を得ることができ、高流速分析による時間短縮が可能である。このカラムは、NBD-F を用いたアミノ酸のハイスルーブット分析法にも採用されており[68]、カラム長を短くしてさらに流速を上げても良好に分離・分析可能であることが報告されている[69]。そこで、本法においては MonoClad C18-HS (150mm \times 3mm I.D., GL Sciences Inc.)を分離カラムとして採用した。

このように本研究においては新たな技術を採用し、メチルアルギニン類測定を最適化することで、一連のプロセスの簡便化、検出の高感度化および測定時間の短縮を試みた。さらに、L-Arginine/ADMA 比が NO バイオアベイラビリティの指標として有用である可能性[70]が示唆されていることから、メチルアルギニン類の 100 倍以上の濃度で存在する L-Arginine も分析対象とした。

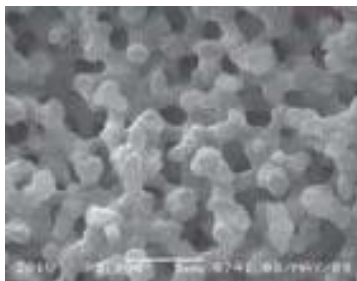


Figure 3. モノリス型シリカカラムの構造 (引用 : GLサイエンスHP)



Figure 4. 従来のシリカ充填型カラムの構造 (引用 : Imtakt HP)

2.2. 実験

2.2.1. 試薬および機器

L-Arginine, L-NMMA, ADMA および SDMA は Sigma (St. Louis, MO, USA)より入手した。L-Arginine, L-NMMA, ADMA および SDMA は 10 mM 塩酸 (Wako Pure Chemicals, Osaka, Japan) に溶解して 5 mM に調製し, 4°C にて保存した。内標準物質である *N*-propyl-L-Arginine (N-PLA) は Cayman Chemical (Ann Arbor, MI, USA)より購入した。N-PLA はエタノール (Wako Pure Chemicals) に溶解して 5 mM に調製し, -20°C で保存した。

リン酸水素二ナトリウムおよび 28% アンモニア溶液は Wako Pure Chemicals (Osaka, Japan)より購入した。固相抽出に用いる 10 mM リン酸緩衝液は, リン酸水素二ナトリウムを純水 (Milli-Q reagent system, Nihon Millipore, Tokyo, Japan) に溶解し, 水酸化ナトリウムを添加し pH メーター HM-30R (TOA DKK, Tokyo, Japan) を用いて pH 7.0 に調整し, 4°C にて保存した。溶出液として 28%アンモニア : 水 : メタノール = 10 : 40 : 50 (v/v/v) を調製し, 同様に 4°C にて保存した。

3つの濃度レベルのキャリブレーションサンプル (低濃度 : 40 μ M L-Arginine + 0.2 μ M メチルアルギニン類, 中濃度 : 100 μ M L-Arginine + 0.5 μ M メチルアルギニン類, 高濃度 : 200 μ M L-Arginine + 1.0 μ M メチルアルギニン類) は, 保管していたそれぞれの標品溶液を 10mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) に溶解して調整した。また 5 mM N-PLA の標品溶液を 10mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) で希釈し, 内標準液 (1.0 μ M N-PLA) を調製した。

NBD-F および酢酸は Wako Pure Chemicals (Osaka, Japan)より購入した。アセトニトリル(HPLC grade) は Kanto Chemical (Tokyo, Japan)より入手した。20 mM NBD-F アセトニトリル溶液は-20°C にて保存した。ホウ酸は Kanto Chemical (Tokyo, Japan)より購入し, 6% 酢酸 (v/v) 溶液および 100 mM ホウ酸緩衝液 (pH9.0) は 4°C で保存した。

リン酸二水素ナトリウム・2水和物は Wako Pure Chemicals (Osaka, Japan)より購入し, 移動相用の 50 mM リン酸緩衝液(pH3.2)を調製した。テトラヒドロフラン(THF) は Wako Pure Chemicals (Osaka, Japan)より購入した。移動相 A として, 50 mM リン酸緩衝液(pH3.2):アセトニトリル:THF= 96:4: 0.04 (v/v/v)を調製した。移動相 B はアセトニトリル 100%とした。

2.2.2. 生体サンプル

分析法の検討やバリデーションに用いるためのヘパリン処理ヒトプール血漿は、COSMO BIO CO., LTD (Tokyo, Japan)より購入した。血漿サンプルは1 mL ずつ分注し、分析に供するまで-80°Cで冷凍保管した。さらに、確立した分析法を用いた測定を行うために、健常成人6名の血漿サンプルを獨協医科大学から入手し、同様に-80°Cで冷凍保管した。なお、本実験は獨協医科大学の倫理委員会による承認を取得済みである。

2.2.3. 除タンパク

-80°Cで冷凍保管していた血漿を室温にて融解し、除タンパク操作開始まで氷浴に静置した。50 μ L の血漿に100 μ L のメタノール(Wako Pure Chemicals, Osaka, Japan)および50 μ L の1 μ M N-PLA を添加し、10 秒間 Vortex Mixer VX 100 (Labnet International, Edison, NJ, USA)で攪拌した。その後-80°Cで30 分間放置した後、Micro Refrigerated Centrifuge KUBOTA 1920 with RA-48J rotor (KUBOTA, Tokyo, Japan) を用いて20,600 g (15,000 rpm), 4°Cで10 分間遠心した。その後、150 μ L の上清を10 mM リン酸緩衝液(pH7.0) 400 μ L に加え、10 秒間ボルテックスミキサーで攪拌した。さらに、Table-top centrifuge CIBITAN-R (Merck Millipore, Tokyo, Japan)ミニ遠心装置で10 秒間遠心し、チューブの壁面に飛散した液滴をチューブの底に集めてから、固相抽出操作に供した。なお、キャリブレーション用のサンプルとして、低濃度 (40 μ M Arginine + 0.2 μ M メチルアルギニン類)、中濃度 (100 μ M Arginine + 0.5 μ M メチルアルギニン類) および高濃度 (200 μ M Arginine + 1.0 μ M メチルアルギニン類) の3つの濃度域の標準液についても、血漿と同様に処理を行った。

2.2.4. 固相抽出法

Mono Spin SCX (GL Sciences, Saitama, Japan)に廃液チューブをセットし、平衡化操作として、メタノール300 μ L をアプライし、Micro Refrigerated Centrifuge で3,300 g (6,000 rpm)にて30 秒間の遠心を2 回繰り返した。なお、遠心後の廃液はその都度取り除いた。次に300 μ L のイオン交換水をアプライし、3,300 g にて30 秒間の遠心を2 回繰り返した。最後に300 μ L の10 mM リン酸緩衝液をアプライし、3,300g にて30 秒間の遠心を2 回繰り返した。吸着操作として、除タンパク後の上清を150 μ L を添加した10 mM リン酸緩衝液400 μ L をアプライし、3,300 g にて30 秒間遠心した。洗浄操作として、300 μ L のイオン交換水をアプライし、9,200 g (10,000 rpm)にて30 秒間の遠心を2 回繰り返した。Mono Spin SCX の廃液チューブを取り外し、回収チューブを取り付け、溶出操作として、28% アン

モニア:水:メタノール=10:40:50 (v/v/v) 100 μ L をアプライ後, 1 分間放置し, 9,200 g にて 1 分間遠心した。その後, 溶出液を Centrifugal concentrators VC-96N (TAITEC, Saitama, Japan) with Freeze Trap VA-800F (TAITEC)を用いて-0.1 MPa にて 50 分間の減圧乾固を行った。

2.2.5. NBD 蛍光誘導体化

液体が全て蒸発したことを確認したのち, 130 μ L の 100 mM ホウ酸緩衝液(pH 9.5)を添加し, ボルテックスミキサーで 10 秒間攪拌した。この溶液に 20 mM NBD-F アセトニトリル溶液を 30 μ L 添加し, ボルテックスミキサーで 10 秒間攪拌した後, 40°Cの Dry Thermo Unit DTU-2C (TAITEC, Saitama, Japan)で 3 分間インキュベートした後, 40 μ L の 6%酢酸を添加して反応を停止させた。NBD-F とアミノ酸の蛍光誘導体化反応を Figure 5 に示す。その後, 前処理由来の夾雑物質を取り除くために Micro Refrigerated Centrifuge で 20,600 g にて 10 分間遠心し, 上清を 0.2 μ m フィルター-Non-Sterile Millex-LG (Millipore, Bedford, MA, USA)を装着した 1 mL ツベルクリン用シリンジ(TERUMO, Tokyo, Japan)を用いてフィルターろ過したのち, 10 μ L を HPLC システムに注入した。L-Arginine を分析する際には, 誘導体化されたサンプルを 6%酢酸で 10 倍希釈し, 10 μ L を HPLC システムに注入した。

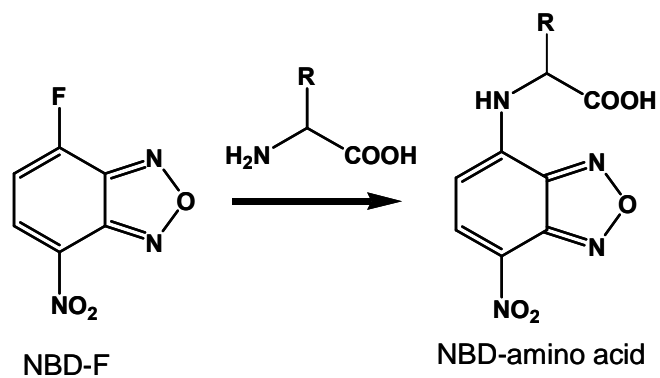


Figure 5. NBD-F とアミノ酸の蛍光誘導体化反応

2.2.6. HPLC 条件

クロマトグラフィーシステムは、液体クロマトグラフィー LC-20AT (Shimadzu, Kyoto, Japan), 脱気装置 DGU-20A 5R (Shimadzu), システムコントローラー SCL-6B (Shimadzu), オートインジェクター SIL-9A (Shimadzu), カラムオープン CTO-2A (Shimadzu), 蛍光検出器 FP-2025 plus (Jasco, Tokyo, Japan) およびインテグレーター 807-IT (Jasco) で構成した (Figure 6)。分離用カラムにはカートリッジ式のガードカラム (Intersil, C8-4 5 μ m, 10 x 3 mm., GL Sciences) を装着した Mono Clad C18-HS (150 x 3 mm i.d., GL Sciences, Tokyo, Japan) を用いた。移動相 A は 50mM リン酸緩衝液 (pH 3.2): アセトニトリル: THF = 96:4:0.04 (v/v/v) の混合液, 移動相 B はアセトニトリル 100% を用いた。グラジエントプログラムは, ①0613 分: 移動相 A 100%, ②13619.5 分: 移動相 A を線型的に 70% まで漸減, ③19.5624 分: 移動相 A 70%, と 3 段階でプログラムした。流速は 1.3 mL/min, カラムオープン温度は 45°C に設定した。蛍光検出器の励起波長および蛍光波長はそれぞれ 470 nm および 530 nm に設定した。

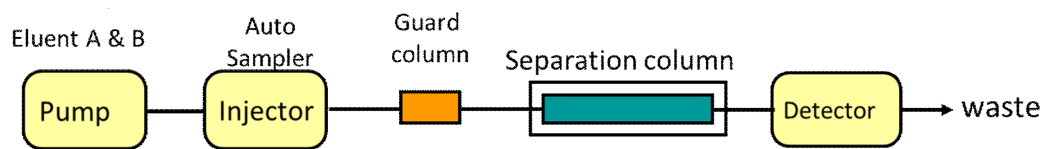


Figure 6. HPLCシステム

2.2.7. バリデーション

2.2.7.1. キャリブレーション

L-NMMA, ADMA および SDMA は 0.2, 0.5, 1.0 μM , また L-Arginine は 40, 100, 200 μM になるよう標準溶液を調製し, 生体試料と同様に除タンパクおよび固相抽出操作を行い, NBD 蛍光誘導体化した試料を測定し, 蛍光強度 (ピーク高さ) と濃度のキャリブレーション結果から数式を作成した。測定対象となる生体試料中のメチルアルギニン類の濃度は, 各メチルアルギニン類のキャリブレーション結果から算出した。

2.2.7.2. 絶対回収率

前処理操作によるメチルアルギニン類の絶対回収率 (未処理のものと比較) を求めた (N=3)。L-NMMA, ADMA および SDMA の溶液を 0.2, 0.5, 1.0 μM , L-Arginine の溶液を 40, 100, 200 μM の濃度となるよう調製し, 除タンパクおよび固相抽出後に NBD 蛍光誘導体化した試料を測定し, 相当濃度のメチルアルギニン類標品を前処理操作なしで NBD 化したものと蛍光強度 (ピーク高さ) を比較した。

2.2.7.3. 検出限界

検出限界はピークと測定時のノイズの signal-to-noise ratio (S/N 比) から求め, 値は S/N=3 とした。

2.2.7.4. 日内変動

L-NMMA, ADMA および SDMA の溶液を 0.2, 0.5, 1.0 μM , L-Arginine の溶液を 40, 100, 200 μM の濃度となるよう血漿に添加し, 除タンパクおよび固相抽出後に NBD 蛍光誘導体化した試料を, 1 日のうちに 5 回測定した。

2.2.7.5. 日間変動

L-NMMA, ADMA および SDMA の溶液を 0.2, 0.5, 1.0 μM , L-Arginine の溶液を 40, 100, 200 μM の濃度となるよう血漿に添加し, 除タンパクおよび固相抽出後に NBD 蛍光誘導体化した試料を, 日を変えて 6 回測定した。

2.3. 結果および考察

2.3.1. スピнкаラムを用いた固相抽出法

スピнкаラムである MonoSpin を用いた固相抽出法について、担体の選択、処理条件の最適化を実施した。さらに抽出効率の向上のため、固相抽出前の除タンパク操作についても検討した。

2.3.1.1. 担体の選択

固相抽出にはスピнкаラムである MonoSpin を用いた。これは均一な連続孔を持つシリカモノリスを用いた前処理用のスピнкаラムで、すべての操作は遠心機による簡便な処理が可能で、50 μ L 程度の微量サンプルでも希釈されずに回収可能である。MonoSpin の担体としては、弱陽イオン交換作用を有するカルボキシ基を担体とした MonoSpin CBA、強陽イオン交換作用を有するプロピルベンゼンスルホン酸を担体とした MonoSpin SCX ならびに強陽イオン交換作用と無極性相互作用を有する MonoSpin C18-CX の3種類で検討した (Figure 7)。

各担体の標準プロトコル^aに従い前処理の検討を行ったところ、MonoSpin CBA では、L-NMMA と ADMA の間に MonoSpin CBA 由来と考えられる夾雑ピークが存在することが明らかになった

(Figure 8)。また、MonoSpin SCX および MonoSpin C18-CX の回収率は、それぞれ 30~60% および 60~80% であり、MonoSpin SCX の方が回収率は良好であった (Table 1)。そこで担体としては MonoSpin SCX を用いることにし、さらに最適化を行った。

^a MonoSpin™ SCX 取扱説明書, MonoSpin™ CBA 取扱説明書, MonoSpin™ C18-CX 取扱説明書

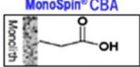
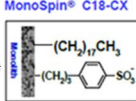
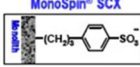
- MonoSpin CBA: 弱陽イオン交換モード 
 - MonoSpin C18-CX: 逆相モード(C18)と強陽イオン交換モード(SCX) 
 - MonoSpin SCX: 強陽イオン交換モード 
- 引用: GLサイエンスHP

Figure 7. 検討した担体の種類

Table 1. MonoSpin で処理したときの回収率 (%)

MonoSpin 担体	L-NMMA	ADMA	SDMA
CBA	70.7	77.1	68.2
C-18-CX	31.1	52.9	61.9
SCX	66.1	85.2	83.5

前処理なしの 25 μ M メチルアルギニン類標品に対する前処理後の各メチルアルギニン類のピーク高さの割合

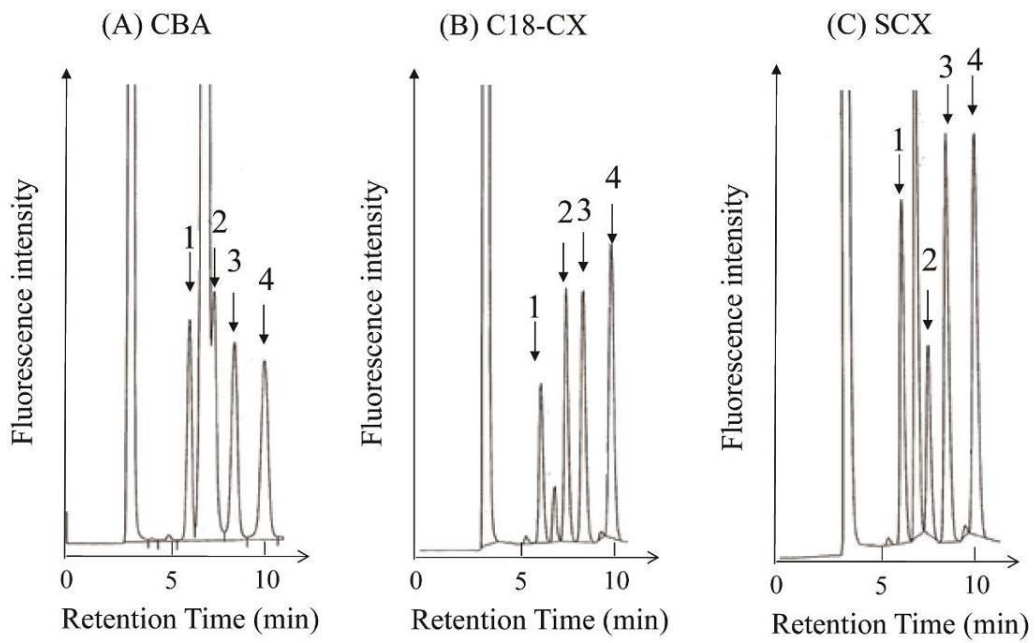


Figure 8. MonoSpin 担体の検討(CBA vs C18-CX vs SCX)

(1) L-NMMA, (2) Homoarginine, (3) ADMA, (4) SDMA (流速 : 1.5mL/min)

2.3.1.2. MonoSpin SCX を用いた前処理条件の最適化

MonoSpin SCX での回収率を 100% に近づけるため、前処理条件の最適化を行った。吸着および洗浄時の遠心速度を標準プロトコルの 9,200 g (10,000 rpm) から 3,300 g (6,000 rpm) に下げて通液時間を長くしたところ、メチルアルギニン類の回収率は 34~65% 改善した。さらに、用いる緩衝液の塩濃度が高すぎるために、塩基性物質がカラムに保持されずサンプルロード時や洗浄段階で溶出した可能性が考えられたことから、リン酸緩衝液濃度についても検討を行った。カラムのイオン交換能力を活かすために、リン酸緩衝液の濃度を標準プロトコルに提示されている 20mM から 10mM まで下げたところ、回収率はほぼ 100% になった。

またサンプル吸着時のリン酸緩衝液の pH 変動が回収率に与える影響について、pH 4.0, 7.0 (標準プロトコル), 9.0 で検討したところ、いずれの pH においてもメチルアルギニン類の回収率について大きな差は見られず (Table 2), 頑健性・再現性に優れていることが確認された。pH7.0 において、バックグラウンドノイズが最も小さかったことから、pH7.0 を選択した。

最適化された固相抽出条件を Figure 9 に、最適化後のクロマトグラムおよび回収率を Figure 10 および Table 3 に示す。

Table 2. Buffer の pH を変えて SCX で処理したときの回収率 (%)

MonoSpin 担体	L-NMMA	ADMA	SDMA
pH 4.0 (N=5)	120 ± 13.3	121 ± 10.8	118 ± 9.8
pH 7.0 (N=7)	109 ± 4.3	114 ± 4.3	114 ± 4.2
pH 9.0 (N=2)	112 ± 5.7	114 ± 5.6	114 ± 7.0

前処理なしの 25 μM メチルアルギニン類標品に対する前処理後の各メチルアルギニン類のピーク高さの割合

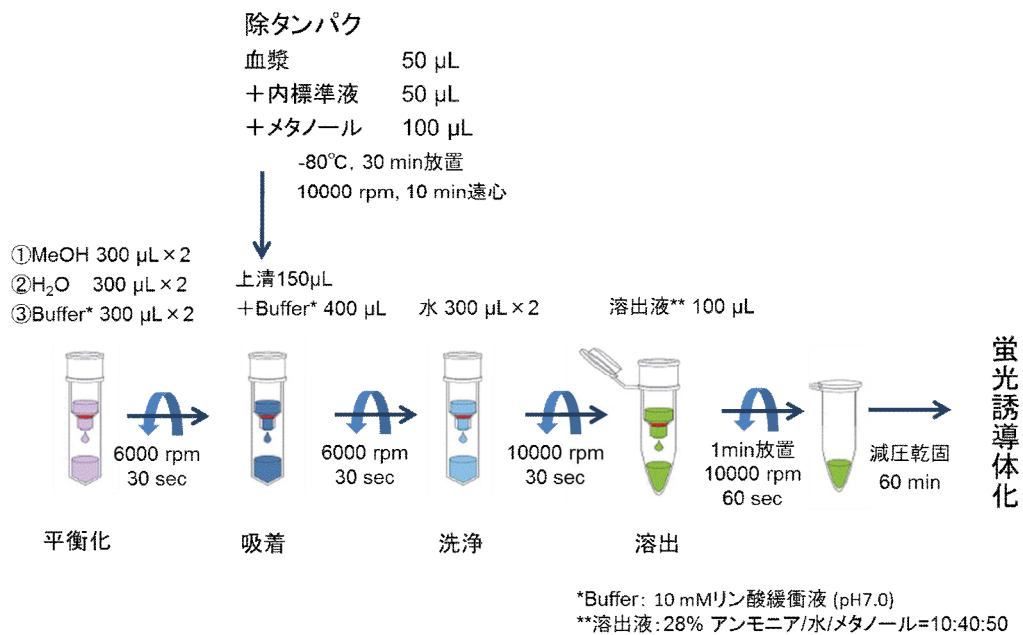


Figure 9. 最適化されたメチルアルギニン類のMonoSpin SCX前処理法

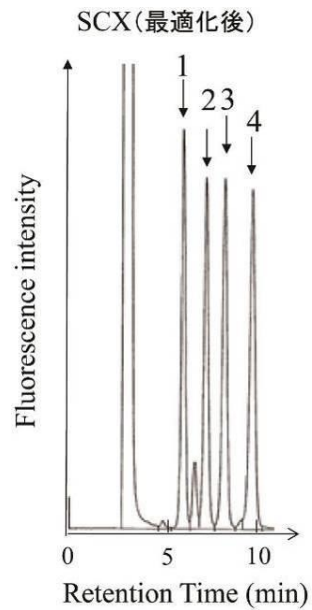


Figure 10. MonoSpin SCX前処理法最適化後のクロマトグラム

(1) L-NMMA, (2) Homoarginine, (3) ADMA, (4) SDMA (流速 : 1.5mL/min)

Table 3. MonoSpin SCX 条件最適化前後の回収率 (%)

MonoSpin SCX	L-NMMA	ADMA	SDMA
標準プロトコル	66	85	84
最適化後(N=7)	109±4.3	114±4.3	114±4.2

前処理なしの 25 μM メチルアルギニン類標品に対する前処理後の各メチルアルギニン類のピーク高さの割合

2.3.1.3. 除タンパク操作

固相抽出装置 MonoSpin SCX に血漿を直接アプライするとフィルターが目詰まりを起こすため、目詰まりを防止し、また NBD 蛍光誘導体化時にメチルアルギニン類以外のアミノ酸残基による反応を抑えるために、固相抽出前に除タンパク操作を行った。除タンパクに用いる試薬として、トリクロロ酢酸 (TCA) およびメタノールを用いて検討した。

TCA を用いた除タンパク操作として、100 μL の 25 μM メチルアルギニン類、90 μL のイオン交換水および 10 μL の 100 w/v% TCA を遠心チューブに順次添加し、ボルテックスミキサーで 10 秒間攪拌した後、9,200 g (10,000 rpm) で 10 分間遠心した。その後 150 μL の上清をとり、370 μL の 10 mM リン酸緩衝液および 30 μL の 1 規定水酸化ナトリウムを添加して攪拌した。攪拌後の混合液が pH 6.5 であることを pH 試験紙で確認した後、固相抽出操作に供した。

メタノールを用いた除タンパク操作として、100 μL の 25 μM メチルアルギニン類および 100 μL のメタノールを遠心チューブに順次添加し、ボルテックスミキサーで 10 秒間攪拌し、 -80°C で 30 分間放置した後、9,200 g (10,000 rpm) で 10 分間遠心した。その後 150 μL の上清をとり、400 μL の 10 mM リン酸緩衝液を添加し攪拌した後、固相抽出操作に供した。

その結果、TCA では L-NMMA の回収率が低く、ADMA と SDMA のばらつきが大きかったが、メタノールではすべてのメチルアルギニン類の回収率は良好で、ADMA と SDMA のばらつきも少なかったことから (Table 4) , 除タンパクに用いる試薬としてメタノールを選択した。

Table 4. 除タンパク後の回収率 (%)

試薬	L-NMMA	ADMA	SDMA
TCA	84.6 ± 4.1	106 ± 12	103 ± 10
Me-OH	99.9 ± 8.4	109 ± 3.9	106 ± 4.7

平均値±標準偏差 (N=3)

2.3.1.1. 処理効率

MonoSpin SCX を用いる固相抽出では、すべての操作は遠心機による簡便な処理が可能で、50 μL 程度の微量サンプルでも希釈されずに回収可能である。これまでに汎用されてきた Oasis MCX cartridges を用いた真空ポンプによる吸引方式での固相抽出法の場合 100~200 μL のサンプルを要するのに対し、MonoSpin SCX では 40 μL 以下（除タンパク操作後の上清に含まれる血漿サンプル量 37.5 μL ）の微量サンプルでも再現性良く抽出される。また従来の吸引装置(Laboratory Vacuum Manifold)を用いたろ過においては、同時に処理できるサンプル数に限界があり（20 サンプル程度）、煩雑な操作が必要であったが、本法においては、遠心機のみを利用した簡便で再現性の高い操作が可能になった。また従来の固相抽出装置はプロセスの最後に 1 mL の溶出液を用いていたため、溶媒を除くための減圧乾固に 2 時間以上を要していたが、MonoSpin においては 100 μL 程度の溶出液で済むため、減圧乾固に必要な時間は 1 時間未満となる。これらのプロセス改良により、より微量の血漿から効率的にメチルアルギニン類を抽出することが可能となり、前処理操作全体でかかる時間は 2 時間以上短縮された。

2.3.2. NBD-F を用いた蛍光誘導体化

NBD-F を用いる利点として、NBD-F 自体は無蛍光であることから、バックグラウンドノイズを抑えられるということが挙げられる。しかしながら、目的とする測定物質の直近に夾雑ピークが認められた (Figure 19)。ADMA, SDMA および生体由来の Homoarginine はそれぞれの保持時間が近いため、夾雑ピークを抑えることは、高流速において再現性の高い分析法を目指すには必須の条件である。そこで本法においては、従来の NBD 化条件[62,63]をもとに NBD-F アセトニトリル溶液濃度を 10, 20, 30, 40 mM（従来法の濃度）の範囲で、反応時間を 1, 2, 3（従来法の反応時間）, 4 分間の範囲で検討したところ、従来法の濃度と比較し、20 mM の NBD-F アセトニトリル溶液濃度で 3 分間インキュベーションすることで NBD 蛍光誘導体化反応はほぼ 100% に達したことから (Table 5)、この条件を NBD 蛍光誘導体化の最適条件とした。また、この条件下においては、従来法と同程度の蛍光強度を保ちながら、生体試料に含まれるメチルアルギニンの濃度域において夾雑ピークはほとんど検出されなくなった。最適化された NBD 蛍光誘導体化条件は、2.2.5 項に示した。

なお、NBD 蛍光誘導体化した試料は、室温で 3 日間以上安定であることを確認しており (Figure 11)、また 4°C で 6 週間保管後も内標準物質で補正すれば安定した測定値が得られることも新たに確認した。

Table 5. NBD-F 濃度および反応時間の検討

NBD-F 濃度 (mM)	分析対象	反応時間 / 反応率(%)			
		1 min	2 min	3 min	4 min
10	L-NMMA	22.1	24.5	20.7	16.8
	ADMA	21.9	56.2	67.8	78.4
	SDMA	25.0	61.0	75.3	87.2
20	L-NMMA	59.7	85.0	96.6	97.8
	ADMA	60.4	85.8	91.7	91.1
	SDMA	62.7	86.0	97.3	97.9
30	L-NMMA	76.9	90.7	98.0	102
	ADMA	76.4	92.2	95.2	95.7
	SDMA	78.9	91.8	97.5	103
40	L-NMMA	77.1	96.3	100	96.4
	ADMA	79.3	101	100	95.3
	SDMA	80.0	97.1	100	94.7

反応温度は 40℃に固定し、反応時間を 1, 2, 3, 4 min, NBD-F 濃度を 10, 20, 30 mM に振って検討した。また、比較対照として、従来の蛍光誘導体化条件である反応温度 40℃, 反応時間 3 min, NBD-F 濃度 40 mM の蛍光強度 (ピーク高さ) を 100%として比較した。なお、条件検討に使う標準品の濃度は生体内の濃度に近い 0.5 μM とした。

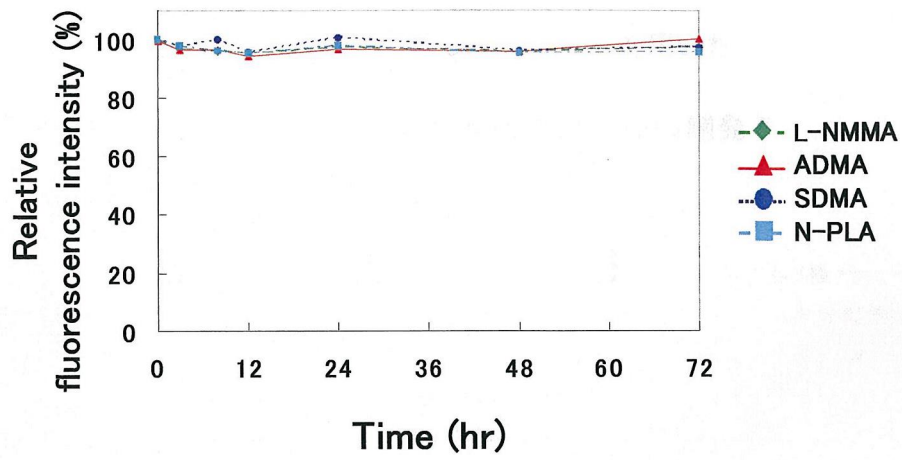


Figure 11. NBD化後のサンプルの室温保存時の安定性[62]

(蛍光誘導体化直後の蛍光強度を100%とする)

2.3.3. HPLC 条件検討

HPLC 条件について、カラムオープン温度，流速，移動相および内標準物質について検討した。加えて，HPLC 注入前のろ過操作についても検討した。

2.3.3.1. カラムオープン温度

カラムオープン温度について，流速を 0.4 mL/min に固定し，40, 41, 42, 43, 44, 45°C の範囲で検討を行った。

カラムオープン温度とメチルアルギニン類の溶出時間の関係を Figure 12 に，カラムオープン温度とメチルアルギニン類の理論段数^aの関係を Figure 13 に，カラムオープン温度とメチルアルギニン類の分離度^bの関係を Figure 14 に示した。

カラムオープン温度を 40°C から 45°C に上げることにより，メチルアルギニン類で最後に溶出される SDMA の保持時間が約 5 分短縮された (Figure 12)。理論段数は 42°C にピークがみられたものの，いずれも 5000 段以下のため大きな差ではないと考えられ，それは流速を上げることによって改良可能であると考えられた (Figure 13)。なお，45°C まで明らかな分離度の低下はみられなかった^c

(Figure 14)。また当該カラムにおいて推奨される最高温度は 50°C であることを考慮し，当分析法で使用するカラムオープン温度は 45°C を選択した。

^a 接線法： $N=(T_R/W)^2$ N =理論段数， T_R =保持時間， W =ピーク幅

^b $R=1.18 \times \{(T_{R2} - T_{R1}) / (W_{0.5h1} + W_{0.5h2})\}$ R =分離度， T_R =各ピークの保持時間， $W_{0.5h}$ =各ピークの半値幅
L-NMMA：L-NMMA と Homoarginine の分離度を算出，ADMA：ADMA と Homoarginine の分離度を算出，
SDMA：SDMA と ADMA の分離度を算出

^c 第十六改正日本薬局方においてピークの完全分離とは，分離度 1.5 以上を意味する

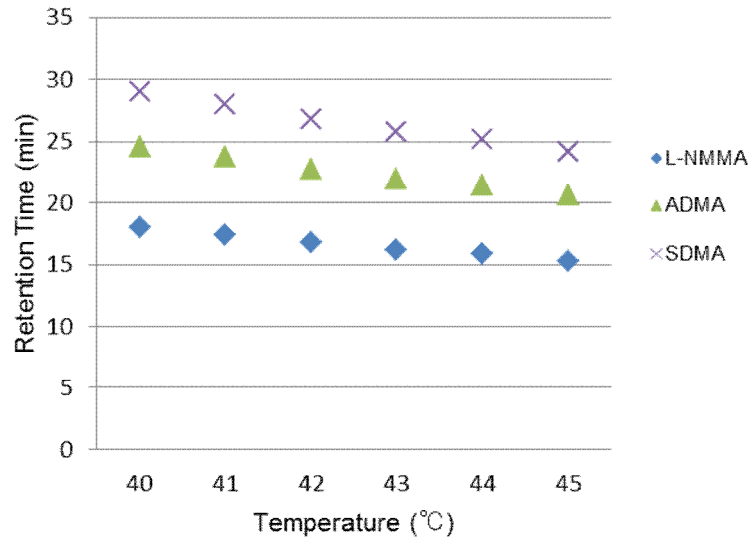


Figure 12. カラムオープン温度とメチルアルギニン類の溶出時間の関係

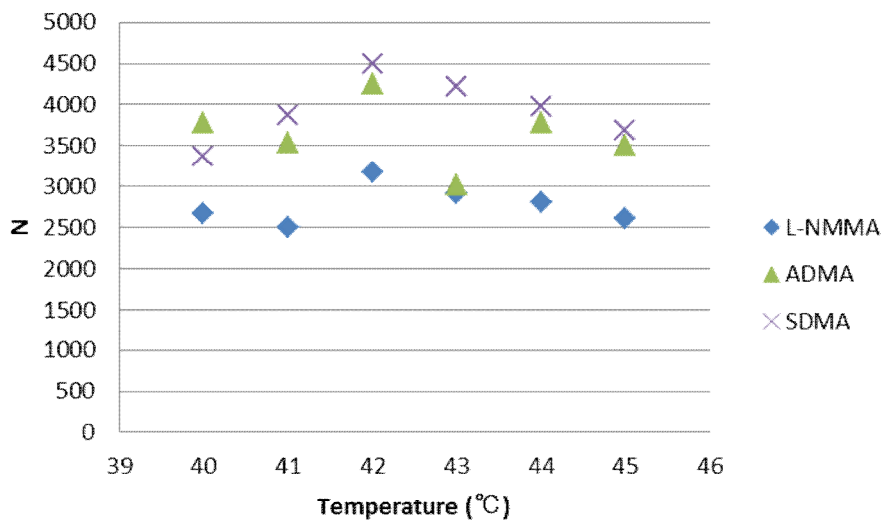


Figure 13. カラムオープン温度とメチルアルギニン類の理論段数 (N) の関係

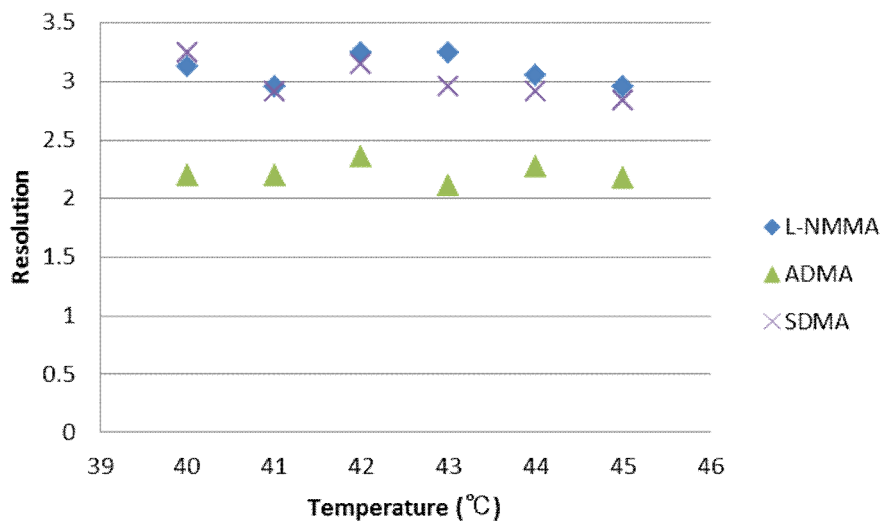


Figure 14. カラムオープン温度とメチルアルギニン類の分離度の関係

2.3.3.2. 流速

本法における流速について、移動相 50mM リン酸緩衝液 (pH 3.2):アセトニトリル: THF = 96:4:0.04 (v/v/v)を用いて 0.6, 0.8, 1.0, 1.1, 1.2, 1.3, 1.4, 1.5 mL/min の範囲で検討を行った。

流速とメチルアルギニン類の溶出時間の関係を Figure 15 に、流速とカラム圧の関係を Figure 16 に、流速とメチルアルギニン類の理論段数^aの関係を Figure 17 に、流速とメチルアルギニン類の分離度^bの関係を Figure 18 に示した。

流速を上げるとメチルアルギニン類の保持時間は良好な分離状態^cを保ったまま短縮された (Figure 15, Figure 18)。当該カラムの最大耐圧が 30 Mpa であることから、その 1/2 を超えない条件を選択し (Figure 16)、さらに理論段数の低下がみられない最適な流速である 1.3 mL/min を最適流速として選択した (Figure 17)。なお、その条件における SDMA の溶出時間は約 15 分であった。

^a 接線法： $N=(T_R/W)^2$ N=理論段数， T_R =保持時間，W=ピーク幅

^b $R=1.18 \times \{(T_{R2} - T_{R1}) / (W_{0.5h1} + W_{0.5h2})\}$ R=分離度， T_R =各ピークの保持時間， $W_{0.5h}$ =各ピークの半値幅
L-NMMA：L-NMMA と Homoarginine の分離度を算出，ADMA：ADMA と Homoarginine の分離度を算出，
SDMA：SDMA と ADMA の分離度を算出

^c 第十六改正日本薬局方においてピークの完全分離とは、分離度 1.5 以上を意味する

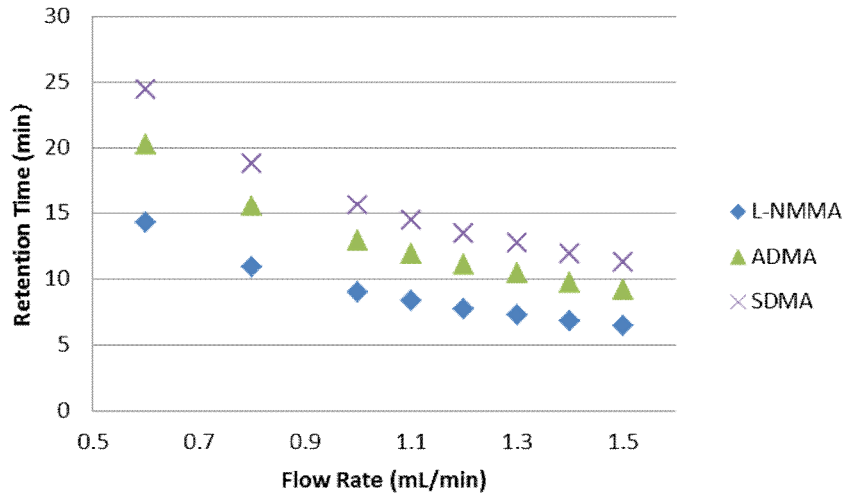


Figure 15. 流速とメチルアルギニン類の溶出時間の関係

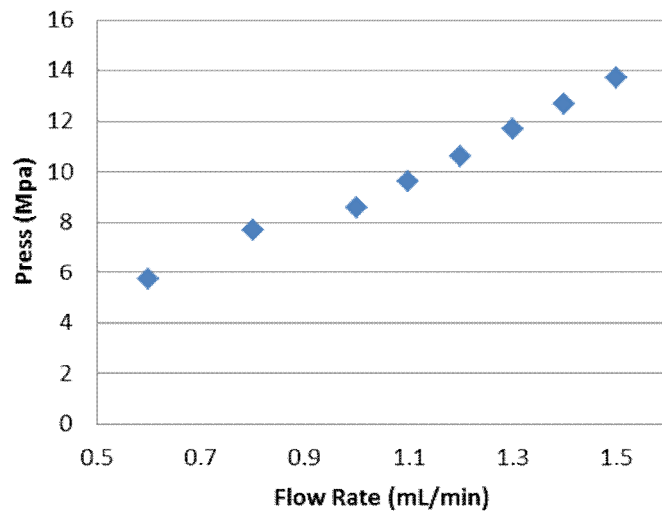


Figure 16. 流速とカラム圧の関係

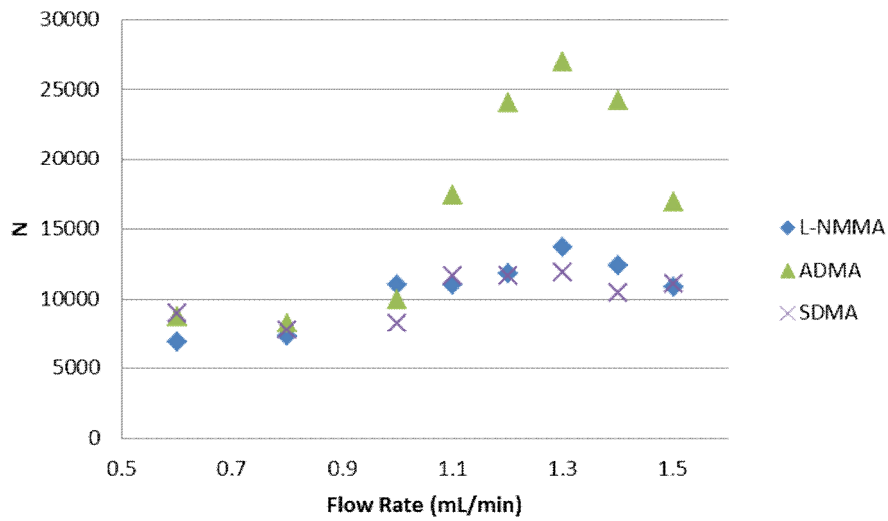


Figure 17. 流速とメチルアルギニン類の理論段数 (N) の関係

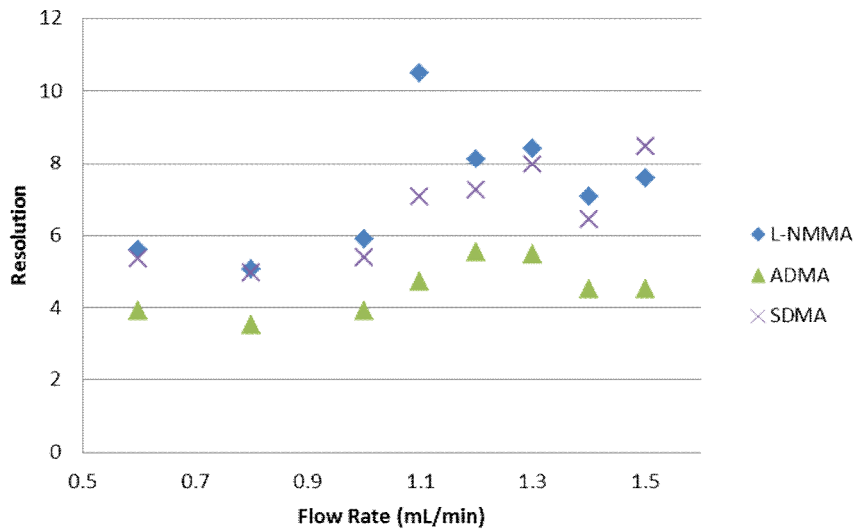


Figure 18. 流速とメチルアルギニン類の分離度 (Resolution) の関係

2.3.3.3. 移動相条件検討

標品のみで検討を行っていた当初、50mM リン酸緩衝液 (pH 3.2):アセトニトリル = 96:4 (v/v)の移動相で分離を試みていたが、ヒト血漿を用いて検討を始めたところ、ADMA と血漿由来の夾雑ピークが重なり、それは移動相条件におけるアセトニトリル濃度の調節だけでは分離困難であった。そこで、微量のテトラヒドロフラン(THF)を移動相に添加することで、ADMA と夾雑ピークの分離が可能であることを見出した (Figure 19)。

移動相に添加する THF を 0.01, 0.02, 0.03, 0.04, 0.05, 0.1, 0.5% と濃度を振ったところ、①THF 0.01% ~ 0.02% では ADMA は夾雑ピークと分離されたが、SDMA が夾雑ピークと重なり、②THF 0.03, 0.04, 0.05% では ADMA および SDMA は夾雑ピークと分離され、③THF 0.1% では ADMA および SDMA が夾雑ピークと重なり、さらに④THF 0.5% では ADMA と Homoarginine (生体由来) のピークが重なった。

①~④の結果から、移動相に添加する THF 濃度は 0.04% が最適な添加量であることが明らかになり、最適な移動相条件を 50mM リン酸緩衝液 (pH 3.2):アセトニトリル: THF = 96:4:0.04 (v/v/v) とした。

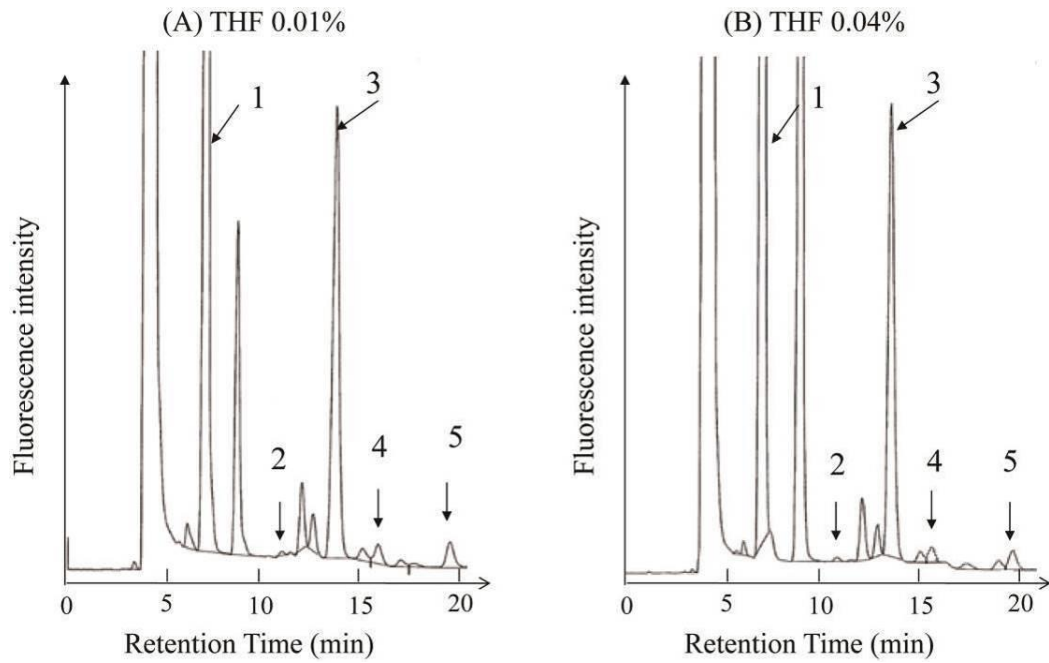


Figure 19. 移動相のTHF濃度検討(THF濃度: 0.01% vs 0.04%)時のクロマトグラム

(1) L-Arginine, (2) L-NMMA, (3) Homoarginine, (4) ADMA, (5) SDMA (流速: 0.8mL/min)

2.3.3.4. 内標準物質

メチルアルギニン類の測定に用いられる内標準物質については、L-NMMA および Homoarginine が広く用いられている[71]。当初、本研究における内標準物質として Homoarginine を用いていた (Figure 20)。Homoarginine は生体内に ADMA よりも高濃度で存在しているが、過剰量を添加することでメチルアルギニン類測定の内標準物質として用いることが可能である。しかしながら、2.3.3.3 項で最適化した移動相 [50mM リン酸緩衝液(pH3.2) : アセトニトリル : THF =96 : 4 : 0.04] では、分析対象である L-NMMA, ADMA および SDMA の血漿サンプルにおける分離は可能になったものの、前処理操作に起因すると考えられる夾雑ピークと当初の内標準物質である Homoarginine の分離が困難となった。さらに、Homoarginine は生体内に少なからず存在し、Homoarginine の生体内濃度は ADMA よりも高いことが知られている[60]。

そこで本測定法においては、内標準物質としてメチルアルギニン類と類似の構造を有する生体外物質である *N*-Propyl-L-arginine (N-PLA) を使用し、高精度な測定系を目指した。N-PLA を NBD 蛍光誘導体化し、移動相 50mM リン酸緩衝液(pH3.2) : アセトニトリル : THF =96 : 4 : 0.04, 流速 1.3mL/min においてイソクラティック条件で測定したところ、溶出時間は 44.2 分であった。なお、ADMA および SDMA の溶出時間に十分な余裕が見られたこと、ならびに N-PLA の溶出時間が 40 分を超えていることから、ADMA の溶出直後からアセトニトリル濃度を漸増させるグラジエントプログラム (2.2.6 項) を設定した。N-PLA は生体内に存在せず、他の夾雑ピークとも重ならないため、頑健性・再現性の高い測定が可能となった。

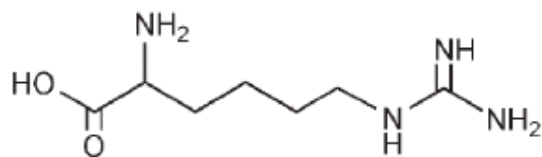


Figure 20. Homoarginine の構造式

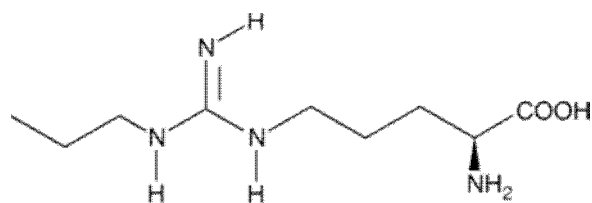


Figure 21. N-PLAの構造式

2.3.3.5. HPLC 注入前フィルターろ過

HPLC システムにサンプルを注入する前にフィルターろ過を行うことで、HPLC の分析信頼性の向上、カラムの保護および感度の向上が期待される。MonoSpin SCX を用いて試料を前処理した場合、フィルターろ過時に大きな抵抗が認められた。一方、MonoSpin C18-CX 処理後には血漿サンプルおよび標準品のいずれにも抵抗は認められなかった。このことから HPLC システムにサンプルを注入する前の試料には、MonoSpin SCX 担体に由来する粒子径の大きな夾雑物質が存在すると考えられ、ガードカラムの劣化を早める可能性があると考えられた。

そこで、前処理後に NBD 化試料を 15,000 rpm で 10 分間遠心した後、0.22 μm フィルター（通常は 0.45 μm のフィルターが汎用される）でろ過したところ、シリンジを押し出す際の抵抗がなくなった。その結果、ピーク状態の改善およびガードカラムの寿命を延長することができた。

2.3.4. クロマトグラム

最適化された HPLC 条件およびグラジエントプログラムを 2.2.6 項に示す。メチルアルギニン類の標準品(A)および血漿サンプル(B)の代表的なクロマトグラムを Figure 22 に、L-Arginine の標準品(A)および血漿サンプル(B)の代表的なクロマトグラムを Figure 23 に示す。20 分以内で内標準物質を含む全てのメチルアルギニン類を測定することが可能となり、従来の 3 種類メチルアルギニン類測定法と比べて測定時間は 10 分以上短縮された。なお、L-Arginine についてはイソクラティック条件において 6 分以内で測定可能である (Figure 23)。

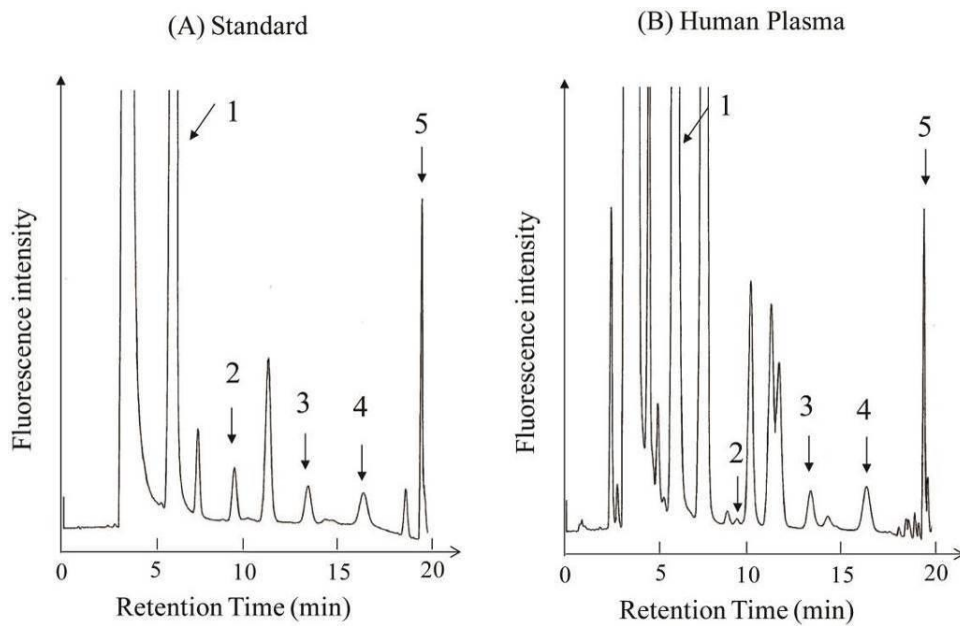


Figure 22. (A) 標品のクロマトグラム(1) L-Arginine, (2) 0.5 μM L-NMMA, (3) 0.5 μM ADMA, (4) 0.5 μM SDMA, (5) 1.0 μM N-PLA (内標準物質)
(B) 50 μL ヒト血漿サンプルのクロマトグラム(1) L-Arginine, (2) 0.04 μM L-NMMA, (3) 0.42 μM ADMA, (4) 0.51 μM SDMA, (5) 1.0 μM N-PLA (内標準物質)

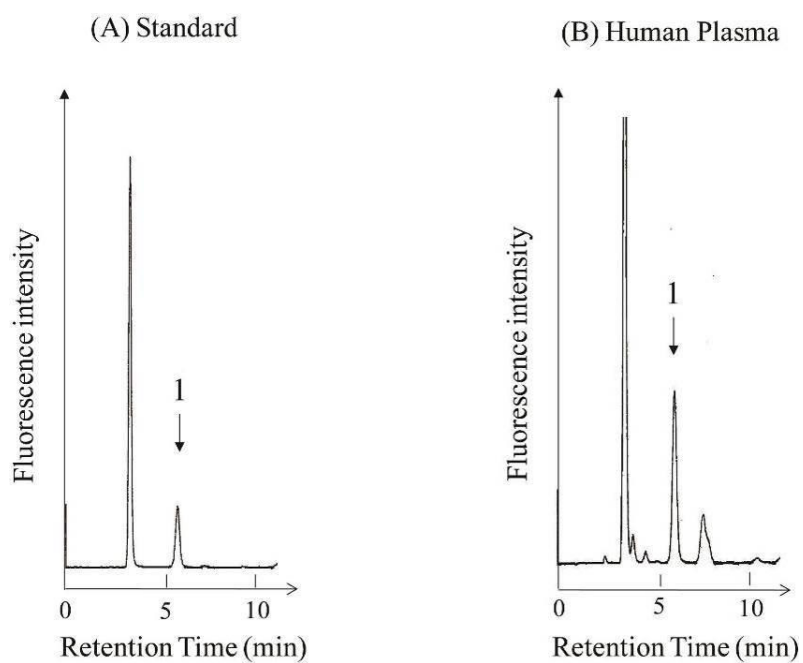


Figure 23. (A) 標品のクロマトグラム (1) 40 μ M L-Arginine.

(B) 50 μ L ヒト血漿サンプルのクロマトグラム (1) 80 μ M L-Arginine.

2.3.5. 線形性

L-NMMA, ADMA および SDMA については $0.2 \sim 1.0 \mu\text{M}$ の, L-Arginine については $40 \sim 200 \mu\text{M}$ のキャリブレーション用サンプルを用いて検量線を作成した結果, 再現性良く相関係数 0.999 以上の良好な直線性を示した (Figure 24, Table 6)。

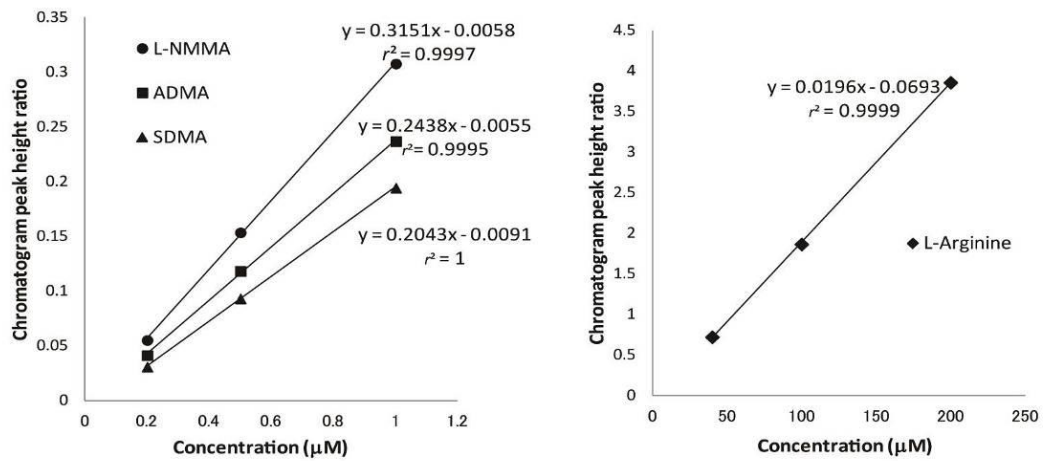


Figure 24. L-NMMA, ADMA, SDMAおよびL-Arginineの標品のキャリブレーション曲線

Table 6. L-NMMA, ADMA, SDMA および L-Arginine%の CV 値

Concentrations	Intra-day precision (CV, %)
L-NMMA, μM (n=5)	
0.2	4.56
0.5	4.54
1.0	2.31
ADMA, μM (n=5)	
0.2	2.31
0.5	3.40
1.0	2.22
SDMA, μM (n=5)	
0.2	4.51
0.5	4.27
1.0	2.55
L-Arginine, μM (n=5)	
40	3.27
100	3.93
200	2.05

2.3.6. 絶対回収率, 検出限界, 真度および精度

前処理による絶対回収率は L-Arginine, L-NMMA, ADMA, SDMA および N-PLA でそれぞれ 85, 89, 100, 104 および 94% であった。

本分析法の検出限界は L-Arginine において 9.0 fmol (希釈前の濃度として 0.06 μ M, SN=3), L-NMMA において 3.75 fmol (元の濃度として 0.0025 μ M, SN=3), ADMA において 7.5 fmol (元の濃度として 0.005 μ M, SN=3), SDMA において 3.75 fmol (元の濃度として 0.0025 μ M, SN=3) であった。これまでに OPA 蛍光誘導体化法等と比較して数倍感度の良い NBD-F による蛍光誘導体化法とシリカ充填型カラムを組み合わせた HPLC-蛍光検出法を確立してきたが[62,63], 本法はこれらの 2 倍以上高感度であった。

日内変動における CV 値は, L-Arginine, L-NMMA, ADMA および SDMA において, それぞれ 4.78, 4.34, 4.34 および 4.50% であった (n=5)。また, 日間変動における CV 値は, L-Arginine, L-NMMA, ADMA および SDMA において, それぞれ 6.76, 4.95, 3.24 および 3.00% であった (n=6)。血漿に低濃度, 中濃度, 高濃度の標品を添加したときの添加回収率を求め, 真度 (Accuracy) を回収率 (Recovery) として算出したところ, ほぼ 100% であった (Table 7)。これらの結果から, 本測定法が良好な再現性を有することが示された。

Table 7. L-Arginine, L-NMMA, ADMA および SDMA の精度および真度

	Concentration (mean±SD)	Precision (CV, %)	Recovery (%)
L-NMMA added, μM (n=5)			
0	0.04±0.000	4.34	
0.2	0.24±0.001	4.78	97
0.5	0.53±0.003	2.87	98
1.0	1.04±0.006	1.74	100
ADMA added, μM (n=5)			
0	0.42±0.003	4.34	
0.2	0.63±0.014	3.07	102
0.5	0.93±0.009	2.63	101
1.0	1.42±0.012	1.61	100
SDMA added, μM (n=5)			
0	0.51±0.012	4.50	
0.2	0.70±0.020	3.30	97
0.5	1.02±0.023	2.86	103
1.0	1.50±0.040	1.01	99
L-Arginine added, μM (n=5)			
0	80.3±11.8	4.78	
40	120.9±37.6	1.76	102
100	183.8±33.3	3.44	104
200	282.5±63.5	4.11	101

2.3.7. 健常成人における L-NMMA, ADMA, SDMA および L-Arginine の血漿中濃度

本測定法を用いて、獨協医科大学より提供された健常成人の血漿中 L-Arginine, L-NMMA, ADMA および SDMA 濃度を測定したところ、それぞれ 83.8 ± 30.4 , 0.05 ± 0.01 , 0.41 ± 0.07 および 0.59 ± 0.11 μM であった ($n=6$)。L-Arginine 濃度範囲は一般的に $40 \sim 200$ μM 程度, L-NMMA は 0.05 ± 0.01 μM ($n=20$) [30], ADMA は 0.50 ± 0.063 μM ($n=2311$), SDMA は 0.53 ± 0.101 μM ($n=2311$) と報告されている[71]ことから、本法により求めた濃度は既報とほぼ一致し、本法がヒトの生体試料の測定に適していることが示された。

Table 8. 健常成人の血漿中 L-NMMA, ADMA, SDMA および L-Arginine

	性別	年齢	L-NMMA (μM)	ADMA (μM)	SDMA (μM)	L-arginine (μM)
Healthy donor 1	男性	58	0.07	0.50	0.45	105
Healthy donor 2	女性	49	0.05	0.46	0.62	117
Healthy donor 3	女性	62	0.03	0.30	0.48	53.0
Healthy donor 4	男性	68	0.04	0.37	0.61	80.3
Healthy donor 5	女性	62	0.04	0.37	0.73	42.8
Healthy donor 6	男性	63	0.06	0.45	0.69	105
Mean \pm SD (n=6)		60.3 \pm 6.4	0.05 \pm 0.01	0.41 \pm 0.07	0.59 \pm 0.11	83.8 \pm 30.4

2.4. まとめと考察

HPLC を用いた短時間かつ簡便なメチルアルギニン類の高感度測定法を確立した[72]。本測定法は、HPLC-蛍光検出法を利用したシンプルな測定法であることから、どのような施設にも容易に導入可能である。さらに、前処理操作が簡便で、内標準物質として生体内に存在しない化合物を採用していることから、誰でも再現性良く生体試料中に含まれるメチルアルギニン類の測定を行うことができる。また、L-Arginine/ADMA 比は、NO の生体内利用率の指標として有用であることが報告されていることから[70]、本測定法ではL-Arginine も定量できるようバリデートしている。

以上のように、本測定法は生体内に含まれる L-Arginine およびメチルアルギニン類をルーチンに測定することができる極めて有用な分析方法であると考えられる。

近年では、循環器疾患の他にも精神疾患や癌など様々な病態でメチルアルギニン類が上昇することが報告されており[73]、健康人でも生活習慣の乱れ等により、メチルアルギニン類が上昇するとも言われている[74,75]。今後は、メチルアルギニン類の疾患バイオマーカーとしての有用性および病態解明などに貢献することが期待される。

3. 統合失調症患者血漿への応用

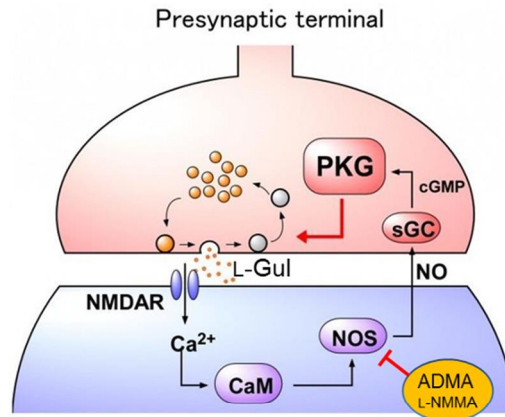
3.1. 背景

NO は内皮細胞, 平滑筋細胞およびニューロン等から産生され, 血管収縮や神経伝達などの様々な生理機能を調節しており [76], 冠動脈性心疾患などの血管障害においては NO 産生が低下することが知られている [77,78]。また, NO は脳の神経伝達に関与しており [79], 脳の血流調節 [80,81] およびミトコンドリアの呼吸調節に重要な役割を担っている [81]。これに関連して, NO の内因性阻害物質であるメチルアルギニン類は, 恒常的に脳内に存在していることが知られており [82,83], アルツハイマーなどの認知機能障害 [84-86] およびうつ病 [87,88] において血中メチルアルギニン類濃度が上昇することが示唆されている。統合失調症はうつ病とは独立した疾患として考えられているが, 分類の難しい境界例が存在すること, 統合失調症やうつ病が同一家系に集積すること, 共通の症状が存在すること, さらに統合失調症の症状として認知機能障害 (陰性症状) が挙げられることから [89], 統合失調症においても NO およびメチルアルギニン類が関与している可能性がある。

近年では, 統合失調症において, 重要な神経伝達物質であるグルタミン酸および D-セリンの関与が報告されており, またこれらが作用する NMDA 型グルタミン酸受容体の機能低下が統合失調症の発症にかかわっていることが示唆されている [90-92]。神経系においては, グルタミン酸の NMDA 受容体刺激によってカルシウムが細胞内に流入し, カルシウムがカルモジュリンに結合することで NOS が活性化して NO の産生が誘導される。さらに NO がシナプス間隙を逆行し, シナプス前終末における cGMP の産生を促すという, NMDA-NO-cGMP 経路がグルタミン酸やドパミンなどの神経伝達物質の放出を制御していることが明らかにされている [93]。様々な神経が偏在するヒトの中樞神経系において, NOS は一部に局在しており, NO 産生の増加は, 統合失調症を含む様々な神経病理学的な状態の変化に関与している可能性がある [94,95]。

上述の背景に一致して, 統合失調症患者において NO 産生の低下が報告されている [96-98]。薬物未治療の統合失調症患者の血漿を用いた *in vitro* 試験において, 患者血漿が血小板由来の NOS を阻害したことから, 統合失調症患者の血漿中メチルアルギニン類濃度が上昇している可能性が示唆された [97]。これらのことから, メチルアルギニン類が脳内で NOS をコントロールし, 統合失調症の病態生理において NO 代謝を調節している可能性が示唆される (Figure 25)。そこで我々は, 開発した分析法を用いて薬物治療歴のある統合失調症患者血漿中の L-NMMA, ADMA および SDMA さらに NO

供与体である L-Arginine 濃度を測定し、より広範な解析を試みた。



Eguchi K, et al. Neuron. 2012 ;74(3):517-29.

Figure 25. NMDA-NO-cGMP 経路とメチルアルギニン類

3.2. 実験

3.2.1. 生体サンプル

獨協医科大学より提供された、薬物治療中の統合失調症患者 101 名および健常者 63 名の血漿を用いた。患者はすべて DSM-IV-TR 診断^aによる組み入れ基準に基づいており、薬物治療中で急性期にはなく、明らかに重篤な合併症はない統合失調症患者である。また対照群の血漿は、向精神薬の服用はなく、採血時点で精神疾患または重篤な身体疾患に罹患していない健常者より得られたものである。採血は昼食前である 10 時 30 分から 11 時 30 分の空腹時に行い、ヘパリンチューブに採取した。採血から 2 時間後くらいまでに 1,500g にて 15 分間遠心し、測定に供するまで -80℃ で保管した。本試験は、獨協医科大学の倫理委員会による承認を取得済みである。

3.2.2. 分析

検体のメチルアルギニン類濃度は、今回確立した HPLC 分析法にて測定を行った[72]。測定対象は、L-NMMA, ADMA, SDMA および L-Arginine で、追加パラメータとして L-Arginine 濃度と (ADMA + L-NMMA) 濃度の比 $[L-Arginine / (ADMA + L-NMMA)]$ および (ADMA + L-NMMA) 濃度と SDMA 濃度の比 $[(ADMA + L-NMMA) / SDMA]$ を解析した。L-Arginine 濃度と ADMA 濃度の比である L-Arginine/ADMA 比は NO の生体内利用率を反映しており[99]、さらに DDAH 活性との相関性も示唆されている[70]。ADMA は DDAH によって代謝されるが、SDMA は腎排泄が主な代謝ルートであることから、ADMA 濃度と SDMA 濃度の比である ADMA/SDMA 比は ADMA 分解の指標となることが示唆されている[70]。今回新たに開発した測定法では、ADMA と同様に NOS 阻害活性を有し、DDAH による代謝を受ける L-NMMA の測定が可能であることから、L-Arginine/ (ADMA + L-NMMA) および (ADMA + L-NMMA)/SDMA を新規のパラメータとして採用した。

3.2.3. 統計解析

データは平均値±標準偏差として記載し、統計解析は GraphPad Prism 6.0 (Graphpad, San Diego, CA, USA) を用いて行った。すべてのデータは対応のない *t* 検定または二元配置分散分析により解析し、*P* 値 < 0.05 未満の場合に有意差ありと判断した (**P* < 0.05, ***P* < 0.01, ****P* < 0.001, *****P* < 0.0001)。

^a Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders (精神障害の診断と統計マニュアル) : アメリカ精神医学会による国際統一診断基準で、2000 年に出版された DSM-IV の「テキスト改訂版」

3.3. 結果

3.3.1. 代表的なクロマトグラム

健常者および統合失調症患者血漿サンプルの代表的なクロマトグラムを Figure 26 および Figure 27 に示す。

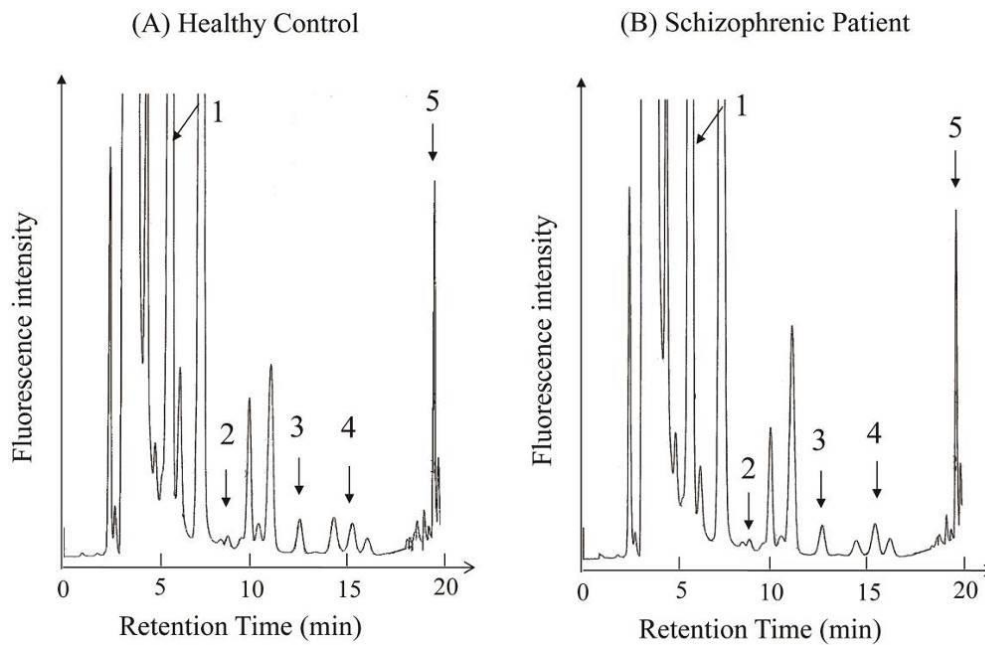


Figure 26. (A) 健常者血漿サンプルのクロマトグラム (1) 44 μM L-Arginine, (2) 0.04 μM L-NMMA, (3) 0.43 μM ADMA, (4) 0.44 μM SDMA, (5) 1.0 μM N-PLA (内標準物質)
(B) 統合失調症患者血漿サンプルのクロマトグラム (1) 93 μM L-Arginine, (2) 0.04 μM L-NMMA, (3) 0.41 μM ADMA, (4) 0.52 μM SDMA, (5) 1.0 μM N-PLA (内標準物質)

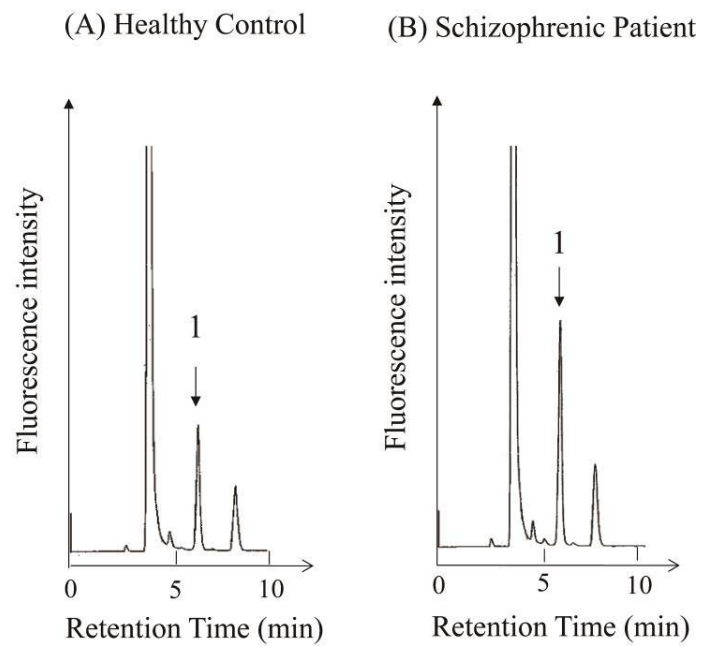


Figure 27. (A) 健常者血漿サンプルのクロマトグラム (1) 44 μM L-Arginine

(B) 統合失調症患者血漿サンプルのクロマトグラム (1) 93 μM L-Arginine

3.3.2. 統合失調症患者におけるメチルアルギニン類濃度（全体比較）

統合失調症患者と健常者の血漿中メチルアルギニン類濃度を全体比較したところ、統合失調症患者群でL-Arginine, L-NMMA, ADMA, SDMA およびL-Arginine/ (ADMA+L-NMMA)の有意な上昇が認められた（Table 9, Figure 28）。(ADMA+L-NMMA)/SDMA について有意差はみられなかった。

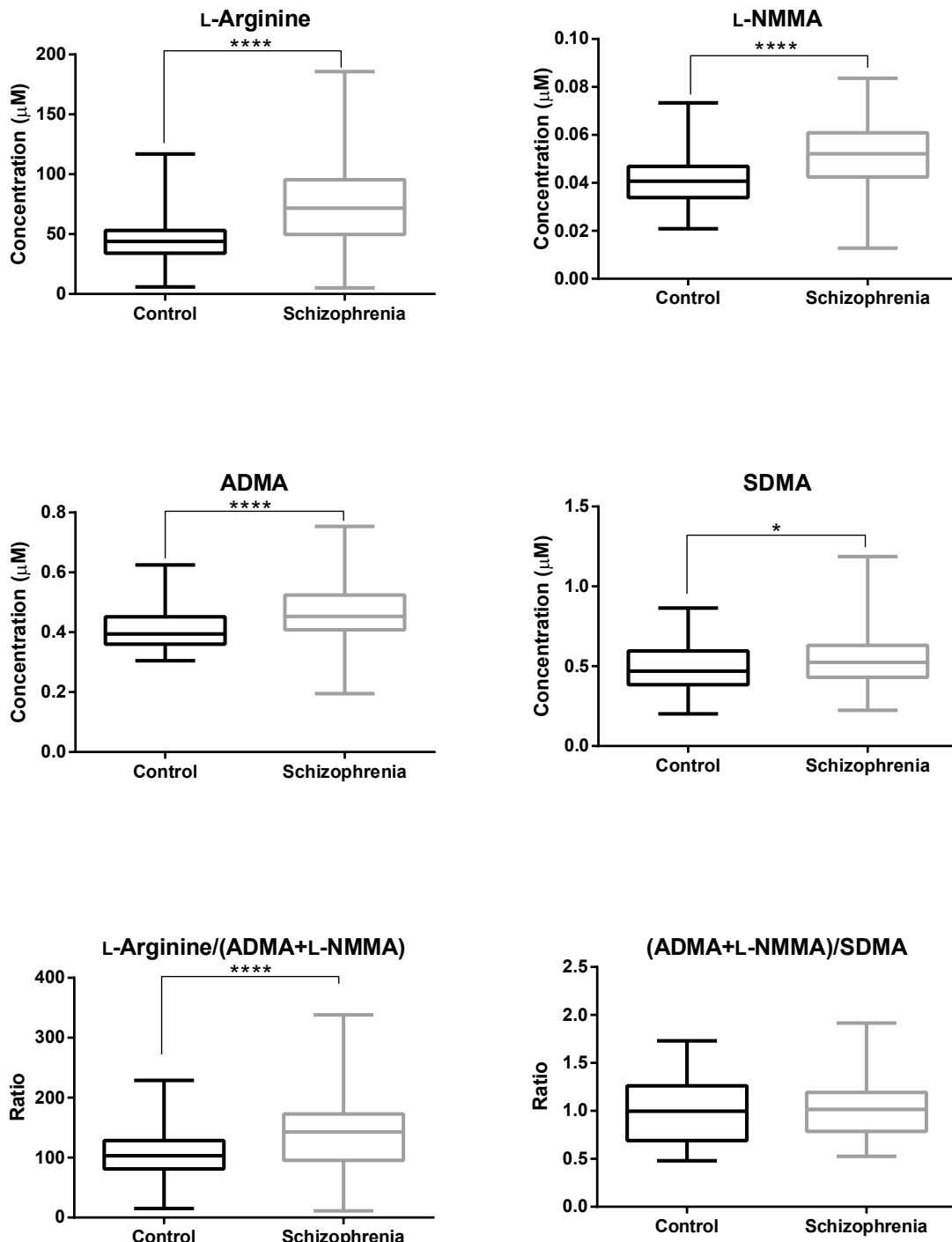
Table 9. メチルアルギニン類濃度 (健常者 vs 統合失調症患者)

群	Age (year)	L-Arginine	L-NMMA	ADMA	SDMA	Arg/(ADMA+MMA)	(ADMA+MMA)/SDMA
						Ratio	Ratio
健常者 (N=63)	47.8 ± 12.3 (24 ó 68)	48 ± 21 (6 ó 117)	0.04 ± 0.01 (0.02 - 0.07)	0.41 ± 0.07 (0.30 - 0.63)	0.49 ± 0.15 (0.20 - 0.86)	106 ± 44 (15 ó 229)	1.01 ± 0.35 (0.48 - 1.73)
患者 (N=101)	50.3 ± 13.8 (20 ó 81)	74 ± 32 ^{****} (5 ó 186)	0.05 ± 0.01 ^{****} (0.01 - 0.08)	0.48 ± 0.11 ^{****} (0.20 - 0.75)	0.55 ± 0.17 [*] (0.22 - 1.19)	142 ± 57 ^{****} (11 ó 338)	1.03 ± 0.30 (0.53 - 1.92)

*P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001, ****P < 0.0001

MMA=L-NMMA

Mean ± SD(μM)
(Min ó Max)



*P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001, ****P < 0.0001

Figure 28. 統合失調症患者におけるメチルアルギニン類濃度 (全体比較)

3.3.3. 統合失調症患者におけるメチルアルギニン類濃度（男女別解析）

男女別に統合失調症患者と健常者の血漿中メチルアルギニン類濃度を比較したところ、男女ともに統合失調症患者群で L-Arginine, L-NMMA, ADMA および L-Arginine/(ADMA+L-NMMA)の有意な上昇がみられた (Table 10, Figure 29)。SDMA および(ADMA+L-NMMA)/SDMA では男女いずれにおいても有意差はみられなかった。なお、各パラメータにおける男女差は認められなかった。

Table 10. メチルアルギニン類濃度 (男女別, 健常者 vs 統合失調症患者)

群	性別	Age (year)	L-Arginine	L-NMMA	ADMA	SDMA	Arg/(ADMA+MMA)	(ADMA+MMA)/SDMA
							Ratio	Ratio
男性	健常者	46.3 ± 14.3	46 ± 21	0.04 ± 0.01	0.42 ± 0.07	0.48 ± 0.14	102 ± 42	1.04 ± 0.33
	(N=39)	(24 ó 64)	(14 ó 55)	(0.03 - 0.07)	(0.32 - 0.63)	(0.20 - 0.57)	(28 ó 104)	(0.56 - 1.62)
女性	患者	50.2 ± 13.2	72 ± 33 ^{****}	0.05 ± 0.01 [*]	0.48 ± 0.11 ^{**}	0.53 ± 0.18	137 ± 62 ^{**}	1.08 ± 0.34
	(N=24)	(20 ó 81)	(5 ó 136)	(0.02 - 0.08)	(0.29 - 0.75)	(0.22 - 1.19)	(11 ó 328)	(0.53 - 1.92)
女性	健常者	50.1 ± 8.2	50 ± 23	0.04 ± 0.01	0.40 ± 0.05	0.52 ± 0.17	113 ± 47	0.95 ± 0.38
	(N=56)	(38 ó 62)	(6 ó 117)	(0.02 - 0.06)	(0.30 - 0.55)	(0.25 - 0.86)	(15 ó 229)	(0.44 - 1.50)
女性	患者	50.4 ± 14.7	78 ± 32 ^{***}	0.05 ± 0.02 ^{****}	0.47 ± 0.10 ^{**}	0.57 ± 0.15	148 ± 50 [*]	0.96 ± 0.24
	(N=45)	(20 ó 78)	(32 ó 186)	(0.01 - 0.08)	(0.20 - 0.75)	(0.35 - 1.02)	(62 ó 281)	(0.63 - 1.68)

*P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001, ****P < 0.0001

MMA=L-NMMA

Mean ± SD(μM)
(Min ó Max)

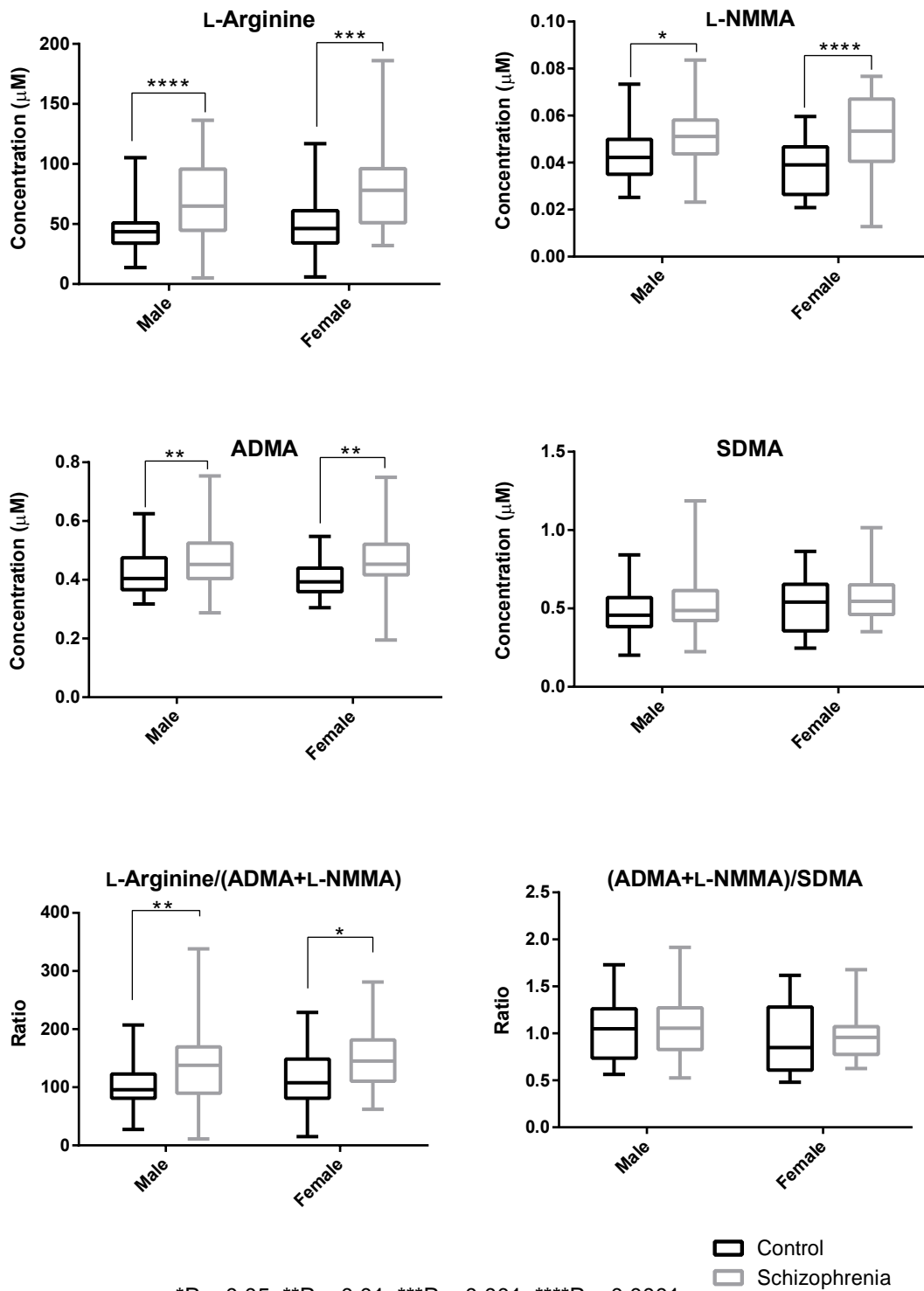


Figure 29. 統合失調症患者におけるメチルアルギニン類濃度 (男女別解析)

3.3.4. 統合失調症患者におけるメチルアルギニン類濃度（年代別解析）

年代別に統合失調症患者と健常者の血漿中メチルアルギニン類濃度を比較したところ、20代、30代および50代においては、いずれのパラメータも健常者と比較して有意差はみられなかった。40代および60代以上においては、健常者と比較してL-Arginineの有意な上昇がみられ、その他の年代においても、統合失調症患者の血漿中L-Arginine濃度は対照群と比べて高い傾向が認められた。60代以上においては、統合失調症群で健常者と比較してL-NMMA, ADMAおよび

L-Arginine/(ADMA+L-NMMA)の有意な上昇が認められた。（Table 11, Figure 30：実線比較）

各パラメータにおける年代別比較では、60代以上の統合失調症群では他の年代の統合失調症患者群と比較してL-Arginine（30代、40代、50代と比べて有意な上昇）、L-NMMA、（30代、40代、50代と比べて有意な上昇）、ADMA（30代と比べて有意な上昇）およびSDMA（30代と比べて有意な上昇）で有意な上昇が認められた（Figure 30：点線比較）。健常者においては、いずれのパラメータにおいても年代による差はみられなかった。

Table 11. メチルアルギニン類濃度（年代別，健常者 vs 統合失調症患者）

群		Age (year)	L-Arginine	L-NMMA	ADMA	SDMA	Arg/(ADMA+MMA)	(ADMA+MMA)/SDMA
							Ratio	Ratio
20代	健常者	25.8 ± 1.4	50 ± 13	0.04 ± 0.01	0.41 ± 0.07	0.47 ± 0.20	110 ± 20	1.09 ± 0.40
	(N=8)	(24 ó 28)	(39 ó 71)	(0.03 - 0.06)	(0.33 - 0.53)	(0.25 - 0.84)	(87 ó 144)	(0.60 - 1.72)
20代	患者	24.3 ± 3.3	68 ± 33	0.05 ± 0.01	0.43 ± 0.14	0.53 ± 0.10	137 ± 53	0.93 ± 0.30
	(N=9)	(20 ó 29)	(10 ó 119)	(0.03 - 0.07)	(0.27 - 0.67)	(0.33 - 0.65)	(32 ó 210)	(0.50 - 1.41)
30代	健常者	36 ± 3	44 ± 13	0.03 ± 0.01	0.38 ± 0.05	0.57 ± 0.19	109 ± 32	0.84 ± 0.40
	(N=8)	(32 ó 39)	(33 ó 71)	(0.02 - 0.05)	(0.32 - 0.48)	(0.20 - 0.86)	(80 ó 171)	(0.48 - 1.73)
30代	患者	36 ± 3	58 ± 19	0.04 ± 0.01	0.43 ± 0.07	0.48 ± 0.11	125 ± 42	1.02 ± 0.30
	(N=18)	(31 ó 39)	(36 ó 93)	(0.02 - 0.06)	(0.20 - 0.51)	(0.29 - 0.75)	(65 ó 200)	(0.61 - 1.90)
40代	健常者	44.8 ± 2.6	42 ± 26	0.04 ± 0.01	0.41 ± 0.05	0.46 ± 0.13	93 ± 54	1.06 ± 0.28
	(N=16)	(40 ó 49)	(6 ó 117)	(0.02 - 0.07)	(0.32 - 0.50)	(0.28 - 0.72)	(15 ó 229)	(0.58 - 1.53)
40代	患者	43.9 ± 3.1	68 ± 39*	0.05 ± 0.02	0.47 ± 0.13	0.56 ± 0.22	140 ± 90	0.99 ± 0.27
	(N=14)	(40 ó 48)	(5 ó 133)	(0.01 - 0.07)	(0.35 - 0.75)	(0.32 - 1.19)	(11 ó 328)	(0.68 - 1.56)
50代	健常者	54.7 ± 3.1	51 ± 18	0.04 ± 0.01	0.41 ± 0.06	0.48 ± 0.15	112 ± 36	1.05 ± 0.34
	(N=19)	(50 ó 59)	(24 ó 105)	(0.02 - 0.07)	(0.32 - 0.53)	(0.25 - 0.75)	(63 ó 185)	(0.52 - 1.62)
50代	患者	54.8 ± 3.2	70 ± 26	0.05 ± 0.01	0.48 ± 0.10	0.51 ± 0.15	136 ± 52	1.11 ± 0.35
	(N=32)	(50 ó 59)	(32 ó 136)	(0.02 - 0.08)	(0.32 - 0.75)	(0.22 - 1.02)	(62 ó 276)	(0.62 - 1.92)

Table 11. メチルアルギニン類濃度（年代別，健常者 vs 統合失調症患者） 続き

群		Age (year)	L-Arginine	L-NMMA	ADMA	SDMA	Arg/(ADMA+MMA)	(ADMA+MMA)/SDMA
							Ratio	Ratio
60代	健常者	63.4 ± 2.0	50 ± 28	0.04 ± 0.01	0.42 ± 0.09	0.53 ± 0.13	112 ± 60	0.93 ± 0.37
	(N=19)	(61 ó 68)	(14 ó 105)	(0.03 - 0.06)	(0.30 - 0.63)	(0.35 - 0.73)	(28 ó 207)	(0.56 - 1.62)
以上	(N=28)	65.8 ± 6.0	95 ± 34***	0.06 ± 0.01***	0.52 ± 0.10***	0.62 ± 0.18	162 ± 49*	0.89 ± 0.23
	健常者	(60 ó 81)	(41 ó 186)	(0.02 - 0.08)	(0.41 - 0.75)	(0.37 - 1.08)	(85 ó 281)	(0.53 - 1.52)

*P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001, ****P < 0.0001

Mean ± SD(μM)

MMA=L-NMMA

(Min ó Max)

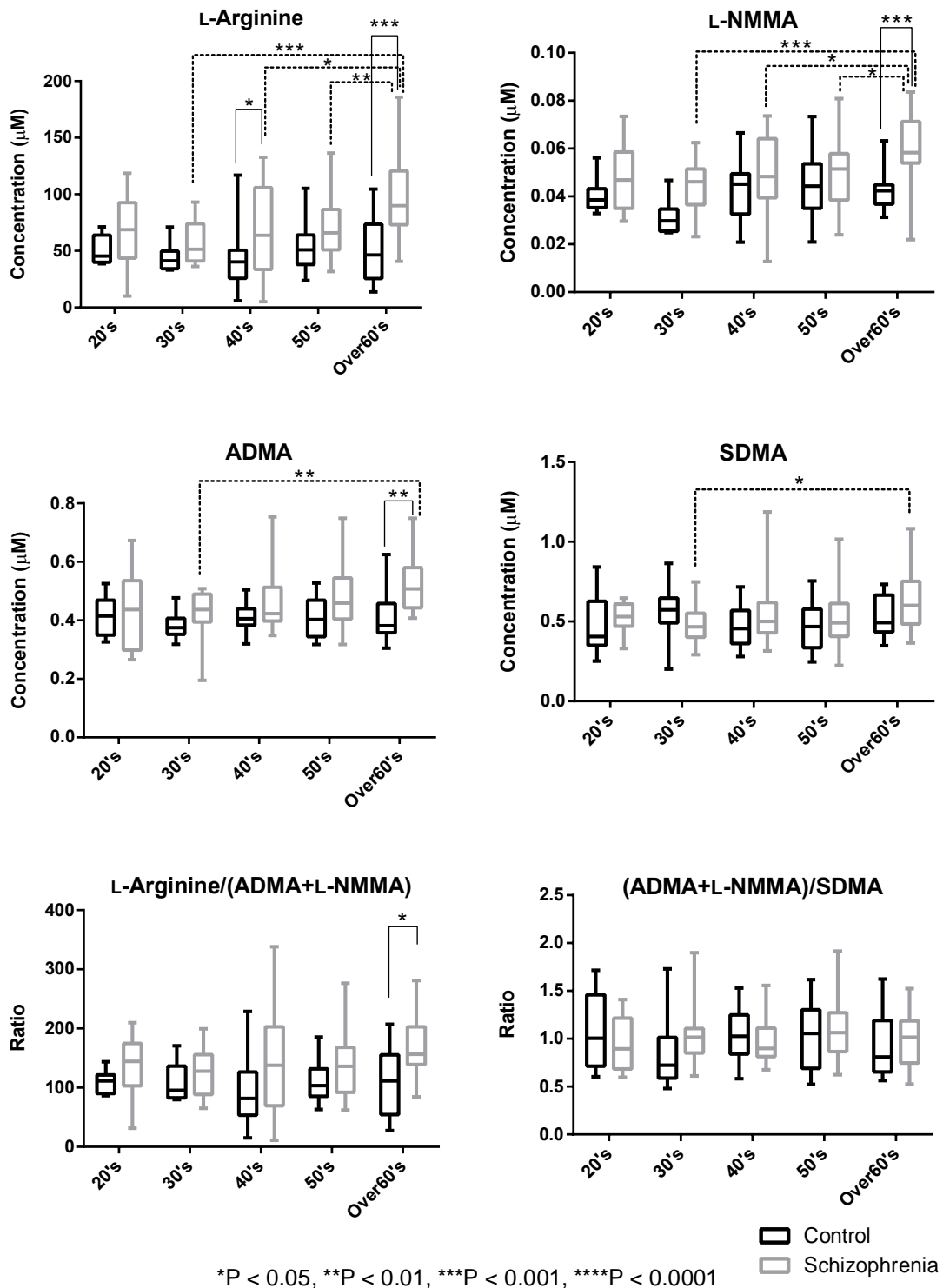


Figure 30. 統合失調症患者におけるメチルアルギニン類濃度 (年代別解析)

3.3.5. 統合失調症患者におけるメチルアルギニン類濃度（薬剤投与量別解析）

薬剤投与量別に統合失調症患者と健常者の血漿中メチルアルギニン類濃度を比較した。患者ごとに治療薬が異なるため、薬剤投与量の比較には1日投与量のクロルプロマジン換算^a（CPEq：クロルプロマジン 100 mg と抗精神病効果が等しくなる各薬剤の用量）を用いた。用量は、300 mg 未満（<300：至適用量未満）、300 以上 600 mg 以下（300-600：至適用量）、600 mg を超えて 1000 mg 以下（600<-1000：至適用量を少し超える）、1000 mg を超える（1000<：過剰投与の可能性あり）の4群に大別した。

L-Arginine は全ての投与量の患者で健常者と比べて有意な上昇が認められた。ADMA では CPEq 600 mg を超えて 1000 mg 以下（600<-1000：至適用量を少し超える）の群を除く用量の患者で健常者と比べて有意な上昇が認められたが、CPEq 600 mg を超えて 1000 mg 以下の群でも健常者と比べて血漿中 ADMA 濃度は約 7% 上昇しており用量相関性はなかったことから、血漿中 ADMA 濃度上昇に薬剤投与量による明らかな違いはないと考えられた。L-Arginine/(ADMA+L-NMMA)では CPEq 300 mg 未満（<300：至適用量未満）を除く用量の患者で健常者と比べて有意な上昇が認められた。L-NMMA においては、CPEq が 1000 mg を超える場合に健常者と比べて有意な上昇が認められたが、血漿中 L-NMMA 濃度の平均値は他の投与量群と同等であり、またごく低濃度で健常者の平均値とほとんど変わらないことから生物学的に意義のない変動であると考えられた。SDMA および (ADMA+L-NMMA)/SDMA においては、いずれの用量でも健常者と比較して有意差はみられなかった（Table 12, Figure 31）。

^a 「向精神薬の等価換算」 稲垣中 稲田俊也 藤井康男 八木剛平 吉尾隆 中村博幸 山内惟光著 星和書店

Table 12. メチルアルギニン類濃度（投与量別，健常者 vs 統合失調症患者）

	群	CPEq	L-Arginine	L-NMMA	ADMA	SDMA	Arg/(ADMA+MMA)	(ADMA+MMA)/SDMA
		(mg/day)					Ratio	Ratio
健常者	NA	0	48 ± 21	0.04 ± 0.01	0.41 ± 0.07	0.49 ± 0.15	106 ± 44	1.01 ± 0.35
	(N=63)	NA	(66117)	(0.02 - 0.07)	(0.30 - 0.63)	(0.20 - 0.86)	(175 ó 229)	(0.48 - 1.73)
患者 ^a	<300	186 ± 70	69 ± 33**	0.05 ± 0.02	0.48 ± 0.10***	0.54 ± 0.22	129 ± 55	1.01 ± 0.35
	(N=18)	(50 ó 268)	(5 ó 125)	(0.02 - 0.07)	(0.35 - 0.75)	(0.22 ó 1.08)	(11 ó 215)	(0.53 - 1.82)
	300-600	444 ± 100	71 ± 34****	0.05 ± 0.01	0.49 ± 0.12****	0.54 ± 0.18	131 ± 45*	1.07 ± 0.34
	(N=30)	(300 ó 600)	(29 ó 186)	(0.02 - 0.08)	(0.27 - 0.75)	(0.29 ó 1.19)	(37 ó 238)	(0.62 - 1.92)
	600<-1000	773 ± 132	65 ± 27**	0.05 ± 0.01	0.44 ± 0.10	0.55 ± 0.12	134 ± 49*	0.90 ± 0.22
(N=24)	(606 ó 1000)	(10 ó 116)	(0.03 - 0.07)	(0.20 - 0.68)	(0.20 - 0.68)	(32 ó 210)	(0.60 - 1.31)	
1000<	1624 ± 499	89 ± 31****	0.05 ± 0.01****	0.49 ± 0.10****	0.55 ± 0.16	166 ± 68****	1.05 ± 0.26	
(N=29)	(1025 ó 3038)	(35 ó 151)	(0.01 - 0.08)	(0.32 - 0.75)	(0.25 ó 1.02)	(75 ó 338)	(0.64 - 1.77)	

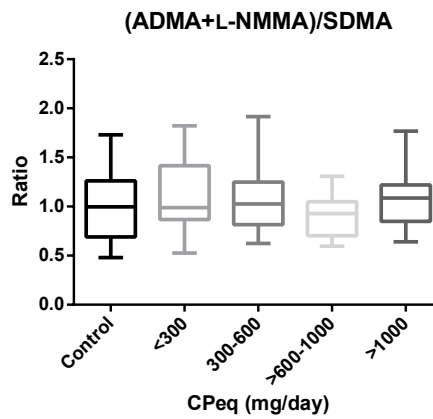
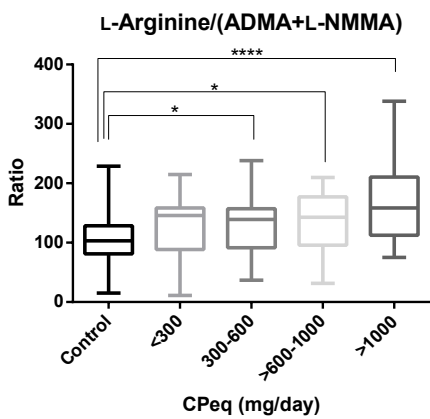
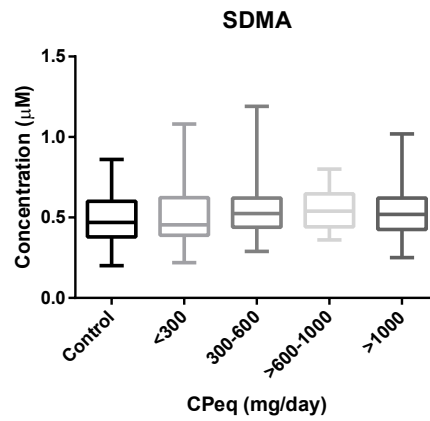
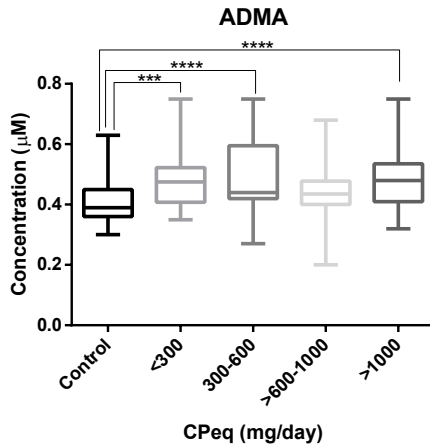
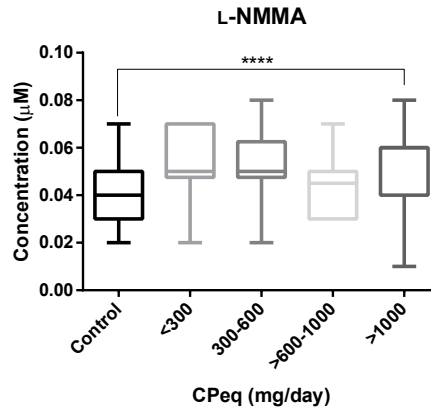
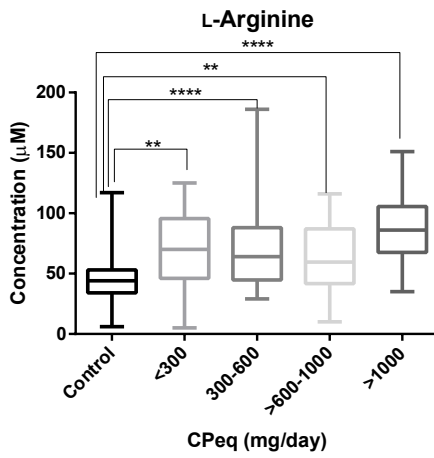
*P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001, ****P < 0.0001

Mean ± SD(μM)

NA=Not Applicable, MMA=L-NMMA

(Min ó Max)

a: 3例の患者（25歳女性，53歳女性，56歳男性）の薬剤情報は得られなかった



*P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001, ****P < 0.0001

Figure 31. 統合失調症患者におけるメチルアルギニン類濃度（投与用量別解析）

3.3.6. 統合失調症患者におけるメチルアルギニン類濃度（循環器疾患の罹病歴に基づく比較）

メチルアルギニン類が特に増加（健常者の上限値を超える）した患者の罹病歴を調査したところ、身体症状は深刻な状態にはなく良くコントロールされているものの、糖尿病、高血圧または高脂血症などの循環器疾患に罹病している患者が数名（n=6）含まれていた。

循環器疾患の罹病歴のある患者と、統合失調症患者全体の血漿中メチルアルギニン類濃度を比較したところ、循環器疾患の罹病歴のある患者では統合失調症患者全体と比べて L-NMMA および ADMA の有意な上昇が認められた（Table 13, Figure 32）。

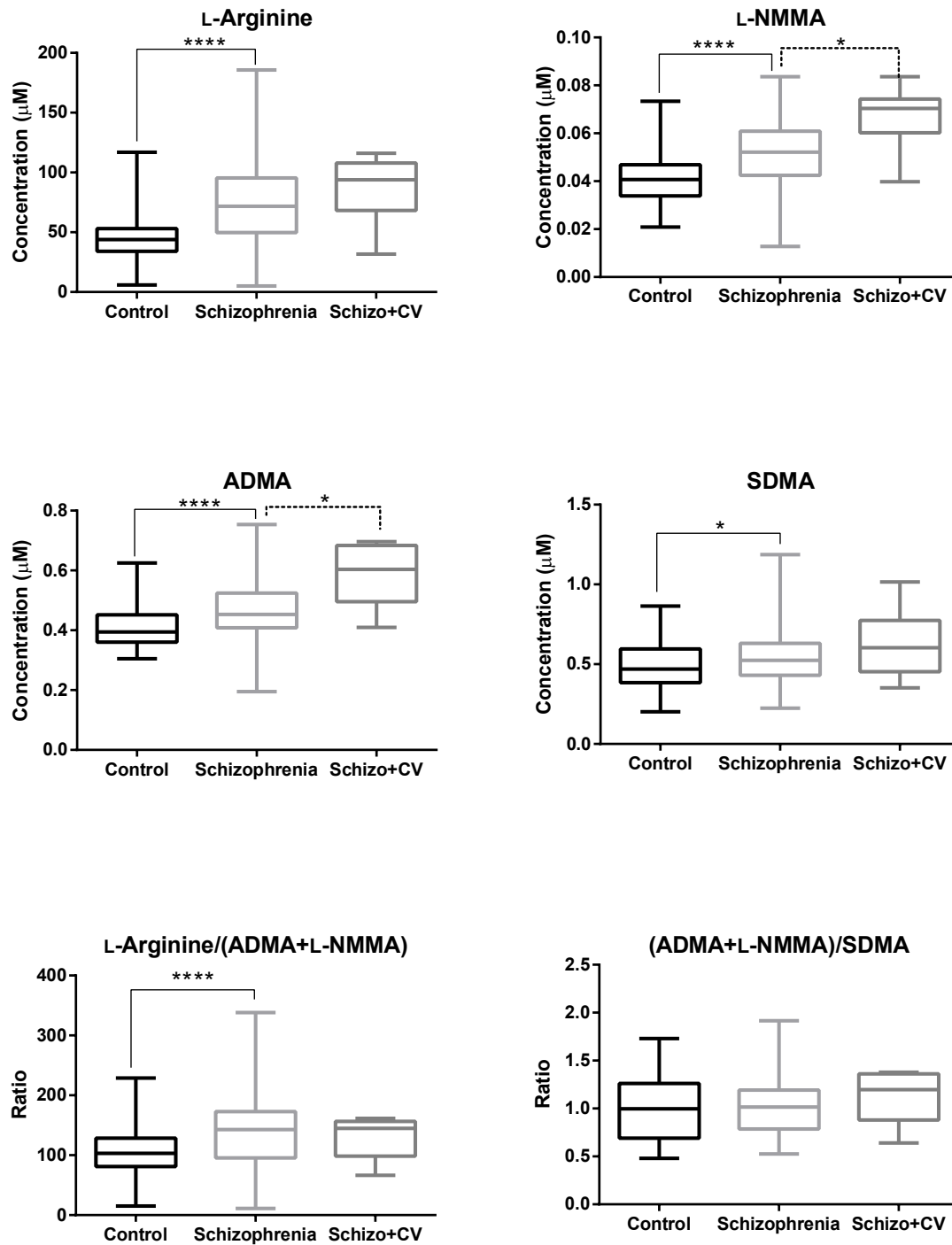
Table 13. メチルアルギニン類濃度 (統合失調症患者 vs 循環器疾患の罹病歴のある患者)

群	Age (year)	Arg	L-NMMA	ADMA	SDMA	Arg/(ADMA+MMA) Ratio	(ADMA+MMA)/SDMA Ratio
健常者 (N=63)	47.8 ± 12.3 (24 ó 68)	48 ± 21 (6 ó 117)	0.04 ± 0.01 (0.02 - 0.07)	0.41 ± 0.07 (0.30 - 0.63)	0.49 ± 0.15 (0.20 - 0.86)	106 ± 44 (15 ó 229)	1.01 ± 0.35 (0.48 - 1.73)
患者 (N=101)	50.3 ± 13.8 (20 ó 81)	74 ± 32**** (5 ó 186)	0.05 ± 0.01**** (0.01 - 0.08)	0.48 ± 0.11**** (0.20 - 0.75)	0.55 ± 0.17* (0.22 - 1.19)	142 ± 57**** (11 ó 338)	1.03 ± 0.30 (0.53 - 1.92)
CV罹病歴 (N=6)	59.7 ± 2.9 (55 ó 64)	87 ± 30 (32 ó 116)	0.07 ± 0.01(*) (0.04 - 0.08)	0.59 ± 0.11(*) (0.41 - 0.70)	0.63 ± 0.23 (0.35 - 1.02)	130 ± 37 (67 ó 161)	1.12 ± 0.28 (0.64 - 1.38)

*P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001, ****P < 0.0001 (患者と CV 罹病歴のある患者との比較は括弧で示す)

MMA=L-NMMA, CV=循環器疾患罹病歴のある統合失調症患者

Mean ± SD(μM)
(Min ó Max)



*P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001, ****P < 0.0001

Figure 32. 統合失調症患者におけるメチルアルギニン類濃度（罹病歴に基づく解析）

3.4. まとめと考察

本検討においては、薬物治療中の統合失調症患者の血漿中 L-NMMA, ADMA および SDMA 濃度の有意な上昇が認められた。さらに年代別に比較したところ、60 代以上の患者では同年代の対照群と比べて L-NMMA および ADMA 濃度の有意な増加が認められ、年代が上昇するにつれて血漿中メチルアルギニン類濃度の増加傾向がみられた。さらに、対照群のメチルアルギニン類濃度の上限値を超える増加が認められた患者についてその背景を調べたところ、身体症状は深刻な状態ではなく良くコントロールされているものの、糖尿病、高血圧または高脂血症などの循環器疾患に罹病している患者が数名含まれていたことが明らかになった。またこれまでに、Das らおよび Celik らは、薬物未治療の患者または最後の投薬から少なくとも 3 か月以上の未治療期間のある患者の血漿中 ADMA 濃度が上昇していると報告している[100,101]。これらのことから、患者のメチルアルギニン類濃度の増加傾向は、統合失調症とともに循環器疾患の罹病歴が関係している可能性が考えられた。年代別解析では、循環器疾患などのリスクの高まる 60 代以上の患者を除いて、統合失調症患者の血漿中メチルアルギニン類濃度に有意差はみられなかったことから、薬剤投与により血漿中メチルアルギニン類濃度が減少した可能性も考えられた。さらに、統計学的に有意な上昇がみられたものの、60 代以上の患者を含めた全ての統合失調症患者のメチルアルギニン類濃度は、L-NMMA は極めて低濃度 (0.1 μM 未満) で平均値比較ではほとんど健常者との差はみられず[30]、また ADMA は背景データの範囲 (0.39-0.63 μM , n=2311) [71]であり、Das らや Celik らの報告 (ADMA は健常者の 1.4 倍~3.8 倍増加) ほどの顕著な増加は認められていない。加えて SDMA は全体比較でわずかに有意な上昇が認められたものの、背景データの範囲(0.38-0.73 μM , n=2311) [71]にあり、性別、年代別および薬剤投与量別の比較ではいずれも有意な上昇は認められておらず、薬物未治療の統合失調症患者血漿においても SDMA は上昇しないと報告されている[100]。また、ADMA 分解の指標となる $\text{ADMA}/\text{SDMA}^{\text{a}}$ は、薬剤未治療の統合失調症患者では健常者と比べて約 2.4 倍上昇していたが[100]、薬剤治療中で急性期にない統合失調症患者における $(\text{ADMA} + \text{L-NMMA})/\text{SDMA}$ は、いずれの比較においても変化は認められなかった。さらに Das らは、小規模で統計学的有意差はみられなかったものの、薬物治療によって

^a L-NMMA 濃度は測定されていない。

統合失調症患者の ADMA 濃度が低下したとも報告していることから、薬剤治療により統合失調症患者の血漿中メチルアルギニン類濃度が減少している可能性が考えられた。

薬物治療中の統合失調症患者の血漿中 L-Arginine 濃度は、いずれの比較においても対照群と比べて上昇傾向がみられた。一般的に、血漿中 L-Arginine 濃度の正常範囲は広く、加齢による影響はみられないことが知られている[102]。NO の生体内利用率を示唆する L-Arginine/(ADMA+ L-NMMA) も同様に、全体比較では対照群と比べて統合失調症患者で高い傾向がみられ、投与量別比較では 300 mg (至適用量) 以上で有意に上昇したものの、300 mg 未満 (至適用量未満) では有意な上昇はみられなかった。Das らは、血中の NO 量の指標となる血漿中 NO 代謝物濃度について検討したところ、薬物未治療の統合失調症患者では対照群と比べて NO 代謝物濃度は低値であり、一方で薬物治療後には対照群と同程度であったことを報告している。統合失調症患者では遺伝子変異や発現量の変化などにより NO 産生が低下し、L-Arginine の細胞内取り込みが停滞することで L-Arginine 血漿中濃度が上昇した可能性も考えられるが、本検討における統合失調症患者では急性症状がみられていないことから、統合失調症患者でみられた血漿中 L-Arginine 濃度および L-Arginine/(ADMA+ L-NMMA) の上昇傾向は、薬物治療による病状の回復を示す過程を示している可能性が考えられる。

これらの結果および関連する参考文献情報をまとめると、薬物未治療または薬物治療を 3 か月以上行っていない統合失調症患者では ADMA 濃度が上昇するが、薬物治療により ADMA 濃度が低下した一方で L-Arginine 濃度は上昇し、ゆえに NO の生体内利用率が上昇すると推察される。この仮説を支持する多くの知見があり、統合失調症患者では血漿中の NO および NO 代謝物レベルが低下している一方で[96-98]、薬物治療により統合失調症患者の NO レベルが上昇すると報告されている[103,104]。このメカニズムについて NMDA-NO-cGMP 経路および酸化ストレスとメチルアルギニン類との関連性を踏まえて以下に考察する。統合失調症において NMDA 型グルタミン酸受容体の機能低下が統合失調症の発症に関与していることが示唆されている[90-92]。神経系においては、グルタミン酸の NMDA 受容体刺激によってカルシウムが細胞内に流入し、カルシウムがカルモジュリンに結合することで NOS が活性化して NO の産生が誘導される。さらに NO がシナプス間隙を逆行し、シナプス前終末における cGMP の産生を促すという、NMDA-NO-cGMP 経路がグルタミン酸やドパミンなどの神経伝達物質の放出を制御していることが明らかにされている[93]。この経路が統合失調症の発症に重要な役割を果たしていると考えられることから、NMDA-NO-cGMP 経路は統合失調症の治療の

ターゲットとなる可能性がある。実際に、統合失調症の急性期の症状が NO 供与体であるニトロプルシッド・ナトリウムの静脈注射によって急速に改善したとの報告がある[105]。さらに、リチウムは中枢神経系において NMDA 受容体阻害を介したカルシウム流入による興奮毒性から神経を保護する作用を有することから、統合失調症患者の治療として長期間のリチウム投与が提案されている[106,107]。これらの報告と一致して、双極性鬱病患者（統合失調症患者と共通の症状を有する）に対してリチウム治療を行ったところ、NO が有意に上昇したとの報告がある[108]。これらの報告ならびに本検討で薬物投与中の統合失調症患者血漿における L-Arginine/(ADMA+L-NMMA)の上昇傾向が認められたことから、薬物治療により NO の生体内利用率が増加した可能性が考えられる。

酸化ストレスは鬱、不安障害、双極性障害および統合失調症などの精神疾患の発症もしくは進展に関連があることが報告されている[109]。また酸化ストレスの亢進ならびに抗酸化防御の低下が、統合失調症の発症に影響していることが示唆されている[110]。さらに、抗精神病薬を投与された患者では、抗酸化活性が投与前と比べて有意に上昇したとの報告もある[111]。酸化ストレスにより PRMT の活性が上昇し、血漿中 ADMA 濃度が上昇することが知られていることから[17,19,18,112-115]、これらの文献情報は今回の結果と一致していると考えられる。さらに、ADMA 誘発性の酸化ストレスは L-NMMA および ADMA の分解酵素である DDAH 活性の低下を伴うが[19,116]、本検討では L-NMMA および ADMA の分解の指標である (ADMA+L-NMMA)/SDMA に変化は認められていない。Das らの報告においては、薬剤未治療の統合失調症患者では健常者と比べて ADMA/SDMA が約 2.4 倍上昇していたことから[100]、今回は薬物治療により酸化ストレスが減少したことにより、PRMT によるタンパク質のメチル化が減少し、また DDAH による分解活性が回復し、遊離の L-NMMA および ADMA が減少した可能性が示唆される。

これらの結果および考察に基づくと、NMDA-NO-cGMP 経路の制御に加えて、内因性の NOS 阻害物質であるメチルアルギニン類も、統合失調症の発症および進展に関与している可能性が考えられる。さらに、NO の生体内利用率の指標である L-Arginine/(ADMA+L-NMMA)および L-NMMA および ADMA の分解の指標である (ADMA+L-NMMA)/SDMA は、統合失調症患者における症状改善の指標として利用できる可能性も示唆された。

4. 総括

チューブ型スピнкаラムを用いた前処理法の簡便化，蛍光誘導体化試薬として NBD-F を用いた高感度化および高分離可能なモノリス型シリカカラムを用いた高速化を検討し，3 種メチルアルギニン類を 20 分以内で同時測定する HPLC 分析法を確立した。さらに，確立した分析法を用いて統合失調症患者の血漿中メチルアルギニン類濃度を測定し，本法が臨床応用可能であることを実証し，健常者の血漿中濃度と比較し，バイオマーカーとして有用である可能性を明らかにした。今後，本測定法が統合失調症のみならず多くの疾患の病態の解明の一助となることが期待される。

5. 論文および学会発表の実績

5.1. 査読付き論文

- (1) Nonaka S, Sekine M, Tsunoda M, Ozeki Y, Fujii K, Akiyama K, Shimoda K, Furuchi T, Katane M, Saitoh Y, Homma H. Simultaneous determination of N^G -monomethyl-L-arginine, N^G , N^G -dimethyl-L-arginine, N^G , N^G -dimethyl-L-arginine, and L-arginine using monolithic silica disk-packed spin columns and a monolithic silica column. *J Sep Sci.* 2014;37(16):2087-94.
- (2) Nonaka S, Sekine M, Ozeki Y, Fujii K, Akiyama K, Shimoda K, Tsunoda M, Katane M, Saitoh Y, Miyamoto T, Homma H. Plasma concentrations of three methylated arginines, endogenous nitric oxide synthase inhibitors, in schizophrenia patients with antipsychotic drug treatment. *In preparation.*

5.2. 参考論文

- (1) Nonaka S, Tsunoda M, Imai K, Funatsu T. High-performance liquid chromatographic assay of N^G -monomethyl-L-arginine, N^G , N^G -dimethyl-L-arginine, and N^G , N^G -dimethyl-L-arginine using 4-fluoro-7-nitro-2, 1,3-benzoxadiazole as a fluorescent reagent. *J Chromatogr A.* 2005;1066(1-2):41-5.
- (2) Tsunoda M, Nonaka S, Funatsu T. Determination of methylated arginines by column-switching high-performance liquid chromatography-fluorescence detection. *Analyst.* 2005;130(10):1410-3.
- (3) Nonaka S, Tsunoda M, Aoyama C, Funatsu T. Determination of N^G , N^G -dimethyl-L-arginine in rat plasma and dimethylarginine dimethylaminohydrolase activity in rat kidney using a monolithic silica column. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2006;843(2):170-4.

5.3. 学会発表

- (1) 野中 聖子, 角田 誠, 関根 正恵, 本間 浩. HPLC-蛍光検出法を用いたメチルアルギニン類の高感度定量法の開発及び応用. 第9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 2011 (箱根) 2011. 9.12. 要旨集 p7
- (2) 野中 聖子, 関根 正恵, 角田 誠, 本間 浩. HPLC-蛍光検出法を用いたメチルアルギニン類の高感度定量法の開発. 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(PPF) 2012 (京都) 2012.8.6. 要旨集 p23

- (3) 野中 聖子, 関根 正恵, 角田 誠, 片根 真澄, 齋藤 康昭, 宮本 哲也, 本間 浩. HPLC-蛍光検出法を用いたメチルアルギニン類の高感度定量法の開発. 日本薬学会第 134 年会 (熊本) 2014.

3.28. 要旨集 DVD

- (4) 野中 聖子, 関根 正恵, 角田 誠, 尾関 祐二, 藤井 久彌子, 秋山 一文, 下田 和孝, 片根 真澄, 齋藤 康昭, 宮本 哲也, 本間 浩. HPLC-蛍光検出法を用いたメチルアルギニン類の高感度定量法の開発および統合失調症患者血漿サンプル測定への応用. 第 27 回バイオメディカル分析科学シンポジウム (東京) 2014.8.20. 要旨集 p226-227

- (5) 野中 聖子, 関根 正恵, 角田 誠, 尾関 祐二, 藤井 久彌子, 秋山 一文, 下田 和孝, 片根 真澄, 齋藤 康昭, 宮本 哲也, 本間 浩. NBD-F を用いたメチルアルギニン類の高感度 HPLC-蛍光検出法の開発および統合失調症患者血漿サンプル測定への応用. 新アミノ酸分析研究会第 4 回学術講演会 (東京) 2014.11.17 要旨集 p31-32

6. 参考文献

- [1] Morris SM Jr. Arginine metabolism: enzymology, nutrition, and clinical significance. *Enzymes of Arginine Metabolism. J Nutr.* 2004;134(10):2743S-7S.
- [2] Moncada S, Higgs A. The L-arginine-nitric oxide pathway. *N Engl J Med.* 1993;329(27):2002-12.
- [3] Rees DD, Palmer RM, Moncada S. Role of endothelium-derived nitric oxide in the regulation of blood pressure. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1989;86(9):3375-8.
- [4] Cooke JP, Singer AH, Tsao P, et al. Antiatherogenic effects of L-arginine in the hypercholesterolemic rabbit. *J Clin Invest.* 1992;90(3):1168-72.
- [5] Tsao PS, McEvoy LM, Drexler H, et al. Enhanced endothelial adhesiveness in hypercholesterolemia is attenuated by L-arginine. *Circulation.* 1994;89(5):2176-82.
- [6] Cayatte AJ, Palacino JJ, Horten K, et al. Chronic inhibition of nitric oxide production accelerates neointima formation and impairs endothelial function in hypercholesterolemic rabbits. *Arterioscler Thromb.* 1994;14(5):753-9.
- [7] Vallance P, Leone A, Calver A, et al. Endogenous dimethylarginine as an inhibitor of nitric oxide synthesis. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1992;20 Suppl 12:S60-2.
- [8] Leiper J, Vallance P. Biological significance of endogenous methylarginines that inhibit nitric oxide synthases. *Cardiovasc Res.* 1999;43(3):542-8.
- [9] Cooke JP. Does ADMA cause endothelial dysfunction? *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000;20(9):2032-7.
- [10] Closs EI, Basha FZ, Habermeier A, et al. Interference of L-arginine analogues with L-arginine transport mediated by the y⁺ carrier hCAT-2B. *Nitric Oxide.* 1997;1(1):65-73.
- [11] Bouras G, Deftereos S, Tousoulis D, et al. Asymmetric Dimethylarginine (ADMA): A Promising Biomarker for Cardiovascular Disease? *Curr Top Med Chem.* 2013;13(2):180-200.
- [12] Nickovi V, Nikoli J, Djindji N, et al. Diagnostical significance of dimethylarginine in the development of hepatorenal syndrome in patients with alcoholic liver cirrhosis. *Vojnosanit Pregl.* 2012;69(8):686-91.
- [13] Wnuk Z, Kokot F, Kunsdorf-Wnuk A. Diagnostic value of plasma asymmetric and symmetric dimethylarginine levels in liver transplant recipients. *Pol Arch Med Wewn.* 2012;122(7-8):367-73.

- [14] Wang S, Vicente FB, Miller A, et al. Measurement of arginine derivatives in pediatric patients with chronic kidney disease using high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Clin Chem Lab Med.* 2007;45(10):1305-12.
- [15] Fogarty RD, Abhary S, Javadiyan S, et al. Relationship between DDAH gene variants and serum ADMA level in individuals with type 1 diabetes. *J Diabetes Complications.* 2012;26(3):195-8.
- [16] Tousoulis D, Kampoli AM, Stefanadis C. Diabetes mellitus and vascular endothelial dysfunction: current perspectives. *Curr Vasc Pharmacol.* 2012;10(1):19-32.
- [17] Sydow K, Schwedhelm E, Arakawa N, et al. ADMA and oxidative stress are responsible for endothelial dysfunction in hyperhomocyst(e)inemia: effects of L-arginine and B vitamins. *Cardiovasc Res.* 2003;57(1):244-52.
- [18] Böger RH, Sydow K, Borlak J, et al. LDL cholesterol upregulates synthesis of asymmetrical dimethylarginine in human endothelial cells: involvement of S-adenosylmethionine-dependent methyltransferases. *Circ Res.* 2000;87(2):99-105.
- [19] Lin KY, Ito A, Asagami T, et al. Impaired nitric oxide synthase pathway in diabetes mellitus: role of asymmetric dimethylarginine and dimethylarginine dimethylaminohydrolase. *Circulation.* 2002;106(8):987-92.
- [20] Reporter M, Corbin J. NG, NG - Dimethylarginine in myosin during muscle development. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1971;43: 644-50.
- [21] Paik WK, Kim S. Enzymatic methylation of protein fractions from calf thymus nuclei. *Biochem Biophys Res Commun.* 1967;29(1):14-20.
- [22] Kimoto M, Whitley GS, Tsuji H, et al. Detection of N^G , N^G -dimethylarginine dimethylaminohydrolase in human tissues using a monoclonal antibody. *J Biochem.* 1995;117(2):237-8.
- [23] Vallance P, Leone A, Calver A, et al. Accumulation of an endogenous inhibitor of nitric oxide synthesis in chronic renal failure. *Lancet.* 1992;339(8793):572-5.
- [24] Kleparnik M, Tomandlova M, Glatz Z, Tomandl J. Determination of asymmetric and symmetric dimethylarginines in human plasma by HPLC with electrochemical detection. *J Sep Sci.* 2013;36(23):3696-701.
- [25] Vishwanathan K, Tackett RL, Stewart JT, et al. Determination of arginine and methylated arginines in human plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl.* 2000;748(1):157-66.

- [26] Martens-Lobenhoffer J, Bode-Böger SM. Simultaneous detection of arginine, asymmetric dimethylarginine, symmetric dimethylarginine and citrulline in human plasma and urine applying liquid chromatography-mass spectrometry with very straightforward sample preparation. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2003;798(2):231-9.
- [27] Huang LF, Guo FQ, Liang YZ, et al. Simultaneous determination of L-arginine and its mono- and dimethylated metabolites in human plasma by high-performance liquid chromatography-mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem.* 2004;380(4):643-9.
- [28] Schwedhelm E, Maas R, Tan-Andresen J, Schulze F, Riederer U, Böger RH. High-throughput liquid chromatographic-tandem mass spectrometric determination of arginine and dimethylated arginine derivatives in human and mouse plasma. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2007;851(1-2):211-9.
- [29] Martens-Lobenhoffer J, Bode-Böger SM. Fast and efficient determination of arginine, symmetric dimethylarginine, and asymmetric dimethylarginine in biological fluids by hydrophilic-interaction liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. *Clin Chem.* 2006;52(3):488-93.
- [30] Di Gangi IM, Chiandetti L, Gucciardi A, et al. Simultaneous quantitative determination of N^G , N^G -dimethyl-L-arginine or asymmetric dimethylarginine and related pathway's metabolites in biological fluids by ultrahigh-performance liquid chromatography/electrospray ionization-tandem mass spectrometry. *Anal Chim Acta.* 2010;677(2):140-8.
- [31] Yi L, Zhang P, Ji X, et al. Quantitation of L-arginine and asymmetric dimethylarginine in human plasma by LC-selective ion mode-MS for Type 2 diabetes mellitus study. *Chem Pharm Bull (Tokyo).* 2011;59(7):839-43.
- [32] Chae JW, Baek IH, Kang W, Kwon KI. Simultaneous determination of L-arginine, asymmetric dimethylarginine, and symmetric dimethylarginine in the plasma of rodents with LC-MS/MS. *Arzneimittelforschung.* 2011;61(6):340-6.
- [33] El-Khoury JM, Bunch DR, Reineks E, et al. A simple and fast liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for measurement of underivatized L-arginine, symmetric dimethylarginine, and asymmetric dimethylarginine and establishment of the reference ranges. *Anal Bioanal Chem.* 2012;402(2):771-9.
- [34] Davids M, Swieringa E, Palm F, et al. Simultaneous determination of asymmetric and symmetric dimethylarginine, L-monomethylarginine, L-arginine, and L-homoarginine in biological samples using stable isotope dilution liquid chromatography tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2012;900:38-47.
- [35] Di Gangi IM, Pirillo P, Carraro S, Gucciardi A, Naturale M, Baraldi E, Giordano G. Online trapping and enrichment ultra performance liquid chromatography-tandem mass

- spectrometry method for sensitive measurement of "arginine-asymmetric dimethylarginine cycle" biomarkers in human exhaled breath condensate. *Anal Chim Acta*. 2012;754:67-74.
- [36] Servillo L, Giovane A, D'Onofrio N, Casale R, Cautela D, Castaldo D, Balestrieri ML. Determination of homoarginine, arginine, NMMA, ADMA, and SDMA in biological samples by HPLC-ESI-mass spectrometry. *Int J Mol Sci*. 2013;14(10):20131-8.
- [37] Weaving G, Rocks BF, Bailey MP, Titheradge MA. Liquid chromatography: Is it essential for the determination of arginine and methylated arginines by tandem mass spectrometry? *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2009;877(27):3267-9.
- [38] Desiderio C, Rossetti DV, Messana I, et al. Analysis of arginine and methylated metabolites in human plasma by field amplified sample injection capillary electrophoresis tandem mass spectrometry. *Electrophoresis*. 2010;31(11):1894-902.
- [39] Zinellu A, Sotgia S, Usai MF, et al. Improved method for plasma ADMA, SDMA, and arginine quantification by field-amplified sample injection capillary electrophoresis UV detection. *Anal Bioanal Chem*. 2011;399(5):1815-21.
- [40] Avci E, Cakir E, Cevher SC, Yaman H, Agilli M, Bilgi C. Determination of oxidative stress and cellular inflammation in patients with diabetic nephropathy and non-diabetic nephropathy being administered hemodialysis treatment due to chronic renal failure. *Ren Fail*. 2014;36(5):767-73.
- [41] Lorin J, Guillaud JC, Korandji C, Touzery C, Bichat F, Chagnon A, Cottin Y, Rochette L, Vergely C, Zeller M. High levels of asymmetric dimethylarginine are strongly associated with low HDL in patients with acute myocardial infarction. *PLoS One*. 2013;8(6):e64796.
- [42] Taner A, Unlu A, Kayrak M, Tekinalp M, Ayhan SS, Ar,ba A, Erdem SS. The value of serum asymmetric dimethylarginine levels for the determination of masked hypertension in patients with diabetes mellitus. *Atherosclerosis*. 2013;228(2):432-7.
- [43] Hsu CP, Lin SJ, Chung MY, Lu TM. Asymmetric dimethylarginine predicts clinical outcomes in ischemic chronic heart failure. *Atherosclerosis*. 2012;225(2):504-10.
- [44] Chen BM, Xia LW, Zhao RQ. Determination of N^G , N^G -dimethylarginine in human plasma by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*. 1997;692(2):467-71.
- [45] Pettersson A, Uggla L, Backman V. Determination of dimethylated arginines in human plasma by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*. 1997;692(2):257-62.

- [46] Teerlink T, Nijveldt RJ, de Jong S, et al. Determination of arginine, asymmetric dimethylarginine, and symmetric dimethylarginine in human plasma and other biological samples by high-performance liquid chromatography. *Anal Biochem.* 2002;303(2):131-7.
- [47] Tsikas D, Junker W, Frölich JC. Determination of dimethylated arginines in human plasma by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl.* 1998;705(1):174-6.
- [48] Pi J, Kumagai Y, Sun G, et al. Improved method for simultaneous determination of L-arginine and its mono- and dimethylated metabolites in biological samples by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl.* 2000;742(1):199-203.
- [49] Dobashi Y, Santa T, Nakagomi K, et al. An automated analyzer for methylated arginines in rat plasma by high-performance liquid chromatography with post-column fluorescence reaction. *Analyst.* 2002;127(1):54-9.
- [50] Zhang WZ, Kaye DM. Simultaneous determination of arginine and seven metabolites in plasma by reversed-phase liquid chromatography with a time-controlled ortho-phthaldialdehyde precolumn derivatization. *Anal Biochem.* 2004;326(1):87-92.
- [51] Teerlink T. Determination of the endogenous nitric oxide synthase inhibitor asymmetric dimethylarginine in biological samples by HPLC. *Methods Mol Med.* 2005;108:263-74.
- [52] Bulau P, Zakrzewicz D, Kitowska K, Wardega B, Kreuder J, Eickelberg O. Quantitative assessment of arginine methylation in free versus protein-incorporated amino acids in vitro and in vivo using protein hydrolysis and high-performance liquid chromatography. *Biotechniques.* 2006 Mar;40(3):305-10.
- [53] de Jong S, Teerlink T. Analysis of asymmetric dimethylarginine in plasma by HPLC using a monolithic column. *Anal Biochem.* 2006;353(2):287-9.
- [54] Markowski P, Baranowska I, Baranowski J. Simultaneous determination of L-arginine and 12 molecules participating in its metabolic cycle by gradient RP-HPLC method: application to human urine samples. *Anal Chim Acta.* 2007;605(2):205-17.
- [55] Blackwell S, O'Reilly DS, Talwar DK. HPLC analysis of asymmetric dimethylarginine (ADMA) and related arginine metabolites in human plasma using a novel non-endogenous internal standard. *Clin Chim Acta.* 2009;401(1-2):14-9.
- [56] Ivanova M, Artusi C, Boffa GM, et al. HPLC determination of plasma dimethylarginines: method validation and preliminary clinical application. *Clin Chim Acta.* 2010;411(21-22):1632-6.

- [57] Marra M, Bonfigli AR, Testa R, et al. High-performance liquid chromatographic assay of asymmetric dimethylarginine, symmetric dimethylarginine, and arginine in human plasma by derivatization with naphthalene-2,3-dicarboxaldehyde. *Anal Biochem.* 2003;318(1):13-7.
- [58] Anderstam B, Katzarski K, Bergström J. Serum levels of N^G , N^G -dimethyl-L-arginine, a potential endogenous nitric oxide inhibitor in dialysis patients. *J Am Soc Nephrol.* 1997;8(9):1437-42.
- [59] Heresztyn T, Worthley MI, Horowitz JD. Determination of L-arginine and N^G , N^G - and N^G , N^G '-dimethyl-L-arginine in plasma by liquid chromatography as AccQ-Fluor fluorescent derivatives. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2004;805(2):325-9.
- [60] Jones CE, Darcy CJ, Woodberry T, et al. HPLC analysis of asymmetric dimethylarginine, symmetric dimethylarginine, homoarginine and arginine in small plasma volumes using a Gemini-NX column at high pH. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2010;878(1):8-12.
- [61] Ueno S, Sano A, Kotani K, et al. Distribution of free methylarginines in rat tissues and in the bovine brain. *J Neurochem.* 1992;59(6):2012-6.
- [62] Nonaka S, Tsunoda M, Imai K, et al. High-performance liquid chromatographic assay of N^G -monomethyl-L-arginine, N^G , N^G -dimethyl-L-arginine, and N^G , N^G -dimethyl-L-arginine using 4-fluoro-7-nitro-2, 1,3-benzoxadiazole as a fluorescent reagent. *J Chromatogr A.* 2005;1066(1-2):41-5.
- [63] Tsunoda M, Nonaka S, Funatsu T. Determination of methylated arginines by lumn-switching high-performance liquid chromatography-fluorescence detection. *Analyst.* 2005;130(10):1410-3.
- [64] Nonaka S, Tsunoda M, Aoyama C, et al. Determination of N^G , N^G -dimethyl-L-arginine in rat plasma and dimethylarginine dimethylaminohydrolase activity in rat kidney using a monolithic silica column. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2006;843(2):170-4.
- [65] Svec F. Preparation and HPLC applications of rigid macroporous organic polymer monoliths. *J Sep Sci.* 2004;27(10-11):747-66.
- [66] Miyabe K, Guiochon G. Characterization of monolithic columns for HPLC. *J Sep Sci.* 2004;27(10-11):853-73.
- [67] Nováková L, Matysová L, Solichová D, et al. Comparison of performance of C18 monolithic rod columns and conventional C18 particle-packed columns in liquid chromatographic determination of Estrogel and Ketoprofen gel. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2004 ;813(1-2):191-7.

- [68] Song Y, Funatsu T, Tsunoda M. Amino acids analysis using a monolithic silica column after derivatization with 4-fluoro-7-nitro-2,1,3-benzoxadiazole (NBD-F). *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2011;879(5-6):335-40.
- [69] Song Y, Funatsu T, Tsunoda M. Rapid determination of amino acids in biological samples using a monolithic silica column. *Amino Acids.* 2012;42(5):1897-902.
- [70] Hsu CN, Huang LT, Lau YT, Lin CY, Tain YL. The combined ratios of L-arginine and asymmetric and symmetric dimethylarginine as biomarkers in spontaneously hypertensive rats. *Transl Res.* 2012;159(2):90-8.
- [71] Teerlink T. HPLC analysis of ADMA and other methylated L-arginine analogs in biological fluids. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2007 ;851(1-2):21-9.
- [72] Nonaka S, Sekine M, Tsunoda M, et al. Simultaneous determination of N^G -monomethyl-L-arginine, N^G , N^G -dimethyl-L-arginine, N^G , $N^{G\omega}$ -dimethyl-L-arginine, and L-arginine using monolithic silica disk-packed spin columns and a monolithic silica column. *J Sep Sci.* 2014;37(16):2087-94.
- [73] Yoshimatsu M, Toyokawa G, Hayami S, et al. Dysregulation of PRMT1 and PRMT6, Type I arginine methyltransferases, is involved in various types of human cancers. *Int J Cancer.* 2011;128(3):562-73.
- [74] Szoćysek-Boćyś I, Sobczak A, Król D. The influence of tobacco smoke on plasma atherogenic compounds levels in active smokers (preliminary report). *Przegl Lek.* 2006;63(10):979-84.
- [75] Goralczyk T, Tisonczyk J, Fijorek K, et al. High tea and vegetable consumption is associated with low ADMA generation in older healthy subjects. *Metabolism.* 2012;61(8):1171-6.
- [76] Moncada S, Higgs EA. Molecular mechanisms and therapeutic strategies related to nitric oxide. *FASEB J.* 1995;9(13):1319-30.
- [77] Miyazaki H, Matsuoka H, Cooke JP, Usui M, Ueda S, Okuda S, Imaizumi T. Endogenous nitric oxide synthase inhibitor: a novel marker of atherosclerosis. *J Cardiol.* 1999;33(2):105-6.
- [78] Lundman P, Eriksson MJ, Stühlinger M, Cooke JP, Hamsten A, Tornvall P. Mild-to-moderate hypertriglyceridemia in young men is associated with endothelial dysfunction and increased plasma concentrations of asymmetric dimethylarginine. *J Am Coll Cardiol.* 2001;38(1):111-6.
- [79] Prast H, Philippu A. Nitric oxide as modulator of neuronal function. *Prog Neurobiol.* 2001;64(1):51-68.

- [80] Faraci FM, Brian JE Jr. Nitric oxide and the cerebral circulation. *Stroke*.1994 ;25(3):692-703.
- [81] Stefano, G.B., 2003. Biomedical Significance of Nitric Oxide. Medical Science International Co. Ltd, Warsaw-New York.
- [82] Nakajima T, Matsuoka Y, Kakimoto Y. Isolation and identification of N^G-monomethyl-, N^G, N^G-dimethyl-, and N^G, N^G-dimethylarginine from the hydrolysate of proteins of bovine brain. *Biochim Biophys Acta* 1971; 230: 212-22.
- [83] Kotani K, Ueno S, Sano A, Kakimoto Y. Isolation and identification of methylarginines from bovine brain. *J Neurochem*. 1992;58(3):1127-9.
- [84] McEvoy M, Schofield P, Smith W, Agho K, Mangoni AA, Soiza RL, Peel R, Attia J. Memory impairment is associated with serum methylarginines in older adults. *Curr Alzheimer Res*. 2014;11(1):97-106.
- [85] Asif M, Soiza RL, McEvoy M, Mangoni AA. Asymmetric dimethylarginine: a possible link between vascular disease and dementia. *Curr Alzheimer Res*. 2013;10(4):347-56.
- [86] Arlt S, Schwedhelm E, Kölsch H, Jahn H, Linnebank M, Smulders Y, Jessen F, Böger RH, Popp J. Dimethylarginines, homocysteine metabolism, and cerebrospinal fluid markers for Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis*. 2012;31(4):751-8.
- [87] Selley ML. Increased (E)-4-hydroxy-2-nonenal and asymmetric dimethylarginine concentrations and decreased nitric oxide concentrations in the plasma of patients with major depression. *J Affect Disord*. 2004;80(2-3):249-56.
- [88] McEvoy MA, Schofield P, Smith W, Agho K, Mangoni AA, Soiza RL, Peel R, Hancock S, Kelly B, Inder K, Carru C, Zinellu A, Attia J. Serum methylarginines and incident depression in a cohort of older adults. *J Affect Disord*. 2013;151(2):493-9.
- [89] Tanaka K. グルタミン酸トランスポーターと精神疾患. *日薬理誌 (Folia Pharmacol. Jpn.)* 2013; 142:291-6
- [90] Anticevic A, Gancsos M, Murray JD, Repovs G, Driesen NR, Ennis DJ, Niciu MJ, Morgan PT, Surti TS, Bloch MH, Ramani R, Smith MA, Wang XJ, Krystal JH, Corlett PR. NMDA receptor function in large-scale anticorrelated neural systems with implications for cognition and schizophrenia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012;109(41):16720-5.
- [91] Nishikawa T. Analysis of free D-serine in mammals and its biological relevance. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2011;879(29):3169-83.
- [92] Chumakov I, Blumenfeld M, Guerassimenko O, Cavarec L, Palicio M, Abderrahim H, Bougueleret L, Barry C, Tanaka H, La Rosa P, Puech A, Tahri N, Cohen-Akenine A,

- Delabrosse S, Lissarrague S, Picard FP, Maurice K, Essioux L, Millasseau P, Grel P, Debailleul V, Simon AM, Caterina D, Dufaure I, Malekzadeh K, Belova M, Luan JJ, Bouillot M, Sambucy JL, Primas G, Saumier M, Boubkiri N, Martin-Saumier S, Nasroune M, Peixoto H, Delaye A, Pinchot V, Bastucci M, Guillou S, Chevillon M, Sainz-Fuertes R, Meguenni S, Aurich-Costa J, Cherif D, Gimalac A, Van Duijn C, Gauvreau D, Ouellette G, Fortier I, Raelson J, Sherbatich T, Riazanskaia N, Rogaev E, Raeymaekers P, Aerssens J, Konings F, Luyten W, Macciardi F, Sham PC, Straub RE, Weinberger DR, Cohen N, Cohen D. Genetic and physiological data implicating the new human gene G72 and the gene for D-amino acid oxidase in schizophrenia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99(21):13675-80.
- [93] Oliveira JP, Lobão B, Machado-de-Sousa JP, Baker GB, Dursun S, Hallak JE.. Targeting the NMDA receptor-nitric oxide-cyclic GMP pathway to develop non-dopaminergic antipsychotic medications for schizophrenia. *Rev Bras Psiquiatr*. 2011;33(3):223-4.
- [94] Bloom FE. Advancing a neurodevelopmental origin for schizophrenia. *Arch Gen Psychiatry*. 1993;50(3):224-7.
- [95] Zhang XY, Zhou DF, Shen YC. Effects of risperidone and haloperidol on superoxide dismutase and nitric oxide in schizophrenia. *Neuropharmacology*. 2012;62(5-6):1928-34.
- [96] Akbarian S, Bunney WE Jr, Potkin SG, et al. Altered distribution of nicotinamide-adenine dinucleotide phosphate-diaphorase cells in frontal lobe of schizophrenics implies disturbances of cortical development. *Arch Gen Psychiatry*. 1993;50(3):169-77.
- [97] Das I, Khan NS, Puri BK, et al. Elevated platelet calcium mobilization and nitric oxide synthase activity may reflect abnormalities in schizophrenic brain. *Biochem Biophys Res Commun*. 1995;212(2):375-80.
- [98] Nakano Y, Yoshimura R, Nakano H, Ikenouchi-Sugita A, Hori H, Umene-Nakano W, Ueda N, Nakamura J. Association between plasma nitric oxide metabolites levels and negative symptoms of schizophrenia: a pilot study. *Hum Psychopharmacol*. 2010 Mar;25(2):139-44.
- [99] Bode-Böger SM, Scalera F, Ignarro LJ. The L-arginine paradox: Importance of the L-arginine/asymmetrical dimethylarginine ratio. *Pharmacol Ther*. 2007;114(3):295-306.
- [100] Das I, Khan NS, Puri BK, et al. Elevated endogenous nitric oxide synthase inhibitor in schizophrenic plasma may reflect abnormalities in brain nitric oxide production. *Neurosci Lett*. 1996;215(3):209-11.
- [101] Celik C, Cayci T, Ozdemir B, et al. Plasma asymmetric dimethylarginine (ADMA) concentrations in patients with first and multiple episode schizophrenia. *Psychiatry Res*. 2011;190(2-3):177-80.

- [102]Luiking YC, Engelen MP, Vissers YL, Deutz NE, Whole body citrulline production, but not arginine production, is increased with aging in healthy humans. *FASEB J.* 2006;20:A160
- [103]Minutolo G, Petralia A, Dipasquale S, et al. Nitric oxide in patients with schizophrenia: the relationship with the severity of illness and the antipsychotic treatment. *Expert Opin Pharmacother.* 2012;13(14):1989-97.
- [104]Maia-de-Oliveira JP, Trzesniak C, Oliveira IR, et al. Nitric oxide plasma/serum levels in patients with schizophrenia: a systematic review and meta-analysis. *Rev Bras Psiquiatr.* 2012 Oct;34 Suppl 2:S149-55. Review.
- [105]Hallak JE, Maia-de-Oliveira JP, Abrao J, Evora PR, Zuardi AW, Crippa JA, Belmonte-de-Abreu P, Baker GB, Dursun SM. Rapid improvement of acute schizophrenia symptoms after intravenous sodium nitroprusside: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *JAMA Psychiatry.* 2013;70(7):668-76.
- [106]Nonaka S, Hough CJ, Chuang D, Chronic lithium treatment robustly protects neurons in the central nervous system against excitotoxicity by inhibiting N-methyl-d-aspartate receptor-mediated calcium influx. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998; 95(5): 2642-67.
- [107]Ghasemi M, Dehpour AR. The NMDA receptor/nitric oxide pathway: a target for the therapeutic and toxic effects of lithium. *Trends Pharmacol Sci* 2011;32:420e34.
- [108]de Sousa RT, Zanetti MV, Busatto GF, Mouro MG, Zarate CA Jr, Gattaz WF, Higa EM, Machado-Vieira R. Lithium increases nitric oxide levels in subjects with bipolar disorder during depressive episodes. *J Psychiatr Res.* 2014;55:96-100.
- [109]Salim S. Oxidative stress and psychological disorders. *Curr Neuropharmacol.* 2014;12(2):140-7.
- [110]Bo-kovi M, Grabnar I, Terzi T, Kores Plesni ar B, Vovk T. Oxidative stress in schizophrenia patients treated with long-acting haloperidol decanoate. *Psychiatry Res.* 2013;210(3):761-8.
- [111]Tsai MC, Liou CW, Lin TK, Lin IM, Huang TL. Changes in oxidative stress markers in patients with schizophrenia: the effect of antipsychotic drugs. *Psychiatry Res.* 2013;209(3):284-90.
- [112]Wells SM, Holian A. Asymmetric dimethylarginine induces oxidative and nitrosative stress in murine lung epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2007;36(5):520-8.
- [113]Maas R, Schwedhelm E, Kahl L, et al. Simultaneous assessment of endothelial function, nitric oxide synthase activity, nitric oxide-mediated signaling, and oxidative stress in individuals with and without hypercholesterolemia. *Clin Chem.* 2008;54(2):292-300.

- [114] Pitocco D, Zaccardi F, Di Stasio E, et al. Role of asymmetric-dimethyl-L-arginine (ADMA) and nitrite/nitrate (NOx) in the pathogenesis of oxidative stress in female subjects with uncomplicated type 1 diabetes mellitus. *Diabetes Res Clin Pract.* 2009;86(3):173-6.
- [115] Chen S, Li N, Deb-Chatterji M, et al. Asymmetric dimethylarginine as marker and mediator in ischemic stroke. *Int J Mol Sci.* 2012;13(12):15983-6004.
- [116] Scalera F, Borlak J, Beckmann B, Martens-Lobenhoffer J, Thum T, Täger M, Bode-Böger SM. Endogenous nitric oxide synthesis inhibitor asymmetric dimethyl L-arginine accelerates endothelial cell senescence. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004;24(10):1816-22.

7. 謝辞

本研究を遂行し学位論文をまとめるにあたり、多くのご支援とご指導を賜りました。指導教官である北里大学薬学部 生体分子解析学教室 本間浩教授に深く感謝申し上げます。本研究を遂行するにあたり、日々の研究において多岐にわたるご指導をいただき、辛抱強く見守って下さいました北里大学薬学部 生体分子解析学教室 関根正恵先生に深く感謝申し上げます。また東京大学大学院 院生時代から現在に至るまで、長きにわたり研究のご助言をいただきました東京大学大学院薬学系研究科 生体分析化学教室 角田誠先生博士に深く感謝申し上げます。研究室セミナーおよび予演会において多くのご助言をくださった、北里大学薬学部 生体分子解析学教室の先生方および学生の皆様に深く感謝申し上げます。また、博士課程への入学において、ご助言いただきました北里大学薬学部 薬学部長 伊藤智夫教授に感謝申し上げます。

応用研究におきましては、統合失調症患者および健常人の血漿サンプルをご提供くださり、本論文の作成にも多くのご助言をいただきました、獨協医科大学 精神神経医学講座 尾関祐二准教授に深く感謝申し上げます。また、本研究をご支援いただきました、獨協医科大学 精神神経医学講座 下田和孝教授および藤井久彌子博士、獨協医科大学 精神生物学講座 秋山一文教授に深く感謝申し上げます。

社会人として博士課程に進むに際し、多大なるご支援を賜りましたファイザー株式会社 非臨床開発研究部の野村俊治部長に深く感謝申し上げます。また、博士課程に進む道を示してくださった堀井郁夫博士に深く感謝申し上げます。そして、温かく見守って下さいました同僚に深く感謝申し上げます。

最後に、温かくそして辛抱強く見守ってくれた家族および友人に対して、深い感謝の意を表して謝辞といたします。