

# 学位論文内容要旨

氏名：野中 聖子 印

題目：「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」

要旨：

## 1. 研究の背景

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

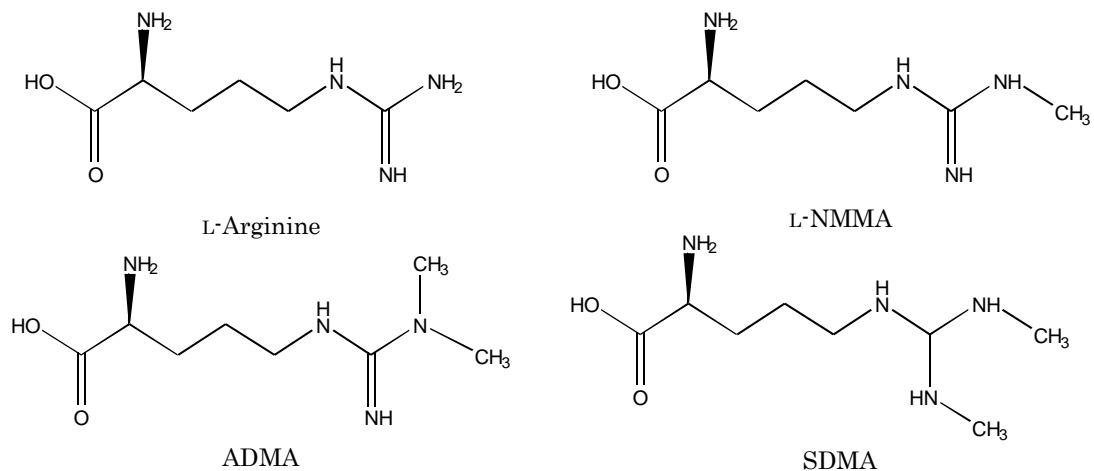
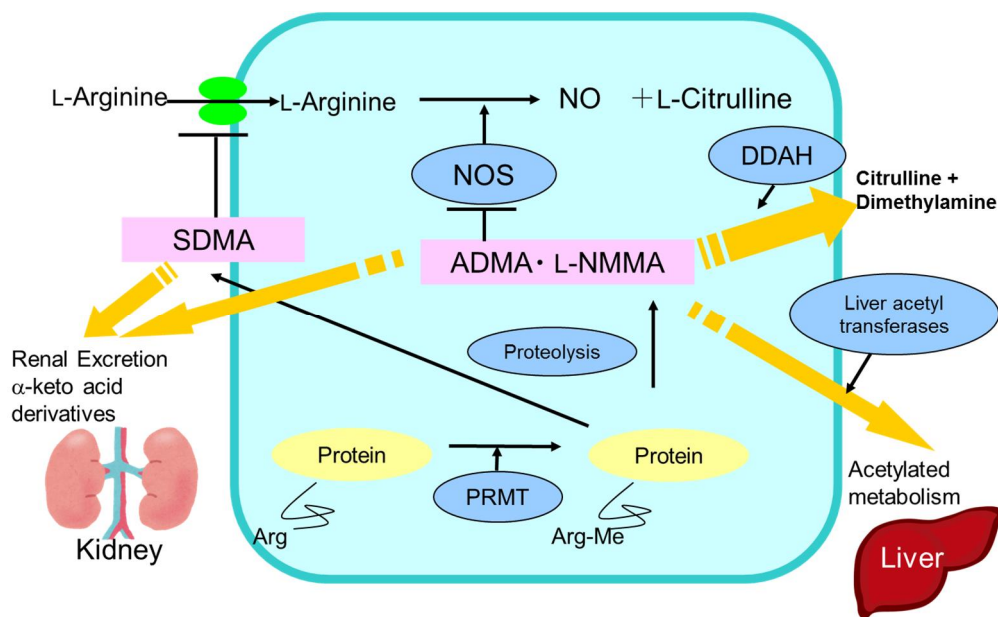


Figure 1. L-Arginine, L-NMMA, ADMAおよびSDMAの化学構造式

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)によって代謝されるが、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の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。

## 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

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 蛍光検出法を開発を行なってきた [Nonaka S, et al. J Chromatogr A. 2005; Tsunoda M, Nonaka S, et al. Analyst. 2005]。

### 2.2. 実験

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。

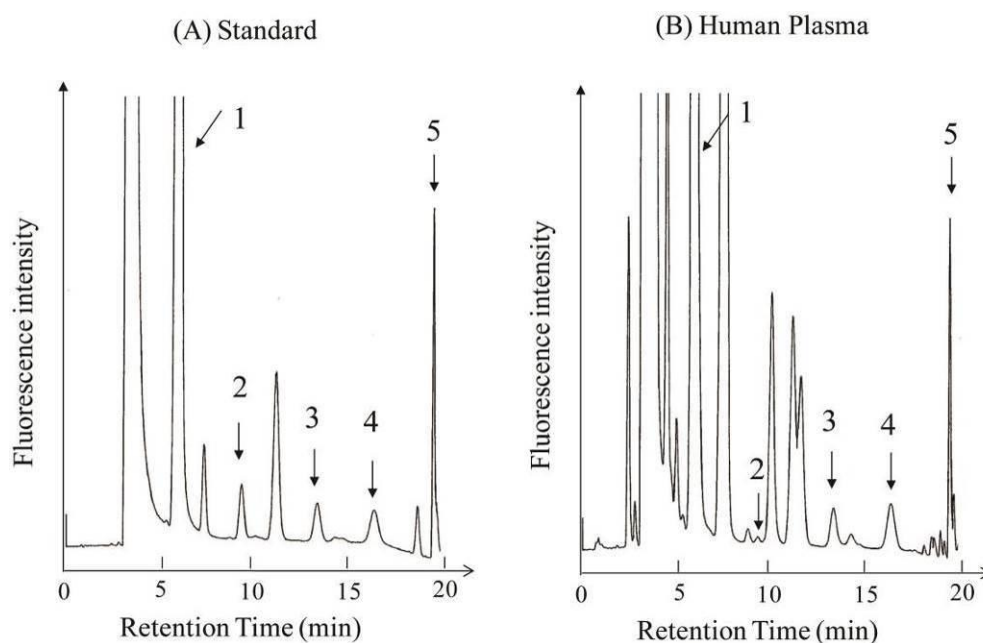
新たな定量法では、50  $\mu$ L 血漿サンプルに等量の 1  $\mu$ M N-PLA および 2 倍量のメタノールを添加し、-80°Cで30分放置し、除蛋白操作を行った。その後、Monospin SCXを用いた固相抽出により L-Arginine およびメチルアルギニン類を抽出し、-0.1 MPaにて50分間の減圧乾固を行った。乾燥したサンプルに100 mM ホウ酸緩衝液(pH9.5)および20 mM NBD-Fを添加し、40°Cにおいて3分間蛍光誘導体化反応を行い、6%酢酸を加えて反応を停止させた。その後、遠心およびフィルターろ過により不純物を取り除いた後、サンプル10  $\mu$ 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。

### 2.3. 結果および考察

メチルアルギニン類およびL-Arginineの代表的なクロマトグラムをFigure 3およびFigure 4に示す。今回確立した方法は、L-NMMA, ADMA および SDMA について10  $\mu$ 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  $\mu$ M), L-Arginine について0.6~48 pmol (希釈前の濃度として4.0~400  $\mu$ 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

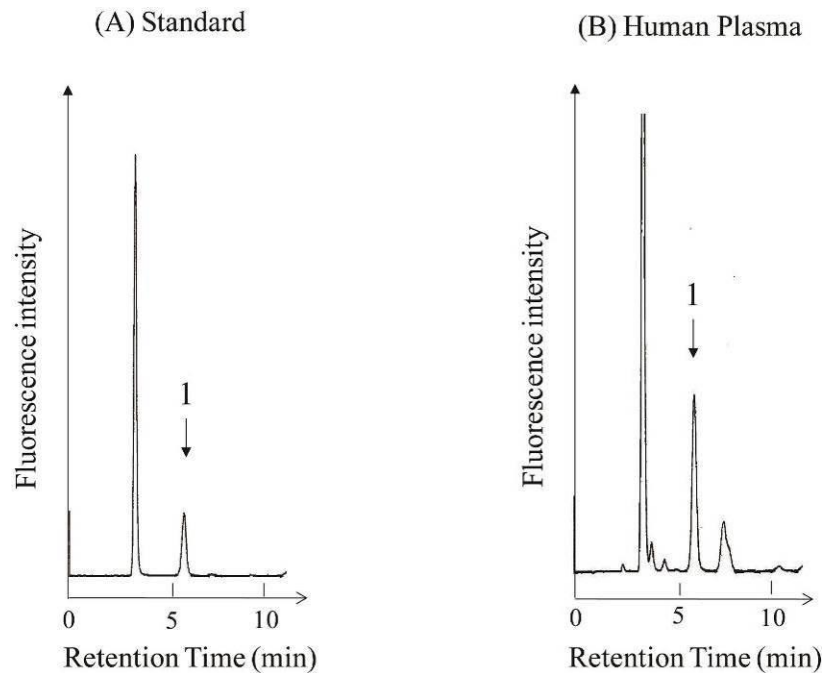
～4.78%および3.00～6.76%であった。さらに本測定法を用いて健常成人の血漿中の L-Arginine, L-NMMA, ADMA および SDMA 濃度を定量したところ、それぞれ  $80.3 \pm 11.8$ ,  $0.04 \pm 0.000$ ,  $0.42 \pm 0.003$  および  $0.51 \pm 0.012 \mu\text{M}$  であった ( $n=6$ )。

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]。



**Figure 3.** (A) 標品のクロマトグラム(1) L-Arginine, (2)  $0.5 \mu\text{M}$  L-NMMA, (3)  $0.5 \mu\text{M}$  ADMA, (4)  $0.5 \mu\text{M}$  SDMA, (5)  $1.0 \mu\text{M}$  N-PLA (内標準物質)

(B)  $50 \mu\text{L}$  ヒト血漿サンプルのクロマトグラム(1) L-Arginine, (2)  $0.04 \mu\text{M}$  L-NMMA, (3)  $0.42 \mu\text{M}$  ADMA, (4)  $0.51 \mu\text{M}$  SDMA, (5)  $1.0 \mu\text{M}$  N-PLA (内標準物質)



**Figure 4.** (A) 標品のクロマトグラム (1) 40  $\mu$ M L-Arginine.

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

### 3. 統合失調症患者血漿への応用

#### 3.1. 背景

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。

### 3.2. 実験

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<sup>a</sup>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。

### 3.3. 結果および考察

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 代以上の患者では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、対照群の濃度範囲を超える濃度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、身体症状は現在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、糖尿病や高血圧、高脂血症などの疾患に罹病していた患者が数名いたことが明らかになった。Das らおよび Celik らの報告では、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。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 のバイオアベイラビリティを示唆する 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、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、

---

<sup>a</sup> 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」

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。

#### 4. 参考文献

- Nonaka S, Tsunoda M, Imai K, et al. High-performance liquid chromatographic assay of NG<sup>G</sup>-monomethyl-L-arginine, NG<sup>G</sup>, NG<sup>G'</sup>-dimethyl-L-arginine, and NG<sup>G</sup>, NG<sup>G'</sup>-dimethyl-L-arginine using 4-fluoro-7-nitro-2, 1,3-benzoxadiazole as a fluorescent reagent. J Chromatogr A. 2005 Feb;1066(1-2):41-5.
- Tsunoda M, Nonaka S, Funatsu T. Determination of methylated arginines by column-switching high-performance liquid chromatography-fluorescence detection. Analyst. 2005 Oct;130(10):1410-3.
- Nonaka S, Sekine M, Tsunoda M, et al. Simultaneous determination of NG<sup>G</sup>-monomethyl-L-arginine, NG<sup>G</sup>, NG<sup>G'</sup>-dimethyl-L-arginine, NG<sup>G</sup>, NG<sup>G'</sup>-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.

以上