

20000 926 ~ 0936

創薬等ヒューマンサイエンス総合研究事業

平成12年度

# 創薬等ヒューマンサイエンス研究

## 重点研究報告書

第1分野

先端的創薬技術の開発に関する研究

財団法人 ヒューマンサイエンス振興財団

平成12年度

# 創薬等ヒューマンサイエンス研究

## 重点研究報告書

### 第1分野

先端的創薬技術の開発に関する研究

# 目 次

## 課題番号

11011	脳梗塞動物モデルの開発と創薬研究への応用	柳本 広二	……	1
11037	免疫・脳神経系のゲノム恒常性維持に係る遺伝子発現制御機構の解明	葛西 正孝	……	7
11106	ヒト組織構築モデル動物の作製と応用に関する研究	藤本純一郎	……	12
11168	疾患モデルラットの調査とラットゲノムの基盤研究によるヒト疾患遺伝子の総合的探索研究	芹川 忠夫	……	19
11178	神経・筋疾患モデル動物の病態解析及び開発のための基礎研究	菊池 建機	……	25
11217	長寿命新規蛍光標識剤の開発および応用	嶋 秀明	……	30
12004	薬物及び生体分子の高感度高性能分析・解析技術の開発に関する研究	今井 一洋	……	38
12129	ゲノム情報に基づく骨疾患治療医薬品の開発に関する研究	瀬原 淳子	……	45
12259	白血球機能の新しい制御手法の開発に関する研究	鈴木 和博	……	50
12263	チャネルの開口を視る技術の開発研究	川西 徹	……	56
12271	正常ヒト上皮組織に由来する初代培養細胞の増殖制御機構の解析とその研究資源化に関する研究	林 真	……	66

## 薬物及び生体分子の高感度高性能分析・解析技術の開発に関する研究

所属 東京大学大学院薬学系研究科  
代表研究者 今井一洋

### 分担研究者

- |                   |                       |
|-------------------|-----------------------|
| (1) 東京大学大学院薬学系研究科 | 今井 一洋、本間 浩、三田 智文、福島 健 |
| (2) 長崎大学薬学部       | 中島 憲一郎                |
| (3) 昭和大学薬学部       | 前田 昌子                 |
| (4) 国立医薬品食品衛生研究所  | 林 譲、松田 りえ子            |
| (5) 住化分析センター(株)   | 西岡 亮太                 |
| (6) 第一製薬(株)       | 伯水 英夫                 |
| (7) 浜松ホトニクス       | 久米 英浩                 |

### 要旨

HPLC による利尿分子 LLU- $\alpha$ 、カテコールアミン及びメチル代謝物の高感度定量法の開発、蛍光偏光測定による結合解析、AK 及び PPDK を標識酵素とする同時イムノアッセイ法の開発、FUMI 理論による評価、新規光学活性カラムの作製、覚醒剤の光学分割を検討した。

#### 1. 研究目的

微量で活性を有する薬物の体内動態や光学活性薬物の体内光学異性変換、並びにそれらによる生体分子への影響を精査するための技術として、蛍光、化学発光検出を利用するクロマトグラフィーを取り上げ、それらのより高感度化及び高性能化を計るべく検討する。またそれらの技術を実際に応用する。さらに、これら薬物の生体内機能分子との相互作用を明らかにするための技術として、蛍光偏光分析法を取り上げ、薬物と受容体などの生体機能分子との相互作用を解析する技術の高感度化を計るべく検討する。

本年度は以下の研究を行った。1) 新規利尿分子 LLU- $\alpha$  の高感度定量法の開発、2) 血中カテコールアミン及びメチル代謝物の高感度分析法の開発と応用、3) 蛍光偏光測定による環境ホルモンのエストロゲン受容体との結合解析、4) Acetate kinase (AK) 及び Pyruvate phosphate dikinase (PPDK) を標識酵素とする 2 成分同時検出が可能な生物発光イムノアッセイ法の開発、5) FUMI 理論による分析法の評価、6) シリカゲルと光学活性分子を結合するアルキル鎖を伸長した光学活性カラム、およびポリ-L-フェニルアラニンを担持した新規光学活性カラムの作製、7) 覚醒剤メタンフェタミン、アンフェタミンの光学分割、8) 筋硬縮解除薬バクロフェンの光学分割。

#### 2. 研究方法

##### 2-1. 新規利尿分子 LLU- $\alpha$ の高感度定量法の開発

LLU- $\alpha$  を蛍光試薬によって蛍光誘導体に導き、HPLC を用いる高感度分離定量法の開発を行った。また、LLU- $\alpha$  には光学異性体が存在するので、LLU- $\alpha$  蛍光誘導体の光学分割法開発も併せて行った。ついで、この方法をラット生体内 LLU- $\alpha$  の動態研究に応用した。

##### 2-2. 血中カテコールアミン及びメチル代謝物の高感度分析法の開発と応用

セミマイクロカラムを用いた過シュウ酸エステル化学発光検出法による高感度かつ高選択的なカテコールアミンとその 3-O-メチル代謝物の分離分析法を開発し、マイクロ化によるカラム外拡散を最小限に抑えるために、電解

酸化に用いる電気化学フローセル及び化学発光検出器のセルの検討を行った。

また、高血圧自然発症ラット (SHR) のカテコールアミンのメチル化代謝能を高めることにより、降圧効果が得られるのではないかと考え、COMT の補酵素である S-Adenosyl-L-methionine(SAME)を静脈内投与して、降圧効果が得られるか否かを検討した。

### 2-3. 蛍光偏光測定による環境ホルモンのエストロゲン受容体との結合解析

前年度の検討により本測定系に最適であった蛍光性分子フルオレセインを用いて、蛍光標識エストラジオールを調製し、エストロゲン受容体上における環境ホルモン類との競合実験を蛍光偏光測定により行った。更に得られた阻害曲線をヒルプロットへと変換し、その化合物のエストロゲン受容体に対する相互作用について解析した。

### 2-4. C-ペプチドとインスリンの同時生物発光イムノアッセイ法

抗 C-ペプチド抗体と抗インスリン抗体を固相化したプレートに、試料または標準溶液とビオチン化抗 C-ペプチド抗体と FITC 標識抗インスリン抗体の混合溶液を加え室温で放置した。洗浄後ビオチン化 AK-ストレプトアビジン複合体と PPK 標識抗 FITC-Fab'抗体の混合溶液を加え、室温で 1 時間放置した。再び洗浄後、Acetate Kinase (AK)用発光基質溶液を添加し、反応させた。その後生じた発光をルミノメーターを用いて積算することで固相上の AK の活性を測定し、C-ペプチドの定量を行った。次いで Pyruvate - Phosphate Dikinase (PPDK) 用基質溶液を加え反応させた。その後生じた発光をルミノメーターを用いて積算することで固相上の PPK 活性測定をすることでインスリンの定量を行った。

### 2-5. FUMI 理論による分析法の評価

FUMI 理論を実践するプログラム TOCO (Total Optimization of Chemical Operations) を用いて行った。マイクロタイター型測定装置を用いたルシフェラーゼ生物発光分析系の測定精度を FUMI 理論から予測し、調製誤差とウェルの違いによる誤差を検討した。

### 2-6. 新規光学活性カラムの作製

シリカゲル基材に Boc-L-フェニルアラニンを用いて、ポリ-L-フェニルアラニンの固相合成を行い、鎖長の異なる 3 種類の固定相 (n=4, 8, 12) を調製し、それぞれ ABS-(L-Phe)4-Bz, ABS-(L-Phe)8-Bz, ABS-(L-Phe)12-Bz を得た。これらの固定相はグリセリン/メタノールでスラリーとした後、ステンレスカラム (150 x 4.0 mm i. d.) に充填した。

一方、アミノプロピルシリカゲルに光学活性成分として N-[(R)-1-( $\alpha$ -naphthyl)-ethylamino-carbonyl]-L-tert-leucine を化学結合した固定相 (CSP-1, 商品名 SUMICHIRAL OA-4700) 及びアミノプロピルシリカゲルを 11-aminoundecanoic acid で修飾した後、同じ光学活性成分を化学結合した固定相 (CSP-2) を作製した。更にスパーサー部分を延長するため、アミノプロピルシリカゲルを 6-(10-aminodecylcarbonyl) aminohexanoic acid 及び 10-(6-aminohexylcarbonyl) aminodecanoic acid で修飾した後、同じ光学活性成分をそれぞれ化学結合した固定相 (CSP-3, CSP-3') を合成した。それぞれ内径 4.6 mm 長さ 25 cm のステンレス製カラムにスラリー充填し、逆相系ならびに順相系移動相を使用して光学分割能の評価を行った。

### 2-7. 毛髪および尿中のメタンフェタミン(MP)およびアンフェタミン(AP)のキラル分離

MP および AP を 4-(4, 5-diphenyl-1H-imidazol-2-yl)benzoyl chloride (DIB-Cl) で蛍光ラベル化後、市販のキラル化合物分離用セミマイクロカラムを用いて分離・検出する高感度な方法を開発した。尿試料の場合はその 10  $\mu$ L を窒素ガスで乾固後、DIB-Cl と炭酸緩衝液(pH 9)中で反応させ、HPLC に注入した。毛髪試料は SDS 洗浄後、約 1cm の長さの毛髪を精秤し、細断後 5%TFA を含むメタノールでソニケーション抽出し、メタノールを窒素ガスで乾固し、残差を尿試料と同様にして DIB-Cl で誘導体化した。検出波長は Ex = 330 nm, Em = 440 nm を用いた。セミマイクロカラムは Chiral OD-RH (Daicel, 150 x 2 mm i. d.)、移動相は 0.3 M NaPF<sub>6</sub> を含むリン酸-ク

エン酸緩衝液(pH 4)とアセトニトリルの43:57混液を使用し、流速は0.1 ml/minとした。

## 2-8. バクロフェンの光学分割

種々の光学異性体分離カラムと、LC/MS/MSで用いることが可能な移動相とを用いてバクロフェンの光学分割を検討した。その後、光学分割可能なカラムを用いてヒト血漿中バクロフェン濃度をLS/MS/MSを用いて調べた。

## 3. 研究成果

### 3-1. 新規利尿分子LLU- $\alpha$ の高感度定量法の開発

LLU- $\alpha$ のカルボキシル基を蛍光試薬 DBD-PZ を用いて、蛍光誘導体化を行い、さらにその水酸基をアセチルクロライドによりアセチル化することで、より安定な誘導体へ導いた。この蛍光誘導体をHPLC-蛍光検出することによって定量を試みたが、一本のODSカラムでは他の生体分子との分離が不十分であったので、2種類のカラム(フェニルおよびODS)を六方バルブで接続したカラムスイッチングHPLCによる分離を検討した。その結果、ラット血漿、尿、胆汁50 $\mu$ L中から、LLU- $\alpha$ の定量に成功した。

次に、LLU- $\alpha$ は2位に不斉炭素を持つので、光学異性体が存在する。そこで、LLU- $\alpha$ の蛍光誘導体の光学分割法を検討した結果、キラル固定相として、修飾セルロース型キラル固定相を用いることで、良好に光学分割できることを見出した。これにより、ラット生体内で検出されたLLU- $\alpha$ はすべてS体であることを明らかにした。

一方、LLU- $\alpha$ は、 $\gamma$ -トコフェロールの代謝によって生じることが知られているが、 $\gamma$ -トコトリエノール(T3)もLLU- $\alpha$ の前駆体となりうることで予想されたので、T3をラットに経口投与後の血漿中LLU- $\alpha$ 濃度を測定した。その結果、LLU- $\alpha$ 濃度の上昇が確認され、T3からもLLU- $\alpha$ が生成することが判った。また、LLU- $\alpha$ のラセミ体をラットに静注した結果、内在性であるS-LLU- $\alpha$ の方が、R-LLU- $\alpha$ に比べて血漿中からの消失が速く、生体内ではLLU- $\alpha$ の立体配置が識別されることが明らかとなった。

### 3-2. 血中カテコールアミン及びメチル代謝物の高感度分析法の開発と応用

従来の電気化学フローセルを用いたところ、試料ピークの拡散が起こったため、Glassy Carbonを充填したステンレスチューブを作用電極として用いた新規マイクロ電解フローセルの開発により、試料の拡散を最小限に抑えることが可能となった。セミマイクロカラムによる分離条件、蛍光誘導体化条件など様々なHPLC条件の最適化を行った。化学発光検出器のセルについては、セル内チューブの内径、外径を共に細くすることにより、高感度に検出することが可能となった。カテコールアミンとその3-O-メチル代謝物の検出限界は、それぞれ0.3-2 fmol、0.7-5 fmolと、従来法に比べて約3倍高感度に検出でき、測定に必要な血漿は15 $\mu$ lであった。

SAMe(1.0 mg/kg)を静脈内投与することにより、SHR、WKY共に有意な降圧作用が見られた。このとき、SHRにおいて、血漿NE濃度の有意な低下(1470 fmol/ml $\rightarrow$ 1100 fmol/ml)、血漿NMN濃度の有意な上昇(962 fmol/ml $\rightarrow$ 1150 fmol/ml)が見られた。このことは、カテコールアミンのメチル化がSAMeによって促進され、それにより、血圧が低下したと考えられる。

### 3-3. 蛍光偏光測定による環境ホルモンのエストロゲン受容体との結合解析

約20種類の化学物質について競合実験を行った。その結果、エストラジオールを基準とした50%阻害濃度の相対値は放射性同位元素を用いる従来法と一致した。更に、ヒルプロットの傾きから得られるヒル係数は化学物質とエストロゲン受容体との結合様式を示し、50%阻害濃度と同様に化合物固有の値として得られた。

### 3-4. C-ペプチドとインスリンの同時生物発光イムノアッセイ法

本法では第一にAK活性を測定し、次いでPPDK活性の測定を行った。第一段階ではAKによりアセチルリン酸とADPからATPを産生させ、それをルシフェリン-ルシフェラーゼ反応により発光させる。第二段階ではPPDKによりピロリン酸、ホスホエノールピルビン酸及びAMPからATPを産生させ、これを同様にルシフェリン-ルシフェラーゼ反応により発光させた。また、第二段階ではADP-HKによるAK用発光基質溶液中のADP

の AMP への変換と PPDK による ATP 産生を平行して行わせることで PPDK のみの測定が可能になった。

種々の条件検討を行った結果、第 1 段階の AK の測定は共存する PPDK の影響はみられず単独測定と同様な感度（最少検出感度  $1.02 \times 10^{-20}$  mol/assay、CV=4.0 - 5.2 %、n = 8）が得られた。第 2 段階の PPDK の測定では AK による ATP 産生を停止させるため PPDK 用発光試液中に ADP-HK とグルコースを添加した。ADP-HK は 8.1mU/mL、グルコースは 20mM で PPDK 測定時の AK による影響をなくすことができた。これにより PPDK の検出感度は単独測定と同様な結果（最少検出感度  $2.05 \times 10^{-20}$  mol/assay、CV = 1.6 - 5.7%、n = 8）が得られた。本研究ではインスリンと C-ペプチドをモデルとしてとりあげ、AK と PPDK の同時測定法の応用として BL-EIA による 2 成分同時測定の検討を行った。両成分とも非競合法による免疫反応の後 C-ペプチドは AK により、インスリンは PPDK によりそれぞれ検出し、測定を行った。

C-ペプチドは検出限界が  $3.0 \times 10^{-16}$  mol/assay (mean+3SD) であり、インスリンは  $9.9 \times 10^{-17}$  mol/assay (mean+3SD) であった。日内同時再現性も C ペプチドで 1.9 - 6.7%、インスリンは 2.9 - 5.8 % (CV%, n = 8) と良好な結果を得た。また日間再現性は C-ペプチドが 14.4 - 25.9%、インスリンが 9.4 - 25.1% (CV%, n = 4) であった。この結果は日常分析法比較して、ともに約 10 倍高感度であった。

C-ペプチド 42 検体、インスリン 28 検体について日常分析法との相関性試験を行った。そのうち 7 検体は外部機関において C-ペプチド、インスリン両成分を測定したものであり、残りの C-ペプチド 35 検体、インスリン 21 検体は各々 1 成分のみ測定されたものを用いた。C-ペプチド、インスリンともにアルカリホスファターゼと 4-メチルウンベリフェルリン酸の反応により生じた蛍光物質（4-メチルウンベリフェロン）を検出する蛍光酵素免疫測定法による値との相関はそれぞれ C-ペプチド：回帰式  $y$  (BL-EIA) =  $1.093 x$  (EIA) - 0.205、相関係数  $r = 0.922$  (n = 42)、インスリン：回帰式  $y$  (BL-EIA) =  $0.957 x$  (EIA) - 7.873、相関係数  $r = 0.947$  (n = 28) といずれも良好な相関を示した。

### 3 - 5. FUMI 理論による分析法の評価

本研究で用いたルシフェラーゼ生物発光分析系では、発光は反応開始から 10 分位まで増大し、15 分以降は一定となった。発光は一定といっても、実際は、揺らいでおり、この揺らぎから発光強度の SD を求めることができる。この SD を濃度に対してプロットすると、サンプル濃度が高くなるにつれて、発光の SD も大きくなることが分かった。発光の揺らぎをフーリエ変換しても、発光強度の SD を求めることができる (FUMI 理論)。実際の SD と FUMI 理論による SD は良く一致したことから、用いたルシフェラーゼ生物発光分析系では、発光の SD は理論的に予測可能であることが分かった。

FUMI 理論から求めた SD の 3 倍を検出限界シグナルとすると、この検出限界濃度は  $1.0 \times 10^{-20}$  mol/assay であり、くり返し測定から求めた検出限界 ( $1.36 \times 10^{-20}$  mol/assay、前田研究室による) とほぼ一致している。

マイクロタイタープレートでは、ウェルにより、温度、光の検出性、反応開始試薬の注入量などが異なる。これらをウェル間誤差と呼ぶことにする。異なったウェルの測定値（発光量）を平均すると、発光の揺らぎによる誤差にウェル間誤差が加わる。揺らぎの誤差+ウェル間誤差の SD をサンプル濃度に対してプロットしたところ、サンプル濃度が高くなるほど、ウェル間誤差が全体の誤差に寄与する度合いが大きくなることが分かった。しかし、最も低い濃度（約  $10^{-19}$  mol）では、ウェル間誤差の寄与はほとんどない。ウェル間誤差を RSD で表すと、これは濃度に無関係にほぼ一定となかった（平均 2.6% RSD）。

### 3 - 6. 新規光学活性カラムの作製

ウラシルおよび安息香酸メチルの分離を行った結果、いずれの固定相も水含量の増加に伴い保持時間が増加するという逆相系の分離挙動を示し、同一溶離液を用いた場合のウラシルおよび安息香酸メチルの保持時間は ABS-(L-Phe)12-Bz が最も長く、次いで ABS-(L-Phe)8-Bz、ABS-(L-Phe)4-Bz の順序となった。次に 3 種類の固定相を用いて 15 種類の光学活性医薬品のキラル分離を試みたところ、いずれの固定相においてもワルファリンが分離され、中でも ABS-(L-Phe)8-Bz が最もよい分離度を示した。また、50℃ 以上で分離を行った結果、ABS-(L-Phe)8-Bz の不斉認識能はほぼ消失し、その後温度を下げて再度分離を行っても分離能は回復しなかったことから固定相の

高次構造が不斉認識能に何らかの影響を与えている可能性が示唆された。

CSP-1、CSP-2 及び CSP-3 を用いて、同じ acetonitrile / water 系の逆相移動相を使用して測定を行った。試料としては、1,1'-bi-2-naphthol 及び N-(3,5-dinitrobenzoyl)-phenylethylamine (DNB-PEA) を用いた。保持時間は、スパーサー部のアルキル鎖の炭素数の増大に比例して、増加が認められた。分離係数については、アルキル鎖の導入によって向上は認められたが、必ずしもアルキル鎖の炭素数には比例しないと考えられた。

一方、n-hexane / ethanol / trifluoroacetic acid 系の順相系移動相で、CSP-1、CSP-2 及び CSP-3 の性能を比較した結果、CSP-1 に比べて CSP-2 及び CSP-3 では分離能が低下した。これは、測定条件によっては、アルキル鎖の延長によって、光学分割能が向上するとは限らないことを示している。

### 3-7. 毛髪および尿中のメタンフェタミン(MP)およびアンフェタミン(AP)のキラル分離

覚せい剤摂取被疑者尿からはすべて S-(+)-体の MPs が検出されたが、パーキンソン病治療薬の R-(-)-デプレニールを投与した患者尿のからは R-(-)-体の MP と AP が検出された。尿中で R-(-)-体の MPs が検出されることは、体内で R-(-)-体の覚せい剤に変換される医薬品を投与された可能性が高く、乱用される MP との区別に本方法が有用であると考えられる。また、覚せい剤摂取被疑者の毛髪から 5%TFA を含むメタノールで抽出した MP はすべて S-(+)-体であった。

### 3-8. バクロフェンの光学分割

Crownpak CR(+) (Daicel; 150×4.0 mm i. d.)を用いた場合にのみ分離度 ( $R_s$ ) > 2.0 以上の良好な分離が得られた。このカラムと C18 (Shiseido; 35 mm×4.6 mm i. d.)を用いたカラムスイッチング HPLC 法により、ヒト血漿中 Baclofen の光学分離法を確立した。ヒト血漿の前処理としては、限外ろ過メンブランを装着したフィルターユニット (ミリポア) に血漿を添加し、7000×g、20℃の条件下で 60 分遠心することで行った。分離検出法として LC/MS/MS/MRM を、内部標準物質として L-p-chlorophenylalanine を用いて、約 0.2 - 60 ng/mL の範囲で検量線を作成したところ、良好な選択性、直線性及び真度が得られた。

## 4. 考察

### 4-1. 新規利尿分子 LLU- $\alpha$ の高感度定量法の開発

新規利尿分子 LLU- $\alpha$  は、 $\gamma$ -トコフェロールの側鎖代謝により生成するので生体内に存在すると考えられるが、その高感度定量法がなかったため、LLU- $\alpha$  の生体内濃度は不明であった。本研究により開発された方法により、血漿、尿、胆汁各 50  $\mu$ L を使用して LLU- $\alpha$  を定量することに成功した。LLU- $\alpha$  は、ナトリウム利尿作用が知られているが、最近シクロオキシゲナーゼ阻害作用を持つことも報告され、新薬のリード化合物として期待される。本法は、その生体内動態を研究する上で有用であると考えられる。

### 4-2. 血中カテコールアミン及びメチル代謝物の高感度分析法の開発と応用

セミマイクロカラムを用いカラム外拡散を減らすことにより、カテコールアミンとその 3-O-メチル代謝物の高感度化に成功した。この方法は、マウス血漿測定への応用を可能とした。また、SAME に降圧作用があり、その作用がメチル化反応の促進であることを初めて明らかにした。今後、投与量を変化させたとき及び経口投与などの検討により、降圧薬開発への足掛かりになるものと期待される。

### 4-3. 蛍光偏光測定による環境ホルモンのエストロゲン受容体との結合解析

本法は放射性同位元素を使用せず、簡便かつ迅速に環境ホルモン類のエストロゲン受容体に対する相互作用を測定できた。又、ヒルプロット解析により一般的な親和性の指標である 50% 阻害濃度と同時に化学物質とエストロゲン受容体との相互作用状態の指標であるヒル係数が求められたが、ヒル係数まで求めた報告例は少なく、in vitro における化学物質の評価の際に有用と思われる。

#### 4-4. C-ペプチドとインスリンの同時生物発光イムノアッセイ法

生物発光検出による C-ペプチドとインスリンをモデルとした AK と PPDK を検出酵素とする 2 成分同時生物発光イムノアッセイ法は高感度で試料量も少なく省力化された方法であり、ヒト血清試料においても測定が可能であった。

#### 4-5. FUMI 理論による分析法の評価

マイクロタイター型の装置において、ルシフェラーゼ生物発光分析系の測定値の精度を FUMI 理論により予測できることを示した。PPDK 分析系では、サンプル調製の誤差を含んだウェル間の誤差は 2.6% RSD であり、検出限界の推定には、サンプル調製を含むウェル間誤差を考慮する必要がないことも示した。

#### 4-6. 新規光学活性カラムの作製

ポリ-L-フェニルアラニンを担持した光学活性カラムの調製を試み、ワルファリンの光学分割を達成することができた。今後、更に改良に向けて詳細な条件検討を行う予定である。

一方、アルキル鎖延長型光学活性カラムは、逆相保持機能が付加されると考えられたので、多種化合物の光学異性体混合物分離において、化合物相互の分離改善に効果があるものと期待される。アルキル鎖の延長によって、逆相系移動相では光学分割能が向上したが、順相系移動相では逆に光学分割能が低下した。これらの結果は、不斉識別部位が同じ固定相でも、スパーサー部位が異なれば、性能差が生じる可能性があることを示している、新規光学活性カラムをデザインする上で重要な知見と言える。

#### 4-7. 毛髪および尿中のメタンフェタミン(MP)およびアンフェタミン(AP)のキラル分離

市販のキラル分離セミマイクロカラムを用いて、覚醒剤 MP および AP 分析用のダウンサイジング化したシステムを構築することができた。本法は、簡便で、経済的であり、薬理学、毒性学あるいは法中毒学などの分野に有用であると考えられる。なお、本法は非常に高感度であり、約 1cm の毛髪中の MP を検出することができた。ヒトの毛髪が 1 ヶ月に平均 1cm 程度のびると考えられることから、1 ヶ月毎の MP 摂取状況を調べる事が可能である。

#### 4-8. バクロフェンの光学分割

生体試料中のバクロフェンの光学分割は、一般的には、ジアステレオマーへの誘導体化によって行われており、誘導体化を必要としない光学分割法は存在しなかった。また、生体試料の前処理法としては、C8 または C18 を基材とする固相による抽出が一般的であり、測定までにかかる一連の作業は煩雑であった。今回確立した方法は、誘導体化を必要とせず、血漿の前処理としても非常に簡便な方法を用いており、しかも、LC/MS/MS/MRM を用いたことにより、従来の方法よりも 20 倍以上も高感度であった。

### 5. 結論

新規利尿分子 LLU- $\alpha$  の高感度分離定量ならびにその光学分割法を開発した。これにより、ラット体液中（血漿、尿、胆汁）から S-LLU- $\alpha$  を定量し、また、 $\gamma$ -T3 も LLU- $\alpha$  の前駆体になりうることを、さらに、S-LLU- $\alpha$  は R-LLU- $\alpha$  に比べて、血漿中からの消失が速いことを明らかにした。カテコールアミンとその 3-O-メチル代謝物の高感度分析法を確立し、SAME の降圧作用がメチル化代謝能促進によることを明らかとした。蛍光偏光分析法は、マイクロプレートによる迅速測定に適用可能であるため、試料の処理能力の点においても優れた方法であると思われた。生物発光検出による AK と PPDK の高感度同時測定法は AK、PPDK 共に  $10^{-20}$  mol/assay レベルという高感度に、また C-ペプチドとインスリンの 2 成分同時生物発光イムノアッセイ法は高感度で試料量も少なく省力化された方法であり、ヒト血清試料においても測定が可能であった。また、マイクロタイター型の装置において、ルシフェラーゼ生物発光分析系の測定値の精度を FUMI 理論により予測できることを示した。新規光学活性カラムを調製し、ワルファリンの光学分割に成功した。また、覚醒剤メタンフェタミン、アンフェタミン、ヒト血漿中バクロフェンの光学分割法を確立した。

## 6. 研究発表

- 1) K.Takezawa, M.Tsunoda, K.Murayama, T.Santa and K.Imai: Automatic semi-microcolumn liquid chromatographic determination of catecholamines in rat plasma utilizing peroxyoxalate chemiluminescence reaction *Analyst*, **125**, 293-296(2000).
- 2) M.Tsunoda, K.Takezawa, T.Santa, Y.Ina, K.Nagashima, K.Ohmori, S.Kobayashi and K.Imai: New approach for measurement of sympathetic nervous abnormality in conscious, spontaneously hypertensive rats. *Jpn. J. Pharmacol.*, **83**, 39-45 (2000).
- 3) A.Hattori, T.Fukushima, and K.Imai: Occurrence and determination of a natriuretic hormone, 2,7,8-trimethyl-2-(-carboxyethyl)-6-hydroxy chroman, in rat plasma, urine, and bile. *Anal. Biochem.*, **281**, 209-215(2000).
- 4) K.Takezawa, M.Tsunoda, N.Watanabe, and K.Imai: An automatic analyzer for catecholamines and their 3-*O*-methyl metabolites using a micro coulometric flow cell as a postcolumn reactor for fluorogenic reaction. *Anal. Chem.*, **72**, 4009-4014(2000).
- 5) A.Hattori, T.Fukushima, H.Yoshimura, K.Abe, and K.Imai: Production of LLU- $\alpha$  following an oral administration of  $\gamma$ -tocotrienol or  $\gamma$ -tocopherol to rats. *Biol. Pharm. Bull.*, **23**, 1395-1397(2000).
- 6) Kanemitsu, M., Arakawa, H., Yoda, R., Maeda, M.: Chemiluminescent determination of lucigenin using thiourea derivatives: *Anal. Chim. Acta*, **403**, 125 - 130 (2000)
- 7) Katsuragi, H., Takahashi, K., Suzuki, H., Maeda, M.: Chemiluminescent measurement of peroxidase activity and its application using a lucigenin CT-complex, *Luminescence*, **15**, 1 - 7 (2000)
- 8) Ohkuma, H., Abe, K., Kosaka, Y., Maeda, M.: Detection of luciferase having two kinds of luminescent color based on optical filter procedure: Application to an enzyme immunoassay, *Luminescence*, **15**, 21 - 27 (2000)
- 9) Kokado, A., Arakawa, H., Maeda, M.: New electrochemical assay of alkaline phosphatase using ascorbic acid 2-phosphate and its application to enzyme immunoassay, *Anal. Chim. Acta*, **407**, 119 - 125 (2000)
- 10) Ito, K., Nishimura, K., Murakami, S., Arakawa, H., Maeda, M.: Novel bioluminescent assay of pyruvate phosphate dikinase using firefly luciferase-luciferin reaction and its application to bioluminescent enzyme immunoassay, *Anal. Chim. Acta*, **421**, 113 -120 (2000)
- 11) 四方田千佳子, 田頭洋子, 勝峰万里, 岩木和夫, 松田りえ子, 林 譲: クロマトグラフィー分析における適切なデータ取り込み間隔の推定, *分析化学*, **49**, 225-231 (2000).
- 12) 松田りえ子, 林 譲, 四方田千佳子, 田頭洋子, 勝峰万里, 岩木和夫, : クロマトグラフィー分析における適切なデータ取り込み間隔とデータ処理に関する考察, *分析化学*, **49**, 233-238 (2000).
- 13) O. Al-Dirbashi, M. Wada, N. Kuroda, M. Takahashi, K. Nakashima: Achiral and chiral quantification of methamphetamine and amphetamine in human urine by semi-micro column high-performance liquid chromatography and fluorescence detection, *J. Forensic Sci.*, **45**, 708-714 (2000).
- 14) O. Al-Dirbashi, N. Kuroda, M. Wada, M. Takahashi, K. Nakashima: Quantification of methamphetamine, amphetamine and enantiomers by semi-micro column HPLC with fluorescence detection: applications on abusers' single hair analyses, *Biomed. Chromatogr.*, **14**, 293-300 (2000).

---

平成12年度

創薬等ヒューマンサイエンス研究  
重点研究報告書

第1分野

先端的創薬技術の開発に関する研究

平成13年11月30日発行

発行 財団法人 ヒューマンサイエンス振興財団

〒103-0001 東京都中央区日本橋小伝馬町13番4号

共同ビル（小伝馬町駅前）4F

電話 03(3663)8641 FAX 03(3663)0448

---

印刷 株式会社 ソーラン社

