

神戸学院大学大学院食品薬品総合科学研究科学学位論文

安定同位体基質と LC-MS を用いた
キサンチン酸化還元酵素活性測定法の研究

2018年7月

村 瀬 貴 代

内容

緒言	4
第1章 序論	6
第1節 安定同位体基質と質量分析計を用いた新規キサンチン酸化還元酵素活性測定法 開発の背景	6
第1項 キサンチン酸化還元酵素と関連する疾患：痛風・高尿酸血症	6
第2項 痛風の原因物質尿酸とプリン代謝	7
第3項 痛風・高尿酸血症の治療	8
第4項 キサンチン酸化還元酵素の構造的特徴と働き	12
第5項 キサンチン酸化還元酵素とさまざまな疾患との関連	13
第6項 これまでのキサンチン酸化還元酵素活性測定法	14
第2節 安定同位体基質と質量分析計を用いた XOR 活性測定法確立に対する著者の方針	26
第2章 LC-HRMS を用いた動物由来試料の XOR 活性測定法開発	27
第1節 安定同位体と質量分析計を用いた新規 XOR 活性測定法	27
第1項 安定同位体の活用例と本研究への応用	27
第2項 使用する質量分析計の選択	28
第2節 HPLC 条件	34
第1項 カラムサイズと流速	34
第2項 カラムの充填剤	35
第3項 移動相の種類	37
第3節 サンプル処理	40
第1項 除タンパク	40
第2項 内部標準物質の選択	40
第4節 酵素反応条件の最適化	41
第1項 条件検討	41
第2項 内在性成分の影響	43
第3項 動物試料 XOR 活性測定法の標準プロトコール	45
第5節 [¹⁵ N ₂]尿酸測定法バリデーション	46
第1項 検量線の調製	46
第2項 日内および日間再現性評価：肝・腎・血漿を用いた妥当性評価	47
第6節 動物組織・血漿の XOR 活性測定および従来法との比較	48
第1項 比較試験①の結果	49
第2項 比較試験②の結果	49
第3項 従来法との比較と本測定法の利点	50
第7節 第2章のまとめ	53
第3章 LC-TQMS を用いた XOR 活性測定法の高感度化	54
第1節 XOR 活性測定法の高感度化検討	54

第 1 項	高感度化に適した質量分析計への変更	54
第 2 項	質量分析計変更に伴う安定同位体基質の選択	55
第 3 項	[¹³ C ₂ , ¹⁵ N ₂]尿酸測定条件の設定および検量線の確認	58
第 2 節	低 XOR 活性モデル試料の XOR 活性測定	59
第 4 章	高感度 XOR 活性測定法の臨床検体への応用	60
第 1 節	ヒト血漿を用いた条件の最適化	60
第 1 項	除タンパク法の変更	60
第 2 項	条件検討 基質量、血漿量、反応時間	61
第 3 項	内在性成分の影響	61
第 4 項	ヒト血漿 XOR 活性測定のプロトコール	64
第 2 節	[¹³ C ₂ , ¹⁵ N ₂]尿酸測定法バリデーション	66
第 1 項	ブランク血漿の BG ピーク評価	66
第 2 項	検量線マトリックスの選択と検量線の評価	66
第 3 項	日内および日間再現性評価	67
第 3 節	従来法との比較 ; LC-FL 法を用いた検討	69
第 1 項	LC-TQMS 法と LC-FL 法の比較試験 ; 8 個体の血漿を用いた活性測定	69
第 4 節	20 名の健常人血漿を用いた XOR 活性測定	70
第 5 章	高感度 XOR 活性測定法に関する考察と今後の展望	72
実験の部		74
第 2 章から第 4 章で使用した安定同位体標識化合物の合成		74
第 2 章に関する実験		78
LC 条件の検討① カラム充填剤の検討		78
LC 条件の検討② 移動相の種類		79
酵素反応条件および前処理法の検討		79
測定法バリデーション		83
マウス肝臓、腎臓、血漿 XOR 活性測定および他の測定法との比較		84
第 3 章に関する実験		86
第 4 章に関する実験		86
ヒト血漿の調製		86
酵素反応条件および前処理法の検討		86
測定法バリデーション		89
従来法との比較 : LC-FL 法		90
健常人血漿の XOR 活性測定および血液性化学検査		90
略語一覧		91
参考文献		92
謝辞	101	

緒言

新薬開発のための基礎研究・スクリーニング・非臨床試験・臨床試験と、医薬品が発売されるまでの研究開発の一連の過程を『創薬』という。この過程において有効性と安全性が確保された薬が厚生労働大臣からの医薬品製造販売承認を受けて医薬品として発売される。この新薬開発には9~17年の研究開発期間と1成分あたり1000億円近くもの開発費が必要となるが、その成功確率はわずか2~3万分の1と極めて低い¹。さらに近年ではアンメットメディカルニーズに対応したバイオ医薬品開発や、治験・承認申請に関するガイドラインの改定により安全性に対する要求が高まり、研究開発コストの増加傾向は続いている¹。医薬品の開発ステージが後期になるほど費用は増大し、臨床第三相試験には二~三十億もの莫大な費用が必要となるが、臨床試験の成功確率はわずか10%にとどまる²。また近年では生体内のタンパク質など新薬開発の標的分子が研究し尽され創薬ターゲットの枯渇が深刻化しており、人工知能（AI）による新たな創薬ターゲットの探索や³、産学連携によるオープン・イノベーションの推進⁴などさまざまな取り組みが推進されているが、新薬開発を取り巻く環境は今後さらに厳しさを増していくことが予想される。このような状況下にある製薬企業にとっては、新しい薬を生み出す『創薬』とならび、市販後の薬の安全性や有効性について研究する『育薬』も重要な取り組みの一つである。創薬の段階では未知であった有効性や有害な作用が、販売後に広く使用されることにより初めて明らかになる例も少なくない。そこで、市販後の医薬品についても効果や副作用に対する継続的な研究と医療者・患者への情報提供を行い、薬をより安全で有効に利用できるよう育てていく取り組みが『育薬』である。また、ドラッグ・リポジショニング（DR、既存薬再開発）も近年脚光を浴びている。DRとはすでに承認されている医薬品や開発中止となった新薬候補化合物を、別の疾患の治療薬として再開発することである。すでに臨床試験で安全性が確認された化合物を用いることにより、開発費や期間を大幅に圧縮することができる。現在使用されている医薬品の中にもDRによって再生された化合物は多く、ミノキシジル（リアップ、高血圧治療薬→発毛剤）やシルデナフィル（バイアグラ、狭心症治療薬→勃起不全治療薬）の例が有名であるが、本論文で紹介するキサンチン酸化還元酵素阻害薬アロプリノールも、当初は抗腫瘍薬として開発されたものが、後にその尿酸低下作用が着目され痛風治療薬として生まれ変わったものである。これら過去の成功例は偶然の産物によるところが大きかったが、欧米では2007年頃から大手製薬企業が戦略的なDR研究を推進している⁵。また、アメリカ政府もDRを推進しているが、DRは安く医薬品を開発できるため、医療費削減が急務であるアメリカ政府にとっても魅力的であり、また難病など現在治療薬がない疾患に関してDRによって新薬よりも早く医薬品を患者に届けることが重要と考えているからである⁵。本邦においては、厚生労働省が2015年に策定した『医薬品産業強化総合戦略』において希少疾病等に対するDRの推進が明記されており⁴、今後DR研究はますます盛んになることが予想される。

このような背景の中、著者は製薬企業で働く研究者として、主に質量分析などの機器分析を専門とし、多くの創薬研究・育薬研究に携わってきた。2015年からはキサンチン酸化還元酵素（XOR）阻害剤であるトピロキソスタット（製品名：ウリアデック）の市販後研究に従

事している。この XOR 阻害剤は痛風・高尿酸血症治療薬として開発された⁶。XOR はヒポキサンチン、キサンチンを尿酸へと代謝する酵素であるが、最近では高尿酸血症以外にも様々な病態と XOR との関連に注目が集まっている。著者は、XOR 阻害剤研究の中で XOR 活性測定の難しさと重要性に着目した。XOR 酵素研究の歴史は古く、1902 年にシャルディンガーが発見して以来⁷今日まで多くの基礎研究がなされてきた⁸。XOR 活性測定法についても原始的な方法から高度な分析機器を用いた方法まで数多くの方法が考案・開発され利用されているが、そこにはまだいくつかの課題も残されている。そこで著者は質量分析を専門とする研究者の立場から、これらの問題点を克服するまったく新しい XOR 活性測定法を考案し、その開発に取り組むこととなった。

本研究では、XOR 活性測定法に関する従来法の問題点を明らかとし、これらを解決するための手段を示し、実用的な XOR 活性測定法を確立することを目標とした。

本研究では大きく分けて 3 つのテーマを目的として遂行した。

- I. LC-HRMS を用いた簡便で高精度な動物由来試料の XOR 活性測定法確立
- II. LC-TQMS を用いた XOR 活性測定法の高感度化
- III. 高感度 XOR 活性測定法の臨床検体への応用

本論文は、第 1 章から第 5 章までの構成とする。まず第 1 章では XOR に関する背景について論じ、著者の研究方針を述べる。第 2 章では安定同位体ラベル化合物を基質とし、LC-HRMS を用いたマウス生体試料の XOR 活性測定法開発の結果および考察について述べる。第 3 章では、安定同位体基質と LC-TQMS を用いた XOR 活性測定法の高感度化の手法について述べる。第 4 章では高感度化 XOR 測定法の応用として臨床検体であるヒト血漿 XOR 活性測定法開発の結果と考察について述べる。第 5 章では、開発したこれらの新しい XOR 活性測定法についての応用例と今後の展望および総括を述べることとする。

第1章 序論

第1節 安定同位体基質と質量分析計を用いた新規キサンチン酸化還元酵素活性測定法開発の背景

第1項 キサンチン酸化還元酵素と関連する疾患：痛風・高尿酸血症

痛風は最も古くから認知されている病気のひとつであり、紀元前にはすでにヒポクラテス（B.C.460年～370年頃）によって報告されており、さらには治療薬としてイヌサフランからとれるコルチカム（イヌサフランの根部で、有効成分であるコルヒチンを含む）が使用されていた。また中世ヨーロッパでは、痛風は貴族や王族など身分の高い人々が罹る病気であったことから「帝王病」と呼ばれ、アレキサンダー大王やミケランジェロ、ニュートンやダーウィンなど多くの歴史上の人物が痛風であったことは興味深い⁹。痛風の原因物質は尿酸（uric acid, UA）であるが、すでに18世紀には痛風発作と尿酸との関連が示唆されていた¹⁰。また、1900年代のはじめにはFolinらによって血中尿酸の測定法が発表された¹¹ことから、痛風と高尿酸血症の関連は専門家の間ではよく知られていた¹⁰。我が国においては、明治31年（1898年）に近藤次繁氏によって報告されたのが初めてであり¹²、もともと日本人には縁のない病であったが、第2次世界大戦後の高度経済成長に伴って患者数が増加し、JMDC（株式会社日本医療データセンター）の統計によると本邦における痛風患者は現在170万人、その予備軍である高尿酸血症は540万人である。（JMDC レセプトデータベースより。分析期間：2016/03-2017/02の1年間）女性ホルモンには尿酸を排泄する働きがあるため、女性の尿酸値は低く、痛風患者のほとんどは男性である⁹。

痛風は「風が当たっても痛い」ことが由来であるとか、「風」は病気を表す言葉であり「痛みがおきる全身の病気」という意味であるとか語源に関しては諸説ある¹³が、最大の特徴はその名の通り激しい「痛み」を伴いある日突然発症する痛風発作である。最も頻発する部位は足の親指のつけ根であり、激しい痛みのために発症後2～3日は歩けなくなるほどであるが、発症から1週間～10日で自然とおさまる。放置しておくと数ヶ月後に再発し、この発作を繰り返すと、「痛風腎」など腎臓や他の臓器にも影響を及ぼす¹³。

第2項 痛風の原因物質尿酸とプリン代謝

痛風の原因物質である尿酸(UA) (図 1) はプリン骨格を有し、分子式 $C_5H_4N_4O_3$ 、分子量 168 の白色結晶である。9 位の H の酸解離定数 (pKa) は 5.75 であり、生体内のような生理的条件下ではほとんどが尿酸ナトリウム形で存在する。この尿酸ナトリウムの溶解度は生理的 pH (pH7.4) では 6.4 mg/dL、血漿中ではアルブミンなどの影響により 7.0 mg/dL 程度である⁹。高尿酸血症は、ガイドラインによると性別・年齢を問わず血清尿酸値が 7.0 mg/dL を超えるもの、と定義されている¹⁴。高尿酸血症で生体内の尿酸濃度が高い状態が続くと、温度や pH、体内の成分の影響などなんらかのきっかけにより尿酸塩 (尿酸一ナトリウム monosodium urate ; MSU) 結晶が関節滑膜へ析出し、これが炎症性サイトカイン産生を制御する複合体タンパク (NLRP3 インフラマソーム) の過度の活性化を促し、マクロファージや好中球などに認識され激しい炎症反応を引き起こすことにより痛風が発症する。

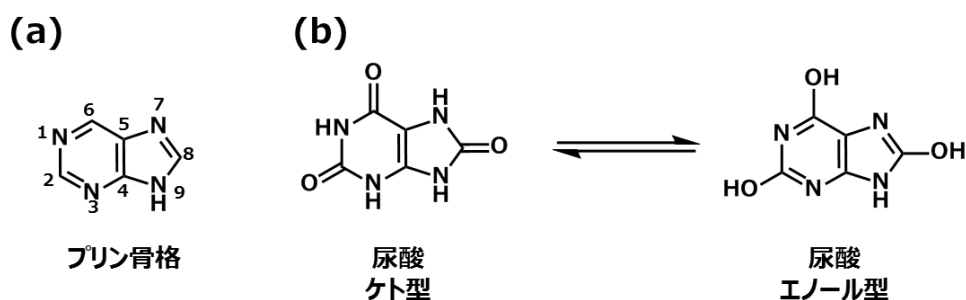


図 1 プリン骨格および尿酸の構造式

(a)プリン骨格、(b)尿酸の構造(ケト型・エノール型)

尿酸は生体内において、①食事、②De novo 経路 (新生合成)、③アデニンヌクレオチドあるいはグアニンヌクレオチドの代謝を経てプリン代謝の最終産物として産生される¹⁵。このうち、ヒポキサンチンからキサンチン、そしてキサンチンから尿酸への代謝を触媒するのがキサンチン酸化還元酵素 (XOR) である (図 2)。ヒトや霊長類では尿酸がプリン体代謝の最終代謝産物である一方、マウスやラットなど他の哺乳類ではウリカーゼという酵素により酸化されアラントインとなり、さらに代謝・排泄されるため、血清尿酸値は 2.0 mg/dL 以下と低い¹⁶。ヒトを含む霊長類は進化の過程で遺伝子変異が発生し、ウリカーゼの機能が完全に消失した^{16,17}。このことは、尿酸値の維持が生物種の生存に重要な役割を果たしてきたことを示唆する。その理由として、主には尿酸による抗酸化能の獲得が挙げられる¹⁸。しかしながら、豊富な栄養を自由に摂取できるようになった現代では、尿酸値の上昇がさまざまな生活習慣病発症の要因となる。

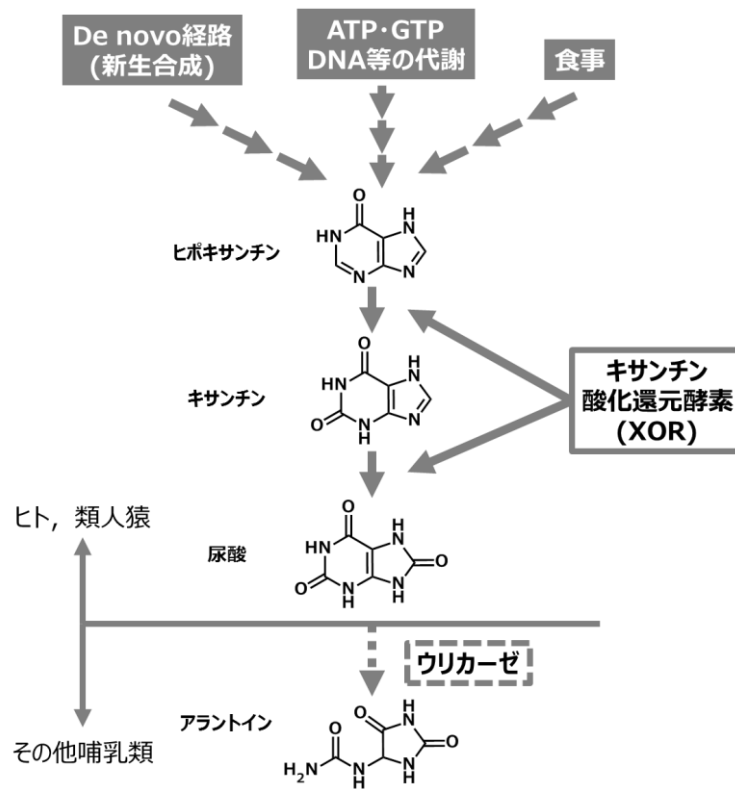


図 2 プリン体代謝経路とキサンチン酸化還元酵素

第3項 痛風・高尿酸血症の治療

我が国においては、痛風は整形外科領域の急性関節炎として取り扱われることが多く、痛風発作時の鎮痛と関節炎の物理療法が主であった¹⁰。また、痛風を伴わない高尿酸血症(無症候性高尿酸血症)については、腎障害に直接関連することや心血管疾患との関連が示唆されながらも、長年に渡って薬物療法の対象疾患にされていなかった。しかし近年、我が国で相次いで XOR 阻害剤が創製、開発された。(フェブキソスタット；2011年 帝人ファーマ、トピロキソスタット；2013年 富士薬品/三和化学研究所、図 3)


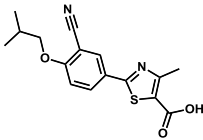
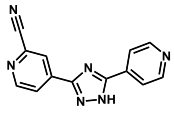
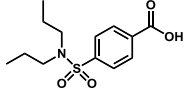
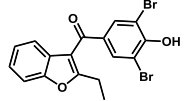


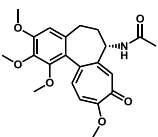
図 3 ウリアデック錠 ((株) 三和化学研究所)
株式会社 三和化学研究所ホームページより

既存の XOR 阻害剤であるアロプリノールは 1956 年 RK.Robins¹⁹ によって抗腫瘍薬として合成され急性白血病治療の研究対象となったが、のちに Elion らによって痛風への治療効果が認められ²⁰、その後尿酸合成阻害薬として長年に渡り使用されてきた最初の XOR 阻害剤であるが、Stevens-Johnson 症候群などの重篤な副作用が稀に起こり、また腎排泄型のため腎障害患者に対する使用に制限があった。また、プリン骨格を有し、他の核酸代謝に影響を及ぼすため、それに起因すると考えられる副作用も生じていた。しかし、第 2 世代として誕生したフェブキソスタットやトピロキソスタットは、非プリン骨格の選択的な XOR 阻害剤であり、アロプリノールでみられるような重篤な副作用が少なく、肝臓における代謝排泄機序を有するため、投与量の減量なしに中等度の CKD 患者にも使用可能であり、さらには腎機能改善効果も示唆されている²¹⁻²³。これまで高尿酸血症は尿酸降下薬の適応症として認可されておらず、「痛風および高尿酸血症を伴う高血圧症」という対象に限定されていた¹⁰。しかし、この 2 つの新しい XOR 阻害剤は高尿酸血症そのものが適応症として認可されており、これら薬剤の登場をきっかけとして、高尿酸血症と腎障害・心血管障害などとの関連を実証する臨床研究が推進されることとなった¹⁰。

ここで、痛風・高尿酸血症の薬物治療についてまとめる。高尿酸血症の原因は産生過剰型と排泄低下型、そして産生過剰・排泄低下の混合型の 3 種類に分けられ¹³、治療ターゲットとしては、前述の XOR 阻害剤のような尿酸産生阻害のほか、尿酸排泄促進や抗炎症に分類される。現在日本国内で使用されている痛風・高尿酸血症治療薬(抗炎症薬を除く)を表 1 に示す。痛風治療薬の市場規模は現在 489 億円程度であるが、そのうち XOR 阻害剤は 9 割を占める。(2016 年 IMS 医薬品市場統計より)

表 1 日本における痛風・高尿酸血症治療薬

分類	一般名／構造式	効能／効果	開発／販売(本邦での発売年)	作用機序
尿酸合成阻害	アロプリノール 	下記の場合における高尿酸血症の是正 痛風、高尿酸血症をともなう高血圧症	田辺製薬/グラクソ・スミスクライン社 (1969年)	プリン骨格を有する XOR 阻害剤。 XOR に対し競合的に阻害し、内因性尿酸の合成を阻害する。XOR により代謝されたオキシプリンールのほうが強力な XOR 阻害作用を有する。
	フェブキソスタット 	1. 痛風、高尿酸血症 2. がん化学療法に伴う高尿酸血症	帝人ファーマ (2011年)	非プリン骨格の選択的 XOR 阻害剤。 XOR に対し競合的に阻害し、内因性尿酸の合成を阻害する。
	トピロキソスタット 	痛風、高尿酸血症	富士薬品/三和化学研究所 (2013年) 共同開発	非プリン骨格の選択的 XOR 阻害剤。 XOR に対し競合的に阻害し、内因性尿酸の合成を阻害する。
尿酸排泄促進	プロベネシド 	1. 痛風 2. ペニシリン、パラアミノサリチル酸の血中濃度維持	科研製薬(1956年)	腎の有機アニオン輸送ポリペプチド (OATP) を阻害して、原尿からの尿酸の再取り込みを抑制する。
	ベンズブロマロン 	下記の場合における高尿酸血症の改善 痛風、高尿酸血症を伴う高血圧症	鳥居薬品(1979年)	腎臓の近位尿細管にある URAT1 と呼ばれる尿酸再吸収を行う尿酸トランスポーター分子を阻害する。

分類	一般名／構造式	効能／効果	開発／販売(本邦での発売年)	作用機序
尿酸分解促進	ラスブリカーゼ	がん化学療法に伴う高尿酸血症	サノフィ(2010年)	尿酸を酸化して5-ヒドロキシイソ尿酸に代謝する酵素。
好中球遊走阻害	コルヒチン 	1. 痛風発作の緩解及び予防 2. 家族性地中海熱	塩野義製薬(1964年)	好中球の走化性因子(LTB4、IL-8)に対する反応性を著明に低下させることにより痛風の発作を抑制すると考えられる。

第4項 キサンチン酸化還元酵素の構造的特徴と働き

キサンチン酸化還元酵素 (Xanthine oxidoreductase, XOR, 図 4) は、細菌からヒトを含む高等動物まで広範囲の生物種が持っている酵素である²⁴。この酵素は 1902 年にシャルディンガーによって牛乳中から発見されて以来、長年に渡って多くの研究が行われてきた⁸。

XOR は分子量が約 300 K の巨大なタンパク質で、細菌以外では分子量 150 K のペプチドの 2 量体であり、哺乳動物におけるアミノ酸配列はほぼ同じ長さを有する。N 末端側から 20 K, 40 K, 85 K の 3 つのドメインから構成され、それぞれのドメインには [2Fe-2S] 型の鉄-硫黄中心、FAD、モリブドプテリンが酸化還元中心として存在している²⁵ (図 4)。

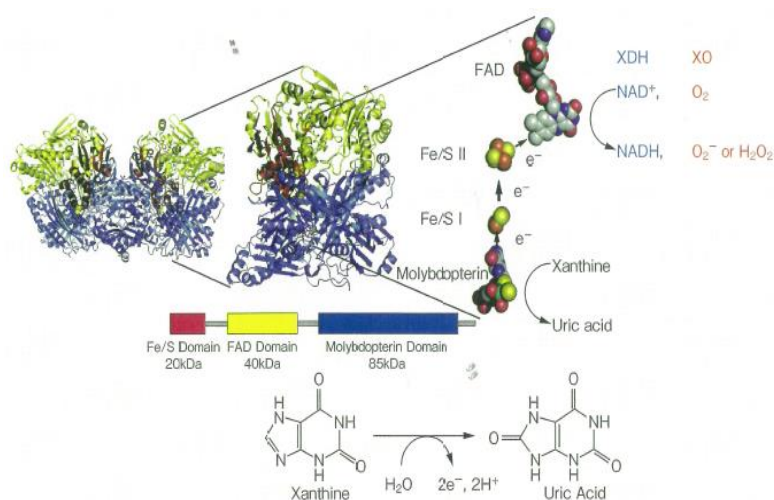


図 4 キサンチン酸化還元酵素²⁶

活性中心であるモリブデンに配位する原子は通常硫黄(S)であるが(sulfo 型)、生体内には硫黄原子と酸素原子(O)が置き換わり、酵素活性を持たないものも存在する(de-sulfo 型)^{27,28}(図 5)。また、この sulfo 型から de-sulfo 型への変換は酵素精製の過程でも容易に起こることが分かっている。非活性型にはモリブデンを含まない型(de-molybd 型)も知られているが、こちらはほとんど無視できる量である²⁹。

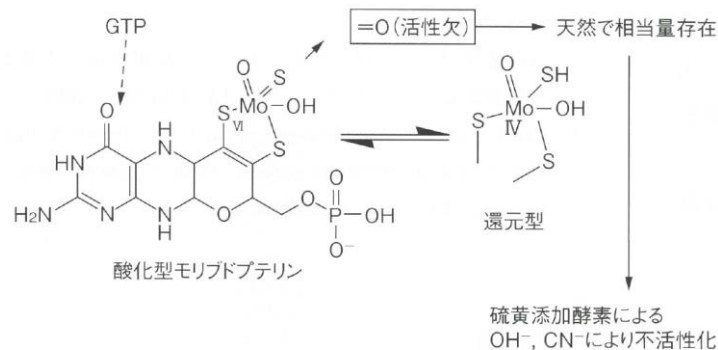


図 5 モリブデンコファクターの構造²⁹

第2項で述べたように、XORはヒトのプリン体代謝系の最終2段階であるヒポキサンチン→キサンチン→尿酸の代謝を触媒する酵素である。XORの基質特異性は広く、それ以外にも多くのプリン、プテリン、ピリミジン、アルデヒドを水酸化する³⁰。XORは生体内において、肝臓、小腸、肺、心臓、腎臓、脂肪組織、血管、脳、脾臓などあらゆる臓器・組織に分布していることがマウスを用いた研究により報告されている³¹。また、マクロファージにおいてもXORは発現している³²。ヒトにおいては、免疫染色化学を用いて、肝臓、心臓、腎臓、脳、大動脈、肺、腸間膜の内皮細胞膜や十二指腸粘膜においてXORの局在が確認されている³³。組織中では主にNAD⁺を電子受容体とするキサンチン脱水素酵素(Xanthine dehydrogenase; XDH)として存在するが、虚血などさまざまな刺激により、哺乳類では分子内のジスルフィド結合形成により可逆的に、またプロテアーゼによる部分分解により不可逆的にキサンチン酸化酵素(Xanthine oxidase; XO)へと変化する³⁴⁻³⁷。XOは酸素を主な電子受容体とし、キサンチンあるいはヒポキサンチンを酸化する過程で酸素を還元してスーパーオキシドアニオン(O₂⁻)、過酸化水素(H₂O₂)を生じる(図6)。

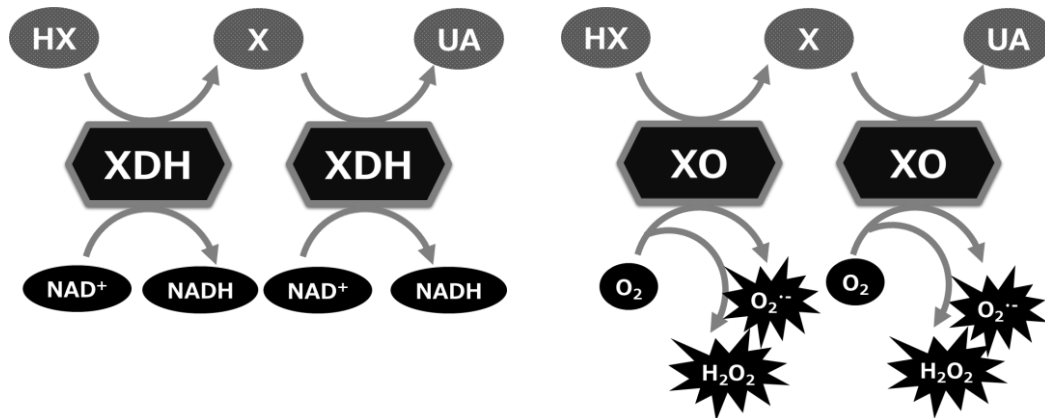


図6 XDHとXO

第5項 キサンチン酸化還元酵素とさまざまな疾患との関連

XOは生体内において主要なROS (Reaction oxygen species) 発生源のひとつとされ、さまざまな病態との関連が指摘されている。まずXORが注目されたのは、虚血再灌流障害である。虚血再灌流障害の原因がフリーラジカルであり、その主な発生源が、虚血再灌流時に活性化されるカルシウム誘発タンパク分解酵素によって組織内のXDHから変換されたXOが発生させるO₂⁻であり、XOR阻害剤であるアロプリノールは虚血再灌流障害を改善することが明らかとなった³⁸⁻⁴⁰。Friedlらはヒトにおいても虚血再灌流により血中XO活性が上昇することを初めて報告した⁴¹。肝疾患における血中XOR活性の上昇も多くの報告があるが⁴²⁻⁴⁷、これはXORが豊富な肝細胞が肝疾患によって障害を受けて、XORが血中に放出されるためと考えられる。最近の研究により、XORとメタボリックシンドロームとの関連が明らかになりつつある。Cheungらの報告では、XORは脂肪細胞分化の初期段階において、転写因子PPAR γ の活性を制御し、肥満の脂肪細胞でXOR遺伝子の発現が上昇し、減量によりその発現が低

下することが明らかとなった⁴⁸。2型糖尿病・肥満モデルマウス (ob/ob マウス) を用いた Tsushima らの研究では、脂肪組織において XOR 遺伝子の発現レベルが最も高く、肥満状態では内臓脂肪組織でその発現が有意に上昇することが報告されている³¹。臨床研究においては、Tam らは肥満小児の体重低下により XOR 活性が低下したことを報告している^{49,50}。これらの研究により、内臓脂肪型肥満を伴うメタボリックシンドロームにおける血清 UA 値の上昇や酸化ストレス亢進と XOR 活性化との関連が示唆される。また、血管機能と XOR 活性の関連についても研究が進められている。血管内皮細胞内には XOR が豊富に存在するという報告があるが⁵¹、血管内皮と XOR に関するさまざまな報告は、血中 XOR がグリコサミノグリカン (GAG) を介して血管内皮細胞の外表面に結合し、この係留型 XOR から発生する ROS が血管内皮機能障害を引き起こすことを示唆している。Adachi(1993)らによるヒトから精製した XO 酵素(h-XOD)を用いた研究により、XOR がリジンあるいはアルギニンを介して多糖鎖と静電的に結合すること、培養ブタ大動脈内皮細胞に XOR が結合し、ヘパリン処理により阻害されること、健常人にヘパリンを静脈内投与し、血中の XOR 濃度の迅速な上昇を認めたことを報告している。これらの結果は、XOR が血管内皮細胞の外側表面に局在することを示唆するものである。White (1996) らのコレステロール負荷ウサギを用いた研究⁵²では、アセチルコリン投与による血管内皮細胞依存性の血管拡張反応の減少が XOR 阻害剤アロプリノール投与により顕著に改善し、これらの反応は血清 UA 値には無関係であったことが示された。このとき、コレステロール負荷ウサギの血中 XOR 活性は上昇し、アロプリノールにより活性が通常食コントロール群以下にまで阻害された⁵²。ヒトにおいても血管組織を用いた研究が行われており、Spiekerman (2003) らの ESR を用いた研究によると、冠動脈疾患患者では健常者と比較して冠動脈組織における XOR 活性が上昇していることが明らかとなった⁵³。また、ヘパリン処理により血中の XOR 活性の上昇が認められた。これは、Adachi らの報告と同様に、ヘパリン投与によって血管内皮細胞に GAG を介して結合していた XOR が遊離し、血中に放出されたことを示している⁵³。Landmesser(2002)ら⁵⁴は慢性心不全患者において内皮に結合した XO 活性の上昇と SOD 活性の低下を報告した。マクロファージにも XOR は局在するが³²、Kushiyama らの報告⁵⁵によると、マクロファージ泡沫細胞の形成とアテローム性動脈硬化症の発症にも XOR が関与している。その他にも、加齢⁵⁶、敗血症⁵⁷、呼吸促進症候群⁵⁸、高血圧⁵⁹、1型糖尿病⁶⁰、2型糖尿病^{61,62}、血液透析^{59,63}、アルコール中毒⁶⁴、慢性閉塞性肺疾患⁶⁵、肺がんおよび肺炎⁶⁶、統合失調症⁶⁷、腎移植⁶⁸、肝移植⁶⁹、多発性硬化症⁷⁰、筋萎縮性側索硬化症⁷¹など多くの疾患において XOR 活性との関連が研究されている。

第6項これまでのキサンチン酸化還元酵素活性測定法

前項で述べたように、病態と XOR の関連について多くの仮説が提唱されているが、これらの研究をすすめるうえにおいては、高精度で高感度な XOR 酵素活性測定法が必須となる。

1902年にシャルディンガーは牛乳にアルデヒドと酸化還元指示薬であるメチレンブルーを加えるとメチレンブルーが還元され青色が消失することを発見した。後に、このメチレン

ブルーの脱色作用を持つ酵素はシャルディングー酵素と名付けられた。それから 20 年あまりが経過し、多くの研究者によって研究がすすめられ、1922 年に Morgan らによってシャルディングー酵素にヒポキサンチン・キサンチンを尿酸へと酸化する働きがあることが見出され「キサンチンオキシダーゼ」と名付けられた⁷。このように、最も初期の活性確認方法はメチレンブルーの色を利用した比色法であった。検出方法が目視から分光光度計に変わりはしたものの、この方法は長きに渡り XOR 酵素研究に貢献することとなった。他にも、酵素の発見以来様々な XOR 活性測定法が開発されているが、それらは大きく分けて、比色・吸光度法（紫外・可視）、モノメーター法、蛍光法、放射性同位体法、ELISA 法などに分類され、そのほかにもクロマトグラフィー技術と検出器を組み合わせた高感度測定法も開発されている。これまで報告された XOR 活性測定法を表 3 に示す。

① 比色法(Colorimetry)

比色法は、初期の目視による色調の変化の観察から、1940 年代に Arnold O. Beckman によって分光光度計が発明されて以来、より精度の高い測定法へと発展していった。分光光度計を用いる吸光度法のうち、呈色試薬を用いて測定するものを比色法として分類した。

嫌気条件下において電子受容体として働くもの

メチレンブルーを用いた測定法は、メチレンブルー自身が嫌気条件下で酵素反応の電子受容体として働き、無色のロイコメチレンブルーとなる色調の変化を目視で観察した。Morgan(1922)⁷らはこの方法を用いて、ウシミルクだけでなくウシの肝臓、脾臓、ラットの肝臓、腎臓、脾臓、肺、筋肉などにメチレンブルーの脱色作用があることを確認した。さらに、モノメーターによる酸素取り込み評価法を用いた好氣的条件下での尿酸生成の確認および、Folin 試薬を用いた尿酸の定量も同時に実施した。その後 Dixon(1924)⁷²によりウシミルクからの部分精製酵素とヒポキサンチン/メチレンブルーを用いた反応速度論的解析が行われ、シャルディングー酵素が Morgan の報告したキサンチンオキシダーゼと同一のものであることが確認された⁷²。このように、メチレンブルーを用いた方法は XOR 酵素の発見および同定に大きな役割を果たした。Feigelson(1952)⁷³は Haas(1944)⁷⁴が開発した方法をもとに、新しい XDH 活性測定法を報告した。この方法ではメチレンブルーの代わりに DCPIP を電子受容体として用い、嫌気条件下還元された DCPIP の脱色を、分光光度計 (600 nm) を用いて測定した⁷³。

スーパーオキシドアニオンによる還元作用を利用した方法

Fried(1974)⁷⁵らは NBT(nitro blue tetrazolium)の還元反応による黄色→紫色の色調変化を 540 nm の吸光度を用いて評価する方法を報告している。NBT は XO により生成した O₂によって還元され、水不溶性のブルーホルマザン色素を生じる。水不溶性のホルマザンによって不均一な分散が生じ、結果に影響を及ぼすため、本方法ではゼラチンを添加して不溶物を可溶化している⁷⁵。NBT は一部が XO の作用で直接的に還元されることが欠点である⁷⁶。ホルマザン色素を利用する方法としては他に Richette(2016)⁷⁷らが INT(Iodonitrotetrazolium chloride)を用いてヒト血清の XO 活性を報告している。INT は NBT とは異なり水溶性のホルマザン色素を生じることが利点である。Horecker と Heppel(1949)⁷⁸

はシトクロム c を用いた活性測定法を報告している。ミトコンドリア内膜に結合しているヘムタンパクの一種であるシトクロム c は、還元を受けると 550 nm の吸光度が上昇する。これまでに、シトクロム c が XOR により還元を受けることは知られていたが、Horecker らはこの反応が嫌気条件下ではなく酸素を供給することにより進行することを見出した⁷⁸。このシトクロム c の還元は、XO によって酸素から還元された O_2^- が引き起こすものと考えられた。しかし、シトクロム c は NADPH レダクターゼなどの還元酵素や生体内に含まれる様々な種類の還元物質によっても還元を受けることから、選択性に問題があった。そこで、Friedl(1989)⁷⁹ らはシトクロム c 法の選択性をより高めるため、1968 年に Irwin Fridovich と Joe McCord³⁹ によって発見された、 O_2^- を消去する酵素であるスーパーオキシドディスムターゼ(SOD)を利用する改良法を報告した⁷⁹。彼らは XO とキサンチン、シトクロム c の反応系に SOD 添加/未添加の検体を調製し、その差分を求めることにより、直接的に XO による O_2^- の生成を評価し、ラットのやけどモデルにおいて血漿 XO 活性が上昇することを見出した⁷⁹。Newaz(1998)⁸⁰ らは、SOD 添加/未添加によるシトクロム c 改良法を用いて、46 名の健常人血漿の XO 活性を測定し、年齢、性別、体重、人種などとの関連を調べた。しかし、Newaz が報告したヒト XOR 活性値の結果(およそ 1-6 nmol O_2^- /mL/min)は Friedl らが報告したラット正常群血漿の XO 活性(8.95 nmol O_2^- /mL/min)とほとんど変わらず、ヒト血漿 XO 活性を正確に測定できているのかは疑問が残る。

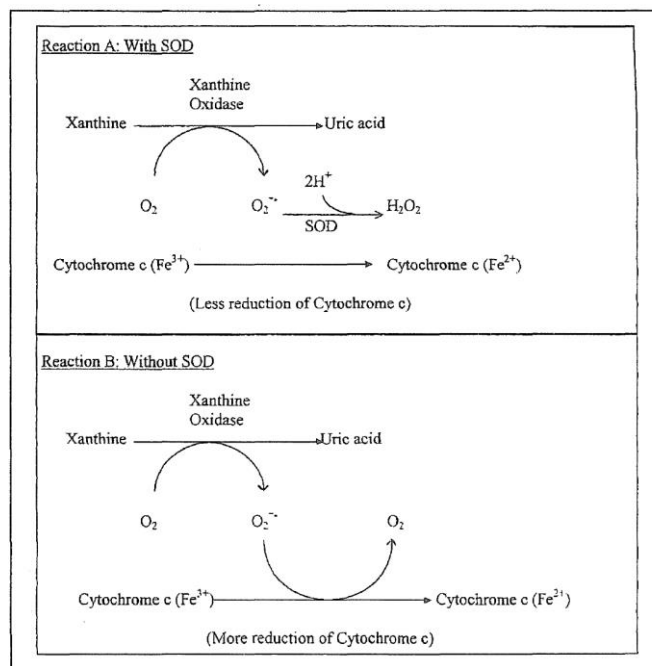


図 7 シトクロム c を用いた XO 活性測定法の原理⁸⁰

過酸化水素と peroxidase を利用した方法

O_2^- は安定性が悪く、酸性条件下で容易に過酸化水素に変換されるため⁷⁶、 O_2^- そのものを XOR 活性測定に利用するには、再現性等に懸念があった。そこで、 O_2^- の還元作用を

利用した方法ではなく、過酸化水素とペルオキシダーゼを利用した XO 活性測定法が開発された。Sugiura(1981)⁸¹らは、XO により生成した過酸化水素と MBTH(3-methyl-2-benzothiazolinone hydrazine hydrochloride)、DMA(N,N-dimethylaniline)をペルオキシダーゼ存在下で反応させる酸化的カップリングを利用した XO 活性測定法を開発した。(図 8) ウシミルク由来精製酵素を用いて評価したところ、日内及び日間の再現性を表す CV 値は 1.4%及び 1.5%と良好な値であった。また、尿酸生成を吸光度 293nm で測定する従来法と比較した相関係数は 0.998 と良好な相関関係を示し、従来法よりも検出感度は高かった⁸¹。

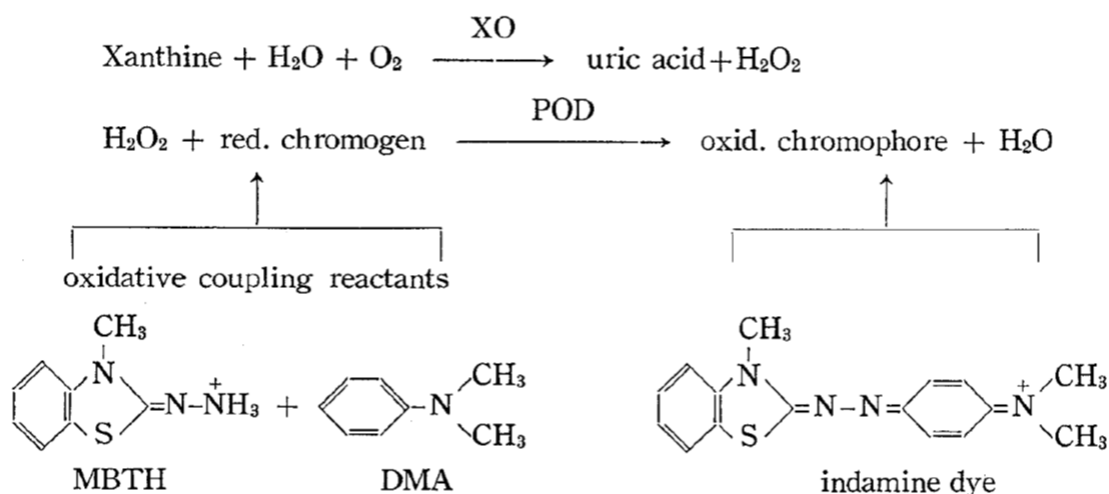


図 8 MBTH と DMA の酸化的カップリングを用いた XO 活性測定法⁸¹

Majkić-Singh ら(1987)⁴²は ABTS(2,2'-azino-di(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonate)をクロモゲンとして用いて、図 9 の反応により生成した過酸化水素と西洋ワサビペルオキシダーゼ(HRP)存在下で反応させ、酸化 ABTS の吸光度(410 nm)を測定する方法を開発し、健常人と肝障害患者の血清 XO 活性を測定し、肝障害患者の XO 活性が健常人より高いことを報告した。彼らは、ABTS を用いた比色法は他の方法(モノメーター法、蛍光法、他の比色法や放射性同位体法)に比べて安価で時間がかからないことが利点であると述べている⁴²。

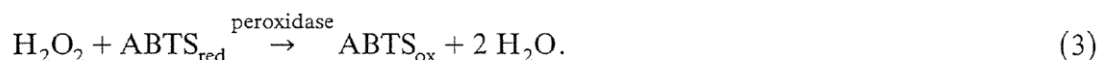
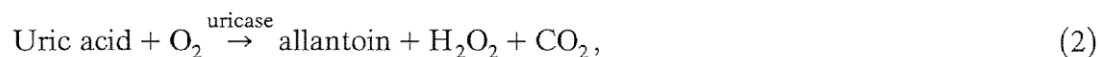
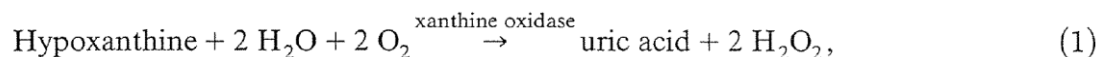


図 9 ABTS とペルオキシダーゼを利用した XO 活性測定法⁴²

ABTS の代わりに同じく HRP の基質である ADHP (10-Acetyl-3,7-dihydroxyphenoxazine, Amplex Red®) を使った方法は XO 活性測定キットとして市販されている⁸²。ADHP は HRP 存在下で過酸化水素と反応し、レゾルフィンを生成する。このレゾルフィンは比色法(測定波長: 570 nm)あるいは蛍光法(励起波長 535 nm, 蛍光波長 587 nm)で測定することが可能である。

その他

その他の比色法としては、Litwack ら(1953)⁸³が報告した、フォリンのフェノール試薬を用いた比色法がある。XOR 反応の生成物として尿酸を定量する方法は、ラット肝臓などウリカーゼを含む組織を測定する場合、尿酸がアラントインに分解してしまうため検出が難しかった。そこで、添加した基質キサンチンの量を測定することによりその減少量から XOR 活性を求めるという方法を開発した⁸³。

以上のように、呈色試薬を XOR の電子アクセプターとして利用する方法や O₂ や過酸化水素による酸化・還元反応を利用した比色法は、多くの方法が開発され利用されている。比色法で用いられる吸光度の測定波長は長波長の可視領域であるため、後述する紫外法(UV)よりも検出の特異性は高いと考えられる。しかし、生体内には XO 以外にも O₂ や過酸化水素を精製する酵素が数多く存在するため⁷⁶、生体試料中の XOR 活性を測定する際にはそれらの酵素に対する選択性に留意する必要がある。XOR の活性を正しく評価するためには、選択的 XOR 阻害剤を反応系内に添加し、その反応系で測定された吸光度をバックグラウンド(BG)として差し引く方法が最も有効であると考えられる。Amplex Red® を使った XO 活性測定キットは容易に入手でき⁸²、測定も手軽に行えるため、この方法を用いたヒト血漿 XO 活性測定の結果が数多く報告されているが、著者がこのキットを用いて非常に低いことが想定される健常人の血漿 XO 活性を測定したところ、選択的 XO 阻害剤を添加しても消失しない非特異的な吸光度あるいは蛍光の上昇が認められ、活性を正しく評価することはできなかった。このような、非特異的な BG 値の評価が正しくなされていないと思われる報告も多く、結果の解釈には注意が必要である。

② 吸光度法

ここでは吸光度法のうち、XOR 酵素により生成する尿酸の吸光度(約 290 nm)を利用する方法についてまとめることとする。1939 年に Ball によって純度の高い酵素精製法が報告され⁸⁴、1940 年代に分光光度計が発明されて以降、精製酵素と吸光度法を用いた XOR 酵素研究は多くの成果を生み出すこととなった。

プリン体を分光光度計で測定する場合、ほとんどが 250–290 nm の紫外領域に吸収を持ち、特異性に欠けることが問題であった。そこで、Kalckar(1947)⁸⁵ は生体試料中のプリン体(キサンチン、ヒポキサンチン、尿酸など)の新規定量法として XO やウリカーゼなどの酵素を利用し、反応前後の吸光度の差を評価することにより、特異性を上げた新しいプリン体定量法を開発した。ヒポキサンチンやキサンチンの定量をする場合は、反応系内に XO を添加し、尿酸の吸光度 290 nm の上昇及びヒポキサンチン、キサンチンの吸光度 250 nm、

270 nm の減少を評価し、尿酸を定量する場合にはウリカーゼを添加して減少する 290 nm の吸光度を測定する。Feigelson(1952)⁷³は Kalckar の方法を XO 活性測定法へと応用し、ウシミルク由来精製酵素とキサンチンを用いた、アスコルビン酸による XO 活性阻害作用を評価した。その後、Avis(1955)⁸⁶、Bergel(1959)⁸⁷、Bray(1966)⁸⁸らのグループが本方法を用いて酵素の安定性や機能について報告している。Elion(1966)^{20,89}はヒト肝臓由来の XOR を用いてアロプリノールの *in vitro* 阻害活性を吸光度(292 nm)測定により評価した。

XOR 酵素の研究が、精製酵素から生体試料中の酵素に移るとともに、活性測定の前処理方法にも多くの工夫がなされるようになった。ラット組織由来の XOR 活性測定においては、尿酸分解酵素ウリカーゼが存在することにより、生成物である尿酸の吸光度を測定する方法は困難であったが、Hashimoto(1974)⁹⁰はウリカーゼ阻害剤であるオキソソルホン酸を用いることにより、ラット肝臓、小腸、脾臓をはじめとする全身の組織の XOR 活性測定に成功した。Stirpe と Della Corte(1969)^{34,35}は、吸光度法(292 nm)を用いて、NAD⁺あるいはメチレンブルー添加/未添加条件で活性測定を行い、NAD⁺依存性なタイプ(Type D, XDH)と O₂ 依存性なタイプ(Type O, XO)が *in vitro* で可逆的(S-S 結合の形成)あるいは不可逆的(プロテアーゼによる切断)に容易に変換されることを見出した。以降、反応系内に NAD⁺添加/未添加で XO と XDH の分別評価が行われるようになった。この場合、NAD⁺未添加で生成する尿酸を測定する場合は XO、NAD⁺添加で UA を測定する場合は XDH+XO(=XOR)、NAD⁺が NADH に還元されるとき吸光度(320 nm)を測定する場合は XDH となる。あるいは、XOR の値から XO を差し引くことで XDH 活性を求める方法もある。

Ramboer(1969)⁹¹は放射性同位体ラベル基質を用いない高感度活性測定法として、吸光度法を用いたヒト血清 XOR 活性測定法を開発した。高感度化のため、血清を G25 で精製し、基質添加後にインキュベーションを 4 時間行い、さらに反応後の試料溶液を Dowex カラムで精製し、過剰なキサンチンと尿酸を分離した後、光路長 4 cm のセルを使用して吸光度(285 nm)を測定した。25°C、pH8.35 において 1 分あたり 1 μmol のキサンチンが尿酸に変換する単位を 1 EU として定めた。検出の下限は 1 mEU/L serum であると述べているが、単位換算すると 60 pmol/h/mL に相当する。本方法を用いて Ramboer は 25 名の健常人血清の XOR 活性を測定し、そのうち 15 名は検出限界以下であり、最も高い被験者の活性は 5 mEU/L であった⁹¹。これまでのヒト血清 XOR 活性の値と大きな解離はなく信頼できる結果であり、また高感度化のために様々な工夫を凝らしているため非常に興味深い報告であるが、血清を 2 mL 使用することやインキュベーションに 4 時間かかること、光路長 4 cm のセルを用いて測定するなど、ルーチンで多検体を測定するには困難な面もある。Cighetti ら(1989)⁹²は、HPLC と UV 検出器を組み合わせ、Xan から生成する UA と NAD⁺から生成する NADH をそれぞれ HPLC で分離し、292 nm と 320 nm で検出する方法を開発し、ラットの心臓と腎臓の XOR(XDH)活性を測定した。心臓と肝臓組織サイトをゲルろ過あるいは透析で処理した試料を用いたが、心臓では内在性の NADH、腎臓では NADH と UA が 0 分インキュベーション試料から検出されたため、BG 値を差し引く必要があったと述べている。内在性成分の残存は、前処理方法や組織の種類によって異なることが示唆された。Tan ら(1995)⁹³は HPLC と UV 検出器の組み合わせによる高感度測定法を開発し、G25 処理したヒト血漿 XOR 活性を測定し、虚血再灌流の影響を評価した。測定に使用した血漿量や測定時間については記載がなく詳細は不明であるが、健常人の血漿 XOR 活性も検

出でき、その値($0.12 \pm 0.12 \mu\text{U}/\text{mg protein}$)もこれまでの報告と大きく解離せず信頼できる結果であった。

吸光度法は簡便で迅速な活性測定が可能であるため、本方法を用いた XOR 活性の報告は数え切れないが、中には単位の定義が不明であったり、これまでの報告と大きくかけ離れた活性値であったりと、混乱した結果も散見されるため、結果の解釈には注意する必要がある。

③ マノメーター法

マノメーター(差圧計)を用いた酸素取り込み量の測定も古くから用いられてきた方法である。Morgan⁷(1922)は嫌気条件、好気条件におけるラット組織あるいはウシミルクのヒポキサンチン・キサンチン酸化反応を調べるため、のメチレンブルーを用いた比色法だけでなく、マノメーターを用いた酸素取り込みも測定した。その後も 1940~1950 年代ごろまでラットの肝臓やウシミルク精製酵素を用いたマノメーター法による酸素取り込み評価が実施されてきたが^{73,94-101}、生体試料を用いる場合の非特異的な酸素取り込みを排除することが困難であることや、XOR 酵素の TypeD/TypeO の存在の判明、他の高感度な活性測定法の発展に伴い、マノメーター法はほとんど使用されることはなくなっていった。

④ 蛍光法(プテリン法)

XOR は基質特異性が広く³⁰、その特性を生かした活性測定法も開発された。Lowry(1949)¹⁰²は、プテリン(2-amino-4-hydroxypteridine)がウシミルク由来の XOR により酸化され、強力な蛍光を持つ IXP に変換されることを見出した。Burch ら(1956)¹⁰³はこの方法をもとに、ラット肝臓、腎臓、および心臓の XOR 活性を測定した。しかし、ラット脳については活性が低く測定することができなかった¹⁰³。Sasaoka ら(1988)¹⁰⁴は HPLC と蛍光検出器を組み合わせることでプテリン法を高感度化し、ラット肝臓や腎臓の他、これまで測定できなかったラット脳の活性測定にも成功した。Beckman ら(1989)¹⁰⁵は、プテリンを用いて精製酵素およびラット肝臓、ヒト肝臓の活性を測定し、キサンチンを基質としたときの活性と比較し、プテリンの酸化反応がキサンチンの酸化反応よりも遅く、その比率は温度や種によって異なることを見出した。これは基質によって XOR 酵素に対する親和性が異なることを示唆している。McHale ら(1979)⁴⁴は蛍光法を用いて様々な疾患を持つ被験者の血清の活性を測定し、急性ウイルス性肝炎や急性胆のう炎で活性が大幅に上昇していることを報告した。しかし、13 名中 4 名の活性は検出することができなかった。Yamamoto ら(1996)⁴⁵は、HPLC と蛍光検出器の組み合わせ、さらにインキュベーション時間の延長と基質濃度の増加により、高感度なヒト血漿 XO 活性測定法を確立した。さらに、健常人と痛風患者で血漿 XO 活性に差がなく、C 型肝炎および 1 名の糖原病 I 型(フォン・ギールケ病)患者で血漿 XO 活性が有意に高かったことを報告した⁴⁵。Tam ら(2014, 2016)^{49,50}はプテリンの代わりに Lumazine を基質として用い、生成する isoxantholumazine を HPLC/蛍光検出器で測定し、肥満の子供の血漿 XOR 活性を測定し、食事療法による体重低下に伴い血漿 XOR 活性も低下することを報告した。

以上のように、蛍光法は HPLC との組み合わせにより低いとされる健常人の血漿 XOR 活性も測定できるほど高感度な測定法である。しかし、基質として用いるプテリンは哺乳

類における主要な基質であるキサンチンとは酵素に対する反応性が異なり、XOR による酸化の反応速度はキサンチンのそれよりも遅い。また、その比率は温度や種によっても異なるため⁴⁴、キサンチンを用いた方法で得られた活性値と直接比較することは難しいと考えられる。

⑤ 放射性同位体法

プテリンは酵素との反応性がキサンチンとは異なると述べたが、キサンチンと同等の反応性を持ち、さらに高感度検出が可能なのがこの放射性同位体法である。測定原理は、放射性同位体を持つ原子でラベルしたキサンチン(あるいはヒポキサンチン)を基質として、生成する放射性同位体ラベル尿酸の放射能を液体シンチレーションカウンター(liquid scintillation counter, LSC)で測定する。検出する放射性同位体尿酸はもともと生体試料中には含まれていないため、BG 値を差し引く必要がなく、生体中の内在性夾雑物の影響も受けにくいことが利点である。

Ultmann ら(1960)¹⁰⁶は放射性原子 ^{14}C でラベルされた Xan を用い、XOR により生成した [^{14}C]尿酸にさらにウリカーゼを反応させ、得られた $^{14}\text{CO}_2$ を LSC を用いて測定し、マウス脾臓リンパ細胞の活性を測定した。Al-khalidi ら(1965)⁴⁷は [^{14}C]キサンチンを基質として、生成した [^{14}C]尿酸と過剰の [^{14}C]キサンチンを Dowex-50 カラムで分離した後 LSC で測定する方法を開発し、さまざまな動物種の XOR 活性を測定した。健常人のヒト血清については 20 名中 18 名が検出限界未満であった⁴⁶。Al-khalidi と同じ研究グループの Shamma'a ら(1973)⁴³は同様の方法を用いて 2000 名という大規模なヒト血清 XOR 測定を行い、ウィルス性肝炎における大幅な血清 XO 活性の上昇を報告した。定量下限は 0.1 mU/L(単位換算すると 6 pmol/h/mL)であり、正常コントロール群 20 名のうち 17 名は定量下限未満であった。他にも、電気泳動^{58,59,107}や HPLC⁶⁹との組み合わせによる放射性同位体法を用いた XOR 活性値が報告されている。

放射性同位体法は高感度に測定でき、本来の基質であるキサンチンと酵素に対する反応性も同等であり、放射能を検出するため特異性が高く生体試料中の夾雑物の影響も受けにくい。一方、放射性同位体を使用できる施設には制限があり、放射性物質による汚染のリスクも伴うため、ルーチンの測定には使いづらいという欠点もある。

⑥ その他

ELISA や RIA を用いた酵素定量

ELISA 法^{69,108-110}を用いた XOR 酵素量の測定結果が報告されているが、XOR には活性中心の構造によって活性型と非活性型が存在する^{27,28}ため、酵素量の測定だけでは XOR 活性を反映しているとは言えない。また、XOR 阻害剤によっても酵素量と活性の関係は変化するため、ELISA 法によるタンパク定量と合わせて、別の方法で XOR 活性測定も実施する必要がある⁶⁹。

電子スピン共鳴法(ESR)

電子スピン共鳴法(ESR)を用いて、XO により生成する O_2 を測定する方法^{53,54,65}も報告さ

れているが、大型の装置が必要であり、さらに生体試料を用いる場合は生体内の O₂ 消去能の働きなどに注意が必要である。

その他、検出に電位差を用いる方法^{111,112}も報告されている。尿酸を電気化学検出器 (ECD) で測定する方法は多いが、Tan ら(1993)¹¹³は XOR で生成する尿酸を HPLC/ECD を用いて測定することにより、吸光度法よりも 1000 倍高感度な活性測定法を確立し、新生児の血漿 XOR 活性を報告している。

ここまで、すでに報告されている従来の XOR 活性測定法について述べたが、それぞれの課題の主なものをまとめると以下の通りである。

表 2 XOR 測定法の課題

測定法	課題
比色法	特異性、検出感度不足
吸光度法	検出感度不足、内在性尿酸の影響、内在性夾雑物の影響
マンノメーター法	特異性、検出感度不足
蛍光法	基質であるプテリンと酵素との反応性がキサントシンと異なる
放射性同位体法	施設の制限、汚染のリスク
ELISA 法	非活性型の存在によりタンパク量だけでは活性値を反映していない

表 3 XOR 活性測定法一覧

文献	年	著者	基質	測定原理	検出法	測定対象
①比色法						
	1902	Schardinger	アルデヒド/MB	MB 還元	青色の消失(目視)	ウシミルク
7	1922	Morgan	HX/MB(嫌気条件)	MB 還元	青色の消失(目視)	ラット,肝臓、腎臓、脾臓、肺、筋肉
72,114	1924	Dixon	HX/MB(嫌気条件)	MB 還元	青色の消失(目視)	ウシミルク粗精製酵素
73,115	1952	Feigelson	Xan/DCPIP	DCPIP 還元	分光光度計 600nm の減少	精製酵素
75	1974	Fried	Xan/O ₂	NBT 還元	分光光度計 540nm	精製酵素
77	2016	Richette	Xan/O ₂	INT 還元	分光光度計 505nm	ヒト(肥満)血清
78	1949	Horecker	HX/O ₂	シトクロム C 還元	分光光度計 550nm	精製酵素
79	1989	Friedl	Xan/O ₂	シトクロム C 還元、SOD あり/なし	分光光度計 550nm	ラット(やけどモデル)血漿
80	1998	Newaz	Xan/O ₂	シトクロム C 還元、SOD あり/なし	分光光度計 550nm	ヒト(正常)
81	1981	Sugiura	Xan/O ₂	H ₂ O ₂ による MBTH+DMA の酸化的カップリング	分光光度計 600nm	精製酵素
42	1987	Majkić-Singh	HX/O ₂	H ₂ O ₂ による ABTS 酸化	分光光度計 410nm	ヒト(正常,肝障害)
116	1994	Supnet	HX/O ₂	H ₂ O ₂ による ABTS 酸化	分光光度計 410nm	ヒト(早期出産新生児)血漿
61	2005	Kuppusamy	HX/O ₂	H ₂ O ₂ による ABTS 酸化	分光光度計 410nm	ヒト(糖尿病)
117	2010	Martinez-Hervas	HX/O ₂	Amplex Red		ヒト(高脂血症)血漿
83	1953	Litwack	Xan	Folin 試薬で Xan 測定	分光光度計 660nm	ラット肝臓
7	1922	Morgan	HX/MB	Folin 試薬で UA 定量	目視	雄牛,肝臓、脾臓
118	2016	Caliceti		化学発光法ルミノール		HUVEC
②吸光度法						
85	1947	Kalckar	Xan	UA 生成	分光光度計 295nm	血漿、組織
73	1952	Feigelson	Xan	UA 生成	分光光度計 290nm	精製酵素
86	1955	Avis	Xan	UA 生成	分光光度計 290nm	精製酵素
87	1959	Bergel, Bray	Xan/O ₂	UA 生成	分光光度計 295nm	精製酵素
88	1966	Bray	Xan/O ₂	UA 生成	分光光度計 295nm	精製酵素
20,89	1966	Elion	Xan	UA 生成	分光光度計 292nm	精製酵素、マウス、ヒト肝臓
35	1968	Stripe	Xan/NAD ⁺ あり/なし	UA 生成	分光光度計 292nm	ラット肝臓
91	1969	Ramboer	Xan	UA 生成	分光光度計 284nm	ヒト(正常)血清
90	1974	Hashimoto	Xan	UA 生成	分光光度計 292nm	ラット肝臓、小腸、脾臓
119	1976	Waud	Xan/NAD ⁺ あり/なし	UA 生成	分光光度計 292nm	ラット肝臓
79	1989	Friedl	Xan/NAD ⁺ あり/なし	UA 生成	分光光度計 293nm	ラット(やけどモデル)血漿

文献	年	著者	基質	測定原理	検出法	測定対象
92	1989	Cighetti	Xan/NAD ⁺ あり/なし	UA 生成+NADH 生成	HPLC/UV 292nm&340nm	ラット心臓、腎臓
41	1990	Friedl	Xan/NAD ⁺ あり/なし	UA 生成	分光光度計 293nm	ヒト(虚血再還流障害)血漿
93	1995	Tan	Xan/NAD ⁺ あり/なし	UA 生成	HPLC/UV 285nm	ヒト(虚血再還流障害)血漿
64	1996	Grattagliano	Xan	UA 生成	分光光度計 295nm	ヒト(アルコール中毒、正常)血漿
65	1998	Pinamonti	Xan	UA 生成	HPLC/UV 254nm	ヒト(COPD、正常)肺胞洗浄液
66	2001	Akyol	Xan	UA 生成	分光光度計 293nm	ヒト(肺がん、肺炎)気管支洗浄液、血漿
67	2002	Akyol	Xan	UA 生成	分光光度計 293nm	ヒト(精神分裂病、正常)血漿
120	2003	Liu	Xan	UA 生成	HPLC/UV 280nm	ヒト(正常)血漿
48	2007	Cheung	Xan	UA 生成	HPLC/UV 290nm	細胞溶解物
68	2010	Dogowska	Xan/NAD ⁺	UA 生成+NADH 生成	分光光度計 340nm&302nm	ヒト(腎移植)血漿
63	2013	Miric	Xan	UA 生成	分光光度計 293nm	ヒト(透析)血清
③マノメーター法						
7	1922	Morgan	Xan	O ₂ 取り込み	マノメーター	ウシミルク
94	1941	Axelrod	Xan	O ₂ 取り込み	マノメーター	ラット肝臓
95	1949	Westerfeld	Xan	O ₂ 取り込み	マノメーター	ラット肝臓
96	1950	Van Meter	HX、Xan	O ₂ 取り込み	マノメーター	ラット肝臓
97	1950	Westerfeld	Xan	O ₂ 取り込み	マノメーター	ラット肝臓
98	1954	Richert	Xan	O ₂ 取り込み	マノメーター	ラット肝臓
73	1952	Feigelson	Xan	O ₂ 取り込み	マノメーター	精製酵素
99	1952	Westerfeld	HX/MB	O ₂ 取り込み	マノメーター	ラット肝臓、小腸
100	1958	Fridovich	HX/O ₂	O ₂ 取り込み	Sulfite-enhanced oxygen uptake	精製酵素
101	1959	Bacila	HX/O ₂	O ₂ 取り込み	Sulfite-enhanced oxygen uptake	ラット肝臓
④蛍光法						
102	1949	Lowry	プテリン	IXP 生成	分光蛍光光度計	精製酵素
103	1956	Burch	プテリン	IXP 生成	分光蛍光光度計	ラット肝臓、腎臓、心臓
121	1967	Haining	プテリン	IXP 生成	分光蛍光光度計	ラット肝臓
44	1979	McHale	プテリン/MB	IXP 生成	分光蛍光光度計	ヒト血清
104	1988	Sasaoka	プテリン/DCPIP	IXP 生成	HPLC/FL	ラット肝臓、腎臓、脳
105	1989	Beckman	プテリン/MB	IXP 生成	分光蛍光光度計	精製酵素、ラット肝臓、ヒト肝臓
45	1996	Yamamoto	プテリン	IXP 生成	HPLC/FL	ヒト血漿
56	2007	Aranda	プテリン	IXP 生成	分光蛍光光度計	ヒト(加齢)
57	2008	Luchtemberg	プテリン	IXP 生成	分光蛍光光度計	ヒト(敗血症)血漿
122	2011	Hasan	プテリン	IXP 生成	分光蛍光光度計	マウス脳、血漿

文献	年	著者	基質	測定原理	検出法	測定対象
49,50	2014-2016	Tam	Lumazine	isoxantholumazine	HPLC/FL	ヒト(子供、肥満)血漿
⑤放射性同位体法						
106	1960	Ulmann	[¹⁴ C]Xan	[¹⁴ C]UA→(ウリカーゼ)→ ¹⁴ CO ₂ 生成	LSC	マウス脾臓リンパ細胞
46,47	1965	Al-khalidi	[¹⁴ C]Xan	[¹⁴ C]UA生成	Dowex-50/LSC	ヒト(正常、肝障害)血清
43	1973	Shamma'a	[¹⁴ C]Xan	[¹⁴ C]UA生成	Dowex-50/LSC	ヒト(正常、肝障害)血清
123	1976	Dougherty	[¹⁴ C]Xan	[¹⁴ C]UA生成	Dowex-50/LSC	精製酵素
107	1977	Kizaki	[¹⁴ C]HX	[¹⁴ C]Xan+[¹⁴ C]UA生成	電気泳動/LSC	マウス肝臓
124	1983	Mousson	[¹⁴ C]HX	[¹⁴ C]Xan+[¹⁴ C]UA生成	TLC/オートラジオグラフィー	ヒト肝臓、空腸
58	1987	Grum	[¹⁴ C]HX	[¹⁴ C]Xan+[¹⁴ C]UA生成	電気泳動/LSC	ヒト(成人呼吸窮迫症候群)血漿
125	1995	Battelli	[¹⁴ C]Xan	[¹⁴ C]UA→(ウリカーゼ)→ ¹⁴ CO ₂ 生成	LSC	ラット脳(嗅覚皮質)
69	1998	Pesonen	[¹⁴ C]Xan	[¹⁴ C]UA生成	HPLC/LSC	ヒト(肝移植)血漿
59	2014	Boban	[¹⁴ C]HX	[¹⁴ C]Xan+[¹⁴ C]UA生成	電気泳動/LSC	ヒト(透析、本態性高血圧)血漿
⑥その他						
111	1935	Booth	HX/MB	電位の低下	カロメル電極を用いた酸化還元電位	精製酵素
112	1964	Guilbault	HX/O ₂	H ₂ O ₂ とUAによる電位の低下	カロメル電極を用いた酸化還元電位	精製酵素
113	1993	Tan	Xan/NAD ⁺ ありなし	UA産生	HPLC/電気化学検出器	ヒト(新生児)血漿
65	1998	Pinamonti		トラップ剤:DMPO	EPR	ヒト(COPD、正常)肺胞洗浄液
54	2002	Landmesser	Xan	トラップ剤:CP-H	ESR	ヒト(慢性心不全 CHF)血漿
53	2003	Spiekermann	Xan	トラップ剤:CP-H	ESR	ヒト(正常、冠動脈疾患 CAD)血漿、血管
126	1991	Stevens	-	XO抗体を用いた免疫染色	ヘマトキシリン染色	ヒトリウマチ滑膜
108	1993	Price	-	ELISAを用いたXOR酵素タンパク量測定	TMB染色	精製酵素
109	1996	Sarnesto	-	ELISAを用いたXOR酵素タンパク量測定		ヒト肝臓、小腸など
69	1998	Pesonen	-	ELISAを用いたXOR酵素タンパク量測定		ヒト(肝移植)血漿
110	1999	Battelli	-	ELISAを用いたXOR酵素タンパク量測定	pNPP 吸光度 405 nm	ヒト(肝障害)血清

第2節 安定同位体基質と質量分析計を用いた XOR 活性測定法確立

に対する著者の方針

これまでに論じてきたように、XOR は痛風・高尿酸血症だけでなく様々な病態との関連が示唆されており、これらの病態と XOR の関連を研究する上で、高精度・高感度な XOR 活性測定法は重要であるが、従来の XOR 活性測定法にはさまざまな課題も残されている。

そこで、著者はこれらの課題を解決する新しい XOR 活性測定法の確立を目的として、安定同位体基質と質量分析計を用いた方法を考案し、本研究を開始した。安定同位体は放射性同位体に比べてはるかに安全性が高く、近年では質の良い安定同位体試薬を容易に入手可能となったため、研究に必要な化合物をすぐに合成することができる。また、質量分析計は分光光度計や HPLC に比べるとかなり高価ではあるものの、装置の改良により比較的容易に測定可能となり、今やほぼすべての製薬企業や数多くの大学、研究機関においてあらゆる研究分野に利用されており、高感度測定には欠かせない分析機器である。

まず、第2章において、動物試料中の XOR 活性測定法確立のため、安定同位体ラベルされた $[^{15}\text{N}_2]\text{Xan}$ と LC-HRMS を用いた動物組織の XOR 活性測定法を検討し、従来法との比較によりその有用性を考察する。つぎに第3章において、動物よりも活性の低い検体や超微量検体の XOR 活性を測定するため、活性測定法の高感度化を目的として、安定同位体キサントンの種類と検出する質量分析計の種類を検討する。第4章では確立した高感度 XOR 活性測定法を臨床検体であるヒト血漿に応用し、その有用性について考察した。また、第5章では第2章から第4章で確立した XOR 活性測定法の特徴と活用例、そして今後の課題・展望について述べる。

第2章 LC-HRMS を用いた動物由来試料の XOR 活性測定

法開発

動物由来試料の XOR 活性測定法は、ヒトでは採取困難な様々な臓器・組織の XOR 活性を測定できることから、XOR と病態の関連を調べる上において極めて重要である。動物を用いた試験では、多種多様な臓器・組織由来の試料を測定することが想定され、試料中に含まれる夾雑物も多岐にわたることが予測される。第2章では、実験動物として汎用されるマウスの組織を用いて、高分解能質量分析計の特性を生かした XOR 活性測定法確立について述べる。第1節では、安定同位体の有用について述べ、次にさまざまな質量分析計やイオン化法について比較検討し、測定に用いる装置を選択する。第2節では、夾雑物との分離や高感度測定に重要な HPLC 条件に付いて詳細に検討する。第3節では、LC-MS 分析にとって重要なサンプル処理方法について述べる。第4節では、XOR 活性測定の反応条件の最適化や、内在性成分が活性に与える影響についての評価を実施し、確立した標準プロトコールについて記述する。第5節では、測定対象物質である $[^{15}\text{N}_2]\text{UA}$ の測定法バリデーションとして、直線性、日内再現性、日間再現性について評価する。第6節では、確立した XOR 測定法を用いて、マウス肝臓、腎臓、血漿の活性測定を行い、変動係数を求め同時再現性を評価する。また、従来法である LC-UV 法(基質: Xan)と LC-FL 法(基質: プテリン)を用いて同一の検体を評価し、LC-HRMS 法との比較検討を行う。最後に第7節で第2章のまとめを行う。

第1節 安定同位体と質量分析計を用いた新規 XOR 活性測定法

第1項 安定同位体の活用例と本研究への応用

原子は、原子核とその周りを回る負の電荷を帯びた電子とで構成されている。さらに原子核は正の電荷を帯びた陽子と、電荷を持たない中性子とに分けられ、陽子と中性子の総和をその原子の質量数と呼ぶ。原子の性質を決定するのは陽子の数であり、この陽子の個数をその原子の原子番号と呼ぶ。一方、陽子数が同一で中性子数が異なる原子を同位体といい、それらの化学的性質は等しいが質量数が異なる。同位体の中には不安定で時間の経過と共に放射線を発して安定な原子に変わろうとする「放射性同位体 (radioisotope, RI)」と、放射能を持たず安定に存在する「安定同位体 (stable isotope, SI)」の二種類に分類される。同位体のある目的化合物に導入し利用することを同位体標識といい、さまざまな分野で活用されている。RI 標識では、陽電子放出断層撮影 (PET, positron emission tomography) 検査やラジオイムノアッセイ (Radioimmunoassay, RIA) など、SI 標識ではピロリ菌の呼気検査や代謝測定などに利用されている。特に SI 標識は、放射能を持たず安全性が高いこと、化学的性質は等しく質量数だけが異なるという特徴から、質量分析計を用いた研究に広く活用されている。例えば、質量分析計では測定試料中に含まれる夾雑物の影響により、測定対象物質 (Analyte)

のイオン化が抑制されたり（イオンサプレッション）促進されたり（イオンエンハンスメント）するため、夾雑物の違いにより Analyte のピーク強度に差が生じてしまう。そこで、Analyte を安定同位体標識した化合物を内部標準物質（ISTD）として試料中に添加することにより、化学的性質が同じである安定同位体標識化合物も Analyte と同様にイオン化抑制/イオン化促進されるため、Analyte ピークと ISTD のピーク強度比を用いることにより、異なる夾雑物が含まれる試料同士の比較が可能となる。

従来の XOR 活性測定法では、Xan を基質として用い、酵素により生成する UA を測定する方法が主流であった。しかし、生体試料中にはもともと UA が含まれるため、その BG 値を事前に除いたり差し引いたりする必要があり、測定精度や感度に悪影響を及ぼす可能性があった。そこで著者はこの問題を克服するため、Xan と質量数以外の性質が等しい安定同位体ラベル(SIL)キサンチン(SIL-Xan)を基質として、XOR により生成する SIL-尿酸(SIL-UA)を質量分析計で測定する方法を考案した。SIL-UA は天然にも存在するが、その存在比はごくわずかであり、生体試料中に含まれる BG 値を差し引くことなく測定が可能であると予測し、検討を行うこととした。基質として使用する SIL-Xan は、市販で容易に入手可能な $[^{15}\text{N}_2]\text{Xan}$ を選択した。以下に、反応式を示す（図 10）。

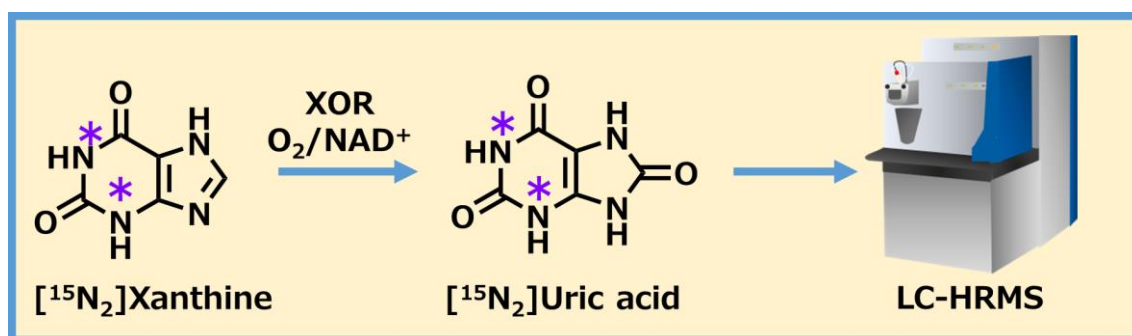


図 10 $[^{15}\text{N}_2]\text{Xan}$ を用いた XOR 活性測定法の原理

第 2 項 使用する質量分析計の選択

次に著者は、SIL-UA の検出に使用する質量分析計について検討した。まず、質量分析計の概略について述べる。

質量分析計（MS）は主に試料導入部、イオン化部、質量分離・検出部から構成される（図 11）。



図 11 質量分析計の構成

試料導入部には夾雑物と目的成分を事前に分離するため、クロマトグラフィー技術を用い

る方法が主流である。ガスクロマトグラフィー(GC)と組み合わせた GC-MS やキャピラリー電気泳動(CE)と組み合わせた CE-MS などがあるが、中でも最も適応範囲が広い装置が高速液体クロマトグラフィー (LC) と MS を組み合わせた LC-MS である。LC は移動相に大量の溶媒や水溶液を使用するため、それらを気化させて目的成分をイオン化し、真空中に導入するインターフェースの開発は困難であった。しかし、1980 年代になって、大気圧化学イオン化法 (APCI) やエレクトロスプレーイオン化法 (ESI、図 12) が開発され、LC と MS との組み合わせが可能となり、LC-MS は爆発的に普及することとなった。ESI と同時期に開発されたマトリックス支援レーザー脱離イオン化法 (MALDI) は、ESI と同じくソフトイオン化法の一つであり、ペプチドやタンパク質、多糖など大型の生体分子の分析に広く使用され、ESI よりも高感度な分析が可能であるが、通常の MALDI は高真空下でイオン化を行うため、オンラインでクロマトグラフィーと組み合わせた自動分析は困難である。

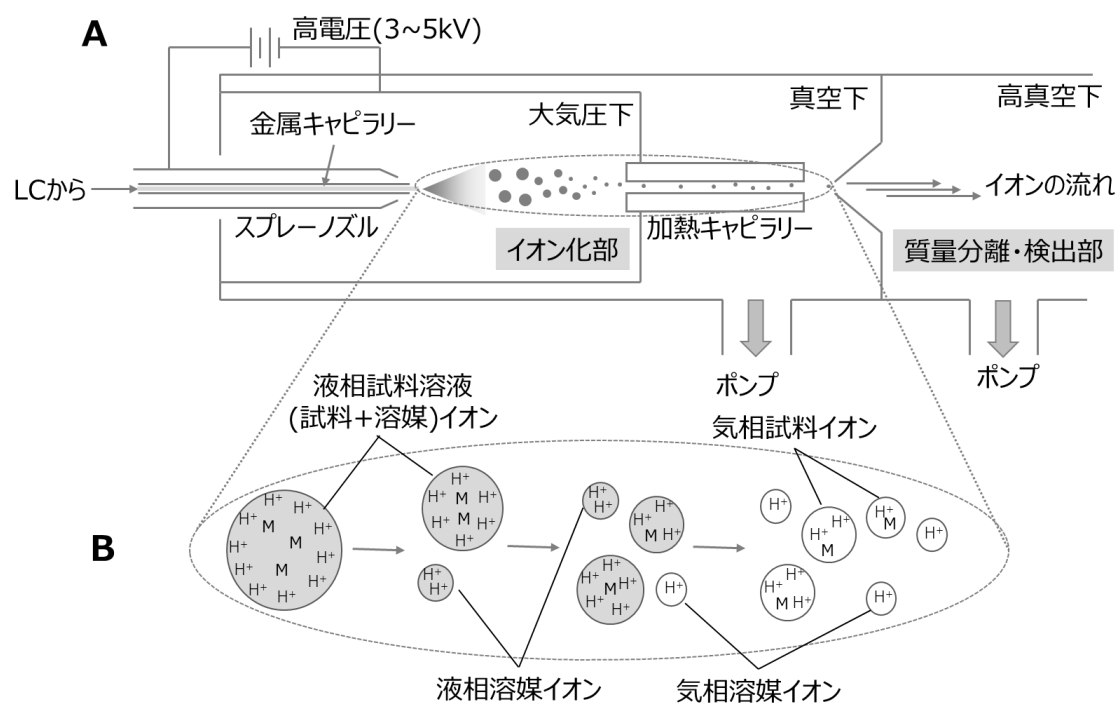


図 12 エレクトロスプレーイオン化法 (ESI) 127 より改変

(a) スプレーノズル先端の仕組み、(b) 液相イオンから気相イオンへの移行の様子

LC-MS に用いられる質量分離・検出部としては、四重極質量分析計 (QMS)、三連四重極質量分析計 (TQMS)、飛行時間質量分析計 (TOF-MS)、イオントラップ質量分析計 (ITMS)、フーリエ変換イオンサイクロトロン共鳴質量分析計 (FT-ICRMS) などがある (表 4)。

表 4 質量分離・検出部の一例とその特長

分解能	質量分析計の種類	特長
低分解能	四重極型質量分析計 (QMS)	1953 年に開発された。タンデム型である三連四重極質量分析計 (TQMS) の SRM (selected reaction monitoring) では高感度な定量分析が可能
	イオントラップ型質量分析計 (ITMS)	1 台で多段階 MS/MS(MS ⁿ)分析が可能。ダイナミックレンジが狭いことが短所。
高分解能	飛行時間型質量分析計 (TOF-MS)	1946 年に開発された。イオン化した試料が検出器に到達するまでの飛行時間の差で分離する。質量分解能 ^{*4} 万程度。
	フーリエ変換イオンサイクロトロン共鳴質量分析計 (FT-ICRMS)	1974 年に開発された ¹²⁸ 。トラップ型の一つ。超伝導磁石を必要とするため安定した磁場が得られ、質量精度や再現性が極めて高い。超伝導磁石の維持にコストがかかる。質量分解能数十万以上。
	電場型フーリエ変換質量分析計 (Orbitrap)	2000 年に開発された ¹²⁹ 。トラップ型の一つ。質量分解能 10 万以上。超伝導磁石を必要とせず、高い質量分解能が得られる。

※質量分解能(R)=質量(m)÷識別できる質量差(Δm)

TOF-MS や FT-ICRMS は質量分解能が数万以上と高く、精密質量測定が可能である。FT-ICRMS と同じように、回転運動するイオンによる誘導電流を検出して、そのシグナルを FT 変換してマススペクトルを得る電場型フーリエ変換質量分析計 (Orbitrap、図 13 Orbitrap) は A.A.マカロフが開発した¹²⁹ 高分解能質量分析計 (High resolution Mass Spectrometry, HRMS) の一種である。その特長は、FT-ICRMS のような超伝導磁石を必要とせず、高い分解能 (10 万以上) と安定した質量精度(質量誤差 3 ppm 以内)が得られることであり、2005 年に現在のサーモフィッシャーサイエンティフィックから発売されて以来^{130,131}、プロテオミクス、メタボロミクス、リポドミクスといった網羅的なオミクス解析、不純物分析や薬物代謝分析など、製薬、食品、環境といった多様な分野で活用されている。そのほとんどは定性分析であるが、著者は Orbitrap の定量機としての活用に着目した。生体試料を用いた XOR 活性測定法開発では、分析対象物質である [¹⁵N₂]UA 以外にも、基質である [¹⁵N₂]Xan や XOR 活性測定に影響を与える可能性がある内在性の UA、Xan、HX など多成分をモニターすることが必要となる。また、測定対象の [¹⁵N₂]UA が検出される m/z 200 以下の範囲では、多くの夾雑ピークが検出されることが予想される。定量機として広く用いられている三連四重極質量分析計 (TQMS)

は、高感度で S/N 比の良好なピークが得られ、定量できる濃度範囲も広いが、目的の成分ごとに SRM メソッドを組む必要があり、測定メソッドの確立に手間がかかる。また、SRM メソッドを組んでいない未知の成分については後から解析することができない。一方、Orbitrap のような高分解能・高質量精度を有する HRMS を用いる場合、ある程度の m/z 範囲で Full Scan 測定を行えば、目的の成分ごとに SRM メソッドを組む必要がなく、測定後に目的成分の精密質量をもとに抽出イオンクロマトグラムの抽出 m/z 幅を小さく絞り込むことにより、夾雑物の影響を排し、SRM で測定したピークに匹敵する良好な S/N 比のピークを簡単に得ることができる。さらに、データを測定した後でも精密質量が分かっているそのデータの範囲内に溶出した成分であれば、別の成分について何度でも再解析をすることができるため、生体試料など複雑な試料を用いて活性測定法を開発する際には極めて有用と考えられた。そこで著者は動物試料を用いた XOR 活性測定法開発の検出器として、Orbitrap を搭載した LC-HRMS の有用性を検証することとした。イオン化法は ESI を選択した。

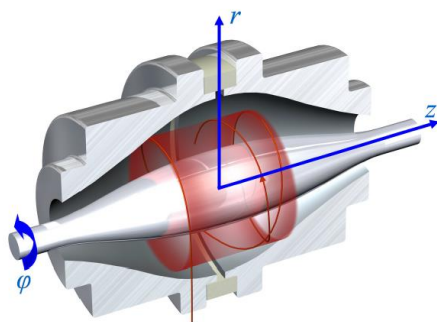


図 13 Orbitrap¹³²

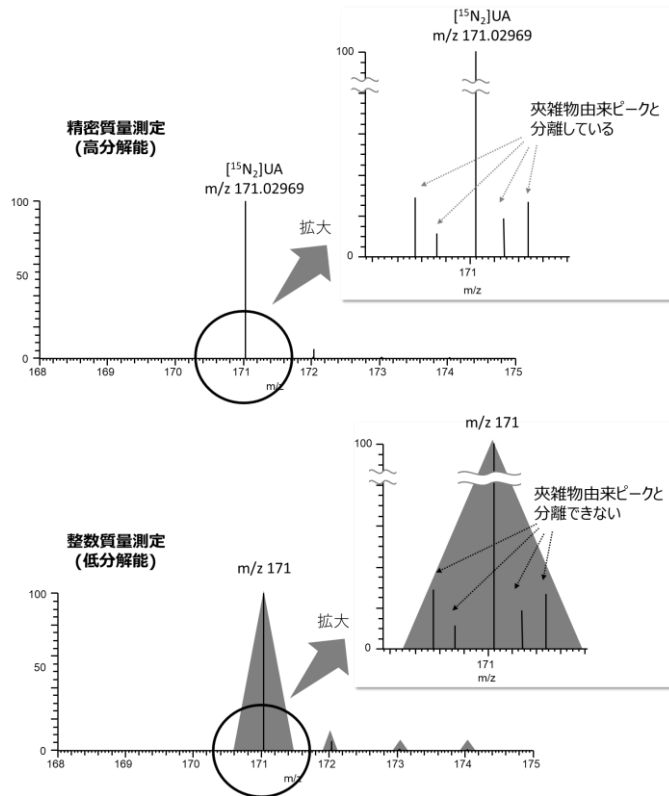


図 14 低分解能と高分解能のマスペクトル

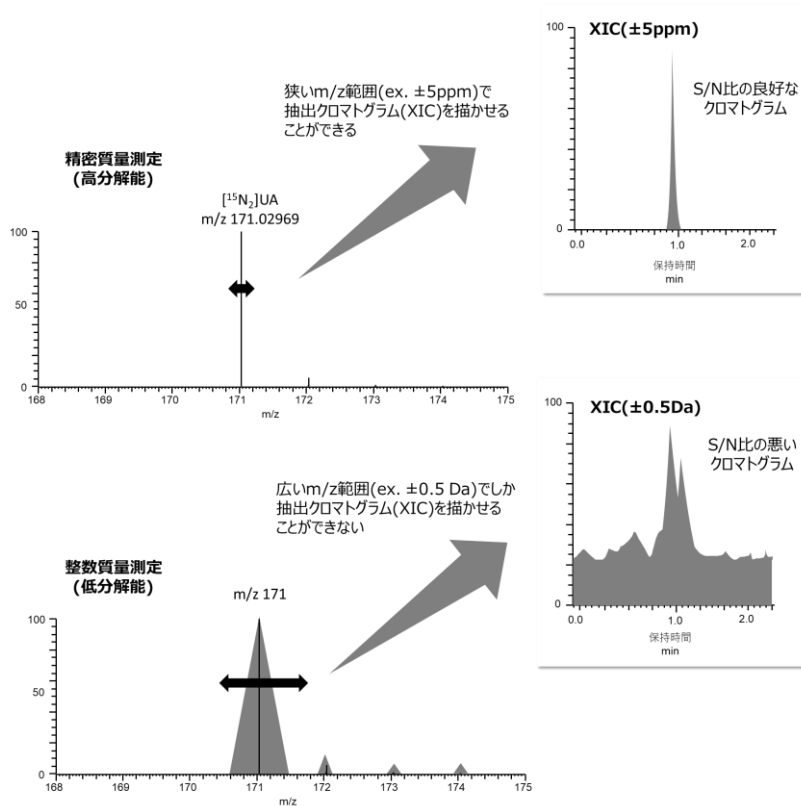


図 15 低分解能と高分解能 MS から取得した抽出クロマトグラムピークの模式図

検証のため、マウスの肝臓、腎臓、血漿試料中に添加した $[^{15}\text{N}_2]\text{UA}$ を LC-HRMS で測定し、そのピークを評価した。 $[^{15}\text{N}_2]\text{UA}$ ピークの抽出クロマトグラム (XIC) を図 16 に示す。

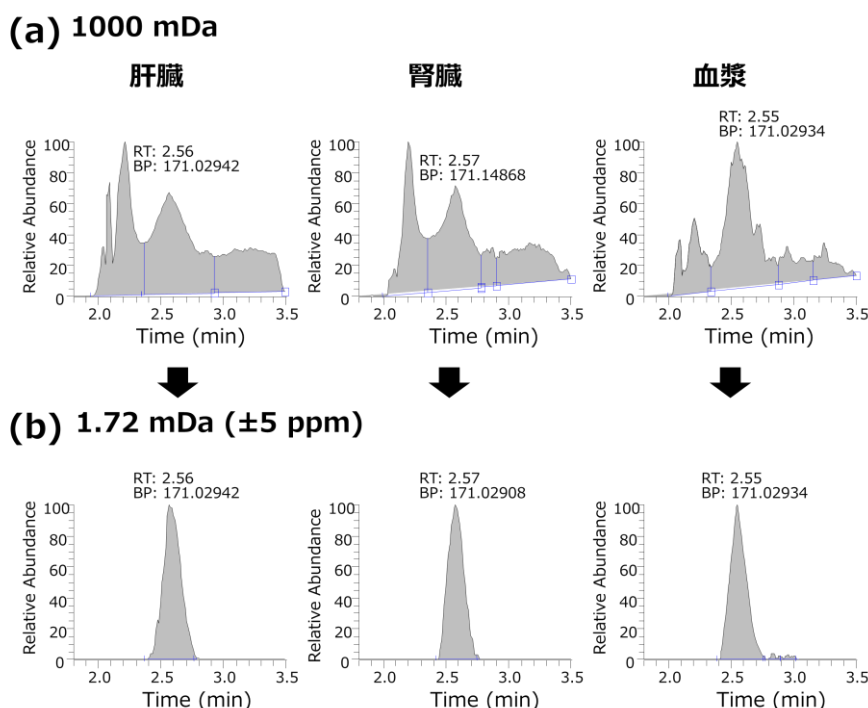


図 16 $[^{15}\text{N}_2]\text{UA}$ の抽出クロマトグラム (XIC)

(a) 低分解能(幅 1000 mDa)、(b) 高分解能(幅 1.72 mDa, ± 5 ppm)

A は、 $[^{15}\text{N}_2]\text{UA}$ のプロトン付加イオンの質量 ± 500 mDa (幅 1000 mDa) で抽出したクロマトグラムであり、低分解能 MS で測定したものと同様のデータである。B は $[^{15}\text{N}_2]\text{UA}$ のプロトン付加イオンの精密質量 m/z 171.02969 に対して幅 1.72 mDa (Mass tolerance 設定値; ± 5 ppm) に絞り込んだ抽出クロマトグラムである。このクロマトグラムは HRMS 測定でしか得られない。A のクロマトグラムでは、生体成分由来の夾雑ピークの影響で $[^{15}\text{N}_2]\text{UA}$ ピークの S/N 比は悪い。一方、 $[^{15}\text{N}_2]\text{UA}$ の精密質量を元に絞り込んだ XIC では、夾雑ピークはほとんど検出されず、 $[^{15}\text{N}_2]\text{UA}$ ピークのみが検出されており、S/N 比は非常に良好である。このように、HRMS で測定して精密質量で絞り込むことにより、SRM 法を用いなくても生体試料中の Analyte ピークの S/N 比を大幅に改善できることが確認できた。測定の際は、Analyte の質量を含むある程度の幅のマスレンジでフルスキャン測定を行い、解析の際に Analyte の精密質量を元に抽出クロマトグラムを描かせるだけで定量が行えるため、測定前に SRM 条件を検討する手間が省ける。また、測定に影響する内在性 Xan、HX、UA ピークをモニターすることもできる。検出感度は TQMS を用いた SRM 法には劣るものの、動物の XOR 活性測定には十分な感度が得られたため、本測定法では LTQ-Orbitrap を用いた LC-HRMS を選択することとした。

第2節 HPLC 条件

次に、質量分析計の試料導入部であり LC-MS 分析においてはその検出感度を大きく左右する要因となる HPLC の条件を検討した。LC 条件設定の際に検討する項目は大きく分けて3つある。分析カラムのサイズ、カラム充填剤の種類および移動相の種類である。分析カラムの充填剤は Analyte の保持や夾雑物との分離に影響する。またサイズのうち、内径は流速や感度と関連し、長さは分離能に関連する。移動相は、目的成分のカラムへの保持やピーク形状に大きく影響し、また LC-MS 分析においてはイオン化効率にも大きく関わる項目である。

第1項 カラムサイズと流速

著者はまず使用するカラムサイズについて検討した。カラム内径は移動相の流速と関連すると述べたが、LC-MS 分析においては、移動相を気化させて目的成分をイオン化する必要があることから、移動相の流速がイオン化に影響を及ぼす。ESI 分析においてはイオン化部に導入される移動相量が少ないほど Analyte のイオン化にとって有利であるため、通常の HPLC 分析よりも内径の細かいカラムを選択し（カラムのダウンサイジング）、移動相流速を抑える必要がある。カラム内径と流速、感度の関係を表 5 に示す。また、カラム内径を細くすることにより、サンプルの濃縮効果も期待できる。1.0 mm よりも細い、例えば 100 μm や 75 μm 内径のカラムは、LC-MS 分析において最も高感度に測定できるナノフローカラムに分類されるが、HPLC の装置も特殊なナノフロー LC が必要となる。また、カラム充填剤のラインナップも極端に減り、装置の操作にも習熟を要し、分析時間も長くなるため、XOR 活性測定法の分析装置として考えた場合、実用的とはいえない。そこで本測定法においては、必要な感度が得られ、かつ簡便に測定できる内径 1.0 mm のカラムを用いることとした。カラム長については分離能と関連するが、長いカラムはその分測定時間も長くなる。一方、短すぎるカラムでは夾雑成分との分離ができず感度低下を招く恐れがある。そこで、カラム長に関しては充填剤の種類および移動相の条件を確定した後に、必要な分離が得られ、かつ分析時間が長くなりすぎないものを選択することとした。

表 5 カラム内径と流速、感度の関係¹³³

カラム内径 (mm)	流速 ($\mu\text{L}/\text{min}$)	断面積 (mm^2)	断面積比	感度
4.6	1000	16.6	1/ 1	1 HPLC
3.0	500	7.07	1/ 2	2
2.0	200	3.14	1/ 5	5 LC-MS
1.5	100	1.77	1/ 9	9
1.0	50	0.785	1/ 20	20

注：カラム長および充填剤の種類および粒子径が同じカラムのとき

第2項 カラムの充填剤

HPLC の逆相分析で第一選択となるのはオクタデシルシリル基 (ODS) を結合させたカラムである。しかし、UA などの高極性分子を測定する場合、ODS カラムでは保持が十分ではない可能性がある。高極性分子を HPLC で分離するため、さまざまな方法が開発されたが、イオンペア法はその一つである。アルキルアミン類などのカチオン性イオンペア試薬を移動相に添加し、アニオン性の化合物とイオンペアを形成することで疎水性を増し ODS カラムへの保持を高めることができるが、Gayden ら(1991)は、テトラブチルアンモニウム塩を移動相に添加し、HPLC-UV でヒポキサンチンやアデノシンなどのプリン体を分析した。¹³⁴。多くの場合イオンペア試薬は不揮発性であり、LC-MS 分析には使用できないが、近年では、LC-MS 用として揮発性のイオンペア試薬も開発され、ヌクレオチド分析などにも使用されている^{135,136}。しかし、これら揮発性のイオンペア試薬により目的成分のイオン化が阻害され検出感度は低下する。また、装置に残りやすく装置汚染の可能性も懸念される。通常、質量分析計のような装置は一つの分析でのみ使用されることはなく、さまざまな分析を一つの装置で行う場合がほとんどであるから、装置の汚染は多くの研究に影響がでる恐れがあり、汚染の原因となるイオンペア試薬の使用は慎重に検討すべきである。親水性相互作用クロマトグラフィー (HILIC, Hydrophilic interaction liquid chromatography) は、1990 年に Alpert¹³⁷ によって順相クロマトグラフィーと区別するために提唱された造語であり、高極性化合物に適した分離モードである。高極性の固定相を用い、溶出順序が逆相カラムとは逆になるのが特徴で、有機溶媒比率の高い移動相が使用できることから、エレクトロスプレーイオン化質量分析の感度を向上できることがメリットの一つであり、MS の有効な分離手法として期待できる。HILIC の固定相や特性は各メーカーによりさまざまであり、選択肢は多い¹³⁸。しかし、通常逆相系と比較するとカラムの平衡化に要する時間が長く、短時間分析では再現性が悪くなる懸念がある¹³⁹。また、移動相の有機溶媒比率が高いため、試料を溶解する溶媒も有機溶媒リッチな条件が望まれるが、高極性化合物は有機溶媒への溶解度が悪い場合があり、試料溶液調製に注意を要する。ミックスモードは逆相とイオン交換の両方の特性を持つ充填剤を使用したモードであり、疎水性相互作用とイオン交換作用により ODS カラムとは全く異なるユニークな分離挙動を示す。しかし、移動相の条件設定が難しく、検討に時間を要するのが難点である。PFP カラムは官能基としてペンタフルオロフェニル基を導入したものであり、立体選択性に優れ、異性体分離に用いられることが多いカラムであるが、疎水性相互作用、水素結合性、双極子相互作用、 π - π 相互作用、静電的相互作用などを有するため、高極性化合物の保持が可能となり、近年注目されている。使用方法も ODS カラムと変わらないため、条件検討が容易である。Peifer らは、PFP カラムを用いてヌクレオチド、ヌクレオシド、プリン塩基の LC-MS による多成分一斉分析法を開発し、報告している¹⁴⁰。そこで著者はペンタフルオロフェニル (PFP) カラムに着目し、検討を実施した。ODS カラムと PFP カラム(図 17)を用いて、UA、Xan、HX の同時分析を行った。クロマトグラムを図 18 に示す。ODS カラムでは 3 成分とも保持が弱かったが、PFP カラムでは良好な保持が得られた。そこで、本研究では PFP カラムを採用することとした。

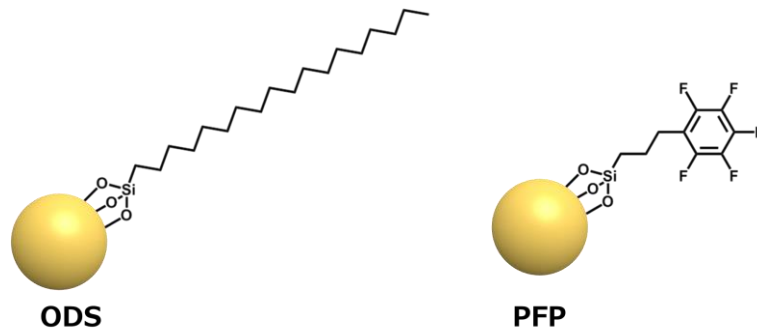


図 17 カラム充填剤の構造

左 ; オクタデシルシリル基 (ODS, C₁₈)、右 ; ペンタフルオロフェニル基 (PFP)

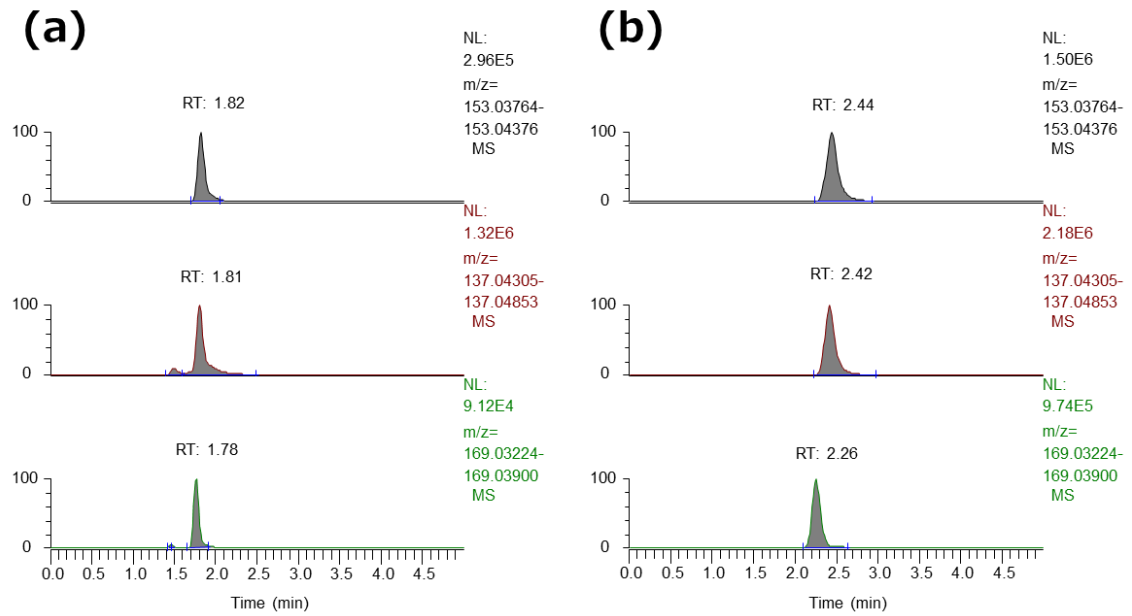


図 18 ODS カラムと PFP カラムの UA、Xan、HX ピーク比較

(a) ODS カラム、(b) PFP カラム、上段 : Xan、中段 : HX、下段 : UA

第3項 移動相の種類

次に、LC の移動相の種類について検討した。逆相カラムを用いた測定の場合、水系移動相と有機溶媒系移動相を用い、各移動相の比率を一定にして分析するアイソクラティック法と、有機溶媒系移動相の比率を上げて目的成分を溶出させるグラジエント法がある。LC-MS 分析では、HPLC 分析と異なり、移動相には揮発性成分しか使えない。また、LC-MS の移動相を検討する際は、成分の保持・分離とイオン化効率という2つの観点から検討する必要がある。

まず、移動相の種類が $[^{15}\text{N}_2]\text{UA}$ イオン化に与える影響を確認するため、水系移動相として0.1%FA、0.5%AcOH、5 mM 酢酸アンモニウムの3種類、有機溶媒系移動相としてMeOH、MeCNの2種類を用いて、水系移動相/有機溶媒系移動相=95/5 (V/V) のアイソクラティック条件で測定を実施した。各移動相条件において $[^{15}\text{N}_2]\text{UA}$ 標準液を5 μL 注入し、ピーク面積を比較した。結果を表6に示す。今回 $[^{15}\text{N}_2]\text{UA}$ を用いて検討した結果では、0.5%AcOH水溶液-0.5%AcOH/MeOHの条件のとき最も $[^{15}\text{N}_2]\text{UA}$ ピーク面積が高かった。MeOH系移動相のほうがMeCN系移動相よりも感度が良かった原因のひとつとしては、LC-ESI-MSのポジティブモードでは、一般的にプロトン供与体であるMeOHのほうが非プロトン性極性溶媒のMeCNよりも感度が良いことが挙げられる。また、MeOHは表面張力がMeCNよりも低いことがESIイオン化の際に有利に働いたと考察される。ESIにおいて帯電液滴からイオンが気化し気相イオンとなるメカニズムとして、金属キャピラリーの先端に正の高電圧を印加した場合、先端の液体表面に過剰に正イオンが蓄積されると、溶液表面が対向電極（オリフィス）に引き付けられ、Taylorコーンと呼ばれる円錐形となる。先端部でイオン同士のクーロン斥力が溶液の表面張力を超えると（レイリーリミット）、イオンを含んだ（正電荷を持った）溶液が爆発的に細分化され（クーロン崩壊）、蒸発・細分化を繰り返しながら液滴表面のプロトンが液滴中の試料分子と接触・付加し、最終的に一分子がイオンとして気相中に放出される。つまり、溶液の表面張力が低いほどクーロン崩壊が起きやすく、イオン化効率が向上する。よって、より低い表面張力をもつMeOH系移動相のほうがMeCN系よりも高感度に検出できたと考察された。

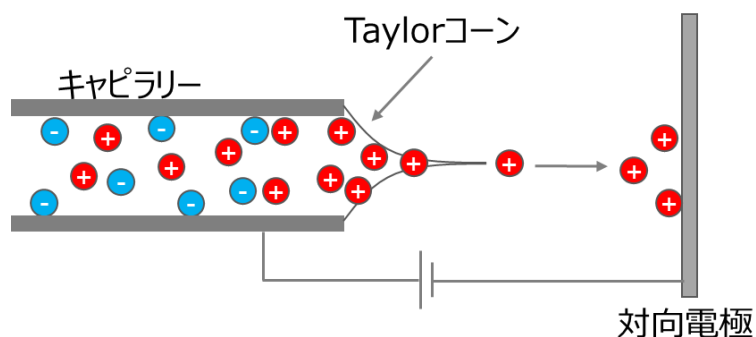


図 19 Taylor コーン ¹³⁹より改変

表 6 移動相と $[^{15}\text{N}_2]\text{UA}$ のピーク強度

移動相条件	$[^{15}\text{N}_2]\text{UA}$ ピーク面積	相対比
0.5%AcOH 水溶液-0.5%AcOH/MeOH	11100000	1.00
0.5%AcOH 水溶液-0.5%AcOH/MeCN	2310000	0.21
0.1%FA 水溶液-0.1%FA/MeOH	6380000	0.57
0.1%FA 水溶液-0.1%FA/MeCN	1360000	0.12
5 mM 酢酸アンモニウム水溶液/MeOH	121000	0.11

移動相は、イオン化だけでなくカラム分離やピーク形状にも大きな影響を与える。図 20 に各種移動相条件における $[^{15}\text{N}_2]$ 尿酸ピークを示す。

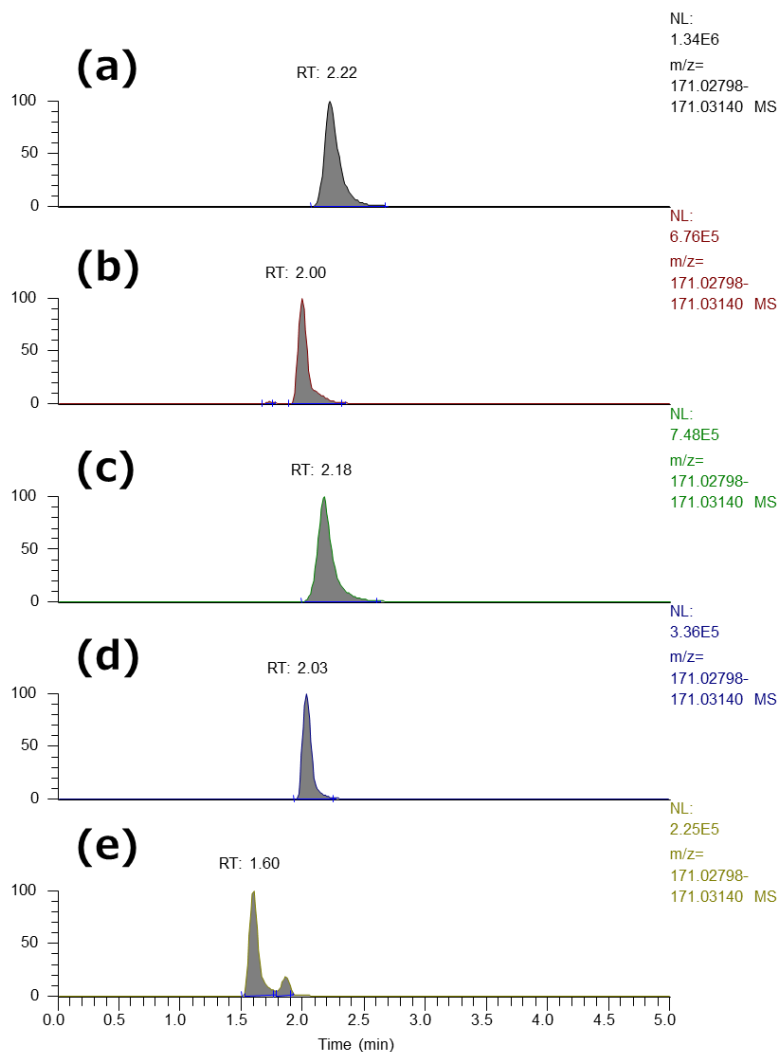


図 20 各種移動相条件における $[^{15}\text{N}_2]\text{UA}$ のクロマトグラムピーク

- (a) 0.5%AcOH 水溶液-0.5%AcOH/MeOH、 (b) 0.5%AcOH 水溶液-0.5%AcOH/MeCN
 (c) 0.1%FA 水溶液-0.1%FA/MeOH (d)0.1%FA 水溶液-0.1%FA/MeCN
 (e) 5 mM 酢酸アンモニウム水溶液/MeOH

移動相の pH は、解離性化合物のカラムへの保持を大きく左右する要因のひとつである。尿酸の pKa は 5.75 であり、それ以上の pH ではほとんどが解離状態となり保持が弱くなる。図 20 において、酢酸アンモニウムは中性付近の pH を示すため、 $[^{15}\text{N}_2]$ 尿酸の保持が弱くなったと考察された。よって、尿酸の分析には酢酸やギ酸などの揮発性の酸を添加し酸性にすることで保持が良好になることが確認できた。

移動相に使用する有機溶媒もまた分離には重要である。一般的に MeOH のほうが MeCN よりも極性が高く溶出力が弱いため、保持が強くなる。MeCN のほうが溶出力が強い分ピークはシャープになるが、保持時間も短くなるため、高極性化合物の分析において保持を強めたい場合は MeOH 系移動相を用いる。実際、 $[^{15}\text{N}_2]$ 尿酸分析においても、MeOH 系移動相のほうが保持時間が長かった。MeCN 系移動相と比較すると MeOH 系のピークはブロードであるが、LC-MS 分析においては、必ずしもシャープなピークが良いとは限らない。なぜなら、シャープすぎるピークでは、信頼性の高い定量に必要なピークのデータポイントが足りない恐れがあるからである。ピークのデータポイントは MS のスキャンスピードに依存し、LC-UV 分析よりもデータポイントは少なくなることから、LC-MS 分析においては留意すべき事項のひとつである。よって、検出感度・S/N 比などに問題がなければピークが多少ブロードであっても許容される。

表 7 LC-MS 移動相の種類と特徴

	アセトニトリル	メタノール
極性溶媒の分類	非プロトン性極性溶媒	プロトン性極性溶媒
粘性率 ¹⁾ cP	0.37	0.61
表面張力 ¹⁾ Nm	0.029	0.022
沸点 (°C)	82	78
溶出力	強い	弱い
ピーク形状	シャープ	ブロード
カラム圧	低い	高い

1) 20 °C における値

第 1 項から第 3 項までの検討結果をもとに、LC 条件を以下の通り設定した。

最適化後の LC 条件

- 装置： UPLC (Waters)
- 分析カラム： ACQUITY CSH fluoro-phenyl, 1.7- μm , 100 mm \times 1.0 mm i.d. (Waters)
- カラム温度： 50 °C
- サンプル温度： 5 °C
- 移動相 A： 0.5% AcOH 水溶液
- 移動相 B： 0.5% AcOH/MeOH
- グラジエント： min/B% = 0/0, 3.0/3, 3.1/100, 4.0/100, 4.1/0, and 5.0/0
- 流速： 50 $\mu\text{L}/\text{min}$ (0–3.0 分), 100 $\mu\text{L}/\text{min}$ (3.1–5.0 分)

第3節 サンプル処理

マウスでは、主に肝臓、小腸、肺、脂肪組織で XOR 活性が高いことが報告されている³¹。本研究においてはマウスの肝臓、腎臓および血漿を XOR 活性測定法検討のモデル試料として用いることとした。

第1項 除タンパク

生体試料などタンパク質を多く含む試料の分析においては、感度や真度、精度を向上させるため、測定前に試料の処理をすることが必須となる。HPLC や LC-MS 分析では、逆相系のカラムにタンパク質を多量に含む試料をそのまま注入すると、カラム中でタンパク質の変性沈殿が起き、カラム圧の上昇やカラム性能の劣化が生じ、分析の再現性低下にもつながる。したがって、タンパク質成分を多量に含む生体試料では除タンパク操作が必須となる。除タンパク法には、タンパク質を有機溶媒、酸、重金属、中性塩、煮沸などの処理により変性沈殿させて除く方法（タンパク質変性沈殿法）、タンパク質を酵素で消化し除く方法（タンパク質消化法）、タンパク質を目的成分との分子サイズの違いにより除く方法（限外ろ過法）などがある¹⁴¹。

本 XOR 活性測定法に際しては、操作が簡便で濃縮などのステップを必要とせず、酵素反応停止処理と兼ねられることから、以下の3ステップによる前処理を実施することとした。

1. 加熱によるタンパク質の熱変性
2. 遠心分離による変性タンパク質の除去
3. 限外ろ過デバイスを用いた残存高分子の除去

本方法を用いて、肝臓サイトゾル、腎臓サイトゾル、血漿試料に既知量の $[^{15}\text{N}_2]\text{UA}$ を添加し、回収率を評価したところ、結果はそれぞれ $91.4 \pm 1.8\%$ 、 $92.4 \pm 0.8\%$ 、および $93.6 \pm 0.5\%$ (mean \pm S.D., n = 3) と良好な値であった。

第2項 内部標準物質の選択

ESI イオン化法を用いる LC-MS 測定では、試料中に含まれる夾雑物の影響によりイオン化が抑制されイオン強度が弱くなったり、逆にイオン化が促進されイオン強度が強くなったりする¹⁴² (マトリックス効果)。測定精度を向上させるため、ISTD として Analyte の安定同位体ラベル化合物を用いることが一般的である。今回は Analyte が安定同位体 2 原子の ^{15}N でラベルされた $[^{15}\text{N}_2]\text{UA}$ であるため、それよりさらに質量が 2Da 大きい $[^{13}\text{C}_2, ^{15}\text{N}_2]\text{UA}$ を ISTD として用いることとした。ISTD を添加しない場合と添加した場合で $[^{15}\text{N}_2]\text{UA}$ 検出の再現性を比較した。結果を表 8 に示す。このように、ISTD を添加することで再現性が大幅に改善した。よって、安定同位体の ISTD は測定精度に有用であることが示された。

表 8 ISTD 添加の有無と CV 値の変化

サンプル	ISTD なし	ISTD あり
肝臓	44.0%	6.5%
腎臓	10.3%	1.2%
血漿	8.7%	5.3%

第 4 節 酵素反応条件の最適化

第 1 項条件検討

酵素反応条件最適化のため、基質量、検体量（肝サイトゾル、腎サイトゾル、血漿）および反応時間について検討を実施した。まず、酵素量の予備検討を実施した。肝臓サイトゾル（1.88, 3.75, 7.5 μL ）、腎臓サイトゾル（7.5, 12.5, 30 μL ）、血漿（7.5, 12.5, 30 μL ）を用いて評価したところ、XOR 活性を示す反応時間 1 分あたりの $^{15}\text{N}_2\text{]UA}$ 産生量と各試料の用量との間には直線性が認められた（図 21）。このうち、肝臓 7.5 μL 、腎臓サイトゾルおよび血漿 30 μL を用いて基質の検討および反応時間を実施した。次に、低用量での酵素量の検討を実施した。結果を図 22 に示す。基質量の検討では、縦軸に反応速度 $[V]$ ： $^{15}\text{N}_2\text{]UA}$ 産生量 pmol/min 、横軸に基質量 $[S]$ ： $^{15}\text{N}_2\text{]Xan}$ 添加量 μM をプロットしたところ $^{15}\text{N}_2\text{]UA}$ 産生速度は基質量の増加に伴って増加し、基質量 400 μM 付近でプラトーに達し、ミカエリス・メンテン動力学のパターンを示した（図 22）。反応時間は 15 分から 60 分の間で直線性を示した（図 23）。酵素量は肝臓サイトゾルで 0.313—2.5 μL 、腎臓サイトゾルで 2.5—20 μL 、血漿で 7.5—60 μL の間で直線性を示した（図 24）。これらの結果から、基質 $^{15}\text{N}_2\text{]Xan}$ 量は 400 μM （絶対量 60 $\text{nmol}/\text{sample}$ ）、反応時間 30 分、肝サイトゾル 1.25 μL 、腎サイトゾル 7.5 μL 、血漿 30 μL を XOR 活性測定条件と設定した。

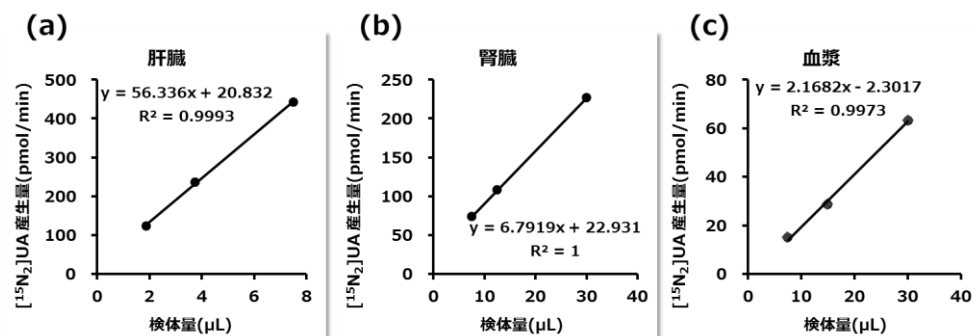


図 21 検体量予備検討の結果

(a) 肝臓、(b) 腎臓、(c) 血漿

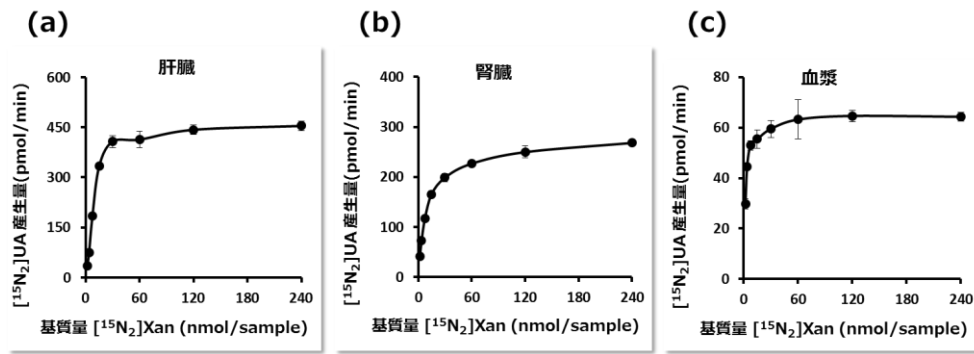


図 22 酵素反応条件検討の結果① 基質量
(a) 肝臓、(b) 腎臓、(c) 血漿

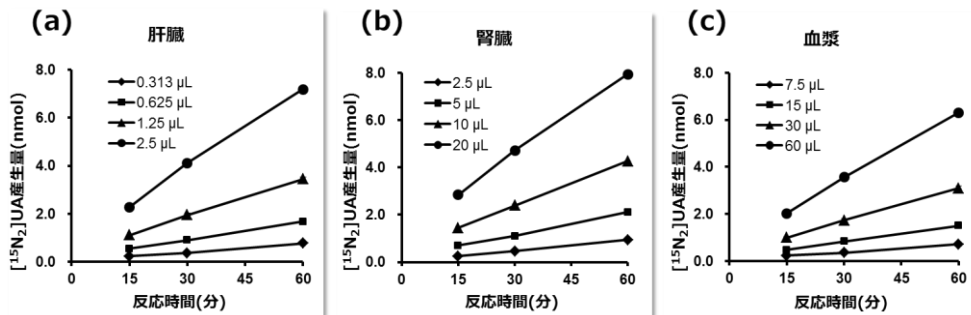


図 23 酵素反応条件検討の結果② 反応時間
(a) 肝臓 ; ◆0.313 μL 、■0.625 μL 、▲1.25 μL 、●2.5 μL
(b) 腎臓 ; ◆2.5 μL 、■5 μL 、▲10 μL 、●20 μL
(c) 血漿 ; ◆7.5 μL 、■15 μL 、▲30 μL 、●60 μL

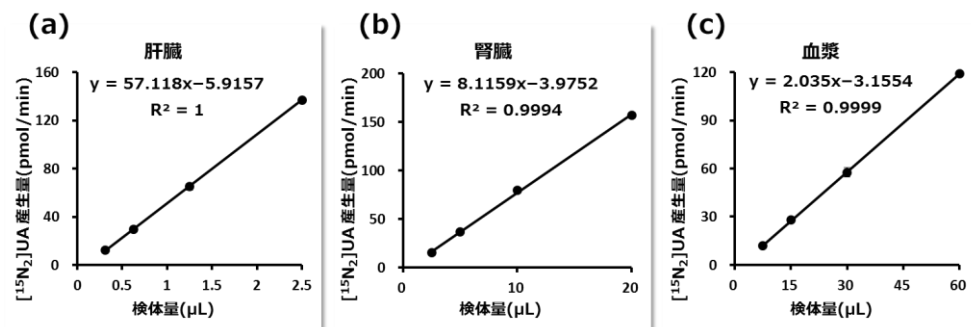


図 24 酵素反応条件検討の結果③ 検体量
(a) 肝臓、(b) 腎臓、(c) 血漿

第2項内在性成分の影響

Xan や HX は哺乳類の XOR にとって主要な基質となる。生体試料を用いて XOR 活性を測定する際、検体中に内在性の低分子、特に Xan や HX が多く含まれる場合、いくつかの活性測定法では見かけの活性が低下する恐れがある。たとえば、安定同位体 Xan を基質として用いる本方法の場合、生体試料中に含まれ反応系内に共存する Xan、HX が競合阻害剤として働くことが予想される (図 25)。また、Xan を基質として用いる場合、内在性の Xan は影響しないものの、内在性の HX が存在すると見かけの活性が低下してしまう。プテリンを基質として用いる場合も同様である。

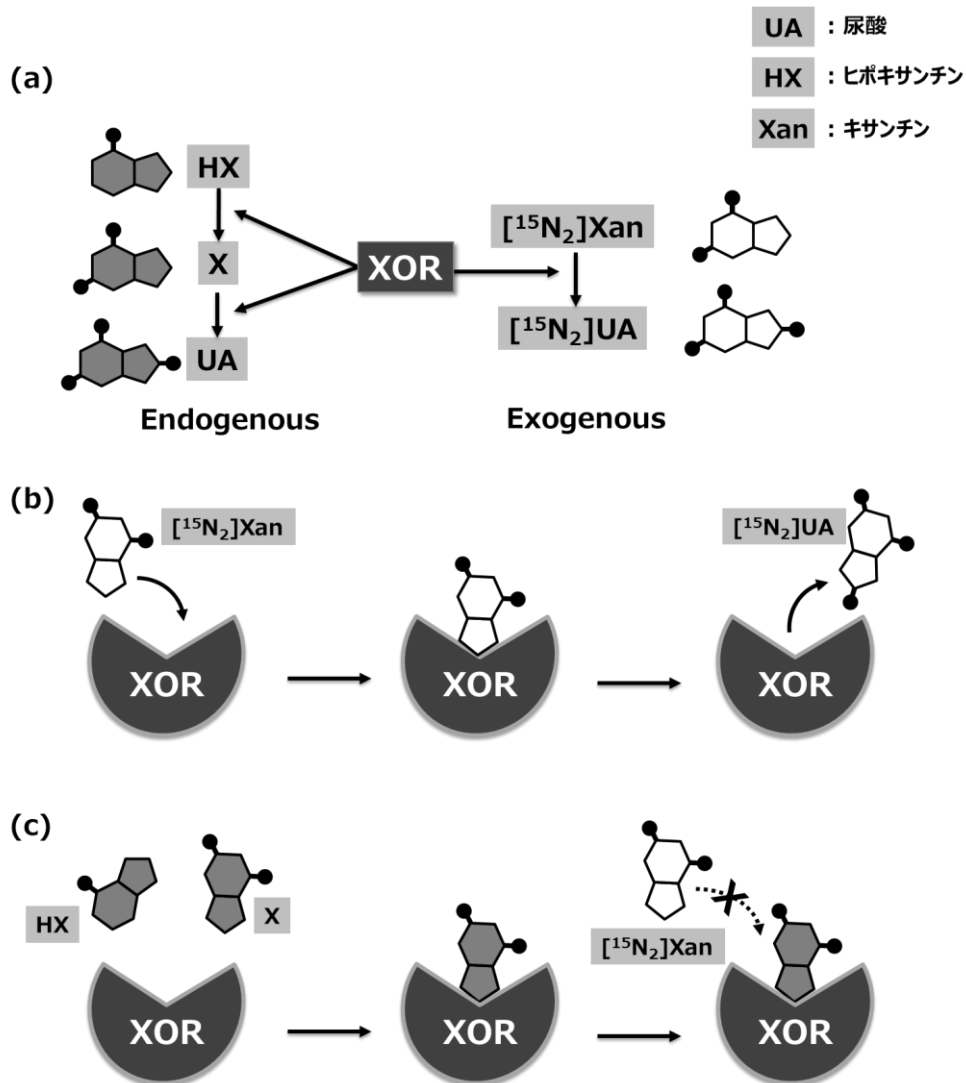


図 25 内在性成分による競合阻害

また、酵素生成物である UA も XOR 活性を阻害するとの報告がある¹¹³。そこでこれら内

在性成分が $[^{15}\text{N}_2]\text{Xan}$ を利用した本活性測定法に与える影響の度合いを検討した。まず、SephadexG25 カラムを用いてゲルろ過処理し内在性成分を除去した腎サイトゾルに、内在性成分 Xan、HX、UA をそれぞれ加え、その後 $[^{15}\text{N}_2]\text{Xan}$ を用いて XOR 活性を測定し、以下の式から内在性成分未添加の検体（コントロール）の XOR 活性を 100%としたときの各濃度における XOR 活性比を求めた。

$$\text{XOR 活性比(\%)} = \text{内在性成分添加検体の XOR 活性} \div \text{コントロールの XOR 活性} \times 100$$

結果を図 26 に示す。グラフは縦軸が XOR 活性比、横軸が、反応液 150 μL 中の Xan、HX、UA 濃度を表す。また、下に示したグラフは、同様のデータを用い、縦軸は XOR 活性比、横軸は基質として添加した $[^{15}\text{N}_2]\text{Xan}$ （反応液中の濃度：400 μM ）と、Xan、HX、UA それぞれとの比率を表す。Xan では、 $[^{15}\text{N}_2]\text{Xan}$ と Xan の比率が 4 以下で XOR 活性の低下が認められた。また、HX では、 $[^{15}\text{N}_2]\text{Xan}$ と HX の比率が 8 以下で XOR 活性の低下が認められた。一方、UA はいずれの濃度においても XOR 活性の低下は認められなかった。このことから、本測定条件においては、高濃度の Xan、HX が XOR 活性に影響する一方、UA は影響しないことが明らかとなった。この結果をもとに各検体中の Xan、HX 量を確認したところ、肝サイトゾルおよび血漿中の Xan、HX 量は活性に影響のない程度であったが、肝サイトゾルより活性が低い腎サイトゾルは検体の使用量が多いため反応系内に混在する Xan、HX 濃度が高くなり、活性測定に影響が出るレベルであった。そこで、今回の測定に使用する腎サイトゾルはすべて G25 処理することとした。なお、第 4 節 第 2 項の酵素反応条件検討においては、腎サイトゾルはすべて G25 処理したものを使用した。

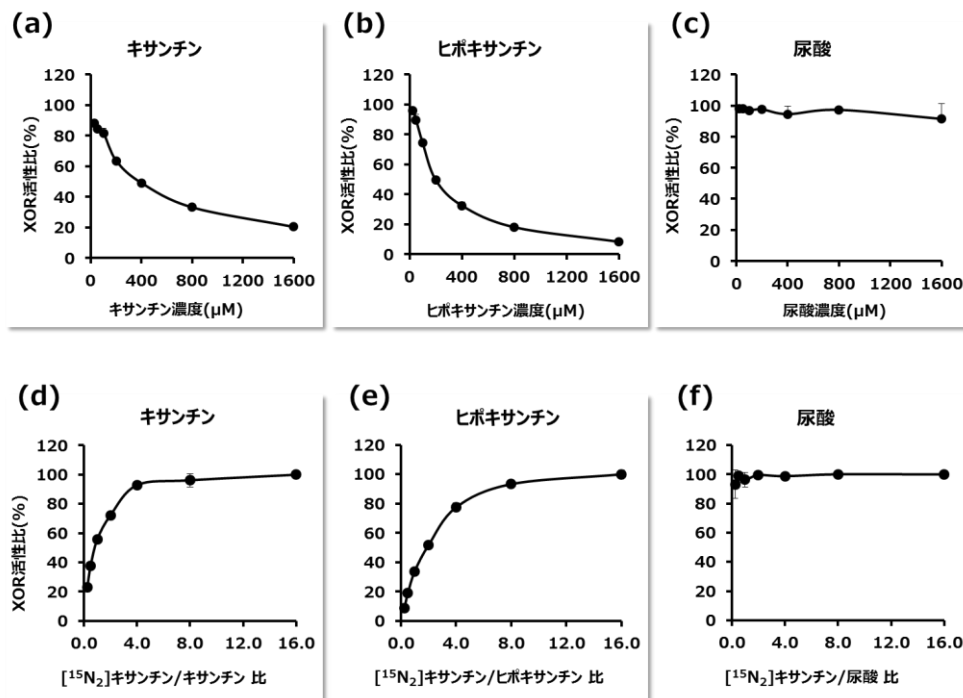


図 26 内在性成分による XOR 活性阻害

第3項 動物試料 XOR 活性測定法の標準プロトコール

以上の検討をもとに確立したマウス試料を用いた XOR 活性測定法の標準プロトコールを以下に示す。

LC-HRMS 法(基質: [¹⁵N₂]Xan) 標準プロトコール

- ① 酵素反応: 肝臓サイトゾルは 1.25 μL、腎臓サイトゾルは 7.5 μL、血漿は 30 μL を反応用チューブに入れ、400 μM の [¹⁵N₂]Xan, 1 mM の NAD⁺, および 13.3 μM の KOX と混合し、TBS で液量を 150 μL に調製。混合液を 37 °C で 30 分間インキュベートする。
- ② 反応停止および除タンパク: 反応後の混合液に ISTD として 200 μM の [¹³C₂, ¹⁵N₂]UA を 50 μL 添加し、速やかに 95 °C のヒートブロックで 5 分間加熱し、反応を停止させる。加熱処理した懸濁液を 15,000 ×g、4 °C で 10 分間遠心分離し、上清を限外ろ過デバイスでろ過 (1,400×g、4 °C、20 分間) し、ろ液を LC-MS 用バイアルに移す。
- ③ 測定および XOR 活性算出: 下記の LC-HRMS 測定条件を用いて [¹⁵N₂]UA を測定する。同時に測定する検量線試料の結果を元に加重最小二乗法による検量線の回帰式 ($Y = aX + b$, Y: ピーク面積, X: 濃度, a: 傾き, b: 切片) を求め、 [¹⁵N₂]UA 産生量を算出する。検体の総タンパク濃度を測定し、反応時間 1 分あたり、総タンパク量 1 mg あたりの [¹⁵N₂]UA 産生量 pmol を XOR 活性とする。

LC-HRMS 測定条件

装置: UPLC (Waters)

分析カラム: ACQUITY CSH fluoro-phenyl, 1.7-μm particle size, 100 mm × 1.0 mm i.d. (Waters)

カラム温度: 50 °C

サンプル温度: 5 °C

移動相 A: 0.5% AcOH 水溶液

移動相 B: 0.5% AcOH/MeOH

グラジエント (min/B%): 0/0, 3.0/3, 3.1/100, 4.0/100, 4.1/0, and 5.0/0.

流速: 50 μL/min (0-3.0 分), 100 μL/min (3.1-5.0 分)

検出: LTQ-Orbitrap (Thermo)

アナライザーモード: FTMS

イオン源: ESI

イオンモード: Positive

スプレー電圧: 3500 V

イオントランスファーチューブ温度: 290 °C

シースガス: 26 (arbitrary unit)

オグジュアリーガス: 8 (arbitrary unit)

Mass Range (m/z): Full Scan 133-400

分解能: 7500

XIC (m/z): [¹⁵N₂]UA; 171.02969, [¹³C₂, ¹⁵N₂]UA 173.03640

Mass tolerance: ± 5 ppm

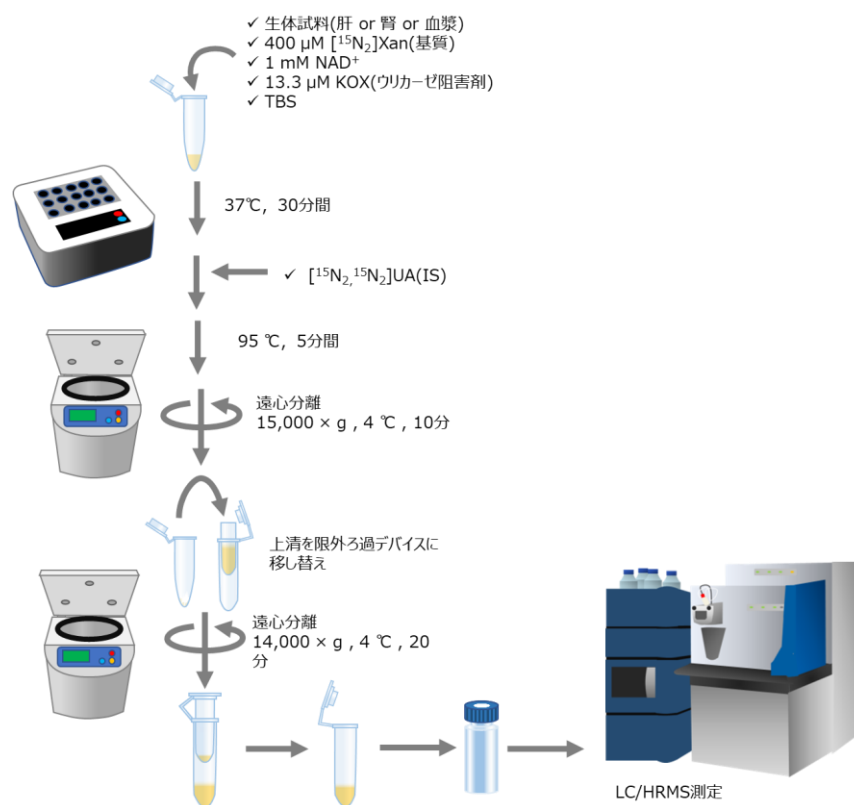


図 27 動物試料 XOR 活性測定標準プロトコール

第 5 節 [¹⁵N₂]尿酸測定法バリデーション

第 1 項 検量線の調製

本 XOR 測定法において、活性値は酵素により生成する[¹⁵N₂]UA 量を検量線から定量し、その値を反応時間とタンパク量で除することにより算出する。検量線用試料溶液には、Analyte と ISTD の他にマトリックスとして測定試料と同じ種類の生体試料（血漿中の薬物濃度測定であれば、薬物が含まれていない血漿）を使用し、除タンパクなどの前処理操作も測定試料と同様の方法で行うことが一般的であるが、本方法においては、血漿や肝臓サイトゾル、腎臓サイトゾルなど様々な種類の生体試料を用いて測定を行うことから、検体毎に検量線のマトリックスを変更することは困難である。酵素活性測定法のバリデーションに特別なガイドラインは存在しないが、一番近いものとして「医薬品開発における生体試料中薬物濃度分析法のバリデーションに関するガイドライン」に準じれば、検量線に使用するマトリックスは測定対象である実試料にできるだけ近いものが望ましいが、それが困難である場合は代替マトリックスの使用が認められている。ただし、『代替マトリックスを使用する場合には、分析法を確立する過程においてその妥当性を可能な限り検証する』と記載されている。そこ

で、本方法では代替マトリックスとして TBS を用いて検量線試料を調製し、その妥当性検証のため、マウスの肝臓サイトゾル、腎臓サイトゾル、血漿を添加した QC 試料の定量を行い、真度・精度を求めることにより妥当性を検証することとした。 $[^{15}\text{N}_2]\text{UA}$ の検量線を図 28 に示す。

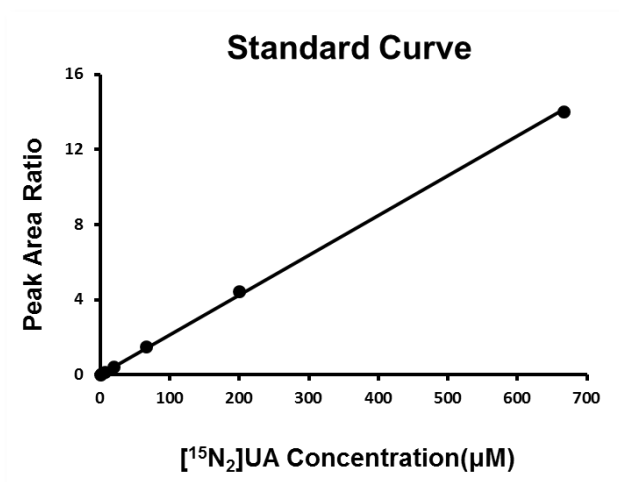


図 28 $[^{15}\text{N}_2]\text{UA}$ 検量線

$[^{15}\text{N}_2]\text{UA}$ (Analyte) の $[^{13}\text{C}_2, ^{15}\text{N}_2]\text{UA}$ (ISTD) に対するピーク面積比と $[^{15}\text{N}_2]\text{UA}$ 設定濃度から加重最小二乗法による検量線の回帰式 ($Y = aX + b$, Y : ピーク面積, X : 濃度, a : 傾き, b : 切片) を求め、濃度を算出した。 $[^{15}\text{N}_2]\text{UA}$ 濃度が $0.667 \sim 667 \mu\text{M}$ の間で相関係数 (R^2) は 0.999 であり、良好な直線性を示した。検量線各ポイントの算出濃度は真度が理論値の $100 \pm 15\%$ 以内 (定量下限では $100 \pm 20\%$ 以内) であった。定量下限 (LLOQ) は $0.667 \mu\text{M}$ であり、この値は血漿 $30 \mu\text{L}$ 使用し反応時間 30 分の場合の XOR 活性として約 3 pmol/min/mg TP に相当する。

第 2 項 日内および日間再現性評価：肝・腎・血漿を用いた妥当性評価

次に、代替マトリックスを用いて生体試料中の $[^{15}\text{N}_2]\text{UA}$ を定量することの妥当性、および再現性を確認するため、肝臓サイトゾル、腎臓サイトゾル、血漿に定量下限 0.667 、低濃度 6.67 、中濃度 66.7 、高濃度 $533 \mu\text{M}$ の $[^{15}\text{N}_2]\text{UA}$ をそれぞれ添加し、検量線試料と同様に処理した後、LC-HRMS にて $[^{15}\text{N}_2]\text{UA}$ の定量を行った。結果を表 9 に示す。いずれの試料においても、精度は 15% 以下 (定量下限では 20% 以下) であり、日内・日間の再現性は良好であった。真度はいずれの試料中においても理論値 $\pm 15\%$ 以内 (定量下限では理論値 $\pm 20\%$ 以内) であり、全て基準を満たした。よって、代替マトリックスとして TBS を使用して調製した検量線で肝臓、腎臓および血漿中の $[^{15}\text{N}_2]\text{UA}$ を定量することの妥当性が示された。代替マトリックスを用いた検量線で生体試料中の $[^{15}\text{N}_2]\text{UA}$ が精度よく測定できた理由としては、本方法では ISTD として測定対象の $[^{15}\text{N}_2]\text{UA}$ よりもさらに 2Da 大きい安定同位体 UA ($[^{13}\text{C}_2, ^{15}\text{N}_2]\text{UA}$) を用いるため、マトリックス効果の影響が最小限に抑えられたこと、さらに、各生体試料からの回

収率はいずれも 90%以上と良好な値であり、ばらつきも少なかったことが考察された。

表 9 肝臓、腎臓、血漿を用いた日内・日間再現性評価

		設定濃度 (μM)	高濃度 533	中濃度 66.7	低濃度 6.67	定量下限濃度 0.667
肝臓	日内	算出濃度平均 (μM)	549	67.0	6.32	0.725
		真度 (% RE)	2.9	0.5	-5.3	8.8
		精度 (% CV)	6.0	6.5	8.2	5.7
	日間	算出濃度平均 (μM)	558	67.3	6.67	0.729
		真度 (% RE)	4.6	0.9	0.0	9.4
		精度 (% CV)	5.9	6.4	7.8	5.7
腎臓	日内	算出濃度平均 (μM)	564	69.5	6.72	0.684
		真度 (% RE)	5.7	4.3	0.8	2.6
		精度 (% CV)	4.3	3.2	3.1	8.6
	日間	算出濃度平均 (μM)	536	66.7	6.49	0.698
		真度 (% RE)	0.5	0.0	-2.6	4.7
		精度 (% CV)	4.5	3.4	3.2	8.5
血漿	日内	算出濃度平均 (μM)	567	69.7	6.38	0.734
		真度 (% RE)	6.3	4.5	-4.4	10.1
		精度 (% CV)	4.5	3.8	2.7	6.3
	日間	算出濃度平均 (μM)	534	66.5	6.47	0.709
		真度 (% RE)	0.2	-0.2	-2.9	6.3
		精度 (% CV)	4.8	4.0	2.6	6.5

第 6 節 動物組織・血漿の XOR 活性測定および従来法との比較

確立した LC-HRMS 法(基質: $[^{15}\text{N}_2]\text{Xan}$)を用いて、ICR マウスの肝臓、腎臓、血漿の XOR 活性を測定した。また、従来法と比較するため、LC-FL 法(基質: プテリン)および LC-UV 法(基質: Xan)を実施した。これらのアッセイは、本研究のために一部条件を最適化した。比較に使用する三種類の活性測定法の基質、Analyte および検出方法を表 10 に示す。また、従来法との比較のため、表 11 に示す二種類の比較試験を実施した。

表 10 比較に使用する三種類の活性測定法の基質、Analyte および検出方法

検出法	基質	Analyte
LC-HRMS	$[^{15}\text{N}_2]\text{Xan}$	$[^{15}\text{N}_2]\text{UA}$
LC-UV	Xan	UA
LC-FL	プテリン	IXP

表 11 比較試験の概要

試験	内容	使用する試料
比較試験①	LC-HRMS,LC-UV,LC-FL の比較	ICR マウス 肝臓、腎臓、血漿 (プール)
比較試験②	LC-HRMS と LC-FL の相関	db/m マウス 3 匹、db/db マウス 7 匹 肝臓、腎臓サイトゾルおよび血漿 (個別別)

第 1 項 比較試験①の結果

三種類の測定条件で測定した肝臓、腎臓、血漿の XOR 活性結果を表 12 に示す。

表 12 ICR マウス肝臓、腎臓、血漿の XOR 活性 ; LC-HRMS 法, LC-UV 法, LC-FL 法の比較

メソッド	LC-HRMS, [¹⁵ N ₂]Xan		LC-UV, Xan		LC-FL, プテリン	
	XOR activity*	[¹⁵ N ₂]UA pmol/min/mg TP	比率	UA pmol/min/mg TP	比率	IXP pmol/min/mg TP
肝臓	928 ± 25	24.4	768 ± 72	26.0	118 ± 2	27.4
腎臓	158 ± 5	4.1	101 ± 3	3.4	17.7 ± 0.5	4.1
血漿	38.1 ± 0.7	1.0	29.6 ± 0.2	1.0	4.30 ± 0.10	1.0

*同一の検体を 5 本ずつ調製し測定。結果は 5 本測定の平均値 ± 標準偏差で表記

本研究において確立した LC-HRMS 法で測定した結果、XOR 活性は肝臓が最も高く、次いで腎臓、血漿であった。その比率は、血漿の活性を 1 とすると、腎臓が 4.1、肝臓が 24.4 であった。これらの結果は、同一の肝臓、腎臓サイトゾル、血漿を 5 本ずつ調製し測定を行ったが、そのときの変動係数(Coefficient of Variation, CV)はそれぞれ 2.7%、3.1%、1.8%であり、再現性は良好であった。同じ検体を用いて、従来法である LC-UV 法で測定した結果、活性値は LC-HRMS 法で測定したときとほぼ同等の値であり、肝臓、腎臓、血漿の活性値比率も LC-HRMS と同程度であった。一方、もうひとつの従来法である LC-FL 法で測定した結果、活性値は LC-HRMS 法、LC-UV 法よりも低くなった。肝臓、腎臓、血漿の活性値比率はほぼ同等であった。

第 2 項 比較試験②の結果

次に、LC-HRMS 法と LC-FL 法の相関を確認するため、マウス 10 個体の肝臓サイトゾル、腎臓サイトゾル、血漿をそれぞれ LC-HRMS 法、LC-FL 法で測定し、相関係数を求めた。結果を図 29 に示す。LC-FL 法で測定した活性値は LC-HRMS 法に比べて低いものの、10 個体の結果の相関係数 (R²) は肝臓、腎臓、血漿それぞれ 0.9 以上であり、良好な相関関係を示した。なお、LC-UV 法でも同様の測定を試みたが、ばらつきが大きく良好な結果が得られなかったため、比較対象から外した。

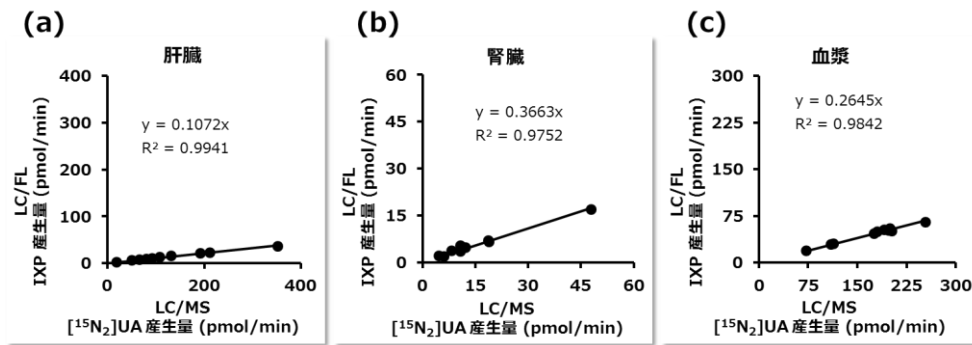


図 29 マウス個体別肝臓、腎臓、血漿の XOR 活性 ; LC-HRMS 法, LC-FL 法の比較

第 3 項 従来法との比較と本測定法の利点

高感度な XOR 活性測定法として開発された LC-FL 法(基質: プテリン)であるが、基質として用いるプテリンは哺乳類にとって XOR 酵素の主要な基質ではなく、キサンチンに比べて XOR に対する反応性が 2.2 から 8.5 倍低く、これらの比率は動物種や反応温度によっても異なることが報告されている¹⁰⁵。一方、 $[^{15}\text{N}_2]$ キサンチンは分子量以外の化学的性質はキサンチンと同じであるため、XOR 酵素に対する反応性も同等であると推定される。実際、本研究において LC-HRMS 法(基質: $[^{15}\text{N}_2]$ Xan)で測定した肝臓、腎臓、血漿中の XOR 活性値と LC-UV 法(基質: Xan)で測定した値はほぼ同等であった。このことは、酵素による $[^{15}\text{N}_2]$ キサンチンから $[^{15}\text{N}_2]$ 尿酸への酸化反応の速度は、キサンチンから尿酸への酸化反応速度と同程度であったことを示唆している。一方、LC-FL 法で測定した XOR 活性は 7.9-8.9 倍低かった。この違いは、Beckman らの報告にあるように Xan とプテリンの XOR 酵素に対する親和性の違いにより説明できる。LC-UV 法では XOR 活性値は LC-HRMS 法とほぼ同等の結果であったが、生体試料を測定したときのクロマトグラム (UV 290 nm) を確認したところ (図 30)、UA 以外にも多くの夾雑ピークが検出され、LC-HRMS に比べて S/N 比が悪かった。LC-UV 法では UV の波長は UA の極大吸収波長 290 nm を用いて測定を行うが、生体試料中には多くの生体成分が含まれており、290 nm の測定波長ではこれらの夾雑成分が UA ピークに対して妨害ピークとなる。腎臓サイトゾルは G25 処理によって低分子の大部分が除去されており、実際内在性 UA ピークは検出されなかったが、夾雑ピークは G25 処理していない肝臓や腎臓と同程度検出された。よって、これらの夾雑ピークは G25 では除去できないペプチドやタンパク質に由来するものと推定された。今回測定した LC-UV 法の LC 条件は LC-HRMS 法と同じであるが、夾雑ピークと完全に分離させるためにはさらに長いカラム・グラジエント条件が必要となる。このため、LC-HRMS 法よりも測定時間が長くなり、スループット性が悪くなるものと考えられた。

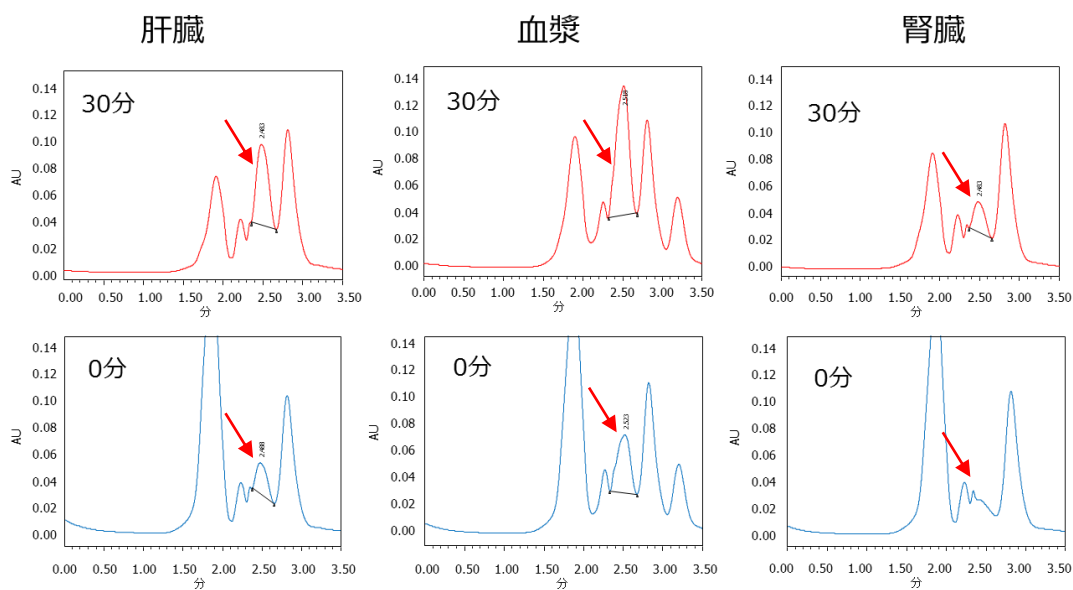
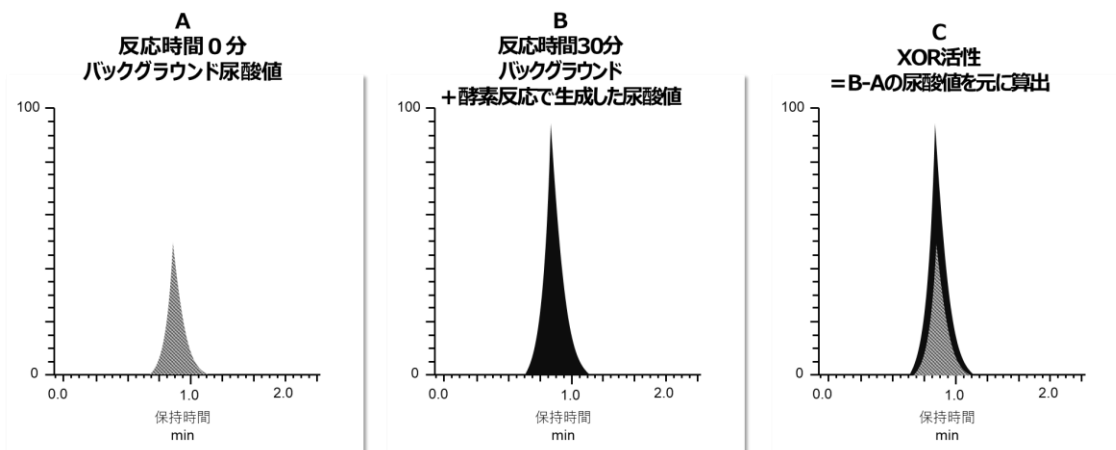


図 30 肝臓、血漿、腎臓試料における UV 290 nm のクロマトグラム
赤矢印は尿酸ピークを示す。腎臓 0 分は尿酸ピーク未検出。

本方法の最大の利点として挙げられるのは、UA の BG 値の差し引きを必要としないことである。生体試料中にはもともと UA が含まれるため、従来の LC-UV 法で生成する UA を測定するには、図 31 上段のように反応後の UA 量だけでなく反応前のコントロールサンプルの UA 値もそれぞれ測定し、反応前の BG の UA 量を差し引く必要があり、それが測定精度に悪影響を与える可能性があった。腎サイトゾルのように G25 処理をすれば内在性 UA は除けるが、前処理に手間がかかるうえ、希少な試料では G25 処理を行うサンプル量が足りず、処理中にロスしてしまう懸念もある。一方、 $[^{15}\text{N}_2]\text{Xan}$ を基質とする方法では、測定対象は内在性の UA ではなく、生体試料にはほとんど含まれていない安定同位体ラベルされた $[^{15}\text{N}_2]\text{UA}$ であるため、図 31 下段に示すように BG 値の差し引きを必要とせず、従来法よりも精度よく測定することが可能となる。また、反応前のコントロールサンプルを測定する必要がないため、前処理や測定も半分で済み効率が良い。以上のように、測定感度、測定精度、スループット性、いずれの点においても LC-HRMS 法のほうが LC-UV 法よりも優れていることが示された。

キサンチン・HPLC/UV法



[¹⁵N₂]キサンチン・LC/HRMS法

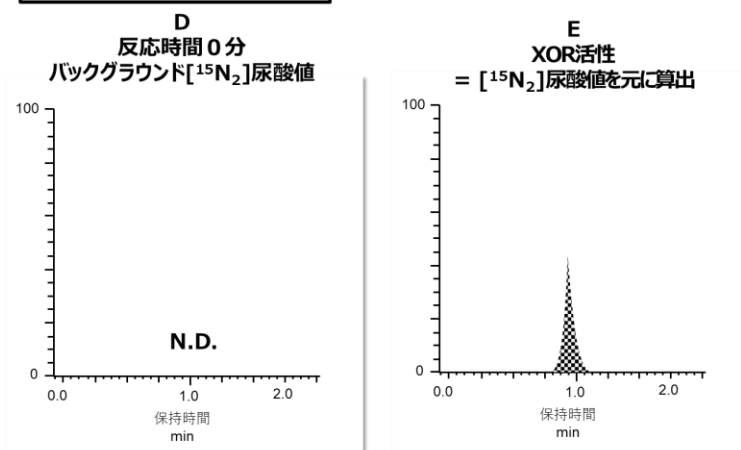


図 31 LC-UV 法と LC-HRMS 法の比較 ; BG ピーク差し引きの必要性

もうひとつの利点として、本測定法では多成分同時分析が可能な LC-HRMS を検出器に用いている。第4節第2項で検証したように、本測定法においては内在性 Xan、HX が競合阻害剤として作用し、見かけの XOR 活性が低下してしまう。生体試料中の XOR 活性を測定する場合、動物種、病態モデル、臓器ごとに含まれる Xan 類の量は大きく異なる。また、XOR 阻害剤を投与した動物では、Xan、HX の濃度が通常よりも上がることが予想される。このことから、反応系内に含まれる内在性成分の量をモニターすることは精度良い測定法にとって重要となる。本測定法では、精密質量が測定できる HRMS を使用したため、測定対象ごとに SRM transition を組む必要がなく、簡便に多成分の測定が可能となる。このため、今回は Analyte の [¹⁵N₂]UA 以外にも XOR 活性測定に影響を与える HX や Xan のピークを予備検討の段階からモニターすることができた。その結果から、腎サイトゾルのみ G25 処理が必要であることが判明した。また、第6節で実施した ICR マウス肝、腎、血漿プール試料および db/m マウス、db/db マウスの肝、腎、血漿個別試料の XOR 活性においても内在性 HX、Xan、UA の量をモニターした。本測定においては、いずれの検体中の内在性成分も活性に影響を与えないレベルであった。このように、多成分一斉分析が簡便に行えることが、LC-UV 法や LC-FL 法にはない、LC-HRMS 法の大きな特長である。

LC-MS 法と従来法である LC/UV 法および LC/FL 法の特徴を表 13 にまとめた。

表 13 三種の XOR 活性測定法の比較

	LC-HRMS 法	LC-UV 法	LC-FL 法
基質	[¹⁵ N ₂]Xan	Xan	プテリン
測定対象	[¹⁵ N ₂]UA	UA	IXP
検出	精密質量	UV 290 nm	蛍光(ex 345/em 410 nm)
	夾雑成分のマトリックス効果によりイオン化が抑制あるいは促進され、再現性が悪くなる可能性がある。ただし、安定同位体の ISTD を使用すればマトリックス効果によるばらつきは補正可能。	選択性が低く、夾雑成分が UA 検出を妨害する可能性がある。ISTD を使用しない場合、前処理操作のばらつきが測定精度に影響する可能性がある。	蛍光検出は UV に比べて選択性が高く、夾雑成分の影響を受けにくい。ISTD を使用しない場合、前処理操作のばらつきが測定精度に影響する可能性がある。
BG 値 差し引き	必要なし	必要あり	必要なし
検出 感度	○ 定量下限：0.667 μM	△ 定量下限：1.33 μM	◎ 定量下限：0.0667 μM
酵素との 親和性	キサントシンと同等	-	キサントシンより低い

第 7 節 第 2 章のまとめ

本研究において、著者は LC-HRMS と [¹⁵N₂]Xan を用いた新しい XOR 活性測定法を確立した。本方法は安定同位体ラベルした基質を利用することにより内在性尿酸の影響を排し、高精度な測定が可能であった。従来法である LC-UV 法(基質：Xan)と比較してピーク検出の選択性が高く、短時間分析でも S/N 比が良好なピークが得られるためスループット性が良く、多検体の測定に有効であると考えられる。また、哺乳類にとって XOR の主要な基質である Xan と酵素に対する親和性が同等である安定同位体 [¹⁵N₂]Xan を基質としているため、LC-FL 法(基質：プテリン)よりも生理的条件を反映した XOR 活性を測定することができる。加えて、質量分析計の特性を活かした多成分同時分析により、測定に影響する内在性 HX 等をモニターでき、信頼性の高い測定法である。本方法を用いて、マウス肝臓、腎臓、血漿の XOR 活性を精度よく測定することができた。

第3章 LC-TQMS を用いた XOR 活性測定法の高感度化

第2章にてマウスの XOR 活性測定法を確立したが、病態と XOR 活性との関連を研究する上では臨床検体、つまりヒトから採取した検体を測定することが重要となる。臨床で得られるヒト検体は主に血漿であるが、ヒト血漿 XOR 活性はげっ歯類などの動物に比べて数百倍以上低い⁴⁷。そのため、先に確立した LC-HRMS/[¹⁵N₂]Xan 法では、感度不足によりヒト血漿 XOR 活性が測定できないことが課題であった。また動物試験においても、神経組織や血管、腎糸球体など一個体からごくわずかししか採取できない検体もあり、限られた検体量で精度よく測定を行うためには、さらなる高感度測定法は必須であった。そこで第3章では、XOR 活性測定法の高感度化を検討することとした。

第1節では高感度化に適した質量分析計への変更とそれに伴う基質の変更について考察し、SIL-UA の検出感度と検量線の直線性を確認する。第2節ではマウス血漿を段階希釈したものを低 XOR 活性モデル試料として、LC-TQMS と [¹³C₂,¹⁵N₂]Xan を用いた XOR 活性測定を行い、検出感度を評価する。

第1節 XOR 活性測定法の高感度化検討

第1項 高感度化に適した質量分析計への変更

マウス活性測定で用いた LC-HRMS (LTQ-Orbitrap) は精密質量を測定できる質量分析計であるが、検出感度は質量分析計の中ではそれほど高くない。一方、三連四重極質量分析計 (TQMS) は定量に特化した装置であり、生体試料中の微量成分であっても高感度に測定することができる。そこで、今回は検出感度を向上させるために、質量分析計を LC-HRMS から TQMS に変更することとした。LTQ-Orbitrap のような HRMS では、Full Scan 測定である程度の m/z 範囲のマススペクトルを測定後、Analyte の精密質量を元に、狭い範囲で抽出クロマトグラムを描くことにより S/N 比の良好なクロマトグラムピークが得られた。しかし TQMS は低分解能で、0.7 Da 程度の幅でしかスペクトルを分離することができない。そこで、TQMS を用いた高感度定量では S/N 比を向上させることを目的として SRM (Selected Reaction Monitoring) という手法が選択される。SRM の概略を図 32 に示す。TQMS ではまず Q1 部で特定の m/z を持つイオンのみをプレカーサーイオンとして選択し、q2 部 (コリジョンセル、または衝突室) へ送りこむ。q2 部でプレカーサーイオンを壊し (衝突誘起解離)、プロダクトイオンを生成させる。そのプロダクトイオンの中で、Analyte に特有のプロダクトイオンを選択し、Q3 部へ送り込み、検出器で検出する。つまり、Q1 部と Q3 部で 2 重のフィルターをかけることになるため、夾雑成分の影響を取り除き、S/N 比の良好なピークを測定することが可能となる。複数の SRM を組むことで 1 つの成分に対する MS のスキャンスピードは遅くなるが、保持時間が異なる成分であれば時間ごとにセグメントで区切って SRM を設定することができるため、ある程度の多成分分析は可能となる。

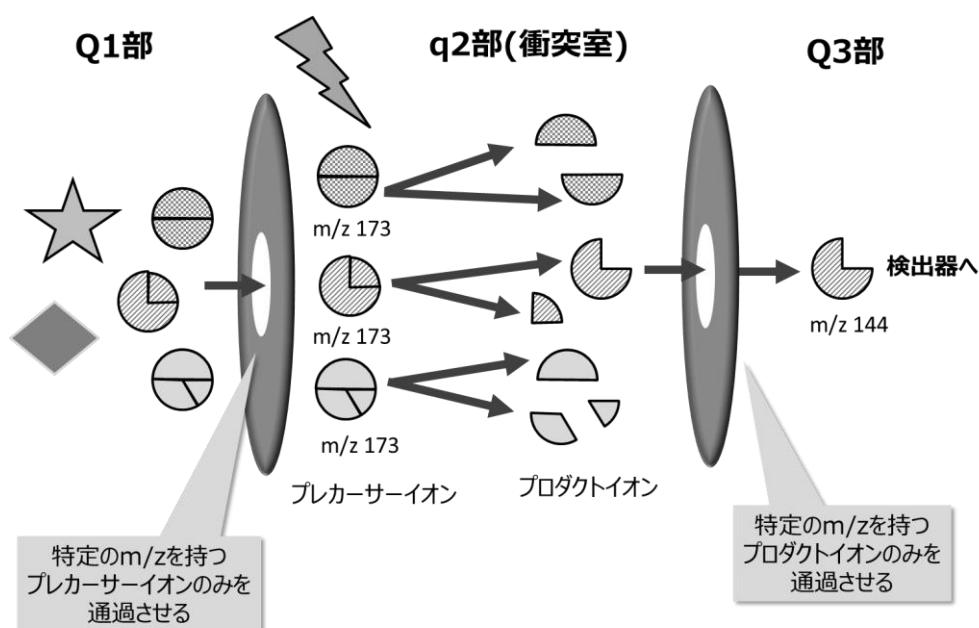


図 32 SRM 法の概略

第 2 項 質量分析計変更に伴う安定同位体基質の選択

前章において、 $[^{15}\text{N}_2]\text{Xan}$ を基質として生成する $[^{15}\text{N}_2]\text{UA}$ を質量分析計で測定する場合、 $[^{15}\text{N}_2]\text{UA}$ はほとんど生体試料に含まれていないため、BG の差し引きが不要であることが大きな利点のひとつであると述べた。しかし、 $[^{15}\text{N}_2]$ 尿酸は生体試料には「ほとんど」存在しないと述べたが、その含有量はゼロではなく、安定同位体 ^{15}N は天然にも僅かに存在しているため、生体試料に尿酸が含まれていればそれに付随する同位体分子として微量ながら存在する。その存在比は尿酸に対して 0.0082% と無視できる程度であり、HRMS で測定した場合ピークは検出限界以下となり、XOR 活性測定には影響がなかった。一方、低分解能の TQMS で測定する場合は大きな影響を及ぼす。表 14 に示したように、尿酸よりも質量が 2 大きい安定同位体尿酸 (+2DaUA) は、 $[^{15}\text{N}_2]$ 尿酸以外にもいくつか存在する。HRMS では高分解能を有するため、これらの同位体ピークを分離して測定することができた。しかし、低分解能の TQMS ではこれらの同位体ピークを完全に分離して測定することができない。+2DaUA の存在比を全て足し合わせると 0.83% と $[^{15}\text{N}_2]$ 尿酸の 100 倍も存在することになり、内在性の尿酸が多く含まれるヒト血漿などの検体においてはその存在が無視できない量となる。

表 14 尿酸のプロトン付加分子の同位体存在比

整数質量		精密質量		分子式	同位体数
m/z	存在比 (%)	m/z	存在比 (%)		
169	100	169.0356	100	$^{12}\text{C}_5, ^1\text{H}_5, ^{14}\text{N}_4, ^{16}\text{O}_3$	0
170	7.06	170.0327	1.477437	$^{12}\text{C}_5, ^1\text{H}_5, ^{14}\text{N}_3, ^{15}\text{N}_1, ^{16}\text{O}_3$	1
		170.0390	5.407864	$^{12}\text{C}_4, ^{13}\text{C}_1, ^1\text{H}_5, ^{14}\text{N}_4, ^{16}\text{O}_3$	
		170.0398	0.114278	$^{12}\text{C}_5, ^1\text{H}_5, ^{14}\text{N}_4, ^{16}\text{O}_2, ^{17}\text{O}_1$	
		170.0419	0.057507	$^{12}\text{C}_5, ^1\text{H}_4, ^2\text{H}_1, ^{14}\text{N}_4, ^{16}\text{O}_3$	
171	0.83	171.0297	0.008186	$^{12}\text{C}_5, ^1\text{H}_5, ^{14}\text{N}_2, ^{15}\text{N}_2, ^{16}\text{O}_3$	2
		171.0360	0.079898	$^{12}\text{C}_4, ^{13}\text{C}_1, ^1\text{H}_5, ^{14}\text{N}_3, ^{15}\text{N}_1, ^{16}\text{O}_3$	
		171.0369	0.001688	$^{12}\text{C}_5, ^1\text{H}_5, ^{14}\text{N}_3, ^{15}\text{N}_1, ^{16}\text{O}_2, ^{17}\text{O}_1$	
		171.0389	0.000850	$^{12}\text{C}_5, ^1\text{H}_4, ^2\text{H}_1, ^{14}\text{N}_3, ^{15}\text{N}_1, ^{16}\text{O}_3$	
		171.0399	0.616498	$^{12}\text{C}_5, ^1\text{H}_5, ^{14}\text{N}_4, ^{16}\text{O}_2, ^{18}\text{O}_1$	
		171.0423	0.116980	$^{12}\text{C}_3, ^{13}\text{C}_2, ^1\text{H}_5, ^{14}\text{N}_4, ^{16}\text{O}_3$	
		171.0432	0.006180	$^{12}\text{C}_4, ^{13}\text{C}_1, ^1\text{H}_5, ^{14}\text{N}_4, ^{16}\text{O}_2, ^{17}\text{O}_1$	
		171.0441	0.000044	$^{12}\text{C}_5, ^1\text{H}_5, ^{14}\text{N}_4, ^{16}\text{O}_1, ^{17}\text{O}_2$	
		171.0452	0.003110	$^{12}\text{C}_4, ^{13}\text{C}_1, ^1\text{H}_4, ^2\text{H}_1, ^{14}\text{N}_4, ^{16}\text{O}_3$	
		171.0461	0.000066	$^{12}\text{C}_5, ^1\text{H}_4, ^2\text{H}_1, ^{14}\text{N}_4, ^{16}\text{O}_2, ^{17}\text{O}_1$	
171.0482	0.000013	$^{12}\text{C}_5, ^1\text{H}_3, ^2\text{H}_2, ^{14}\text{N}_4, ^{16}\text{O}_3$			
172	0.047				3
173	0.0026				4

Simulated mass spectrum of protonated non-labeled uric acid [$\text{C}_5\text{H}_4\text{N}_4\text{O}_3+\text{H}^+$] calculated by Xcalibur 2.1 software (Thermo Scientific., MO, U.S.) .

実際、ヒト血漿 100 μL 中に+2DaUA (m/z 171) がどれくらい含まれるかを確認するため、TQMS を用いて SRM 測定を行った。結果を図 33 に示す。

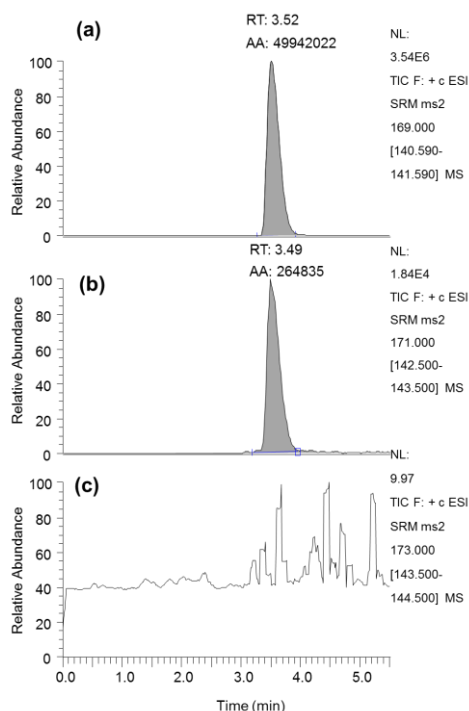


図 33 TQMS で測定したヒト血漿中尿酸および同位体の SRM クロマトグラム

(a) 尿酸 (SRM-transition; m/z 169 \rightarrow 141), (b) +2Da 尿酸 (SRM-transition; m/z 171 \rightarrow 143), (c) +4Da 尿酸 (SRM-transition; m/z 173 \rightarrow 144)

[$^{15}\text{N}_2$]キサンチン基質等を添加していないにもかかわらず、ヒト血漿中には尿酸ピーク (SRM m/z 169 $>$ 141) の他に、尿酸よりも質量が 2 大きい+2DaUA ピーク (m/z 171 $>$ 143) が検出され、UA に対する+2DaUA ピークの面積比は 0.53%であった。これまで報告されているヒト血漿 XOR 活性の値^{43,46,47}から推定すると、この 0.53%のピークであっても活性測定に大きな影響を及ぼすレベルであり、たとえ血漿を Sephadex G25 カラムで精製し、内在性 UA を 90%程度除去できたとしても、完全に内在性の+2DaUA ピークの影響を排除することは不可能であると予想された。つまり、TQMS を用いてヒト血漿の XOR 活性を測定する場合、[$^{15}\text{N}_2$]Xan を基質として[$^{15}\text{N}_2$]UA を測定する XOR 活性測定法では、酵素反応の前にもともと含まれている+2DaUA ピークを差し引く必要があり、安定同位体基質を用いる活性測定法の『BG 値の差し引きが不要』という利点が得られない。そこで著者は、この課題を解決するため、用いる基質を[$^{15}\text{N}_2$]Xan よりさらに同位体ラベルを増やした基質に変更することを考案した。たとえば、尿酸より質量が 4 大きい同位体 (+4DaUA) は全ての存在比を足し合わせても 0.0026%であり、ヒト血漿 XOR 活性測定でもほとんど無視できる量であることが予測される。実施、先ほどのヒト血漿サンプルで+4DaUA (SRM m/z 173 $>$ 144) のピークを確認したところ、ピークは未検出であった(図 33 (c))。このことから、TQMS を用いた XOR 活性測定法高感度化のため、基質を従来の[$^{15}\text{N}_2$]キサンチンからさらに同位体ラベルを 2 つ増やした [$^{13}\text{C}_2, ^{15}\text{N}_2$]Xan に、Analyte を [$^{13}\text{C}_2, ^{15}\text{N}_2$]尿酸に、ISTD を [$^{13}\text{C}_3, ^{15}\text{N}_3$]尿酸に変更することとした。以下に反応式を示す。(図 34)

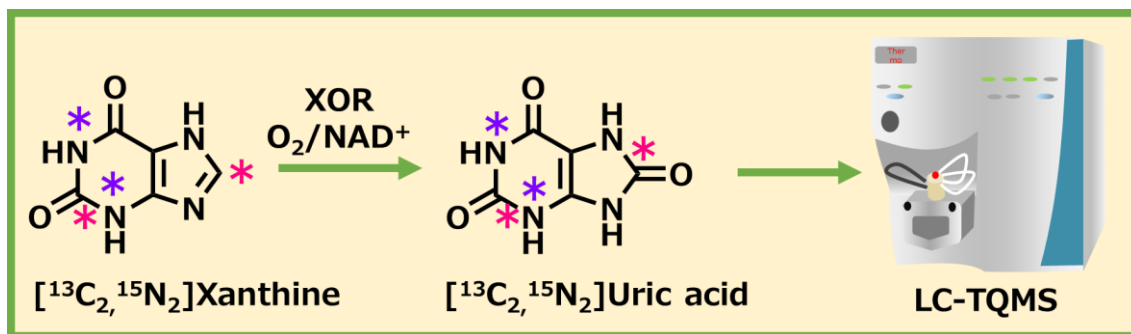


図 34 [13C₂, 15N₂]Xan を用いた XOR 活性測定法の原理

第3項 [13C₂, 15N₂]尿酸測定条件の設定および検量線の確認

測定対象物質である[13C₂, 15N₂]尿酸の LC-TQMS 測定条件を以下の通り設定した。装置の制約があったことから、カラムサイズは一般的な LC-MS で使用される内径 2.1 mm のものを使用した。また、充填剤は LC-HRMS 法と同じ PFP カラムを用いた。[13C₂, 15N₂]UA と [13C₃, 15N₃]UA の標準液を用いて MS/MS 分析を行い、得られたプロダクトイオンから SRM 条件を設定し、パラメーターを最適化した。

LC-TQMS 測定条件

装置：Nano Space SI-2 LC system (資生堂)

分析カラム：Discovery HS F5, 150 mm × 2.1 mm i.d. (Sigma-Aldrich)

カラム温度：40 °C

サンプル温度：10 °C

移動相 A：0.5% AcOH 水溶液

移動相 B：0.5% AcOH/MeOH

グラジエント (min/B%)：0/0, 5/2.5, 5.1/0, and 7.0/0

流速：200 μL/min

検出：TSQ Quantum Discovery MAX (Thermo)

イオン源：ESI

イオンモード：Positive

スプレー電圧：5500 V

イオントランスファーチューブ温度：350 °C

シースガス：40 arb

オグジュアリーガス：5 arb

モード：SRM

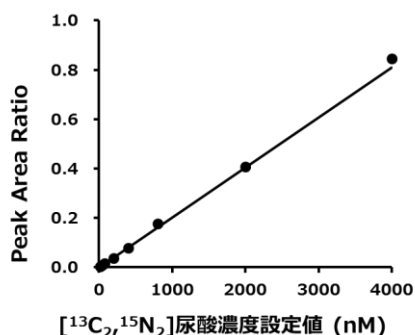
SRM transition (m/z)：

Analyte [13C₂, 15N₂]UA 173 > 144 ; CE 17

ISTD [13C₃, 15N₃]UA 175 > 146 ; CE 17

ヒト血漿 100 μL をマトリックスとして [13C₂, 15N₂]UA の検量線用標準液を測定し、定量範囲の直線性および検出感度を確認した。結果を図 35 に示す。濃度範囲 20~4000 nM までの間

で良好な直線性を示した。定量下限は 20 nM であった。LC-HRMS 法における $[^{15}\text{N}_2]\text{UA}$ の定量下限は 667 nM であったことから、TQMS を用いることで SIL-UA の検出感度が約 33 倍向上した。



Weighing factor, 1/x ²								
設定濃度(nM)	4000	2000	800	400	200	80.0	40.0	20.0
算出濃度(nM)	4170	2010	870	387	184	76.0	40.8	20.2
真度(RE%)	4.3	0.4	8.8	-3.2	-8.2	-5.0	1.9	1.0

図 35 $[^{13}\text{C}_2, ^{15}\text{N}_2]$ 尿酸検量線

第2節 低 XOR 活性モデル試料の XOR 活性測定

確立した TQMS 法の XOR 活性検出感度を評価するため、低 XOR 活性モデル試料としてマウス血漿を 1~1024 倍の間で段階希釈した試料を調製し、 $[^{13}\text{C}_2, ^{15}\text{N}_2]\text{Xan}$ を基質として反応時間 90 分での酵素活性を測定した。結果を図 36 に示す。1024 倍希釈したマウス血漿 100 μL を用いた場合の XOR 活性は反応時間 1 時間あたりの $[^{13}\text{C}_2, ^{15}\text{N}_2]\text{UA}$ 産生量として 4.49 ± 0.44 pmol/h (平均 \pm 標準偏差, n=3)であった。これは、反応液 250 μL 中の $[^{13}\text{C}_2, ^{15}\text{N}_2]\text{UA}$ 濃度に換算すると 25.5 nM であり、前項で示した $[^{13}\text{C}_2, ^{15}\text{N}_2]\text{UA}$ 検量線で十分評価できる値であった。以上の検討から、測定機器を LC-HRMS から LC-TQMS に変更し、それに伴い基質を $[^{13}\text{C}_2, ^{15}\text{N}_2]\text{Xan}$ に変更することで、約 1000 倍希釈したマウス血漿の XOR 活性を測定可能な高感度 XOR 活性測定法を確立した。

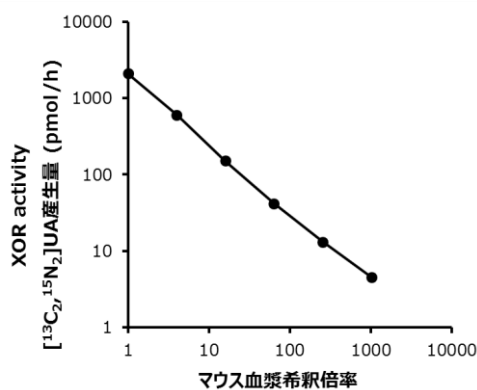


図 36 マウス希釈血漿の XOR 活性

第4章 高感度 XOR 活性測定法の臨床検体への応用

第4章では、第3章にて確立した LC-TQMS と $[^{13}\text{C}_2, ^{15}\text{N}_2]\text{Xan}$ を用いた高感度 XOR 活性測定法の臨床検体ヒト血漿への応用を検討する。第1節ではヒト血漿に適した除タンパク法の改良とヒト血漿を用いた XOR 酵素反応条件のうち基質量・血漿量・反応時間について検討し、最適な条件を設定する。また、内在性成分が XOR 酵素反応に与える影響と、血液の採取から血漿分離までの時間が XOR 活性測定に与える影響について調べ、血漿の前処理法について検討する。第2節では確立した方法を用いたヒト血漿中 $[^{13}\text{C}_2, ^{15}\text{N}_2]\text{UA}$ 測定法バリデーションおよびヒトプール血漿を用いた XOR 活性測定の日内・日間再現性評価を行う。第3節では高感度 XOR 活性測定従来法として LC-FL 法(基質: プレリン)を用いて、8 個体の個別血漿を用いた XOR 活性測定を行い、LC-MS 法の結果と比較検討する。第4節では確立した方法を用いた健常人 20 名の血漿 XOR 活性測定と血液生化学検査の結果との比較検討について述べる。

第1節 ヒト血漿を用いた条件の最適化

第1項 除タンパク法の変更

マウス由来試料の XOR 活性測定では、酵素反応停止及びタンパク質の変性のため煮沸処理を用いていたが、ヒト血漿を試料とする場合、煮沸処理ではタンパク質を十分に除去できない可能性が考えられた。そこで、除タンパク法を

- ・煮沸→遠心→上清の限外ろ過

から、

- ・メタノール除タンパク→遠心→上清を濃縮→再溶解→限外ろ過

に変更することとした。

通常煮沸法は他の除タンパク法との組み合わせで用いられるが、メタノールなど有機溶媒を用いた除タンパク法は単独でも十分なタンパク質除去が可能である。[分析試料前処理ハンドブック 中村洋監修]によれば、血漿に対して4倍量のメタノールを用いることにより 99.2% のタンパク質が除去できる。しかし、活性測定サンプルでは血漿以外に基質なども添加するため血漿が希釈され、除タンパク効率が低下する恐れがある。そこで今回は、メタノール除タンパク法と限外ろ過法の組み合わせを採用した。また、メタノール上清はそのままでは液量が多く、希釈による感度低下が生じる。さらに、LC 分析においてサンプル媒体の有機溶媒比率が移動相の有機溶媒比率よりも高い場合、測定対象物質がサンプル媒体の溶出力に引きずられてカラムの充填剤に保持せず流れてしまったり、ピークがブロードになり分離が悪くなることが知られている。そこで、メタノール除タンパク後の上清をいったん遠心エバポレーターで濃縮した後、再溶解し、限外ろ過することとした。工程数が増える分スロットが悪くなることが懸念されたため、従来ではエッペンチューブを用いて1本ずつ検体処理していたところを、96 ウェルプレートに変更することにより処理の効率を改善した。

第2項条件検討 基質量、血漿量、反応時間

酵素反応条件最適化のため、基質量、血漿量、および反応時間について検討を実施した。基質量の検討では、縦軸に $[^{13}\text{C}_2, ^{15}\text{N}_2]\text{UA}$ 産生量 pmol、横軸に基質である $[^{13}\text{C}_2, ^{15}\text{N}_2]\text{Xan}$ 添加量 μM をプロットしたところ $[^{13}\text{C}_2, ^{15}\text{N}_2]\text{UA}$ 産生量は基質量の増加に伴って増加し、基質量が $14 \mu\text{M}$ 付近でプラトーに達し、ミカエリス・メンテン動力学のパターンを示した (図 37 a)。反応時間は 30 分から 120 分の間で直線性を示した (図 37 b)。血漿量は $50 \mu\text{L}$ から $150 \mu\text{L}$ の間で直線性を示した (図 37 c)。これらの結果から、基質 $[^{13}\text{C}_2, ^{15}\text{N}_2]\text{Xan}$ 量は $16 \mu\text{M}$ (絶対量 4 nmol/sample)、反応時間 90 分、血漿 $100 \mu\text{L}$ を XOR 活性測定条件と設定した。

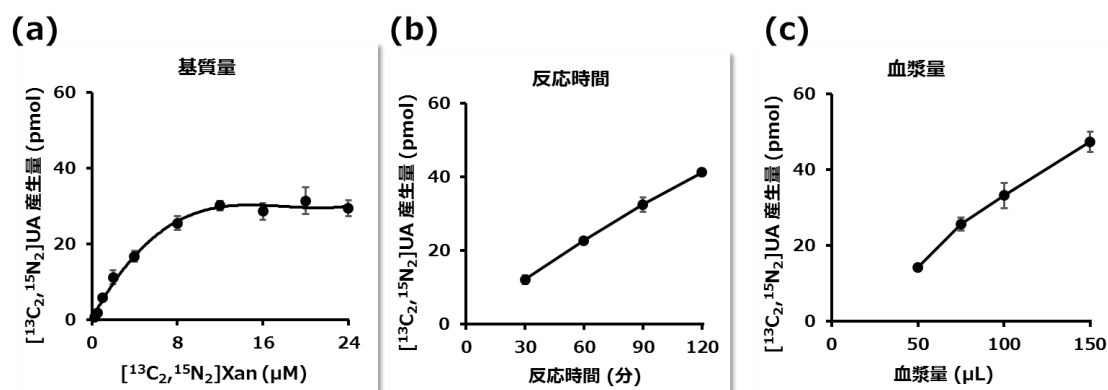


図 37 反応条件検討結果

(a) ; 基質量、(b) ; 反応時間、(c) ; 血漿量

第3項内在性成分の影響

内在性ヒポキサンチン、キサンチン、尿酸が XOR 活性に与える影響

マウス XOR 活性測定法の検討において、内在性ヒポキサンチン、キサンチンが XOR 活性結果に影響することを見出したが、本高感度測定法においても同様に内在性成分の影響を検討した。まず G25 処理して内在性成分を除去したヒトプール血漿に、Xan、HX、UA をそれぞれ加え、後述の酵素反応条件で反応させ、未添加の検体の XOR 活性を 100% としたときの各濃度における XOR 活性比を求めた。結果を図 38 に示す。グラフは縦軸が XOR 活性比、横軸が、添加した Xan、HX、UA の血漿中濃度を表す。Xan は $10 \mu\text{M}$ 以上で、HX は $5 \mu\text{M}$ 以上で XOR 相対活性が 80% 以下に低下した。UA 濃度では $320 \mu\text{M}$ 以上で XOR 相対活性が 80% 以下に低下した。健康なヒトの血中 HX 濃度は幅 $0 \sim 11 \mu\text{M}$ の間で、平均は $5.8 \mu\text{M}$ であるが、低酸素状態では $20 \mu\text{M}$ 以上まで上昇するとの報告がある¹⁴³。よって、臨床試験においてさまざまな疾患をもつヒト血漿 XOR 活性を測定する場合、Xan、HX 濃度の上昇が予測され、XOR 活性測定の精度に影響を及ぼす可能性が示唆された。UA については、マウス XOR

活性測定法確立の際の検討では XOR 活性に影響を及ぼさなかったが、今回検討した結果、320 μM で相対活性の低下が認められた。その理由として、今回の条件では添加する安定同位体基質の量が少ないことが考えられる。実際、添加した UA 320 μM を安定同位体基質/尿酸比に換算すると 0.125 であり、マウスでの検討範囲（安定同位体基質/尿酸比率は 0.25~16 まで）よりも安定同位体基質に対して高濃度添加していることになる。XOR 活性低下が認められた尿酸濃度 320 μM は単位換算すると 5.4 mg/dL と血清尿酸値の正常範囲内であり、健康なヒトの生理的尿酸レベルであっても XOR 活性測定に影響を及ぼすことが推定された。Tan らは、生理的濃度の血漿中尿酸が XOR 活性を阻害することを報告している¹¹³。しかし、尿酸による XOR 阻害の機序は明らかになっていないため、今後更なる検討が必要である。

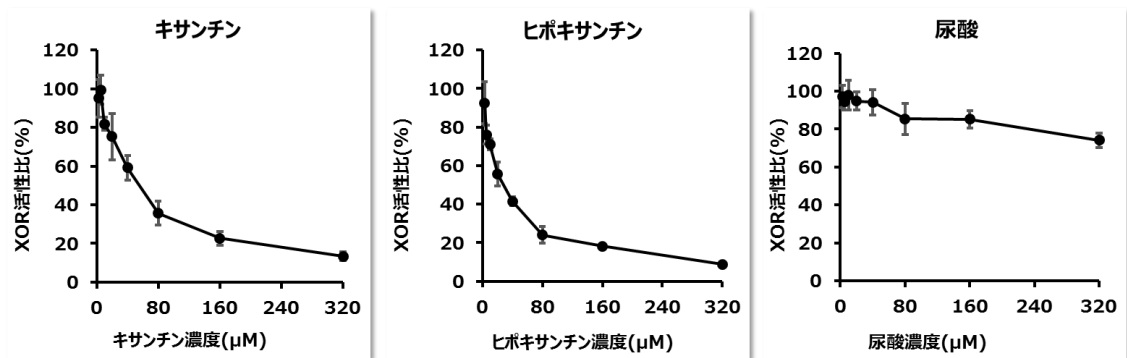


図 38 内在性 HX、Xan、UA が XOR 活性に与える影響

採血管中血液放置時間の影響

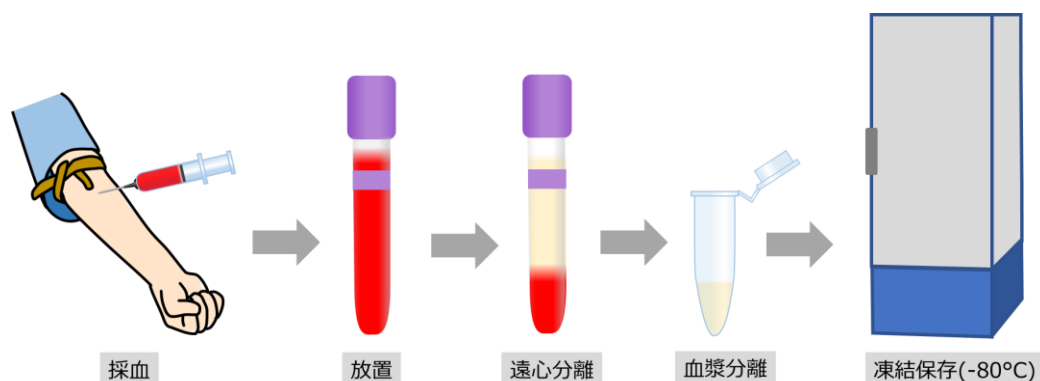


図 39 採血から血漿分離までの流れ

病院で実施される臨床研究においては、検体は他の臨床検査項目と同時に採血され、臨床検査室などで多検体を一度に処理することにより、採血から血漿分離・凍結保存までに数時間を要する場合が想定される(図 39)。この血液放置時間が XOR 活性の安定性に与える影響を評価するため、採血管中で血液を 4°C で 72 時間まで放置し、その後遠心分離して得られた血漿の XOR 活性を測定した。全ての検体は血漿分離後に -80°C で凍結保存し、同時に XOR 活性測定を行った。結果を図に示す。血液放置時間 0 時間の XOR 活性を 100% としたときの各時間の相対活性 (%) は経時的に低下し、72 時間で 50% 以下となった(図 41 破線)。この活性低下の原因としては、① XOR 酵素の分解、② XOR 酵素の活性中心の不活性化 (sulfo 型から desulfo 型への変換)、③ 内在性の阻害剤濃度の上昇、の 3 通りが想定された。そこで、同じ血漿検体を G25 処理した後に XOR 活性を測定したところ、72 時間でも相対活性の低下はほとんど認められなかった(図 41 実線)。このことから、原因は③の内在性阻害剤濃度の上昇であると推定し、血液放置時間ごとの血漿中 UA、Xan、HX 濃度を LC-MS にて測定した。結果を図 41 に示す。UA および Xan はほぼ変動がなかったものの、HX は血液放置時間に依存して濃度が上昇した。よって、G25 未処理の血漿で血液放置時間依存的に XOR 相対活性が低下した原因は、血液放置時間に応じて上昇した HX が XOR による $[^{13}\text{C}_2, ^{15}\text{N}_2]\text{Xan}$ の酸化反応を阻害したことにより、見かけの活性が低下したためであり、血漿を G25 処理して内在性 HX 等を除去することにより XOR 相対活性は回復したことから、XOR 酵素自身の不活性化あるいは分解はほとんど進行していないと推察された。

Jorgensen と Poulsen¹⁴⁴ は、酵素法による Xan, HX 測定法を開発し、血液細胞との 24 時間の接触により、血清中の HX 濃度が 1000 倍に上昇することを見出した。Wung ら¹⁴⁵、Bouliou ら¹⁴⁶ および Hiroshige ら¹⁴⁷ は HPLC を用いた HX などのオキシプリン類の定量法を開発し、その研究においても同様に、全血を放置することにより血漿中のオキシプリン類が上昇することを報告している。Wung ら¹⁴⁵ は、血液中の成分である赤血球、血小板、白血球のうち、HX 放出に関連する成分を調べ、赤血球と血小板が主な HX 発生源であることを見出した。HX は血液細胞膜を自由に通過することができ、採血後に *in vitro* で赤血球や血小板などの血液細胞中で HX の産生が起り、ヒトの XOR 活性が低いために尿酸まで代謝されず、血漿中に放出されると考えられる。このように、著者の結果はこれまでに報告された結果と一貫

しており、前述の通り採血から血漿分離までの時間のコントロールが難しい臨床検体では HX の顕著な上昇が予想され、XOR 活性測定の前に全ての検体の精製操作が必須であることが示された。

図 40 血液放置時間が XOR 活性に与える影響

実線：G25 処理あり、破線：G25 処理なし

図 41 血液放置時間と血漿中内在性成分濃度

(a) ヒポキサンチン、(b) キサンチン、(c) 尿酸

G25 処理の検討

前項および本項の検討結果から、測定に使用するヒト血漿検体はすべて XOR 活性を測定する直前に G25 で処理し内在性成分を除去することとした。ヒト血漿は、動物の希少な組織ホモジネートなどとは異なり、ある程度の検体量を確保することが容易であることから、全検体を G25 処理することは今後のルーチンでの臨床検体 XOR 活性測定に影響しないものと考えられた。ヒト血漿の処理に使用する G25 カラムは、多検体処理に最適な 96 ウェルタイプを選択し、G25 処理における HX、Xan、UA の除去効率を検討した。血漿の処理は本製品の遠心プロトコールに従って実施した。あらかじめ G25 処理した血漿に尿酸は 400 μM 、キサンチン、ヒポキサンチンは 100 μM を添加し、G25 処理した後、血漿中に残存する尿酸、キサンチン、ヒポキサンチン濃度を LC-MS にて測定した。結果を表 15 に示す。HX および Xan は 97% 以上、UA も 90% 程度の除去率であった。除去後の尿酸、キサンチン、ヒポキサンチン濃度は XOR 活性に影響のないレベルであった。また、G25 処理前後におけるタンパク濃度に変化はなかった(表 16)。

表 15 G25 処理後の尿酸、キサンチン、ヒポキサンチン濃度と除去率 (%)

	添加濃度 血漿中 (μM)	G25 処理後の濃度 血漿中 (μM)	除去率 (%)
尿酸	400	40.6	89.9
キサンチン	100	2.39	97.6
ヒポキサンチン	100	2.94	97.1

表 16 G25 処理前後における血漿中タンパク質濃度 (平均 \pm 標準偏差)

	G25 処理前	G25 処理後
血漿中タンパク質濃度(mg/mL)	44.9 \pm 0.7	43.6 \pm 1.3

第 4 項 ヒト血漿 XOR 活性測定の標準プロトコール

各検討で得られた基質量、血漿量、反応時間の結果をもとに、ヒト血漿 XOR 活性測定の標準プロトコールを設定した。MS 測定条件では、測定対象物質の [$^{13}\text{C}_2, ^{15}\text{N}_2$]UA と内部標準

物質の $[^{13}\text{C}_3, ^{15}\text{N}_3]\text{UA}$ 以外に、基質である $[^{13}\text{C}_2, ^{15}\text{N}_2]\text{Xan}$ および XOR 活性に影響する内在性成分の UA、Xan、HX の SRM を設定し、6 成分の同時測定メソッドを作成した。

LC-TQMS 法(基質： $[^{13}\text{C}_2, ^{15}\text{N}_2]\text{Xan}$)

- ① 酵素反応：ヒト血漿サンプル 100 μL を G25 で精製し、16 μM の $[^{13}\text{C}_2, ^{15}\text{N}_2]\text{Xan}$ 、16 μM の NAD^+ および 1 μM の $[^{15}\text{N}_3, ^{15}\text{N}_3]\text{UA}$ を添加し、トリス緩衝液でサンプル液量を 250 μL に調製する。混合液を 37°C で 90 分間インキュベートする。
- ② 反応停止および除タンパク：500 μL の MeOH を添加しピペティングで混合して反応を停止させる。懸濁液を 4°C、2,000 $\times g$ で 15 分間遠心分離し、上清を別のチューブに移し替え、遠心エバポレーターで濃縮乾固する。残渣に 150 μL の DW を加え、ボルテックスミキサーで攪拌して再溶解し、限外ろ過フィルターでろ過し、LC-TQMS 用試料溶液とする。
- ③ LC-TQMS 測定および XOR 活性算出：下記の条件に従って LC-TQMS 測定を行う。 $[^{13}\text{C}_2, ^{15}\text{N}_2]\text{UA}$ の検量線用試料を同時に測定し、得られた $[^{13}\text{C}_2, ^{15}\text{N}_2]\text{UA}$ と $[^{15}\text{N}_3, ^{15}\text{N}_3]\text{UA}$ のピーク面積比と $[^{13}\text{C}_2, ^{15}\text{N}_2]\text{UA}$ 設定濃度から加重最小二乗法による検量線の回帰式 ($Y = aX + b$, Y ：ピーク面積, X ：濃度, a ：傾き, b ：切片) を求め、検体中 $[^{13}\text{C}_2, ^{15}\text{N}_2]\text{UA}$ 産生量を求める。XOR 活性は反応時間 1 時間、血漿 1 mL あたりの $[^{13}\text{C}_2, ^{15}\text{N}_2]\text{UA}$ 産生量 (pmol/h/mL plasma) で表記する。

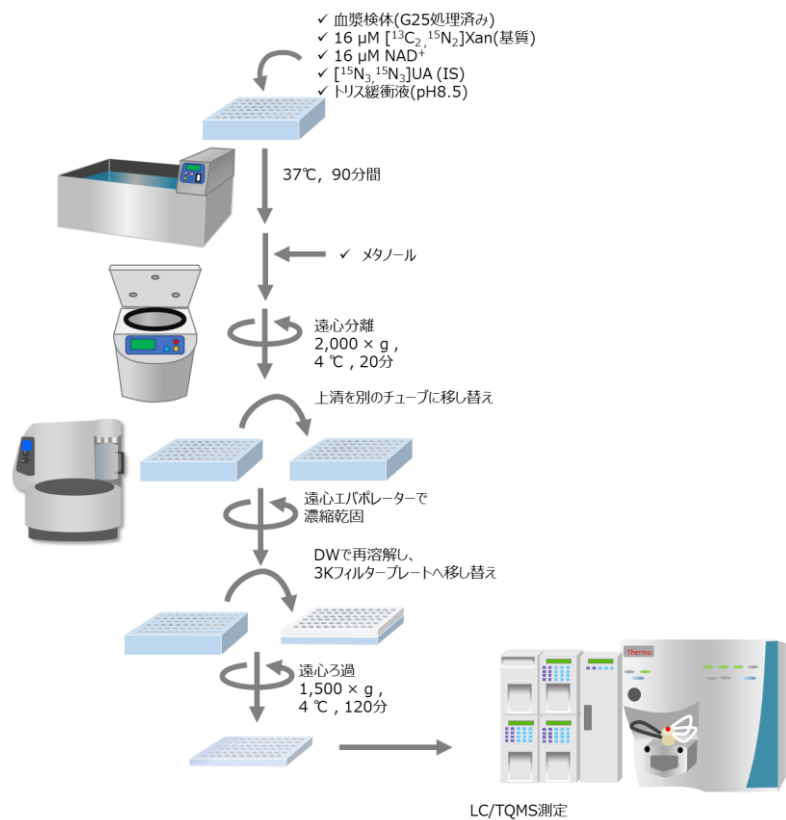


図 42 ヒト血漿 XOR 活性測定標準プロトコール

LC-TQMS 測定条件

装置 : Nano Space SI-2 LC system (資生堂)
分析カラム : Discovery HS F5, 150 mm × 2.1 mm i.d. (Sigma-Aldrich)
カラム温度 : 40 °C
サンプル温度 : 10 °C
移動相 A : 0.5% AcOH 水溶液
移動相 B : 0.5% AcOH/MeOH
グラジエント (min/B%) : 0/0, 5/2.5, 5.1/0, and 7.0/0
流速 : 200 µL/min
検出 : TSQ Quantum Discovery MAX (Thermo)
イオン源 : ESI
イオンモード : Positive
スプレー電圧 : 5500 V
イオントランスファーチューブ温度 : 350 °C
シースガス : 40 arb
オグジュアリーガス : 5 arb
モード : SRM
SRM transition (m/z) :
Analyte [¹³C₂, ¹⁵N₂]UA 173 > 144 ; CE 17
ISTD [¹³C₃, ¹⁵N₃]UA 175 > 146 ; CE 17
UA m/z 169 > 141
Xan 153 > 110
HX 137 > 94 and 110
[¹³C₂, ¹⁵N₂]Xan 157 > 112 and 139

第2節 [¹³C₂, ¹⁵N₂]尿酸測定法バリデーション

第1項 ブランク血漿の BG ピーク評価

本測定法の利点は、インキュベーション 0 時間の検体をコントロールとして測定し、BG 値を差し引く必要がないことである。実際、BG ピークが検出されないかどうかを確認するため、ヒト血漿 100 µL を用いて 0 時間インキュベーションのコントロール検体を調製し LC-TQMS にて測定したところ、Analyte[¹³C₂, ¹⁵N₂]UA の保持時間付近にピークは認められず (図 43 A)、インキュベート 30 分において明らかな [¹³C₂, ¹⁵N₂]UA ピークが検出された (図 43 C) ことから、XOR の酵素による [¹³C₂, ¹⁵N₂]Xan → [¹³C₂, ¹⁵N₂]UA の反応が進み、LC-TQMS にてきちんとその変化が捉えられていることが確認された。

第2項 検量線マトリックスの選択と検量線の評価

動物の XOR 活性測定法の場合は、あらゆる種類の組織由来の試料を測定することから、検量線の代替マトリックスとして TBS を用いたが、ヒト血漿 XOR 活性測定法では、検体は

ヒト血漿一種類であるため、検量線のマトリックスはヒト血漿を用いることとした。使用するヒト血漿は市販のものとし、使用前に G25 で処理した。

$[^{13}\text{C}_2, ^{15}\text{N}_2]\text{UA}$ (Analyte) の $[^{13}\text{C}_3, ^{15}\text{N}_3]\text{UA}$ (IS) に対するピーク面積比と $[^{13}\text{C}_2, ^{15}\text{N}_2]\text{UA}$ の設定濃度から加重最小二乗法による検量線の回帰式 ($Y = aX + b$, Y: ピーク面積, X: 濃度, a: 傾き, b: 切片) を求め、濃度を算出した。 $[^{13}\text{C}_2, ^{15}\text{N}_2]\text{UA}$ 濃度が 4–4000 nM の間で相関係数 (R^2) は 0.995 であり、良好な直線性を示した。検量線各ポイントの算出濃度は真度が理論値の $100 \pm 15\%$ 以内 (定量下限では $100 \pm 20\%$ 以内) であった。定量下限 (LLOQ) は 4 nM (絶対量 1pmol/sample) であった。LLOQ における $[^{13}\text{C}_2, ^{15}\text{N}_2]\text{UA}$ の SRM クロマトグラムを図 43 B に示す。ピーク形状および S/N 比は良好であった。LLOQ 4 nM という値は、血漿 100 μL を用いて測定した場合の XOR 活性約 6.67 pmol/h/mL plasma に相当する。また、第 2 章で確立した LC-HRMS 法 (定量下限 0.667 μM , 絶対量 0.1 nmol/sample) よりも 100 倍高感度に測定できることを示す。

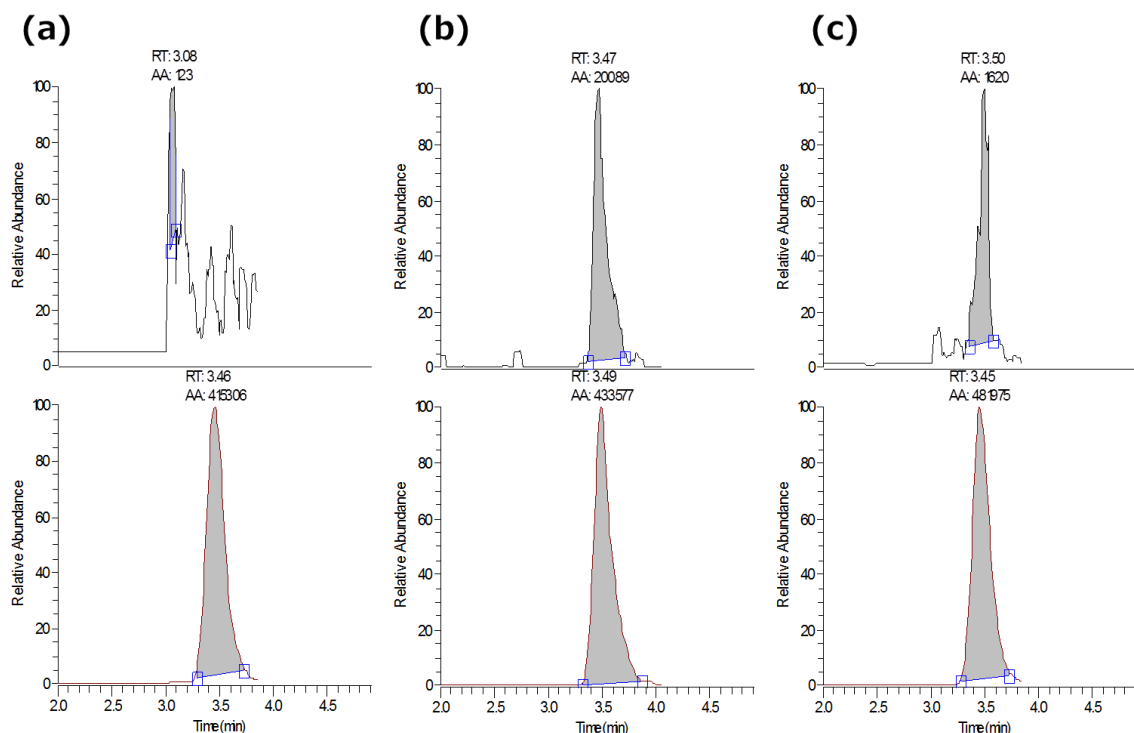


図 43 抽出クロマトグラム

上段: $[^{13}\text{C}_2, ^{15}\text{N}_2]\text{UA}$ (Analyte)、下段: $[^{13}\text{C}_3, ^{15}\text{N}_3]\text{UA}$ (IS)

(a) 0 分反応サンプル、(b) 30 分反応サンプル、(c) 検量線 LLOQ サンプル

第 3 項 日内および日間再現性評価

4 濃度 (高濃度、中濃度、低濃度、定量下限濃度) における日内・日間再現性を評価した。結果を表 17 に示す。いずれの濃度においても、精度は 15% 以下 (定量下限では 20% 以下)、真度は理論値の $100 \pm 15\%$ 以内 (定量下限では理論値の $100 \pm 20\%$ 以内) と良好な結果であつ

た。

最後に、ヒトプール血漿を用いて、XOR 活性測定の日内・日間再現性を評価した (表 17)。検体は 6 本ずつ調製し、測定した。日間再現性はこれを 3 日間実施した。プール血漿の XOR 活性は 96.6 ± 6.3 pmol/h/mL plasma であり、日内および日間再現性を示す CV (%) はそれぞれ 6.5% (n = 6)、9.1% (n = 6, 3 日間) と良好な再現性を示した。

表 17 QC 試料の日内・日間再現性およびヒトプール血漿の XOR 活性測定再現性

Nominal concentration (nM)	3200	80.0	8.00	4.00
Intra-assay $n = 6$				
Calculated concentration mean (nM)	3170	89.9	8.00	3.86
Accuracy (%RE)	-0.9	12.4	0.0	-3.5
Precision (%CV)	1.5	3.0	4.8	14.2
Inter-assay $n = 6, 3$ days				
Calculated concentration mean (nM) $n = 18$	3050	85.1	7.84	3.92
Accuracy (%RE)	-4.7	6.4	-2.0	-2.0
Precision (%CV)	6.0	6.4	9.7	11.2
Reproducibility of XOR activity				
XOR activity (pooled human plasma)	96.6 ± 6.3 pmol/h/mL plasma			
Precision (%CV)	Intra-assay $n = 6$		6.5	
	Inter-assay $n = 6, 3$ days		9.1	

第 3 節 従来法との比較 ; LC-FL 法を用いた検討

第 1 項 LC-TQMS 法と LC-FL 法の比較試験 ; 8 個体の血漿を用いた活性測定

XOR 活性の低いヒト血漿検体を用いた活性測定においては、RI 法⁴³や LC-FL 法(基質 : プテリン)⁴⁵が用いられてきたが、特に LC-FL 法は高感度であり RI より遥かに取り扱いが容易であるため、従来法の中では最もルーチンの高感度 XOR 活性測定に有用であると考えられる。本研究においても、確立した LC-TQMS 法(基質 : [¹³C₂,¹⁵N₂]Xan)と LC-FL 法を用いて 8 名の被験者から得た個別の血漿検体の XOR 活性を測定し、これらの結果を比較した。結果を図 44 に示す。LC-TQMS 法と LC-FL 法それぞれで全ての被験者の血漿 XOR 活性を検出することができ、それらの結果を比較すると、良好な相関関係を示した ($r = 0.991$)。ただし、第 2 章で述べたようにプテリンと安定同位体 Xan と XOR 酵素に対する親和性の違いにより、[¹³C₂,¹⁵N₂]Xan から [¹³C₂,¹⁵N₂]UA の酸化の割合はプテリンから IXP への酸化よりも 2.8-5.9 倍高かった。この結果から、著者が開発した LC-TQMS 法も従来の高感度測定法である LC-FL 法と同等の検出感度を有しながら、LC-FL 法よりも生理的条件を反映し、ヒト血漿 XOR 活性測定に適切な方法であることが示された。

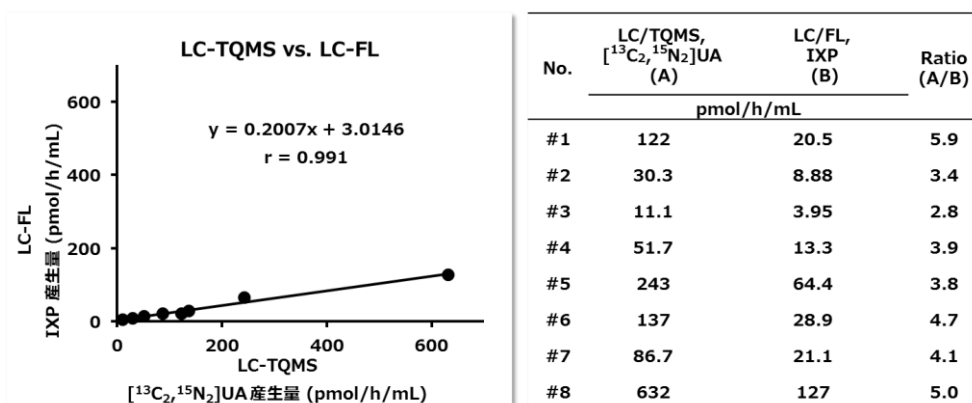


図 44 被験者 8 名の個別 XOR 活性結果；従来法（LC-FL 法）との比較

第 4 節 20 名の健常人血漿を用いた XOR 活性測定

確立した本方法を用いて 20 名の健常人の血漿 XOR 活性を測定した。結果を表に示す。全被験者（20 名）、女性（6 名）、男性（14 名）の XOR 活性はそれぞれ 89.1 ± 55.1 , 63.9 ± 34.8 , 99.9 ± 59.6 (pmol/h/mL, 平均 ± 標準偏差) であり、本高感度測定法を用いることによって、低いとされる健常人の血漿中 XOR 活性を全例検出することに成功した。これまでの報告⁵⁶とは異なり XOR 活性と年齢との相関は認められなかった ($r = -0.2364$)。しかし、本研究においては被験者の年齢幅が狭く偏りもあるため、比較することは困難である。一方、既報通り⁴³、XOR 活性は ALT と強い相関 ($r = 0.8269$) を示し、AST とも中程度の相関 ($r = 0.4879$) を示した。血中の ALT は主に肝臓に由来し、AST は肝臓以外にも心臓、筋肉、膵臓、脾臓、肺などに分布している。ALT と特に強い相関が認められたことから、疾患を持たない健常人においては、血漿中 XOR の主な由来は肝臓であることが示唆された。XOR 酵素はヒトの肝臓に相当量存在し、肝細胞のターンオーバーや障害により血中に放出されると推定される。

本研究では被験者数が少なく、年齢や性別に偏りがあるため、得られた XOR 活性平均値は健常人の血漿 XOR 活性平均値を反映しているとはいえないであろう。病態と健常のヒト血漿 XOR 活性を比較するためには、検体数を増やした更なる検討が必要であると考えられる。

表 18 健常人 20 名の XOR 活性および血液性化学検査との相関

Number of subjects	Total 20			Female 6			Male 14		
	mean \pm SD (Min–Max)	vs. XOR activity		mean \pm SD (Min–Max)	vs. XOR activity		mean \pm SD (Min–Max)	vs. XOR activity	
		r	P-value		r	P-value		r	P-value
XOR activity (pmol/h/mL)	89.1 \pm 55.1 (32.8–227)			63.9 \pm 34.8 (32.8–127)			99.9 \pm 59.6 (46.9–227)		
ALT (U/L)	27.3 \pm 21.2 (6–87)	0.8269	< 0.0001	15.8 \pm 23.3 (6–29)	0.6004	0.2076	32.2 \pm 23.3 (14–87)	0.8301	0.0002
AST (U/L)	29.9 \pm 21.9 (17–120)	0.4879	0.0291	24.5 \pm 6.8 (17–34)	0.6602	0.1536	32.2 \pm 25.7 (17–120)	0.4626	0.0958
UA (mg/dL)	5.4 \pm 1.6 (2.4–8.0)	0.5026	0.0239	3.4 \pm 0.8 (2.4–4.6)	-0.2901	0.577	6.2 \pm 0.9 (5.3–8.0)	0.6567	0.0107
T-cho (mg/dL)	176.9 \pm 28.5 (145–254)	-0.05394	0.8213	171.0 \pm 28.9 (145–219)	0.008	0.988	179.4 \pm 29.0 (149–254)	-0.1301	0.6576
BUN (mg/dL)	13.3 \pm 3.9 (7.1–22.0)	0.1161	0.6259	11.9 \pm 4.5 (7.1–19.7)	-0.2669	0.6091	13.9 \pm 3.7 (8.7–22.0)	0.1329	0.6506
Cre (mg/dL)	0.80 \pm 0.15 (0.55–1.00)	0.2842	0.2247	0.60 \pm 0.03 (0.55–0.63)	0.1369	0.796	0.89 \pm 0.06 (0.75–1.00)	-0.02687	0.9274
Age (years)	38.4 \pm 8.9 (26–57)	-0.2364	0.3156	38.5 \pm 8.1 (29–50)	0.6848	0.1334	38.3 \pm 9.5 (26–57)	-0.4247	0.1301

第5章 高感度 XOR 活性測定法に関する考察と今後の展望

本論文では、XOR 活性測定法に関するこれまでの課題を明らかにし、安定同位体基質と LC-MS を用いた新しい XOR 活性測定法の考案と、反応条件や基質の種類、検出等さまざまな項目について最適な条件を明らかにした。その結果、マウスの組織および血漿 XOR 活性測定法と、高感度ヒト血漿 XOR 活性測定法を確立した。そして、低いとされる健常人 20 名の血漿 XOR 活性の全例検出に成功した。本 XOR 活性測定法は、安定同位体基質と質量分析計を組み合わせた世界で最初の研究である。本測定法の特徴は、

- ① BG 値差し引き不要で、高精度・高感度かつスループット性の良い測定法
- ② 活性に影響する内在性 HX、Xan、UA 等をモニターすることが可能
- ③ 内在性基質 Xan と性質が同じ SIL-Xan の利用により、生理的条件を反映した測定法
- ④ SIL-Xan は安全性が高く、取り扱いが容易

などが挙げられる。

従来法の課題を克服した本測定法は、今後ますます盛んになることが予想される XOR 研究に大いに寄与するものと期待している。

本測定法はすでに現在さまざまな研究で活用されており、一例を紹介する。動物検体を用いた XOR 活性測定法では、池森らのグループとの共同研究によりアデニン誘発性腎損傷モデルマウスを用いて、トピロキソスタット投与群が腎 XOR 活性および尿細管間質損傷のバイオマーカーである尿中 L-FABP(ヒト肝臓型脂肪酸結合タンパク質)を低下させ、腎保護効果を示すことを明らかにした¹⁴⁸。中村らとの共同研究により、XOR 阻害剤を投与した db/db マウスの肝・腎・血漿 XOR 活性を測定し、トピロキソスタットが db/db マウスの尿中アルブミン排泄を用量依存的に減少させ、それが血漿 XOR 活性と良好な相関関係を示したこと、類薬であるフェブキソスタットはそのような傾向を示さなかったことを明らかにした¹⁴⁹。また、*in vitro* の XOR 阻害活性評価により、血漿中においてフェブキソスタットよりもトピロキソスタットが強い XOR 阻害活性を示すことを明らかにした¹⁴⁹。大畑らとの共同研究により、アンジオテンシン II タイプ 1a(AT1a) 受容体発現が減少したアデニン誘発性腎損傷モデルマウスにおいて、トピロキソスタットが腎 XOR、腎機能障害、尿中 L-FABP、尿細管間質損傷、低酸素症および酸化ストレスのレベルを減少させたことを示した¹⁵⁰。

ヒト血漿の高感度 XOR 活性測定法を用いた研究では現在、本測定の高スループット性を生かし、多くの大学や病院との共同研究により年間 5000 検体のペースで測定を実施しており、その中でもいくつかの成果がすでに報告されている。山形大学の大瀧らとの共同研究において、慢性心不全患者および対照患者の血漿 XOR 活性を測定し、血漿 XOR 活性が非常に高い、あるいは低い群で患者の心イベント発生率が有意に高かったことを明らかにした¹⁵¹。大阪医科大学の藤村らとの共同研究においては、心臓病患者において血漿 XOR 活性が BMI や HbA1c と相関しており、さらに左室肥大、低左心室駆出率、および脳性ナトリウム利尿ペプチドの増加と血漿 XOR 活性に関連があることを明らかにした¹⁵²。兵庫医科大学の鷺尾らとの共同研究においては、若年者(25.9±3.3 歳)の血漿中 XOR 活性の自然対数(ln-XOR)と尿酸、BMI が正の相関を、インスリン抵抗性の指標である quantitative insulin sensitivity check index (QUICKI)およびアディポネクチンと負の相関を示すことを明らかにした¹⁵³。さらに ln-XOR

は慢性の炎症の指標である高感度 CRP(C 反応性タンパク)と正の相関があることを明らかにした¹⁵³。大阪市立大学の仲谷らとの共同研究では、2 型糖尿病を発症した透析患者において、血漿 XOR 活性と血漿グルコース、および糖化アルブミンに相関があることを明らかにした¹⁵⁴。

高精度な XOR 活性測定法を開発し、臨床研究においてさまざまな疾患と XOR 活性との関連が明らかになりつつあるが、XOR による酸化ストレスの亢進と XOR 活性上昇の関連ははっきりと明らかにはなっていない。これは、ひとつには生体試料を用いた酸化ストレス評価が難しいことが要因として挙げられる。また、本方法で測定しているのは XOR つまり XO と XDH を合わせたトータルの活性であるが、酸化ストレスには XO が関与しており、XO/XDH の比が病態にとって重要だという仮説もある。しかし、本方法において XO と XDH の厳密な測り分けにはいくつかの技術的な課題が残されており、今後は質量分析計だけでなく ESR など別の分析技術も組み合わせた検討が必要と考える。また、血管内皮係留型の XOR 活性に関しては、臨床研究においてヘパリンを投与し採血することが困難であることから、本方法においては評価できていない。さらに、生検や外科手術で得られたヒト組織の XOR 活性測定や、動物においてごく微量にしか得られない神経や腎糸球体などの組織 XOR 活性を測定するためには、本測定法よりも高い検出感度が求められると予想される。測定のスループットを落とすことなくさらなる高感度化を達成すること、XO/XDH の分別活性評価、酸化ストレス評価との組み合わせによる病態の解明などが今後の重要な研究課題である。

実験の部

第 2 章から第 4 章で使用した安定同位体標識化合物の合成

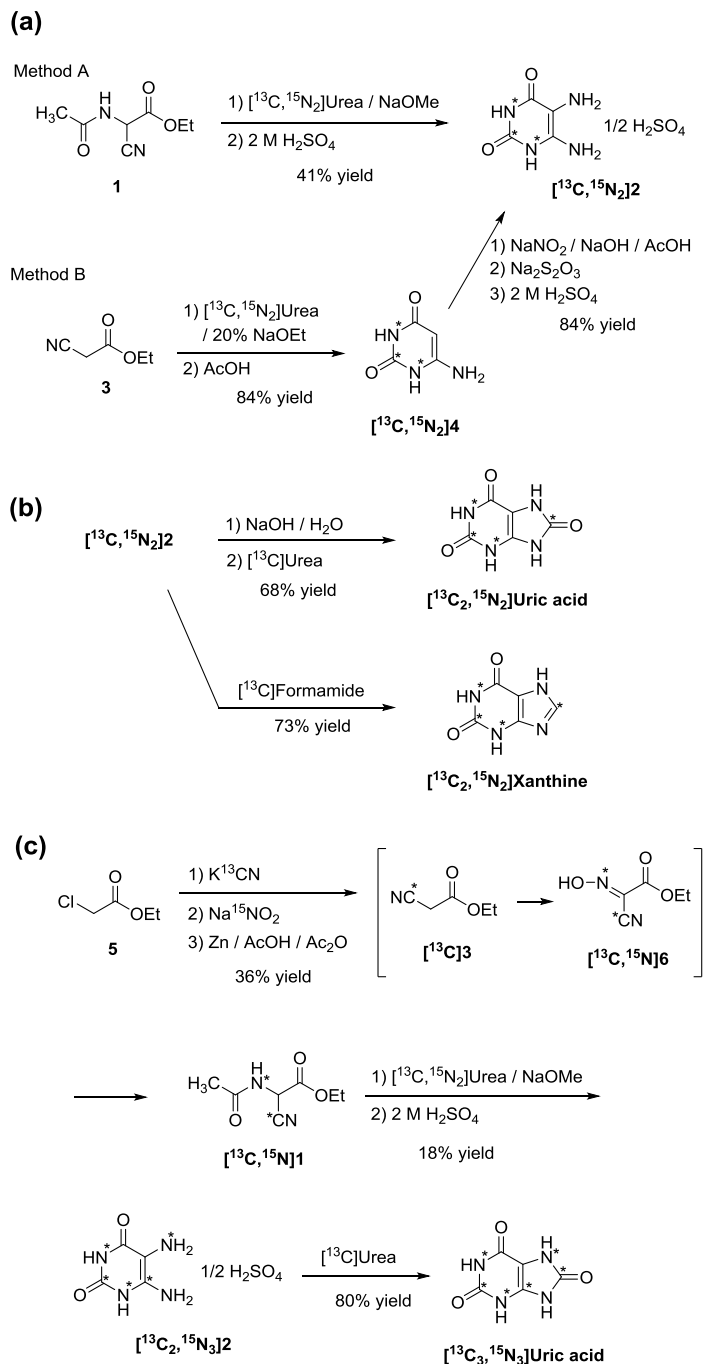


図 45 安定同位体尿酸およびキサンチンの合成スキーム

$[^{13}\text{C},^{15}\text{N}_2]5,6\text{-ジアミノピリミジン-2,4 (1H,3H) -ジオン 1/2 硫酸塩 } ([^{13}\text{C},^{15}\text{N}_2]2)$

Method A: 2-アセトアミド-2-シアノ酢酸エチル (**1**, 1.62 g, 9.53 mmol) 及び $[^{13}\text{C},^{15}\text{N}_2]$ 尿素 (500 mg, 7.94 mmol) を含むテトラヒドロフラン (THF; 14 mL) 懸濁液にナトリウムメトキシド (1.23 g, 22.8 mmol) を室温で加えた。混合液を加熱し、エタノール (EtOH) (4 mL) を加え、3時間還流した。氷浴で冷却した後、沈殿物をフィルターろ過で採取し、45 °C で減圧乾燥し、粉末 (2.13 g) を得た。その粉末を 2 M 硫酸水溶液 (H_2SO_4) (21 mL) に加え 100 °C で 10 分間攪拌した。冷却後、沈殿物をろ過して採取し、DW で洗浄し (2 mL) , 45 °C で減圧乾燥し、灰色粉末の $[^{13}\text{C},^{15}\text{N}_2]2$ (635 mg, 収率 41%) を得た。

$^1\text{H NMR}$ (DMSO- d_6) δ 6.10 (2H, s, NH_2) , 7.85 (3H, brs, NH_2 and NH) , 10.6 (1H, d, $J = 91.6$ Hz, NH) ; MS (ESI) m/z 146 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 144 $[\text{M}-\text{H}]^-$.

Method B: $[^{13}\text{C},^{15}\text{N}_2]$ 尿素 (500 mg, 7.93 mmol) 及び 20% ナトリウムメトキシド/EtOH 溶液 (8.0 mL) の混合物に氷冷下、シアノ酢酸エチル (905 mg, 8.01 mmol) を滴下した。得られた懸濁液をゆっくりと加熱し、75 °C で 5 時間放置した。冷却後、DW (15 mL) を加え、その後酢酸 (AcOH) (1.5 g) を加えて懸濁液を得た。この懸濁液を氷浴中で 30 分攪拌し、フィルターろ過して採取し、50 °C で終夜減圧乾燥し、淡灰色粉末の $[^{13}\text{C},^{15}\text{N}_2]6\text{-アミノピリミジン-2,4 (1H,3H) -ジオン } ([^{13}\text{C},^{15}\text{N}_2]4)$ (0.867 g, 収率 84%) を得た。

$^1\text{H NMR}$ (DMSO- d_6) δ 4.39 (1H, t, $J = 2.8$ Hz, C5-H) , 6.30 (2H, s, NH_2) , 10.0 (1H, d, $J = 91.6$ Hz, NH) , 10.4 (1H, brs, NH) ; MS (ESI) m/z 131 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 129 $[\text{M}-\text{H}]^-$.

$[^{13}\text{C},^{15}\text{N}_2]4$ (0.861 g, 6.62 mmol) と亜硝酸ナトリウム (502 mg, 7.28 mmol) を 2 M 水酸化ナトリウム水溶液 (NaOH) (9.0 mL) に溶解した。この溶液を氷冷下、氷酢酸 (11.1 mL) に滴下し、得られた紫色の懸濁液を氷冷下で 10 分間攪拌した。沈殿物をろ過して採取し、DW (1 mL \times 3) で洗浄し、40–50 °C で終夜減圧乾燥した。得られた紫色の固体 (1.05 g) を DW (15 mL) に懸濁させ 100 °C に加熱した。亜ジチオン酸ナトリウム (1.87 g, 25.3 mmol) を懸濁液に一部ずつ加えた。紫色が消失した後、懸濁液を冷やし 2 M 硫酸 (6.6 mL, 13.2 mmol) と DW を加えた。懸濁液を終夜攪拌し、沈殿物をろ過して採取し、DW (2 mL \times 3) で洗浄し、45 °C で減圧乾燥し、淡褐色の粉末として $[^{13}\text{C},^{15}\text{N}_2]2$ (1.08 g, 収率 84%) を得た。

$^1\text{H NMR}$ (DMSO- d_6) δ 6.09 (2H, s, NH_2) , 7.8 (3H, brs, NH_2 and NH) , 10.6 (1H, d, $J = 91.3$ Hz, NH) ; MS (ESI) m/z 146 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 144 $[\text{M}-\text{H}]^-$.

$[^{13}\text{C}_2,^{15}\text{N}_2]UA$

1/2 硫酸塩 $[^{13}\text{C},^{15}\text{N}_2]2$ (578 mg, 2.98 mmol) を 1 M 水酸化ナトリウム水溶液 (2.98 mL, 2.98 mmol) で中和し、室温で超音波にかけた。得られたフリー体をろ過して採取し、40 °C で減圧乾燥し、淡灰色の粉末 (368 mg, 2.54 mmol) を得た。 $^1\text{H NMR}$ (DMSO- d_6) δ 2.95 (2H, brs, NH_2) , 5.54 (2H, s, NH_2) , 9.89 (1H, brd, $J = 89.8$ Hz, NH) , 10.3 (1H, dd, $J_1 = 91.1$ Hz, $J_2 = 2.3$ Hz, NH) . フリー体 $[^{13}\text{C},^{15}\text{N}_2]2$ (368 mg, 2.54 mmol) と $[^{13}\text{C}]$ 尿素 (170 mg, 2.8 mmol) を混合し乳鉢中で粉砕し、185 °C で 1 時間攪拌した。得られた混合物に DW (5 mL) 及び 1 M NaOH 水溶液 (9 mL) を加え 90 °C で溶解し、不溶物をろ過した。ろ液に 1 M 塩酸 (HCl) (12 mL) を加えて酸性にし、得られた沈殿物をろ過して採取し、40 °C で減圧乾燥し、淡黄色の粉末として

[¹³C₂,¹⁵N₂]UA (296 mg, 58% yield in two steps) を得た。

¹H NMR (DMSO-d₆) δ 10.5 (1H, s, N7-H), 10.7 (1H, d, *J* = 88.4 Hz, NH), 11.6 (2H, brs, NH×2); HRMS calculated for [C₃¹³C₂H₄N₂¹⁵N₂O₃+H]⁺: *m/z* 173.0364; found: 173.0361 (-1.7 ppm).

[¹³C₂,¹⁵N₂]Xan

1/2 硫酸塩[¹³C,¹⁵N]**2** (0.15 g, 0.773 mmol) に[¹³C]ホルムアミド (0.25 g, 5.41 mmol) を加え 210 °C で 2 時間加熱した。得られた混合物を 90 °C で 1 M 水酸化ナトリウム水溶液 (2.3 mL) に溶解し不溶物をろ過した。ろ液に 1 M 塩酸 (4.6 mL) を 4 °C で加え、得られた沈殿物をろ過して採取し、40 °C で減圧乾燥し、[¹³C₂,¹⁵N₂]Xan を得た。(0.089 g, 74% yield)

¹H NMR (DMSO-d₆) δ 7.93 (1H, d, *J* = 211 Hz, C8-H), 10.8 (1H, d, *J* = 90.1 Hz, NH), 11.5 (1H, d, *J* = 93.8 Hz), 13.3 (1H, s, N7-H); HRMS calculated for [C₃¹³C₂H₄N₂¹⁵N₂O₂+H]⁺: *m/z* 157.0415; found: 157.0412 (-1.9 ppm)

[¹³C,¹⁵N]アセトアミドシアン酢酸エチル ([¹³C,¹⁵N]**1**)

氷冷下、[¹³C]シアン化カリウム (1.00 g, 15.1 mmol) を、クロロ酢酸エチル (2.03 g, 16.6 mmol) と 18-クラウン-6 (200 mg, 0755 mmol) のアセトニトリル (10 mL) 溶液に加えた。混合物を室温で 2 日間攪拌し、フィルターろ過し、MeCN (10 mL) で洗浄した。ろ液を 70 torr、30–35 °C で濃縮し、オイル状の粗生成物[¹³C]**3** (2.52 g) を得た。

¹H NMR (CDCl₃) δ 1.32 (3H, t, *J* = 7.1 Hz, CH₂CH₃), 3.49 (2H, d, *J* = 10.0 Hz, C2-CH₂), 4.27 (2H, q, *J* = 7.1 Hz, CH₂CH₃)

粗[¹³C]**3** (2.52 g) を DW (0.51 mL) に加え、これに氷冷下[¹⁵N]亜硝酸ナトリウム (1.00 g, 14.3 mmol) を添加した。DW (0.55 mL) に酢酸 (948 mg, 15.8 mmol) を混合した液を加え、室温で終夜攪拌した。酢酸エチル (20 mL) と 5%炭酸水素ナトリウム水溶液 (15 mL) を氷冷下で反応液に加えた後、有機層を分離し、水層を酢酸エチル (20 mL × 2) で抽出した。有機層を合わせて無水硫酸ナトリウムで乾燥し、濃縮し、40 °C で減圧乾燥し、粗生成物[¹³C,¹⁵N] シアノ (ヒドロキシイミノ) 酢酸エチル ([¹³C,¹⁵N]**6**) (1.46 g) を得た。

粗[¹³C,¹⁵N]**6** の酢酸 (2.0 mL) 懸濁溶液を、氷浴中窒素気流下 7–15 °C で亜鉛粉末 (3.22 g) を無水酢酸 (3.0 mL) と酢酸 (3.0 mL) の混合溶液に加えた懸濁溶液にゆっくりと加えた。追加の AcOH (1 mL × 2) で粗[¹³C,¹⁵N]**6** の容器を洗った。混合液を室温で終夜攪拌した。その溶液をろ過し、不溶物を酢酸 (4 mL × 2) で洗浄した。その後、不溶物を酢酸 (2 mL) とクロロホルム (5 mL) の混合液に懸濁させ、ろ過した。この洗浄を繰り返し、ろ液を合わせて濃縮した。残渣をクロロホルム (20 mL) に溶解し、5%炭酸水素ナトリウム水溶液 (25 mL) を 5–10 °C で加えた。有機層を分離し、水層をクロロホルム (30 mL × 2) で抽出した。有機層を合わせ、無水硫酸ナトリウムで乾燥させた後濃縮し、白色の固体 (1.62 g) を得た。その固体を酢酸エチル (5 mL) で還流し、最初に 20 °C で 2 時間、続いて 6 °C で 3 日間静置した。得られた結晶をろ過し、40 °C で 3 時間減圧乾燥し、無色の[¹³C,¹⁵N]**1** (755 mg) を得た。ろ液を濃縮し、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (ノルマルヘキサン:酢酸エチル = 2:1) 精製し[¹³C,¹⁵N]**1** (185 mg) を得た。それぞれに得られた[¹³C,¹⁵N]**1** を合わせて、940 mg を得た。[¹³C]シアン化カリウムからの収率は 36% であった。

¹H NMR (CDCl₃) δ 1.37 (3H, t, *J* = 7.1 Hz, CH₂CH₃), 2.12 (3H, d, *J* = 1.5 Hz, CH₃CO), 4.37 (2H,

q, $J = 7.1$ Hz, CH_2CH_3), 5.53 (1H, ddd, $J_1 = 11.6$ Hz, $J_2 = 7.6$ Hz, $J_3 = 1.7$ Hz, C2-H), 6.31 (1H, ddd, $J_1 = 93.4$ Hz, $J_2 = 7.6$ Hz, $J_3 = 0.9$ Hz, NH); MS (ESI) m/z 173 [M+H]⁺, 171 [M-H]⁻.

$[^{13}\text{C}_2, ^{15}\text{N}_3]$ 5,6-ジアミノピリミジン-2,4 (1H,3H) -ジオン 1/2 硫酸塩 ($[^{13}\text{C}_2, ^{15}\text{N}_3]$ 2)

ナトリウムメトキシド (781 mg, 14.5 mmol) を $[^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}]$ 1 (913 mg, 5.31 mmol) と $[^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}_2]$ 尿素 (304 mg, 4.83 mmol) の THF (9 mL) 懸濁液に室温で加えた。この混合物を加熱し、EtOH (2.5 mL) を加え 3 時間還流した。冷却後、沈殿物をろ過し、45 °C で減圧乾燥し、粉末 (1.41 g) を得た。その粉末を 2 M 硫酸 (13 mL) 中で加熱し、100 °C で 10 分間攪拌した。氷浴で冷却後、沈殿物をろ過し、DW で洗浄し、45 °C で減圧乾燥し、 $[^{13}\text{C}_2, ^{15}\text{N}_3]$ 2 を得た。(172 mg, 18% yield): ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ 6.10 (2H, s, NH₂), 7.7 (3H, brs, NH₂ and NH), 10.64 (1H, d, $J = 91.4$ Hz, NH); MS (ESI) m/z 148 [M+H]⁺, 146 [M-H]⁻.

$[^{13}\text{C}_3, ^{15}\text{N}_3]$ UA

1/2 硫酸塩 $[^{13}\text{C}_2, ^{15}\text{N}_3]$ 2 (0.170 g, 0.867 mmol) を $[^{13}\text{C}]$ 尿素 (0.0580 g, 0.954 mmol) と混合し、190 °C で 2 時間攪拌した。得られた混合物を 90 °C で 1 M 水酸化ナトリウム (2.6 mL) に溶解し、ろ過した。ろ液を 4 °C で 1 M 塩酸 (5.3 mL) で酸性にし、得られた沈殿物をろ過して 40 °C で減圧乾燥し、淡灰色の $[^{13}\text{C}_3, ^{15}\text{N}_3]$ UA (0.12 g, 80% yield) を得た。¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ 10.5 (1H, d, $J = 98.8$ Hz, N7-H), 10.7 (1H, d, $J = 88.9$ Hz, NH), 11.6 (2H, brs, NH×2); HRMS calculated for $[\text{C}_2^{13}\text{C}_3\text{H}_4\text{N}^{15}\text{N}_3\text{O}_3+\text{H}]^+$: m/z 175.0368; found: 175.0364 (-2.3 ppm).

第 2 章に関する実験

LC 条件の検討① カラム充填剤の検討

UA、Xan、HX を 40 μ M となるよう 0.1M 水酸化ナトリウムおよび DW で溶解後、LC-HRMS に 5 μ L を注入した。

カラムの種類	
PFP :	ACQUITY CSH fluoro-phenyl, 1.7- μ m, 100 mm \times 1.0 mm i.d. (Waters)
ODS :	ACQUITY CSH C ₁₈ , 1.7- μ m, 100 mm \times 1.0 mm i.d. (Waters)

LC-HRMS 測定条件

カラム温度 : 40 $^{\circ}$ C
サンプル温度 : 5 $^{\circ}$ C
移動相 A : 0.5% AcOH 水溶液
移動相 B : 0.5% AcOH / MeOH
組成 : 95/5 (V/V) アイソクラティック
流速 : 50 μ L/min
アナライザーモード : FTMS
イオン源 : ESI
イオンモード : Positive
スプレー電圧 : 3500 V
トランスファーチューブ温度 : 350 $^{\circ}$ C
シースガス : 40 (arbitrary unit)
オグジュアリーガス : 5 (arbitrary unit)
Mass Range (m/z) : Full Scan 133-400
分解能 : 7500
XIC : UA ; 169.03561
Xan ; 153.04070
HX ; 137.04579
Mass tolerance : \pm 5 ppm

LC 条件の検討② 移動相の種類の見直し

[¹⁵N₂]UA を 40 μM となるよう 0.1M 水酸化ナトリウムおよび DW で溶解後、LC-HRMS に 5 μL を注入した。

移動相の種類	組成
0.5%AcOH 水溶液-0.5%AcOH/MeOH	95/5 (V/V)
0.5%AcOH 水溶液-0.5%AcOH/MeCN	95/5 (V/V)
0.1%FA 水溶液-0.1%FA/MeOH	95/5 (V/V)
0.1%FA 水溶液-0.1%FA/MeCN	95/5 (V/V)
5mM 酢酸アンモニウム水溶液/MeOH	95/5 (V/V)

LC-HRMS 測定条件

カラム :	ACQUITY CSH fluoro-phenyl, 1.7-μm, 100 mm × 1.0 mm i.d. (Waters)
XIC :	[¹⁵ N ₂]UA ; 171.02969

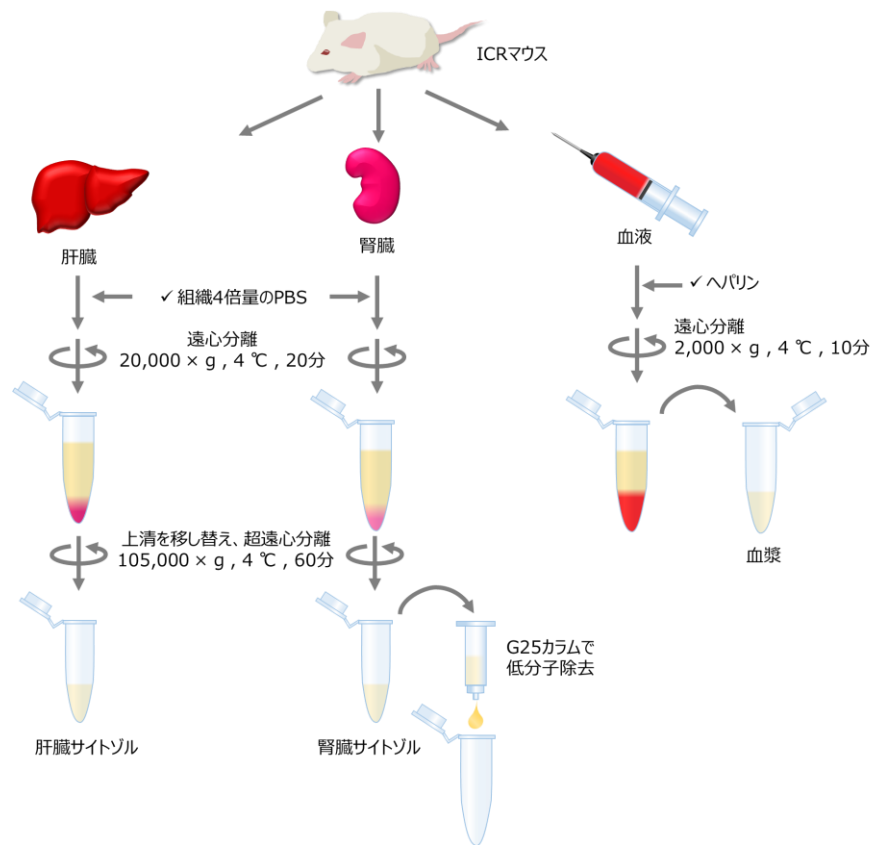
その他の条件は 78 ページに同じ

酵素反応条件および前処理法の検討

酵素反応条件および前処理法の検討において、酵素反応停止、除タンパク操作、LC-HRMS 測定は第 2 章第 4 節第 3 項に記載のマウス試料 XOR 活性測定法標準プロトコールに従って実施した。

動物試料

すべての動物実験は株式会社 三和化学研究所 動物倫理委員会の承認を得た。リタイア ICR マウス、db/m マウスおよび db/db マウスは日本チャールスリバー株式会社(横浜、日本)より入手した。マウスは温度 23 ± 2 °C、12 時間の明暗サイクル (lights on from 7:00 am to 7:00 pm) で管理されたプラスチックケージ中で自由摂餌、摂水下で飼育された。数週間の馴化の後、マウスは 2.5%イソフルラン麻酔下で屠殺し、肝臓、腎臓および血液を採取した。血液は採取後にヘパリンと混合し、2,000 × g、10 分、4 °C で遠心分離し、血漿を得た。肝臓と腎臓はプロテアーゼインヒビターカクテルを混合した 0.1 M PBS (pH 7.5) 中でホモジナイズし、20,000 × g、4 °C で 20 分間遠心分離し、得られた上清を別の容器に移し、105,000 × g、4 °C で 60 分間超遠心分離し、サイトゾルを得た。腎臓サイトゾルは Sephadex G25 カラムの遠心プロトコールに従い精製した。特に記載がない場合、腎臓サイトゾルは G25 処理したものを使用した。タンパク濃度は BCA タンパクアッセイキットを使用した。



基質量の検討

リタイア ICR マウスの肝臓サイトゾル 7.5 μL 、腎臓サイトゾルおよび血漿各 30 μL を 20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl 緩衝液 (TBS; pH 8.5) と混合し、液量を 75 μL に調製した。この酵素液にそれぞれ 12.5, 25, 50, 100, 200, 400, 800, 1600 μM の $^{15}\text{N}_2$ Xan, 1 mM の NAD^+ , および 13.3 μM の KOX を含む溶液を添加し、TBS を加えて総液量を 150 μL に調製した。混合液を 37 $^\circ\text{C}$ で 30 分インキュベートした。

サイトゾル／血漿量の予備検討

肝臓サイトゾル (1.88, 3.75, 7.5 μL)、腎臓サイトゾル (7.5, 12.5, 30 μL)、血漿 (7.5, 12.5, 30 μL) に TBS を添加し、液量を 75 μL に調製した。これらの酵素液を 400 μM の $^{15}\text{N}_2$ Xan, 1 mM の NAD^+ , および 13.3 μM の KOX (いずれも終濃度) を含む TBS 溶液と混合し、TBS で液量を 150 μL に調製した。混合液を 37 $^\circ\text{C}$ で 30 分インキュベートした。

時間およびサイトゾル／血漿量の検討

肝臓サイトゾル (2.5, 1.25, 0.625, 0.313 μL) , 腎臓サイトゾル (20, 10, 5.0, 2.5 μL)、あるいは

は血漿 (60, 30, 15, 7.5 μL) に TBS を添加し、液量を 75 μL に調製した。これらの酵素液を 400 μM の $^{15}\text{N}_2\text{Xan}$, 1 mM の NAD^+ , および 13.3 μM の KOX (いずれも終濃度) を含む TBS 溶液と混合し、TBS で液量を 150 μL に調製した。混合液を 37 $^\circ\text{C}$ で 15 分、30 分、および 60 分インキュベートした。

内在性成分の影響に関する検討

37.5 μL の $^{15}\text{N}_2\text{Xan}$ (終濃度 400 μM) と内在性成分である 37.5 μL の Xan、HX、あるいは UA (終濃度 0, 25, 50, 100, 200, 400, 800, 1600 μM) を混合し、30 μL の腎臓サイトゾル、1 mM の NAD^+ および 13.3 μM の KOX を含む TBS 溶液と混合し、液量を 150 μL に調製した。混合液を 37 $^\circ\text{C}$ で 30 分インキュベートした。

内在性成分を添加しない試料をコントロール試料とし、コントロール試料の $^{15}\text{N}_2\text{UA}$ 産生量を 100% としたときの内在性成分添加試料の相対活性 (%) を算出した。

相対活性 (%) = 内在性成分添加試料の $^{15}\text{N}_2\text{UA}$ 産生量 \div コントロール試料の $^{15}\text{N}_2\text{UA}$ 産生量 $\times 100$

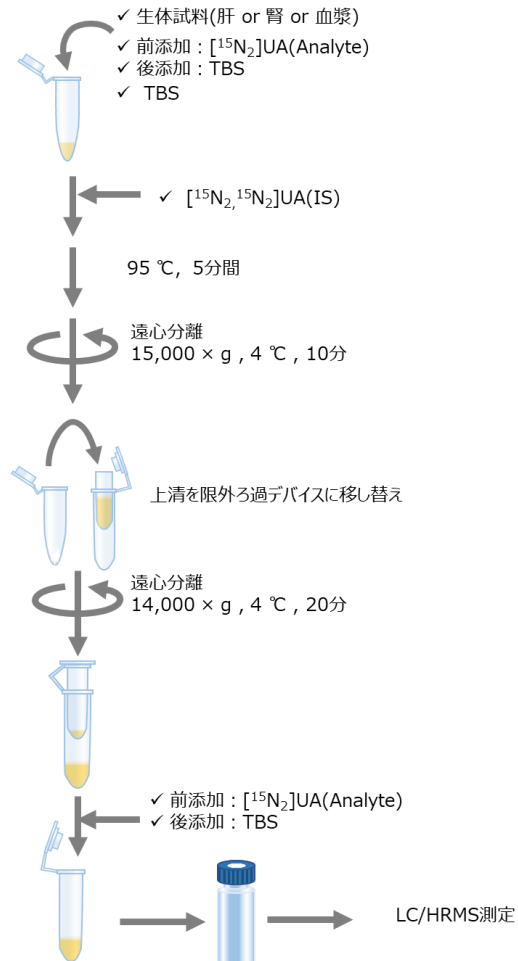
基質 $^{15}\text{N}_2\text{Xan}$ 濃度 ; A (反応液 150 μL 中, μM)	内在性成分濃度 ; B (反応液 150 μL 中, μM)	基質/添加した内在性成分 比率 (A/B)
400	0	コントロール
400	25	16
400	50	8.0
400	100	4.0
400	200	2.0
400	400	1.0
400	800	0.5
400	1600	0.25

回収率

肝臓サイトゾル 1.25 μL 、腎臓サイトゾル 7.5 μL 、あるいは血漿 30 μL を含む 75 μL の TBS 溶液に 66.7 μM の $^{15}\text{N}_2\text{UA}$ を添加した試料を前添加試料とし、 $^{15}\text{N}_2\text{UA}$ の代わりに TBS を同量添加したものを後添加試料とした。前添加/後添加試料を TBS で 150 μL に調製し、200 μM の $^{13}\text{C}_2, ^{15}\text{N}_2\text{UA}$ /TBS 溶液を 50 μL 添加した。この溶液をヒートブロックで 95 $^\circ\text{C}$ 、5 分間加熱した後、15,000 $\times g$ 、4 $^\circ\text{C}$ で 10 分間遠心分離した。上清を限外ろ過フィルターでろ過し、後添加試料のろ液に 66.7 μM の $^{15}\text{N}_2\text{UA}$ を添加した。前添加試料には、 $^{15}\text{N}_2\text{UA}$ の代わりに同

量の TBS を添加した。各試料を LC-HRMS にて測定し、前添加試料と後添加試料の $[^{15}\text{N}_2]\text{UA}/[^{13}\text{C}_2, ^{15}\text{N}_2]\text{UA}$ ピーク面積比から以下の式を用いて回収率を算出した。

$$\text{回収率 (\%)} = \text{前添加試料ピーク面積比} \div \text{後添加試料ピーク面積比} \times 100$$



測定法バリデーション

検量線

検量線用試料を以下の通り調製した。0.667, 2.00, 6.67, 20.0, 66.7, 200 および 667 μM の $^{15}\text{N}_2\text{]UA/TBS}$ 溶液を 150 μL ずつ調製し、ISTD として 200 μM の $^{13}\text{C}_2, ^{15}\text{N}_2\text{]UA/TBS}$ を 50 μL 加え検量線用試料溶液を調製した。 $^{15}\text{N}_2\text{]UA}$ を添加しない試料を 0 濃度ブランク (ST_0)、 $^{15}\text{N}_2\text{]UA}$ および $^{13}\text{C}_2, ^{15}\text{N}_2\text{]UA}$ を添加しない試料をダブルブランク (DB) とした。これらの試料を LC-HRMS にて測定し、得られた $^{15}\text{N}_2\text{]UA}$ と $^{13}\text{C}_2, ^{15}\text{N}_2\text{]UA}$ のピーク面積値からピーク面積比を算出し、 $^{15}\text{N}_2\text{]UA}$ の設定濃度とピーク面積比から、加重最小二乗法による検量線の回帰式 ($Y = aX + b$, Y : ピーク面積, X : 濃度, a : 傾き, b : 切片) を求め、濃度および真度を算出した。 $1/x^2$ の重み付けを採用した。

検量線設定濃度 (150 μL 中, μM)	$^{15}\text{N}_2\text{]UA}$ 絶対量 (150 μL 中, nmol)	MS 注入絶対量 pmol/5 μL
667	100	2500
200	30.0	750
66.7	10.0	250
20.0	3.00	75.0
6.67	1.00	25.0
2.00	0.300	7.50
0.667	0.100	2.50

$$\text{MS 注入量} = [^{13}\text{C}_2, ^{15}\text{N}_2\text{]UA 絶対量} \div 200 \mu\text{L (最終液量)} \times 5 \mu\text{L (注入量)}$$

日内・日間再現性

1.25 μL の肝臓サイトゾル, 7.5 μL の腎臓サイトゾル,あるいは 30 μL の血漿を含む 75 μL の TBS 溶液に 0.667, 6.67, 66.7, or 533 μM (150 μL 中の終濃度) の $^{15}\text{N}_2\text{]UA}$ を添加し、液量を 150 μL に調製した。これらの溶液に 200 μM の $^{13}\text{C}_2, ^{15}\text{N}_2\text{]UA/TBS}$ 溶液を 50 μL 加え、95 $^\circ\text{C}$ のヒートブロックで 5 分間加熱後、15,000 $\times g$ 、4 $^\circ\text{C}$ で 10 分間遠心分離した。ろ液を限外ろ過フィルターでろ過し、LC-MS にて $^{15}\text{N}_2\text{]UA}$ を測定した。同時に測定した $^{15}\text{N}_2\text{]UA}$ 標準試料をもとに検量線を作成し、各試料の $^{15}\text{N}_2\text{]UA}$ 濃度を定量した。各濃度 5 本ずつ調製し、測定した。日間再現性はこれらの測定を 3 日間実施した。個々の算出値から、以下の式を元に平均値、真度、精度を算出した。

<計算式>

真度 (Accuracy)

$$\text{真度 (\%)} = \frac{\text{算出値}}{\text{設定値}} \times 100$$

相対誤差 (RE, 乖離度)

$$\text{乖離度 (\%)} = (\text{真度 (\%)}) - 100$$

精度 (Precision, 変動係数 : CV)

$$\text{精度 (\%)} = \frac{\text{標準偏差}}{\text{平均値}} \times 100$$

バリデーシヨンの判定基準

バリデーシヨンの合格判定基準は、検量線と再現性用 QC 試料の真度が基準値の $100 \pm 15\%$ 以内、(定量下限では $100 \pm 20\%$ 以内)、精度を表す CV 値が 15% 以下 (定量下限では 20% 以下) と設定した。また、活性測定の再現性は精度を表す CV 値が 15% 以下と設定した。

マウス肝臓、腎臓、血漿 XOR 活性測定および他の測定法との比較

試験	内容	使用する試料
比較試験①	LC-MS, LC-UV, LC-FL の比較	ICR マウス 肝臓、腎臓、血漿 (プール) 測定は各 n = 5
比較試験②	LC-MS と LC-FL の相関	db/m マウス 3 匹、db/db マウス 7 匹 肝臓、腎臓サイトゾルおよび血漿 (個体別) 測定は各 n = 1

LC-FL 法 (基質 : プテリン)

1.25 μL 肝サイトゾル、7.5 μL 腎臓サイトゾル、あるいは 30 μL の血漿と、400 μM のプテリン、1 mM メチレンブルーを混合し、TBS で液量を 150 μL に調製し、混合液を 37 $^{\circ}\text{C}$ で 30 分間インキュベートした。反応後、速やかに 95 $^{\circ}\text{C}$ のヒートブロックで 5 分間加熱し、反応を停止させた。加熱処理した懸濁液を 15,000 $\times g$ 、4 $^{\circ}\text{C}$ で 10 分間遠心分離し、上清を限外ろ過膜でろ過し、ろ液を測定用バイアルに移し、以下の測定条件に従い LC/FL にて IXP を測定した。同時に測定した IXP 標準液の結果から検量線を作成し、各試料の IXP 産生量を定量し

た。XOR 活性はタンパク質 1 mg、反応時間 1 分あたりの IXP 産生量 (pmol/min/mg TP) で表記した。

LC-FL 測定条件

装置 : ACQUITY UPLC™ system/FLR detector (Waters)
分析カラム : ACQUITY HSS PFP, 1.8 μm particle size, 100 mm × 1.0 mm i.d. (Waters)
カラム温度 : 50 °C
サンプル温度 : 5 °C
移動相 A : 0.5% AcOH 水溶液
移動相 B : 0.5% AcOH/MeOH
グラジエント min/B% = 0/0, 3.0/3, 3.1/100, 4.0/100, 4.1/0, and 5.0/0.
流速 : 50 μL/min (0–3.0 分), 100 μL/min (3.1–5.0 分)

LC-UV 法 (基質 : Xan)

1.25 μL 肝サイトゾル、7.5 μL 腎臓サイトゾル、あるいは 30 μL の血漿と、400 μM の Xan、1 mM の NAD⁺ および 13.3 nM の KOX を混合し、TBS で液量を 150 μL に調製し、混合液を 37 °C で 30 分間インキュベートした。反応後、速やかに 95 °C のヒートブロックで 5 分間加熱し、反応を停止させた。加熱処理した懸濁液を 15,000 × g、4 °C で 10 分間遠心分離し、上清を限外ろ過膜でろ過し、ろ液を測定用バイアルに移し、以下の測定条件に従い LC/UV にて UA を測定した。また、反応時間 0 分の試料を測定し、得られたピーク面積を、30 分反応後の UA ピーク面積から差し引いた。同時に測定した UA 標準液の結果から検量線を作成し、各試料の UA 産生量を定量した。XOR 活性は総タンパク質量 (TP) 1 mg、反応時間 1 分あたりの UA 産生量 (pmol/min/mg TP) で表記した。

LC-UV 測定条件

装置 : ACQUITY UPLC™ system/PDA detector (Waters)
LC 条件は LC-HRMS に同じ
検出波長 : 290 nm

第 3 章に関する実験

第 4 章に関する実験

ヒト血漿の調製

試験プロトコールは株式会社三和化学研究所 倫理委員会の承認を得た。また、被験者には試験の概要の説明および書面による同意を得た。

血液は 20 名の健康人ボランティアから得た。(男性 14 名, 女性 6 名) 採血管は EDTA-2K 採血管を使用した。得られた血液は 4 °C、2000 × g で 10 分間遠心分離し、血漿を得た。活性の高かった 5 名分の血漿をプールし、酵素条件の検討およびバリデーションに使用した。これらの血液は、特に記載しない限り使用前に Sephadex G25 カラムで精製した。すべての血漿サンプルは使用まで -80 °C の超低温冷凍庫で保管した。

酵素反応条件および前処理法の検討

基質量の検討

ヒト血漿サンプル 100 μL に 0, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8, 12, 16, 20, or 24 μM の [¹³C₂,¹⁵N₂]Xan, 16 μM の NAD⁺, 1 μM の [¹³C₃,¹⁵N₃]UA を混合し、トリス緩衝液で液量を 250 μL に合わせた。混合液を 37 °C で 90 分間インキュベートした。

血漿量および反応時間の検討

血漿量検討のため、50, 75, 100, 150 μL のヒト血漿に 16 μM の [¹³C₂,¹⁵N₂]Xan, 16 μM の NAD⁺, 1 μM の [¹³C₃,¹⁵N₃]UA を混合し、トリス緩衝液で液量を 250 μL に合わせた。混合液を 37 °C で 90 分間インキュベートした。インキュベーション時間検討のため、100 μL のヒト血漿に 16 μM の [¹³C₂,¹⁵N₂]Xan, 16 μM の NAD⁺, 1 μM の [¹³C₃,¹⁵N₃]UA を混合し、トリス緩衝液で液量を 250 μL に合わせた。混合液を 37 °C で 30, 60, 90, 120 分間インキュベートした。反応時間 0 分のサンプルを BG ピーク確認のため調製した。

内在性成分の影響に関する検討

Sephadex G25 カラムで精製し内在性低分子を除去したヒト血漿 100 μL に内在性成分として既知量の Xan、HX、UA (0, 2.5, 5, 10, 20, 40, 80, 160, or 320 μM , 血漿中濃度表記) をそ

れぞれ添加した。次いで、16 μM の $^{13}\text{C}_2, ^{15}\text{N}_2$ Xan, 16 μM の NAD^+ , 1 μM の $^{13}\text{C}_3, ^{15}\text{N}_3$ UA を添加し、トリス緩衝液で液量を 250 μL に合わせた。HX、Xan、UA を添加しない検体をコントロール試料とした。混合液を 37 °C で 90 分間インキュベートした。

内在性成分を添加しない試料をコントロール試料とし、コントロール試料の $^{13}\text{C}_2, ^{15}\text{N}_2$ UA 産生量を 100% としたときの内在性成分添加試料の相対活性 (%) を算出した。

相対活性 (%) = 内在性添加試料の $^{13}\text{C}_2, ^{15}\text{N}_2$ UA 産生量 ÷ コントロール試料 $^{13}\text{C}_2, ^{15}\text{N}_2$ UA 産生量 × 100

基質 $^{13}\text{C}_2, ^{15}\text{N}_2$ Xan 濃度 ; A (血漿 100 μL 中, μM)	内在性成分濃度 ; B (血漿 100 μL 中, μM)	基質/添加した内在性成分 比率 (A/B)
40	0	コントロール
40	2.5	16
40	5	8
40	10	4
40	20	2
40	40	1
40	80	0.5
40	160	0.25
40	320	0.125

採血管中の血液保存安定性

8 名の健常人ボランティア (男性 4 名、女性 4 名) から EDTA-2K 入り採血管を用いて採取した血液を 4 °C で 0, 4, 8, 24, 48, 72 時間放置した。その後、採血管を 4 °C、2,000 × g で 10 分間遠心分離し、血漿を得た。これらの血漿の一部を Sephadex G25 カラムで精製し、G25 処理あり/なしの血漿を各 100 μL 用いて XOR 活性を評価した。血液放置 0 時間の検体の $^{13}\text{C}_2, ^{15}\text{N}_2$ UA 産生量を 100% としたときの各時間の相対活性 (%) を算出した。

さらに、各時間放置後の血漿 (G25 処理なし) 中の HX、Xan、UA 濃度を LC-TQMS にて測定した。

血漿 UA、Xan、HX 測定法

100 μL の血漿サンプルに ISTD として $^{13}\text{C}_2, ^{15}\text{N}_2$ UA, $^{13}\text{C}_2, ^{15}\text{N}_2$ Xan, $^{13}\text{C}_3, ^{15}\text{N}_3$ HX を含む MeOH を 500 μL 添加し、ピペティングで混合した。懸濁液を 4 °C、2,000 × g で 15 分間遠心分離し、上清を別のチューブに移し替え、遠心エバポレーターで濃縮乾固した。残渣に DW を 150 μL を加え、限外ろ過フィルターでろ過し、LC-TQMS にて測定した。UA、Xan、HX の標準液も同様に測定し、得られた Analyte と ISTD のピーク面積値からピーク面積比を

算出し、Analyte の設定濃度とピーク面積比から、加重最小二乗法による検量線の回帰式 ($Y = aX + b$, Y : ピーク面積, X : 濃度, a : 傾き, b : 切片) を求め、濃度を算出した。 $1/x^2$ の重み付けを採用した。

LC-TQMS 測定条件

SRM transition 以外は活性測定法の測定条件に同じ

SRM transition (m/z) :

UA m/z 169 > 141

Xan 153 > 110

HX 137 > 94 and 110

[$^{13}\text{C}_2, ^{15}\text{N}_2$] UA 173 > 144

[$^{13}\text{C}_2, ^{15}\text{N}_2$] Xan 157 > 112 and 139

[$^{13}\text{C}_3, ^{15}\text{N}$] HX 141 > 98 and 113

測定法バリデーション

検量線

検量線用試料を以下の通り調製した。Sephadex G25 で処理したヒトプール血漿 100 μL に段階希釈した既知濃度の $^{13}\text{C}_2, ^{15}\text{N}_2\text{]UA}$ (Analyte) と 1 μM の $^{13}\text{C}_3, ^{15}\text{N}_3\text{]UA}$ (IS) を添加し、トリス緩衝液で液量を 250 μL に調製した。 $^{13}\text{C}_2, ^{15}\text{N}_2\text{]UA}$ を添加しない試料を 0 濃度ブランク (ST_0)、 $^{13}\text{C}_2, ^{15}\text{N}_2\text{]UA}$ および $^{13}\text{C}_3, ^{15}\text{N}_3\text{]UA}$ を添加しない試料をダブルブランク (DB) とした。検量線の設定値は、DB, ST_0, 4, 8, 20, 40, 80, 200, 400, 800, 2000, 4000 nM の 12 ポイントとした。これらの試料に 500 μL の MeOH を添加し、ピペッティングで混合した。4 $^\circ\text{C}$ 、2,000 $\times g$ で 15 分間遠心分離し、上清を別のチューブに移し、遠心エバポレーターで濃縮乾固した。残渣に DW を 150 μL 加え再溶解し、限外ろ過フィルターでろ過し、LC-TQMS にて測定を行った。得られた $^{13}\text{C}_2, ^{15}\text{N}_2\text{]UA}$ と $^{13}\text{C}_3, ^{15}\text{N}_3\text{]UA}$ のピーク面積値から、ピーク面積比を算出し、 $^{13}\text{C}_2, ^{15}\text{N}_2\text{]UA}$ の設定濃度とピーク面積比から、加重最小二乗法による検量線の回帰式 ($Y = aX + b$, Y: ピーク面積, X: 濃度, a: 傾き, b: 切片) を求め、濃度および真度を算出した。 $1/x^2$ の重み付けを採用した。

検量線設定値 (250 μL 中濃度, nM)	$^{13}\text{C}_2, ^{15}\text{N}_2\text{]UA}$ 絶対量 (pmol/sample)	MS 注入量 (pmol/20 μL)
4000	1000	133
2000	500	66.7
800	200	26.7
400	100	13.3
200	50	6.67
80	20	2.67
40	10	1.33
20	5	0.667
8	2	0.267
4	1	0.133

$$\text{MS 注入量} = [^{13}\text{C}_2, ^{15}\text{N}_2\text{]UA 絶対量} \div 150 \mu\text{L (再溶解液量)} \times 20 \mu\text{L (注入量)}$$

日内・日間再現性

Sephadex G25 で処理したヒトプール血漿 100 μL に高濃度・中濃度・低濃度および定量下限濃度として 3200、80、8、4 nM の $^{13}\text{C}_2, ^{15}\text{N}_2\text{]UA}$ を添加した。各濃度 6 本ずつ調製した。これらの試料を検量線と同様に処理し、LC-TQMS で測定した。日間再現性ではこの操作を 3 日間実施した。各試料の $^{13}\text{C}_2, ^{15}\text{N}_2\text{]UA}$ 濃度を求め、個々の算出値から、83 ページの式を元に平均値、真度、精度を算出した。

XOR 活性測定の変現性

確立した XOR 活性測定法の日内・日間再現性を評価した。日内再現性はヒトプール血漿を 100 μL ×6 サンプル用いて最適化条件を用いて XOR 活性測定を実施した。日間再現性はこれを 3 日間実施した。得られた活性値を元に 83 ページの式から精度(%CV)を求めた。

バリデーシヨンの判定基準

バリデーシヨンの合格判定基準は、検量線と再現性用 QC 試料の真度が基準値の $100 \pm 15\%$ 以内、(定量下限では $100 \pm 20\%$ 以内)、精度を表す CV 値が 15% 以下 (定量下限では 20% 以下) と設定した。また、活性測定の変現性は精度を表す CV 値が 15% 以下と設定した。

従来法との比較 : LC-FL 法

健常人 8 名から得た被験者別の血漿を用いて、LC-TQMS 法と LC-FL 法(基質 : プテリン)を比較した。LC-TQMS 法では、第 4 章第 1 節第 4 項に記載のヒト血漿 XOR 活性測定の変準プロトコールに従って 8 人分の血漿 XOR 活性を測定した。また、LC-FL 法は以下の通り実施した。

LC-FL 法

ヒト血漿 100 μL を G25 で処理し、20 μM のプテリンおよび 20 μM のメチレンブルーを添加し、トリス緩衝液で液量を 250 μL に調製した。この混合液を 37 $^{\circ}\text{C}$ で 0 分または 90 分インキュベートした。0 分サンプルは IXP の BG ピークを差し引くためのコントロール試料とした。MeOH を 500 μL 加えてピペッティングで混合し、反応を停止させた。懸濁液を 4 $^{\circ}\text{C}$ 、2,000 $\times\text{g}$ で 15 分間遠心分離し、上清を別のチューブに移し替え、遠心エバポレーターで濃縮乾固した。残渣に DW を 150 μL 加え再溶解し、限外ろ過フィルターでろ過し、85 ページに記載の条件で LC/FL 測定を行った。IXP 標準液を同時に測定し、作成した検量線から検体中の IXP 産生量を求めた。0 分のコントロール試料で検出された IXP 量を、各検体中の IXP 量から差し引き、XOR 活性 (IXP 産生量 pmol/h/mL plasma) を算出した。

健常人血漿の XOR 活性測定および血液性化学検査

確立した XOR 活性測定法の機能性を確認するため、20 名の健常人(男性 14 名、女性 6 名)血漿 XOR 活性を測定した。測定は第 4 章第 1 節第 4 項に記載のヒト血漿 XOR 活性測定の変準プロトコールを用いた。さらに、血液性化学検査として、以下の項目を測定した。測定は

7180 autoanalyzer (Hitachi, Tokyo, Japan) を用いた。

- ✓ alanine transaminase (ALT)
- ✓ aspartate transaminase (AST)
- ✓ UA (UA)
- ✓ total cholesterol (T-Cho)
- ✓ creatinine (Cre)
- ✓ blood urea nitrogen (BUN)

血液性化学検査の結果と、各被験者の XOR 活性を元に相関係数を算出した。

統計解析

データは平均値 ± 標準偏差で示した。統計解析は Prism 6.0 software (GraphPad, La Jolla, CA, USA) を用いた。p < 0.05 の場合、有意差ありとした。

略語一覧

参考文献

1. 厚生労働省. 医薬品産業ビジョン2013. (2013). Available at: http://www.mhlw.go.jp/seisakunitsuite/bunya/kenkou_iryuu/iryuu/shinkou/dl/vision_2013a.pdf.
2. Hay, M., Thomas, D. W., Craighead, J. L., Economides, C. & Rosenthal, J. Clinical development success rates for investigational drugs. *Nat. Biotechnol.* **32**, 40–51 (2014).
3. 創薬A I で50社連合 武田やNEC、新薬探し短縮. 日本経済新聞
4. 厚生労働省. 医薬品産業強化総合戦略 ～グローバル展開を見据えた創薬～ (概要版) . (2015).
5. 水島徹. 創薬が危ない 早く・安く・安全な薬を届けるドラッグ・リポジショニングのすすめ. (講談社, 2015).
6. Matsumoto, K., Okamoto, K., Ashizawa, N. & Nishino, T. FYX-051: a novel and potent hybrid-type inhibitor of xanthine oxidoreductase. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **336**, 95–103 (2011).
7. Morgan, E. J., Stewart, C. P. & Hopkins, F. G. On the Anaerobic and Aerobic Oxidation of Xanthin and Hypoxanthin by Tissues and by Milk. *Proc. R. Soc. London. Ser. B, Contain. Pap. a Biol. Character* **94**, 109–131 (1922).
8. Massey, V. & Harris, C. M. Milk xanthine oxidoreductase: the first one hundred years. *Biochem Soc Trans.* **25**, 750–755 (1997).
9. 金子希代子. 痛風予防のA・B・C. (薬事日報社, 2008).
10. 松澤佑次 (監修) , 下村伊一郎 (編集) & 益崎裕章 (編集) . ここまで明らかになった! 尿酸代謝ワールドと高尿酸血症の病態解明—診療と医学の最前線. (メディカルレビュー社, 2015).
11. Garry, R. C. Note on the Estimation of Uric Acid by the Hopkins-Folin Method. *Biochem. J.* **18**, 913–8 (1924).
12. 大島良雄. 痛風の臨床. 日本内科学会雑誌 **54**, 1–20 (1965).
13. 巖琢也. 痛風: 発作を起こさないための尿酸コントロール. (新星出版社, 2005).
14. 日本痛風・核酸代謝学会ガイドライン改定委員会. 高尿酸血症・痛風の治療ガイドライン 第2版 2012年追補 ダイジェスト版. (2012). Available at: <http://www.tukaku.jp/wp-content/uploads/2013/06/tufu-GL2.pdf>.
15. Yamamoto, T. *et al.* The effect of completely purine-free diet of low sodium content on purine intermediates and end-product. *Eur. J. Clin. Nutr.* **44**, 659–64 (1990).
16. Pillinger, M. H., Rosenthal, P. & Abeles, A. M. Hyperuricemia and gout: New insights into pathogenesis and treatment. *Bull. NYU Hosp. Jt. Dis.* **65**, 215–221 (2007).
17. Wu, X. W., Muzny, D. M., Lee, C. C. & Caskey, C. T. Two independent mutational events in the loss of urate oxidase during hominoid evolution. *J. Mol. Evol.* **34**, 78–84 (1992).
18. Ames, B. N., Cathcart, R., Schwiers, E. & Hochstein, P. Uric acid provides an antioxidant defense in humans against oxidant- and radical-caused aging and cancer: a hypothesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **78**, 6858–6862 (1981).
19. Robins, R. K. Potential Purine Antagonists. I. Synthesis of Some 4,6-Substituted Pyrazolo [3,4-d] pyrimidines. *J. Am. Chem. Soc.* **78**, 784–790 (1956).

20. Elion, G. B. Enzymatic and metabolic studies with allopurinol. *Ann. Rheum. Dis.* **25**, 608–614 (1966).
21. Hosoya, T. *et al.* Effects of topiroxostat on the serum urate levels and urinary albumin excretion in hyperuricemic stage 3 chronic kidney disease patients with or without gout. *Clin. Exp. Nephrol.* **18**, 876–84 (2014).
22. Mizukoshi, T. *et al.* Renoprotective effects of topiroxostat for hyperuremic patients with overt diabetic nephropathy study (ETUDE Study): A prospective, randomized, multicenter clinical trial. *Nephrology* (2017). doi:10.1111/nep.13177
23. Tanaka, K. *et al.* Renoprotective effects of febuxostat in hyperuricemic patients with chronic kidney disease: a parallel-group, randomized, controlled trial. *Clin. Exp. Nephrol.* **19**, 1044–53 (2015).
24. 岡本研 & 西野武士. モリブデンによる水酸化反応中間体の構造と反応機構. *生化学* **80**, 531–539 (2008).
25. 岡本研, 桑原慶充, 西野朋子 & 西野武士. キサンチン脱水素酵素から酸化酵素への蛋白質構造・機能の変換の分子機構 蛋白質のコンフォメーションスイッチとリレー系. *蛋白質 核酸 酵素* **49**, 625–633 (2004).
26. 西野武士. キサンチンオキシダーゼ研究の歴史 第3回. *尿酸と血糖* **2**, 55–59 (2016).
27. Massey, V. & Edmondson, D. On the mechanism of inactivation of xanthine oxidase by cyanide. *J. Biol. Chem.* **245**, 6595–8 (1970).
28. Nishino, T., Itoh, R. & Tsushima, K. Studies on chicken liver xanthine dehydrogenase with reference to the problem of non-equivalence of FAD moieties. *Biochim. Biophys. Acta - Enzymol.* **403**, 17–22 (1975).
29. 西野武士. キサンチンオキシダーゼ研究の歴史 第2回. *尿酸と血糖* **1**, 60–62 (2015).
30. Hille, R. The Mononuclear Molybdenum Enzymes. *Chem. Rev.* **96**, 2757–2816 (1996).
31. Tsushima, Y. *et al.* Uric acid secretion from adipose tissue and its increase in obesity. *J. Biol. Chem.* **288**, 27138–49 (2013).
32. de Jong, J. W. *et al.* Enhanced expression and activity of xanthine oxidoreductase in the failing heart. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **32**, 2083–9 (2000).
33. Moriwaki, Y. *et al.* Purification and immunohistochemical tissue localization of human xanthine oxidase. *Biochim Biophys Acta.* **1164**, 327–330 (1993).
34. Stirpe, F. & Della Corte, E. The regulation of rat liver xanthine oxidase. Conversion in vitro of the enzyme activity from dehydrogenase (type D) to oxidase (type O). *J. Biol. Chem.* **244**, 3855–3863 (1969).
35. Della Corte, E. & Stirpe, F. The regulation of rat-liver xanthine oxidase: Activation by proteolytic enzymes. *FEBS Lett.* **2**, 83–84 (1968).
36. Amaya, Y. *et al.* Proteolytic conversion of xanthine dehydrogenase from the NAD-dependent type to the O₂-dependent type. Amino acid sequence of rat liver xanthine dehydrogenase and identification of the cleavage sites of the enzyme protein during irreversible conversion by. *J. Biol. Chem.* **265**, 14170–14175 (1990).
37. Nishino, T. The conversion of xanthine dehydrogenase to xanthine oxidase and the role of the

- enzyme in reperfusion injury. *J. Biochem.* **116**, 1–6 (1994).
38. Parks, D. A. & Granger, D. N. Ischemia-induced vascular changes: role of xanthine oxidase and hydroxyl radicals. *Am. J. Physiol.* **245**, G285-9 (1983).
 39. McCord, J. M. & Fridovich, I. Superoxide Dismutase AN ENZYMIC FUNCTION FOR ERYTHROCUPREIN (HEMOCUPREIN). *J Biol Chem.* **244**, 6049–6055 (1969).
 40. Granger, D. N., McCord, J. M., Parks, D. A. & Hollwarth, M. E. Xanthine oxidase inhibitors attenuate ischemia-induced vascular permeability changes in the cat intestine. *Gastroenterology* **90**, 80–4 (1986).
 41. Friedl, H. P. *et al.* Ischemia-reperfusion in humans. Appearance of xanthine oxidase activity. *Am. J. Pathol.* **136**, 491–495 (1990).
 42. Majkić-Singh, N., Bogavac, L., Kalimanovska, V., Jelić, Z. & Spasić, S. Spectrophotometric assay of xanthine oxidase with 2,2'-azino-di(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonate) (ABTS) as chromogen. *Clin Chim Acta.* **162**, 29–36 (1987).
 43. Shamma'a, M., Nasrallah, S. & Al-Khalidi, U. Serum xanthine oxidase. An experience with 2000 patients. *Am J Dig Dis.* **18**, 15–22 (1973).
 44. McHale, A., Grimes, H. & Coughlan, M. P. Human serum xanthine oxidase: fluorometric assay applicable to the investigation of liver disorders. *Int J Biochem.* **10**, 317–319 (1979).
 45. Yamamoto, T. *et al.* Determination of human plasma xanthine oxidase activity by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. B.* **681**, 395–400 (1996).
 46. Al-Khalidi, U., Nasrallah, S., Khachadurian, A. & Shammaa, M. A sensitive method for the determination of xanthine oxidase activity. *Clin Chim Acta.* **11**, 72–77 (1965).
 47. Al-Khalidi, U. & Chaglassian, T. The species distribution of xanthine oxidase. *Biochem. J.* **97**, 318–320 (1965).
 48. Cheung, K. J. *et al.* Xanthine Oxidoreductase Is a Regulator of Adipogenesis and PPAR γ Activity. *Cell Metab.* **5**, 115–128 (2007).
 49. Tam, H. K., Kelly, A. S., Metzger, A. M., Steinberger, J. & Johnson, L. A. Xanthine oxidase and cardiovascular risk in obese children. *Child. Obes.* **10**, 175–80 (2014).
 50. Tam, H. K., Kelly, A. S., Fox, C. K., Nathan, B. M. & Johnson, L. A. Weight Loss Mediated Reduction in Xanthine Oxidase Activity and Uric Acid Clearance in Adolescents with Severe Obesity. *Child. Obes.* **12**, 286–291 (2016).
 51. Jarasch, E. D., Bruder, G. & Heid, H. W. Significance of xanthine oxidase in capillary endothelial cells. *Acta Physiol. Scand. Suppl.* **548**, 39–46 (1986).
 52. White, C. R. *et al.* Circulating plasma xanthine oxidase contributes to vascular dysfunction in hypercholesterolemic rabbits. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93**, 8745–8749 (1996).
 53. Spiekermann, S. *et al.* Electron spin resonance characterization of vascular xanthine and NAD(P)H oxidase activity in patients with coronary artery disease: Relation to endothelium-dependent vasodilation. *Circulation* **107**, 1383–1389 (2003).
 54. Landmesser, U. *et al.* Vascular oxidative stress and endothelial dysfunction in patients with chronic heart failure: Role of xanthine-oxidase and extracellular superoxide dismutase. *Circulation* **106**, 3073–3078 (2002).

55. Kushiyama, A. *et al.* Xanthine oxidoreductase is involved in macrophage foam cell formation and atherosclerosis development. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **32**, 291–298 (2012).
56. Aranda, R. *et al.* Age-related increase in xanthine oxidase activity in human plasma and rat tissues. *Free Radic Res* **41**, 1195–1200 (2007).
57. Luchtemberg, M. N. *et al.* Xanthine oxidase activity in patients with sepsis. *Clin. Biochem.* **41**, 1186–1190 (2008).
58. Grum, C. M., Ragsdale, R. a, Ketai, L. H. & Simon, R. H. Plasma xanthine oxidase activity in patients with adult respiratory distress syndrome. *J. Crit. Care* **2**, 22–26 (1987).
59. Boban, M. *et al.* Circulating purine compounds, uric acid, and xanthine oxidase/dehydrogenase relationship in essential hypertension and end stage renal disease. *Ren. Fail.* **36**, 613–8 (2014).
60. Desco, M.-C. *et al.* Xanthine oxidase is involved in free radical production in type 1 diabetes: protection by allopurinol. *Diabetes* **51**, 1118–24 (2002).
61. Kuppusamy, U. R., Indran, M. & Rokiah, P. Glycaemic control in relation to xanthine oxidase and antioxidant indices in Malaysian Type 2 diabetes patients. *Diabet. Med.* **22**, 1343–1346 (2005).
62. Miric, D. J. *et al.* Xanthine Oxidase Activity in Type 2 Diabetes Mellitus Patients with and without Diabetic Peripheral Neuropathy. *J. Diabetes Res.* **2016**, 1–7 (2016).
63. Miric, D. *et al.* The role of xanthine oxidase in hemodialysis-induced oxidative injury: Relationship with nutritional status. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2013**, (2013).
64. Grattagliano, I., Vendemiale, G., Sabbà, C., Buonamico, P. & Altomare, E. Oxidation of circulating proteins in alcoholics: Role of acetaldehyde and xanthine oxidase. *J. Hepatol.* **25**, 28–36 (1996).
65. Pinamonti, S. *et al.* Detection of xanthine oxidase activity products by EPR and HPLC in bronchoalveolar lavage fluid from patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Free Radic Biol Med* **25**, 771–779 (1998).
66. Akyol O *et al.* The activities of purine catabolizing enzymes in plasma and bronchial washing fluid in patients with lung cancer and pneumonia. *Clin. Biochem.* **34**, 251–4 (2001).
67. Akyol, O. *et al.* The incidences of endogenous oxidative and antioxidative processes in plasma from schizophrenic patients. The possible role of oxidant/antioxidant imbalance. *Prog. Neuro. Psychopharmacol. & Biol. Psychiatry* **26**, 995–1005 (2002).
68. Dogowska, B., Bogowski, W. & Domaski, L. Clinical evidence of the association between serum perioperative changes in xanthine metabolizing enzymes activity and early post-transplant kidney allograft function. *J. Am. Coll. Surg.* **211**, 587–595 (2010).
69. Pesonen, E. J. *et al.* Circulating xanthine oxidase and neutrophil activation during human liver transplantation. *Gastroenterology* **114**, 1009–1015 (1998).
70. Honorat, J. A. *et al.* Xanthine Oxidase Mediates Axonal and Myelin Loss in a Murine Model of Multiple Sclerosis. *PLoS One* **8**, 1–9 (2013).
71. Kato, S., Kato, M., Kusano, T. & Nishino, T. New Strategy That Delays Progression of Amyotrophic Lateral Sclerosis in G1H-G93A Transgenic Mice: Oral Administration of Xanthine Oxidoreductase Inhibitors That Are Not Substrates for the Purine Salvage Pathway. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **75**, 1124–1144 (2016).
72. Dixon, M. & Thurlow, S. Studies on Xanthine Oxidase: Preparation and Properties of the Active

- Material. *Biochem J.* **18**, 971–975 (1924).
73. Feigelson, P. The inhibition of xanthine oxidase in vitro by trace amounts of l-ascorbic acid. *J Biol Chem.* **197**, 843–850 (1952).
 74. Haas, E. A colorimetric determination for studies involving coenzymes microdetermination of glucose-6-phosphate. *J. Biol. Chem.* **155**, 333–335 (1944).
 75. Fried, R. & Fried, L. *Methods of enzymatic analysis: Xanthine oxidase (Xanthine dehydrogenase)*. (Academic Press, Inc., 1974).
 76. 中野稔, 浅田浩二 & 大柳善彦. 活性酸素 生物での生成・消去・作用の分子機構. (共立出版, 1996).
 77. Richette, P. *et al.* Weight Loss, Xanthine Oxidase, and Serum Urate Levels: A Prospective Longitudinal Study of Obese Patients. *Arthritis Care Res.* **68**, 1036–1042 (2016).
 78. Horecker, B. & Heppel, L. The reduction of cytochrome c by xanthine oxidase. *J. Biol. Chem.* **178**, 683–690 (1949).
 79. Friedl, H. P., Till, G. O., Trentz, O. & Ward, P. a. Roles of histamine, complement and xanthine oxidase in thermal injury of skin. *Am. J. Pathol.* **135**, 203–217 (1989).
 80. Newaz, M. A. & Adeeb, N. N. Detection of xanthine oxidase in human plasma. *Med. J. Malaysia* **53**, 70–75 (1998).
 81. Sugiura, M., Kato, K., Adachi, T., Ito, Y. & Hirano, K. A new method for the assay of xanthine oxidase activity. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*. **29**, 430–432 (1981).
 82. ThermoFisher, S. Amplex® Red 酵素アッセイ. Available at: <https://www.thermofisher.com/jp/ja/home/brands/molecular-probes/key-molecular-probes-products/amplex-red-enzyme-assays.html>.
 83. Litwack, G., Bothwell, J., Williams, J. J. & Elvehjem, C. A colorimetric assay for xanthine oxidase in rat liver homogenates. *J Biol Chem.* **200**, 303–310 (1953).
 84. Ball, E. Xanthine oxidase: purification and properties. *J. Biol. Chem.* **128**, 51–67 (1939).
 85. Kalckar, H. M. & Shafran, M. Differential spectrophotometry of purine compounds by means of specific enzymes. 1. Determination of hydroxypurine compounds. *J. Biol. Chem.* **167**, 429–443 (1947).
 86. Avis, P. G., Bergel, F. & Bray, R. C. Cellular constituents. The chemistry of xanthine oxidase. Part I. The preparation of a crystalline xanthine oxidase from cow's milk. *J. Chem. Soc.* **0**, 1100 (1955).
 87. Bergel, F. & Bray, R. C. The chemistry of xanthine oxidase. 4. The problems of enzyme inactivation and stabilization. *Biochem J.* **73**, 182–192 (1959).
 88. Bray, R. & Watts, D. The chemistry of xanthine oxidase. Reaction with iodoacetamide. *Biochem. J.* **98**, 142–148 (1966).
 89. Elion, G. B., Kovensky, A., Hitchings, G. H., Metz, E. & Rundles, R. W. Metabolic studies of allopurinol, an inhibitor of xanthine oxidase. *Biochem. Pharmacol.* **15**, 863–880 (1966).
 90. Hashimoto, S. A new spectrophotometric assay method of xanthine oxidase in crude tissue homogenate. *Anal. Biochem.* **62**, 426–435 (1974).
 91. Ramboer, C. R. A sensitive and nonradioactive assay for serum and tissue xanthine oxidase. *J Lab Clin Med.* **74**, 828–835 (1969).

92. Cighetti, G., Del Puppo, M., Andreetta, F. & Kienle, M. G. Xanthine oxidase activity: simultaneous HPLC evaluation of the 'D' and 'O' forms. *Biochem. Int.* **18**, 1211–20 (1989).
93. Tan, S., Gelman, S., Wheat, J. K. & Parks, D. A. Circulating xanthine oxidase in human ischemia reperfusion. *South. Med. J.* **88**, 479–482 (1995).
94. Axelrod, A. E. & Elveejem, C. A. The xanthine oxidase content of rat liver in riboflavin deficiency. The effect of a riboflavin deficiency upon the xanthine oxidase activity of rat liver. *J. Biol. Chem.* **140**, 725–738 (1941).
95. Westerfeld, W. W. & Richert, D. A. A new dietary factor related to xanthine oxidase. *Science* (80-). **109**, 68 (1949).
96. Van Meter, J. & Oleson, J. A modified method of estimation of xanthine oxidase in tissue homogenates. *J Biol Chem.* **187**, 91–95 (1950).
97. Westerfeld, W. & Richert, D. Dietary factors related to liver xanthine oxidase. *J Biol Chem.* **184**, 163–173 (1950).
98. Richert, D. & Westerfeld, W. The relationship of iron to xanthine oxidase. *J Biol Chem.* **209**, 179–189 (1954).
99. Westerfeld, W. W. & Richert, D. The determination of xanthine oxidase in rat liver and intestine. *J. Biol. Chem.* **199**, 393–405 (1952).
100. Fridovich, I. & Handler, P. Xanthine oxidase. III. Sulfite oxidation as an ultra sensitive assay. *J Biol Chem.* **233**, 1578–1580 (1958).
101. Bacila, M. & Villela, G. G. A rapid and sensitive method for the determination of xanthine oxidase activity using the oxygen electrode. *Nature.* **184**, 1394–1395 (1959).
102. Lowry, O., Bessey, O. & Crawford, E. Pterine oxidase. *J. Biol. Chem.* **180**, 399–410 (1949).
103. Burch, H., Combs, A., Lowry, O. & Padilla, A. Effects of riboflavin deficiency and realimentation on flavin enzymes of tissues. *J Biol Chem.* **223**, 29–45 (1956).
104. Sasaoka, T., Kaneda, N. & Nagatsu, T. Highly sensitive assay for xanthine oxidase activity by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *J Chromatogr.* **424**, 392–397 (1988).
105. Beckman, J. S., Parks, D. A., Pearson, J. D., Marshall, P. A. & Freeman, B. A. A sensitive fluorometric assay for measuring xanthine dehydrogenase and oxidase in tissues. *Free Radic. Biol. Med.* **6**, 607–615 (1989).
106. Ultmann, J. E., Feigelson, P. & Harris, S. A method for studying the properties of intracellular and liberated xanthine oxidase. *Anal Biochem.* **10**, 417–423 (1960).
107. Kizaki, H. & Sakurada, T. Simple micro-assay methods for enzymes of purine metabolism. *J. Lab. Clin. Med.* **89**, 1135–1144 (1977).
108. Price, L. J. & Harrison, R. Sensitive enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) for xanthine oxidase. *Biochem. Soc.* **21**, 102S (1993).
109. Sarnesto, A., Linder, N. & Raivio, K. O. Organ distribution and molecular forms of human xanthine dehydrogenase/xanthine oxidase protein. *Lab. Invest.* **74**, 48–56 (1996).
110. Battelli, M. G. *et al.* Determination of xanthine oxidase in human serum by a competitive enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Clin. Chim. Acta* **281**, 147–158 (1999).

111. Booth, V. H. The identity of xanthine oxidase and the Schardinger enzyme. *Biochem. J.* **29**, 1732–1748 (1935).
112. Guilbault, G. G., Kramer, D. N. & Cannon, P. L. Electrochemical Determination of Xanthine Oxidase and Inhibitors. *Anal. Chem.* **36**, 606–610 (1964).
113. Tan, S. *et al.* Physiologic levels of uric acid inhibit xanthine oxidase in human plasma. *Pediatr. Res.* **34**, 303–307 (1993).
114. Dixon, M. & Thurlow, S. Studies on Xanthine Oxidase: The Dynamics of the Oxidase System. *Biochem J.* **18**, 976–988 (1924).
115. Feigelson, P., Davidson, J. & Robins, R. Pyrazolopyrimidines as inhibitors and substrates of xanthine oxidase. *J Biol Chem.* **226**, 993–1000 (1957).
116. Supnet, M. C., David-Cu, R. & Walther, F. J. Plasma Xanthine Oxidase Activity and Lipid Hydroperoxide Levels in Preterm Infants. *Pediatr. Res.* **36**, 283–287 (1994).
117. Martinez-Hervas, S. *et al.* Increased plasma xanthine oxidase activity is related to nuclear factor kappa beta activation and inflammatory markers in familial combined hyperlipidemia. *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.* **20**, 734–739 (2010).
118. Caliceti, C., Calabria, D. & Roda, A. A new sensitive and quantitative chemiluminescent assay to monitor intracellular xanthine oxidase activity for rapid screening of inhibitors in living endothelial cells. *Anal. Bioanal. Chem.* **408**, 8755–8760 (2016).
119. Waud, W. R. & Rajagopalan, K. V. Purification and properties of the NAD⁺-dependent (type D) and O₂-dependent (type O) forms of rat liver xanthine dehydrogenase. *Arch. Biochem. Biophys.* **172**, 354–364 (1976).
120. Liu, X. *et al.* Improved method for measurement of human plasma xanthine oxidoreductase activity. *J. Chromatogr. B Biomed. Appl.* **785**, 101–114 (2003).
121. Haining, J. L. & Legan, J. S. Fluorometric assay for xanthine oxidase. *Anal Biochem* **21**, 337–343 (1967).
122. Hasan, N. M. Effect of Anesthesia and Hypoxia - Reoxygenation on Xanthine Oxidase Levels in Mouse Brain and Plasma. **3**, 121–125 (2011).
123. Dougherty, T. M. A sensitive assay for xanthine oxidase using commercially available [¹⁴C]xanthine. *Anal. Biochem.* **74**, 604–608 (1976).
124. Mousson, B., Desjacques, P. & Baltassat, P. Measurement of xanthine oxidase activity in some human tissues. An optimized method. *Enzyme* **29**, 32–43 (1983).
125. Battelli, M. G. *et al.* Excitotoxic increase of xanthine dehydrogenase and xanthine oxidase in the rat olfactory cortex. *Dev. Brain Res.* **86**, 340–344 (1995).
126. Stevens, C. R. *et al.* Localisation of xanthine oxidase to synovial endothelium. *Ann Rheum Dis.* **50**, 760–762 (1991).
127. 志田保夫, 黒野定, 高橋利枝, 笠間健嗣 & 高山光男. これならわかるマスマススペクトロメトリー. (化学同人, 2001).
128. Comisarow, M. B. & Marshall, A. G. Fourier transform ion cyclotron resonance spectroscopy. *Chem. Phys. Lett.* **25**, 282–283 (1974).
129. Makarov, A. Electrostatic axially harmonic orbital trapping: A high-performance technique of mass

- analysis. *Anal. Chem.* **72**, 1156–1162 (2000).
130. Makarov, A., Denisov, E., Lange, O. & Horning, S. Dynamic Range of Mass Accuracy in LTQ Orbitrap Hybrid Mass Spectrometer. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **17**, 977–982 (2006).
 131. Makarov, A. *et al.* Performance evaluation of a hybrid linear ion trap/orbitrap mass spectrometer. *Anal. Chem.* **78**, 2113–2120 (2006).
 132. 坂本茂. Orbitrap質量分析計の装置と性能. *Tms研究* **3**, 59–66 (2010).
 133. *LC Café*. (株) 資生堂, フロンティアサイエンス事業部 **11**, (2010).
 134. Gayden, R. H., Watts, B. A., Beach, R. E. & Benedict, C. R. Quantitation of adenosine, inosine and hypoxanthine in biological samples by microbore-column isocratic high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.* **536**, 265–72 (1991).
 135. Cai, Z., Song, F. & Yang, M. S. Capillary liquid chromatographic-high-resolution mass spectrometric analysis of ribonucleotides. *J. Chromatogr. A* **976**, 135–43 (2002).
 136. Cordell, R. L., Hill, S. J., Ortori, C. A. & Barrett, D. A. Quantitative profiling of nucleotides and related phosphate-containing metabolites in cultured mammalian cells by liquid chromatography tandem electrospray mass spectrometry. *J. Chromatogr. B* **871**, 115–124 (2008).
 137. Alpert, A. J. Hydrophilic-interaction chromatography for the separation of peptides, nucleic acids and other polar compounds. *J. Chromatogr.* **499**, 177–96 (1990).
 138. Kawachi, Y. *et al.* Chromatographic characterization of hydrophilic interaction liquid chromatography stationary phases: hydrophilicity, charge effects, structural selectivity, and separation efficiency. *J. Chromatogr. A* **1218**, 5903–19 (2011).
 139. 中村洋. LC/MS, LC/MS/MSの基礎と応用. in (ed. 公益社団法人 日本分析化学会) (オーム社, 2016).
 140. Peifer, S., Schneider, K., Nürenberg, G., Volmer, D. A. & Heinzle, E. Quantitation of intracellular purine intermediates in different Corynebacteria using electrospray LC-MS/MS. *Anal. Bioanal. Chem.* **404**, 2295–2305 (2012).
 141. 中村洋. 分析試料前処理ハンドブック. (丸善, 2003).
 142. Matuszewski, B. K., Constanzer, M. L. & Chavez-Eng, C. M. Strategies for the assessment of matrix effect in quantitative bioanalytical methods based on HPLC-MS/MS. *Anal. Chem.* **75**, 3019–3030 (2003).
 143. Saugstad, O. D. Hypoxanthine as an indicator of hypoxia: its role in health and disease through free radical production. *Pediatr Res* **23**, 143–150 (1988).
 144. Jorgensen, S. & Poulsen, H. E. Enzymic determination of hypoxanthine and xanthine in human plasma and urine. *Acta Pharmacol. Toxicol. (Copenh)*. **11**, 223–43 (1955).
 145. Wung, W. E. & Howell, S. B. Simultaneous liquid chromatography of 5-fluorouracil, uridine, hypoxanthine, xanthine, uric acid, allopurinol, and oxipurinol in plasma. *Clin. Chem.* **26**, 1704–8 (1980).
 146. Bouliou, R., Bory, C., Baltassat, P. & Gonnet, C. Hypoxanthine and xanthine levels determined by high-performance liquid chromatography in plasma, erythrocyte, and urine samples from healthy subjects: the problem of hypoxanthine level evolution as a function of time. *Anal. Biochem.* **129**, 398–404 (1983).

147. Hiroshige, K., Takasugi, M., Yuu, K. & Kuroiwa, A. Studies on the purine-pyrimidine metabolism (2) - Effects of sample preparation and diet on the concentrations of oxypurines in blood and urine. *J. UOEH* **16**, 167–178 (1994).
148. Kamijo-Ikemori, A. *et al.* Renoprotective effect of the xanthine oxidoreductase inhibitor topiroxostat on adenine-induced renal injury. *Am. J. Physiol. - Ren. Physiol.* **310**, F1366-76 (2016).
149. Nakamura, T. *et al.* Effects of topiroxostat and febuxostat on urinary albumin excretion and plasma xanthine oxidoreductase activity in db/db mice. *Eur. J. Pharmacol.* **780**, (2016).
150. Ohata, K. *et al.* Renoprotective effect of the xanthine oxidoreductase inhibitor Topiroxostat under decreased angiotensin II type 1 a receptor expression. *Eur. J. Pharmacol.* **815**, 88–97 (2017).
151. Otaki, Y. *et al.* Association of plasma xanthine oxidoreductase activity with severity and clinical outcome in patients with chronic heart failure. *Int. J. Cardiol.* **228**, 151–157 (2017).
152. Fujimura, Y. *et al.* Relationship between plasma xanthine oxidoreductase activity and left ventricular ejection fraction and hypertrophy among cardiac patients. *PLoS One* **12**, e0182699 (2017).
153. Washio, K. W. *et al.* Xanthine oxidoreductase activity is correlated with insulin resistance and subclinical inflammation in young humans. *Metabolism.* **70**, 51–56 (2017).
154. Nakatani, A. *et al.* Xanthine oxidoreductase activity is associated with serum uric acid and glycemic control in hemodialysis patients. *Sci. Rep.* **7**, 15416 (2017).

謝辭

本学位論文は、以下の基礎論文をもとに作成されたものである。

基礎論文

1. **Murase T**, Nampei M, Oka M, et al. Xanthine oxidoreductase activity assay in tissues using stable isotope-labeled substrate and liquid chromatography high-resolution mass spectrometry. *J Chromatogr B Anal Technol Biomed Life Sci*. 2016;1008:189-197.
2. **Murase T**, Oka M, Nampei M, Miyachi A, Nakamura T. A highly sensitive assay for xanthine oxidoreductase activity using a combination of [¹³C₂, ¹⁵N₂]xanthine and liquid chromatography/triple quadrupole mass spectrometry. *J Label Compd Radiopharm*. 2016;59(5):214-220.
3. **Murase T**, Nampei M, Oka M, Miyachi A, Nakamura T. A highly sensitive assay of human plasma xanthine oxidoreductase activity using stable isotope-labeled xanthine and LC/TQMS. *J Chromatogr B Anal Technol Biomed Life Sci*. 2016;1039:51-58.