

博士論文

逆相 LC/ICP-MS の開発による
有機化合物の高感度元素特異的検出と
金属タグ化試薬を使った高感度アミノ酸分析

岩畑 大悟

目次

| | |
|--|-------|
| 略語表 | ・・・4 |
| 第一章 緒言 | ・・・7 |
| 第二章 逆相 LC/ICP-MS による有機化合物の高感度元素特異的検出法の開発 | |
| 2-1 序論 | ・・・10 |
| 2-2 LC/ICP-MS による元素特異的分析 | |
| 2-2-1 ICP-MS の歴史 | ・・・11 |
| 2-2-2 ICP-MS の構造と特徴 | ・・・12 |
| 2-2-3 LC/ICP-MS による化学種別元素特異的分析 | ・・・20 |
| 2-3 逆相 LC/ICP-MS 用インターフェイスの開発 | |
| 2-3-1 逆相 LC/ICP-MS の課題 | ・・・22 |
| 2-3-2 ICP-MS への有機溶媒導入検討 | ・・・23 |
| 2-3-3 有機溶媒導入に向け低流速/高効率ネブライザの開発 | ・・・27 |
| 2-3-4 有機溶媒導入に向けた気化室容積の最適化 | ・・・31 |
| 2-3-5 逆相 LC/ICP-MS 用インターフェイスの性能評価 | ・・・34 |
| 2-4 新規インターフェイスを用いた逆相 LC/ICP-MS によるアプリケーション | |
| 2-4-1 逆相 LC/ICP-MS による有機化合物の特異的検出 | ・・・36 |
| 2-4-2 逆相 LC/ICP-MS を使ったリン化合物の分析 | ・・・37 |
| 2-4-3 逆相 LC/ICP-MS を使った含硫アミノ酸の分析 | ・・・43 |
| 第三章 金属タグ化試薬を使った高感度アミノ酸分析法の開発 | |
| 3-1 序論 | ・・・49 |
| 3-2 金属タグ化試薬の開発 | |
| 3-2-1 金属タグ化試薬の歴史 | ・・・52 |
| 3-2-2 金属タグ化試薬の性質と用途 | ・・・54 |
| 3-2-3 アミノ酸分析用金属タグ化試薬の開発 | ・・・56 |

| | |
|--------------------------------------|------|
| 3-3 金属タグ化試薬を使った高感度アミノ酸分析法の確立 | |
| 3-3-1 金属タグ化試薬によるアミノ酸の誘導体化条件の検討 | …61 |
| 3-3-2 LC/ICP-MS による金属タグ化アミノ酸の検出 | …62 |
| 3-3-3 金属タグ化分析法によるアミノ酸の分析バリデーション | …65 |
| 3-3-4 アミノ酸分析用金属タグ化試薬の改良 | …68 |
| 3-3-5 新規アミノ酸分析用金属タグ化試薬によるアミノ酸分析条件の確立 | …71 |
| 3-3-6 EDTA 構造を持つ金属タグ化試薬の検討 | …75 |
| | |
| 第四章 iPS 細胞およびショウジョウバエ中の遊離アミノ酸分析 | |
| 4-1 序 論 | …77 |
| 4-2 iPS 細胞中の遊離アミノ酸分析 | |
| 4-2-1 iPS 細胞を使った再生医療研究での課題 | …80 |
| 4-2-2 iPS 細胞中の遊離アミノ酸分析 | …80 |
| 4-3 ショウジョウバエ 1 個体中の遊離アミノ酸分析 | |
| 4-3-1 ショウジョウバエ研究における高感度分析法の重要性 | …85 |
| 4-3-2 ショウジョウバエ 1 個体中の遊離アミノ酸分析 | …86 |
| 4-3-3 性差によるショウジョウバエ中遊離アミノ酸量の変化 | …88 |
| 4-3-4 食性の違いによるショウジョウバエ中遊離アミノ酸量の変化 | …89 |
| 4-3-5 ライフサイクルにおけるショウジョウバエ中遊離アミノ酸量の変化 | …91 |
| 4-3-6 遺伝子変異によるショウジョウバエ中遊離アミノ酸量の変化 | …92 |
| | |
| 第五章 総 括 | …96 |
| | |
| 実験の部 | …97 |
| | |
| 引用文献 | …109 |

| | |
|--------|--------|
| 取得特許 | ・・・120 |
| 学会受賞一覧 | ・・・121 |
| 謝 辞 | ・・・122 |

略語表

| | |
|-----------------|--|
| AAS | atomic absorption spectrometry 原子吸光分析法 |
| AES | atomic emission spectrometry 原子発光分析法 |
| Ala | alanine アラニン |
| Ala-Gln | alanyl- <i>L</i> -glutamine アラニルグルタミン |
| ALS | amyotrophic lateral sclerosis 筋萎縮性側索硬化症 |
| Ans | anseine アンセリン |
| APDS | 3-aminopyridyl- <i>N</i> -hydroxysuccinimidylcarbamate |
| Ar | argon アルゴン |
| Arg | arginine アルギニン |
| Asn | asparagine アスパラギン |
| Asp | aspartic acid アスパラギン酸 |
| Au | gold 金 |
| BCAA | blanched chain amino acid |
| BCRS | bis (2,2'-bipyridine)-4'-methyl-4-carboxybipyridine-ruthenium <i>N</i> -succinimidyl ester |
| ¹² C | carbon 炭素(質量数 12 の安定同位体) |
| ¹³ C | carbon 炭素(質量数 13 の安定同位体) |
| Car | carnosine カルノシン |
| cps | count(s) per second カウント毎秒 |
| Cys | cysteine システイン |
| DOTA | 1,4,7,10-tetraazacyclododecane- <i>N, N', N'', N'''</i> -tetraacetic acid |
| DTPA | diethylene triamine pentaacetic acid |
| ECRS | bis (ethylenediamine)-4'-methyl-4-carboxybipyridine-ruthenium <i>N</i> -succinimidyl ester |
| EDTA | ethylenediaminetetraacetic acid エチレンジアミン四酢酸 |
| ES | embryonic stem cell 胚性幹細胞 |
| ESI | electrospray ionization エレクトロスプレーイオン化法 |
| Eu | europium ユーロピウム |
| F | fluorine フッ素 |
| FBS | fetal bovine serum ウシ胎児血清 |
| FDA | Food and Drug Administration 米国食品医薬品局 |
| Fe | iron 鉄 |
| FGF-2 | fibroblast growth factor - 2 繊維芽細胞増殖因子 - 2 |
| GC | gas chromatography ガスクロマトグラフィー |

| | |
|-----------|---|
| GLP | good laboratory practice 優良試験所基準 |
| Glu | glutamic acid グルタミン酸 |
| Gly | glycine グリシン |
| H | hydrogen 水素 |
| He | helium ヘリウム |
| HEN | high efficiency nebulizer 高効率型ネブライザ |
| Hg | mercury 水銀 |
| HILIC | hydrophilic interaction chromatography 親水性相互作用クロマトグラフィー |
| His | histidine ヒスチジン |
| IC | ion chromatography イオンクロマトグラフィー |
| ICP-AES | inductively coupled plasma atomic emission spectrometry 誘導結合プラズマ発光分析装置 |
| ICP-MS | inductively coupled plasma mass spectrometry 誘導結合プラズマ質量分析装置 |
| IgG | immunoglobulin G 免疫グロブリン G |
| Ile | isoleucine イソロイシン |
| In | indium インジウム |
| iPS | induced pluripotent stem cells 人工多能性幹細胞 |
| LC | liquid chromatography 液体クロマトグラフィー |
| LC/ICP-MS | liquid chromatography / inductively coupled plasma mass spectrometry 液体クロマトグラフィー / 誘導結合プラズマ質量分析装置 |
| LC-MS | liquid chromatography - mass spectrometry 液体クロマトグラフィー - 質量分析装置 |
| Leu | leucine ロイシン |
| Li | lithium リチウム |
| lipT2 | lipoyl transferase T2 リポイルトランスフェラーゼ T2 |
| Lys | lysine リジン |
| MCAT | metal coded affinity tag 差異的金属コード化アフィニティータグ |
| Met | methionine メチオニン |
| MS | mass spectrometry 質量分析装置 |
| MS/MS | tandem mass spectrometer タンデム質量分析装置 |
| N | nitrogen 窒素 |
| Na | sodium ナトリウム |
| PAPS | (<i>N</i> -propyl- <i>N</i> -sulphopropyl) amino phenol |

| | |
|-----------|--|
| O | oxygen 酸素 |
| ODS | octadecylsilyl オクタデシルシリル基 |
| OPA | o-phthalaldehyde |
| PEEK | polyetheretherketone ポリエーテルケトン |
| Phe | phenylalanine フェニルアラニン |
| Pro | proline プロリン |
| QTOF | quadrupole Time-of-Flight 四重極飛行時間型 |
| Ru | ruthenium ルテニウム |
| SEC | size Exclusion Chromatography サイズ排除クロマトグラフィー |
| SAM | self-assembled monolayers 自己組織化単分子膜 |
| Ser | serine セリン |
| Sn | tin スズ |
| S/N | signal-noise ratio シグナル雑音比 |
| TCA Cycle | tricarboxylic acid cycle クエン酸回路 |
| Thr | threonine トレオニン/スレオニン |
| Tl | thallium タリウム |
| Trp | tryptophan トリプトファン |
| Tyr | tyrosine チロシン |
| UV | ultraviolet 紫外線 |
| UV-VIS | ultraviolet-visible 紫外-可視(分光装置) |
| Val | valine バリン |
| Zn | zinc 亜鉛 |

第一章 緒言

バイオロジーを含むサイエンス一般において、高感度で選択的な分析法は研究の基盤として最も重要な要素の 1 つである。例えば生体試料中の微量なタンパク質や代謝物の分析では、質量分析法や蛍光検出法などの分析法が高感度化を推進し、誘導体化やクロマトグラフィーの工夫が選択性を向上させ、今日のプロテオミクス研究やメタボロミクス研究の発展につながった。このように、より高感度で選択的な新しい分析法を開発することは、新たな研究を開拓する大きな可能性を秘めている。そして分析法開発の歴史は、この高感度化と選択性向上の連続であった。

代表的な生体内代謝物の 1 つであるアミノ酸は、タンパク質を構成する栄養素や代謝反応の制御物質、神経伝達物質としての役割等、重要な機能を有しており、生体内の濃度を測定する意義が非常に高い。しかし生体内アミノ酸は、血漿中の濃度を例に出すと、 $\mu\text{ mol/L}$ 程度と存外に低濃度に保たれている。またタンパク質を構成する 20 種類以外に自然界では 700 種類以上見つかり、類縁体なども含めれば代謝物の中で最も多くの群を形成するほど種類が多い。化学的性質もよく似ており、どのアミノ酸も非常に親水性が高く、ほとんどのアミノ酸は可視光もしくは紫外光の特徴的な吸収スペクトルを持っていない。これらの特徴のため、各アミノ酸を分離・分析するためには多くの課題を解決しなくてはならなかった。

アミノ酸分析の歴史は、1806 年にフランスの化学者である Louis Nicolas Vauquelin と Pierre Jean Robiquet によって、Asn がアスパラガスから発見・単離されたことに始まる[1]。当初はアミノ酸という存在に対する理解も実験データも十分ではなく、Asn の認知は世間に広がらなかったが、その後、尿結石から Cys、ゼラチンから Gly、筋肉や羊毛から Leu と、徐々に他のアミノ酸が発見され、1930 年代にタンパク質を構成するアミノ酸が全て見つかり、一般にも認知されるようになった。

アミノ酸分析の高感度化は分析機器の使用が可能になってから発達した。1941 年にイギリスの生化学者である Archer John Porter Martin と Richard Laurence Millington Syngé はペーパークロマトグラフィーを用いることで高い分離能を獲得し、アミノ酸を分離することに成功した[2]。その後 1958 年には、Rockefeller 研究所の Stanford Moore と William Stein、そして Darryl Spackman が、陽イオン交換樹脂で分離した後にニンヒドリン試薬と反応させて検出する、ポストカラム誘導体化型の全自動アミノ酸分析装置(アミノ酸アナライザ)を開発した[3]。このアミノ酸アナライザは 1~2% という高い分析精度が得られるため、現在も同一原理の装置がアミノ酸分析の主流として用いられている。ただし、ニンヒドリンによる検出法の定量濃度は mmol/L レベル(1 nmol/injection) であり、現在の生命科学研究をけん引するのに十分な分析性能を持っているとは言えない。このため、より高感度な分析法としてニンヒドリン検出の代わりに蛍光検出法、近年ではさらに高感度なアミノ酸分析法として、検出器に MS を用いた LC-MS 法が開発され、試料溶液中に 1 pmol 以上含まれるほとんどのアミノ酸を一度に定量することが

可能となった[4, 5]。

ところが最先端の生命科学研究では、高感度な LC-MS 法でも難しい、10 μ L 以下の微量かつ 1 nmol/L 以下の低濃度での分析が求められている。例えば、ヒト疾患モデルとして使われるショウジョウバエは、体液量が約 1 μ L、体内の遊離アミノ酸量は数 nmol 以下[6]と考えられているため、HPLC 蛍光分析法では 100 個体程度集めても検出することが難しい。また最近注目されているヒト iPS 細胞を含む幹細胞を使った再生医療分野でも、1 fmol 以下の超高感度分析法が必要となっている。

iPS 細胞を含む幹細胞研究では、再生医療の実現に向けて培養条件の検討が盛んに行われているが、培養液の組成から混合の手順等、多条件を試す必要性から 96 ウェルプレート以下の小スケールでの実験が切望されている。特に、これから再生医療研究で盛んになると考えられている分化用培養液の開発では、細胞培養に必要な実験手順が非常に多岐に渡るため、小スケールでの培養系は必須である。その結果として、アミノ酸分析の検出感度はプレカラム誘導体化/LC-MS 法の検出限界を超える nmol/L レベルの超高感度が要求されている。

このように超高感度な分析性能が要求される中、新たな超高感度検出器の 1 つとして、無機元素分析装置の ICP-MS が注目されるようになってきている[7, 8]。

ICP-MS は LC-MS と同様に MS を検出器として持つ分析装置であるが、イオン化源として ESI の代わりに高温・高エネルギーな Ar の ICP を利用している。この ICP は非常に効率の高いイオン化源であり、夾雑物も含めて試料中のほとんどの化合物をイオン化することができる[9, 10]。このため ICP-MS は低濃度領域での検出感度と定量精度が高く、その検出限界濃度は最も高感度な元素は 1 pg/L (\equiv fmol/L = 10^{-15} mol/L) に達する。すなわち装置への導入量を 1 μ L とした場合、 10^{-21} mol の物質が検出できることになり、アミノ酸分析に応用することができれば、既存のアミノ酸アナライザに比べ、計算上は 1,000,000 倍以上の高感度化が可能になる。

一方で ICP-MS は高感度な分析装置ではあるが、無機元素分析装置のため、通常は有機化合物であるアミノ酸を分析することができない。ICP-MS に試料としてアミノ酸を導入した場合、アミノ酸はアルゴンプラズマ中で構成元素である C、H、O、N (含硫アミノ酸はさらに S) の各原子に分解され、それぞれの質量に応じた一価のプラスイオンが生成される。ここで、多量に生成される炭素イオン、水素イオン、窒素イオン、酸素イオンのいずれかを検出すればアミノ酸の高感度分析が可能であるが、実際には大気中には多量に存在する窒素と酸素、二酸化炭素、さらに試料溶液中の水由来のイオンが膨大なバックグラウンドとして検出されてしまう。結果としてアミノ酸由来のイオンは検出できないため、ICP-MS では、C、H、O、N で構成される有機化合物を分析することは不可能である。そこで、ICP-MS でアミノ酸を検出するためには、ICP-MS で検出可能な金属をアミノ酸に結合させる必要がある[11]。

本研究では、金属を含有する誘導体化試薬(金属タグ化試薬)をアミノ酸と反応させ、

誘導体化物中の金属を ICP-MS で検出することで、分析対象のアミノ酸を高感度に分析する、全く新しい検出原理の分析法を開発することにした。そして、この「無機元素分析装置で有機化合物であるアミノ酸を分析する」というユニークな発想のもと、これまでに世間で報告された例の無い「アミノ酸分析用の金属タグ化試薬」をデザインし、合成した(特許番号 4835036:有機化合物の高感度検出方法およびそれに用いる装置)。

また、誘導体化した金属タグ化アミノ酸を個別に分離・検出するための装置として、有機溶媒が導入できる ICP-MS インターフェイスを備えた逆相型 LC/ICP-MS システム(特許番号:4815915:誘導結合プラズマ分析法およびそのための装置)も開発した。

開発した金属タグ化試薬と逆相型 LC/ICP-MS により、アミノ酸標品を使ってアミノ酸が高感度で検出/定量できることが確認できた。さらにこの新しい分析法を使い、ショウジョウバエ1個体中の遊離アミノ酸の定量と、iPS 細胞抽出液中のアミノ酸分析に成功した。

第二章 逆相 LC/ICP-MS による有機化合物の高感度元素特異的検出法の開発

2-1 序 論

多量の夾雑成分を含む微量試料から低濃度の化合物を分析するためには、高い分離能と検出感度が必要である。本研究では微量の生体試料中に含まれる有機化合物やアミノ酸を測定するために、LC/ICP-MS を使った新しい高感度分析法を開発することを目標としているが、そのためには高分離能の逆相クロマトグラフィー[12]で物質を分離した後、高感度な ICP-MS で化合物を検出する装置が最適である[13]と考えられる。しかし、通常 ICP-MS は導入できる溶媒に制限があり、特に逆相クロマトグラフィーで使うアセトニトリルやメタノールの使用が困難である[14, 15]。

LC と ICP-MS の結合自体は配管や LC の接続等の基礎知識があれば容易である。このため 1979 年には Maessen らによって LC と ICP-AES との結合例が報告されており、化合物の化学種や化学形態別情報が得られると期待された。ところが現実には、SEC や IC と ICP-MS の結合は盛んに行われてきたが[16-19]、逆相クロマトグラフィーとの結合は、ICP-MS に使える移動相が制限されることにより、ほとんど行われてこなかった。一般的に、ICP-MS は 5~10 %程度のメタノール濃度からアルゴンプラズマの不安定化が生じてしまうため、高濃度の有機溶媒を移動相として使用する逆相クロマトグラフィーとは、著名な ICP 研究者による教科書や総説でも ICP との結合が困難とされてきた[9, 10, 13, 14, 21]。

ICP-MS に高濃度の有機溶媒を導入できない理由は、まず有機溶媒の導入によってプラズマが不安定化し、場合によっては消灯してしまう点にある。このため逆相 LC/ICP-MS を使って分析を行うためには、有機溶媒導入時でもプラズマを安定化させる工夫が必要で、新たに逆相クロマトグラフィーと ICP-MS を連結する試料導入インターフェイスを開発しなくてはならない。このため過去の報告では、①プラズマトーチインジェクターの内径を細径化して試料導入量を削減する方法[16]、②脱溶媒機器を接続して有機溶媒を除去する方法[22]、③酸素ガス導入によってプラズマの耐性を向上させる方法[23]、等が検討されてきた。

しかし、逆相 LC/ICP-MS として実用的に分析を行うためには、単に高濃度の有機溶媒が導入できるだけでなく、できるだけ簡便に実験操作が行え、なおかつ LC のピークを拡散させない等、LC の分離能を低下させないことが重要である。前述の①~③の方法は、いずれも逆相 LC/ICP-MS のインターフェイスとして十分な対策にはなっておらず、新たに実用的な有機溶媒用のインターフェイス開発が強く望まれている。そこで本章では、本研究で取り組んだ新規インターフェイスの開発成果と、開発した新規インターフェイスを装着した逆相 LC/ICP-MS を使ったアプリケーションの成果を報告する。

2-2 LC/ICP-MS による元素特異的分析

2-2-1 ICP-MS の歴史

ICP-MS は試料溶液中のほとんどの元素を高感度に検出/定量することが可能な無機元素分析装置である。このため、これまで元素分析装置として広く使われてきた AAS に代わり、現在では ICP-AES と並んで、高感度無機分析法として広く用いられるようになってきている。

無機元素分析は、1859 年に Kirchhoff が発光吸収スペクトルの理論を完成[24]し、1860 年に Bunsen とともにバーナーによる炎色反応を利用した炎光分析法を確立[25]して以降、約 100 年もの間、原子発光によって行われてきた。この間、光源は炎だけでなく、直流アーク(孤光)やスパーク(火花)などのプラズマへと広がり、それらが出尽くすと、再び水素やアセチレン等を用いた化学炎が着目されるようになった。これは、プラズマを使用した場合、高い電子密度によって効率良く原子が励起される反面、発光線の種類が増加し、解析が複雑化してしまったからである。化学炎の場合、電子密度は低い、その分発光線の種類は減り、分析を行う面ではかえって有効であった。このため、一時期は高温の化学炎であるシアン-酸素炎等が重要な光源となった。

原子発光が盛んに分析法として用いられた後、1955 年に Walsh が AAS を発明[26]すると、今度は AAS が数十年に渡って無機元素分析に使われるようになった。AAS は 1817 年に Fraunhofer が Fraunhofer 線として太陽光の可視スペクトル中に暗線を発見した際、元素ごとに特定の吸収波長を持つという基本的な原子吸光現象が見つかったにも関わらず、原子発光が分析法の主流となっていたために、分析法として活用されるまでには長い期間を要した[27]。しかし、化学発光が一つの元素から多くの種類の発光線を発生させるのに対し、AAS は固有の幅の狭い吸収スペクトルを示すだけであるため、非常に元素選択性が高い。このため無機元素分析法としては非常に有効であり、現在も公定法として様々な分野で活用されている。

一方で、AAS が分析法の主流に変わっても、一部の研究者は化学発光を使った研究を引き続き行っていた。中でも、Fassel らは原子発光でも AAS に対抗できることを示すため、自ら装置を改良し、1965 年に ICP-AES を開発した[28]。ICP-AES はそれまでの原子発光とは異なり、Ar によるプラズマを光源として用いることで、非常に効率よく化合物を原子化し、高感度かつ多元素同時に分析が行えるようになった。この多元素同時分析が AAS では不可能であったため、ICP-AES は AAS に代わる新しい無機元素分析法として注目されるようになった。

さらに 1980 年になると、Houk らは ICP が化合物を原子化するだけでなく、非常に効率よくイオン化まで行っていることを発見し、高感度検出法である MS と組み合わせ、ICP-MS を発表した[29]。実は、多くの研究者が ICP によって化合物のイオン化が行われていることに気付いていたが、MS との結合には至っていなかった。これに対して Houk らは、大気中で生成させたアルゴンプラズマを高真空の MS と結合させるという

装置構成上での課題を、多段階方式を使って装置内を差動排気させ、ICPと結合させても MS の真空度を保つことに可能にした。これにより、現在使われている分析法の中で最も高感度な手法の1つである ICP-MS が誕生し、無機元素分析法として広く使われるようになっていく。

2-2-2 ICP-MS の構造と特徴

2-2-1 で記載したように、ICP-MS は試料溶液中の化合物を原子レベルで高感度に検出/定量することが可能な無機元素分析装置である。ただし、例外として有機化合物の主要構成元素である C、H、O、N は分析することができない(図 2-1 に ICP-MS で分析可能な元素の種類を記載する)。これは ICP の原理上の問題で、これらの4元素は周囲の大気と試料溶液から多量にプラズマ内に供給されてしまい、検出器を飽和させてしまうためである。他には、F も Ar よりイオン化エネルギーが高い(各元素の第一イオン化エネルギー:Ar/15.76 eV、F/17.42 eV)ために ICP ではイオン化することができず、検出することができない。

Ar よりもイオン化エネルギーの高い不活性ガスとしては、他に He と Ne が存在する。特に He は第一イオン化エネルギーが 24.59 eV と高いため、ヘリウムプラズマを使えば F を含めて全ての元素をイオン化することができる。F は様々な製品にポリマーや塩として含まれ、日常生活で広く使われているため、分析ニーズが高い物質である。

研究室レベルではヘリウムプラズマが検討されており、He の質量数が小さいために他のスペクトル干渉も少ないとされ、元素分析に最も適したプラズマであると考えられていた[30]。しかし、He は励起温度が非常に高いため、プラズマを生成するのに必要なトーチ等の器具を損傷しやすい。また商業的にも、分析時に高価なヘリウムガスを大量に消費するため、比較的安価なアルゴンガスを用いた ICP 分析装置のみが実用化された。

| | 1A | 2A | 3A | 4A | 5A | 6A | 7A | 8 | 1B | 2B | 3B | 4B | 5B | 6B | 7B | 0 | | |
|---|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|
| 1 | H | | | | | | | | | | | | | | | He | | |
| 2 | Li | Be | | | | | | | | | B | C | N | O | F | Ne | | |
| 3 | Na | Mg | | | | | | | | | Al | Si | P | S | Cl | Ar | | |
| 4 | K | Ca | Sc | Ti | V | Cr | Mn | Fe | Co | Ni | Cu | Zn | Ga | Ge | As | Se | Br | Kr |
| 5 | Rb | Sr | Y | Zr | Nb | Mo | Tc | Ru | Rh | Pd | Ag | Cd | In | Sn | Sb | Te | I | Xe |
| 6 | Cs | Ba | L | Hf | Ta | W | Re | Os | Ir | Pt | Au | Hg | Tl | Pb | Bi | Po | At | Rn |
| 7 | Fr | Ra | A | | | | | | | | | | | | | | | |
| | L | La | Ce | Pr | Nd | Pm | Sm | Eu | Gd | Tb | Dy | Ho | Er | Tm | Yb | Lu | | |
| | A | Ac | Th | Pa | U | Np | Pu | Am | Cm | Bk | Cf | Es | Fm | Md | No | Lr | | |

図 2-1 ICP-MS で分析可能な元素(着色部分)

※有機化合物の主要構成元素である C、H、O、N、そして ICP ではイオン化ができない F と He を中心とした希ガス、天然には存在しない放射性元素類(存在した場合は分析可能)は分析ができない。

ICP-MS の構造を大きく分類すると、最初に試料が通る試料導入部、試料をイオン化するプラズマ部、それから生成したイオンを検出する検出部の 3 つで構成されている(図 2-2 に ICP-MS の装置構成を記載する)。

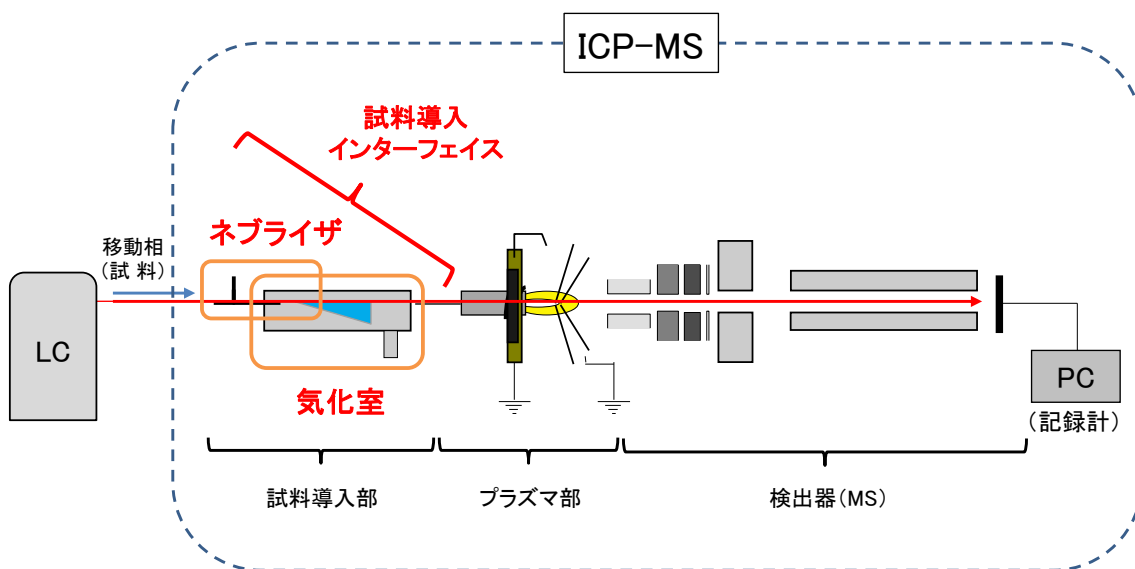


図 2-2 ICP-MS の装置構成

試料導入部は液体試料をアルゴンガスによって噴霧し、液滴を形成するネブライザと、液滴を大きさで分別し、微粒子のみをプラズマ部に送る気化室(チャンバー)から構成され、この二つは試料導入インターフェイスと呼ばれる。

ネブライザは物理的に液滴を生成する装置で、同軸型、クロスフロー型、ダブルパス型、バビントン型、超音波発振型等が存在する。現在は同軸ネブライザが最も広く用いられているが、表 2-1 に記載したようにそれぞれ特徴がある。これらのネブライザは多くのメーカーから市販されているが、ほとんどのネブライザはチャンバーや試料導入用キャピラリー等のコネクタ径を合わせれば相互に交換可能であり、試料や分析目的に合わせて適切なものを選択することが可能である。

表 2-1 ICP 用ネブライザの種類と特徴

| 種類 | 特徴 |
|---------|---|
| 同軸型 | 一般的に広く普及 0.02 ~ 2 mL/min と広範囲の試料流速で使用可能 LCとの結合性が良い |
| クロスフロー型 | 構造が単純で耐久性が高い 耐フッ酸性や耐塩基性などの素材で製造可能 試料管が塩などで詰まりやすい |
| ダブルパス型 | 噴霧の安定性が低い 樹脂素材で製造 試料管が塩などで詰まりやすい |
| バビントン型 | 粘性液体や懸濁液も試料として適用可能 噴霧効率が低い 試料のメモリー効果が生じやすい 試料導入時の応答速度が遅い |
| 超音波発振型 | 噴霧効率が低い 装置が複雑で噴霧の安定性が低い 試料のメモリー効果が生じやすい 試料導入時の応答速度が遅い |

またチャンバーにもスコット型とサイクロン型が存在し、サイクロン型はスコット型に比べて約 2 倍に試料導入効率が高くなっている(図 2-3 にサイクロンチャンバーの構造を記載する)。サイクロンチャンバーではいったんネブライザで生成された液滴試料が、チャンバー内で壁面に何度も衝突し、さらに微細な液滴となることでプラズマへの導入効率が高くなる[31]。

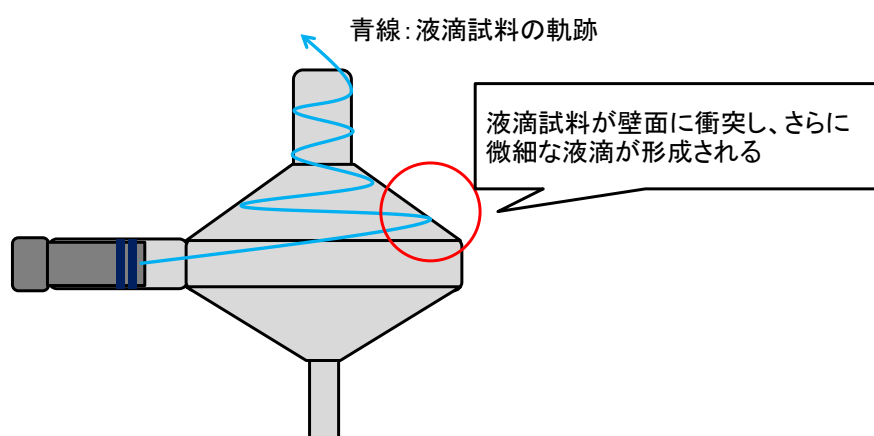


図 2-3 サイクロンチャンバーの構造と二次液滴の生成過程

しかし、サイクロンチャンバーは微細な液滴だけでなく、比較的大きな液滴も導入されるため、分析値の安定性が低いという欠点がある。また壁面に試料が衝突するため、試料成分が長時間にわたって残存し、メモリー効果として分析上の妨害になりやすい。このため LC の検出器のように、分析時に迅速な応答性が必要な場合は、液滴の分別効果に優れるスコット型チャンバーの方が適している。

プラズマ部では、ICP-MS の最大の特徴であるアルゴンプラズマによって、チャンバーから送られてきた液滴試料が気化・分解・イオン化される(図 2-4 にアルゴンプラズマにおける試料のイオン化過程を記載する)。このアルゴンプラズマは、コイル状に巻かれた誘導電流によって内部のアルゴンガスを電離することによって形成され、表面温度は 10,000 K、電子密度は 10^{14} cm^{-3} に達する。このため、プラズマ内に導入された化合物は効率的にイオンにまで励起される(図 2-5 にプラズマ内部におけるイオン化の仕組みを記載する)。

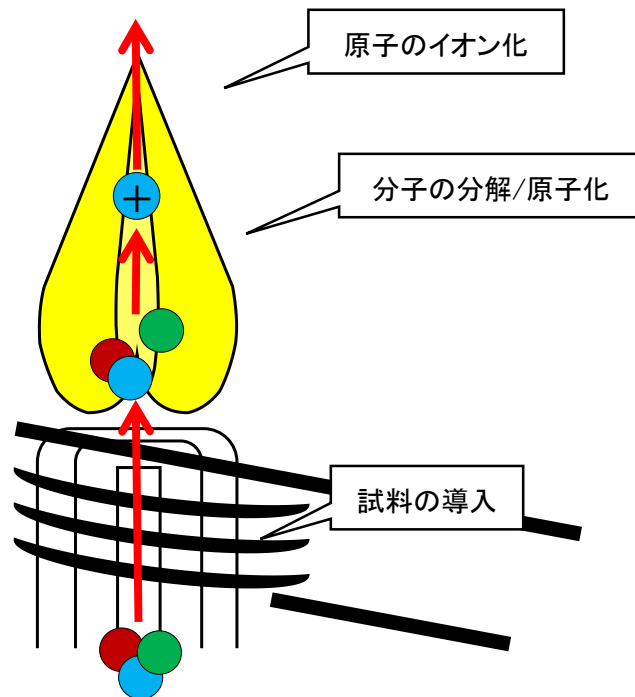


図 2-4 アルゴンプラズマ内の試料移動経路とイオン化過程

※アルゴンプラズマの中心は、キャリアガスが通ることによって周囲よりも温度が低い部分が形成されており、断面がドーナツのような特殊な構造になっている。これにより、プラズマ Torch 中心の試料管から導入された試料(液滴)は、プラズマ表面に拡散されることなく、温度の低いプラズマの中心に効率よく導入される。

プラズマ内に導入された試料は、プラズマ内を通過するわずかな間に分子の分解/原子化、さらにイオン化まで行われ、プラズマ部の後に配置された MS にて検出される。

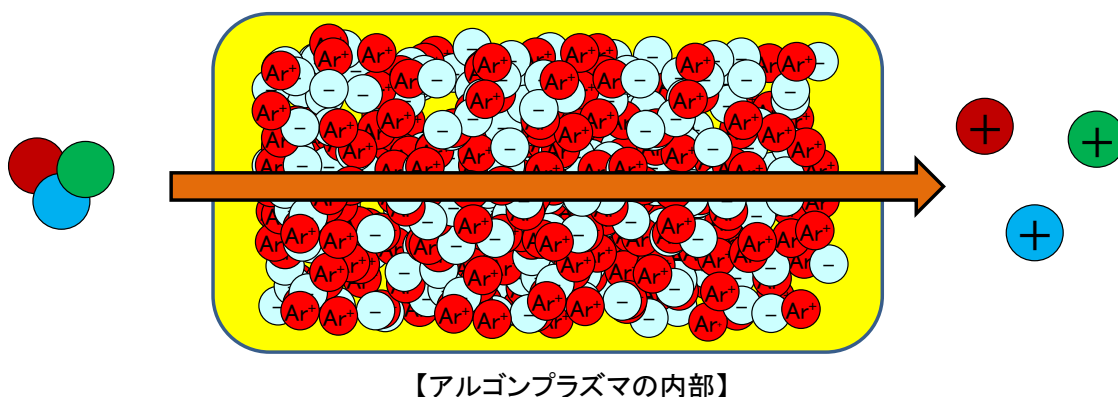


図 2-5 アルゴンプラズマの内部と試料のイオン化

※アルゴンプラズマ内には高周波によって強制的に電離された、同数の Ar^+ と e^- が高密度に存在している。 Ar^+ と e^- は分析試料に対して圧倒的に多く存在し、さらに Ar^+ の第一イオン化エネルギーが $1,520.6 \text{ kJmol}^{-1}$ と高く、均一なエネルギー状態となっているため、金属、非金属を問わず、ほぼすべての物質が 100% 近くの高い効率で一価のプラスイオンとなる。

試料中で分析対象となる化合物を形成する全ての原子は、それぞれが一価のプラスイオンとなる(例えば 3 原子で構成される分子ならば、一価のプラスイオンが 3 つ同時に生成する)ため、アルゴンプラズマはイオン供給源として非常に効率が良く、なおかつ得られるマススペクトルは単純で解析が容易である。

アルゴンプラズマの生成は誘導電流によって行われるが、図 2-4 に記載したように、液滴試料をそのままプラズマに吹き付けても内部には導入されず、表面効果によってプラズマ表面を拡散してしまう。このため過去のプラズマ分析法では、プラズマ発生装置を 3 基並べて中心に試料を導入する等の工夫が行われてきた。ICP ではこの課題を解決するため、Fassel らによって 3 重管構造を持つ Fassel 型トーチが開発された(図 2-6 に Fassel 型トーチの構造を記載する)。

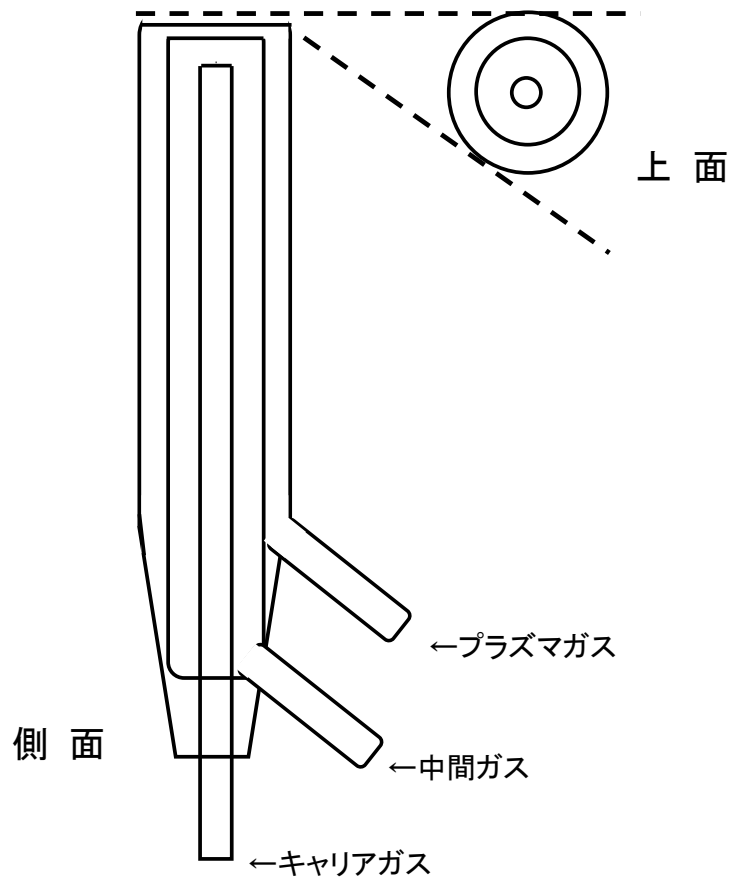


図 2-6 Fassel 型トーチの構造

※トーチは主にガラス製で、同心円状に 3 重環構造が形成されている。中心に試料である液滴がキャリアガスによって導入され、その周りには中間ガス、外円にはプラズマガスが流されている。

プラズマガスと中間ガスはトーチの垂直方向に対して下方斜めに導入口を持ち、渦巻きを描くようにガス流路が作られている。この渦巻き型流路はアルゴンプラズマの形成を補助する効果がある。

検出部には、高感度検出装置である MS が用いられており、元素によっては pg/L から検出可能である。MS は有機化合物の分析に用いられているものと同じものが使用されており、一般的には四重極型が多く用いられているが、磁場型や飛行時間型、

イオントラップ型も存在する。ただし元素測定用であることから、いずれの装置も質量測定範囲は $m/z = 300$ 程度が測定上限となっている(表 2-2 に ICP-MS で使用される MS の種類と特徴を記載する)。

表 2-2 ICP-MS で使用される MS の種類と特徴

| 種類 | 特徴 |
|----------|---|
| 四重極型 | 価格が安く、一般的に広く普及 コリジョンセルを搭載する事で、妨害イオンの低減が可能 装置が小型で安定性が高い |
| 磁場型 | 価格が高い 質量分解能が高く、妨害イオンの影響を受けにくい 検出感度が高い 測定時間が比較的にかかるが、同位体比の精密測定が可能 |
| 飛行時間型 | 価格が高い 質量分解能が高く、妨害イオンの影響を受けにくい 検出感度が低い 測定時間が非常に短く、多元素を同時検出できる |
| イオントラップ型 | 定量範囲が狭く、検出感度も低い 質量分解能が高くすることができる 測定時間がかかり、多元素の測定に向かない |

2-2-3 LC/ICP-MS による化学種別元素特異的分析

無機元素分析装置である ICP-MS では、装置に導入された試料はプラズマ中で構成原子にまで分解されたのち、イオン化されるため、もとの化合物情報(化学種情報)は全て失われてしまう。そこで ICP-MS で化学種情報を得るためには、ICP-MS の前に LC や GC、CE 等の分離装置を結合させる必要がある。特に LC は排出口を ICP-MS の試料導入口と直接結合するだけで、移動相を試料として分析することが可能なため、最も簡便で実用的な分離装置である。このため ICP-MS と LC を結合した LC/ICP-MS を使った研究が、これまでに報告されている[31-35]。

最も簡単な LC と ICP-MS の結合法は、LC から排出されるドレインのキャピラリと ICP-MS の試料導入キャピラリを、タイゴンチューブなど耐溶媒性のあるゴム管で接続するというものである。この方法は非常に簡便なため、現在でも頻繁に用いられている。しかし、使用しているうちにゴム管が膨潤することによる試料の漏えいや、結合部分からの汚染が生じることがあるため、PEEK 製の接続ブロック等を使うことが望ましい。本研究では、さらに装置の利便性を図り、接続部にセラミック製の六方バルブと電磁弁を設置し、任意で LC とシリンジポンプの流路切り替えを行えるようにした。

LC/ICP-MS では、LC で化合物を分離した後、ICP-MS で化合物中の原子を特異的に検出する。この際、ICP-MS に導入可能な移動相であれば、使用する LC やカラ

ムに特に制限はなく、どのような装置とも接続可能である。例えばヒ素化合物やセレン化合物では、分離にイオンクロマトグラフィーやサイズ排除クロマトグラフィーを用い、ICP-MS でヒ素やセレンを検出することで元素特異的に分析した例が報告されている[36]。またその他の取り組みとしては、サイズ排除クロマトグラフィーやアフィニティークロマトグラフィーと ICP-MS を組み合わせ、リン酸化タンパク質を特異的に検出した例も報告されている[37-40]。

タンパク質中の特定の元素に着目して検出/定量する取り組みは、「ヘテロタグドプロテオミクス」もしくは「ナチュラルタグドプロテオミクス」と呼ばれ、無機元素分析の新しい手法として 21 世紀になってから研究が始まった[41]。これは、ゲノム研究の発展に続いてプロテオミクス研究が行われるようになり、タンパク質の定量技術が着目され始めたためである。通常、タンパク質の定量は、UV 吸収を測定するか、試薬と反応させて吸収波長や発色波長を測定する方法があるが、いずれも十分な定量精度を得ることは難しい。これに対して LC/ICP-MS を使った方法では、タンパク質中のリンやイオウ、その他 ICP-MS で検出可能な原子を直接検出・定量するため、誘導体化の影響を受けずに、ICP-MS の高い検出感度と定量性を利用することができる。そこで LC/ICP-MS による有機化合物の定量技術は、夾雑成分が多い生体試料でも目的のタンパク質を高感度かつ高選択的に定量できる手法として期待されている。

一方、低分子有機化合物の分析に LC/ICP-MS が用いられた例はほとんど報告されていない。これは、低分子化合物の分析に広く用いられている逆相クロマトグラフィーには、一般的に高濃度の有機溶媒が移動相として用いられており、ICP-MS との結合が困難なためである。そこで、2-3 節では低分子化合物の分析に LC/ICP-MS を用いるため、逆相クロマトグラフィーと ICP-MS の結合法を検討した。

2-3 逆相 LC/ICP-MS 用インターフェイスの開発

2-3-1 逆相 LC/ICP-MS の課題

ICP-MS には化学種の分離能が無いため、LC/ICP-MS として ICP-MS と結合する LC は、できるだけ分離能が高く、化合物の適用範囲が広い装置が有効である。このため低分子化合物を化学構造で分離する際には、幅広い物質に対して適用でき、高い分離能が得られる逆相クロマトグラフィーが最適な分離法だと考えられる。しかし、ICP-MS は導入できる溶媒が著しく制限されるため、これまで逆相クロマトグラフィーを利用することがほとんどできなかった。

逆相クロマトグラフィーは、固定相に ODS 等、移動相に水やアセトニトリル、メタノール等を使い、極性の差による分配傾向を利用して分析対象を分離する方法である。逆相クロマトグラフィーで使われるこれらの有機溶媒を ICP-MS に高濃度で導入した場合、通常、プラズマは不安定化し、最後には消灯してしまうために分析ができない。この現象は、①高い蒸気圧によるアルゴンプラズマへの物理的影響^{*1}、②水とのインピーダンス差によるプラズマのマッチング不良^{*2}、③プラズマ燃焼後に発生するススによるサンプリングコーン等の目詰まり^{*3}、といった要因によって引き起こされる。このため有機溶媒を含む溶液は ICP-MS で分析することができず、一般的に試料中の濃度は 5 %程度までが限界とされてきた[42]。そこで、本研究では逆相クロマトグラフィーと ICP-MS を結合するために、ICP-MS の試料導入系であるインターフェイスの改良を行い、有機溶媒導入時でもプラズマを維持する検討を行うことにした。

※1 アセトニトリルとメタノールは、それぞれ蒸気圧が 9.86 kPa (20 °C)、12.7 kPa (20 °C)と、水の 2.3 kPa (20 °C)よりも高く、インターフェイスに導入すると、噴霧によって部分的に気化された有機溶媒蒸気がそのままプラズマに吸入されるため、圧力によるプラズマの消灯を引き起こす。

※2 高周波数の大電流を流したコイル中に試料(気体および微粒子)を通し、高周波数と高電圧の変動磁場によってプラズマは形成されるが、この気体が水と有機溶媒だと大きなインピーダンス差が発生する。プラズマを維持するためにはインピーダンス差を速やかに解消する必要があるが、差が大きいとコンピュータによる周波数制御が間に合わず、プラズマの不安定化や消灯を引き起こす。

※3 アセトニトリルやメタノールは炭素が主成分であるため、いったんプラズマ内で炭素が原子化/イオン化された後、プラズマから放出された時に再結合して多量のススが発生する。このススが MS の一部であるサンプリングコーンやスキマーコーン、さらに引き込み電極等にも付着し、分析の妨害となる。

2-3-2 ICP-MS への有機溶媒導入検討

2-1 に記載したように ICP-MS への有機溶媒導入はプラズマの不安定化などを引き起こすため、通常のインターフェイスを用いた場合、メタノールであれば 5 %程度を上限として低い濃度の試料しか測定する事はできない。しかし言い換えると、5 %までならメタノール溶液を ICP-MS への導入/測定することが可能である。

このように、同じプラズマ条件であっても有機溶媒の濃度や種類によって導入可能な条件が異なるという現象は、有機溶媒のプラズマ導入には一定の許容範囲があることを示していると考えられた。また、ICP-MS は試料量を移動相の導入速度で制御することが一般的であるが、有機溶媒がプラズマに与える直接的な影響は、主に蒸気圧と高周波のインピーダンス変化である。このことから、過去の研究では移動相中の有機溶媒濃度でプラズマへの導入可能範囲を制限していた[14, 20]が、本研究では、単位時間あたりに導入される有機溶媒の絶対量がプラズマへの導入可能範囲を制限するとの仮説を設定した。

そこで ICP-MS への有機溶媒導入に関し、「プラズマに安定的に導入できる有機溶媒には濃度に上限が存在するのか、その場合にその上限は有機溶媒の濃度と絶対量のどちらに依存するのか」を調査した。プラズマの安定性は、逆相 LC で最も一般的に使われる有機溶媒のアセトニトリルを用い、濃度と導入速度を変えて ICP-MS に導入し、5 分間安定してプラズマが点灯しているかで評価した。

表 2-3 にプラズマの安定性を調査した結果をまとめたが、流速によって導入できる有機溶媒濃度には上限があり、750 μ L/min 以上では 10 %以上の高濃度溶液は導入できないことが明らかになった。そして、アセトニトリル濃度が高くなるにつれ、導入できる流速が低くなる傾向を示すことが分かった。

表 2-3 ICP-MS へのアセトニトリル溶液導入結果
(チャンバー容積: 75 mL/通常条件)

| 流速(μ L/min) | 10 | 20 | 30 | 40 | 50 | 60 | 70 | 80 | 90 | 100 | 150 | 200 | 250 | 300 | 350 | 400 | 450 | 500 | 550 | 600 | 650 | 700 | 750 | 800 | 850 | |
|-------------|----|----|----|----|----|----|----|----|----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|---|
| 10% | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ |
| 30% | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ |
| 100% | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ |

※安定: ○、不安定: × として結果を表示
縦軸はアセトニトリル濃度(v / v)

次にチャンバーの容積を変えて同様にプラズマの安定性を調査した。その結果を表 2-4 と表 2-5 に記載したが、いずれも表 2-3 に記載した 75 mL 容積のチャンバーを装着して測定した結果と同様、流速によって導入できる有機溶媒濃度には上限があり、100 mL 容積のチャンバーを装着した条件では 450 μ L/min 以上、25 mL 容積のチャンバーを装着した条件では 750 μ L/min 以上だと 10%以上の濃度の溶液は導入することができなかった。そして、いずれの条件でもアセトニトリル濃度が高くなるにつれ、導入できる流速が低くなる傾向を示すことが分かった。

表 2-4 ICP-MS へのアセトニトリル溶液導入結果
(チャンバー容積: 100 mL)

| 流速(μ L/min) | 10 | 20 | 30 | 40 | 50 | 60 | 70 | 80 | 90 | 100 | 150 | 200 | 250 | 300 | 350 | 400 | 450 | 500 | 550 | 600 | 650 | 700 | 750 | 800 | 850 | |
|-------------|----|----|----|----|----|----|----|----|----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|---|
| 10% | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ |
| 30% | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ |
| 100% | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ |

※安定: ○、不安定: × として結果を表示
縦軸はアセトニトリル濃度(v / v)

表 2-5 ICP-MS へのアセトニトリル溶液導入結果
(チャンバー容積: 25 mL)

| 流速(μ L/min) | 10 | 20 | 30 | 40 | 50 | 60 | 70 | 80 | 90 | 100 | 150 | 200 | 250 | 300 | 350 | 400 | 450 | 500 | 550 | 600 | 650 | 700 | 750 | 800 | 850 | |
|-------------|----|----|----|----|----|----|----|----|----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|---|
| 10% | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ |
| 30% | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ |
| 100% | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ |

※安定: ○、不安定: × として結果を表示
縦軸はアセトニトリル濃度(v / v)

ここで図 2-7 に、アセトニトリル含有移動相を導入した場合の導入速度上限とチャンバーの容積の関係を記載した。図 2-7 では、どの容積のチャンバーでもアセトニトリル濃度が上昇するに従って導入できる速度上限が低下し、チャンバーの容積を大きくした場合も、導入できる速度上限が低下することがわかった。

次にアセトニトリルの絶対量に換算して、導入速度上限とチャンバーの容積の関係を図 2-8 に記載した。図 2-8 では、アセトニトリルの濃度に関係なく導入速度上限はほぼ一定であった。このため、移動相中のアセトニトリル導入速度はアセトニトリル濃度とは関連性が低いことが分かった。

以上の結果から、「プラズマに安定的に導入できる有機溶媒には濃度に上限が存在し、その上限となる導入速度は有機溶媒の絶対量に依存している」ことが証明された。そして、市販の ICP で使用されるプラズマは全て 27.12 MHz の周波数かつ、ほぼ同一規格のプラズマトーチで生成されており、どのメーカーのプラズマもほぼ同じ性能を有しているため、本研究で証明したこの現象は、研究に使用した装置に固有の現象ではなく、全ての ICP に共通であると考えられた。

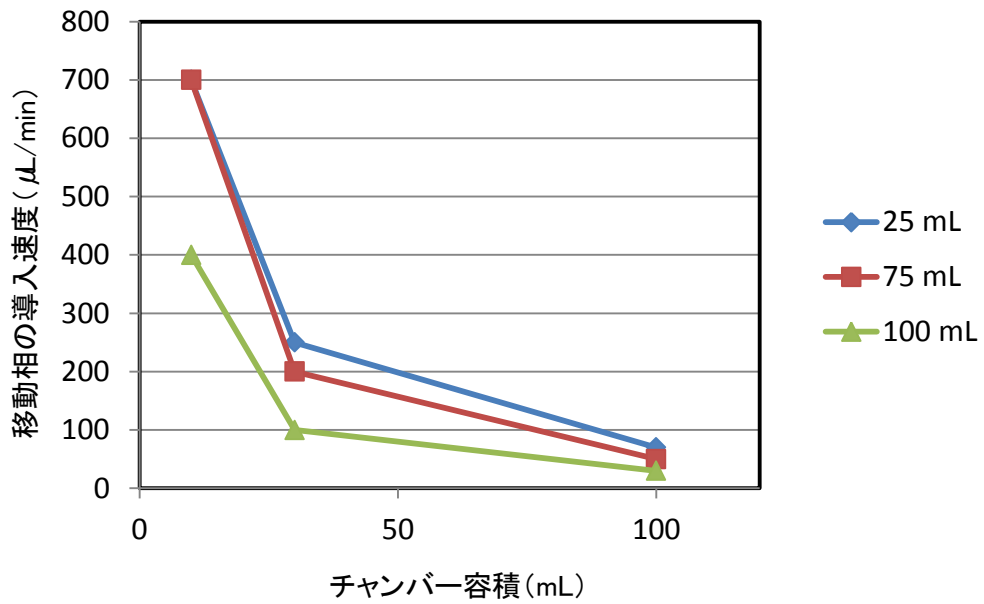


図 2-7 アセトニトリル含有移動相導入時における
導入速度上限とチャンバー容積の関係

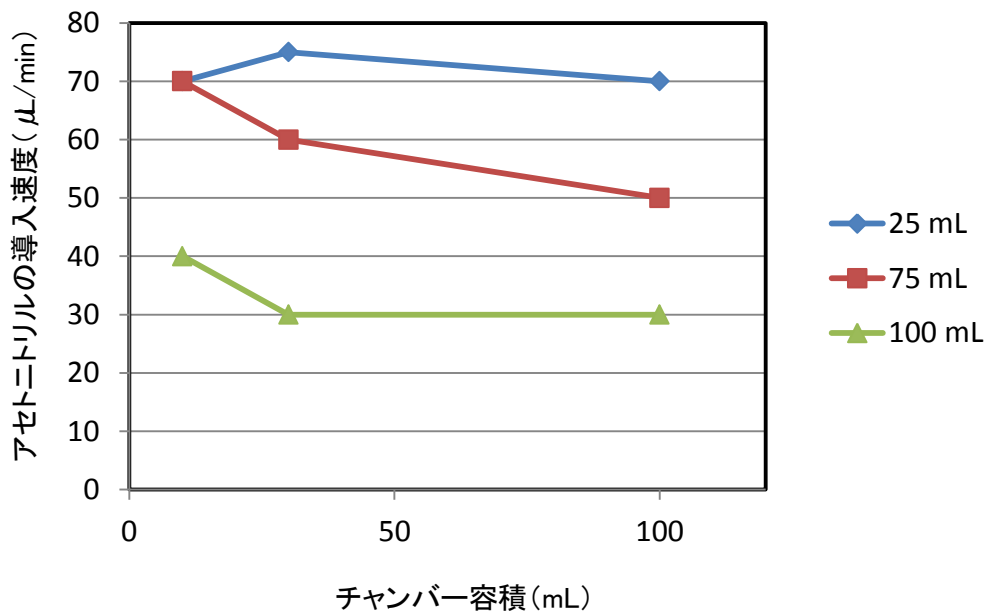


図 2-8 アセトニトリル含有移動相導入時における
アセトニトリル絶対量の導入速度上限とチャンバー容積の関係

2-3-3 有機溶媒導入に向けた低流速/高効率型ネブライザの開発

2-3-2 の検討から、移動相に含まれる有機溶媒の絶対量がプラズマへの導入上限を決定していることが分かったため、プラズマに導入する有機溶媒の絶対量は変えずに、移動相の低流速化によって相対的に移動相中の有機溶媒濃度を高くすることを検討した(図 2-9 に流速を変化させた場合の有機溶媒の体積と濃度の関係を記載する)。そして、高濃度有機溶媒条件下でもプラズマを維持できる低流速/高効率型ネブライザの開発を行った。

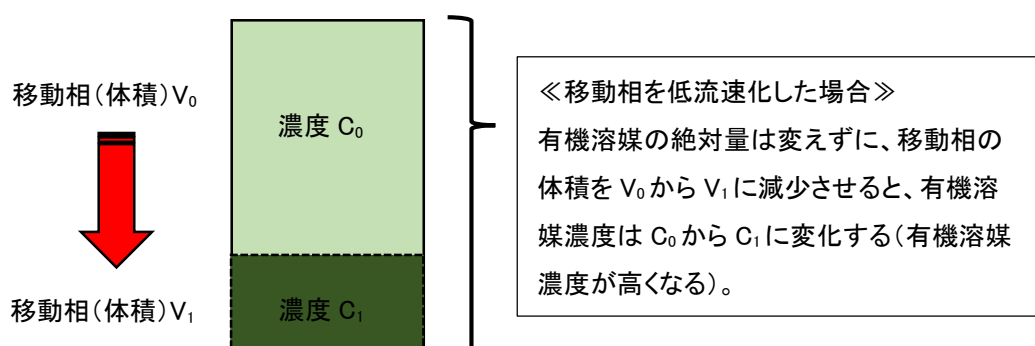


図 2-9 移動相の低流速化による試料中有機溶媒濃度の変化

開発の基本となるネブライザのタイプには、一般的に広く普及し、LC との結合性が良好な同軸ネブライザを選択した。市販されている一般的な同軸ネブライザは、移動相流速の範囲が 0.5~1.5 mL/min 程度である。このネブライザを使用する場合、プラズマに安定して導入できる有機溶媒濃度が 5% とすると、有機溶媒の絶対量は 25~75 μ L/min となる。この時、逆相クロマトグラフィーで 100% まで有機溶媒濃度を上げようとする、移動相は 25~75 μ L/min の範囲でしか流すことはできない。しかし、ネブライザの至適流速は各ネブライザによって決まっているため、単純に移動相流速を下げると液滴の微粒子生成効率が下がり、十分な分析感度(応答信号値)を得ることができない。

一般的な同軸ネブライザは、移動相流速範囲が 0.5~1.5 mL/min 程度、微細液滴の生成効率は 0.5~2% 程度である。つまり、試料のほとんどはドレインとして廃棄されている。このため、最近ではドレインとして廃棄される試料も装置に導入する事が可能なネブライザである HEN が開発され、移動相流速が低くても高い応答信号値を得ること

ができるようになってきた[43-46]。

一方、試料管の内径に着目すると、一般的な同軸ネブライザの試料管内径は直径 0.5mm 程度のものがほとんどである。低流速(流速 100 μ L/min 以下)では、試料管内における溶質(分析対象)の流路に対する横方向の拡散が問題となるが、HEN は低流速ではあるが試料管内径は従来のもと同じため、同様に溶質の拡散が発生する。このため、LC/ICP-MS 用のインターフェイスとして HEN をそのまま使用することは適切ではない。

HEN の特徴は、従来のネブライザに比べて試料噴霧時における微細液滴の生成効率が低いことにある。生成効率をあげるための工夫として、キャピラリー先端の形状等が研究されている[47]が、最も大きく影響する因子は試料溶液とアルゴンガスとの接点距離である。このため、試料管の先端とアルゴンガス配管の先端、ネブライザ本体の先端の 3 点の距離を測定条件に合わせて最適化でき、振動等で動かないように固定できる装置が必要である。

そこで本研究では、試料管の先端長を最適化することができ、なおかつ試料管内での横方向の拡散を防止できる新しいネブライザを設計することにした。

新たに設計したネブライザは、通常の二重管構造の試料管内に、さらにフューズドシリカキャピラリーを挿入した三重管構造をしている(図 2-10 にキャピラリー導入型同軸ネブライザの構造を記載する)。通常の二重管構造の内部に、試料の吸着が少ない細径のフューズドシリカキャピラリーを挿入することで、試料管の内径が細くなり、溶質の拡散を防止する効果が得られた。

また、キャピラリー試料管を新たに挿入したことにより、ネブライザ先端で試料溶液とアルゴンガスが接触する距離を自在に調整できるようになった。ネブライザ後部のダイヤルによって、フューズドシリカキャピラリーの先端長を調整することで、ネブライザ先端で試料とアルゴンガスを接触させる距離の最適化を行い、微粒子の生成効率を向上させた。これにより、通常のネブライザが試料溶液のうち 1~2 %程度しかプラズマ内に導入できておらず[48, 49]、ほとんどをドレインから廃棄してしまっているのに対し、ほとんど廃液が出ない 100 %近い高効率での試料導入を達成した。

試料管は分析試料や緩衝液等、様々な溶液が流れるために必ず汚れが発生するが、本研究のネブライザはキャピラリーを交換することで容易に汚染を防止することができる。また、消耗部分はフューズドシリカキャピラリーだけであるため、維持費用も安価にすることができた(図 2-11 に通常の同軸ネブライザと新しく開発したキャピラリー導入型同軸ネブライザの比較、図 2-12 に実際のキャピラリー導入型同軸ネブライザの写真を記載する)。

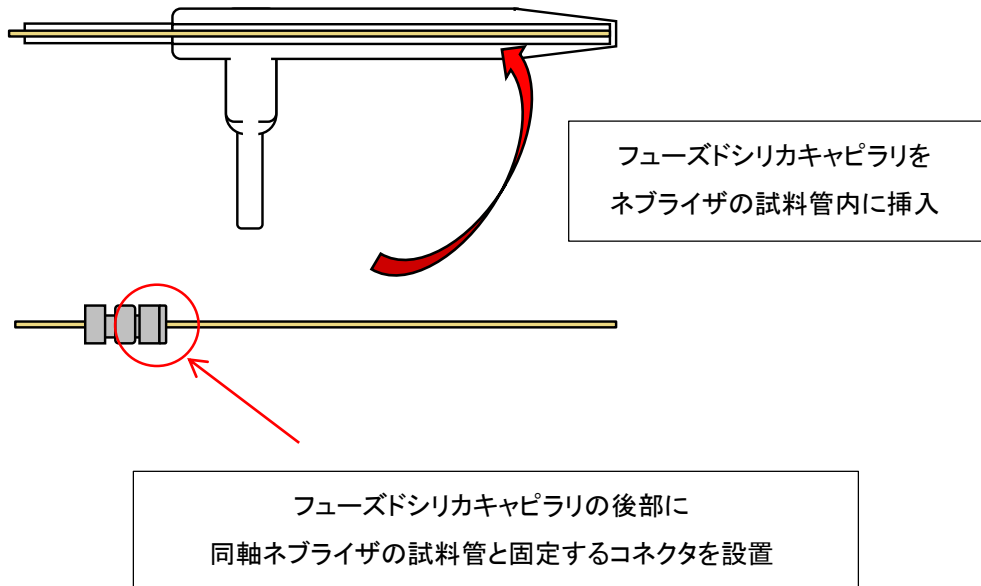


図 2-10 キャピラリ導入型同軸ネブライザの構造

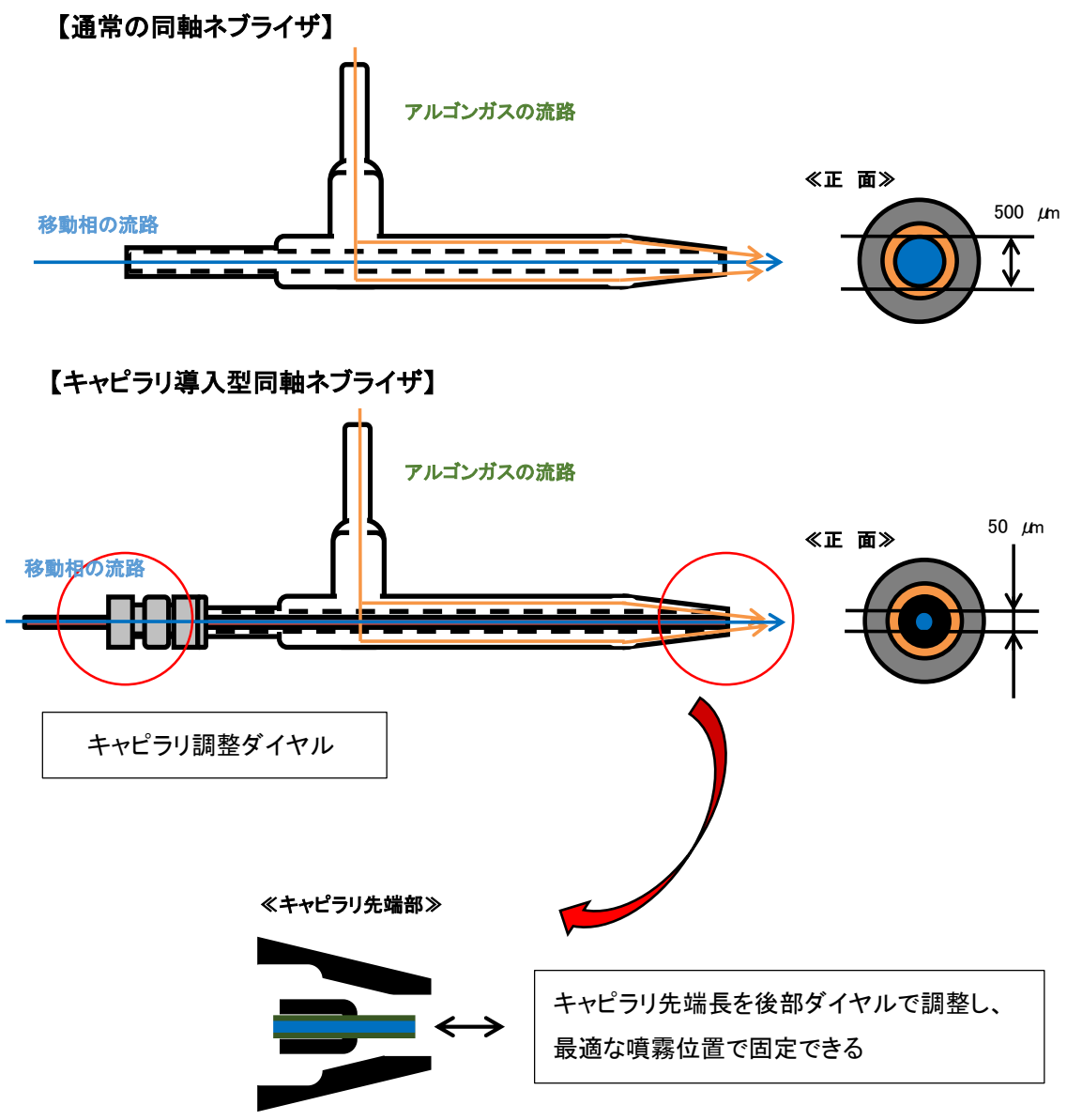


図 2-11 通常の同軸ネブライザとキャピラリー導入型同軸ネブライザの構造比較

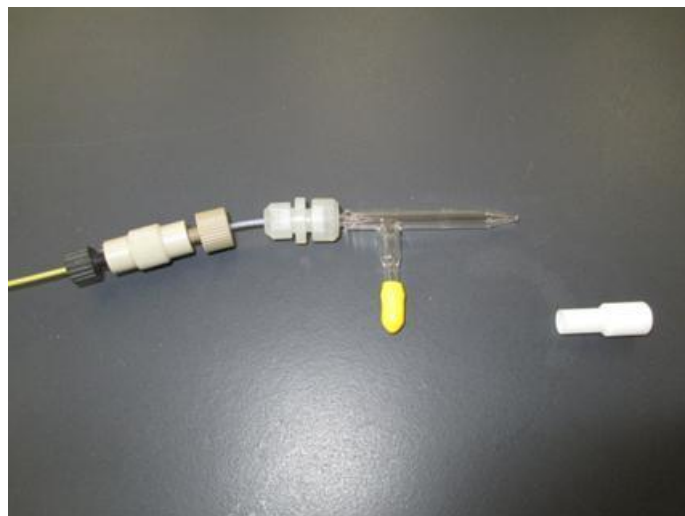


図 2-12 キャピラリー導入型同軸ネブライザの実物写真

2-3-4 有機溶媒導入に向けた気化室容積の最適化

2-3-3 でキャピラリー導入型という新しい低流速/高効率型ネブライザを開発したが、逆相 LC/ICP-MS を使う上で、数 $\mu\text{L}/\text{min}$ という流速は一般的ではなく、①選択できるカラムの種類が少ない、②移動相を窒素ガスで置換する必要がある、③配管やカラム交換時が煩雑である、といった課題がある。このため、様々な物質に合わせて分析条件を頻繁に変更するような使い方が難しく、汎用的な研究には適していない。そこで、高濃度有機溶媒をより多量に導入できるシステムを開発するため、試料導入インターフェイスとしてネブライザと組み合わせて使用する、チャンバーの改良を行った。

チャンバーはネブライザで作られた試料液滴を選別し、微粒子だけをプラズマに導入する装置である。アセトニトリルやメタノールをインターフェイスに導入すると、チャンバー内で試料液滴が揮発し、過剰に上昇した圧力がそのまま配管を通過して直接プラズマ内にかかるため、プラズマを不安定化する。しかし、有機溶媒の液滴は完全には気化しておらず、液滴と気体の部分平衡が生じていると考えられるため、チャンバーの容積によって気化の状態が変わる可能性がある。そこで、チャンバーの容積を変えることで過剰圧力の大きさを変化させることができるとの仮説を立て、チャンバー容積の最適化を行った。

通常のチャンバー容積は 25 mL 程度であるが、検討用のチャンバーとして容積が 8 mL、25 mL、75 mL、100 mL の各装置を用意し、アセトニトリル、メタノール、エタノールをそれぞれ導入し、プラズマの安定性を調査した。その結果を図 2-13 に記載する。

図 2-13 は縦軸が有機溶媒導入速度、横軸が気化室容積で、アセトニトリル、メタノール、エタノールの各溶媒の導入上限速度を●と破線、いずれの溶媒も導入できない、プラズマが不安定な領域を×で示した。この結果、いずれの溶媒も 8~100 mL の間でチャンバー容積と導入上限速度には逆相関があり、気化室容積が小さいほど、多量の有機溶媒が導入できることが判明した。

この結果から、ネブライザによる噴霧空間と接続に必要な空間を確保して、気化室の容積をできるだけ小さくしたチャンバーを設計した結果、チャンバーの容積は 8 mL となった。また図 2-13 より、容積が 8 mL のチャンバーでは、50 μ L/min まではアセトニトリル、メタノール、エタノールが全て導入可能であった(図 2-14 に開発した低容積チャンバーの設計図、図 2-15 に低容積チャンバーの実物写真、図 2-16 に開発した低容積チャンバーおよびキャピラリー導入型同軸ネブライザを装着した ICP-MS の写真を記載する)。

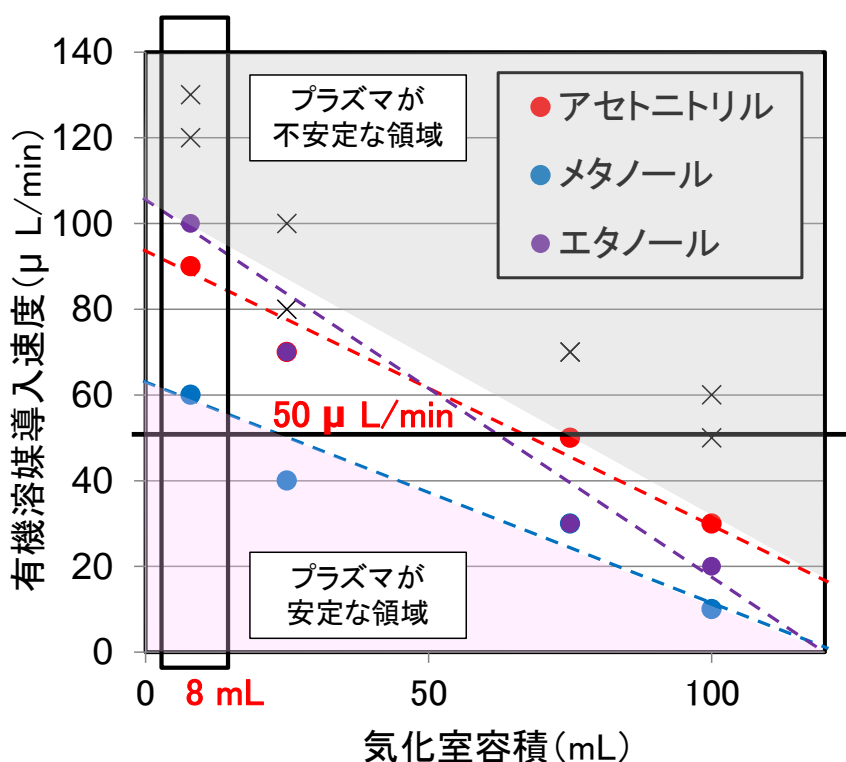


図 2-13 プラズマの安定性に対する有機溶媒導入速度とチャンバー容積の関係

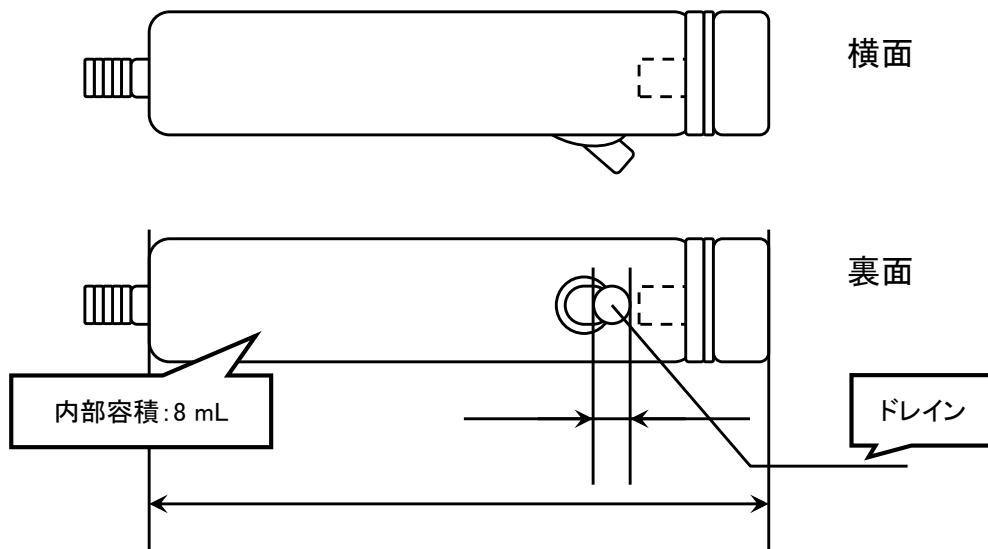


図 2-14 低容積チャンバーの設計図



図 2-15 低容積チャンバーの実物写真

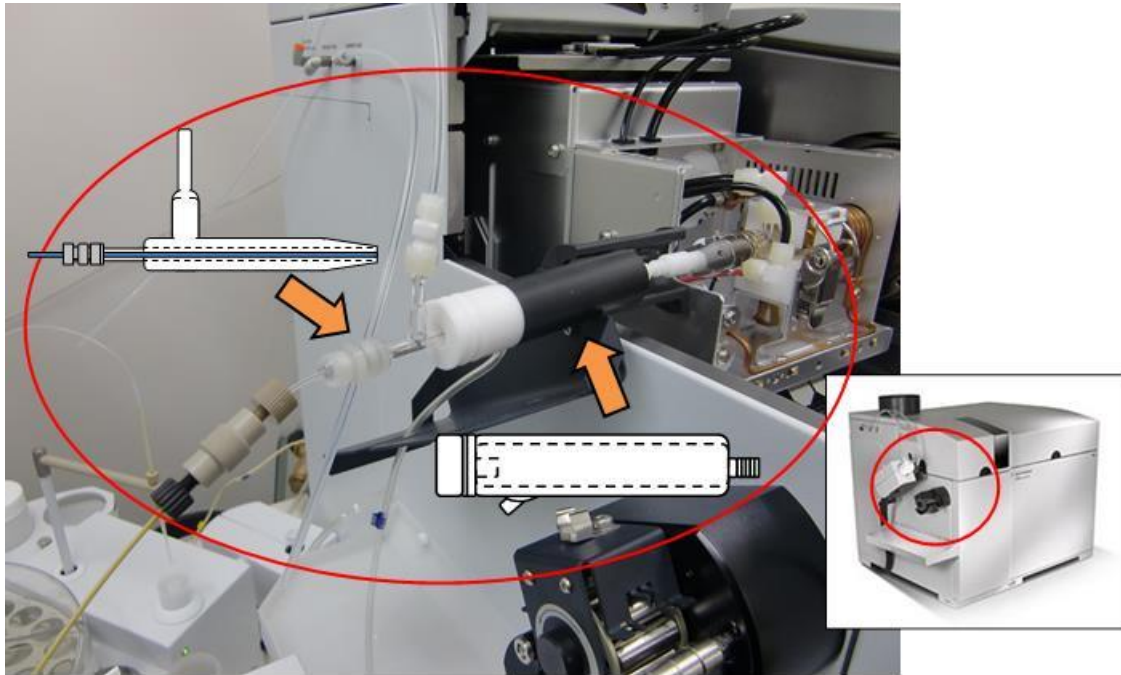


図 2-16 ICP-MS に開発した新規インターフェイスを装着した状態

2-3-5 逆相 LC/ICP-MS 用インターフェイスの性能評価

2-3-3 と 2-3-4 で開発したキャピラリー導入型同軸ネブライザと小型チャンバーを用い、ICP-MS で分析に必要な検出感度が得られるか性能評価を行った。

性能評価は、通常インターフェイスを装着した場合と新規インターフェイスを装着した場合の検出感度の比較で行った。四重極型 ICP-MS は、一般的に軽元素から重元素にかけて質量依存的に検出感度が高くなる傾向があるため、比較として軽元素の Li と重元素の Tl を用いることにした。

評価実験は Li と Tl の 1 mg/L 溶液 (0.1 %硝酸溶液) をアセトニトリルで 100 倍に希釈した 1 μ g/L 溶液を用い、ICP-MS に直接導入して応答信号値を検出することで行った。また、比較として 1 mg/L 溶液を純水で希釈した 1 μ g/L 水溶液も調製し、分析を行った。

性能評価の結果を表 2-6 に記載したが、新規インターフェイス装着時は、アセトニトリル溶液 (アセトニトリル/水 : 99/1 = v/v) および水溶液で ICP-MS の検出感度は変わらず、Li は 10 pmol/L、Tl は 0.5 pmol/L であった。通常インターフェイス装着時は、水溶液導入時の検出感度が Li は 250 pmol/L、Tl は 5 pmol/L であった。アセトニトリル溶液は装置導入直後にプラズマが消灯してしまったため、測定はできなかった。

この結果から、新規インターフェイスを装着することで、アセトニトリル溶液の測定を可能にただけでなく、既存ネブライザ装着時の検出感度に比べて、Liで10倍、TIでは25倍向上させることができた。

表 2-6 新規インターフェイスと既存インターフェイス装着時の検出限界

| | | 新規インターフェイス | 既存インターフェイス |
|---------|-------------------|----------------|-----------------|
| アセトニトリル | Li($m/z = 7$) | 10 pmol/L | 導入不可 |
| | TI($m/z = 205$) | 0.5 pmol/L | 導入不可 |
| 水溶液 | Li($m/z = 7$) | 10 pmol/L | 250 pmol/L |
| | TI($m/z = 205$) | 0.5 pmol/L | 5 pmol/L |
| 移動相 | | 50 μ L/min | 400 μ L/min |

2-4 新規インターフェイスを用いた逆相 LC/ICP-MS によるアプリケーション

2-4-1 逆相 LC/ICP-MS による有機化合物の特異的検出

逆相 LC/ICP-MS は、逆相 LC の特徴である高い分離能を活用することができる。一方、ICP-MS で検出可能な元素を含む化合物は、リン原子を含む核酸類や、有機ヒ素化合物、セレン化合物など、数多く知られており[50]、逆相 LC/ICP-MS によって、様々な種類の化合物が混在する複雑系試料中の高感度かつ高選択的な分析が可能になると考えられる。

最近の低分子有機化合物の分析では、LC-MS 等の高感度・高選択的な分析装置を使った方法がよく用いられているが、生体試料のように様々な物質が混在する中から、未知のリン化合物やイオウ化合物等を同定するためには様々な課題が存在する。例えば、イオウは天然に質量数 32 と 33、34 が存在し、その存在比率は 94.99 : 0.75 : 4.24 である。低分解能の MS の場合、質量数 32 は酸素原子が 2 つ結合したものととの区別が難しく、+2 の質量数である 34 ($32 + 1.954$) も、2 つ以上炭素が含まれる化合物では ^{12}C と ^{13}C の差の 2 倍 (1.0034×2) と区別することができない(図 2-17 にイオウの同位体を測定するのに必要な質量分解能を示した図を記載する)。この差を判別するためには 100,000 以上の高分解能が必要である[51, 52]。

またリンの場合は、天然に安定同位体が存在しない単核種のため、他の様々な化合物の同位体との判別が難しい。このため、ICP-MS のように原子を特異的に検出できる分析法は、確実に構成元素を見極めることができ、複雑系試料からの検出や未知化合物の同定に非常に有用である。そこで、本研究ではリン化合物とイオウ化合物に対し、LC/ICP-MS による分析を試みた。

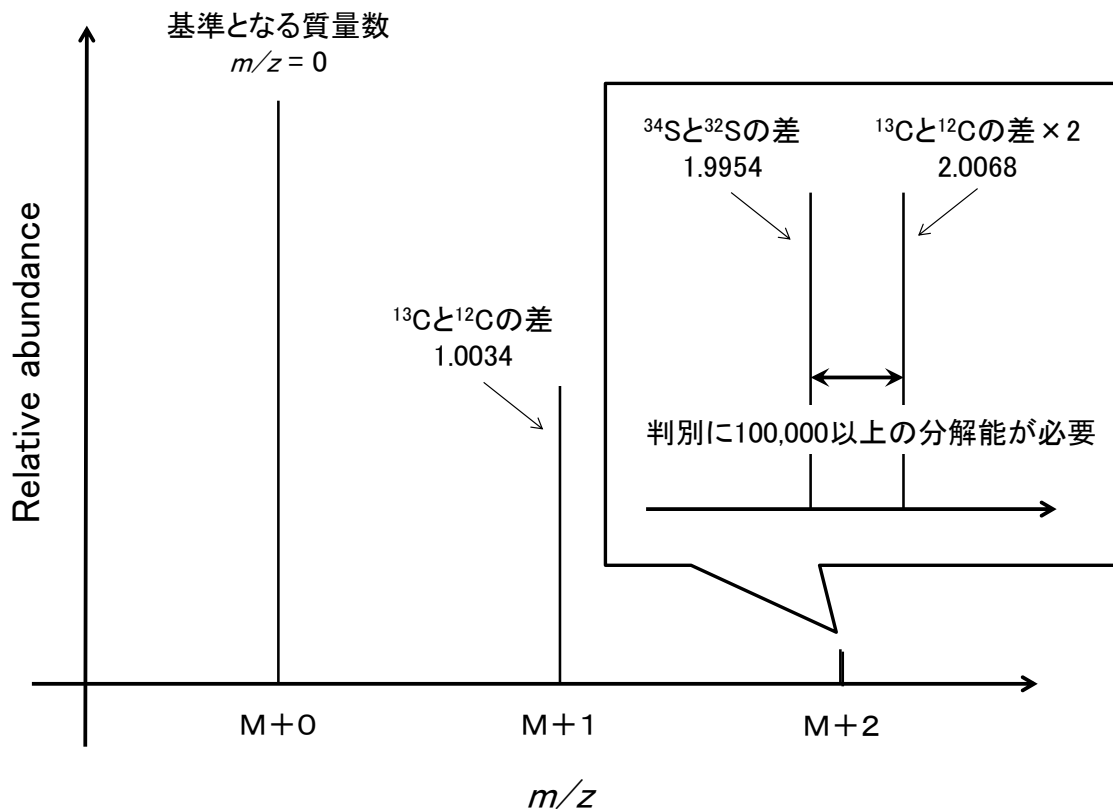


図 2-17 イオウ同位体分析に必要な質量分解能

2-4-2 逆相 LC/ICP-MS を使ったリン化合物の分析

血清アルブミンは血漿タンパク質の約 60 %を占め、生体中で脂肪酸やホルモン、ミネラル等の低分子化合物を結合して運搬する機能を担っている。このため生体中の低分子化合物の解析では、アルブミン結合物の分析が重要となるが、アルブミンは非常に多くの種類の物質が結合しているため、その中からリン脂質など特定の物質を調べたい場合、特異性の高い分析法を用いて選択的に検出する必要がある。そこで、本研究の新型インターフェイスを使った逆相 LC/ICP-MS を使い、アルブミン抽出液中リン化合物の元素特異的検出を行った。

試料には、研究用試薬として市販されているアルブミンをメタノールで抽出し、疎水性の化合物を網羅的に回収したものを使った。移動相に 5 mM ギ酸アンモニウム水溶液と 5 mM ギ酸アセトニトリル溶液、固定相に ODS カラムを用いた逆相 LC/ICP-MS を使い、抽出液中の比較的疎水性の高い物質を分離するとともに、 $m/z = 31$ を検出してリン化合物を検出した。

LC/ICP-MS の分析は、検出したい対象元素の同位体を選び、その同位体に応じた m/z を時系列で連続的に検出して行なわれる。今回の分析対象であるリンは単核種のため、 $m/z = 31$ でのみ測定が可能であるが、磁場型や飛行時間型の MS のように質量分解能が高くない四重極型 MS では、他の分子種との区別が難しい。そこで、あらかじめ $m/z = 31$ の質量数に妨害が無いことを確認し、できる限りバックグラウンドノイズを低減する必要がある。

しかし、 $m/z = 31$ は窒素酸化物である $^{14}\text{N}^{16}\text{O}^1\text{H}$ や $^{15}\text{N}^{16}\text{O}$ 、 $^{14}\text{N}^{17}\text{O}$ の妨害を受けることが知られており、ICP-MS では大気中でアルゴンプラズマを生成させる原理上、周囲の空気や試料中の窒素と酸素に由来する窒素酸化物の影響を受けやすい[53]。このため初期の四重極型 ICP-MS ではリンの検出が非常に困難であったが、最近の装置にはコリジョンセルによる分子イオンの分解・排除能力が装備されるようになり、分析条件を最適化することでリンの測定が可能となった(図 2-18 にコリジョンセルの構造と ICP-MS 内の配置図を記載する)。

本研究でもコリジョンセルを装備した四重極型 ICP-MS を用い、窒素酸化物の影響を低減してリンの検出を行った。具体的には、まず有機化合物の分解/イオン化効率を下げないようにプラズマ出力は高めに設定し、コリジョンセル内には通常よりも多くヘリウムガスを流して、コリジョンセル内の高エネルギーヘリウム状態を維持した。一方で MS のプレートバイアス、オクタポールバイアス、Q ポールバイアスの値を通常 of 全元素測定用パラメータから変更し、最適化を行った。これにより、リンの測定用に MS の設定を特化し、バックグラウンドノイズを数 cps にまで低減することができた(表 2-7 にリン測定時の ICP-MS 測定パラメータを記載する)。

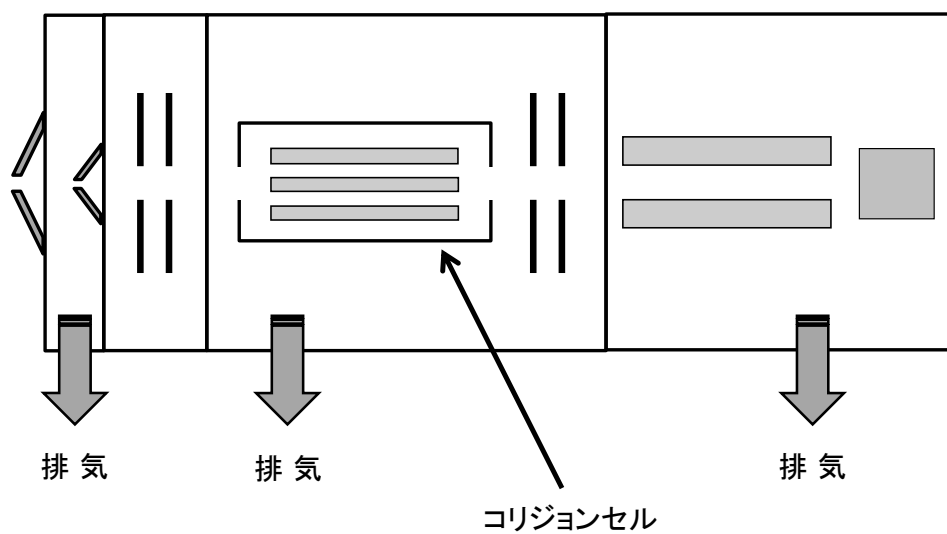


図 2-18 ICP-MS 内部のコリジョンセルの配置

表 2-7 通常測定時とリン測定時の ICP-MS 測定パラメータの比較

| | 通常条件 | リン測定条件 |
|-------------------------------|--------|--------|
| Plasma | | |
| RF パワー | 1550 | 1550 |
| RF マッチング | 1.8 | 1.8 |
| サンプリング位置 | 8 | 8 |
| キャリアガス | 1.05 | 1.05 |
| オプションガス | 0 | 0 |
| ネブライザポンプ | 0.1 | 0.1 |
| スプレーチャンバ温度 | 2 | 2 |
| メイクアップ/希釈ガス | 0 | 0 |
| Lens | | |
| 引き出し電極1 | 0 | 0 |
| 引き出し電極 2 | -195 | -200 |
| オメガバイアス | -80 | -90 |
| オメガレンズ | 10.2 | 11 |
| セル入射 | -40 | -100 |
| セル出射 | -60 | -150 |
| 偏向レンズ | 2 | -75 |
| プレートバイアス | -55 | -150 |
| Cell | | |
| He 流量 | 4.3 | 10 |
| H2 流量 | 0 | 0 |
| 第 3 セルガス流量 | 0 | 0 |
| OctP バイアス | -18 | -100 |
| OctP RF | 200 | 200 |
| エネルギーディスクリミネーション | 3 | 7 |
| Q-Pole (Standard Tune) | | |
| 分解能ゲイン | 126 | 126 |
| 分解能オフセット | 126 | 126 |
| マス軸ゲイン | 0.9998 | 0.9998 |
| マス軸オフセット | 0 | 0 |
| QP バイアス | -15 | -93 |
| Torch (Standard Tune) | | |
| トーチ H | 0 | 0 |
| トーチ V | 0 | 0 |
| EM (Hardware Setting) | | |
| ディスクリミネータ | 4.5 | 4.5 |
| アナログ HV | 1750 | 1750 |
| パルス HV | 980 | 980 |

抽出液の分析と同時にリン脂質標品の分析を行った。リン脂質標品 3 種類をメタノールに溶解して混合し、得られたピークから検出限界を求めた結果、リン原子換算で 30 fmol/injection であった。これは既存の四重極型 LC-MS/MS によるリン脂質の検出感度に比べて約 10 倍高感度であった。

LC/ICP-MS では化合物の分子量情報が得られないため、検出された化合物の同定は標品による保持時間との照合によって行われる。今回検討した標品の中では、1-パルミトイル-*sn*-グリセロ-3-ホスホコリンと L- α -ホスファチジルエタノールアミンジミリストイルが、抽出液から検出されたピークとそれぞれ保持時間が近かった(図 2-19 に LC/ICP-MS 測定で得られたクロマトグラムを記載する)。一方、併行して(QTOF)LC-MS による分析を行ったが、リン脂質標品は検出されたが、抽出液からリン化合物は検出されず、同定には至らなかった。

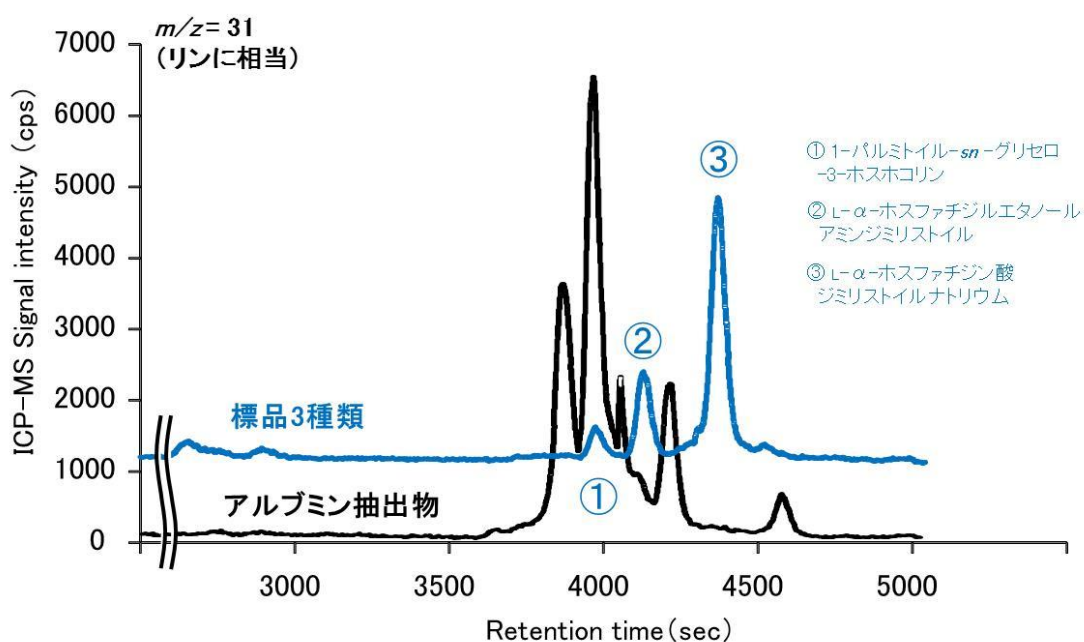


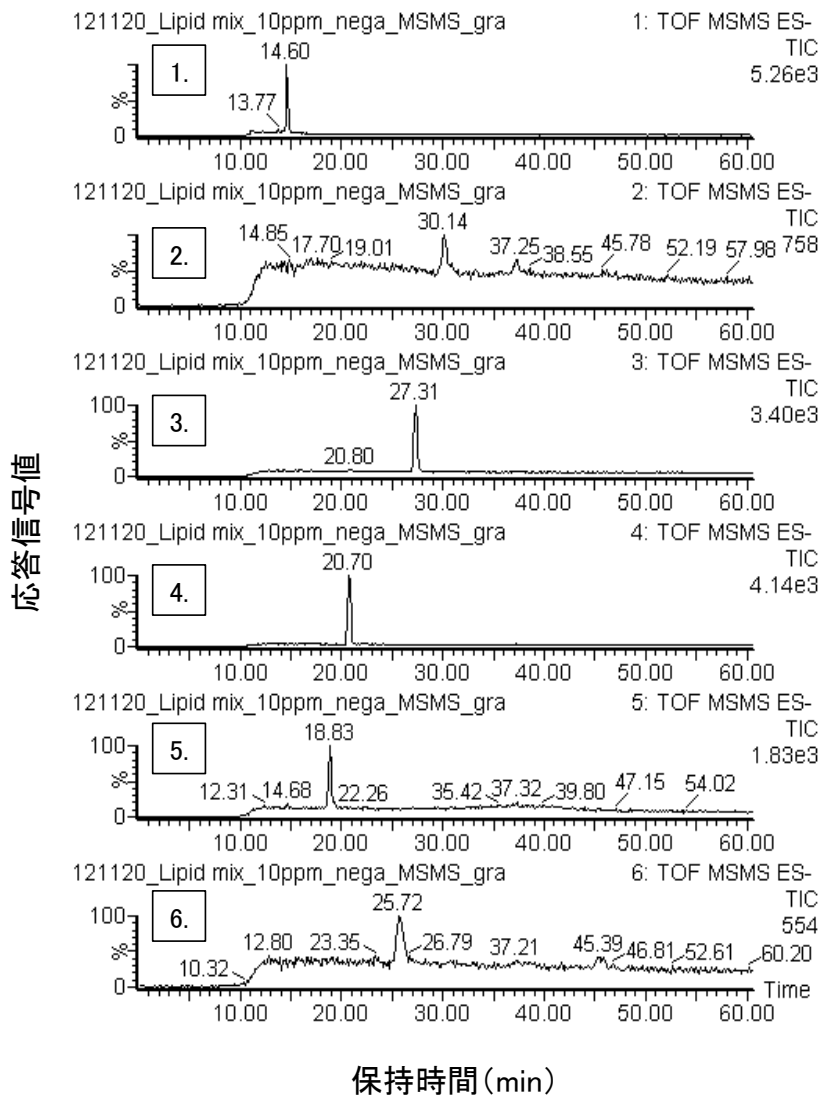
図 2-19 LC/ICP-MS によるリン化合物のクロマトグラム

LC/ICP-MS ではアルブミン抽出液からリン化合物が検出されたが、同一試料を(QTOF)LC-MS で分析しても、リン化合物を検出することはできなかった(図 2-20 に(QTOF)LC-MS によるリン脂質標品のマスクロマトグラムを記載する)。これは、検出装

置である ICP-MS と (QTOF) MS の検出性能の違いによるものと考えられた。

ICP-MS はイオン化にアルゴンプラズマを使うことにより、夾雑成分も含めて目的化合物中の原子を高い効率でイオン化し、検出することが可能である。これに対し、(QTOF) MS で使用している ESI は夾雑成分の影響を受けやすく、特にクロマトグラフィーによる分離の際、同一保持時間に多成分が溶出される場合には、目的化合物のイオン化が阻害される場合がある。今回はアルブミン抽出液という多成分の混合試料であったため、脂質等がリン化合物の溶出位置に重なり、目的化合物が検出されなかったと考えられた。

以上の結果から、LC/ICP-MS はリン化合物を元素特異的かつ高感度に検出できおり、夾雑成分の多い試料への適用が非常に有効であることが示された。ただし、LC/ICP-MS による検出では元素情報以外の化合物情報は失われてしまうため、複雑な混合試料や未知化合物を含む試料ではリン化合物の同定が難しいと考えられる。このため、LC/ICP-MS で検出された化合物をどのように同定するか、その手法開発は今後の課題であると考えられた。



1. 1-パルミトイル-*sn*-グリセロ-3-ホスホコリン, 2. L- α -ホスファチジン酸ジミリストイルナトリウム,
3. L- α -ホスファチジルコリンジパルミトイル, 4. L- α -ホスファチジルコリンジミリストイル,
5. L- α -ホスファチジルエタノールアミンジミリストイル, 6. L- α -ホスファチジルエタノールアミン

図 2-20 (QTOF)LC-MS によるリン脂質標品のマスキロマトグラム

2-4-3 逆相 LC/ICP-MS を使った含硫アミノ酸の分析

LC によるアミノ酸の分析法としては、イオン交換クロマトグラフィーや逆相クロマトグラフィー、最近では HILIC 等が存在するが、それ以外の分離や検出のための手段とし

て、誘導体化という手法がこれまでも用いられてきた[54-59]。

アミノ酸の誘導体化方法としては、ポストカラム誘導体化法とプレカラム誘導体化法の2種類が存在する。GCでは揮発性や熱安定性の付加のため試料の誘導体化が頻繁に行われるが、LCは移動相が液体なので揮発性や熱安定性を付加する必要はない。このためLCの誘導体化はGCほど一般的な操作ではないが、分離能の改善や検出手段の一つとして重要である。アミノ酸はUVで検出しようとした場合、一部の芳香族アミノ酸を除いてカルボキシル基の200~210 nmでの吸収波長しか利用できず、十分な検出感度を得る事ができない。また、いずれのアミノ酸も親水性が高く、逆相カラムでの保持が難しい。このため、分光分析を行うための手段として、誘導体化法が使われている。

本節では、LC用に市販されているアミノ酸の誘導体化試薬の手順[60, 61]に従ってアミノ酸誘導体化物を調製し、逆相系LC/ICP-MSに導入してアミノ酸の分析を行った。試料にはCysとMetの2種類の含硫アミノ酸を含む18種類のアミノ酸混合標品を用い、6-aminoquinolyl-*N*-hydroxysuccinimidyl carbamateで誘導体化してから、 $m/z=34$ を検出してイオウを含む化合物を検出した(図2-21に6-aminoquinolyl-*N*-hydroxysuccinimidyl carbamateによるアミノ酸の誘導体化反応を記載する)。

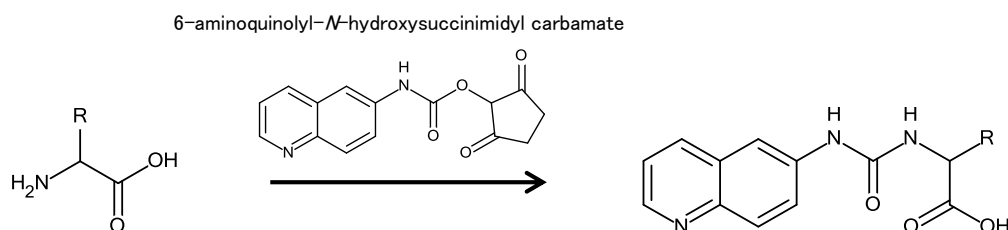


図 2-21 6-aminoquinolyl-*N*-hydroxysuccinimidyl carbamate によるアミノ酸の誘導体化反応

6-aminoquinolyl-*N*-hydroxysuccinimidyl carbamateによるアミノ酸の誘導体物は、キノリノール基の疎水性によって逆相カラムに保持することが可能なため、逆相LCによる分離分析に適している。各アミノ酸は側鎖の差異によって分離され、UV検出器等を用いて、それぞれアミノ酸ごとにクロマトグラムのピークとして検出される。本研究では、検出器としてICP-MSを用い、元素特異的にイオウを検出したため、含硫アミノ酸の

CysとMetだけが検出された(図 2-22 に Cys と Met の構造式、図 2-23 に誘導体化物の構造式を記載する)。

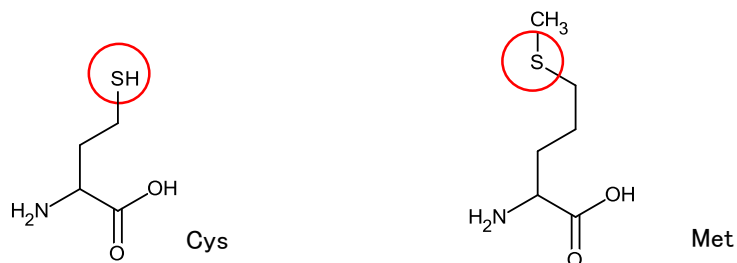


図 2-22 含硫アミノ酸(Cys、Met)の構造式

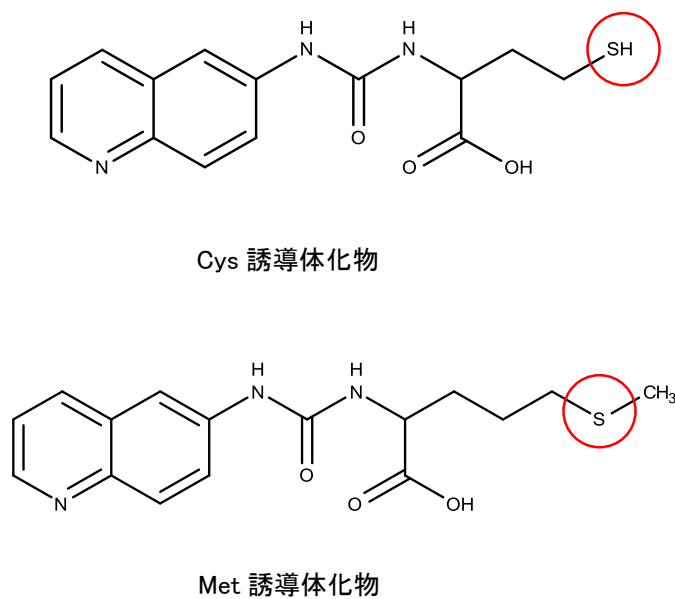


図 2-23 含硫アミノ酸(Cys、Met)誘導体化物の構造式

イオウを選択的に検出するためには、イオウの安定同位体比のうち、最適なものを選択する必要がある。イオウには原子量が 32, 33, 34, 36 の安定同位体が存在するが、天然での存在比は 94.99 : 0.75 : 4.25 : 0.01 である。このため、本来は $m/z = 32$ が最も感度よく測定できるが、 $m/z = 32$ は酸素の分子イオン $^{16}\text{O}^{16}\text{O}$ と重なってしまい、検出器が飽和するレベルの巨大なバックグラウンドノイズを示すために ICP-MS での測定ができない。このため、次に存在比率の高い $m/z = 34$ を選択する必要がある。

しかし、 $m/z = 34$ も $^{16}\text{O}^{16}\text{O}$ より小さいが、 $^{16}\text{O}^{18}\text{O}$ が目的イオンの質量数と重なるため、できる限りコリジョンセル等で分子イオンを除去し、バックグラウンドノイズを低減させることが望ましい。ところが、一般的に酸化物は非常に安定で、コリジョンセルによる分子イオンの分解・除去が難しい[62, 63]。リンの場合は 2-4-2 に記載したように MS のバイアス電圧を操作することで妨害イオンのスリット通過量を低減させ、目的イオンだけを検出するエネルギー分別法が有効であったが、イオウの場合はバイアス電圧を変化させても顕著な改善効果は見られなかった。これは最新のトリプル四重極型 ICP-MS を使って質量選択性をあげてもほとんど差は無く、ICP-MS でイオウを検出する上での今後の大きな課題であると考えられる(表 2-8 にコリジョンセル搭載四重極型 ICP-MS とトリプル四重極型 ICP-MS によるイオウのバックグラウンド値の比較を記載する)。

表 2-8 イオウ測定時のバックグラウンド値および検出限界濃度の比較

| コリジョン搭載四重極型ICP-MS | | | | トリプル四重極型ICP-MS | | | | |
|-------------------|-----|---------|---------|----------------|----------|----------|-----------|---------|
| 測定モード | m/z | BK(cps) | DL(ppb) | 測定モード | m/z (Q1) | m/z (Q2) | BK(cps) | DL(ppb) |
| ガス無し | | 測定不可 | - | ガス無し | | 32 | 216567274 | 22992 |
| | | | | ヘリウム | | 32 | 測定不可 | - |
| 高ヘリウム | 32 | 測定不可 | - | 高ヘリウム | 32 | 32 | 測定不可 | - |
| | | | | 水素 | 32 | 32 | 6214670 | 7411 |
| | | | | 酸素 | 32 | 32 | 測定不可 | - |
| | | | | 酸素シフト | 32 | 48 | 16831 | 5 |
| ガス無し | | 測定不可 | - | ガス無し | | 34 | 測定不可 | - |
| | | | | ヘリウム | | 34 | 679 | 3088 |
| 高ヘリウム | 34 | 868 | 430 | 高ヘリウム | 34 | 34 | 232 | 320 |
| | | | | 水素 | 34 | 34 | 26550 | 2733 |
| | | | | 酸素 | 34 | 34 | 3480 | 93 |
| | | | | 酸素シフト | 34 | 50 | 819 | 5 |

BK : Blank value, DL : Detection limit

※トリプル四重極型 ICP-MS

四重極型質量分析装置を 3 基備えており、Q1 で通過イオンを選択した後、コリジョンセルで分子イオンを分解し、Q2 で選択的に目的イオンを検出する MS/MS 測定が可能。高い質量分別効果があり、分子イオンによる干渉を受けやすい元素でも高感度に分析できるとされる。

※ICP-MS の測定モード

ガス無し : コリジョンセル内へのガス導入無し

ヘリウム : コリジョンセルへのヘリウムガス導入条件

高ヘリウム : 高いプラズマエネルギーとコリジョンセルへのヘリウムガス導入の併用条件

水素 : コリジョンセルへの水素導入条件(トリプル四重極型でのみ実施)

酸素 : コリジョンセルへの酸素導入条件(トリプル四重極型でのみ実施)

酸素シフト : コリジョンセルに酸素を導入し、Q1 でイオウイオン(S⁺)を検出した後、Q2 で一硫化酸素イオン(SO⁺)を検出する条件

酸素原子を付加することで、妨害を受ける質量数から妨害を受けない質量数に変えて検出するトリプル四重極型でのみ可能な測定モード

図 2-24 に LC/ICP-MS によるアミノ酸誘導体化物のクロマトグラムを記載した。S のバックグラウンド値を低減する ICP-MS 分析条件を検討したが、移動相中の水溶液比率が高い測定条件では、水分子の中の酸素原子が影響して妨害イオンが増大するため、十分な効果は得られなかった。このため図 2-24 に示したように、移動相中の水の比率が高い間はクロマトグラムのベースラインが高くなり、グラジエント分離でアセトニトリル濃度を高くなるにつれてベースラインが低下するという傾向を示した。

本研究ではベースラインの変動は避けられなかったが、試料中のアミノ酸誘導体化物の濃度が十分に高い場合は、含有アミノ酸の検出が可能であった。ただし、ベースラインが高いことから高感度分析は難しく、検出限界は 1 pmol/injection であった。これは UV 検出を使った既存のプレカラム誘導体化 LC 法とほぼ同等の検出感度であり、蛍光検出法やプレカラム誘導体化 LC-MS/MS 法には及ばなかった。また、インジェクションショックによる圧力変動や ICP-MS 側の汚れ等の影響を受けやすく、クロマトグラムに小さなピーク状のノイズが観測された。

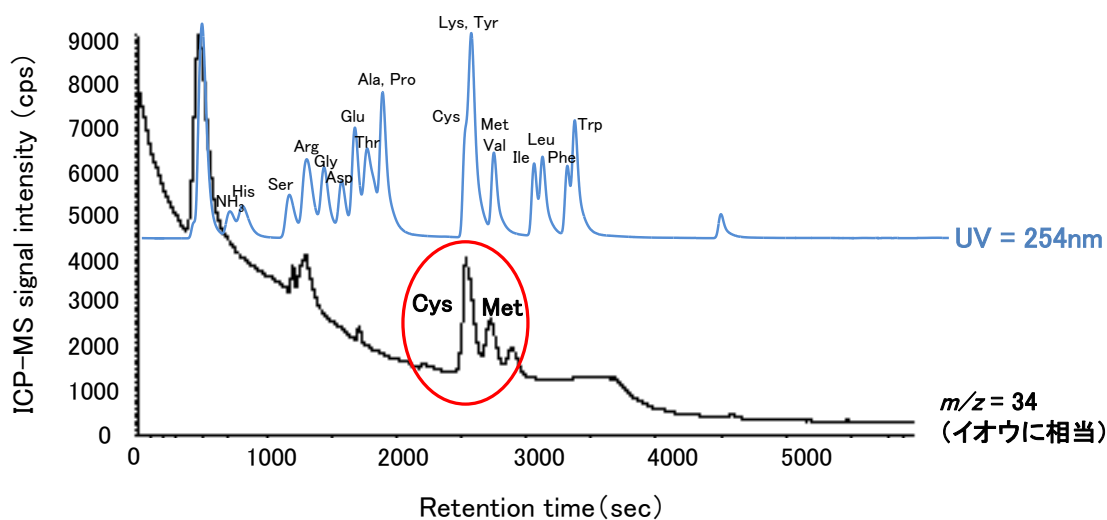


図 2-24 LC/ICP-MS によるアミノ酸誘導体化物のクロマトグラム

第三章 金属タグ化試薬を使った高感度アミノ酸分析法の開発

3-1 序論

アミノ酸は親水性が高く、特徴的な吸収波長も持たないため、分離や検出を容易にする目的から誘導体化試薬を用いて分析する方法が一般的に広く用いられてきた。その中で、アミノ酸をカラム分離後に検出用の試薬と反応させて分析する方法はポストカラム誘導体化法、アミノ酸を先に試薬と反応させてからカラムで分離する方法はプレカラム誘導体化法と呼ばれている[64, 65]。

ポストカラム誘導体化法はイオン交換クロマトグラフィー等でアミノ酸を分離した後、カラム溶出液にニンヒドリンや OPA 等を反応させて検出を行う[66, 67]。この分析法は、いったん装置内の反応系を最適化すれば広範囲の試料に適用でき、定量性や再現性に優れるため、特にルーチン分析に適している。ただし、試料や装置に応じた分析条件の変更が難しく、分析のハイスループット化や高感度化にも不向きであるため、微量の生体試料分析にはあまり適していない。

プレカラム誘導体化法は、先にアミノ酸と誘導体化試薬 (phenylisothiocyanate や fluorescamine、5-(dimethylamino) naphthalene -1-sulfonyl chloride、6-aminoquinolyl -*N*-hydroxysuccinimidyl carbamate、APDS 等) を反応させたのち、逆相クロマトグラフィー等で分離し、蛍光検出器や MS 等の適切な検出器で検出を行う分析法である[59, 64, 68-70]。逆相カラムを用いることでイオン交換カラムでは困難であった分析時間の短縮が可能となり、高感度化にも様々な誘導体化試薬が存在するために対応しやすい。表 3-1 にプレカラム誘導体化法とポストカラム誘導体化法の特徴を記載したが、特に検出器に MS を用いたプレカラム誘導体化 LC-MS 法は、多くの物質を高感度に分析することが可能であるため、昨今の生命科学分野において非常に重要な分析法となっている。

表 3-1 プレカラム誘導体化法とポストカラム誘導体化法の比較

| | プレカラム誘導体化法 | | ポストカラム誘導体化法 | |
|------------|---|-------|--|----------|
| 検出感度 | ◎ | 非常に高い | × | 低い |
| 定量性 | ○ | 高い | ◎ | 非常に高い |
| 分析のスループット | ○ | 良い | × | 悪い |
| 試料マトリクスの影響 | ○ | 受けにくい | ◎ | ほとんど受けない |
| 使用する試薬の量 | ○ | 少ない | × | 多い |
| 検出試薬の種類 | ◎ | 非常に多い | △ | 少ない |
| 反応の自動化 | △ | 複雑 | ○ | 単純 |
| 分析法の特徴 | 試料によっては前処理など分析条件の確立が必要だが、高感度が必要な実験に適した分析法 | | 装置内の反応系を最適化する必要があるが、広範囲の試料に適用でき、定量性に優れたルーチン作業に適した分析法 | |

しかし、プレカラム誘導体化 LC-MS 法にも課題がいくつか存在する。例えば、分析対象によって検出感度が大きく異なるため、分析には既知の標品が必須であり、多成分の同時分析では検量線範囲にも注意が必要である。また検出時には、光学検出器を使ったプレカラム誘導体化法よりも試料マトリクスの影響を受けやすいため、分析対象のピークに他の夾雑物のピークが重なっていると、検出感度への影響が大きい。このため、定量分析には安定同位体による内標補正が有効であるが、内標の入手が困難であったり、内標を使っても十分には補正できなかつたりする場合がある。

通常の MS が試料マトリクスの影響を受けやすい一方で、ICP-MS は比較的試料マトリクスに強い分析法である。ICP-MS は LC-MS と同様に MS を検出器として持つ分析装置であるが、イオン化源として ESI の代わりに高温・高エネルギーな ICP を利用している(図 3-1 に ESI によるイオン化の仕組みを記載する)。この ICP は夾雑物も含めて試料中のほとんどの化合物を高効率でイオン化することができるため、試料マトリクスの影響が少なく、低濃度から高濃度まで、どの領域でも検出感度と定量精度が高い。このため、LC-MS では定量が難しい生体試料中の微量タンパク質やペプチドを、プレカラム誘導体化 LC/ICP-MS 法で検出/定量する取り組みが報告されはじめている[37, 71-73]。そこで本章では、本研究で行ったアミノ酸分析用の新規金属タグ化試薬の開発結果について報告する。

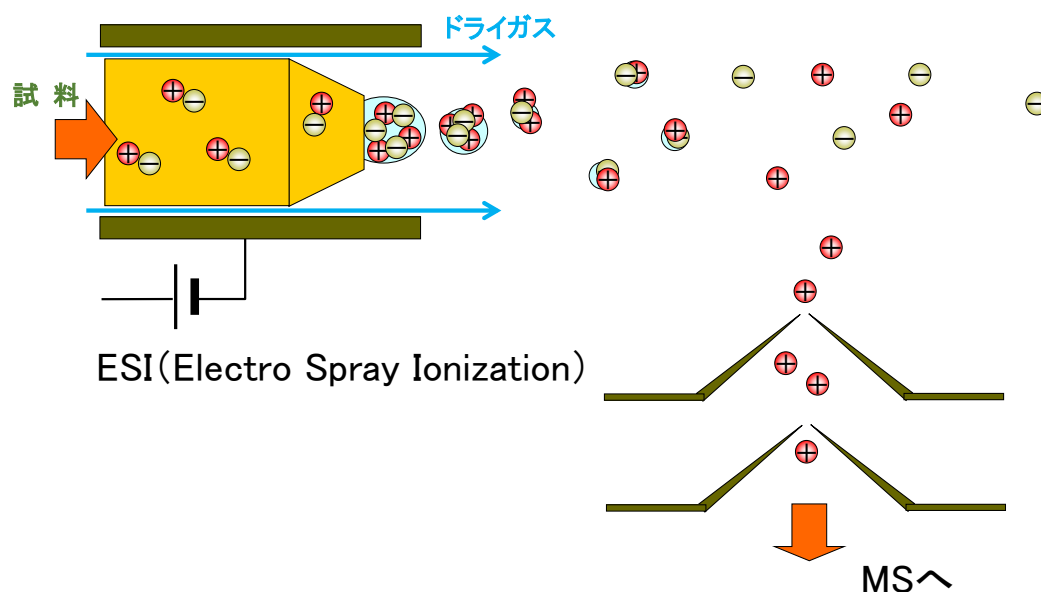


図 3-1 ESI によるイオン化のしくみ

※試料溶液は 3~5 kV 程度の高電圧を印可したキャピラリに導入され、キャピラリの外側からドライガス(ネブライザーガス)を流しスプレーすることで、印可した電圧と同符号の細かな帯電液滴が生成される。帯電液滴は移動の過程で溶媒の蒸発と表面電場の増加が進み、電荷同士の反発力が液体の表面張力を越えると分裂する。

蒸発と分裂を繰り返すことによって微細な液滴になり、最終的には試料由来の分子イオンが気相中に放出される(イオン蒸発)。気相中に放出された分子イオンは印加電圧によって MS 内部に導入されて検出される。

ESI は最もソフトなイオン化法で、高極性、難揮発性、熱不安定化合物に適用が可能である。そのかわり、物質によってイオン化の効率が大きく異なり、夾雑物によるイオン化阻害も大きい。

3-2 金属タグ化試薬の開発

3-2-1 金属タグ化試薬の歴史

最初に有機化合物を金属で検出しようと試みたのは、中国の Zhang らのグループである。2001年に彼らは thyroid hormone に抗体反応を利用して Eu を結合させ、ICP-MS で Eu を検出し、その応答信号値から thyroid hormone を定量した[74]。また、ほぼ同時期の 2002 年には、Baranov らのグループも抗体反応を利用して Eu や Au のナノパーティクルを IgG に結合させ、ICP-MS を使って定量した結果を報告している[75]。

しかし彼らの研究は、どちらの場合もオフラインで金属結合抗体を精製・分取し、それを酸抽出もしくは酸溶解した後、ICP-MS を使って Eu や Au を検出/定量するということであった。これは有機化合物を分析する手法として積極的に金属を利用したと言うよりも、もともとの抗体-試薬結合物が Eu や Au を含んでいたことに着目し、その中の金属を ICP-MS で分析しただけで、酸による前処理後に ICP-MS で検出するという、従来からの伝統的な無機元素分析手法と変わりはなかった(表 3-2 に無機分析法の特徴を記載する)。

表 3-2 一般的な無機分析法と抗体-金属結合物分析法の分析手順の比較

| 一般的な無機分析法 | |
|------------|--|
| 試料 | 生体、環境、その他 |
| 前処理手順 | ①試料に塩酸などの強酸を添加 ②よく混合し、金属を抽出/溶解 ③純水で希釈し、ICP-MSで検出/定量 |
| Zhangの方法 | |
| 試料 | 抗体-Eu結合物 |
| 前処理手順 | ①抗体-Euを緩衝液で洗浄後、1%硝酸を添加 ②Euを抽出/溶解 ③硝酸で調製し、ICP-MSでEuを検出/定量 |
| Baranovの方法 | |
| 試料 | 抗体-nanoAuコロイド結合物 |
| 前処理手順 | ①抗体-Auをろ過後、硝酸/フッ化水素酸を添加 ②Auコロイドを溶解 ③ICP-MSでAuを検出/定量 |

次に、2004年に Whetstone らはタンパク質の Cys 残基に着目し、特異的に金属を結合させる手法を開発した[72]。この時に使用された試薬は DOTA という二官能性試薬で、金属タグ化試薬の中に Cys 残基と反応するイソチオシアネート基と、金属と結合

するキレート部位を有していた。この手法は MCAT と名付けられ、DOTA のような構造を持つ試薬を総称して MCAT 試薬と呼ばれるようになった(図 3-2 に DOTA 試薬の構造式の例を記載する)。それ以降現在に至るまで、ICP-MS を使ったタンパク質の検出には、ほとんどの場合にこの MCAT 試薬が利用されている[76-79]。

Whetstone らは、Zhang らとは異なり、分析対象を金属タグ化した後、分取や酸による前処理を行うことなく、HPLC とオンラインで結合した ICP-MS を使って直接分析対象を検出した。この手法は分取や酸分解という複雑な前処理工程を経ないため、分析のハイスループット化が可能であり、本来は ICP-MS では検出できない有機化合物を外部から検出可能な金属を結合させて測定するという、これまでの無機分析手法には無かったアプローチであった。Whetstone らはサイズ排除系の HPLC と ICP-MS をオンラインで結合し、タンパク質やポリペプチドを検出することにも成功しており、金属タグ化試薬による有機化合物の分析法研究はここから始まった。

しかしこれまでの研究では、分析対象は高分子化合物のみで、使用する液体クロマトグラフィーはサイズ排除クロマトグラフィーやアフィニティクロマトグラフィーのような純水系に限られており、アミノ酸のような低分子を分析対象にして逆相系クロマトグラフィーを用いて分析した例は無かった。

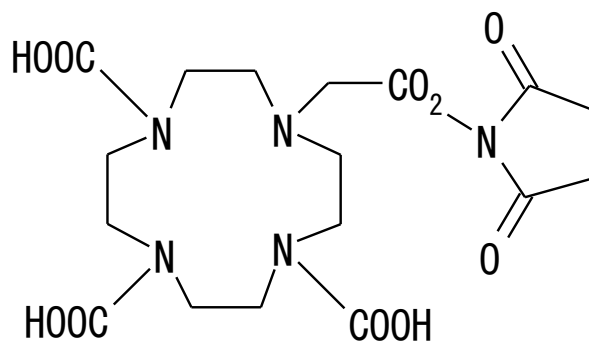


図 3-2 DOTA を含む誘導体化試薬の構造式

3-2-2 金属タグ化試薬の性質と用途

金属タグ化試薬は、有機化合物を ICP-MS 等の無機分析装置で検出するために金属タグを結合する試薬である。金属タグは無機分析装置で検出可能な検出基であり、金属原子、金属コロイド、ナノ粒子、もしくは他の金属化合物等を含んでいればどのような化学形態でもよく、金属タグ化試薬は金属タグを分析対象である有機化合物に結合するための反応基(もしくは結合部位)を備えている(図 3-3 に金属タグ化試薬の一般的な構造を記載する)。

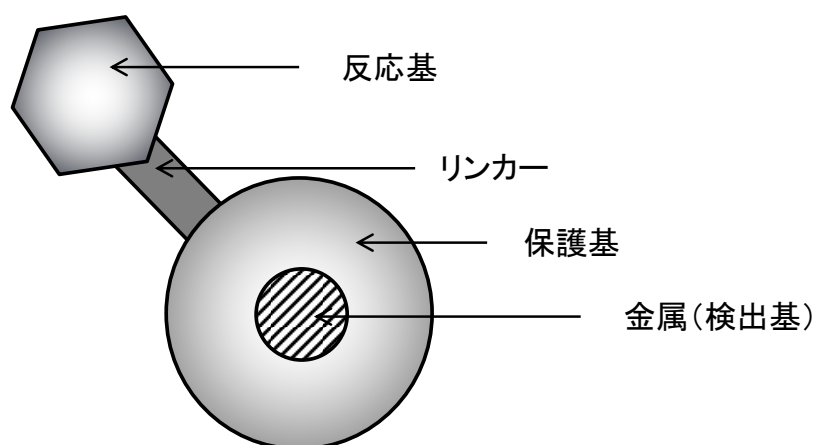


図 3-3 金属タグ化試薬の一般構造

上記の検出基と反応基以外にも、金属タグ化試薬は検出基と反応基をつなぐリンカーや、金属を安定化させるための保護基を持っていることが多い。これらは金属タグ化試薬の反応性や安定性などを向上させることができるが、試薬の機能としては必ずしも必須ではない。また、検出基と反応基が一緒であるというケースとして Hg なども存在する。Hg はチオール基との反応性が高く、ICP での検出も可能なため、最も単純な例では水銀イオンだけでも金属タグ化試薬として機能する。このため、タンパク質の分析法として低分子水銀化合物を使った分析例が研究されている[80]。

金属タグは、使われている金属の化学形態から分類すると、以下の 3 つに大別することができる。

【金属タグの分類】

- ① キレート化合物をベースとした金属タグ[81-87]
- ② 共有結合をベースとした金属タグ[88]
- ③ ナノ粒子をベースとした金属タグ[89, 90]

この中で①のキレート化合物をベースとした金属タグは、最も一般的な金属タグ化試薬として用いられている。キレートとは一つもしくは複数の中心金属の周りに配位子を持ち、イオン結合によって安定化している物質の総称であるが、金属と配位子の選択によって非常に強固な結合を形成し、金属を安定化させることができる。このためキレートの種類を選択する事で、クロマトグラフィー等による分離過程を経ても金属を安定化させることができ、LC-ICP-MS として金属タグを検出することが可能である。

金属タグとしてのキレート化合物の条件は、中心金属が化合物として安定であることと、無機元素分析装置で検出可能な金属を含んでいるという 2 点である。図 3-2 に示した DOTA はこのキレート型金属タグ化試薬の代表例であり、1, 4, 7, 10-tetraazacyclododecane が配位子として中心の金属を安定化させている。この 1, 4, 7, 10-tetraazacyclododecane は多くの種類の金属とキレート化合物を形成することが可能で、二価の遷移金属であれば安定度定数が 10 以上、ランタノイド類のような三価の金属であれば 20 以上である。他にも安定度定数の高い安定なキレート化合物は多く存在するため、キレート化合物は金属タグとして非常に有用である。

②の共有結合をベースとした金属タグは、非常に強固な結合を持っているため誘導体化合物中の金属も非常に安定であり、分析試薬として有用であるが、キレート化合物ほど化合物の選択肢は多くない。例えばリンやイオウは金属ではないが、共有結合を形成して ICP-AES や ICP-MS で検出が可能のため、金属タグとして利用することができる。ただし、もともとの分析対象がリンやイオウを含んでいる場合、金属タグとしてさらに付加しなくても分析が可能であるため、その場合は Native-tag もしくは Natural-tag と呼ばれ、金属タグ化試薬による誘導体化を行わずに、直接分析するという手法がとられている。また、Au や Hg、Sn などの金属も共有結合を形成するため、金属タグ化試薬の候補となりうる。特に Au などの貴金属類は、SAM を形成させる目的でチオール基を有する様々な試薬が開発されているため、金属タグ化試薬のベースとして利用することができる[91]。

③のナノ粒子をベースとした金属タグは、1~100 nm 程度の大きさの微小粒子を使用する。ナノ粒子は、シリコンや粘土、半導体原料、金属などの材質が多く、いずれも無機分析系で検出できる材質であれば利用することが可能である。しかし、現在実用

的に研究されているのは、金属を材質に使用したナノ粒子だけである。金属ナノ粒子のうち、金や白金、銅などのナノ粒子は、共有結合としても使われている SAM 用の試薬が利用できるため、金属タグとして有用である。ただし、ナノ粒子をベースとした金属タグは、モル数へ変換に必ずナノ粒子標品が必要で、その標品もナノ粒子を均一の粒径にそろえることが重要である。

3-2-3 アミノ酸分析用金属タグ化試薬の開発

これまでにタンパク質やペプチドを対象として金属タグ化分析法を開発した報告は行われているが、アミノ酸のような低分子を対象とした研究は行われていない。そして金属タグ化分析法は、分析対象によって使用する金属タグ化試薬や分析手段を全く別のものに変える必要がある[92]。そこで 3-2-3 では、アミノ酸分析を目的とした金属タグ化試薬の開発を行った。

現在、金属タグ化試薬として一般的に利用されている DOTA は、タンパク質やペプチドを分析対象とした金属タグ化試薬であるため、水溶液中での溶解性を高める目的で親水性の高い試薬構造を持っている。また分析対象が高分子であるため、逆相 LC を使った化学構造による分離は考慮されていない。これに対してアミノ酸は、いずれも低分子化合物で非常に親水性が高く、分析対象のほとんどが類似構造を持つ化合物群であるという特徴がある。このためアミノ酸分析用の金属タグ化試薬としては、次の 4 つの要件を満たす必要がある。

【アミノ酸分析用の金属タグ化試薬の必要要件】

- ①アミノ酸と反応して金属と安定した結合体を形成する
- ②ICP-MS で検出が容易な金属(もしくは原子)を含有する
- ③高い分離能が必要なため、逆相系 LC で保持・分離可能な適度な疎水性を有する
- ④移動相や逆相系カラム内で金属が解離や吸着を生じない構造を有する

まず「①アミノ酸と反応して金属との結合体を形成する」という要件に関しては、特異的にアミノ酸と反応する化合物が望ましく、また簡便かつ速やかに反応する物が適している。2-4-2 に記載したが、芳香族アミノ酸を除いてアミノ酸には特徴的な吸収波長が存在しない。このため、古くからアミノ酸分析には検出を目的とした誘導体化が行われてきた。そして表 3-3 に記載したように、現在ではアミノ酸と反応する非常に多くの誘導体化試薬が報告されている。

そこで本研究では、使用実績が多く、アミノ基との反応時間が早いスクシンイミジルカルバメート構造を金属タグ化試薬の一部として選択した。スクシンイミジルカルバメー

トは C、H、O、N の 4 元素だけで構成され、ICP-MS での検出に妨害となる元素を含んでいない。このため、アミノ酸分析用の金属タグ化試薬に適していると考えられた。

表 3-3 液体クロマトグラフィーで使用される誘導体化試薬と反応基の分類

| Derivative reagents | Reactive groups | Detections |
|--|--|----------------------|
| nitorobenzenes | primary and secondary amines, polyamine | UV-VIS |
| ninhydrin | primary amine | UV-VIS |
| disuccinimido carbonate | primary and secondary amines | UV-VIS |
| 4- <i>N</i> , <i>N</i> -dimethylaminoazobenzene-4'-sulfonyl chloride | primary and secondary amines, thiol, imidazole, phenol and aliphatic hydroxyl group | UV-VIS |
| acetic anhydride | tertiary aliphatic amine | UV-VIS |
| benzoyl chloride | di- and polyamines | UV-VIS |
| dimethylaminobenzaldehyde | primary aromatic amine | UV-VIS |
| phenylisocyanate | primary and secondary aromatic amines (active hydrogen atom) | UV-VIS |
| <i>o</i> -phthalaldehyde | primary amine | UV-VIS, fluorescence |
| fluorescamine | primary amine | UV-VIS, fluorescence |
| sulfonyl chloride | primary and secondary amines | UV-VIS, fluorescence |
| carbonyl chloride and fluoride | primary, secondary and tertiary amines, and alcohol | UV-VIS, fluorescence |
| 1,2,-naphtoquinone-4-sulfonate | primary and secondary amines | UV-VIS, fluorescence |
| isocyanate and isothiocyanate | primary, secondary and tertiary amines, urea, but also react with alcohol, water, phenol and carboxylic acid | UV-VIS, fluorescence |
| succinimidyl | amino acid | UV-VIS, fluorescence |
| benzofurazan | primary and secondary amines | UV-VIS, fluorescence |
| oxazole | amine, thiol and alcohol | UV-VIS, fluorescence |

金属と安定した結合体を形成させる方法については、アミノ基との反応基とは別に、金属を安定して保持させる工夫が必要である。3-2-2 で金属タグとして使われる物質をまとめたが、本研究では金属タグとして金属の種類とベースとなる化合物の選択肢が多くイキレート化合物を選択した。

「②ICP-MS で検出が容易な金属(もしくは原子)を含有する」という要件に関しては、ただ検出可能なだけでなく、ICP-MS での検出感度が高く、なおかつ環境や試料からの汚染の可能性が低いものが、実際に分析で使用する金属タグ化試薬として適している。表 3-4 にキレート化合物を形成する金属を貴金属類、13 族類(3 価のイオンになりやすい)、希土類、遷移金属に分け、その中の代表的な金属について適正をまとめた。

表 3-4 ICP-MS 用タグとしての金属の適正評価結果

| | 貴金属類(Ru) | 13族類(In) | 希土類(Eu) | 遷移金属(Fe) | 遷移金属(Zn) |
|---------------|----------|----------|---------|----------|----------|
| ICP-MSによる検出感度 | ○ 高い | ◎ 非常に高い | ◎ 非常に高い | × 非常に低い | △ 低い |
| 環境からの汚染性 | ◎ 非常に低い | ◎ 非常に低い | ○ 低い | × 高い | × 高い |
| 生体試料中の存在量 | ◎ 非常に少ない | ◎ 非常に少ない | ○ 少ない | × 非常に多い | △ 多い |
| キレート化合物の安定性 | ◎ 非常に高い | ◎ 非常に高い | ◎ 非常に高い | ◎ 非常に高い | ○ 高い |

これらの性質から、貴金属類と13族類が中心金属の候補として挙げられ、その中でもRuは光化学分野などで様々なキレート化合物が合成/報告されており、錯体の安定度定数も高い [93]。そこでRuを金属タグ化試薬の中心金属として選択した。

「③高い分離能が必要なため、逆相系 LC で保持・分離可能な適度な疎水性を有する」という要件は、構造異性体が多く存在するアミノ酸を個別に検出・定量するために必須である。金属タグ化試薬に限らず、高い分離能を得るため、プレカラム誘導体化を行ったアミノ酸誘導体化合物は、逆相 LC を使って分離することが一般的である。アミノ酸はいずれも非常に親水性が高く、そのままでは逆相カラムに保持することが難しい。このためプレカラム誘導体化法では、誘導体化試薬として疎水性が高い化合物を用い、誘導体化合物に適度な疎水性を付加している。

これまでに報告されているタンパク質用の金属タグ化試薬は、アミノ基との反応性を有しているものもあるが、いずれもキレート化合物の親水性が高く、逆相系でのアミノ酸分析には適していない。一方で、これらの金属タグ化試薬に疎水性の官能基を付加した場合、金属タグ化試薬の構造が大きくなり過ぎ、誘導体化合物の LC による分離が難しくなることが考えられる。そこで、本研究ではキレート化合物から極力水酸基な

どの親水性官能基を除き、金属キレート部分の疎水性でアミノ酸をカラム内に保持させることにした。

「④移動相や逆相系カラム内で金属が解離や吸着を生じない構造を有する」という要件に関しては、まず③の要件を考慮し、報告されている Ru キレート化合物のうち、安定度定数が 10 以上であるビピリジンキレートをキレートのリガンド候補とした。以上、4 つの要件を満たした化合物として、BCRS をアミノ酸分析用金属タグ化試薬として決定した(図 3-4 に BCRS の構造、図 3-5 に BCRS とアミノ酸の反応を記載する)。

アミノ酸の分析は、弱塩基性条件で誘導体化反応を行った後、弱酸性～中性の移動相を使って ODS カラム等の逆相系カラムによる分離が行われる。このため、弱酸性の pH や逆相系カラム内で金属の解離や吸着を生じないようにする必要がある。特に、キレート化合物は ODS カラム内の残存シラノール基によって影響を受けやすいため、テーリングや吸着、分解が起きていないか確認しなくてはならない。

キレート化合物の分析例としては、1997 年に Otani らが nitro-PAPS を鉄イオンと反応させ、ODS カラムで分離した例が報告されている[94, 95]。nitro-PAPS/鉄キレートではないが、類縁体である nitroso-PAPS/鉄キレートの安定度定数は 9.3 と報告されている[96]ため、これ以上の安定度定数を持ち、正八面体構造を形成するビピリジンの *tris*キレート(安定度定数 11.1)を金属タグ化試薬のベースとした。

ODS カラムへのキレート化合物の吸着原因は、ODS カラム内の残存シラノール基に金属イオン(特に鉄イオン)が結合し、その結合金属にキレート化合物が吸着するためだと考えられている。このため、使用する ODS カラムは高度にエンドキャッピング処理が行われ、残存シラノール基を極力減らしたものを使うこととした。また、実際に金属タグ化試薬を LC/ICP-MS に導入し、溶出ピークがテーリングを起こしていないことと、デッドボリュームでルテニウムイオンが溶出されていないことを確認した。

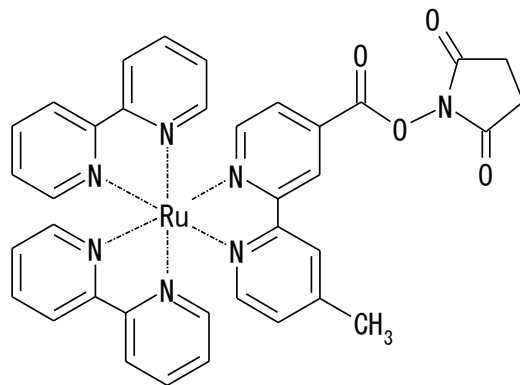


図 3-4 アミノ酸分析用金属タグ化試薬(BCRS)の構造式

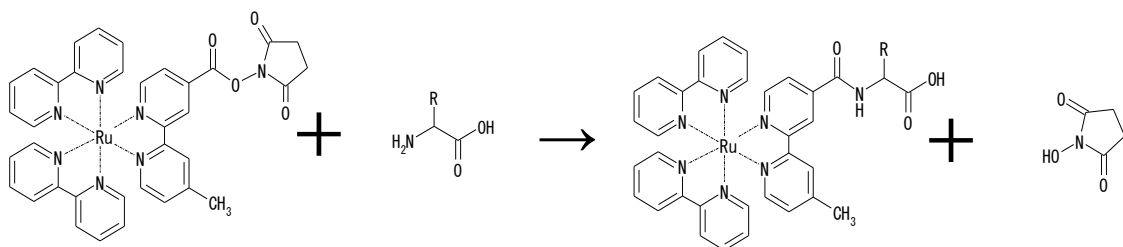


図 3-5 BCRS とアミノ酸の反応

3-3 金属タグ化試薬を使った高感度アミノ酸分析法の確立

3-3-1 金属タグ化試薬によるアミノ酸の誘導体化条件の検討

新しく開発した金属タグ化試薬の BCRS を用い、アミノ酸の誘導体化条件の最適化検討を行った。まず誘導体化反応に対する pH の影響を調べるため、リン酸緩衝液 (pH 8.0 以下) とホウ酸緩衝液 (pH 8.0 以上) を用いて反応を行った。その結果、図 3-6 に記載したように、pH 8.0 で誘導体化効率が最も高いことが分かった。

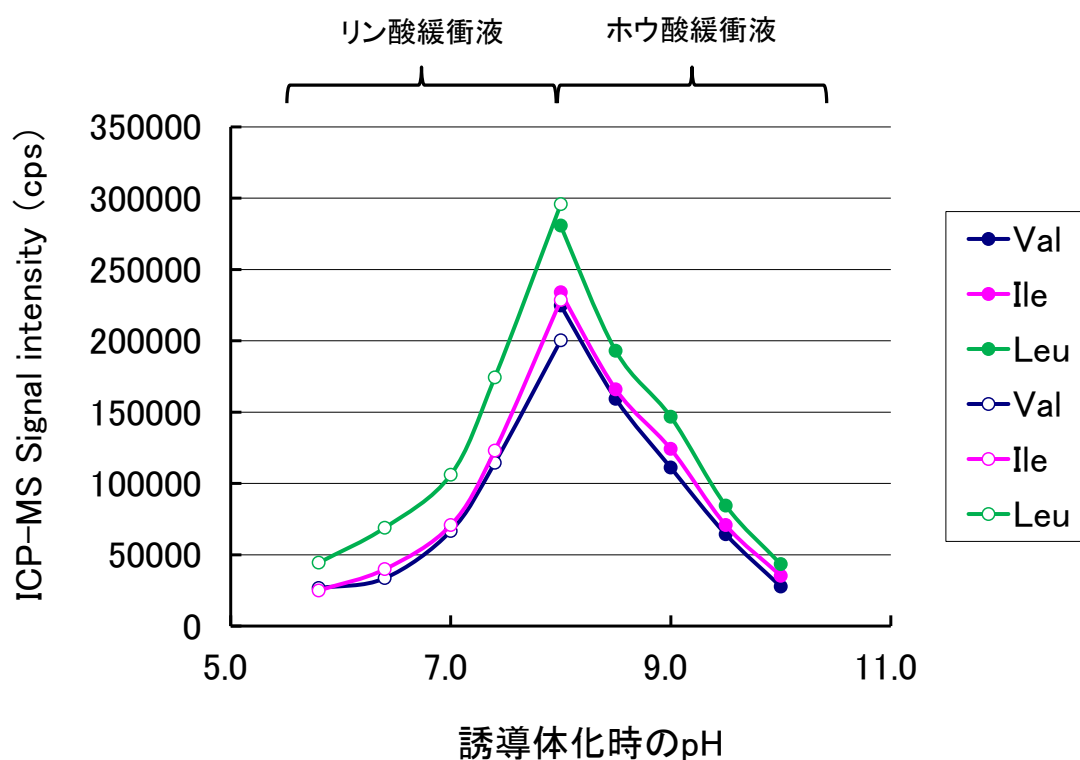


図 3-6 pH に対する金属タグ化試薬とアミノ酸の反応性

次に誘導体化反応に対する有機溶媒濃度の影響を調べるため、pH 8.0、200 mmol/L のホウ酸緩衝液にアセトニトリル濃度を変えて添加し、反応を行った。その結果、図 3-7 に記載したようにアセトニトリル濃度が 40 %のときに誘導体化効率は最も高くなり、それ以上のアセトニトリル濃度ではほとんど誘導体化されなかった。

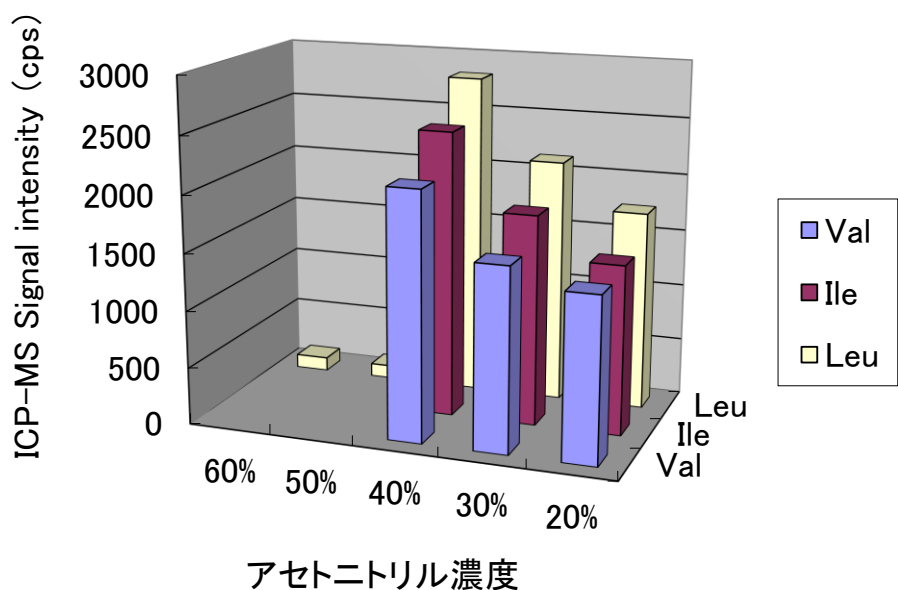


図 3-7 アセトニトリル濃度に対する金属タグ化試薬とアミノ酸の反応性

3-3-2 LC/ICP-MS による金属タグ化アミノ酸の検出

金属タグ化試薬によるアミノ酸の誘導体化は、3-3-1 で検討した結果に基づき、200 mmol/L、pH 8.0 のホウ酸緩衝液中において行った。アミノ酸標品は 0.1 mol/L 塩酸溶液にして冷凍保存しておいたものを溶解し、適宜希釈して用いた。金属タグ化試薬は冷凍保存しておいたものを、使用時にアセトニトリルに溶解して使用した。誘導体化反応にはアルミ製のブロックヒーターを用い、55 °Cで 90 min 加熱後、1 mol/L の酢酸アンモニウム溶液を添加して pH を調整した。調製後の溶液は 4 °Cで保存し、速やかに LC/ICP-MS 分析に供した。

装置は流速 50 μ L/min で送液を行うため、フロント LC にマイクロフロー LC システムを用いた。ICP-MS による検出は、プラズマエネルギーを 1540 W に設定し、有機溶媒によるイオン化効率の低下を防止して、 $m/z = 101$ もしくは 102 で Ru 由来のプラズマイオンを検出した。その結果、アミノ酸を金属タグによって検出することができた。図 3-8 にはアミノ酸標品をそれぞれ誘導体化し、LC-UV で検出した結果を、図 3-9 にはア

ミノ酸標品を混合した混合標品を誘導体化し、一斉に LC/ICP-MS および LC-UV で検出した結果を記載した。図 3-9 を見ると、ICP-MS ではいずれのアミノ酸もほぼ同じ強度で UV に比べて大きなピークが検出されており、ベースラインもバックグラウンドノイズは低値で安定していた。このことから、LC/ICP-MS が低濃度のアミノ酸の検出に適していることが確認された。

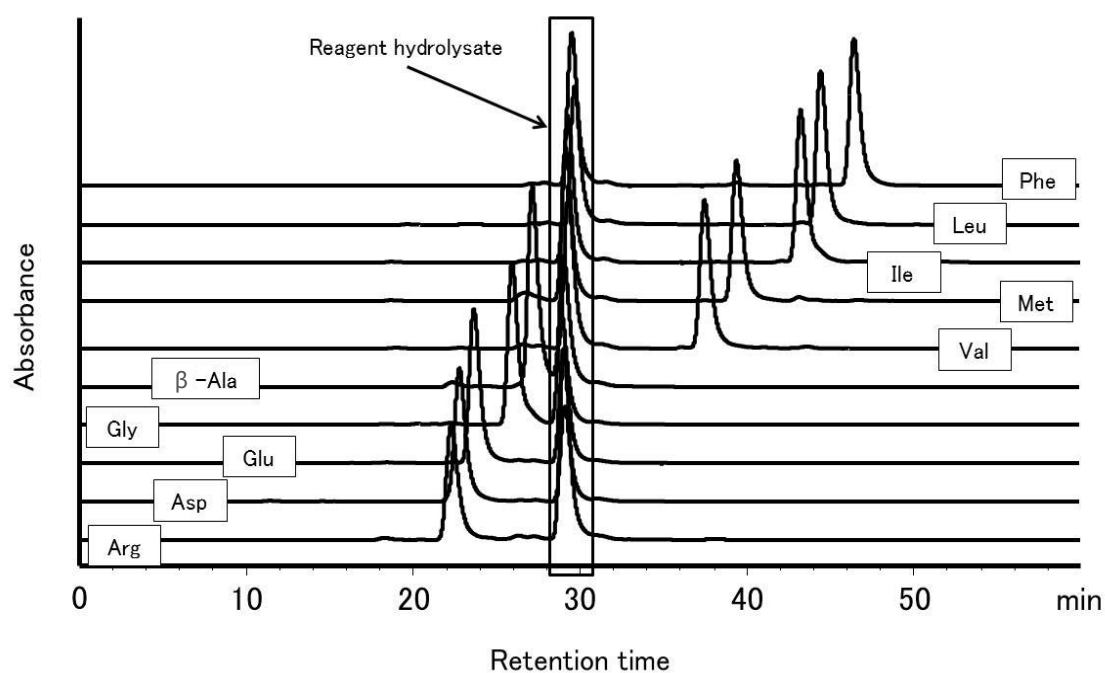
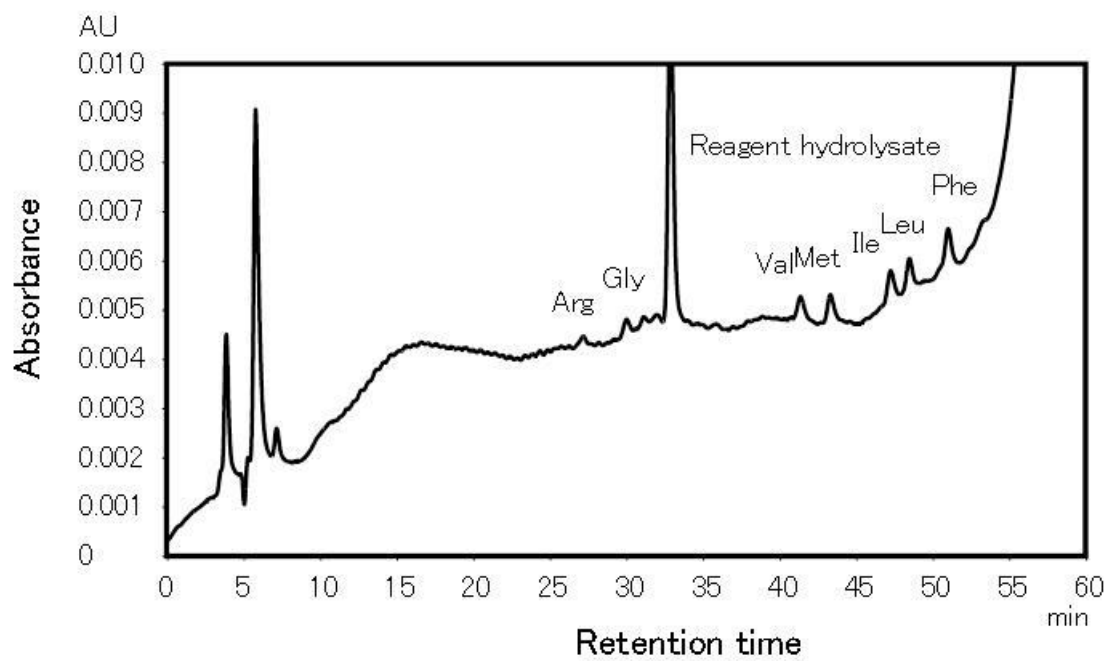
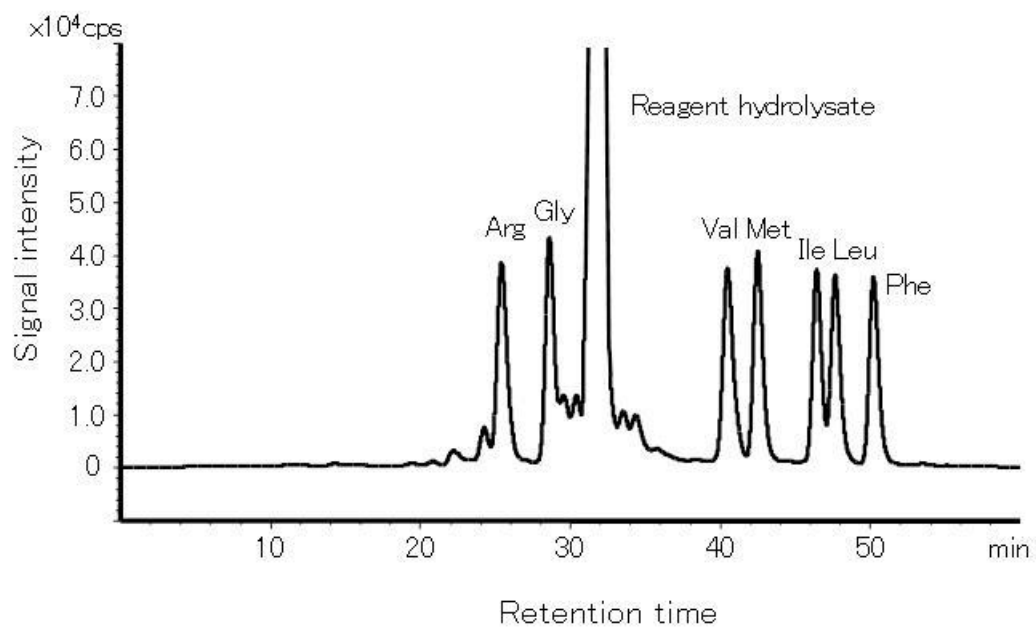


図 3-8 金属タグによるアミノ酸標品誘導体化物のクロマトグラム
(UV = 254 nm にて検出)



上段:ICP-MS、下段:UV 検出(254 nm)

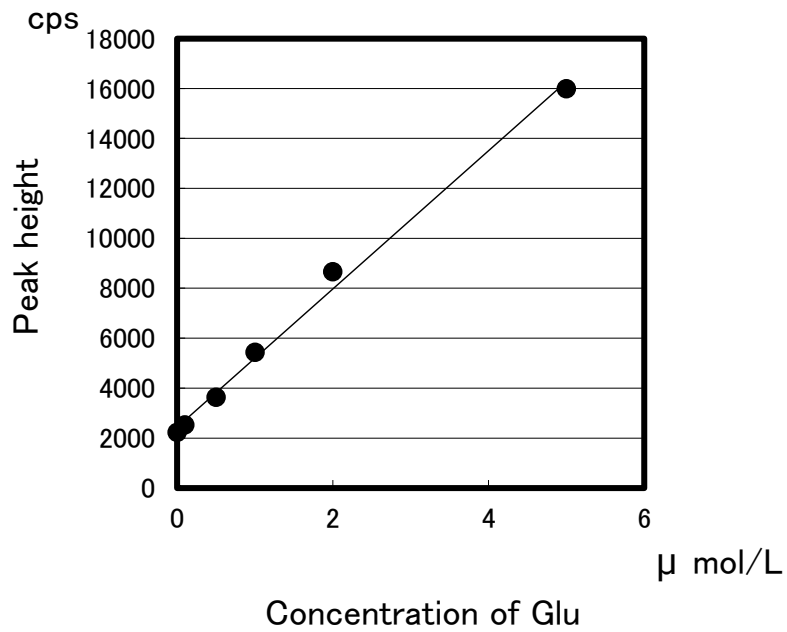
図 3-9 金属タグ化分析法によるアミノ酸標品混合物のクロマトグラム

3-3-3 金属タグ化分析法によるアミノ酸の分析バリデーション

バリデーションとは、米国FDAによるGLP規制から始まった考え方で、試験データの品質と信頼性を証明する目的で、期待される結果をクリアできるか、検証、確認、評価を行う行為と、そのための計画書およびデータの作成、考察、判断、承認を文書化する行為を指す。もともとは消費者に対する保護のために作られた制度であるため、対象は公的な規制を受ける新規の医薬品や香料、食品添加物等の開発段階での前臨床安全性試験であるが、最近では探索段階で用いる分析法にも、この考え方を取り入れて信頼性の高い分析データを得ようという動きが盛んになってきている。そこで、本分析法においても分析値の信頼性を高めるため、一部考え方を取り入れた簡易バリデーションを行った。

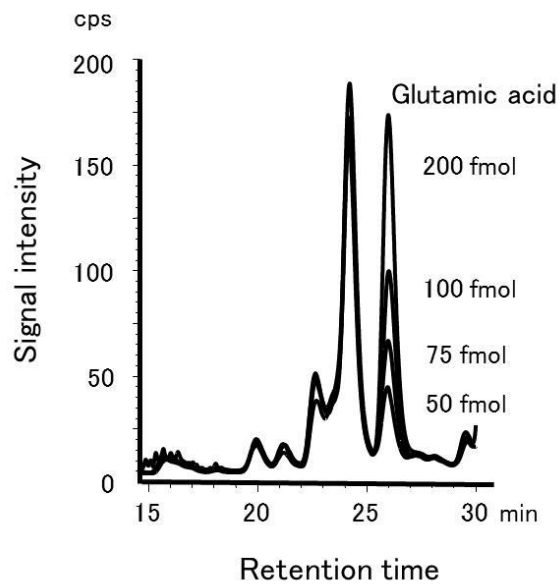
分析バリデーションで実施すべき項目としては、選択性、検量線、定量範囲、回収率、真度、精度、安定性等が挙げられ、それぞれに評価基準を設定する必要がある。本研究においては、全く新しい検出原理に基づいた高感度分析法である金属タグ化分析法が、特に低濃度・微量試料中のアミノ酸分析に適しているかを評価することが目的であるため、これらの項目のうち、検量線、定量範囲、安定性、そして真度に着目し、バリデーションを実施した。具体的には、Glu, Val, Leu, Ileの各標品を用い、検量線を作成して定量範囲と検出限界を求めた。また、アミノ酸標品の溶解、希釈から誘導体化までを通して独立調製し、測定日を変えて分析して日間の安定性を含めた分析精度を求めた。

図3-10に0、0.1、0.5、1、2、5 $\mu\text{mol/L}$ の各濃度に調製したGlu標品を使って作成した検量線、図3-11に50、75、100、200 fmolのGluをinjectionした時のクロマトグラムを示した。また、表3-5には0.5 $\mu\text{mol/L}$ と1 $\mu\text{mol/L}$ に調製したGlu標品を使い、測定日をまたいで3回測定した時の保持時間とピーク高さを示した。この結果、定量に十分な検量線を得る事ができ、本研究で開発した金属タグによるアミノ酸分析法によって、Gluを5%以下の精度で分析ができることが示された。また、この時の検出限界は $S/N = 3$ で5 fmol/injection (5 cps)、直線性は $r = 0.999$ であった。



検出器: ICP-MS ($m/z = 101$)

図 3-10 アミノ酸標品 (Glu) の検量線



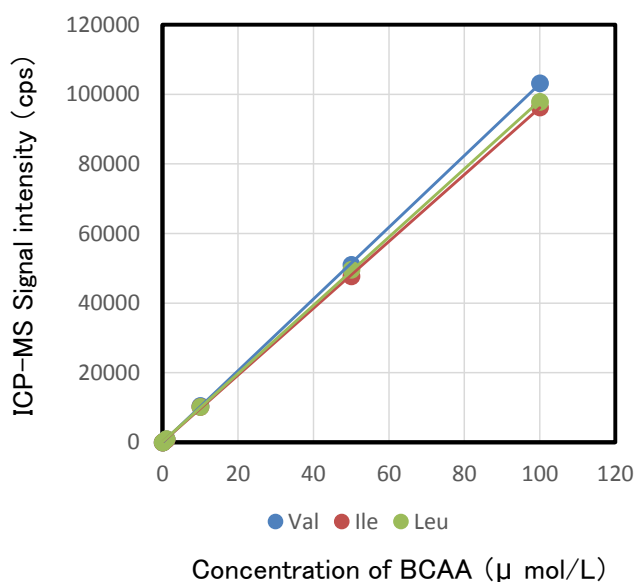
検出器: ICP-MS ($m/z = 101$)

図 3-11 Glu 濃度に応じたクロマトグラムの変化

表 3-5 Glu 標品を用いた繰り返し測定の結果

| | 0.5 μ mol/L | | | 1 μ mol/L | | |
|-----------------|-----------------|------|------|---------------|------|------|
| RT (min) | 26.1 | 26.0 | 26.0 | 26.1 | 26.1 | 26.0 |
| Peak high (cps) | 3719 | 3793 | 3629 | 5431 | 5448 | 5760 |
| RSD (%) | 2.2 | | | 3.3 | | |

続いて図3-12に0、0.1、1、10、50、100 μ mol/Lの各濃度に調製したVal、Leu、Ile標品を使って作成した検量線を記載した。3-3-2では、B液として用いる60 %アセトニトリル/水溶液 (v/v = 60/40) の濃度を、0-5 min/5 %、5-40 min/5-35 %、40-55 min/100 %、55-70 min/5 %として測定したが、BCAAの測定のため、0-35 min/20-40 %、35-45 min/100 %、45-55 min/20 %にグラジエントを変更して測定を行った。この結果、図3-12に示したように、Val、Leu、Ileはいずれもほぼ同感度で検出されており、本研究で開発した金属タグ化分析法は、検出対象が金属タグ中のRuであることから、検出感度は化合物の種類に依存せず、どのアミノ酸も同じ感度で検出できることが確認できた。また、検出器として使用するICP-MSをAgilent社製4500から7700に変更したことで高感度化を達成し、検出限界はS/N = 3で0.5 fmol/injection (0.2 cps)、直線性はr = 0.999であった。



検出器: ICP-MS ($m/z = 101$)

図 3-12 アミノ酸標品 (Val, Leu, Ile) の検量線

分析値の真度については、アミノ酸アナライザの分析値と比較して確認を行った。表 3-6 に金属タグ化分析法とアミノ酸アナライザを使って、市販の FBS 製品中の BCAA を測定した結果を記載した。金属タグ化分析法とアミノ酸アナライザでは定量濃度範囲が異なるため、アミノ酸アナライザは FBS をそのまま希釈せずに分析試料として用い、金属タグ化分析法は 100 倍希釈したものを分析試料として用いた。2 つの分析法によって得られた分析値はよく一致しており、金属タグ化分析法によってアミノ酸アナライザと同等の真度で分析値が得られることが確認された。

表 3-6 FBS 中 BCAA 濃度の定量結果

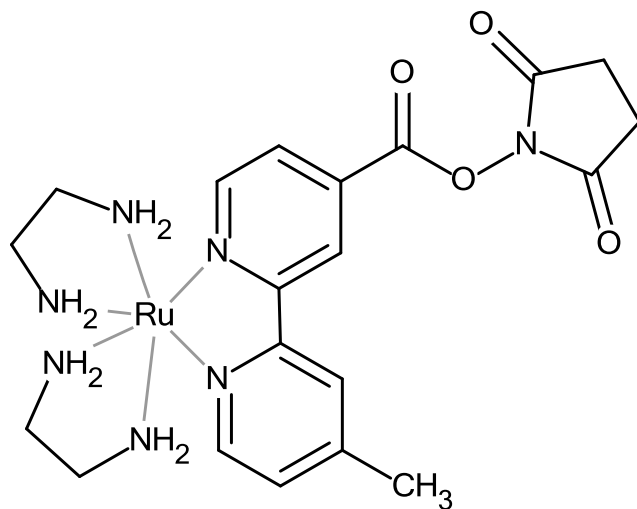
| | 金属タグ化分析法 | | | アミノ酸アナライザ | | |
|-----|----------|---|-------|-----------|---|-------|
| Val | 0.227 | ± | 0.013 | 0.227 | ± | 0.006 |
| Ile | 0.101 | ± | 0.009 | 0.099 | ± | 0.002 |
| Leu | 0.151 | ± | 0.011 | 0.162 | ± | 0.004 |

単位: mmol/L (n = 3)

3-3-4 アミノ酸分析用金属タグ化試薬の改良

3-3-2 および 3-3-3 にて、BCRS を金属タグ化試薬として用いてアミノ酸が分析できることを示したが、この試薬はピペリジン構造を 3 つ含むため、分析対象であるアミノ酸に比べて分子量が大きく、ODS カラムではアミノ酸側鎖による HPLC での分離が容易とは言えなかった。またアミノ酸との反応性に関しても、誘導体化に時間がかかるという課題があった。そこで試薬構造を変更し、新しい金属タグ化試薬の開発を行った。

まずピペリジン構造よりも試薬骨格を小さくする方法として、エチレンジアミン骨格への変更を行った。中心金属である Ru、アミノ酸との反応基である *N*-succinimidyl ester など、ICP-MS による検出能やアミノ酸との反応性に影響する部位は変更せず、ピペリジンをエチレンジアミンに変更した。これにより誘導体化条件や HPLC での分離条件、ICP-MS での検出条件を大きく変えることなく、課題であった HPLC での分離性とアミノ酸との反応性を改善することができる考えた。図 3-13 に新しくデザインした金属タグ化試薬 ECRS の構造式を記載した。



bis(ethylenediamine)-4'-methyl-4-carboxybipyridine
-ruthenium *N*-succinimidyl ester (=ECRS)

図 3-13 ECRS の構造

新たにデザインした金属タグ化試薬の ECRS は新規化合物であり、市販されていないため、図 3-14 の手順で合成を行った。

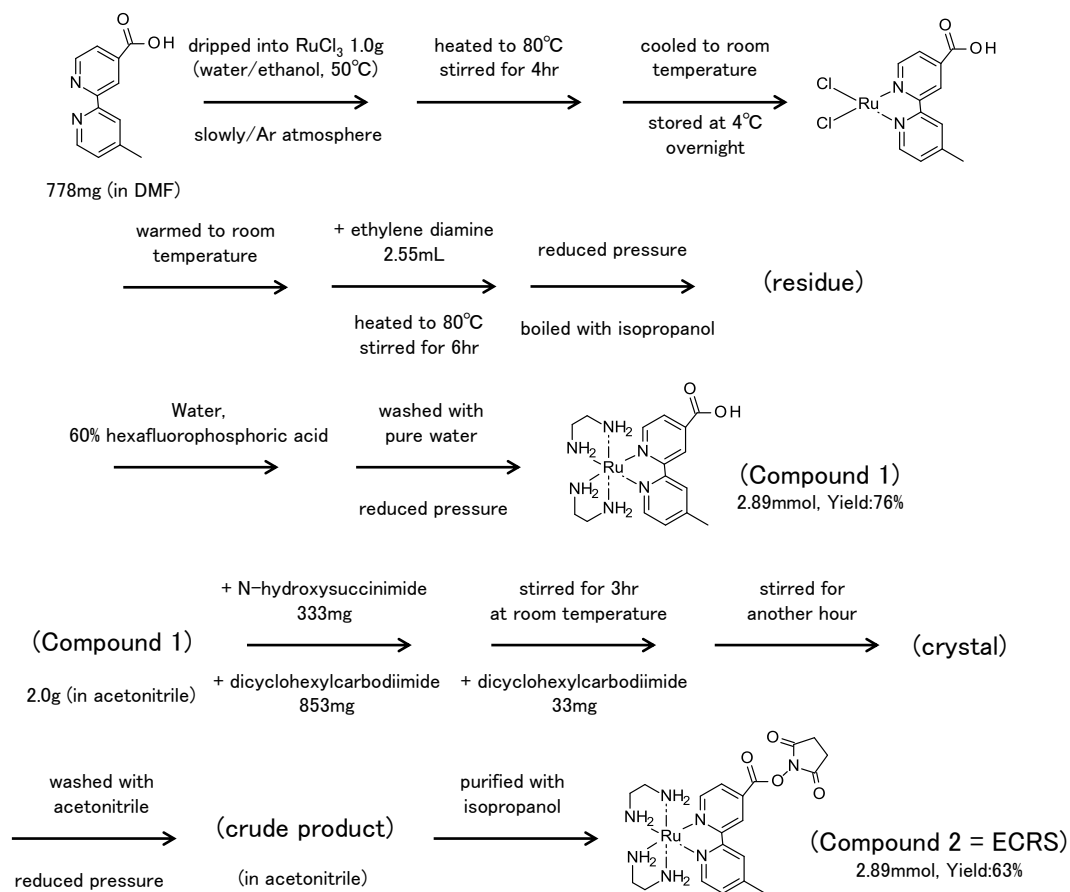
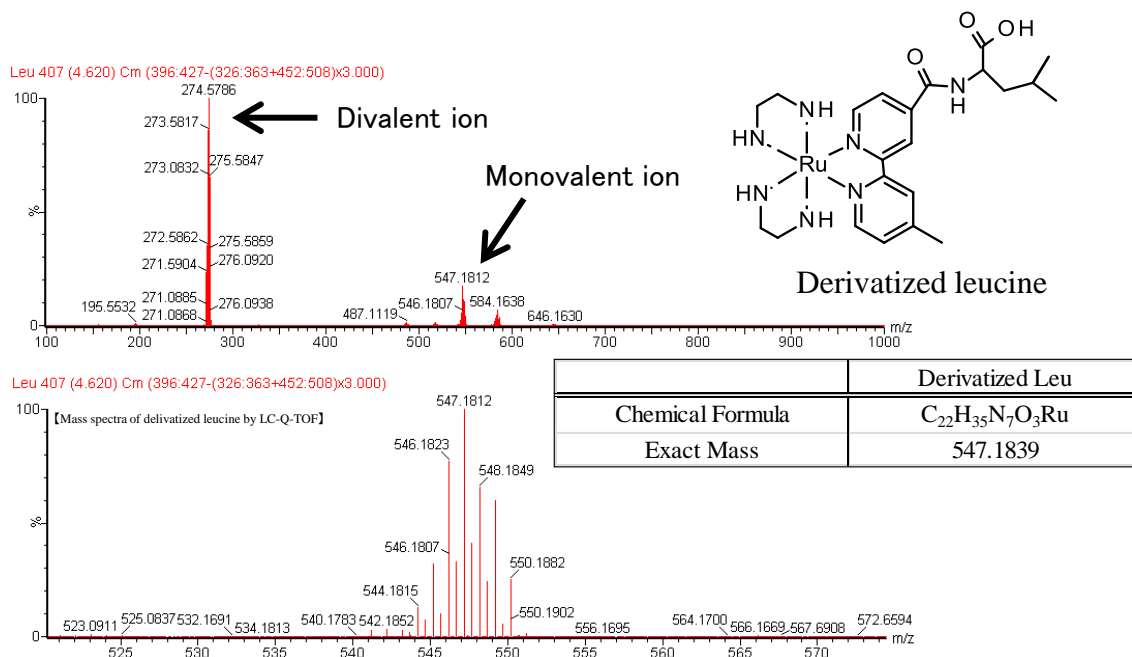


図 3-14 ECRS の合成スキーム

合成した ECRS がアミノ酸と反応していることを確認するため、(QTOF)LC-MS を使ってロイシン誘導体化物のマススペクトルを取得した(図 3-15 にその結果を記載する)。この結果、得られた一価のプリカーサーイオンが理論値(Exact Mass)とよく一致しており、ECRS が設計通りにアミノ酸と反応していることが確認された。



※縦軸:シグナル強度(相対強度)、横軸: m/z

図 3-15 ECRS によるロイシン誘導体化物の構造式とマススペクトル

3-3-5 新規アミノ酸分析用金属タグ化試薬によるアミノ酸分析条件の確立

3-3-4 で開発/合成した ECRS を使い、アミノ酸の誘導体化条件検討を行った。ECRS は BCRS に比べて親水性が高いと考えられるが、水には不溶であるため、最初にアセトニトリルで溶解した後、200 mmol/l、pH 8.0 のホウ酸緩衝液中でアミノ酸標品と反応させた。誘導体化反応にはアルミ製のブロックヒーターを用い、55 °C で加熱したが、BCRS の反応時間が 90 分であったのに対し、ECRS は 5 分以内に反応が完了した(図 3-16 に誘導体化時間とピーク強度の関係を記載する)。

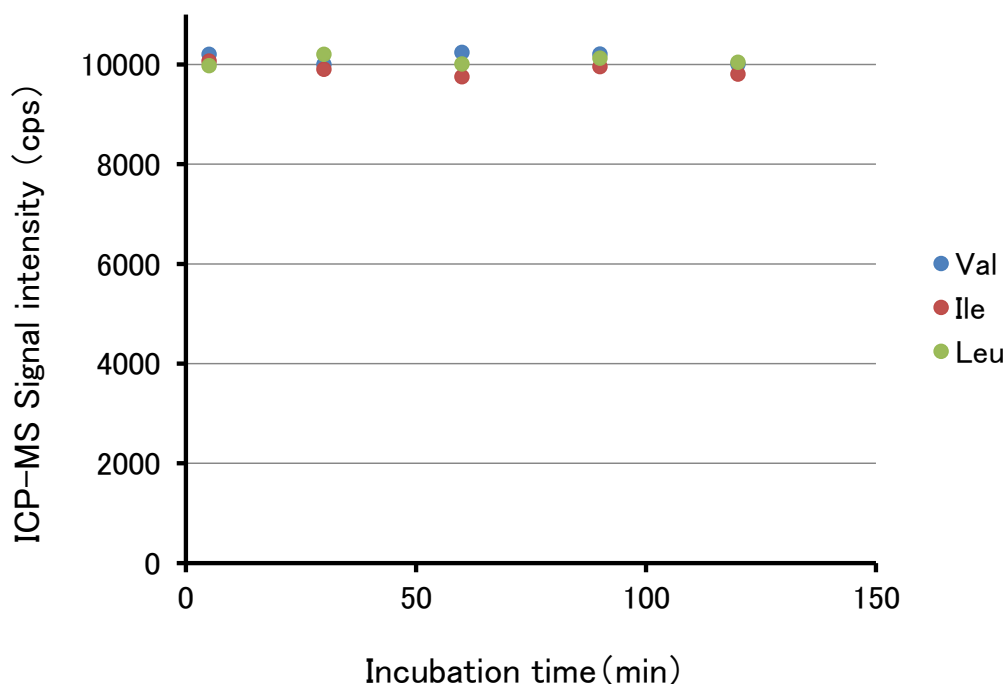
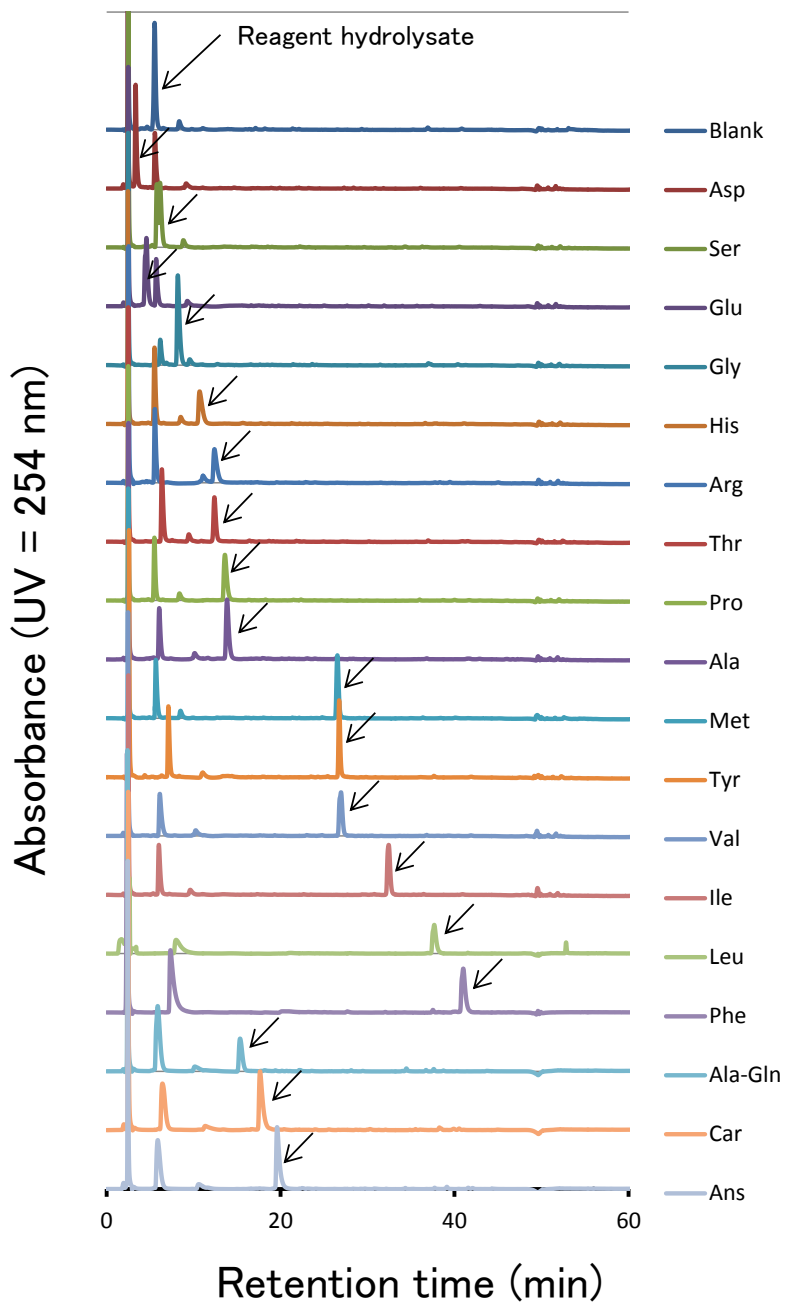


図 3-16 誘導体化時間による BCAA のピーク強度変化

図 3-17 に ECRS で誘導体化したアミノ酸およびジペプチドを LC-UV で分析し、得られたクロマトグラムを記載した。この結果から、二級アミノ酸の Pro やジペプチドである Car や Ans とも同一条件下で反応する事が確認できた。ECRS で誘導体化した金属タグ化合物は比較的親水性が高く、同じ LC の分離条件下では BCRS 誘導体化物よりも早く溶出された。

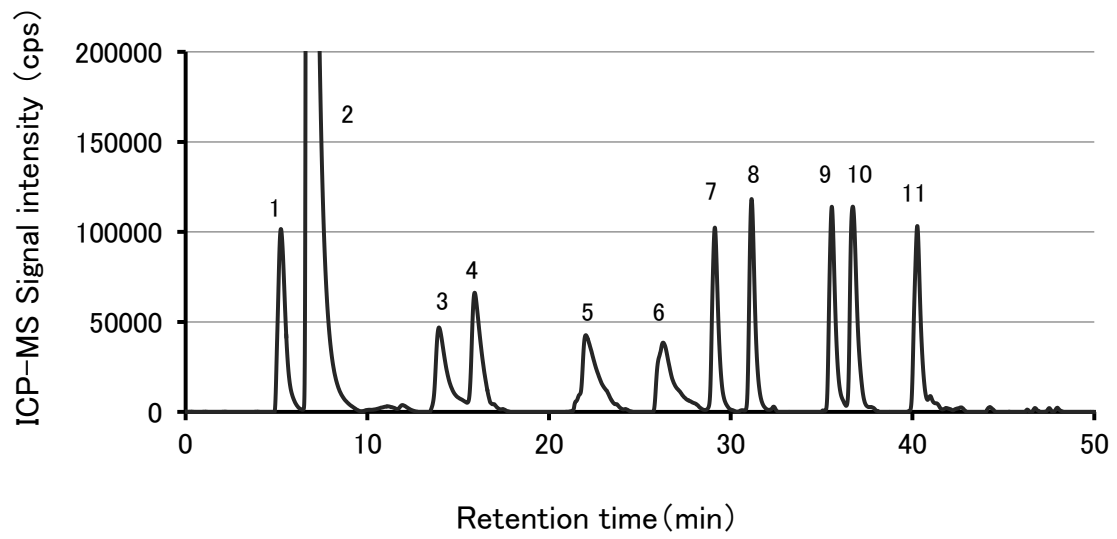
ビピリジン骨格からエチレンジアミン骨格への変更により、Ru を中心としたキレート安定度定数は低下したが、安定度定数は 10 以上あり、アミノ酸との誘導体化反応から LC 分離、ICP-MS 検出を通して Ru イオンの解離/溶出は見られず、金属タグ化試薬として十分な安定度を持っていることが確認できた。

最適化された LC 分離条件では、図 3-18 に記載したように、15 種類のタンパク質構成アミノ酸と 3 種類のジペプチドを分析することができた。BCRS は試薬の加水分解物が分析対象であるアミノ酸と近い保持時間で溶出し、アミノ酸のピークと重なる可能性が高く、さらに試薬のテーリングも分析の障害となっていたが、図 3-18 に示したように、ECRS の加水分解物はほとんどのアミノ酸より早い時間に溶出されるため、各アミノ酸の分離特異性が向上した。



↓ : アミノ酸誘導体化物の溶出位置

図 3-17 ECRS 誘導体化アミノ酸およびジペプチドのクロマトグラム



1. Glu, 2. Reagent hydrolysate, 3. Thr, 4. Ala, 5. Car, 6. Ans, 7. Met, 8. Val, 9. Ile, 10. Leu, 11. Phe

図 3-18 ECRS 誘導体化アミノ酸およびジペプチド 10 種混合品のクロマトグラム

3-3-6 EDTA 構造を持つ金属タグ化試薬の検討

Ru を中心金属にした金属タグ化試薬以外に、EDTA 構造をキレートに取り入れた金属タグ化試薬の開発を行った。タンパク質分析用の金属タグ化試薬には、EDTA とキレート構造に近い三酢酸構造を 2 つ持つ無水 DTPA を使った例が報告されている [81-84]。しかし無水 DTPA はアミノ酸分析用の金属タグ化試薬としては親水性が高すぎるため、EDTA とアミノ基反応部位との間にベンジル基を疎水性構造として導入した Isothiocyanobenzyl-EDTA を使用した。反応基にはスクシンイミジルカルバメートではなく、イソチオシアネート基を選択した。

Isothiocyanobenzyl-EDTA もアミノ酸との誘導体化反応は、200 mmol/L のホウ酸緩衝液中において行った (図 3-19 に Isothiocyanobenzyl-EDTA とアミノ酸の反応を記載する)。アミノ酸標品は 0.1 mol/L 塩酸溶液にして冷凍保存しておいたものを溶解し、適宜希釈して用いた。Isothiocyanobenzyl-EDTA は冷凍保存しておいたものを使用時にアセトニトリルに溶解して使用した。誘導体化反応にはアルミ製のブロックヒーターを用い、塩酸インジウムの水溶液とともに 55 °C、オーバーナイトで加熱後、1 mol/L の塩酸を添加してさらに 30 分加熱し、最後に 1 mol/L の酢酸アンモニウム溶液を添加して pH を調整した。調製後の溶液は 4 °C で保存し、速やかに LC-UV/ICP-MS 分析に供した (図 3-20 に得られたクロマトグラムを記載する)。

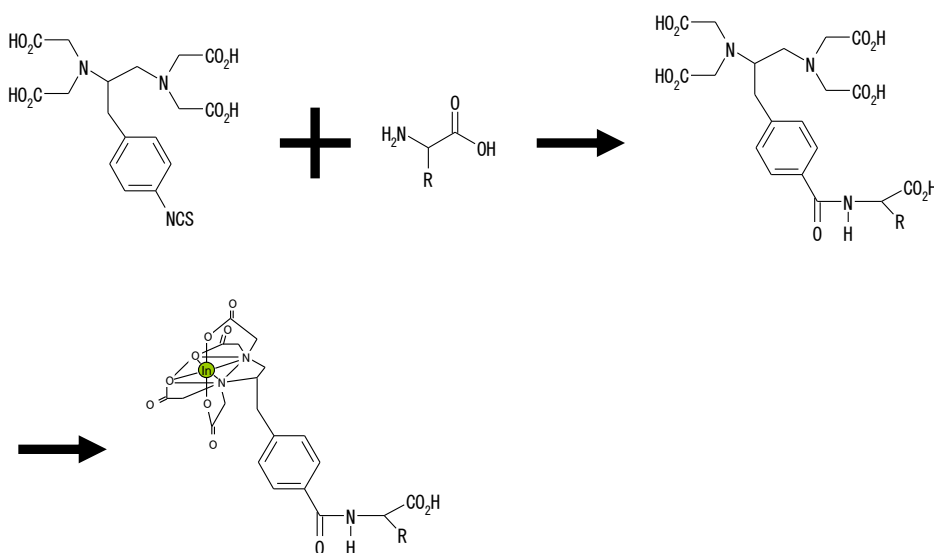


図 3-19 Isothiocyanobenzyl-EDTA によるアミノ酸の誘導体化反応

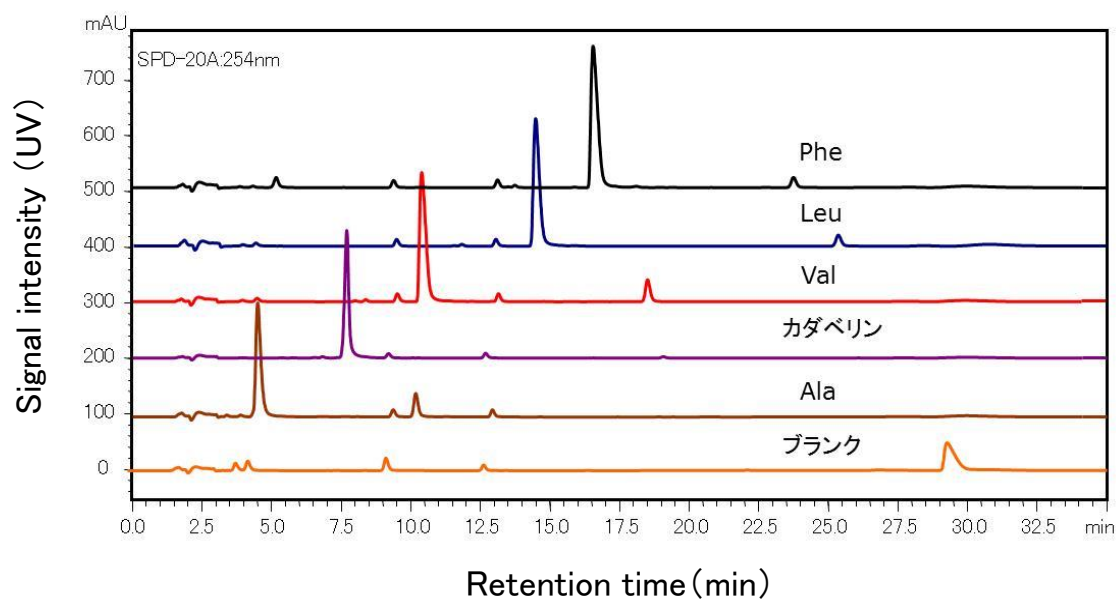


図 3-20 Isothiocyanobenzyl-EDTA によるアミノ酸誘導体化物のクロマトグラム

EDTA 型の金属タグ化試薬は、ビピリジン型やエチレンジアミン型と異なり、試薬骨格には金属は含まれておらず、アミノ酸の誘導体化とは別にキレート形成反応を行って金属を結合させる。このため検出に用いる金属の選択肢が広く、同位体組成を変えた同位体比分析など、BCRS や ECRS とは異なる使い方が可能である。実際、タンパク質分析用の金属タグである DOTA を使い、ラベル体の金属を試薬に導入した例が報告されており[78, 97, 98]、さらに分析法の条件検討を進めることで、この EDTA 型の金属タグ化試薬でも同位体を使った高感度分析等に活用できると期待される。

第四章 iPS 細胞およびショウジョウバエ中の遊離アミノ酸分析

4-1 序 論

アミノ酸がタンパク質の構成成分であり、生物にとって必須の物質であることはよく知られている。特に成長期には身体を構成するタンパク質を作るため、多量に摂取する必要があるが、成長後もタンパク質は常に体内で分解と合成が行われており、成人であればその量は1日で200 gにも及ぶ。その多くは分解したタンパク質の再吸収で賄われるが、エネルギー源として失われる量が1日に約70 g(体重60 kgの成人と仮定した場合)に及ぶため、その分は常に新しく摂取しなくてはならない。そこで生物は生命活動を維持するため、全てのタンパク質を構成するのに必要なアミノ酸を、バランスよく摂取することが必要になる。

アミノ酸をバランスよく摂取する考え方として桶の理論(図4-1)というものがある。これは桶の縦板がそれぞれ生物に必須なアミノ酸を表しているのだが、1つでも短い縦板(=アミノ酸)があると桶には水が十分汲めず、どれだけ他の板が長くてもその量は一番短いものに合わせたものになってしまう。アミノ酸も水と同じで、1つでも足りないアミノ酸があると、充足量はそのアミノ酸に依存して少なくなってしまう。

このアミノ酸のバランスは長年の生活スタイルにも影響している。例えば、西欧諸国の様に小麦を主食とする地域では小麦中に少ないLysが不足しやすいため、肉類などのタンパク質を積極的に摂取するか、食べやすいパスタやうどんといった麺類にして大過剰に小麦を摂取するという食生活が定着している。ヒト以外の他の生物も同じで、ウシや豚等の家畜に与える飼料がトウモロコシ主体の場合、トウモロコシ中に少ないLysが欠乏する。このため近年の配合飼料には、欠乏するLysをはじめ、他にも不足しがちなMet、Cys、Thr、Trpといったアミノ酸が計算されたバランスで添加されている。

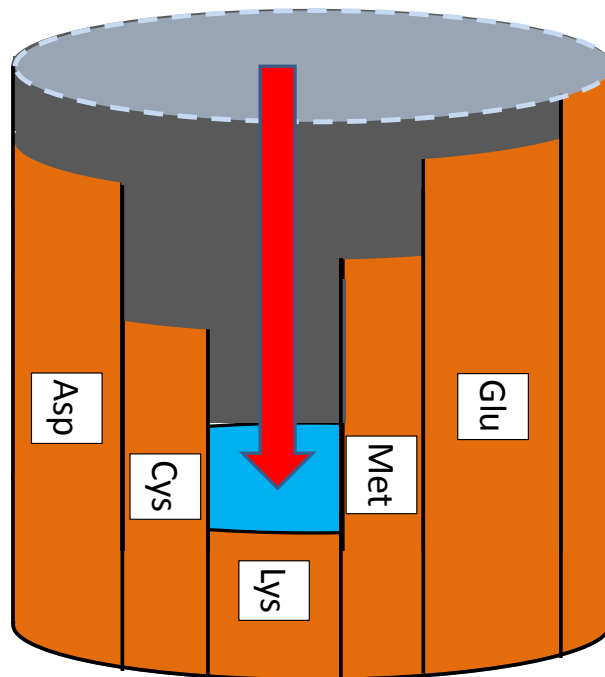


図 4-1 アミノ酸の桶の理論

※各アミノ酸を桶の立て板と考えた場合、タンパク質合成はこの桶に入れる水の量に相当し、最も少ないアミノ酸(この図では Lys)に合わせた分しか作ることができない。その他の Asp や Glu、Cys、Met に合わせようとしても、Lys が少ないために水の量(タンパク質)はこぼれて増えることは無く、アミノ酸の過剰分はタンパク質合成には使われない。

生体内の代謝からアミノ酸を考えると、各アミノ酸は炭素および窒素代謝ネットワークの中心化合物として存在しており、それぞれが重要な働きを担っている。例えば Val、Leu、Ile といった BCAA は筋肉の重要なエネルギー源 [99] であるし、近年になって Gln や Glu も大腸の蠕動運動の主要なエネルギー源として消化吸収に最も重要な物質であることが明らかになった[100]。他にもビタミンの一種ナイアシン(ビタミン B3)はアミノ酸の Trp を原料としているし[101]、神経伝達物質のアドレナリンやセロトニンもアミノ酸から作られている[102-105]。

一方で、疾病などの障害によってアミノ酸代謝が阻害されると、アミノ酸の濃度バランスが変化することが知られている[106-108]。前述の Val、Leu、Ile は、糖尿病[109]、

110]や肝機能障害[111, 112]などに関連して、代謝が亢進することが知られており、他にも各種ガンや冠状動脈性心臓病、腎不全、糖尿病などでアミノ酸との関連が報告されている[113, 114]。このため生体中のアミノ酸濃度分析は、診断、検診、代謝解析、その他、生物学的な観点から非常に重要であり、さらに代謝変化と疾病の関係を解析するためには、遺伝子改変等を含む様々な実験条件を試すことができる培養細胞やモデル生物を使った生体試料の分析が必須である[115]。

しかし、培養細胞はもちろん、ショウジョウバエのようにライフサイクルが早く使いやすいモデル生物も、分析サンプルとするには個体サイズが小さく、それに伴って分析試料が少なくなるため、アミノ酸を分析には高い検出感度が必要である。このため、これまでにこれらの生体試料中のアミノ酸濃度を分析した例はほとんどない。そこで本研究では、現在、再生医療分野で注目されているiPS細胞を使って細胞中の遊離アミノ酸分析を実施し、さらに、モデル生物であるショウジョウバエの遺伝子変異体を用いて、体内の遊離アミノ酸濃度の比較解析を行ったので報告する。

4-2 iPS 細胞中の遊離アミノ酸分析

4-2-1 iPS 細胞を使った再生医療研究での課題

再生医療とは人体に何らかの障害が発生した場合に、本人もしくは他人の細胞や組織を培養し、さらに必要に応じて加工を施して、喪失した組織や臓器を修復・再生する医療のことである。再生医療的な処方として、最も早期に始まった治療法は輸血療法であると考えられているが、その後分化細胞の培養技術が確立されたことにより、現在は分化能を持つ幹細胞を使った治療に期待が集まっている。この幹細胞による再生医療は、体性幹細胞、ES 細胞、そして iPS 細胞の 3 種類で応用の可能性があるが、あらゆる組織を得ることが可能な万能性、均質な細胞を大量に得ることが可能な利便性、倫理的な問題を生じない社会性の観点から、iPS 細胞が最も現実的な選択と考えられる[116]。

しかし iPS 細胞による再生医療の実用化にはいくつかの課題がある。まず iPS 細胞は、その細胞樹立法から悪性腫瘍化しやすいということが開発初期から知られているが、この細胞そのものに起因する課題に関しては、樹立法の改良や未分化細胞の選別法開発といった技術的進歩によって克服されつつある。一方、iPS 細胞を治療に用いるためには大量の細胞を使用する必要があるが、これにかかる莫大なコストや使用する様々な試薬および基材類の安全性確保といった、現実的な事業化に向けた運用に関わる課題についてはほとんど進捗していない。特に iPS 細胞用培養液は、iPS 細胞の大量培養から目的細胞への分化まで、細胞の機能や品質を左右する最大のキーテクノロジーであるとともに、500 mL で 3~5 万円程度と高価格であるため、コスト増の最大の要因ともなっている。このため、この細胞用培地の開発は再生医療成功のための最も重要かつ喫緊に解決すべき課題である。

現在、再生医療を実用化するために多くの研究機関が iPS 細胞用培養液の開発に取り組んでおり、培養液の組成開発に最先端の分析法を駆使している。中でもアミノ酸は、濃度や含有比率が培養液の性能に大きく影響するため培養液組成の最適化が必須であるが、既存の分析法では小スケールの培養系では分析感度が足りず、十分なデータを得ることができていない。現在の生化学実験では、様々なアッセイ系に 96 ウェルプレート以下の小スケール培養容器が一般的に用いられており、アミノ酸分析に関しても、微量の試料で分析できる新しい分析系の開発が必須となっている。

4-2-2 iPS 細胞中の遊離アミノ酸分析

iPS 細胞用培養液のアミノ酸組成を最適化するためには、細胞内の遊離アミノ酸濃度と細胞の増殖速度や容器底面への定着性、細胞の未分化および分化状態といった情報を比較することが必要である。そこで、無血清培地で培養した iPS 細胞を用い、細胞中の遊離アミノ酸を抽出し、金属タグ化試薬と LC/ICP-MS を使って抽出液中のアミノ酸の検出・定量を行った(図 4-2 に使用した iPS 細胞の写真を記載する)。

iPS 細胞は遠心分離機と氷水冷したリン酸緩衝液を使って2回洗浄後、上清を除き、メタノール／水(v/v = 80:20)溶液を添加してアミノ酸を抽出した。抽出液の上清を200 mmol/L、pH 8.0 のホウ酸緩衝液と混合し、金属タグ化試薬 ECRS のアセトニトリル溶液を添加して混合した後、アルミ製ブロックヒーターにて55 °C、5 min 加熱、1 mol/L の酢酸アンモニウム溶液を添加して pH を調整した(図 4-3 に iPS 細胞試料の前処理手順を記載する)。

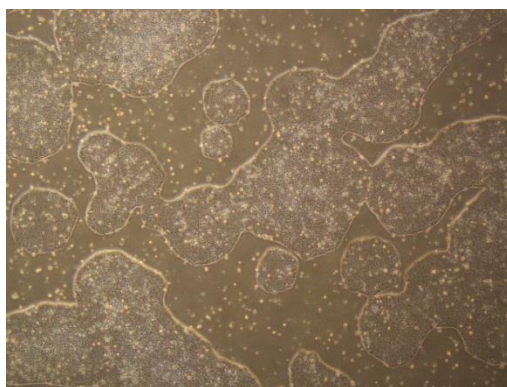


図 4-2 iPS 細胞(201B7 株)の写真

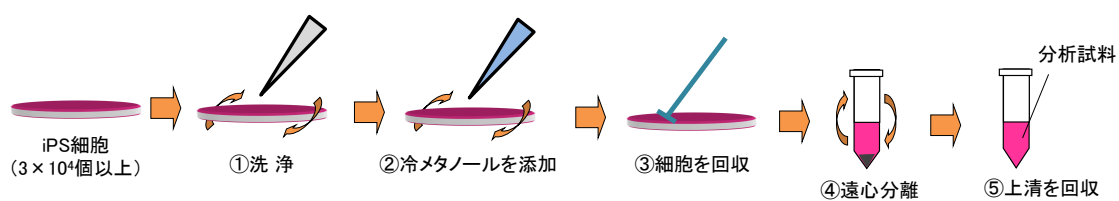


図 4-3 iPS 細胞中遊離アミノ酸の抽出手順

調製後の溶液は 4 °C で保存し、速やかに LC/ICP-MS 分析に供した。また iPS 細胞の培養液から FGF-2 を除いて培養すると、未分化がランダムに解除され、多くの細胞が神経様に分化する[117]。この分化細胞についても細胞中の遊離アミノ酸分析を行った(図 4-4 に iPS 細胞抽出液を金属タグ化試薬で誘導体化し、LC/ICP-MS で検出して得られたクロマトグラムを記載する)。この時、通常のグラジエント条件では分離が不十分な金属タグ化アミノ酸があったため、保持時間 5 分から 17 分のグラジエント条件を変更した溶離条件(図 4-4 上部のクロマトグラム)を併用して定量を行った。

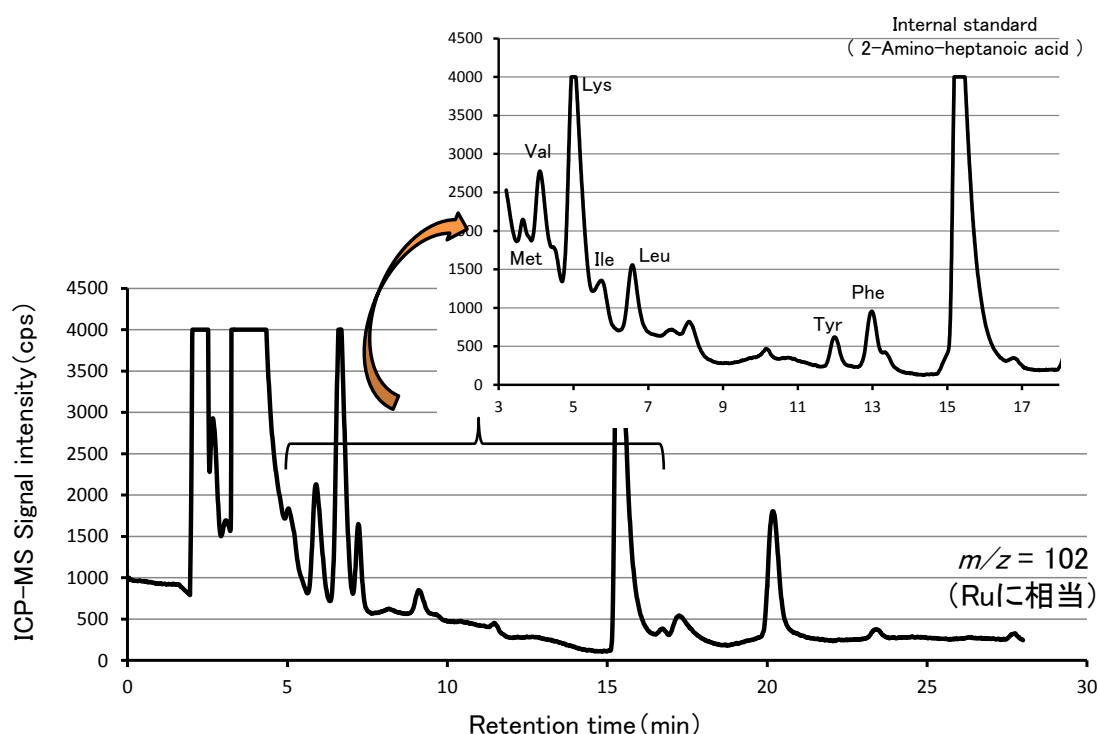


図 4-4 iPS 細胞中遊離アミノ酸のクロマトグラム

iPS 細胞 3×10^4 個あたりのアミノ酸定量結果を表 4-1 と図 4-5 に記載した。この結果から、未分化細胞と分化細胞の遊離アミノ酸量を比較すると、未分化細胞で有意に Pro, Lys, Arg が多く、分化細胞では Asp, Glu, Phe 等が多くなっていた。

現在の iPS 細胞培養技術では、内胚葉系への分化誘導率は 30 %程度であるため、培養後に回収した細胞には、必ず分化細胞と未分化細胞が混在する。このため iPS

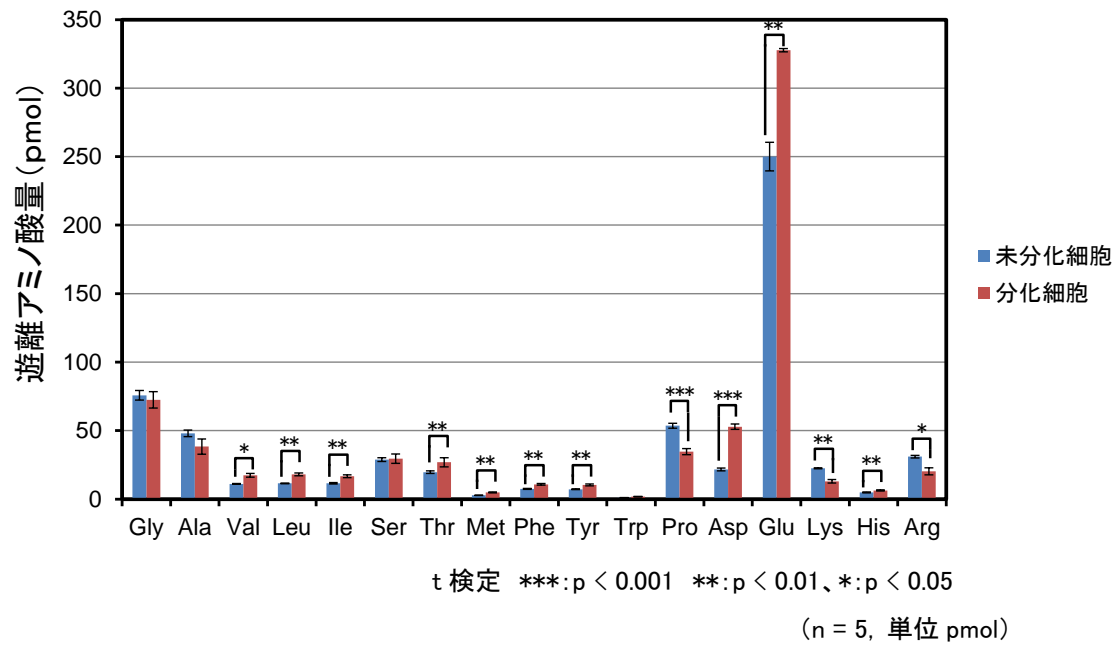
細胞を使った再生医療の実用化には、分化細胞への誘導率向上が必須である。今回の結果から、分化細胞と未分化細胞ではアミノ酸を含む低分子の代謝が異なっていると予想されるため、培養液の組成を分化細胞用に最適化することで、誘導率が向上すると考えられる。その際、本研究で開発した金属タグによるアミノ酸分析法は、これまで不可能だった 96 ウェルプレートによる培養系細胞からの遊離アミノ酸定量が可能であるため、再生医療用培養液の開発ツールとして活用できると期待される。

表 4-1 iPS 細胞および未分化解除細胞中の遊離アミノ酸量

| | 未分化 | | | 分化 | | |
|-----|------|---|-----|------|---|-----|
| | 値 | ± | 値 | 値 | ± | 値 |
| Gly | 75.8 | ± | 3.6 | 72.5 | ± | 6.0 |
| Ala | 48.0 | ± | 2.4 | 38.4 | ± | 5.6 |
| Val | 11.1 | ± | 0.3 | 17.4 | ± | 1.3 |
| Leu | 11.5 | ± | 0.3 | 18.1 | ± | 1.0 |
| Ile | 11.6 | ± | 0.5 | 16.7 | ± | 1.0 |
| Ser | 28.9 | ± | 1.4 | 29.5 | ± | 3.4 |
| Thr | 19.7 | ± | 0.9 | 26.9 | ± | 3.3 |
| Met | 2.8 | ± | 0.1 | 5.0 | ± | 0.3 |
| Phe | 7.4 | ± | 0.3 | 10.8 | ± | 0.6 |
| Tyr | 7.2 | ± | 0.3 | 10.4 | ± | 0.7 |
| Trp | 1.0 | ± | 0.1 | 1.8 | ± | 0.1 |
| Pro | 53.6 | ± | 1.8 | 34.7 | ± | 2.3 |
| Asp | 21.7 | ± | 1.0 | 52.8 | ± | 2.0 |
| Glu | 250 | ± | 10 | 328 | ± | 1.2 |
| Lys | 22.5 | ± | 0.3 | 13.0 | ± | 1.3 |
| His | 4.9 | ± | 0.3 | 6.3 | ± | 0.4 |
| Arg | 31.0 | ± | 0.9 | 20.3 | ± | 2.5 |

(n = 5, 単位 pmol)

※96 ウェルプレート中の細胞量である 3×10^4 個相当の細胞内遊離アミノ酸量を記載
(アミノ酸は中性アミノ酸、酸性アミノ酸、塩基性アミノ酸、芳香族アミノ酸の順に記載)



※96 ウェルプレート中の細胞量である 3×10^4 個相当の細胞内遊離アミノ酸量を記載
(アミノ酸は中性アミノ酸、酸性アミノ酸、塩基性アミノ酸の順に記載)

図 4-5 iPS 細胞および未分化解除細胞中の遊離アミノ酸量

4-3 ショウジョウバエ 1 個体中の遊離アミノ酸分析

4-3-1 ショウジョウバエ研究における高感度分析法の重要性

ショウジョウバエは 1 世紀以上に渡って研究されてきた重要な実験モデル生物であり、古くは遺伝学の研究で、その後は発生生理学の研究で盛んに用いられている(図 4-6 にキイロショウジョウバエの外見図を記載する)。1980 年代にショウジョウバエの遺伝子の多くが種を越えてヒト等の脊椎動物と共通であることが分かったと、脳や神経、様々な臓器の機能についてショウジョウバエを使って研究しようという動きが広まった。ショウジョウバエは飼育が容易でライフサイクルも約 10 日と短いため、多くの条件実験を実施するのに適している。そこで、ショウジョウバエの全ゲノムが解読されてからは、特定の遺伝子を導入または破壊して、パーキンソン病や糖尿病などヒトを模した多くの疾患モデルが作成された[118]。現在は、このような様々な遺伝子変異モデルを使って、プロテオミクス研究やメタボロミクス研究への展開が期待されている。



全長: 1~2 mm

図 4-6 キイロショウジョウバエの外見図

ショウジョウバエの遺伝子変異体を使ってメタボロミクス研究を行うためには、試料中の代謝物濃度を分析しなくてはならない。そのためには高感度な分析法が必須である。例えば、ある遺伝子の改変によって飛べなくしたショウジョウバエを作成し、遺伝子改変群と非改変群に分けて体内の代謝物濃度から代謝の違いを比較解析する場合、必

ず問題となるのが標本間での個体差である。遺伝子改変を行って飛べない群を作成したとしても、実際には標本間で「飛べない程度」に差が出てしまう。すなわち、完全に飛べない個体から、不完全ながらある程度は飛べる個体まで存在するのである。現象がはっきり現れている個体とそうでない個体では、体内の代謝状態も異なっていることが容易に想像でき、試料の選択を誤るとせっかくの発見を見逃すことになりかねない。しかしLC-蛍光検出法などのこれまでの手法では、検出感度が低いために一度の分析に100個体以上の個体を使用する必要がある[119]、メタボロミクス研究に使用することは困難であった。

ショウジョウバエ1個体で分析ができる高感度かつ微量の試料に対応した分析法があれば、飛行能力と違って表現型がはっきりとはわからないような場合でも、個体ごとに分析を行って分布を取り、まとめて分析した時にはわからなかった差異を検出することが可能である。また、多量かつ均一な試料群を用意するための実験や検討が回避でき、研究にかかる時間と労力、費用を軽減することが可能である。ショウジョウバエのように増殖が容易で個体数を集めやすく、遺伝子改変技術も整った実験モデル生物を使用した場合でも、多量かつ均一な試料群を準備するには多大な労力と困難が伴う。このため、高感度な分析法の開発は研究の推進に非常に重要である[120]。

そこで本研究では、ショウジョウバエ1個体から遊離アミノ酸を抽出し、金属タグ化試薬分析法を使って遊離アミノ酸量を定量し、実際にオスメスの性差や食性の変化、成虫への変態に由来するアミノ酸量の変化を明らかにした。さらに、遺伝子変異体を用いて特定の代謝経路の欠損が体内の遊離アミノ酸量変化として現れることも示し、モデル生物を使った実験によって、アミノ酸量の変化と疾患との因果関係が解析できる可能性があることを見出したので報告する。

4-3-2 ショウジョウバエ1個体中の遊離アミノ酸分析

ショウジョウバエは体長1~2 mm、体液は1 μ L以下である。このため、1個体から注射器等を使って体液を吸い出したり、粉碎して圧搾したりすることは難しい。そこで本研究では、凍結乾燥後に抽出液中で粉碎し、体内の遊離アミノ酸を抽出することにした。

実験にはキイロショウジョウバエ(*Drosophila melanogaster*)の野生株を用いた。採取したショウジョウバエは純水で洗浄し、1個体ずつサンプルチューブ内で凍結乾燥を行った。続いてメタノール/水(v/v = 50/50)溶液を100 μ L添加し、電動ペッスルを用いて破碎・抽出した(図4-7に抽出手順を記載する)。

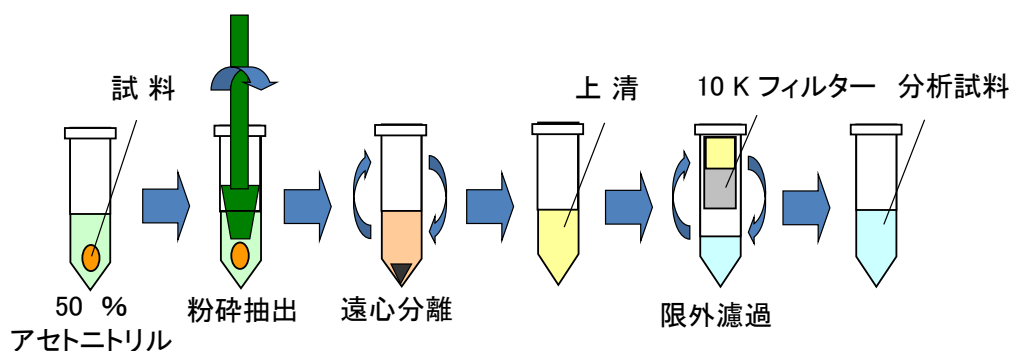


図 4-7 ショウジョウバエ中遊離アミノ酸の抽出手順

得られた抽出液は遠心分離して上清を 10 K の限外ろ過膜に通し、ろ液を分析試料とした。分析試料を 200 mmol/L、pH 8.0 のホウ酸緩衝液と混合し、BCRS のアセトニトリル溶液を添加して混合した後、アルミ製ブロックヒーターにて 55 °C で 90 min 加熱し、1 mol/L の酢酸アンモニウム溶液を添加して pH を調整した。調製後の溶液は 4 °C で保存し、速やかに LC/ICP-MS 分析に供した(分析結果を表 4-2 に記載する)。

表 4-2 ショウジョウバエ 1 個体中の遊離アミノ酸量

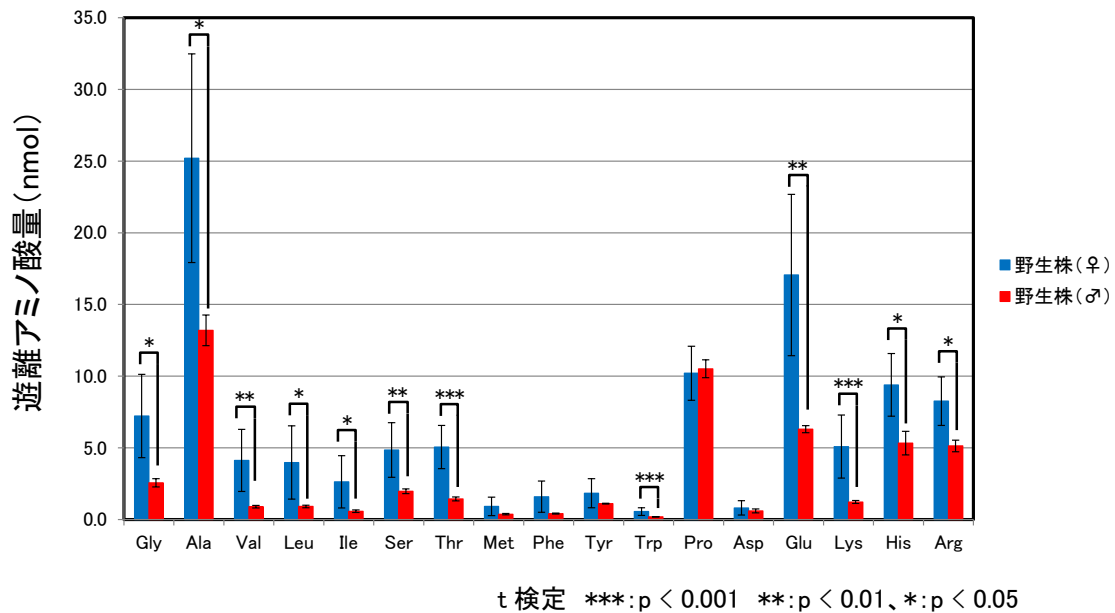
| | 野生株(♀) | | | 野生株(♂) | | |
|-----|--------|---|-----|--------|---|-----|
| Gly | 7.2 | ± | 2.9 | 2.6 | ± | 0.3 |
| Ala | 25.2 | ± | 7.3 | 13.2 | ± | 1.1 |
| Val | 4.1 | ± | 2.2 | 0.9 | ± | 0.1 |
| Leu | 4.0 | ± | 2.6 | 0.9 | ± | 0.1 |
| Ile | 2.6 | ± | 1.8 | 0.6 | ± | 0.1 |
| Ser | 4.9 | ± | 1.9 | 2.0 | ± | 0.2 |
| Thr | 5.1 | ± | 1.5 | 1.4 | ± | 0.1 |
| Met | 0.9 | ± | 0.6 | 0.4 | ± | 0.0 |
| Phe | 1.6 | ± | 1.1 | 0.4 | ± | 0.0 |
| Tyr | 1.8 | ± | 1.0 | 1.1 | ± | 0.0 |
| Trp | 0.6 | ± | 0.3 | 0.2 | ± | 0.0 |
| Pro | 10.2 | ± | 1.9 | 10.5 | ± | 0.6 |
| Asp | 0.8 | ± | 0.5 | 0.6 | ± | 0.1 |
| Glu | 17.1 | ± | 5.6 | 6.3 | ± | 0.2 |
| Lys | 5.1 | ± | 2.2 | 1.2 | ± | 0.1 |
| His | 9.4 | ± | 2.2 | 5.3 | ± | 0.8 |
| Arg | 8.3 | ± | 1.7 | 5.1 | ± | 0.4 |

(n = 5, 単位 nmol)

※(アミノ酸は中性アミノ酸、酸性アミノ酸、塩基性アミノ酸の順に記載)

4-3-3 性差によるショウジョウバエ中遊離アミノ酸量の変化

ショウジョウバエはオスとメスで体の大きさが異なることが知られており、10～20 %程度、メスの方が大きい[121, 122]。このため 1 個体あたりでは骨格筋等の量がメスの方が多く、それに応じて主に骨格筋中に存在するアミノ酸であるBCAAも多いと考えられる。そこで、4-3-2 で求めたショウジョウバエ 1 個体中の遊離アミノ酸量の比較を行った(図 4-8 にショウジョウバエのオスとメスの遊離アミノ酸量を比較したグラフを記載する)。その結果、メスの方で優位に BCAA をはじめとする多くの遊離アミノ酸量が多くなっており、本分析法を用いることによって 1 個体から遊離アミノ酸量の変化を解析できると推測された。



※(アミノ酸は中性アミノ酸、酸性アミノ酸、塩基性アミノ酸の順に記載)

図 4-8 ショウジョウバエのオスとメスの遊離アミノ酸量

4-3-4 食性の違いによるショウジョウバエ中遊離アミノ酸量の変化

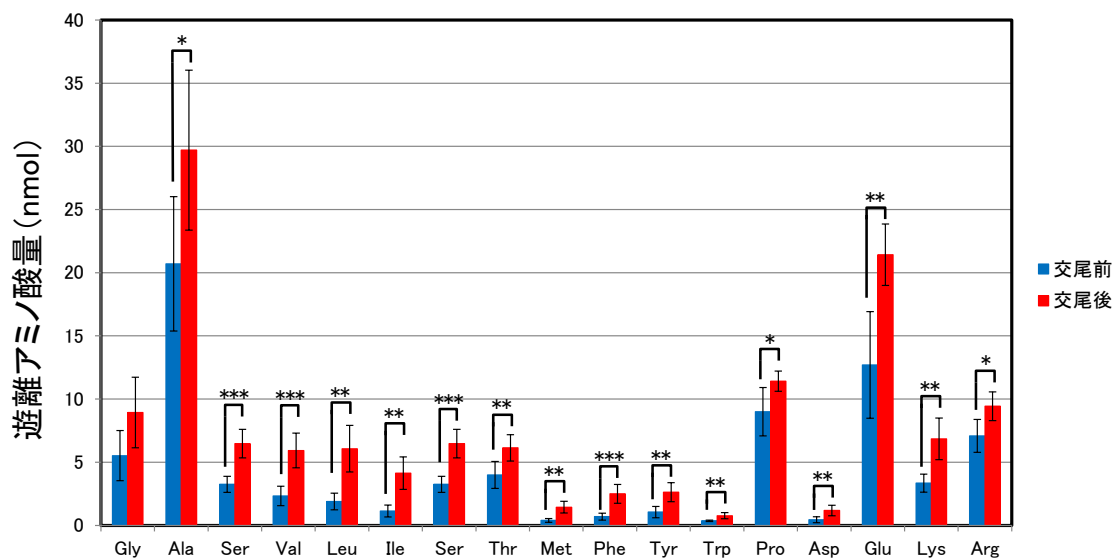
ショウジョウバエの飼育には餌として酵母が一般的に使用されている。本研究では一生を通して、ビール酵母、トウモロコシ粉、グルコース、防腐剤(プロピオン酸、パラオキシ安息香酸ブチル/エタノール溶液)を添加した寒天培地を用いたが、メスは交尾後に産卵に向けて食性が変わり、タンパク食を好むようになることが知られている[123]。そこで、この食性の違いが体内の遊離アミノ量に反映されるのか、交尾前後のメスから遊離アミノ酸を抽出し、金属タグ化試薬分析法を使って定量を行った。表 4-3 と図 4-9 に定量結果を記載したが、交尾後のメスで優位に多くの種類の遊離アミノ量が増加することが確認された。これにより、食性の変化による影響を遊離アミノ酸量の変化として捉えることができた。

表 4-3 交尾後のショウジョウバエメス 1 個体中の遊離アミノ酸量

| | 交尾後(♀) | | |
|-----|--------|---|-----|
| Gly | 8.9 | ± | 2.8 |
| Ala | 29.7 | ± | 6.3 |
| Val | 6.5 | ± | 1.1 |
| Leu | 5.9 | ± | 1.4 |
| Ile | 6.1 | ± | 1.8 |
| Ser | 4.1 | ± | 1.3 |
| Thr | 6.5 | ± | 1.1 |
| Met | 6.1 | ± | 1.0 |
| Phe | 1.4 | ± | 0.5 |
| Tyr | 2.5 | ± | 0.7 |
| Trp | 2.6 | ± | 0.8 |
| Pro | 0.8 | ± | 0.2 |
| Asp | 11.4 | ± | 0.8 |
| Glu | 1.2 | ± | 0.4 |
| Lys | 21.4 | ± | 2.4 |
| His | 6.8 | ± | 1.6 |
| Arg | 9.4 | ± | 1.1 |

(n = 5, 単位 nmol)

※(アミノ酸は中性アミノ酸、酸性アミノ酸、塩基性アミノ酸の順に記載)



t 検定 ***: p < 0.001 ** : p < 0.01, * : p < 0.05

※(アミノ酸は中性アミノ酸、酸性アミノ酸、塩基性アミノ酸の順に記載)

図 4-9 メスのショウジョウバエの交尾前後の遊離アミノ酸量

4-3-5 ライフサイクルにおけるショウジョウバエ中遊離アミノ酸量の変化

ショウジョウバエのライフサイクルは早く、産卵から約 10 日間で成虫になる。このため、発生生理学での遺伝子の機能や組織形成機構の解明のため、成虫だけでなく、幼虫や蛹なども実験に使われている。そこで、幼虫(第三齢)と蛹それぞれ1個体ずつから遊離アミノ酸を抽出し、金属タグ化試薬分析法を使って定量を行った。また、胚についてもメス個体から回収し、1個体ずつ遊離アミノ酸の定量を行った(表 4-4 と図 4-10 に定量結果を記載する)。

表 4-4 ショウジョウバエの各ライフサイクルにおける遊離アミノ酸量

| | 胚 | | | 幼虫 | | | 蛹 | | |
|-----|------|---|------|------|---|------|------|---|------|
| Gly | 0.47 | ± | 0.08 | 52.0 | ± | 5.3 | 28.3 | ± | 12.8 |
| Ala | 1.07 | ± | 0.38 | 139 | ± | 17.9 | 125 | ± | 62.5 |
| Val | 0.20 | ± | 0.03 | 31.9 | ± | 4.0 | 14.2 | ± | 4.1 |
| Leu | 0.21 | ± | 0.04 | 26.5 | ± | 2.8 | 15.3 | ± | 6.3 |
| Ile | 0.11 | ± | 0.02 | 14.3 | ± | 1.7 | 8.1 | ± | 2.8 |
| Ser | 0.30 | ± | 0.05 | 33.9 | ± | 4.4 | 17.2 | ± | 5.7 |
| Thr | 0.17 | ± | 0.03 | 23.5 | ± | 2.1 | 14.4 | ± | 5.6 |
| Met | 0.06 | ± | 0.01 | 8.0 | ± | 1.1 | 4.5 | ± | 1.6 |
| Phe | 0.10 | ± | 0.02 | 17.5 | ± | 2.0 | 8.4 | ± | 3.2 |
| Tyr | 0.13 | ± | 0.02 | 107 | ± | 8.6 | 12.8 | ± | 3.8 |
| Trp | 0.03 | ± | 0.00 | 4.6 | ± | 0.7 | 4.7 | ± | 1.1 |
| Pro | 0.21 | ± | 0.04 | 53.8 | ± | 5.3 | 23.7 | ± | 4.9 |
| Asp | 0.04 | ± | 0.01 | 2.7 | ± | 0.1 | 1.3 | ± | 0.5 |
| Glu | 0.59 | ± | 0.10 | 66.3 | ± | 6.7 | 46.5 | ± | 4.7 |
| His | 0.17 | ± | 0.03 | 21.5 | ± | 1.9 | 16.6 | ± | 2.2 |
| Arg | 0.25 | ± | 0.04 | 43.2 | ± | 4.2 | 29.1 | ± | 7.8 |

(n = 5, 単位 nmol)

※(アミノ酸は中性アミノ酸、酸性アミノ酸、塩基性アミノ酸の順に記載)

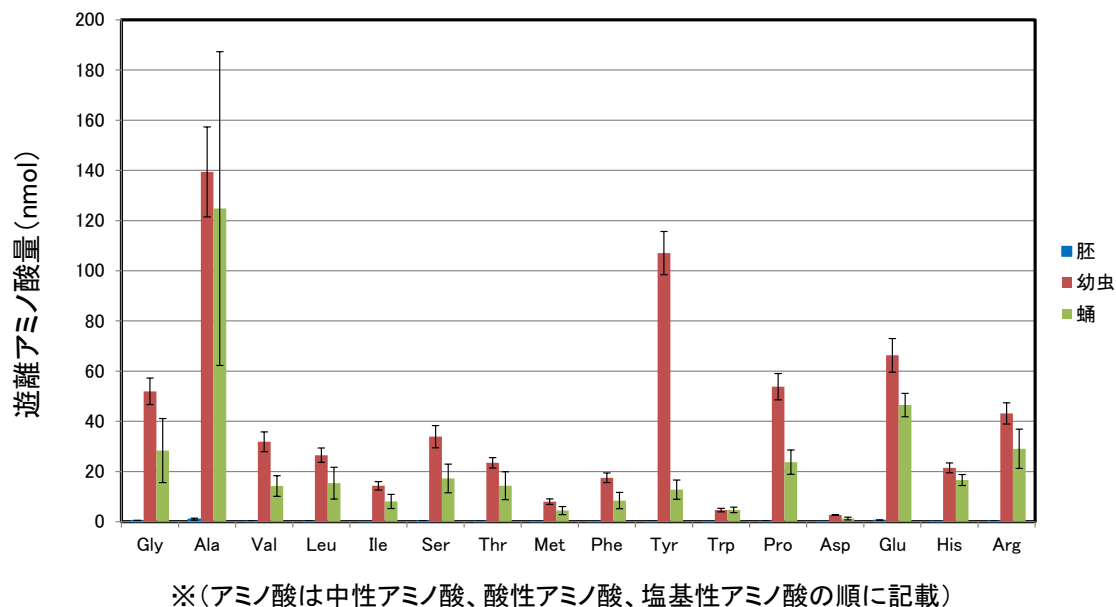


図 4-10 ショウジョウバエの各ライフサイクルにおける遊離アミノ酸量

図 4-10 の結果から、定量できたアミノ酸のうち、幼虫では他のアミノ酸に比べて Tyr が特徴的に多く含まれていることが分かった。幼虫時に Tyr が多いという特徴はチョウ類で知られており、Tyr が黒色の色素原料であるため、成虫に必要な色素が幼虫時に蓄えられていると考えられている[124]。今回の実験から、ショウジョウバエでも同様の現象が起きていると推測された。

4-3-6 遺伝子変異によるショウジョウバエ中遊離アミノ酸量の変化

ショウジョウバエは発生生理学用の検証モデルとしてだけでなく、これまでの研究の積み重ねによって突然変異体のライブラリが多数集められているため、ヒトと共通の遺伝子疾患を持つ病態モデルとしての重要性が高くなっている[125-127]。実際、神経難病の ALS や筋ジストロフィー、白内障、白血病、糖尿病など様々な病態モデルが存在し、発症にかかる仕組みや治療法の解明に向けて研究が行われている。

このように病態モデルを含むライブラリが多いため、ショウジョウバエはプロテオミクスやメタボロミクスの視点からも注目されている。特にメタボロミクスでは、代謝物濃度から疾患を判別・予測する研究が数多く行われているが[108, 115, 128]、代謝物濃度と疾患との因果関係が明確ではなく、病態モデルを使うことで関係性の解明につながるのではないかと期待されている。そこで本研究では、タンパク質の翻訳後修飾の 1 つで

あるリポイル化を制御する *lipT2* の変異体を用い、この代謝経路の異常が体内の遊離アミノ酸濃度に反映されるか実験を行った。実験にはショウジョウバエのオス、メス、それぞれの変異体を用い、1 個体から体内の遊離アミノ酸分析を行った。その結果を表 4-5 と図 4-11 に記載した。

表 4-5 ショウジョウバエ変異体中の遊離アミノ酸量

| | 変異体(♀) | | | 変異体(♂) | | |
|-----|--------|---|-----|--------|---|-----|
| Gly | 1.8 | ± | 0.5 | 2.1 | ± | 0.7 |
| Ala | 17.8 | ± | 7.5 | 12.2 | ± | 4.6 |
| Val | 1.0 | ± | 0.3 | 0.6 | ± | 0.3 |
| Leu | 0.8 | ± | 0.4 | 0.5 | ± | 0.3 |
| Ile | 0.6 | ± | 0.2 | 0.4 | ± | 0.2 |
| Ser | 4.6 | ± | 2.0 | 2.0 | ± | 0.6 |
| Thr | 3.3 | ± | 1.6 | 1.9 | ± | 0.8 |
| Met | 0.4 | ± | 0.1 | 0.2 | ± | 0.1 |
| Phe | 0.4 | ± | 0.2 | 0.2 | ± | 0.1 |
| Tyr | 0.8 | ± | 0.3 | 0.8 | ± | 0.3 |
| Trp | 0.1 | ± | 0.0 | 0.1 | ± | 0.1 |
| Pro | 12.2 | ± | 2.2 | 11.8 | ± | 2.1 |
| Asp | 0.7 | ± | 0.9 | 0.1 | ± | 0.1 |
| Glu | 10.1 | ± | 2.5 | 6.5 | ± | 1.3 |
| Lys | 1.4 | ± | 0.7 | 1.1 | ± | 0.6 |
| His | 6.9 | ± | 2.2 | 5.7 | ± | 1.3 |
| Arg | 3.8 | ± | 1.1 | 4.1 | ± | 1.2 |

(n = 5, 単位 nmol)

※(アミノ酸は中性アミノ酸、酸性アミノ酸、塩基性アミノ酸の順に記載)

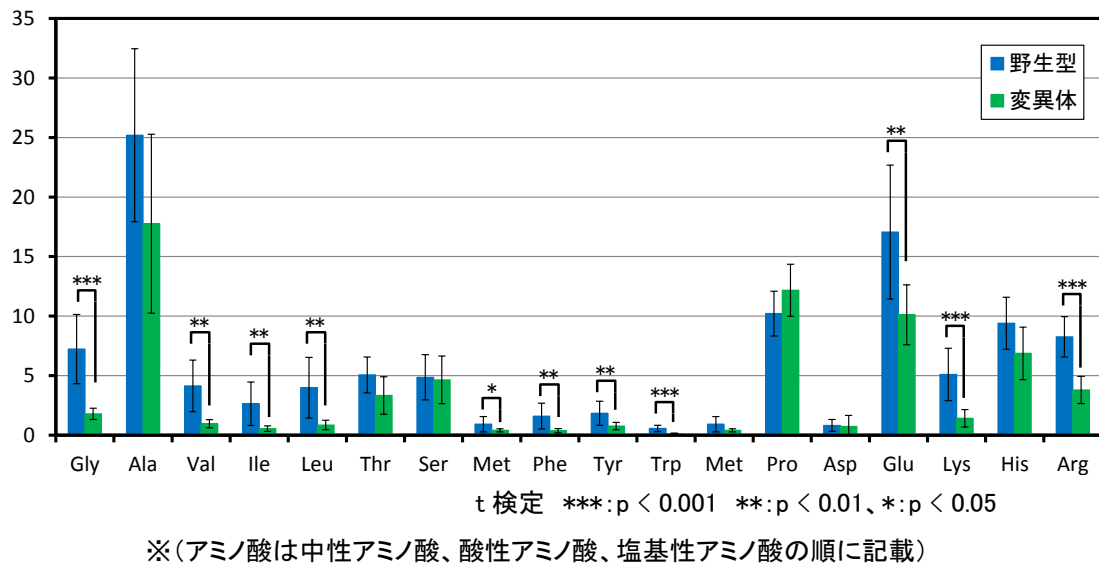
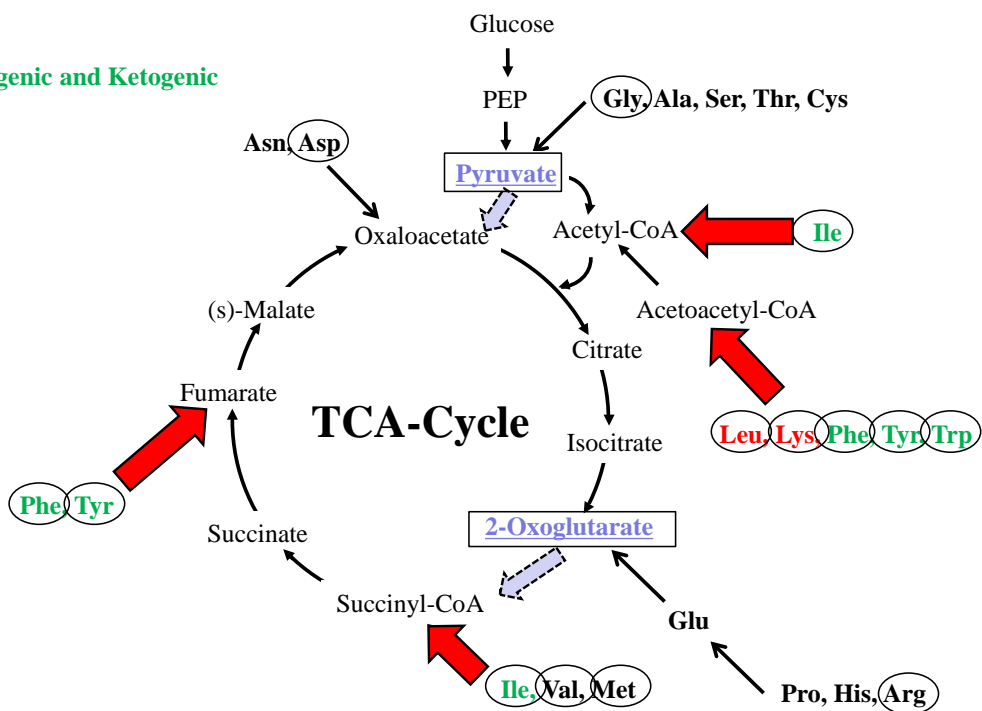


図 4-11 ショウジョウバエ野生株と変異体の遊離アミノ酸量(メス)

*lipT2*変異体は、ピルビン酸および2-オキソグルタル酸脱水素酵素活性が低下するため、体内にピルビン酸と2-オキソグルタル酸が蓄積される傾向がある[129]。また、エネルギー代謝効率が低下するため、体内でのエネルギーが枯渇した飢餓状態となることもわかっている。本研究で分析した結果、*lipT2* 変異体は野生株に比べて体内の遊離アミノ酸のうち、Gly、Val、Ile、Leu、Lys、Glu、Met、Phe、Arg、Tyr、Trp が有意に低くなっていた。

そこでピルビン酸と2-オキソグルタル酸、各アミノ酸が関わる糖代謝経路と各アミノ酸の増減の関係を図4-12に記載した。図4-12の中で、青点線矢印で示したピルビン酸と2-オキソグルタル酸は、遺伝子変異によって細胞内の量が増加するとともに、代謝が抑制されている。一方、逆に細胞内の量が低下したアミノ酸を○で囲んだが、特にピルビン酸と2-オキソグルタル酸の代謝低下を補うように、TCA サイクルの下流でアミノ酸(Val、Ile、Leu、Lys、Met、Phe、Tyr、Trp)が代謝されていることが分かった。これは、ピルビン酸と2-オキソグルタル酸によるエネルギー産生の低下を補完するため、アミノ酸が多く代謝するよう、代謝量に変化したのだと考えられる。このことから、ショウジョウバエの代謝経路異常は体内の遊離アミノ酸量に反映され、金属タグ化アミノ酸分析法を使うことでその変化を検出・解析可能であることが証明された。

Glucogenic
 Ketogenic
 Both Glucogenic and Ketogenic



- : 遺伝子変異体で増加する有機酸(既知)
- : 遺伝子変異体で減少したアミノ酸
- ←: 代謝の流れ

図 4-12 遺伝子変異体で変化した遊離アミノ酸と代謝経路の関係

変異体はピルビン酸と 2-オキソグルタル酸の代謝低下に伴い、青点線矢印の代謝経路が低下する。これにより TCA 回路が働かず、体内のエネルギーが枯渇する。今回の実験から、○で囲ったアミノ酸が体内で減少していることが明らかとなった。これにより、変異体は赤矢印の代謝経路が亢進し、アミノ酸代謝によって低下した有機酸の代謝を補い、エネルギーを産生するよう、代謝変化を起こしていると考えられる。

第五章 総括

本研究では、有機溶媒が導入できる ICP-MS 用の試料導入インターフェイスを開発し、高感度元素特異的な分析が可能な逆相 LC/ICP-MS を構築した。また新規に金属タグ化試薬を開発し、逆相 LC/ICP-MS と併用することでアミノ酸の検出限界が 50 amol になった。これは既存のアミノ酸分析法で最も検出感度が高いプレカラム誘導体化 LC-MS/MS 法の約 20~5,000 倍、汎用的なニンヒドリン発色法によるアミノ酸アナライザの約 1,000,000 倍であった。

開発した逆相 LC/ICP-MS は高濃度の有機溶媒が導入できるため、リン脂質の検出感度が LC-MS/MS よりも 10 倍向上し、アルブミン抽出液中のリン化合物を高感度かつ特異的に検出することができた。また iPS 細胞中の遊離アミノ酸分析では、96 ウェルプレート相当の細胞数(細胞数: 3×10^4 個)で未分化細胞と分化細胞のアミノ酸バランスを比較し、Pro や Asp 等で有意な変化が発見できた。ショウジョウバエ中の遊離アミノ酸分析では、*lipT2*変異体は TCA サイクルのピルビン酸下流で代謝される Leu, Ile, Phe, Tyr, Trp, Lys と、2-オキシグルタル酸の下流で代謝される Val, Ile, Met, Phe, Tyr 等のアミノ酸が、野生型よりも減少していることが明らかとなった。これは、変異体がピルビン酸と 2-オキシグルタル酸の代謝低下によるエネルギー不足の際に、アミノ酸代謝を亢進させてエネルギーを獲得していることを示しており、遺伝子変異に伴う代謝経路異常が実際に代謝物量の変化を引き起こし、その変化を金属タグ化アミノ酸分析法によって検出・解析可能であることが証明された。

本研究は、無機化合物の分析装置を有機化合物の分析に用いるというアイデアによって、高感度元素特異的な新しい分析法を開発することができた。金属タグ化試薬はアミノ酸分析用にデザインしたが、本分析法はアミノ酸に限らず、分析条件や金属タグ化試薬の変更によって、誘導体化可能な官能基を持つ全ての有機化合物に適用できる拡張性を持っている。また ICP-MS の濃度検出限界は磁場型の高感度装置では 1 pg/L (\cong 10 fmol/L) であり、更なる高感度化が期待できる。このため本分析法を発展させることで、代謝物解析や未知化合物の探索など幅広く生化学の発展に貢献できると考える。

実験の部

第二章

2-2-3 LC/ICP-MS による化学種別元素特異的分析

《装置条件》

シリンジポンプ：ハミルトン製

シリンジ：イトーキ製ガスタイトシリンジ

六方バルブ：レオダイン製セラミックディスク搭載(メタルフリー)

《実験手順》

HPLC と ICP-MS を結合する際、間に六方バルブを設置し、ICP-MS への試料導入において HPLC とシリンジポンプの切り替えを可能にした。六方バルブにはメタルフリーかつデッドボリュームが少ないものを選択することにより、金属汚染と切り替え時の溶媒ショックに対する抑制効果が得られた。また、これによりチューニングから分析に移る際のキャピラリ切り替え作業がなくなり、キャピラリ内への空気混入が避けられ、プラズマが消灯する危険性を下げることができた。

2-3-2 ICP-MS への有機溶媒導入検討

《装置条件》

ICP-MS：Agilent 製 HP4500 (四重極型質量分析装置)

| | |
|----------------|---|
| 高周波電圧 | ； 1430 W |
| プラズマガス流速 | ； 15.0 L/min |
| 中間ガス流速 | ； 1.0 L/min |
| キャリアガス流速 | ； 10 μ L/min～850 μ L/min (標準時 800 μ L/min) |
| サンプリングコーン材質 | ； Nickel |
| スキマーコーン材質 | ； Nickel |
| サンプリング深さ | ； 6.5 mm |
| ピークあたりの測定ポイント数 | ； 3 |
| 積分時間 | ； 9.9 sec/mass |
| 繰り返し回数 | ； n = 3 |
| チャンバー温度(ペルチェ) | ； 2 $^{\circ}$ C |
| ネブライザ | ； 同軸ネブライザ(石英ガラス) |

《試 薬》

アセトニトリル ; LC-MS 用溶媒
純 水 ; ミリポア社製 ICP-MS グレードより採取

《実験手順》

アセトニトリルと純水を混合し、アセトニトリル溶液を調製。調製したアセトニトリル溶液を ICP-MS に直接試料キャピラリーから導入し、各キャリアガス流速にて 5 分間安定してプラズマが維持できているか観測した。

2-3-4 有機溶媒導入に向けた気化室容積の最適化

《試 薬》

メタノール ; LC-MS 用溶媒
エタノール ; LC-MS 用溶媒

《実験手順》

装置及びその他の試薬は 2-3-3 と同じ。各有機溶媒と純水を混合し、試料溶液を調製。調製した試料溶液を ICP-MS に直接試料キャピラリーから導入し、各キャリアガス流速にて 5 分間安定してプラズマが維持できているか観察した。

2-3-5 逆相 LC/ICP-MS 用インターフェイスの性能評価

《試 薬》

元素標準溶液 ; 原子吸光分析用標準液
ICP-AES 用標準液
ICP-MS 用標準液
硝 酸 ; Ultrapur グレード

《実験手順》

装置及びその他の試薬は 2-3-3 と同じ。元素標準溶液を純水で希釈し、硝酸を添加して 1 mg/L 溶液(硝酸濃度 0.1 mol/L)をストック溶液とした。ストック溶液をアセトニトリルまたは純水で希釈し、アセトニトリル溶液および水溶液の 1 μ g/L 試料溶液を調製。調製した試料溶液を ICP-MS に直接試料キャピラリーから導入し、ブランク溶液と比較して検出限界を求めた。

2-4-2 逆相 LC/ICP-MS を使ったリン化合物の分析

《装置条件》

ICP-MS: Agilent 製 HP7700 (四重極型質量分析装置)

| | |
|----------------|-------------------|
| 高周波電圧 | ; 1550 W |
| プラズマガス流速 | ; 15.0 L/min |
| 中間ガス流速 | ; 1.0 L/min |
| キャリアガス流速 | ; 800 μ L/min |
| コリジョンガス | ; He |
| コリジョンガス流速 | ; 4.3 mL/min |
| サンプリングコーン材質 | ; Nickel |
| スキマーコーン材質 | ; Nickel |
| サンプリング深さ | ; 6.5 mm |
| ピークあたりの測定ポイント数 | ; 3 |
| 積分時間 | ; 9.9 sec/mass |
| 繰り返し回数 | ; n = 3 |
| チャンバー温度 (ペルチェ) | ; 2 $^{\circ}$ C |
| ネブライザ | ; 同軸ネブライザ (PFA 製) |

(QTOF)MS: Waters社製Q-TOF Premier

| | |
|-------------------------|-----------------------------|
| Detection mode | ; ESI positive and negative |
| Desolvation gas | ; 700 L/h |
| Cone gas | ; 50 L/h |
| Source temperature | ; 80 $^{\circ}$ C |
| Capillary voltage | ; 3,000 V |
| Cone voltage | ; 20 V |
| MCP detector voltage | ; 1,600 V |
| Collision gas | ; Ar |
| Collision gas flow rate | ; 0.6 mL/min |
| Collision gas energy | ; 4 V |

HPLC: (株)島津製作所製 Prominence システム

control unit (CBM-20A)、autosampler (SIL-20AC HT UFLC)、UV detector (SPD-20A UFLC with micro-bore cell)、column oven (CTO-20AC)、pump (LC-20AD_{XR} UFLC)、degasser (DGU-20A₃)

【LC/ICP-MS 測定時】

| | |
|------------------|---|
| 流 速 | ; 50 μ L/min |
| カラム | ; Inertsil ODS-3, 1.0 \times 150 mm |
| カラムオープン温度 | ; 室温 (25 $^{\circ}$ C) |
| UV 検出 | ; 254 nm |
| 移動相 | ; A) 5 mmol/L ギ酸アンモニウム水溶液 B) 5 mmol/L ギ酸アンモニウム/メタノール溶液 |
| グラジエント条件 (B 液濃度) | ; 0-5 min/5 %, 5-60 min/5-100 % |

【(QTOF)LC-MS 測定時】

| | |
|------------------|---|
| 流 速 | ; 0.6 mL/min |
| カラム | ; Inertsil ODS-3, 4.6 \times 150 mm |
| カラムオープン温度 | ; 室温 (25 $^{\circ}$ C) |
| 移動相 | ; A) 5 mmol/L ギ酸アンモニウム水溶液 B) 5 mmol/L ギ酸アンモニウム/メタノール溶液 |
| グラジエント条件 (B 液濃度) | ; 0-5 min/5-100 %, 5-60 min/100 % |

《試 薬》

| | |
|-------------|---|
| 元素標準溶液 | ; 原子吸光分析用標準液 ICP-AES 用標準液 ICP-MS 用標準液 |
| リン脂質標品 | ; 特級試薬 |
| アルブミン標品 | ; 特級試薬 |
| 硝 酸 | ; Ultrapur グレード |
| メタノール | ; LC-MS 用溶媒 |
| アセトニトリル | ; LC-MS 用溶媒 |
| 純 水 | ; ミリポア社製 ICP-MS グレードより採取 |
| 硝 酸 | ; Ultrapur グレード |
| ギ酸、ギ酸アンモニウム | ; 特級試薬 |

《実験手順》

リン脂質標品はメタノールに溶解し、LC-MS および LC/ICP-MS に導入/検出を行った。LC/ICP-MS の検出には $m/z = 31$ を用い、リンの検出を行った。

2-4-3 逆相 LC/ICP-MS を使った含硫アミノ酸の分析

《装置条件》

ICP-MS: 2-4-2 と同じ

HPLC: (株)島津製作所製 Prominence システム

control unit (CBM-20A)、autosampler (SIL-20AC HT UFLC)、UV detector (SPD-20A UFLC with micro-bore cell)、column oven (CTO-20AC)、pump (LC-20AD_{XR} UFLC)、degasser (DGU-20A₃)

| | |
|-----------------|--|
| 流 速 | ; 50 μ L/min |
| カラム | ; Inertsil ODS-3, 1.0 \times 150 mm |
| カラムオープン温度 | ; 室温 (25 $^{\circ}$ C) |
| UV 検出 | ; 254 nm |
| 移動相 | ; A) 10 mmol/L 酢酸アンモニウム水溶液 (pH 4.8) B) 60 %アセトニトリル/水溶液(v/v = 60/40) |
| グラジエント条件(B 液濃度) | ; 0-5 min/5 %, 5-40 min/5-35 %, 40-55 min/100 %, 55-70 min/5 % |

《試 薬》

| | |
|------------|--------------------------|
| アミノ基誘導体化試薬 | ; Waters 社製 AccQ-Tag キット |
| 含硫アミノ酸標品 | ; 特級試薬 |

《実験手順》

装置及びその他の試薬は 2-4-2 と同じ。含硫アミノ酸の誘導体化はキットの手順に従い、試料 10 μ L をホウ酸緩衝液 60 μ L と混合。一方、誘導体化試薬をアセトニトリルで加温溶解し、30 μ L を分取して試料/ホウ酸溶液と混合し、アルミブロックヒーターで 55 $^{\circ}$ C、5 分間加熱。その後 pH 4.8 ギ酸緩衝液 500 μ L と混合して分析試料とした。分析試料は 4 $^{\circ}$ C 冷蔵保存し、速やかに LC/ICP-MS に導入して検出を行った。

第三章

3-3-1 金属タグ化試薬を使った高感度アミノ酸分析法の確立

《装置条件》

ICP-MS: Agilent 製 HP4500 (四重極型質量分析装置)

パラメータは 2-3-2 と同じ。検出のみ $m/z = 101$ もしくは 102 を使用 (Ru を検出)

HPLC: Dionex 社製 メタルフリークロマトグラフィーシステム

control unit、autosampler (AS50)、UV detector (AD25)、column oven (LC30)、
pump (GP50)、degasser

| | |
|------------------|--|
| 流速 | ; 50 μ L/min |
| カラム | ; Inertsil ODS-3, 1.0 \times 250 mm |
| カラムオープン温度 | ; 35 $^{\circ}$ C |
| UV 検出 | ; 254 nm |
| 移動相 | ; A) 100 mmol/L リン酸緩衝液 (pH 6.8) (アセトニトリル 5 %含有) B) 60 %アセトニトリル/水溶液 (v/v = 60/40) C) 10 M EDTA-Na 溶液 |
| グラジエント条件 (B 液濃度) | ; 0-50 min/6.25-40 %, 50-60 min/6.25 % C 液を常時 1 %導入 |

《試薬》

| | |
|-------------|--------------------------|
| アセトニトリル | ; LC-MS 用溶媒 |
| リン酸二水素ナトリウム | ; 特級試薬 |
| リン酸水素二ナトリウム | ; 特級試薬 |
| ホウ酸 | ; 特級試薬 |
| アミノ酸標品 | ; 特級試薬 |
| BCRS | ; 特級試薬 |
| 純水 | ; ミリポア社製 ICP-MS グレードより採取 |

《実験手順》

アミノ酸標品は秤量後に 0.1 mol/L の塩酸で溶解し、1 mmol/L のストック試料を調製。適宜希釈混合して用いた。誘導体化反応は、試料 10 μ L を 200 mmol/L ホウ酸緩衝液 60 μ L と混合。一方、BCRS をアセトニトリルで溶解し、30 μ L を分取して試料/ホウ酸溶液と混合 (有機溶媒濃度変更時にはアセトニトリルを適宜添加) し、アルミブロックヒーターで 41 $^{\circ}$ C、1.5 時間加熱。その後 pH 6.8 リン酸緩衝液 900 μ L と混合

して分析試料とした。分析試料は 4 °C 冷蔵保存し、速やかに LC/ICP-MS に導入して検出を行った。

3-3-2 LC/ICP-MS による金属タグ化アミノ酸の検出

《実験手順》

装置及び試薬条件は 3-3-1 と同じ。

3-3-3 LC/ICP-MS による金属タグ化アミノ酸の検出

《実験手順》

Glu 測定時の装置及び試薬条件は 3-3-1 と同じ。

《BCAA 測定時の装置条件》

ICP-MS: Agilent 製 HP7700 (四重極型質量分析装置)

| | |
|----------------|-------------------|
| 高周波電圧 | ; 1590 W |
| プラズマガス流速 | ; 15.0 L/min |
| 中間ガス流速 | ; 1.0 L/min |
| キャリアガス流速 | ; 800 μ L/min |
| コリジョンガス | ; He |
| コリジョンガス流速 | ; 4.3 mL/min |
| サンプリングコーン材質 | ; Nickel |
| スキマーコーン材質 | ; Nickel |
| サンプリング深さ | ; 6.5 mm |
| ピークあたりの測定ポイント数 | ; 3 |
| 積分時間 | ; 9.9 sec/mass |
| 繰り返し回数 | ; n = 3 |
| チャンバー温度 (ペルチェ) | ; 2 °C |
| ネブライザ | ; 同軸ネブライザ (PFA 製) |

3-3-4 アミノ酸分析用金属タグ化試薬の開発

《装置条件》

(QTOF)MS: 2-4-2と同じ。

HPLC: (株)島津製作所製 Prominence システム

control unit (CBM-20A)、autosampler (SIL-20AC HT UFLC)、UV detector (SPD-20A UFLC with micro-bore cell)、column oven (CTO-20AC)、pump (LC-20AD_{XR} UFLC)、degasser (DGU-20A₃)

流速 ; 50 μ L/min
カラム ; Inertsil ODS-3, 1.0 \times 150 mm
カラムオープン温度 ; 室温(25 $^{\circ}$ C)
UV 検出 ; 254 nm
移動相 ; A) 10 mmol/L 酢酸アンモニウム水溶液 (pH 4.8)
B) 60 %アセトニトリル/水溶液(v/v = 60/40)
グラジエント条件(B 液濃度) ; 0-5 min/5 %, 5-40 min/5-35 %, 40-55 min/100 %, 55-70 min/5 %

《試薬》

4'-Methyl-2, 2'-bipyridine-4-carboxylic acid

; Rubypy Scientific Inc.より入手

《実験手順》

試薬合成は NARD 株式会社に委託。合成手順は図 3-13 を参照。

3-3-5 新規アミノ酸分析用金属タグ化試薬によるアミノ酸分析条件の確立

《装置条件》

ICP-MSの装置条件は3-3-3のBCAA測定時と同じ

HPLC: 分析条件は 3-3-3 と同じ

《実験手順》

アミノ酸標品は秤量後に 0.1 mol/L の塩酸で溶解し、1 mmol/L のストック試料を調製。適宜希釈混合して用いた。誘導体化反応は、試料 10 μ L を 200 mmol/L ホウ酸緩衝液 (pH 8.0) 60 μ L と混合。一方、ECRS をアセトニトリルで溶解し、30 μ L を分取して試料/ホウ酸溶液と混合し、アルミブロックヒーターで 55 $^{\circ}$ C、5 分間加熱。その

後 1 mol/L 酢酸緩衝液 (pH 4.8) 50 μ L と混合して分析試料とした。分析試料は 4 $^{\circ}$ C 冷蔵保存し、速やかに LC/ICP-MS に導入して検出を行った。

3-3-6 EDTA 型構造を持つ金属タグ化試薬の検討

《装置条件》

装置条件は 3-3-3、3-3-4 と同じ。

《試薬》

Isothocyanobenzyl-EDTA ; 特級試薬

《実験手順》

アミノ酸およびジアミン標品は秤量後に 0.1 mol/L の塩酸で溶解し、1 mmol/L のストック試料を調製。適宜希釈混合して用いた。誘導体化反応は、試料 10 μ L を 200 mmol/L ホウ酸緩衝液 (pH 8.0) 60 μ L と混合。一方、Isothocyanobenzyl-EDTA をアセトニトリルで溶解し、30 μ L を分取して試料/ホウ酸溶液と混合し、アルミブロックヒーターで 55 $^{\circ}$ C、一晩加熱。その後 1 mol/L 塩酸 50 μ L と混合し、さらに 1 mol/L 酢酸緩衝液 (pH 4.8) 50 μ L と混合して分析試料とした。分析試料は 4 $^{\circ}$ C 冷蔵保存し、速やかに LC/ICP-MS に導入して検出を行った。

第四章

4-2-2 iPS 細胞中の遊離アミノ酸分析

《装置条件》

ICP-MS: Agilent 製 HP7700 (四重極型質量分析装置)

| | |
|----------------|-------------------------|
| 高周波電圧 | ; 1590 W |
| プラズマガス流速 | ; 15.0 L/min |
| 中間ガス流速 | ; 1.0 L/min |
| キャリアガス流速 | ; 800 μ L/min |
| コリジョンガス | ; He |
| コリジョンガス流速 | ; 4.3 mL/min |
| サンプリングコーン材質 | ; Nickel |
| スキマーコーン材質 | ; Nickel |
| サンプリング深さ | ; 6.5 mm |
| ピークあたりの測定ポイント数 | ; 3 |
| 積分時間 | ; 9.9 sec/mass |
| 繰り返し回数 | ; n = 3 |
| チャンバー温度 (ペルチェ) | ; 2 $^{\circ}$ C |
| ネブライザ | ; 同軸ネブライザ (PFA 製) |
| 検出 | ; $m/z = 101$ または 102 |

HPLC: (株)島津製作所製 Prominence システム

control unit (CBM-20A)、autosampler (SIL-20AC HT UFLC)、UV detector (SPD-20A UFLC with micro-bore cell)、column oven (CTO-20AC)、pump (LC-20AD_{XR} UFLC)、degasser (DGU-20A₃)

| | |
|------------------|---|
| 流速 | ; 50 μ L/min |
| カラム | ; Inertsil ODS-3, 1.0 \times 150 mm |
| カラムオープン温度 | ; 室温 (25 $^{\circ}$ C) |
| UV 検出 | ; 254 nm |
| 移動相 | ; A) 10 mmol/L 酢酸アンモニウム水溶液 (pH 4.8) B) 60 %アセトニトリル/水溶液 (v/v = 60/40) |
| グラジエント条件 (B 液濃度) | ; 0-5 min/5 %, 5-40 min/5-35 %, 40-55 min/100 %, 55-70 min/5 % |

《試薬》

| | |
|---------|-------------|
| アセトニトリル | ; LC-MS 用溶媒 |
|---------|-------------|

| | |
|----------|--------------------------|
| 酢酸アンモニウム | ； 特級試薬 |
| 酢酸 | ； Ultrapur グレード |
| ホウ酸 | ； 特級試薬 |
| アミノ酸標品 | ； 特級試薬 |
| ECRS | ； NARD 社に合成委託 |
| 純水 | ； ミリポア社製 ICP-MS グレードより採取 |

《試料》

iPS 細胞 (201B7 株) ； /京都大学 iPS 細胞研究所 (CiRA[※])より入手
[※]CiRA: Center for iPS Cell Research and Application, Kyoto University

《実験手順》

iPS 細胞を 6 ウェルプレートで培養し、上清を除いて氷水冷したリン酸緩衝液を添加/洗浄を 2 回繰り返した。その後、上清を除き、メタノール/水 (v/v = 80:20) 溶液を添加してスクレーパーで細胞を掻き取り、サンプルチューブに入れた。遠心して上清を回収し、細胞抽出液とした。抽出液の上清は細胞数を測定後、 3×10^4 個分を 200 mmol/L、pH 8.0 のホウ酸緩衝液と混合して 70 μ l に調製し、ECRS のアセトニトリル溶液 30 μ L を添加して混合した後、アルミ製ブロックヒーターにて 55 $^{\circ}$ C、5 min 加熱、1 mol/L の酢酸アンモニウム溶液を添加して pH を調整した。誘導体化後の溶液は 4 $^{\circ}$ C で保存し、速やかに LC/ICP-MS 分析に供した。

4-3-2 ショウジョウバエ 1 個体中の遊離アミノ酸分析

《装置条件》

LC/ICP-MS: 4-2-2 と同じ。

《試料》

キイロショウジョウバエ ； /首都大学東京相垣研究室より入手

《実験手順》

キイロショウジョウバエ (*Drosophila melanogaster*) を採取後、純水で軽く洗浄し、1 個体ずつサンプルチューブ内で凍結乾燥を行った。サンプルチューブにメタノール/水 (v/v = 50:50) 溶液を 100 μ L 添加し、電動ペッスルを用いて 5 分間、氷水冷しながら破碎・抽出し、遠心分離後、上清を分析試料とした。

得られた分析試料は 10 μ L を分取して 200 mmol/L、pH 8.0 のホウ酸緩衝液 60 μ L とよく混合し、ECRS のアセトニトリル溶液 30 μ L を添加してさらに混合した後、アルミ製ブロックヒーターにて 55 $^{\circ}$ C、5 min 加熱し、1 mol/L の酢酸アンモニウム溶液を添加して pH を調整した。誘導体化後の溶液は 4 $^{\circ}$ C で保存し、速やかに LC/ICP-MS 分析に供した。

4-3-3 性差によるショウジョウバエ中の遊離アミノ酸量の変化

実験条件は 4-3-2 と同じ。

4-3-4 食性の違いによるショウジョウバエ中の遊離アミノ酸量の変化

実験条件は 4-3-2 と同じ。

4-3-5 ライフサイクルにおけるショウジョウバエ中の遊離アミノ酸量の変化

実験条件は 4-3-2 と同じ。

4-3-6 遺伝子変異によるショウジョウバエ中の遊離アミノ酸量の変化

実験条件は 4-3-2 と同じ。

引用文献

1. J. Wisniak, *Pierre-jean robiquet*. Educación Química, 2013. **24**: p. 139.
2. P. S. Florides, *John lighton syngé. 23 March 1897*. Biogr. Mem. Fell. R. Soc., 2008. **54**: p. 401.
3. D. H. Spackman, W. H. Stein, S. Moore, *Automatic recording apparatus for use in the chromatography of amino acids*. Anal. Chem., 1958. **30**: p. 1190.
4. K. Shimbo, A. Yahashi, K. Hirayama, M. Nakazawa, H. Miyano, *Multifunctional and Highly Sensitive Precolumn Reagents for Amino Acids in Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry*. Anal. Chem., 2009. **81**: p. 5172.
5. K. Shimbo, T. Oonuki, A. Yahashi, K. Hirayama, H. Miyano, , *Precolumn derivatization reagents for high-speed analysis of amines and amino acids in biological fluid using liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry*. Rapid Commun. Mass Spectrom., 2009. **23**: p. 1483.
6. M. N. Arbeitman, E. M. Eileen, F. Imam, E. Johnson, B. H. Null, B. S. Baker, M. A. Krasnow, M. P. Scott, R. W. Davis, K. P. White, *Gene expression during the life cycle of Drosophila melanogaster*. Science, 2002. **297**: p. 2270.
7. G. K. Zoorob, J. W. Mckiernan, J. A. Caruso, *ICP-MS for elemental speciation studies*. Mikrochim. Acta, 1998. **128**: p. 145.
8. A. Sanz-Medel, *Trace element speciation by ICP-MS in large biomolecules and its potential for proteomics*. Anal. Bioanal. Chem., 2003. 377: p. 236.
9. A. R. Date, A. L. Glay, *Inductively coupled plasma mass spectrometry*, 1989, Blackie.
10. K. E. Jarvis, A. L. Glay, R. S. Houk, *Inductively coupled plasma mass spectrometry*, 1992, Blackie.
11. D. Iwahata, K. Hirayama, H. Miyano, *A highly sensitive analytical method for metal-labelled amino acids by HPLC/ICP-MS*. J. Anal. At. Spectrom., 2008. **23**: p. 1063.
12. L. Novakova, H. Vlečkova, *A review of current trends and advances in modern bio-analytical methods: Chromatography and sample preparation*. Anal. Chim. Acta, 2009. **656**: p. 8.
13. T. Wang, *Liquid chromatography - inductively coupled plasma mass spectrometry (LC-ICP-MS)*. J. Liq. Chrom. Rel. Tech., 2007. **30**: p. 807.
14. A. W. Boorn, R. F. Browner, *Effects of organic solvents in inductively coupled plasma atomic emission spectrometry*. Anal. Chem., 1982. **54**: p. 1402.
15. D. R. Wiederin, R. S. Houk, R. K. Winge, A. P. D'Silva, *Introduction of Organic Solvents into Inductively Coupled Plasmas by Ultrasonic Nebulization with Cryogenic Desolvation*. Anal. Chem., 1990. **62**: p. 1155.

16. C. K. Sam, R. N. Shum, R. S. Houk, *Elemental speciation by liquid chromatography, inductively coupled plasma mass spectrometry with direct injection nebulization*. Analyst, 1992. **117**: p. 577.
17. K. Pomazal, C. Prohaska, I. Steffan, G. Reich, J. F. K. Huber, *Determination of Cu, Fe, Mn, and Zn in blood fractions by SEC-HPLC-ICP-AES coupling*. Analyst, 1999. **124**: p. 657.
18. O. Mestek, J. Kominkova, R. Koplík, M. Kodíček, T. Zima, *Quantification of trace elements in human serum fractions by liquid chromatography and inductively coupled plasma mass spectrometry*. Appl. Organomet. Chem., 2007. **21**: p. 5.
19. S. Muniz, C. M. Gayon, J. M. G. Alonso, J. Ignacio, A. Sanz-Medel, *Speciation of essential elements in human serum using anion exchange chromatography coupled to post-column isotope dilution analysis with double focusing ICP-MS*. J. Anal. At. Spectrom., 2001. **16**: p. 587.
20. K. E. Lawrence, G. W. Rice, V. A. Fassel, *Direct liquid sample introduction for flow injection analysis and liquid chromatography with inductively coupled argon plasma spectrometric detection*. Anal. Chem., 1984. **56**: p. 292.
21. K. L. Sutton, J. A. Caruso, *Liquid chromatography–inductively coupled plasma mass spectrometry*. J. Chromatogr. A, 1999. **856**: p. 243.
22. L. Li, B. Hu, L. Xia, Z. Jiang, *Determination of trace Cd and Pb in environmental and biological samples by ETV-ICP-MS after single-drop microextraction*. Talanta, 2006. **70**: p. 468.
23. E. H. Evans, L. Ebdon, *Effect of organic solvents and molecular gases on polyatomic ion interferences in inductively coupled plasma mass spectrometry*. J. Anal. At. Spectrom., 1990. **5**: p. 425.
24. G. Kirchhoff, *Ueber das gleichgewicht und die bewegung eines unendlich dünnen elastischen stabes*. J. Reine Angew. Math., 1859. **56**: p. 285.
25. G. Kirchhoff, R. Bunsen, *Chemische analyse durch spectralbeobachtungen*. Ann. Phys., 1860. **186**: p. 161.
26. A. Walsh, *The application of atomic absorption spectra to chemical analysis*. Spectrochim. Acta, 1955. **7**: p. 108.
27. B. V. L'vov, *Fifty years of atomic absorption spectrometry*. J. Anal. Chem., 2005. **60**: p. 382.
28. R. H. Wendt, V. A. Fassel, *Induction-coupled plasma spectrometric excitation source*. Anal. Chem., 1965. **37**: p. 920.
29. R. S. Houk, V. A. Fassel, G. D. Flesch, H. J. Svec, *Inductively coupled argon plasma as an ion source for mass spectrometric determination of trace elements*. Anal. Chem.,

1980. **52**: p. 2283.
30. P. G. Brown, T. M. Davidson., J. A. Caruso, *Application of helium microwave-induced plasma mass spectrometry to the detection of high ionisation potential gas phase species*. J. Anal. At. Spectrom., 1988. **3**: p. 763.
 31. L. Ebdon, M. R. Cave, *A study of pneumatic nebulisation systems for inductively coupled plasma emission spectrometry*. Analyst, 1982. **107**: p. 172.
 32. I. A. Bergdahl, A. Schutz, A. Grubb, *Application of liquid chromatography, inductively coupled plasma mass spectrometry to the study of protein-bound lead in human erythrocytes*. J. Anal. At. Spectrom., 1996. **11**: p. 735.
 33. L. Wang, S. W. May, R. F. Browner, S. H. Pollock, *Low-flow interface for liquid chromatography / inductively coupled plasma mass spectrometry speciation using an oscillating capillary nebulizer*. J. Anal. At. Spectrom., 1996. **11**: p. 1137.
 34. A. Tangen, R. Trones, T. Greibrokk, W. Lund, *Microconcentric nebulizer for the coupling of micro liquid chromatography and capillary zone electrophoresis with inductively coupled plasma mass spectrometry*. J. Anal. At. Spectrom., 1997. **12**: p. 667.
 35. B. Michalke, *The coupling of LC to ICP-MS in element speciation: I. General aspects*. Trends Anal. Chem., 2002. **21**: p. 142.
 36. E. Dumont, Y. Ogra, F. Vanhaecke, K. T. Suzuki, R. Cornelis, *Liquid chromatography - mass spectrometry (LC-MS): a powerful combination for selenium speciation in garlic (Allium sativum)*. Anal. Bioanal. Chem., 2006. **384**: p. 1196.
 37. J. Szpunar, *Advances in analytical methodology for bioinorganic speciation analysis: metallomics, metalloproteomics and heteroatom-tagged proteomics and metabolomics*. Analyst, 2005. **130**: p. 442.
 38. J. Bettmer, M. M. Bayon, J. R. Encinar, M. Luiza, F. Sanchez, M. Rosario, R. F. Campa, A. Sanz-Medel, *The emerging role of ICP-MS in proteomic analysis*. J Proteomics, 2009. **72**: p. 989.
 39. A. P. Navaza, J. R. Encinar, A. Sanz-Medel, *Quantitative protein phosphorylation analysis: the role of ICP-MS*. J. Anal. At. Spectrom., 2007. **22**: p. 1223.
 40. K. Wrobel, J. A. Caruso, *Epigenetics: an important challenge for ICP-MS in metallomics studies*. Anal. Bioanal. Chem., 2009. **393**: p. 481.
 41. A. Sanz-Medel, *From metalloproteomics to heteroatom-tagged proteomics*. Anal. Bioanal. Chem., 2005. **381**: p. 1.
 42. R. N. Rao, M. V. Talluri, *An overview of recent applications of inductively coupled plasma-mass spectrometry (ICP-MS) in determination of inorganic impurities in drugs and pharmaceuticals*. J. Pharm. Biomed. Anal., 2007. **43**: p. 1.

43. J. I. Todoli, J. M. Mermet, *Evaluation of a direct injection high-efficiency nebulizer (DIHEN) by comparison with a high-efficiency nebulizer (HEN) coupled to a cyclonic spray chamber as a liquid sample introduction system for ICP-AES*. J. Anal. At. Spectrom., 2001. **16**: p. 514.
44. P. W. Kirlew, J. A. Caruso, *Investigation of a modified oscillating capillary nebulizer design as an interface for CE-ICP-MS*. Appl. Spectrosc., 1998. **52**: p. 770.
45. J. L. Todoli, V. Hernandis, A. Canalsa, J. M. Mermet, *Comparison of characteristics and limits of detection of pneumatic micronebulizers and a conventional nebulizer operating at low uptake rates in ICP-AES*. J. Anal. At. Spectrom., 1999. **14**: p. 1289.
46. S. E. Maestre, J. L. Todoli, J. M. Mermet, *Evaluation of several pneumatic micronebulizers with different designs for use in ICP - AES and ICP-MS. Future directions for further improvement*. Anal. Bioanal. Chem., 2004. **379**: p. 888.
47. K. Inagaki, S. Fujii, A. Takatsu, K. Chiba, *High performance concentric nebulizer for low-flow rate liquid sample introduction to ICP-MS*. J. Anal. At. Spectrom., 2011. **26**: p. 623.
48. G. A. Llamas, M. Rosario, F. Campa, A. Sanz-Medel, *ICP-MS for specific detection in capillary electrophoresis*. Trends Anal. Chem., 2005. **24**: p. 28.
49. D. Beauchemin, J. M. Craig, *Investigations on mixed-gas plasmas produced by adding nitrogen to the plasma gas in ICP-MS*. Spectrochim. Acta B, 1991. **46**: p. 603.
50. M. J. Holden, S. A. Rabb, Y. B. Tewari, M. R. Winchester, *Traceable phosphorus measurements by ICP-OES and HPLC for the quantitation of DNA*. Anal. Chem., 2007. **79**: p. 1536.
51. M. Y. Hirai, K. Saito, *Analysis of systemic sulfur metabolism in plants using integrated 'omics' strategies*. Mol. Biosyst., 2008. **4**: p. 967.
52. R. Nakabayashi, Y. Sawada, Y. Yamada, M. Suzuki, M. Y. Hirai, T. Sakurai, K. Saito, *Combination of liquid chromatography. Fourier transform ion cyclotron resonance-mass spectrometry with ¹³C. Labeling for chemical assignment of sulfur-containing metabolites in onion bulbs*. Anal. Chem., 2013. **85**: p. 1310.
53. M. Shah, J. A. Caruso, *Inductively coupled plasma mass spectrometry in separation techniques: Recent trends in phosphorus speciation*. J. Sep. Sci., 2005. **28**: p. 1969.
54. M. C. Roach, M. D. Harmony, *Determination of amino acids at subfemtomole levels by high-performance liquid chromatography with laser-induced fluorescence detection*. Anal. Chem., 1987. **59**: p. 411.
55. S. A. Cohen, D. J. Strydom, *Amino acid analysis utilizing phenylisothiocyanate derivatives*. Anal. Biochem., 1988. **174**: p. 1.
56. S. A. Cohen, K. M. Antonis., *Applications of amino acid derivatization with 6-*

- aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl carbamate analysis of feed grains, intravenous solutions and glycoproteins.* J. Chromatogr. A, 1994. **661**: p. 25.
57. F. R. Antoine, C. I. Wei, R. C. Littell, M. R. Marshall, *HPLC method for analysis of free amino acids in fish using o-phthaldialdehyde precolumn derivatization.* J. Agric. Food Chem., 1999. **47**: p. 5100.
58. A. M. G. Paramás, J. A. G. Barez, C. C. Marcos, R. J. García-Villanova, J. S. Sánchez, *HPLC-fluorimetric method for analysis of amino acids in products of the hive (honey and bee-pollen).* Food Chemistry, 2006. **95**: p. 148.
59. C. Aoyama, T. Santa, M. Tsunoda, T. Fukushima, C. Kitada, K. Imai, *A fully automated amino acid analyzer using NBD-F as a fluorescent derivatization reagent.* Biomed. Chrom., 2004. **18**: p. 630.
60. J. M. Armenta, D. F. Cortes, J. M. Pisciotta, J. L. Shuman, K. Blakeslee, D. Rasoloson, O. Ogunbiyi, D. J. Sullivan, Jr., V. Shulaev, *Sensitive and rapid method for amino acid quantitation in Malaria biological samples using AccQ•Tag ultra performance liquid chromatography-electrospray ionization-MS/MS with multiple reaction monitoring.* Anal. Chem., 2010. **82**: p. 548.
61. D. Kowalczyk, A. Galewska, *HPLC analysis of amoxicillin using AccQ-Fluor reagent for pre-column derivatization.* Pol. J. Environ. Stud., 2012. **21**: p. 139.
62. P. R. D. Mason, K. Kaspers, M. J. Bergen, *Determination of sulfur isotope ratios and concentrations in water samples using ICP-MS incorporating hexapole ion optics.* J. Anal. At. Spectrom., 1999. **14**: p. 1067.
63. S. F. Boulyga, J. S. Becker, *ICP-MS with hexapole collision cell for isotope ratio measurements of Ca, Fe, and Se.* Fresen J Anal Chem., 2001. **370**: p. 618.
64. T. Santa, A. Takeda, S. Uchiyama, T. Fukushima, H. Homma, S. Suzuki, H. Yokosu, C. K. Lim, K. Imai, *N-(4-nitro-2,1,3-benzoxadiazoyl-7-yl) -N-methyl -2-aminoacetohydrazide (NBD-CO-Hz) as a precolumn fluorescent derivatization reagent for carboxylic acids in high-performance liquid chromatography.* J. Pharm. Biomed. Anal., 1998. **17**: p. 1065.
65. T. Toyo'oka, H. Miyano, K. Imai, *Amino acid composition analysis of minute amounts of cysteine-containing proteins using 4-(aminosulfonyl)-7-fluoro-2,1,3-benzoxadiazole and 4-fluoro-7-nitro-2,1,3-benzoxadiazole in combination with HPLC.* Biomed. Chrom., 2005. **1**: p. 15.
66. T. A. Graser, H. G. Godel, S. Albers, P. Foldi, P. Furst, *An ultra rapid and sensitive high-performance liquid chromatographic method for determination of tissue and plasma free amino acids.* Anal. Biochem., 1985. **151**: p. 142.
67. Y. Ishida, T. Fujita, K. Asai, *New detection and separation method for amino acids by*

- high-performance liquid chromatography*. J. Chromatogr., 1981. **204**: p. 143.
68. K. Iwaki, N. Nimura, Y. Hiraga, T. Kinoshita, *Amino acid analysis by reversed-phase high-performance liquid chromatography automatic pre-column derivatization with activated carbamate reagent*. J. Chromatogr., 1987. **407**: p. 273.
69. Y. Watanabe, K. Imai, *High-performance liquid chromatography and sensitive detection of amino acids derivatized with 7-fluoro-4-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazole*. Anal. Biochem., 1981. **116**: p. 471.
70. S. Uchiyama, T. Santa, N. Okiyama, T. Fukushima, K. Imai, *Fluorogenic and fluorescent labeling reagents with a benzofurazan skeleton*. Biomed. Chromatogr., 2001. **15**: p. 295.
71. A. Tholey, D. Schaumlöffel, *Metal labeling for quantitative protein and proteome analysis using inductively-coupled plasma mass spectrometry*. Trends Anal. Chem., 2010. **29**: p. 399.
72. P. A. Whetstone, N. G. Bulin., T. M. Corneillie, C. F. Meares, *Element-coded affinity tags for peptides and proteins*. Bioconjug Chem., 2004. **15**: p. 3.
73. S. Zhang, C. Zhang, Z. Xing, X. Zhang, *Simultaneous determination of alpha-fetoprotein and free beta-human chorionic gonadotropin by element-tagged immunoassay with detection by inductively coupled plasma mass spectrometry*. Clin. Chem., 2004. **50**: p. 1214.
74. C. Zhang, F. Wu, Y. Zhang, X. Wang, X. Zhang, *A novel combination of immunoreaction and ICP-MS as a hyphenated technique for the determination of thyroid-stimulating hormone (TSH) in human serum*. J. Anal. At. Spectrom., 2001. **16**: p. 1393.
75. Z. A. Quinn, V. I. Baranov, S. D. Tanner, J. L. Wrana, *Simultaneous determination of proteins using an element-tagged immunoassay coupled with ICP-MS detection*. J. Anal. At. Spectrom., 2002. **17**: p. 892.
76. R. Ahrends, S. Pieper, A. Kuhn, H. Weisshoff, M. Hamester, T. Lindemann, C. Scheler, K. Lehmann, K. Taubner, M. W. Linscheid, *A metal-coded affinity tag approach to quantitative proteomics*. Mol. Cell. Proteomics, 2007. **6**: p. 1907.
77. R. Ahrends, S. Pieper, B. Neumann, C. Scheler, M. W. Linscheid, *Metal-coded affinity tag labeling: A demonstration of analytical robustness and suitability for biological applications*. Anal. Chem., 2009. **81**: p. 2176.
78. J. Bettmer, M. M. Bayon, J. R. Encinar, M. L. F. Sánchez, M. R. F. Campa, A. Sanz-Medel, *The emerging role of ICP-MS in proteomic analysis*. J Proteomics, 2009. **72**: p. 989.
79. U. Bergmann, R. Ahrends, B. Neumann, C. Scheler, M. W. Linscheid, *Application of*

- metal-coded affinity tags (MeCAT): Absolute protein quantification with top-down and bottom-up workflows by metal-coded tagging.* Anal. Chem., 2012. **84**: p. 5268.
80. Y. Guo, M. Xu, L. Yang, Q. Wang, *Strategy for absolute quantification of proteins: CH₃Hg⁺ labeling integrated molecular and elemental mass spectrometry.* J. Anal. At. Spectrom., 2009. **24**: p. 1184.
 81. M. W. Brechbiel, O. A. Gansow, R. W. Atcher, J. Schlom, J. Esteban, D. E. Simpson, D. Colcher, *Synthesis of 1-(p-1isothiocyanatobenzyl) derivatives of DTPA and EDTA. Antibody labeling and tumor-imaging studie.* Inorg. Chem., 1986. **25**: p. 2112.
 82. M. Friedman, A. Orlova, E. Johansson, T. L. Eriksson, I. Hoiden-Guthenberg, V. Tolmachev, F. Y. Nilsson, S. Stahl, *Directed evolution to low nanomolar affinity of a tumor-targeting epidermal growth factor receptor-binding affibody molecule.* J. Mol. Biol., 2008. **376**: p. 1388.
 83. D. A. Westerberg, P. L. Carney, P. E. Rogers, S. J. Kline, D. K. Johnson, *Synthesis of novel bifunctional chelators and their use in preparing monoclonal antibody conjugates for tumor targeting.* J. Med. Chem., 1989. **32**: p. 236.
 84. S. Crotti, C. Granzott., W. R. Cairns, P. Cescon, C. Barbante, *Elemental labeling for the identification of proteinaceous-binding media in art works by ICP-MS.* J. Mass Spectrom., 2011. **46**: p. 1297.
 85. G. Schwarz, L. Mueller, S. Beck, M. W. Linscheid, *DOTA based metal labels for protein quantification: a review.* J. Anal. At. Spectrom., 2014. **29**: p. 221.
 86. G. Koellensperger, M. Groeger, D. Zinkl, P. Petzelbauer, S. Hann, *Quantification of elemental labeled peptides in cellular uptake studies.* J. Anal. At. Spectrom., 2009. **24**: p. 97.
 87. D. Kretschy, M. Groger, D. Zinkl, P. Petzelbauer, G. Koellensperger, S. Hann, *High-throughput flow injection analysis of labeled peptides in cellular samples - ICP-MS analysis versus fluorescence based detection.* Int. J. Mass Spectrom., 2011. **307**: p. 105.
 88. S. Bomke, M. Sperling, U. Karst, *Organometallic derivatizing agents in bioanalysis.* Anal. Bioanal. Chem., 2010. **397**: p. 3483.
 89. F. Z. Su, Y. M. Liu, L. C. Wang, Y. Cao, H. Y. He, K. N. Fan, *Ga-Al mixed-oxide-supported gold nanoparticles with enhanced activity for aerobic alcohol oxidation.* Angew. Chem., 2008. **120**: p. 340.
 90. L. Duester, D. Rakcheev, J. V. Bayer, P. M. Abraham, A. Dabrunz, R. Schulz, G. E. Schaumann, *A robust, particle size independent, method for quantifying metal(loid oxide) nanoparticles and their agglomerates in complex environmental matrices by electrothermal vapourisation coupled to ICP-MS.* J. Anal. At. Spectrom., 2011. **26**: p.

- 450.
91. T. Nakanishi, B. Ohtani, K. Uosaki, *Fabrication and characterization of CdS-nanoparticle mono- and multilayers on a self-assembled monolayer of alkanedithiols on gold*. J. Phys. Chem. B, 1998. **102**: p. 1571.
 92. D. Iwahata, K. Nakamura, R. Yamada, H. Miyano, N. Yamada, *A new metal tag for highly selective and sensitive analyses of amino acids and dipeptides by HPLC/ICP-MS*. J Anal Sci Meth Instrum, 2013. **3**: p. 80.
 93. J. A. Broomhead, L. K. Maguire, *Substitution reactions of ruthenium(III)-ethylenediamine and related complexes. I. Acid hydrolysis of cis-dihalogenobis(ethylenediamine), (-)-1,2-diaminopropane, triethylenetetramine, and ammonia complexes*. Inorg. Chem., 1968. **7**: p. 2519.
 94. T. Okutani, Y. Tsukada, A. Sakuragawa, T. Yamaji, S. Morita, *Multi-element trace analysis by reversed-phase high-performance liquid chromatography followed by on-line column enrichment as 2-(5-nitro-2-pyridylazo)-5-[N-propyl-N-(3-sulfopropyl)amino] phenol chelates*. J. Chromatogr. A, 1997. **788**: p. 113.
 95. T. Okutani, S. Morit, A. Sakuragawa, *Trace determination of metal ions by on-line column enrichment followed by HPLC as metal-2-(5-nitro-2-pyridylazo)-5-[N-propyl-N-(3-sulfopropyl)-amino]phenol chelates*. Anal. Sci., 2000. **16**: p. 531.
 96. I. Yoshida, F. Sagara, K. Ueno, *Potentiometric studies on the binding properties of protons, some divalent and trivalent metal ions with 2-nitroso-5-(N-propyl-3-sulfopropylamino) phenol*. Anal. Sci., 1988. **4**: p. 69.
 97. J. Bettmer, *Application of isotope dilution ICP-MS techniques to quantitative proteomics*. Anal. Bioanal. Chem., 2010. **397**: p. 3495.
 98. X. Yan, Y. Luo, Z. Zhang, Z. Li, Q. Luo, L. Yang, B. Zhang, H. Chen, P. Bai, Q. Wang, *Europium-labeled activity-based probe through click chemistry: Absolute serine protease quantification using ¹⁵³Eu isotope dilution ICP/MS*. Angew. Chem., 2012. **51**: p. 3358.
 99. H. Kobayashi, H. Kato, Y. Hirabayashi, H. Murakami, H. Suzuki, *Modulations of muscle protein metabolism by branched-chain amino acids in normal and muscle-atrophying rats*. J. Nutr., 2006. **136**: p. 234.
 100. K. Torii, H. Uneyama, E. Nakamura, *Physiological roles of dietary glutamate signaling via gut - brainaxis due to efficient digestion and absorption*. J Gastroenterol., 2013. **48**: p. 442.
 101. N. Raghuramulu, B. S. N. Rao, C. Goplan, *Amino acid imbalance' and tryptophanniacin metabolism*. J. Nutr., 1965. **86**: p. 100.
 102. S. Spector, A. Sjoerdsma., S. Udenfriend, *Blockade of endogeneous norepinephrine*

- synthesis by α -methyl-tyrosine, an inhibitor of tyrosine hydroxylase.* J. Pharm. Exp. Ther., 1965. **147**: p. 86.
103. D. E. Matthews, G. Pesora, R. G. Campbell, *Effect of epinephrine on amino acid and energy metabolism in humans.* Am. J. Physiol., 1990. **258**: p. E948.
104. J. D. Fernstrom, *Role of precursor availability in control of monoamine biosynthesis in brain.* Physiol. Rev., 1983. **63**: p. 484.
105. D. J. Walther, J. U. Peter, S. Bashammakh, H. Hörtnagl, M. Voits, H. Fink, M. Bader, *Synthesis of serotonin by a second tryptophan hydroxylase isoform.* Science, 2003. **299**: p. 76.
106. J. E. Fischer, R. J. Baldessarini, *False neurotransmitters and hepatic failure.* Lancet, 1971. **298**: p. 75.
107. N. Shikata, Y. Maki, M. Nakatsui, M. Mori, Y. Noguchi, S. Yoshida, M. Takahashi, N. Kondo, M. Okamoto, *Determining important regulatory relations of amino acids from dynamic network analysis of plasma amino acids.* Amino Acids, 2010. **38**: p. 179.
108. Y. Noguchi, Q. W. Zhang, T. Sugimoto, Y. Furuhashi, R. Sakai, M. Mori, M. Takahashi, T. Kimura, *Network analysis of plasma and tissue amino acids and the generation of an amino index for potential diagnostic use.* Am. J. Clin. Nutr., 2006. **83**: p. 513S.
109. J. Wahren, P. Felig, E. Cerasi, R. Luft, *Splanchnic and peripheral glucose and amino acid metabolism in diabetes mellitus.* J. Clin. Invest., 1972. **51**: p. 1870.
110. P. Felig, J. Wahren, R. Sherwin, G. Palaiologos, *Amino acid and protein metabolism in diabetes mellitus.* Arch Intern Med., 1977. **137**: p. 507.
111. G. E. Lobleya, A. Connella, M. A. Lomaxa, D. S. Browna, E. Milnea, A. G. Caldera, D. A. H. Farninghama, *Hepatic detoxification of ammonia in the ovine liver: possible consequences for amino acid catabolism.* Br. J. Nutr., 1995. **73**: p. 667.
112. J. Iwasa, M. Shimizu, M. Shiraki, Y. Shirakami, H. Sakai, Y. Terakura, K. Takai, H. Tsurumi, T. Tanaka, H. Moriwaki, *Dietary supplementation with branched-chain amino acids suppresses diethylnitrosamine-induced liver tumorigenesis in obese and diabetic C57BL/KsJ-db/db mice.* Cancer Sci., 2009. **101**: p. 460.
113. Y. Muto, S. Sato, A. Watanabe, H. Moriwaki, K. Suzuki, A. Kato, M. Kato, T. Nakamura, K. Higuchi, S. Nishiguchi, H. Kumada, *Effects of oral branched-chain amino acid granules on event-free survival in patients with liver cirrhosis.* Clin Gastroenterol Hepatol., 2005. **3**: p. 705.
114. Y. Muto, S. Sato, A. Watanabe, H. Moriwaki, K. Suzuki, A. Kato, M. Kato, T. Nakamura, K. Higuchi, S. Nishiguchi, H. Kumada, Y. Ohashi, *Overweight and obesity increase the risk for liver cancer in patients with liver cirrhosis and long-term oral supplementation with branched-chain amino acid granules inhibits liver*

- carcinogenesis in heavier patients with liver cirrhosis*. Hepatol. res., 2006. **35**: p. 204.
115. T. Ando, *Aminoindex. Development of a health checking method by blood amino acid concentration*. Chem. Ind, 2007. **60**: p. 40.
116. S. Yamanaka, *A fresh look at iPS cells*. Cell, 2009. **137**: p. 13.
117. K. Miura, Y. Okada, T. Aoi, A. Okada, K. Takahashi, K. Okita, M. Nakagawa, M. Koyanagi, K. Tanabe, M. Ohnuki, D. Ogawa, E. Ikeda, H. Okano, S. Yamanaka, *Variation in the safety of induced pluripotent stem cell lines*. Nat. Biotechnol., 2009. **27**: p. 743
118. T. Aigaki, K. Seong, T. Matsuo, *Longevity determination genes in Drosophila melanogaster*. Mech Ageing dev., 2002. **123**: p. 1531.
119. P. Lindroth, K. Mopperr, *High performance liquid chromatographic determination of subpicomole amounts of amino acids by precolumn fluorescence derivatization with o-phthaldialdehyde*. Anal. Chem., 1979. **51**: p. 1667.
120. D. Iwahata, M. Tsuda, T. Aigaki, H. Miyano, *Quantitative analysis of branched amino acids in a single fruit fly by LC-ICPMS after pre-column derivatization with a metal tag reagent*. J. Anal. At. Spectrom., 2011. **26**: p. 2461.
121. S. Lupold, M. K. Manier, O. Ala-Honkola, J. M. Belote, S. Pitnick, *Male Drosophila melanogaster adjust ejaculate size based on female mating status, fecundity, and age*. Behav. Ecol., 2010. **22**: p. 184.
122. M. Spindler-barth, *Drosophila melanogaster: life cycle, genetics and development*. 2011, Nova Science Pub Inc.
123. G. B. Carvalho, P. Kapashi, D. J. Anderson, S. Benzer, *Allochrine modulation of feeding behavior by the Sex Peptide of Drosophila*. Curr. Biol., 2006. **16**: p. 692.
124. Y. Umebachi, M. Katayama, *Tryptophan and tyrosine metabolism in the pupa of Papilionid butterflies-II. The general pattern of tryptophan metabolism during the pupal stage of Papilio xuthus*. J. Insect Physiol., 1966. **12**: p. 1539.
125. S. R. Wilson, J. G. Oakeshott, J. B. Gibson, P. R. Anderson, *Measuring selection coefficients affecting the alcohol dehydrogenase polymorphism in Drosophila melanogaster*. Genetics, 1982. **100**: p. 113.
126. M. D. Adams, et. al., *The genome sequence of Drosophila melanogaster*. Science, 2000. **287**: p. 2185.
127. U. B. Pandey, C. D. Nichols, *Human disease models in Drosophila melanogaster and the role of the fly in therapeutic drug discovery*. Pharmacol. Rev., 2011. **63**: p. 411.
128. J. Maeda, M. Higashiyama, A. Imaizumi, T. Nakayama, H. Yamamoto, T. Daimon, M. Yamakado, F. Imamura, K. Kodama, *Possibility of multivariate function composed of plasma amino acid profiles as a novel screening index for non-small cell lung cancer:*

- a case control study*. BMC Cancer, 2010. **10**: p. 690.
129. H. Guo, C. Madzak, G. Du, J. Zhou, *Mutagenesis of conserved active site residues of dihydrolipoamide succinyltransferase enhances the accumulation of α -ketoglutarate in Yarrowia lipolytica*. Appl Microbiol Biotechnol., 2015. **100**: p. 649.

取得特許

特許番号： 4815915

「誘導結合プラズマ分析法およびそのための装置」

被測定物および有機溶媒を含む液状試料をネブライザで霧化して気化室へ噴霧し、噴霧された液状試料をプラズマトーチに導入し、プラズマトーチ内でプラズマにより励起された被測定物を測定する誘導結合プラズマ分析法であって、気化室の容量が 1～100 mL であり、有機溶媒の気化室への流速が 5～80 $\mu\text{L}/\text{min}$ となるように液状試料を気化室へ噴霧することを特徴とする誘導結合プラズマ分析法。有機溶媒を含有する試料の簡便かつ高感度な誘導結合プラズマ分析を可能とする新規な分析方法、装置が提供される。

特許番号： 4835036

「有機化合物の高感度検出方法およびそれに用いる装置」

分析対象であるアミノ酸や生体内アミンなどの有機化合物と金属元素含有化合物との結合体を生成する工程と、該結合体を誘導結合プラズマ質量分析などの無機分析に供して該結合体に含有される金属元素を分析する工程を含む、有機化合物の分析方法および装置。微量の有機化合物を従来法に比較して高感度かつ迅速に分析する方法、装置が提供される。

学会受賞一覧

2007 年 International Symposium on Metallomics

Poster award

Title: High Sensitive Analytical Method of Amino Acids by Metal-tagged HPLC/ICP-MS

2008 年 Third Asia-Pacific Winter Conference on Plasma Spectrochemistry

Poster award

Title: The Highly Sensitive Analytical Method for Metal-labelled Amino Group Compounds by HPLC/ICP-MS

2009 年 第 14 回 LC テクノプラザ

ベストオーラルプレゼンテーション賞

演題名: アミノ酸を金属で検出するープレカラム誘導体化 LC-ICP-MS の提案

2012 年 第 17 回 LC テクノプラザ

ベストオーラルプレゼンテーション賞

演題名: LC-ICP-MS によるショウジョウバエ 1 個体中の遊離アミノ酸分析

2014 年 日本分析化学会第 63 年会

展望とトピックス

演題名: 金属タグを使った代謝物の超高感度分析

謝 辞

本研究の遂行並びに本論文の作成に際し、熱心なご指導、ご鞭撻を賜りました東京大学大学院薬学系研究科物理薬科学体分析化学分野の船津高志教授、角田誠講師、東京大学大学院薬学系研究科の加藤大特任准教授、東京大学大学院薬学系研究科医療薬学教育センターの三田智文特任教授に謹んで感謝申し上げます。特に本論文の作成に関し、直接ご指導いただき、多大なるご助言を賜りました、加藤大特任准教授に心より深く感謝いたします。

ショウジョウバエ野生株、並びに変異体をご提供頂き、その生態および代謝に関する多大なるご教授を賜りました、首都大学東京都市教養学部理工学系生命科学コースの相垣敏郎教授、神奈川県立保健福祉大学保健福祉学部の津田学准教授に厚く感謝いたします。

本研究において、研究機会および装置、設備をはじめとする研究資源のご提供を頂き、なおかつ多大なるご教示、ご協力を頂きました味の素株式会社イノベーション研究所の宮野博氏、山田尚之氏、(QTOF)LC-MS の測定をして頂いた唐川幸聖氏、上林弥生氏、iPS 細胞および写真を提供して頂いた千田将氏をはじめ関係者の皆様に深く感謝申し上げます。

最後に、いつも暖かく励まして研究生活を支えてくれた妻の紘子と家族の皆に心より感謝いたします。