

巻頭言

医療における分析化学の役割と期待

Bio-Analytical Chemistry on Clinical Medicine



東北大学病院特任教授
後藤 順一

学生時代より長いこと在籍し、臨床分析化学をテーマに教育・研究を続けてきた薬学部・薬学研究科から離れてほぼ6年になろうとしている。この間5年ほど東北大学病院の薬剤部長として薬剤師業務に携わり、定年退職後の昨年4月からは特任教授として主に治験関連の業務を担当しており、分析化学を専門とする人間が、臨床の場に入り込んだ6年間ということになる。今回医療と分析という観点で原稿を依頼されたのをよい機会に、臨床の場で感じていることを記してみたい。

高齢化、少子化が叫ばれる日本にあって、年金とともに医療が社会の大きな関心事となっている。若い世代の負担を減らし、財政基盤を安定化させるため、いかに医療費を削減するかが国の課題である。大きな病院を対象として包括医療の導入が図られ、診療所における再診料の減額なども進められようとしており、テレビのコマーシャルでもお馴染みになった後発医薬品（ジェネリック医薬品）採用もその一環といえる。薬害問題に対する関心も高まり、医薬品の適正かつ安全な

使用も従来にも増して強く求められている。一方、再生医療や臓器移植、がんをはじめとする難病治療に向けた新規薬物療法、治療法の開発も焦眉の急務である。こうした先端医療を実施する上で、最新の医療機器が大いに威力を発揮している。臨床検査における全自動分析装置、超音波診断装置、X線撮影装置、コンピューター断層撮影装置（CT）、磁気共鳴撮影装置（MRI）、陽電子放射断層撮影装置（PET）と枚挙にいとまがない。いずれもその開発には関連する幅広い領域の知識が集約されており、感度、信頼度、再現性といった分析化学の基本がこれを支えている。

さて、ご存じのように分析化学は「何が、どこに、どのような状態で、どれだけ存在するか」を明らかにすることが使命である。その中にあって臨床分析化学は、ヒトを対象として生命現象の解明や疾病の治療法開発に役立てるための方法論を構築することが目的となる。一方、筆者が在籍した病院薬剤部の主要な業務の一つに生体内生理活性物質の動態解析が挙げられ

C O N T E N T S

■巻頭言

- ・医療における分析化学の役割と期待
後藤順一1

■報 文

- ・食品の安全・安心
食品添加物を中心に
西島基弘3
- ・生体内糖タンパク質糖鎖の
解析のための前処理法
中川裕章6

■解 説

- ・薬物動態受託分析の実際
—ヒト血漿中薬物濃度測定を例として—
折井義光9
- ・タンパク質MS解析のための
高速酵素消化技術
笹倉由貴江／野上真／荻野剛／
神田勝弘12

■学会発表ミニファイル16

- 液体クロマトグラフ質量分析計(LC/MS)
アプリケーションノート20

■テクニカルデータ発行ミニファイル21

■情報広場ミニファイル22

■新製品紹介

- ・U-3900/3900H形
分光光度計の紹介23
- ・超高速液体クロマトグラフLaChromUltraシステム
検出器のラインナップを強化23
- ・日立「ノビアス」GPC分画前処理カラム
(NOBIAS SE-FR1E)発売23

■2007分析展

- 新技術説明会報告24

る。体内における生体成分の変動を物質レベルで把握し、病因の解明、病態の解析、さらには治療のためのエビデンスを医師に提供することである。したがって、分析化学は臨床にとって極めて重要な学問分野であり、臨床の場は臨床分析化学の実践の場ともいえよう。筆者は、クロマトグラフィーや免疫測定法を利用して、高い分子認識能を持ち、感度と特異性に優れる方法論を創案し、臨床に提供することを課題としてきた。後者の免疫測定法は、臨床の場では通常の臨床検査だけでなく、感染症の確認、抗菌剤やジグタリス製剤をはじめとする医薬品の適正使用のための血中濃度の測定(TDM)に広く利用されている。キット製品が測定機器とともに市販され、世界でも大きな市場となっている。前者のクロマトグラフィーでは、質量分析法(MS)と組み合わせた液体クロマトグラフィー(LC)が生命科学、環境化学、創薬科学をはじめ幅広い研究領域で汎用されているが、臨床の場ではいまだ十分に利用されているとは言い難い。クロマトグラフィーと免疫測定法は、その特性からお互いに相補的な関係にあるといえるが、前者が臨床であまり利用されないのは、その都度分離条件などを設定しなくてはならない、生体試料の前処理をはじめ煩雑な操作が必要であるという概念があるためであろう。しかし、近々オンライン化や、分離条件のデーターベース化、自動化などの工夫でこうした問題も解決されよう。

臨床の場では常に新たな治療法を求めており、このため物質レベルでの信頼度の高いエビデンスの提供が必須となる。患者さん一人一人に適応した治療法の設定、すなわち個別化医療の実践が始まっており、薬の適正使用の観点からは薬剤管理指導が実施されている。薬同士の、時には薬と食べ物との予期せぬ相互作用、ノンコンプライアンス(患者さんが適正に薬を服用していない)、あるいは患者さん個人の遺伝的要因などで投与した薬の効果が予測とは異なる(効いていない、副作用が見られる)場合、TDMを実施し治療に生かすことが重要である。薬は投与後、吸収、移行、分布、代謝、排泄という過程を経るが、予測とは異なる効果出現の原因がどの過程にあるかを見極めるため、時には一塩基多型(SNPs)を調べる必要もある。がんの薬物療法では、いくつかの抗がん剤の併用が行われている。効果的でかつ安全な投与計画の設定には、それぞれの薬の血中濃度の動態と効果との関連を証拠立てるエビデンスを蓄積することが不可欠であり、今

後の大きな課題である。こうした問題解決に、それぞれの薬の測定と解析に対応できるLC、特にLC/MS/MSが大きな威力を発揮することは間違いない。

最近では、再生医療、臓器移植といった先端医療も臨床に導入されてきている。移植の1例を挙げてみよう。糖尿病患者さんでは、食事のコントロールをはじめ、健常人からすると大変に制約された生活を強いられているにもかかわらず、糖尿病性の他の疾病の発症に常に苛まれる。治療には膵臓移植が推奨されており、I型糖尿病に対しては、膵島移植という新たな治療法が提供されつつある。これは、従来膵臓すべてを移植の対象としたのに対し、ドナーの膵臓から膵島を純化し、門脈中に注入してレシピエント(移植を受けるヒト)の肝臓にこれを移植する方法である。レシピエントは大きな外科的手術を受けないことから、翌日には健常人とほとんど変わらないほどに回復する。しかし、膵島の純化という技術がいまだ十分に確立しているわけではなく、ドナーの膵島の一部しか得られていないのが現状である。また、純化した膵島をどのくらいレシピエントに投与すればよいかもまだ分かっていない。さらに、免疫抑制剤の投与は不可欠であり、投与量のコントロールは他の移植の場合に比して難しく、多くのデーターを積み重ねる必要がある。逆にいえば、これらの問題を解決すれば、ドナー一人の膵島で二人、三人という複数のI型糖尿病患者さんを治療することが可能となる。こうした、課題解決に物質レベルで生理活性物質の量的、質的変動を的確に把握する方法論を提供する分析化学は欠くことができない。

医療の場において、分析化学は目立たないが、実際には治療を実施する上でのエビデンスの提供に大きな役割を果たしている。そればかりか、薬物療法を含めたより高度で、より安全な治療法を構築していく上でも不可欠であり、今後その重要性はさらに増すであろう。最後に、各病院でも入手できるような安価な医療用LC/MS/MSが市販されることを祈りたい。

著者略歴

後藤 順一 (ごとう じゅんいち)

昭和19年生まれ

昭和42年 東北大学医学部薬学科卒

昭和44年 東北大学大学院薬学研究科修士課程修了

昭和46年 東北大学薬学部助手

平成 3年 東北大学薬学部教授

平成11年 東北大学大学院薬学研究科教授

平成14年 東北大学医学部附属病院教授に配置換え、薬剤部長を併任

平成14年 宮城県病院薬剤師会会長(現在に至る)

平成18年 クロマトグラフィー科学会会長

平成19年 東北大学定年退職(名誉教授)

平成19年 東北大学特任教授(病院担当)(現在に至る)

U.D.C.641.1/3 : 006.88.004.4 : 641.45 : 613/614.3 : 615.01 : 543.07/0.8

食品の安全・安心 食品添加物を中心に

What is Safety and Reassurance of Foods — Mainly Food Additives —

西島 基弘*



西島 基弘

期限や賞味期限の付け方には疑問が残る。

3. 報道の疑問

老舗といわれる食品関連企業が次々と問題を起こし、テレビや新聞をにぎわしているが、報道が正確でない場合も少なからずある。ニュースのコメンテーターがほとんど素人と思われる人であってもしたり顔で、“嫌ですね”、“またですか、とんでもない、危険ですね”など、知らない人の方が確信を持ってコメントする。

自然界に当然存在する一般生菌を無菌で無ければいけないような報道や大腸菌と大腸菌群との違いが分からずに、報道している場合も少なからずある。

消費者はテレビでいっているのだからと疑いもなく受け止めて、無意味な心配をする人も多い。

食べて危険な事例であれば、まず報道で食べないようにするのは当然であるが、近年のお詫び広告を見ると食品の安全性に関係するものや影響するものは少なく、大半はJAS法違反の偽装や賞味期限の改ざんである。

その様なものについての報道は必ず“なぜ?”を念頭に置いてできるだけ裏付けをした報道をして欲しい。

食品によっては微生物に関して一般生菌や大腸菌、大腸菌群に対する規格基準がある。偽装等が日々報道される中に、検出されてはいけない大腸菌群が検出されたとして、食品衛生法違反で該当商品の廃棄命令を受けたものや、衛生管理全般の改善を求める行政処分をされた事はほとんど報道されず、賞味期限改ざんは、連日のように報道された例も見られる。

また、産地の偽装は消費者心理からするときわめて不愉快であるが、健康への影響とは関係の無い話である。

我々消費者は報道によって事実を知ることが多いものの、消費者が興味を持つことのみのを扱う報道は迷惑この上ない。

1. はじめに

毎日、健康で、美味しく食事ができるヒトは幸せである。その根底にあるのは栄養バランスと食品の安全性であるが、毎日というほど新聞に何らかの偽装や賞味期限の改ざん等のお詫びの広告が出ている。

消費者にとって、食品が安全であるかは自分や家族にとってきわめて気になることであり、食べたものが『お詫び広告』に出ると心配となり、ヒトによってはかなり深刻に受け止める。原材料の産地や賞味期限のごまかしなどが、次々と発覚している。これらは食品の安全性の点から考えると問題とならない話も多いが、消費者にとっては気分の悪い話である。

2. 消費期限、賞味期限の一つの見方

近頃、数多くの不正が次々と明るみに出るのは、安全性に問題はなくても、少しでも“ごまかしは悪!”という社会風潮や内部告発者を守る法律(公益通報者保護法)が色濃く影響しているといわれている。大半の事例は社員、あるいは元社員やパートなどで勤務していたヒトからの通報といわれている。

一昔前と違って、一度会社に入社したら、ほぼ定年になるまでをその会社で過ごすという事が無くなったため、内部告発をしやすい土壤がある。

食品メーカーは昔からの経験が色濃く残り、科学的根拠というより親方の勘と経験がものをいう業種がある。

一方、消費者は臭いを嗅ぐ、色を見る、触って新鮮度を判別する能力(本能)が無くなり、勢い賞味期限などに頼る事となる。

農林水産省のホームページに「消費期限や賞味期限はその食品を最もよく知っている人が決める」となっている。この解釈は、メーカーが科学的データのもとに付けると考えて良いのではないだろうか。食品によっては賞味期限が過ぎたが美味しくなるものもある。しかし、一度社内規格を短めに設定して、それを逸脱すると問題となる。また、メーカーによって衛生管理のしっかりしているところと、それほどではないところであっても、同類の食品に対してほぼ画一的な消費

* 実践女子大学 生活科学部食品衛生学研究室 教授

4. 食の安全・安心

食の安全とは食品を食べて健康障害を起こさないものであるが、これがなかなか難しい。卵にしてもリンゴにしてもダイエットとして流行ったことがあるが、むやみにそれだけを食べて痩せるのは誰が考えても栄養障害以外の何物でもない。普通の食べ方であれば全く問題は無いが常識外の食べ方をすればどんなものでも健康障害を起こす。

食品の安全性、特に毒性を考えるとときには、そのものの毒性の強さと摂取量を必ず合わせて考える必要がある。

以前、食品香料に日本で許可されていないアセトアルデヒドが添加されていたとして連日報道された。香料は人の香水を考えてみても付けすぎると悪臭となる。食品に添加するときにも同様で、混入しすぎると単なる悪臭となるため、微量を添加し、美味しそうな香りとなるように調整する。一般に香料は何十種類の物質が混ざっているはずである。したがって一成分は極微量で、その量では人に何らかの影響を与えるはずはない。また、アセトアルヒドは先進諸国では香料成分として許可しているものである。しかし、日本では許可されていないため食品衛生法違反となるため誰も援護は出来ない。科学を知っている人であれば誰しも同じ考えを持つはずである。これは健康障害とは関係ないといっても間違いではないが、消費者にとっては非常に心配になるニュースである。

表示の問題一つにしても現在は使用した添加物質すべてを記載することになっているが、内容を知りたい人には唯一の情報であるので、重要である。しかし、記載されたものが入っているかは分かるものの、入っていることが体に悪いのかは別問題である。よくテレビなどで表示を見て食品添加物の数が少ないものを購入するという人がいるが、体に悪いものを国が許可するわけではない。それに数だけで量を無視した話などは意味がない。

現在、消費者を最も惑わせているのは、「無添加」表示やコマーシャルである。その商品を刹那的に売らんがためにするのであろうが、消費者に、その製品が食品添加物を使用していないから安全であると誤解を与えているに過ぎない。意味のない売りかたをすると、ひいてはその様なことをする企業が自らの首を絞めることになりかねない。本当に食品添加物が体に良くないと考えるのであれば、科学的なデータを示すべきであり、消費者に誤解を与えながら、消費者が求めているからなどというのは単に惑わせているに過ぎないのではないだろうか。

5. 食品の安全性は確保されているか

食品の安全性と信頼は、生産者・メーカー・流通・小売り・行政が上手くかみ合わないと確保できない。

食品メーカーは20%の大手の会社が80%の製品をつくっているといわれている。メーカーの多くは安全性の確保のために何らかの方法で品質管理を行うようになった。衛生面でも一昔前とは隔世の感がある。しかし、科学より経験がものをいう中小企業も少なからずあり、食品の偽装や賞味期限の改ざんなどは長い経験が優先する背景があるためである。

生産者は生産性を上げるために、囲場の手入れの他に農薬の使用に対し、細かい所まで留意する必要があるが出てきた。家畜についても飼料の他に動物性医薬品や飼料添加物に対して留意するようになった。メーカーは食品衛生法を念頭において、昭和に比較して現在は安全性を含めた品質管理を厳密に要求されるようになった。流通・小売店でも、同様に安全性に対して十分な管理が求められるようになった。

しかし、消費者が食品添加物に対し不信感を持つ背景の一つに、昭和30年代に起こった水俣病やイタイタイ病、ヒ素ミルク事件等の被害者がまだ治らない事など、化学物質に対する何らかの不安感がある。行政は事件発生以降、それらのような悲劇が二度と起こらないように対応しているが、消費者の食品に対する不信感は払拭されていない。

日本の食品衛生法は世界各国のそれと比較すると極めて厳しいといわれている。また、食品衛生法に収載されているものの法律の適用は世界に例を見ないほど厳格に行っている。

現在、食品添加物の安全性の確保のために、国は厚生労働省の組織に属する検疫所があり、国の食品衛生監視員が空港や港に到着した輸入食品を食品衛生監視員が収去し、検疫所で検査している。

食品添加物などの使用は常識外に大量に摂取すると、食品の味覚や物性の点が変化し、不味くなるため、常識的にはあり得ない。しかし、薬と同様に非常識に大量に摂取すると安全性が確保できないものは規格基準がある。それを遵守しているかを各都道府県・政令市にある衛生研究所や保健所などで法律に準拠しているかを検査し、違法のものは排除している。

都道府県や政令市などでは地方自治体の食品衛生監視員が保健所や衛生研究所に搬入し、そこで検査をして、食品衛生法に準拠している食品かを科学的に検査を行う。化学的な項目としては食品添加物、残留農薬、汚染物質、自然毒等が対象となる。

例えば保存料のソルビン酸などは地方衛生研究所だけでも年間に20万件以上の検査を行って、安全生を確保している。この行政試験は違反を出すと必ず見つかるという緊張関係を作り、抑止力ともなっている。

このようなことから日本の食品の安全性は世界各国に比較しても確保されているといって過言ではない。

食品安全委員会や東京都、川崎市、いくつかの大学などで行っている食品に関する不安調査では、ほぼ同

様に食品添加物と残留農薬などがいずれも最も多くの人が不安と回答している。

また、平成18年に食品安全委員会は食品安全モニターに対し同様の調査を行い、不安を持つ人がやや少なくなったとの報告をしている。この食品モニターの結果から一般消費者に置き換えて判断して良いのかは不明であるが、正確な情報を共有することができれば不安を少しは不安を和らげることができることの証明かもしれない。

食品中の食品添加物、残留農薬、汚染物の分析方法の進歩は日進月歩であり、微量のものまで正確に測定できる。これらの分析精度や確認限度の精密さは機器分析のおかげで進歩したと言っても過言ではない。

6. 食品衛生行政と機器分析

昭和30年代にはメチル水銀、ヒ素、カドミウムを原因とする食品に関する大きな事故が幾つか起こった。昭和40年代になると世の中は食料が安定したためか、消費者の食品への関心は食糧の確保から安全性に対して関心を持つようになった。

食品添加物のうち昭和40年代から現在に至るまで、詳細な項目の移り変わりはあるが、概ね消費者の関心が高い

食品添加物の分析は、昭和40年半ばにはサリチル酸を含めた保存料、サイクラミン酸ナトリウムやサッカリン等の甘味料試験、酸性タール色素、漂白剤としての二酸化硫黄が行政検査の中心であった。

このころは食品添加物のサイクラミン酸ナトリウムが発がん性の疑いを持つ報告がされたため、不許可になった時期である。その後、サイクラミン酸の発ガン性は否定され、現在では許可している国もある。

爽やかな甘味を有し、しょう油、味噌をはじめ多くの食品に許可されていた。許可を取り消された食品添加物は添加しただけで違反となるため、当時は定性試験が中心となるため、ペーパークロマトグラフィーや薄層クロマトグラフィーが主流であり、多くの違反食品が検出された。その後、食品添加物のうち行政試験として数多く検査された保存料は蒸留し、抽出分離後自記分光光度計での定性・定量分析であった。次いでガスクロマトグラフィーが中心となり、感度も精度も従来の方法とは比較できないほど良くなった。甘味料のサッカリンやサイクラミン酸などはバックドカラムのガスクロマトグラフィーが主流となり、妨害物質も見られず良好な方法であった。

現在、食品添加物の分析法の多くはHPLCやHPLC/MS, GC, GC/MSが多用されるようになり、感度や精度が抜群に向上した。

食品添加物の分析法の進歩には目を見張るものがある。

おわりに

食品の安全性が確保されていることを消費者が納得するためには輸入時、あるいは流通している市販食品の検査を十分に行い、その結果をガラス張りで公表し、安全性が確保されていることを消費者に伝えることが最も説得力がある。

行政試験は万一にミスがあった場合、貴重な他人の財産を廃棄することにもなりかねないため、慎重にも慎重を要する。したがって常に信頼できる結果を求められるため、行政試験に関与する衛生研究所、保健所、登録検査機関については最新の機器を揃える事を志向してきた。

食品添加物の分析法の進歩は、日本経済が右肩上がり時代の時代は行政機関で分析法を競って開発し、新しい機器を購入し、使用してきたことによる進歩といっても過言ではない。

しかし、いわゆるバブルが崩壊し、経済が冷え込んで来てからは多くの地方自治体で機器の購入を控え、食品の安全性を確保するための要である人員も削減している機関が多くなってきた。

その様な時代背景を考えると、従来のように新しい機器を競って購入し学会に発表し、その方法を用いて行政試験や調査研究を行うのは経費的に無理な機関が増えたといって過言ではない。特殊な機器を使用し、特殊な機関だけがができるような分析法の開発は行政試験においてはあまり意味をなさなくなる。汎用機器で多くの機関が検査できる事が、本来の安全性の確保のためには重要である。それに対応した機器の開発が望まれる。

U.D.C.547.963.1 : 577.112.7 : 577.152.2 : 66.022.1 : 543.51 : 572.5 : 591.49

生体内糖タンパク質糖鎖の解析のための前処理法

Preparation for the analysis of protein-bound glycans

中川 裕章*



中川 裕章

糖タンパク質糖鎖はタンパク質の主な翻訳後修飾として注目されている研究対象である。遺伝子やタンパク質研究の進展に伴い、タンパク質に結合して機能をコントロールする分子として糖鎖への注目度も高まっている。また糖鎖合成には、多くの糖転移酵素や分解酵素などのタンパク質の発現や糖スクレオチド濃度などに影響されるため、疾患などでの細胞環境の変化を反映するマーカーとしても期待されている。しかし、糖鎖は紫外吸収が無い等検出が難しいこと、異性体を含む多様性が多いため分析が難しく、遺伝子やタンパク質研究に比べ構造解析が遅れている。生体内糖鎖の前処理について、糖鎖を2-アミノピリジンで蛍光標識しHPLC及びMSで分析する方法¹⁾を例に述べて行きたい。

糖タンパク質の精製

糖タンパク質の精製では、分析対象が糖鎖に偏りなく精製されるように注意が必要である。収率が悪いと、特定の糖鎖を持った糖タンパク質を取ってきていない可能性が高くなる。特に注意をしないといけない工程は、レクチンとイオン交換である。レクチンは糖鎖を認識するタンパク質であり、糖タンパク質精製にもよく利用される。糖鎖構造に多様性がある場合には、糖鎖構造により吸着の度合いが変わる可能性がある。抗体を使った精製でも、抗原認識部位によっては糖鎖プロファイルに影響する恐れがある。また、レクチンや抗体から糖鎖や糖タンパク質を溶出するときに、濃い糖や塩溶液を用いるため脱塩などの精製が必要なことも多い。逆に目的の試料が吸着しないレクチンや抗体を用いて、不要なタンパク質を吸着させて、目的の糖タンパク質を素通り画分で回収する場合はその後の処理が楽になる。

糖タンパク質糖鎖にはシアル酸と呼ばれる糖カルボン酸が非還元末端に結合しているものが多い。陰イオン交換樹脂でシアル酸の数によりタンパク質が分離される恐れがあること、またイオン交換樹脂の表面や溶出液など、低pHの環境ではシアル酸の分解が懸念される。シアル酸の密度が高くなるとシアル酸自身の酸

性で分解することもあり、濃縮するときには特に注意が必要である。

市販免疫グロブリンG (IgG) を何種類か比較分析した経験があるが、メーカーやグレードにより糖鎖パターンは大きく異なる。また、目的の糖タンパク質の純度が低ければ他の糖タンパク質由来の糖鎖を見ている危険性が増す。糖タンパク質の純度は多くの場合SDS-PAGEでチェックするが、見えなくても数%程度のタンパク質が混在する可能性がある。特に微量糖鎖の場合、他の糖タンパク質由来や前処理での副生成物である可能性を念頭に置く必要がある。

糖鎖の調製

まず糖タンパク質を加熱変性し、トリプシンとキモトリプシンで糖ペプチドに分解し、糖鎖遊離酵素が作用しやすくする。還元アルキル化や界面活性剤を併用する場合もある。糖鎖遊離酵素は界面活性剤存在下でも作用するが、活性は低下するので注意が必要である²⁾。

糖タンパク質N-結合型糖鎖の遊離酵素 (N-Glycosidase) の *Flavobacterium* 由来のFまたはアーモンド由来のAを用いる。Fの方が普及しているが、昆虫や植物などでよく見られる糖鎖構造などAでしか切断されないものもある。糖鎖を遊離後、プロナーゼで残ったペプチドを分解し、この後のゲルろ過で糖鎖を精製しやすくする。ヒドラジンで化学的に遊離する方法もある³⁾。

遊離した糖鎖のゲルろ過精製には、Bio Gel P-4 (Bio Rad社) と水を用いる。この後良く乾燥し、2-アミノピリジンで蛍光標識を行う (PA化)⁴⁾。蛍光標識試薬と還元剤の品質は収率に大きく影響するので、試薬の保管や調製には十分な注意が必要である。また夾雑物が多いときには乾燥が不充分で収率が低下することがある。

ピリジリアミノ化糖鎖 (PA化糖鎖) は、Sephadex G-15 (Amersham Bioscience社) と10mM NH₄HCO₃で精製する。このときにBio Gel P-4 と水を用いて精製するとPA化糖鎖はゲルに吸着する。Bio Gel P-2 や Sephadex G-10の方が分画分子量は小さいが、分離能

はP-4 やG-15の方が高い。

以上がPA化糖鎖の一般的な前処理法であり、殆どの試料がこのプロトコールで処理できる。大体1～2週間かかるが、試料を特定して条件検討を行うことにより短縮でき、血清IgGの前処理を3時間で行った例もある⁵⁾。

糖鎖の精製にはこの他に、特異的に相互作用するセルロース系充填剤⁶⁾、活性炭(カーボン)やC18など各種固相抽出カラム⁷⁾、糖の還元末端と化学的に結合するオキシム基などを持つ担体⁸⁾を用いる手法もある。

HPLC分析

PA化糖鎖はHPLCで、DEAE、ODSとAmideの異なる分離モードで分析する。500種類以上のPA化糖鎖の各カラムでの溶出位置(マップ)がデータベース化されており、それとの照合で糖鎖構造が推定できる^{9, 10)}。特に逆相(ODS)モードを用いた分析では異性体構造が区別できるため、糖鎖変化の原因となる糖転移酵素研究との連携が良い^{11, 12, 13)}。また殆どの糖鎖が分離でき、糖鎖を精製するのに非常に良い方法である。血清など良く分析されている試料では溶出位置のみで糖鎖構造を議論することがあるが、未知試料の場合にはマップ上で糖鎖構造を推定した後、酵素や酸処理などで部分消化を行って再度分析し、推定糖鎖構造を確認することも多い。PA化糖鎖ではそれぞれの糖鎖を単離することができるため、質量分析や部分消化での確認が行いやすいこともメリットの一つである。

ここまでの前処理がどのような影響を与えるかについて、IgG中性糖鎖の典型的なODSカラムでの糖鎖パターンを例に注意点をあげる(図1)。糖鎖遊離酵素の作用が弱いと、特に切れ難いピーク *g* が低くなる。P-4 やG-15でのゲルろ過精製時に狭く取ると、大抵大きな糖鎖 *d* や *g* が減少する。逆に広く取りすぎると夾雑物のAが多くなり、時にはもう一度G-15でのゲルろ過精製かAmideカラムを用いた精製が必要になる。Bは糖鎖ピークであるが、この糖鎖群が増加したときは、C

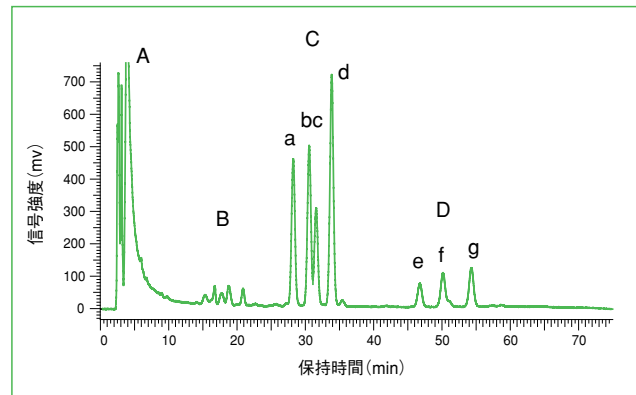


図1 ヒトIgG糖鎖のODSカラムを用いた分析例。前処理の影響で、これらのピークの量比が変化する。

の糖鎖群の副生成物である可能性がある。蛍光標識化前の乾燥や、試薬について見直したほうが良い。同じIgGを4回処理したときの各ピークの量比、その平均と標準偏差を表1に示す。

表1 ヒトIgG糖鎖をODSカラムで分析したときの再現性。ピークは図1に準じる。

ピーク	1回目	2回目	3回目	4回目	平均(%)	標準偏差
a	16.7	16.0	14.2	15.4	15.58	1.059
b	19.1	19.3	17.9	18.8	18.78	0.618
c	11.4	9.3	9.4	11.2	10.33	1.130
d	28.3	28.1	26.6	28.4	27.85	0.843
e	3.1	2.8	2.6	3.1	2.90	0.245
f	5.7	5.1	5.1	5.4	5.33	0.287
g	5.9	6.9	6.5	5.9	6.30	0.490

質量分析

質量分析 (MS) は核酸、タンパク質、ペプチド、糖鎖、脂質その他殆どの生体成分を分析対象にできる応用範囲の広い分析手法である。しかし何でも検出できるMS分析においては、微量成分やイオン化しにくい糖鎖など検出が難しい物は、他成分のシグナルに隠れてしまう。標準試料の分析は上手くいっても、実試料の分析ができないことが往々にして起き、前処理が重要になる。HPLC分析は、MS分析の究極の前処理でもある。特にHPLCで単離された異性体のPA化糖鎖は、MSでのフラグメンテーションの違いや、異性体の存在比などを解析に利用される^{14, 15, 16, 17)}。

逆相カラムを用いたLC-MSで糖鎖プロファイルを見することもできる。図2は日立L-7000HPLCシステムとM-8000質量分析装置を組み合わせでヒト血清糖鎖を分析した例である。(A)の蛍光検出でのチャートにおいて、点線○中央のピークは3種類の糖鎖が重なって出てきており区別できない。MSと組み合わせることで、異性体も含め3種類の糖鎖が区別できる。この時、イオン化にSonic Spray Ionizationを用いることで定量性が良くなる^{14, 18)}。同一試料を10回連続分析した時の再現性を表2に示す。リウマチ患者のIgG糖鎖が変化することが知られていたが、この変化をIgG精製することなく血清を用いて検出でき、また知られていなかった3本鎖糖鎖が増加や異性体での変化の度合いの違いも解った¹⁹⁾。

糖ペプチドの前処理

糖鎖分析の先には個々の糖鎖構造がどのタンパク質に結合しているのか、一つのタンパク質が複数の糖鎖結合位置を持つ場合は結合位置毎の糖鎖情報も重要な研究課題であり、糖ペプチド分析の研究が盛んになってきた^{20, 21, 22, 23)}。糖ペプチドは糖鎖に加えペプチドの多様性もあり、紫外吸収やMSでの感度も一定でなく、

* 北海道大学大学院 先端生命科学研究院 糖鎖精密化学研究室

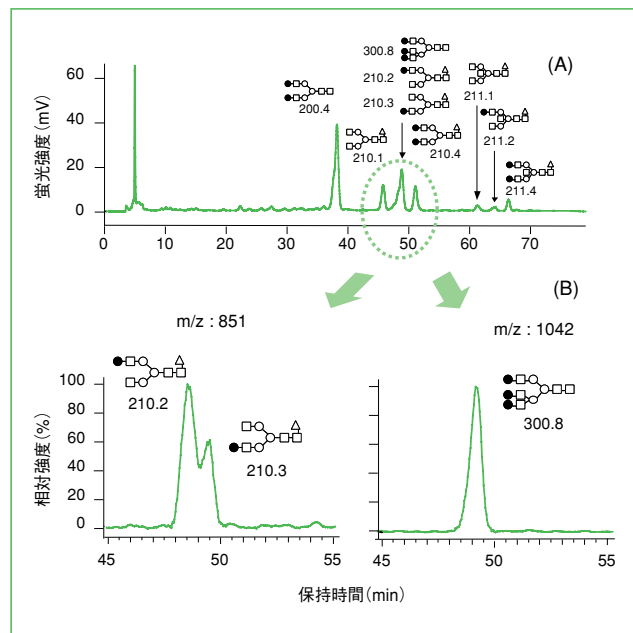


図2 ヒト血清糖鎖の分析例。 A：蛍光検出器でのクロマトグラム。励起320nm，測定400nm。B：蛍光分析では重なっている糖鎖をそれぞれのイオン質量でのマス・クロマトグラムで分析。異性体210.2と210.3は逆相カラムで分離されm/z=851で検出される。210.2と210.3の間に重なって溶出する300.8はm/z=1042のマス・クロマトグラムで単独で検出される。

表2 ヒト血清糖鎖をLC-SSI/MSで分析したときの再現性。糖鎖量は各糖鎖構造に対応するマス・クロマトグラムの面積より計算した。糖鎖ピークは図2に準じる。

糖鎖構造	平均(%)	標準偏差
200.4	44.33	1.099
210.1	5.51	0.463
210.2	5.70	0.533
210.3	3.42	0.448
300.8	11.01	0.481
210.4	17.48	0.983
211.1	1.82	0.370
211.2	2.95	0.464
211.4	7.79	0.523

汎用的な前処理は難しい。糖ペプチドは遊離糖鎖と同様にレクチン、カーボンや逆相など各種カラムで精製される。その中でZIC-HILICカラムは、逆相系カラムに比べペプチドと糖ペプチドの分離が良く、異性体の分離も良い²⁴⁾。糖ペプチドについては前処理方法、分析方法共まだ緒についたばかりであるが、質量分析を中心に今後の発展が期待される。

まとめ

前処理は時間や手間がかかるだけでなく、生体内本来の構造や量比が変化してしまう可能性がある。できる限り前処理は少なくしたいが、量や感度の問題で避けては通れない過程である。試料の状態、分析対象物、

分析方法により前処理は変わり、糖鎖に限らずモデル化合物での予備試験が重要である。特に不安定な物質の前処理では手際の良さも成功の重要な鍵である。現在では多くの実験でキットやプロトコールが充実し、初めての実験でも良いデータが出ることも多いが、試料の前処理は数回練習しないと良い結果が出ないことも多い。

質量分析の簡便化や高感度化により、糖鎖など生体内物質の情報が飛躍的に増えてきている。しかし、糖鎖で見るとMS感度が低いものや、分子量が同じ物質を分析するためには前処理や装置での様々な工夫が必要である。HPLCの迅速な精製能力は生体成分の前処理に適しており、今後前処理用途の重要性が高くなってくると考えている。

謝辞

本稿に関わる実験を指導・実施した西村紳一郎教授，出口喜三郎教授，高橋禮子教授，岡田和恵氏を始め多くの共同研究者に深謝いたします。

参考文献

- 1) Nakagawa H et al. : Methods in Enzymology, 415 : 87 (2006)
- 2) Altman, F. et al. : Glycoconjugate J, 12, 84 (1995)
- 3) Takasaki S et al. : Methods in Enzymology, 83 : 263 (1982)
- 4) Hase S et al. : Biochem Biophys Res Commun, 85 : 257 (1978)
- 5) 公開特許平8-228795
- 6) Shimizu Y et al. : Carbohydrate Res, 332 : 381 (2001)
- 7) Nakano M et al. : J Chromatogr A, 1005 : 13 (2003)
- 8) Niikura K et al. : Chem Eur J, 11 : 3825 (2005)
- 9) Takahashi N et al. : Anal Biochem, 226 : 139 (1995)
- 10) <http://www.glycoanalysis.info/>
- 11) Nishikawa A et al. : Biochem Biophys Acta, 1035 : 313 (1990)
- 12) Ishimura H et al. : Clin. Cancer Res., 12 : 2506 (2006)
- 13) Itoh N et al. : Am J Physiol-Endocrinol Metab, 293 : E1069 (2007)
- 14) Takegawa Y et al. : Rapid Commun Mass Spectrom, 18 : 385 (2004)
- 15) Nishimura S-I et al. : Angew Chem Int Ed, 44 : 91 (2005)
- 16) Deguchi K et al. : Rapid Commun Mass Spectrom, 20 : 412 (2006)
- 17) Ito H et al. : Rapid Commun Mass Spectrom, 21 : 212 (2007)
- 18) Takegawa Y et al. : Anal Chem, 77 : 2097 (2005)
- 19) Nakagawa H et al. : J Chromatogr B, 853 : 133 (2007)
- 20) Kaji H et al. : Nat Protoc, 1 : 3019 (2006)
- 21) Wada Y et al. : Glycobiology, 17 : 411 (2007)
- 22) Henning S et al. : J Mass Spectrom, 42 : 1415 (2007)
- 23) Deguchi K et al. : Rapid Commun Mass Spectrom, 21 : 691 (2007)
- 24) Takegawa Y et al. : J Chromatogr A, 1113 : 177 (2006)

U.D.C.615.1.01 : 611.018.5 : 591.111.1 : 543.544.5-145.1 : 615.033 : 53.08

薬物動態受託分析の実際 —— ヒト血漿中薬物濃度測定を例として ——

Practice of Pharmacokinetic Analysis at Contract Laboratory
—— As an Example for Drug Concentration Analysis in Human Plasma ——

折井 義光*

1. はじめに

医薬品開発の過程における，血液，尿，生体組織中の薬物やその代謝物の測定による薬物動態(PK)評価は，医薬品候補スクリーニングをはじめ，医薬品候補化合物の安全性や薬効評価，製剤開発，臨床試験などを一貫して結ぶ研究分野である。また，医薬品の市販後も，薬物相互作用や副作用症例の検証，TDM(Therapeutic Drug Monitoring：時間薬物濃度モニタリング)といわれるテラーメード医療における薬剤投与量の決定などにも必要とされる業務となっている。

試験動物による安全性評価では，薬物の全身への暴露を確認し，毒性所見への関与，ヒトへの外挿性を評価するトキシコキネティクス解析^{※)}が行われ，臨床評価では，薬物の血中濃度と臨床所見から，その安全性及び忍容性と薬物動態特性を評価する。

生体試料由来の様々な生体成分と本来は異物である薬物を選択的に分離・精製し，定量性の優れた分析手法により薬物濃度を得るために様々な方法が考案されてきたが，現在では，液体クロマトグラフタンデム質量分析装置(LC-MS/MS)が最も多く使用されている。LC-MS/MSの優れた特異性，同時測定能，定量性および高感度といった特長が，生体試料中での微量薬物の定量に貢献している理由である。

一方，製薬メーカーでは最新の分析設備，研究員の確保や薬事申請対応のノウハウを社内で維持するのではなく，アウトソーシングを活用する傾向にある。株式会社日立ハイテクマニファクチャ&サービスでは，受託解析メニューのひとつとして，LC-MS/MSを中心とした薬物動態分析受託サービスを1995年に開始した。1997年からは，継続して独立法人 医薬品医療機器総合機構によるGLP適合性確認(評価A)を維持し，国内外の医薬品メーカーを中心に，本サービスの提供を行っている。

トキシコキネティクス解析^{※)}：薬物の毒性試験において，薬物の全身暴露を評価し，ヒトへの安全性予測(外挿性)を解析する研究分野。

2. 薬物動態分析の必要性

医薬品開発には，薬物の生体試料中濃度の分析は必

須となっている。創薬初期における医薬品候補スクリーニングでは，多数の化合物のバイオアベイラビリティ(生物学的利用能)の評価において，迅速な測定法確立と定量値のフィードバックが要求される。

医薬品開発候補が絞られ，動物での安全性評価のため実施される血中を中心とした薬物濃度測定(トキシコキネティクス測定)は，ヒトでの安全性を予測する極めて重要な試験であり，前述のGLP適合確認書を有する施設において実施するか，新薬申請時に個別にGLP調査を受けなければならない。試験に関しても，その業務や発生した生データは，独立した信頼性保証部門が試験実施の立会い調査や詳細な書面調査を実施し，信頼性保証責任者が発行する陳述書を報告書に添付することも義務づけられている。

臨床試験でも，ヒトに投与された薬剤の効果(作用・副作用)は，その血中濃度と相関するのが一般的であり，人種差や個体差を評価するための最も重要な試験項目のひとつになっており，通常3年から10年程度かかる臨床試験での信頼性の高い継続した試験方法の維持も重要となる。また，トキシコキネティクス測定と違い，臨床試験では低容量から薬剤評価が行われるためng/mLまたはpg/mLオーダーの高感度測定法が求められることになる。

ここ数年，政府の医療費軽減の政策もあり，後発医薬品のシェアが急増している。この後発医薬品開発では，先発品とのバイオアベイラビリティの同等性を証明する臨床試験を実施する必要があり，血中薬物濃度測定が試験項目の中で最も重要な項目となる。一方，市販後において，TDMにおける薬物濃度測定は，治療にもっとも有効な投与方法を患者ごとに設定する薬剤では，迅速かつ同時多成分の測定が求められている。また，薬物相互作用(薬の飲み合わせ)が原因で，市販後に死亡例を含む重篤な副作用が発現し，薬剤が発売中止になった例やグレープフルーツジュースなどの食品が薬物代謝を阻害し¹⁾，作用メカニズムを狂わせるような問題の解明にも薬物濃度測定は重要な直接比較データとなる。

医薬品開発と生体試料中薬物濃度測定業務の流れと弊社の専門受託領域を図1に示す。

* 株式会社日立ハイテクマニファクチャ&サービス 受託解析センタ

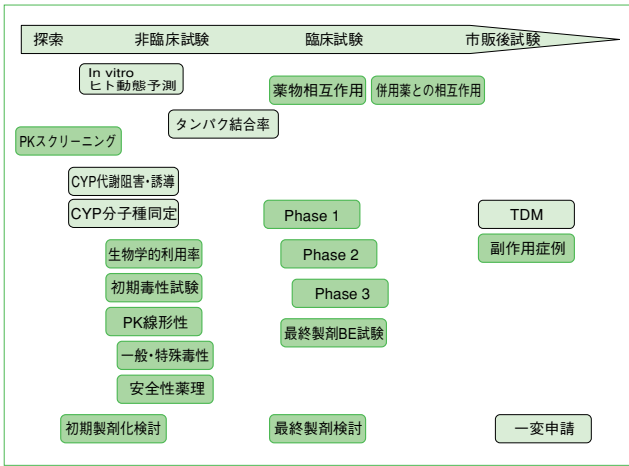


図1 医薬品開発と生体試料中薬物濃度業務の流れ：
弊社が専門とする分野

3. LC-MS/MS法による生体試料中の薬物分析の原理

LC-MS/MSは、HPLCの検出器として質量分析計を接続したものである。質量分析法には、磁場型、四重極型、飛行時間型(TOFMS)、イオントラップ型、フーリエ変換型などがあるが、生体試料中の薬物分析には、タンデム質量分析計と呼ばれる四重極型分析計を2台直列に結合した装置がもっとも多く使用されている。生体試料を後述する前処理法により精製し、HPLCで分離溶出後に、大気圧下でイオン化し、最初の四重極電極で、 $(M+1)^+$ や $(M-1)^-$ など薬物の化学構造に特異的な分子量関連イオンのみを通過させ、衝突誘起解離を経て次の四重極電極では薬物の化学構造由来の特異的な生成イオンのみ通過させてイオン量を検出することにより選択性の高いクロマトグラフを作成する。

4. 生体中薬物濃度測定の実際

生体試料中薬物濃度測定にLC-MS/MSは有効であるが、様々な動物種で試験が実施され、生体中に存在する未知の成分が測定を妨害することも多く、測定機器に注入する試料溶液をいかに効率よく精製する(前処理)ことが、要点となる。生体試料の前処理法は、3種類に大別される。1) 液体試料やホモジネート懸濁試料に酸、メタノール、アセトニトリルを添加、タンパクを変性させ沈殿させる除タンパク沈殿法、2) 有機溶媒による液-液抽出法、3) 市販の固相プレートやカートリッジによる固相抽出法がある。前処理法は、試料量や検体数なども考慮し、後述するHPLC条件の最適化と複合させて選択することが肝要である。また、試料を前処理したとしても、取り除けなかった成分によるMS/MS上でのバックグラウンドへの影響や測定対象物質のイオン化を妨害してしまうマトリックス効果が、思わぬ感度低下や定量値の信頼性を失うことがあるので、注意が必要である。

試験法検討の段階では、測定試料のブランクマトリックスに既知量の薬物を添加した擬似的サンプルで測

定法を評価するが、実際の生体試料中では、薬物は代謝を受け、類似構造の物質が存在していたり、アルブミンなどとタンパク結合した状態で薬物が存在していたり、グルクロン酸や硫酸抱合体として存在していることもある。MS/MS測定では、HPLCによる不完全分離をMRM[®]) モード測定により回避することは可能であるが、前述の生体成分由来のマトリックス効果などを回避するためにもHPLC上でなるべく十分保持させ、良好な分離状態にしておくことが多検体分析や定量値の信頼性を確保するには重要である。

MRM[®]): Multiple Reaction Monitoring (多反応検出法)の略。分子量関連イオンとその生成イオンを同時に検出することにより化合物特異性の高い測定が可能である。

5. 分析法バリデーション

測定法検討で、ほぼ目的をクリアできる測定方法ができたとしても、その後の実検体の濃度測定での信頼性確保は必要である。分析法バリデーションでは、測定法の特異性、検量線の直線性、定量限界、回収率、日内及び日間変動などが評価される。また、測定に用いる標準溶液、試料の安定性を様々な角度から検証しておくことも必要である。

医薬品開発においては、米国FDAのガイダンス²⁾が分析法バリデーションの標準になっているが、試験法のタイプや試験の目的に応じて、各自工夫して科学的に妥当な方法で評価しているのが現状である。弊社で標準的なバリデーションパラメータは以下のとおりである。

1. 標準溶液の安定性
2. 特異性または選択性
3. 検量線の直線性
4. 回収率
5. 日内及び日間再現性
6. 希釈再現性
7. 試料溶液の安定性
8. 試料の保存安定性
9. 試料の室温安定性
10. 試料の凍結融解安定性

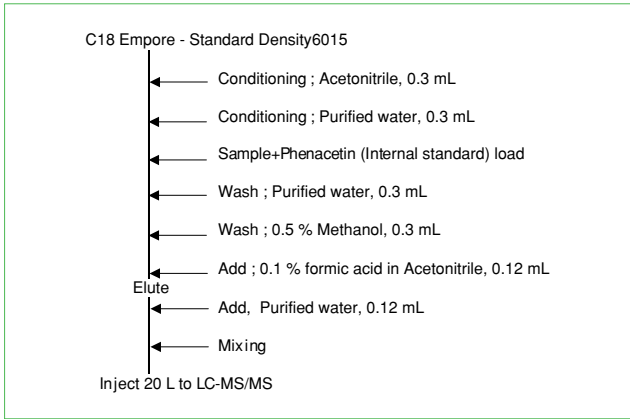


図2 ヒト血漿中パロキセチン濃度測定法の前処理フローチャート

また、実際の濃度測定では、医薬品申請資料となることを十分配慮し、試験施設・設備の管理、継続する分析の精度管理や業務上の責任分担を明確に示す標準操作手順書(SOP)を配備し、試験データの信頼性を維持しておかなければならない。

6. 測定法の開発事例

塩酸パロキサチンは、選択的セロトニン再取り込み阻害作用を有する代表的な抗うつ剤である一方、CYP2D6を阻害し、薬物相互作用プローブ薬としても臨床試験に用いられている。そのヒト血漿中薬物濃度測定を開発したので、その一部を紹介する。

塩酸パロキサチンのヒト血漿中濃度測定法は、前処理法としては、その化学特性を考慮し、逆相ODS系の市販固相プレートによる固相抽出法を採用し、図2に示す工程で試料を精製しLC-MS/MSに注入、分析する方法を採用した。

その定量下限におけるクロマトグラムと検量線を図3及び図4に示す。また、検量線の再現性データを表1に示す。検量線は0.2~40 ng/mLの範囲で良好な直線性($r^2 < 0.999$)を示し、定量法の再現性が得られ、測定時間も2分となる分析法を開発した。

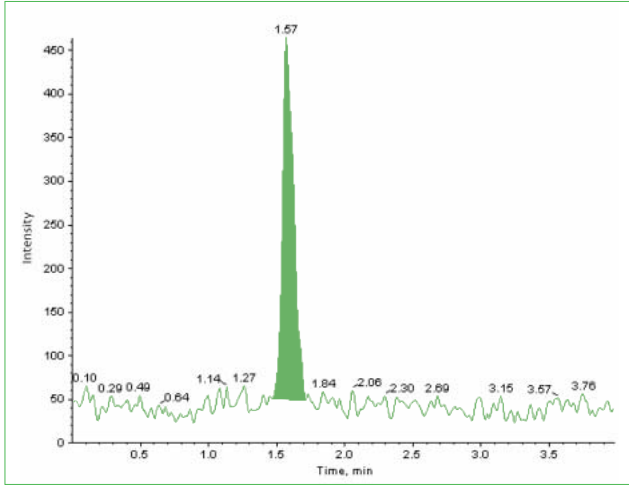


図3 ヒト血漿中パロキセチン濃度測定法のクロマトグラム
(血漿添加濃度：0.2 ng/mL)

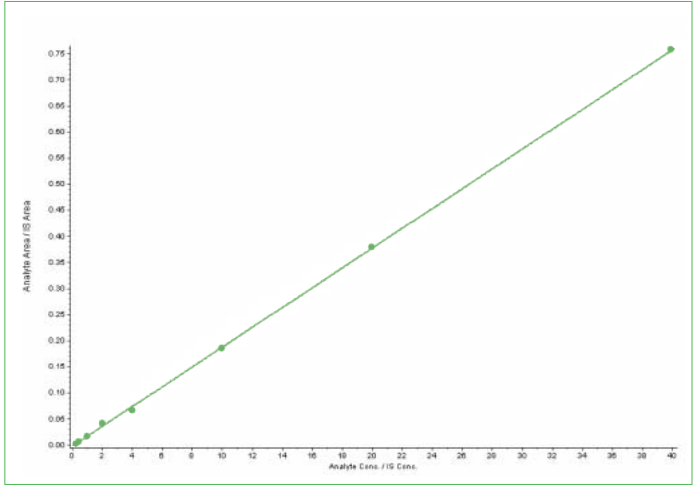


図4 ヒト血漿中パロキセチン濃度測定法の検量線
(範囲：0.2-40 ng/mL)

表1 ヒト血漿中パロキセチン濃度測定法の再現性

Nominal conc. (ng/mL)	1		2		3	
	Observed conc. (ng/mL)	%R.E.	Observed conc. (ng/mL)	%R.E.	Observed conc. (ng/mL)	%R.E.
0.200	0.199	-0.5	0.208	4.0	0.161	-19.5
0.400	0.398	-0.5	0.378	-5.5	0.374	-6.5
1.00	0.973	-2.7	0.964	-3.6	1.09	9.0
2.00	2.27	13.5	2.01	0.5	2.27	13.5
4.00	3.63	-9.3	4.15	3.8	4.00	0.0
10.0	9.88	-1.2	10.1	1.0	10.2	2.0
20.0	20.1	0.5	20.3	1.5	20.8	4.0
40.0	40.1	0.3	39.5	-1.3	38.6	-3.5
Coefficient of determination	0.9995		0.9999		0.9990	

Weighting: 1/X

タンパク質MS解析のための高速酵素消化技術

Rapid protein digestion method for the protein structural analysis using Mass Spectrometry

笹倉 由貴江* 野上 真* 荻野 剛* 神田 勝弘*

背景

質量分析(MS)によるタンパク質構造解析において、タンパク質のプロテアーゼ消化効率は解析の大きなポイントとなる。また糖タンパク質の構造解析の場合、プロテアーゼによるペプチドへの断片化に加えて、グリコシダーゼによるペプチドからの糖鎖遊離が必要となる。しかし、通常の液相消化の場合、消化に長時間を要したり、消化が不十分である場合が多く認められる。更に糖タンパク質の場合は2段階の酵素処理工程が必要となるため、作業は煩雑であり長時間を要する。

近年、固定化酵素を用いたタンパク質消化について報告がなされている。プロテアーゼ¹⁾やグリコシダーゼ²⁾を支持体に固定化して消化に用いることで消化効率を向上させ、通常一晩要する消化時間を、数分から数時間に短縮可能であることが示されている。

我々は固定化酵素および微量溶液反応用マイクロチャンバー “はいぶるクンTM” (製造：フルイドウエアテクノロジーズ, 販売：日立ハイテクノロジーズ)^{3,4)}を組み合わせることで、タンパク質消化効率の向上およ

び糖タンパク質の2種酵素一括処理を実現したので紹介する。

実験

〔微量溶液反応用マイクロチャンバー

“はいぶるクンTM” の構成〕

図1に微量溶液反応用マイクロチャンバー “はいぶるクンTM” (A)およびその構成要素((B)～(F))を示す。“はいぶるクンTM” はPDMS製チャンバー(B)、酵素を固定化した支持体とPDMS製チャンバーを保持するホルダ(C)、振動モーターを備えた振動ユニット(D)、ACアダプタ(E)、密封用シール(F)から構成される。PDMS製チャンバーには反応槽となる溝が形成されており、現在、反応槽のサイズが異なる3種のチャンバー(反応容量50 μ L, 100 μ L, 200 μ L)を提供している。反応槽には内部に試料を注入するための流入口が設けられている(B)。

図1 (G)～(L)に使用方法の概略を示す。始めに酵素を固定化した支持体を下部ホルダ上に設置した後

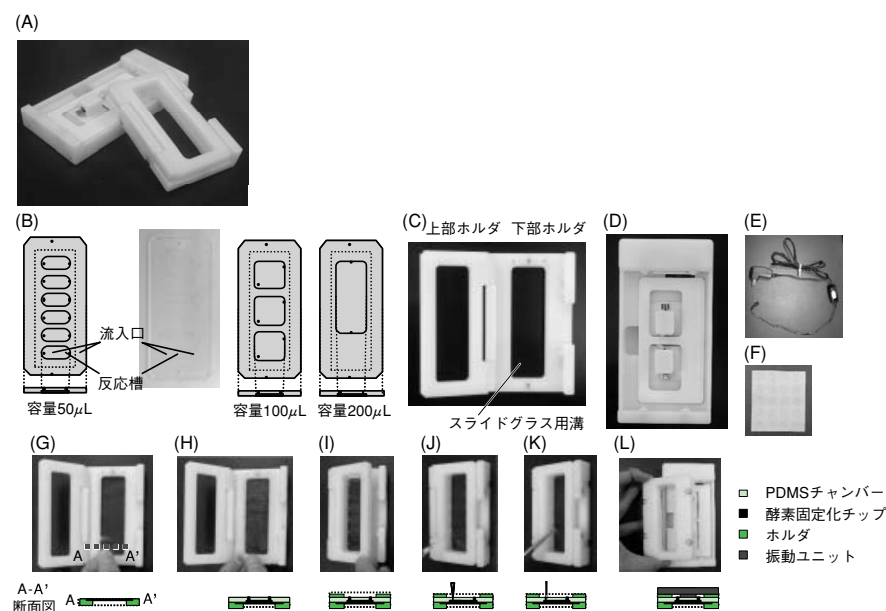


図1 微量溶液反応用マイクロチャンバー “はいぶるクンTM” の構成
(A)全体像, (B)PDMSチャンバー(左より50 μ L, 100 μ L, 200 μ Lの各反応槽容量), (C)ホルダ, (D)振動ユニット, (E)ACアダプタ, (F)密封用シール, (G)～(L)“はいぶるクンTM” 使用手順概略(詳細は本文参照)。

(G), PDMS製チャンバーを支持体上に載せる(H)。この際、支持体とPDMS製チャンバーの反応槽との間に試料を保持する空間が形成される。次に上部ホルダを閉じ、支持体とPDMS製チャンバーを密着して固定する(I)。試料を流入口から反応槽内に注入した後に(J)流入口をシールにより封じ(K), 振動ユニットを取り付けて、モーターを作動させることで試料を攪拌する(L)。

〔固定化プロテアーゼによるBSAの消化〕

プロテアーゼ固定化のための支持体として, Prteo ChipTM TypeA (Proteogen)⁵⁾を用いた。3種類のプロテアーゼ(トリプシン, キモトリプシン, ArgC)はそれぞれPBS (pH 7.4)で1 mg/mLに調製した。Proteo ChipTMにはあらかじめ固定化用シール “HybriWellTM” (GRACE BIO-LABS)を貼付し, ウェル内部に調製したプロテアーゼ溶液を50 μ L注入して4℃で一晩静置することで固定化した。洗浄の後 “はいぶるクンTM” にセットし, 還元アルキル化済みBSA溶液を反応槽内部に30 μ L注入して37℃で反応を行った。

〔BSA消化物の逆相HPLCによる解析〕

消化済みBSAを逆相HPLC解析(L2000シリーズ, 日立ハイテクノロジーズ)に供試し, 未消化のBSAに相当するピークの減少から消化効率を判定した。測定条件は以下のとおりである。

カラム：CAPCELLPAK C₁₈ MG (2 mm I.D. x 75 mm 粒子径 3 μ m, 資生堂)

A 液：0.1%TFA/ 2 %ACN

B 液：0.1%TFA/98%ACN

グラジエント：

測定開始後 5～60分間でA液100%→40%

流 速：0.2 mL/min

検 出：吸光度(214 nm)

〔BSA消化物のLC-MS/MS解析〕

トリプシン消化済みBSAをnanoLC-ESI/IT-TOF-MS NanoFrontierLD(日立ハイテクノロジーズ)によりMS/MS測定し, MASCOT(Matrix Science)を用いてタンパク質を同定した。LC-MS測定ならびにデータベース検索の条件は以下のとおりである。

LC部)

カラム：PicoFrit (75 μ m x 50mmL, tip15 μ m, NewObjective)

A 液：0.1%ギ酸/ 2 %ACN

B 液：0.1%ギ酸/98%ACN

グラジエント：

測定開始後0～60分間でA液100%→60%

流 速：0.1 μ L/min

MS部)

Polarity：Positive

Ion accumulation time：2 msec

Mass scan range: 200-2000

MASCOT検索)

Database：NCBIsp

Missed cleavages：1

Fixed modifications：Carbamidomethyl(C)

Variable modifications：Phospho(STY)

Peptide tol：± 0.3 Da

MS/MS tol：± 0.1 Da

〔固定化トリプシン-NGF(2種酵素同時固定)による糖タンパク質(IgG)の消化〕

トリプシンはPBS(pH 7.4)で1 mg/mLに, グリコペプチダーゼF(NGF)は50%Glycerol, 25 mM EDTAを含んだ100 mM リン酸バッファー(pH 7.2)で30 μ g/mLに調製した。ProteoChipTM上にはあらかじめ酵素固定用シール(17 mm x 15.5 mmの酵素固定用孔を3つ含む)を貼付した。トリプシン溶液は左右両端の酵素固定用孔に, NGF溶液は中央の酵素固定用孔にそれぞれ60 μ Lずつ添加し, 4℃で一晩静置することで固定化した。洗浄の後 “はいぶるクンTM” にセットし, 還元アルキル化済みIgG 溶液を反応槽内に注入して37℃で一晩反応を行った。

〔IgG由来ペプチドおよび糖鎖のHPLC解析〕

消化済みIgGを逆相HPLC解析に供試した。(測定条件は前記BSAと同様)。また遊離した糖鎖はABOE糖鎖標識化キット(J-オイルミルズ)を用いて精製および蛍光標識した後, HPLC解析に供試した。糖鎖解析の測定条件は以下のとおりである。

カラム：ホーネンパックC₁₈(4.6 mm I.D. x 75 mm 粒子径 3 μ m, J-オイルミルズ)

A 液：0.1 M酢酸アンモニウム(pH 4.0)：ACN =75：25の混合溶液

B 液：0.1 M酢酸アンモニウム(pH 4.0)：ACN =60：40の混合溶液

グラジエント：

測定開始後10～50分間でA液100%→50%

流 速：1 mL/min

検 出：蛍光(励起：305 nm, 検出：360 nm)

結果

〔BSA消化物の逆相HPLCによる解析〕

3種の固定化プロテアーゼを用いてBSAを消化し, HPLCのクロマトグラムから未消化BSAの消失およびペプチドの生成を確認した(図2)。固定化トリプシン, キモトリプシン, およびArgCによる, BSAの完全消

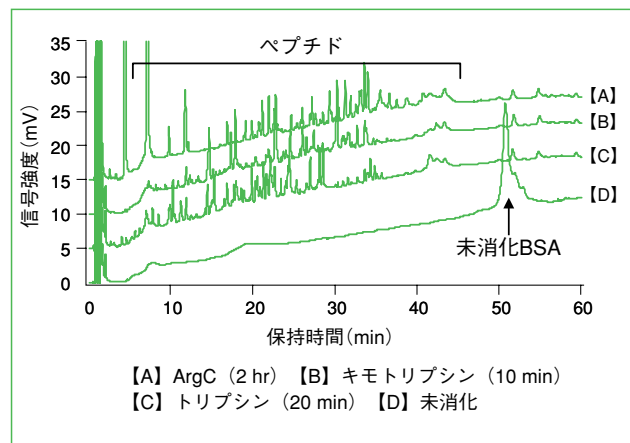


図2 固定化トリプシン、キモトリプシン、およびArgCによって消化したBSAをHPLCに供試し、未消化BSAの消失およびペプチドの生成を確認した。括弧内の数値は、未消化BSAに相当するピーク(保持時間50分)が消失するのに要した時間を示す。

化に要する時間はそれぞれ20分、10分、および2時間以内であり、通常の液相消化(消化時間16時間)と比較して、本手法がハイスループットなプロテアーゼ消化に利用可能であることを示した。

[BSAトリプシン消化物のLC-MS/MSによる解析]

トリプシン消化済みBSAをLC-MS/MS解析に供試し、トリプシンを固定化した場合と従来の液相消化を行った場合の結果を比較した。消化時間はいずれも1時間とした。図3にMSのトータルイオンクロマトグラム(固定化酵素(A)および液相消化(B))、ならびにMASCOT同定結果(C)を示す。酵素固定化によりペ

プチドピーク数の増加が認められ(A)、また同定ペプチド数、スコア、およびシーケンスカバー率がいずれも向上したことから(C)、本手法による消化効率がよく、タンパク質同定精度の向上に有効であることが示された。

[IgGのトリプシン-NGF消化物の解析]

糖タンパク質であるヒトIgGについて、固定化トリプシン-NGF処理で得られた消化産物をHPLCに供試した結果、未消化IgGの消失およびペプチドの生成を確認した(図4(A))。また同消化産物をLC-MS/MS解析に供試した結果、20種のヒトIgGの同定に至った(データ省略)。更に同消化産物中から糖鎖を精製し、蛍光色素(ABOE)で標識してHPLCに供試した結果、遊離した糖鎖に相当するピークをクロマトグラム上で確認した(図4(B))。以上のことから、本手法によりタンパク質消化と糖鎖遊離を一括処理可能であることが示された。

総括

固定化トリプシンによる消化技術はこれまでも多くの報告がなされているが¹⁾、近年、翻訳後修飾解析の重要性の増加や、様々なタイプのイオン解離技術の開発から^{6,7)}、トリプシン消化だけでなく、解析目的に適した酵素消化断片を調製することが必要とされてきている。本実験では、トリプシンに加えてキモトリプシンおよびArgCでも固定化により消化効率が向上することを示した。今後、固定化酵素のバリエーショ

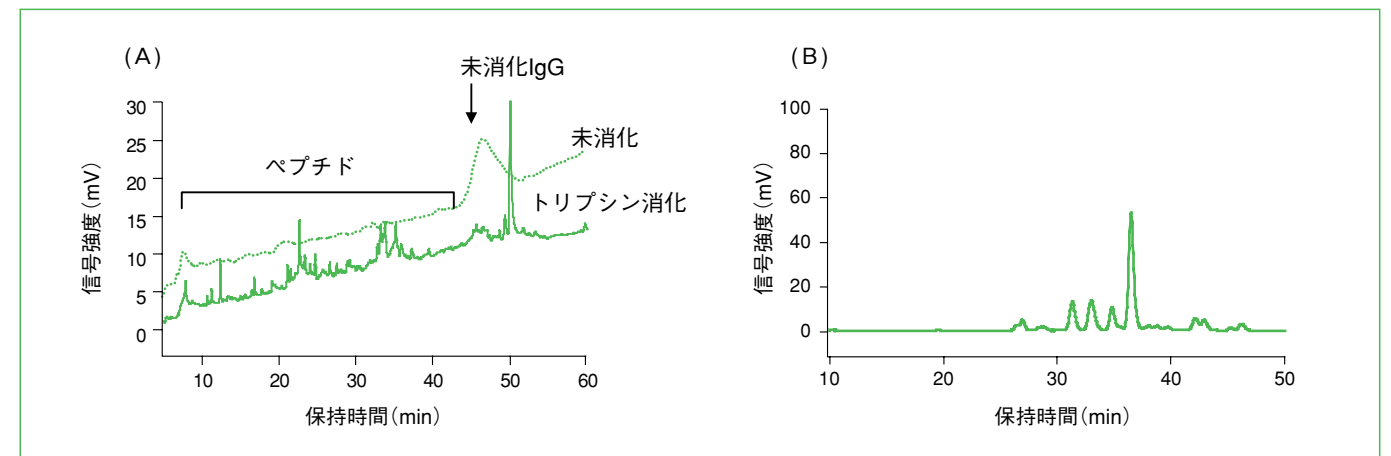


図4 (A)固定化トリプシン-NGF(2種酵素同時固定)によって処理したIgGをHPLCに供試し、未消化IgGの消失およびペプチドの生成を確認した。(B)消化産物中から糖鎖を精製し、ABOE標識の後にHPLCに供試して、遊離糖鎖のピークを確認した。

ンを増やすことで、より解析目的に適した消化技術を提供したいと考えている。また、本手法はタンパク質消化と糖鎖遊離を一括で処理することが可能であった。本手法はHPLCを用いた糖鎖2Dマッピング法やMSによる糖鎖構造解析に応用可能であり、ハイスループットな糖タンパク質前処理技術としての使用が期待される。

参考文献

- 1) Massolini, G. J Sep Sci. 2005, 28, 7-21.
- 2) Christine, S. J Chromatogr A. 1993, 646, 227-34.
- 3) Sasakura, Y. Analytica Chimica Acta. 2006, 564, 53-8.
- 4) Sasakura, Y. Analytical Chemistry Insights. 2007, 2, 69-74.
- 5) Lee, Y. Proteomics. 2003, 3, 2289-304.
- 6) Cooper, H. J. Mass Spectrom Rev. 2005, 24, 201-22.
- 7) Mikesch, L. M. Biochim Biophys Acta. 2006, 1764, 1811-22.

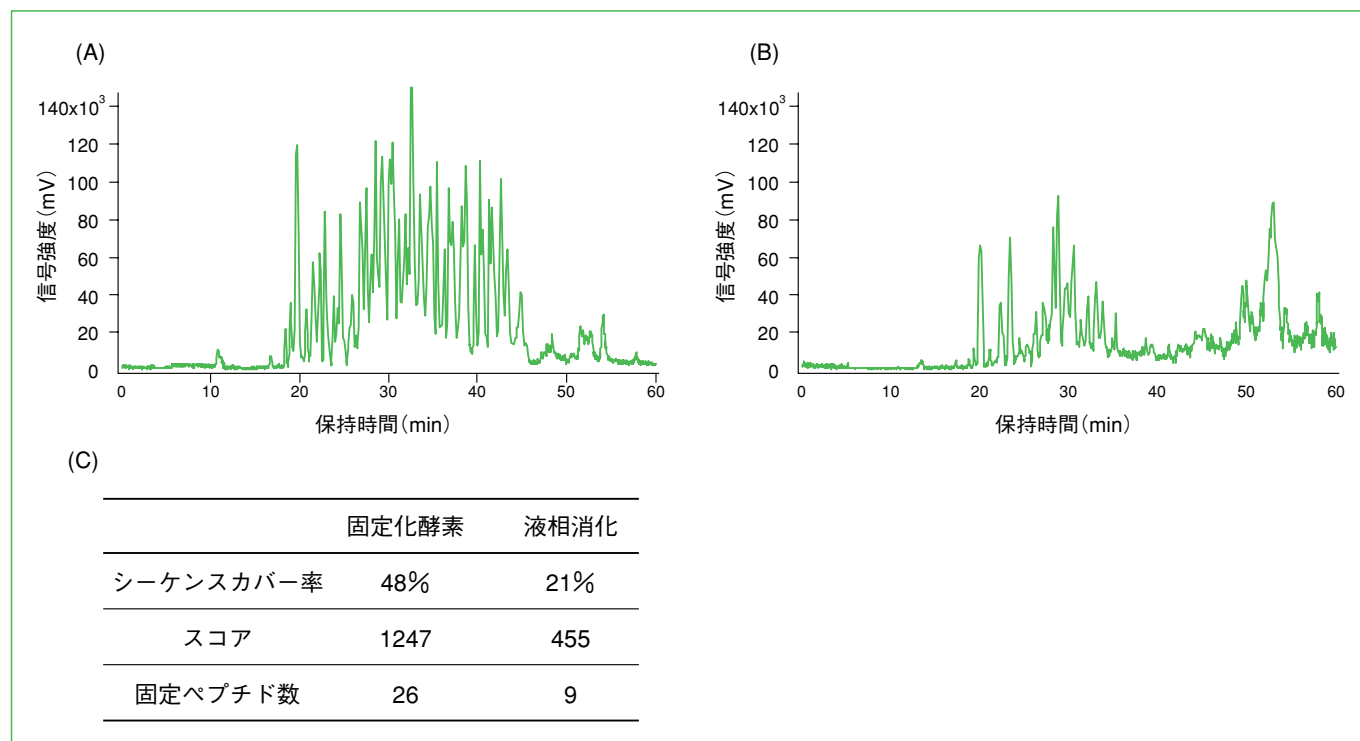


図3 (A)(B)BSAトリプシン消化物をMS測定した際のトータルイオンクロマトグラム(固定化酵素(A)および液相消化(B))を示す。(C)BSAのMASCOT同定結果を示す。



1. Journal of Proteome Research : 2007,6,3581-3603(2007/8/21)

K. Cho (Chonnam National University), 他: Survey of Differentially Expressed Proteins and Genes in Jasmonic Acid Treated Rice Seedling Shoot and Root at the Proteomics and Transcriptomics Levels.

2. 計測技術 別冊号 p.46(2007/10/10)

和久井(日立ハイテクノロジーズ), 他: 紫外可視分光光度計

3. 日本ヒトプロテオーム機構(JHUPO)第5回大会(2007/7/30 東京都)

笹倉(日立ハイテクノロジーズ), 他: 固定化酵素を用いた微量溶液反応用マイクロチャンバーの開発および糖タンパク質構造解析への応用

【要旨】タンパク質の構造解析において, 近年, 質量分析(MS)は重要な解析技術として広まっている。これらの解析においては, タンパク質をまずプロテアーゼによってペプチドへと分解する前処理が必要となる。また糖タンパク質の場合, 初めにプロテアーゼで処理した後, グリコシダーゼによって糖鎖を遊離する。しかし液相反応における消化効率は解析に不十分であることも多く, また糖タンパク質に必要な二段階の試料調製は煩雑であり, 長時間を要する。近年, 固定化酵素を用いたタンパク質消化システムについて報告がなされている。プロテアーゼやグリコシダーゼは始めに固相に固定化されて, 試料の消化に用いられる。これらはタンパク質消化効率を向上させ, 消化に要する時間を短縮可能であることが既に示されている。しかし, プロテアーゼとグリコシダーゼを同一の固

相に固定化し, 消化を1段階で行った例については報告されていない。本研究では, 3種のプロテアーゼ(トリプシン, キモトリプシン, ArgC)固定化チップ, およびトリプシンとグリコペプチダーゼF(NGF)を同一基板上に固定化したチップを作製した。また, 酵素固定化チップ上で試料を攪拌するための, マイクロチャンバーを作製した。プロテアーゼ固定化チップによってBSAおよびPhospholipase A₂を, またトリプシン・NGF固定化チップによってヒトIgGを, 高速かつ簡便に消化することに成功した。これらの結果は, 固定化酵素およびマイクロチャンバーを用いた消化技術がタンパク質MS解析の前処理として使用可能であり, 特に複数酵素固定化チップを用いた消化システムが, 糖タンパク質のハイスループットな構造解析に有効であることを示している。

野上(日立ハイテクノロジーズ), 他: 2D-nanoLC/LIT-TOFMSとInformation Based Acquisitionを組み合わせた血清タンパク質中のバイオマーカー探索

4. 東京カンファレンス 2007(2007/8/29~31 千葉県)

堀込(日立ハイテクノロジーズ), 他: 絶対法を用いた蛍光量子収率測定方法の検討

5. 日本分析化学会第56年会(2007/9/19~21 徳島県)

坂元(日立ハイテクノロジーズ), ヒ素化合物の抽出方法の検討

【要旨】加工食品や海産物などの試料からヒ素化合物を抽出する場合, 抽出溶媒の種類, 抽出時間, 抽出方法により抽出率が変化することが推察される。そこで, 抽出方法を変えた時の各ヒ素化合物(As(III), As(V), モノメチルアルソン酸(MMA), ジメチルアルシン酸(DMA), トリメチルアルシン

オキサイド(TMAO))の最適抽出条件の検討を行った。ヒ素の形態分析にはHPLC-水素化物発生-偏光ゼーマン原子吸光度法を用いた。ヒジキから超純水を用いてヒ素化合物を抽出した結果, As(III), As(V), DMAが検出された。

鈴木歩(日立ハイテクノロジーズ), 他: 液体クロマトグラフィー質量分析計による食品中に含まれる低分子ペプチドの高感度検出

松崎(日立ハイテクノロジーズ), 他: 超高速LCを用いた蛍光誘導体化脂肪酸分析の高速化

【要旨】近年, 分析時間を短縮する手法として粒子径2 μ m級のカラムを用いて測定する超高速LCが開発されている。報告者らは, 化学特性の等しい粒子径2 μ m, 3 μ m, 5 μ mのオクタデシルシリル基を持つ逆相クロマトグラフィー用シリカゲルカラムを用いて, 異なる粒子径のカラムにより分析移行性について検討した。その結果, 粒子径の異なるカラム間で同様の分離パターンが得られたことを報告済みである。今回は, 超高速LCを用いた蛍光

誘導体化脂肪酸分析について検討した結果を報告する。高速液体クロマトグラフを用いた脂肪酸分析は, 一般的に脂肪酸を反応試薬により誘導体化し測定している。ここで採用した蛍光誘導体化は, 操作が簡易であり, また蛍光で測定することにより選択性が高まるといった利点が挙げられる。ここでは, 蛍光誘導体化脂肪酸分析の高速化および脂肪酸分析における異なった粒子径を持つカラムの分析移行性について報告する。

米谷(日立ハイテクノロジーズ), 他: 紫外線照射による有機ヒ素化合物の分解前処理法の検討 ~水素化物発生法への応用~
堀込(日立ハイテクノロジーズ), 他: 絶対法を用いた蛍光量子収率測定法の検討

6. HUPO 6th Annual World Congress(2007/10/6~10 韓国)

Y. Sasakura(日立ハイテクノロジーズ), 他: Vibratory reaction unit for the mass spectrometry analysis of proteins and glycochains

M. Nogami(日立ハイテクノロジーズ), 他: The Evaluation of the 2D-nanoLC/LIT-TOFMS and Information Based Acquisition Technique for the Biomarker Discovery in Serum

【Summary】The comparison of the protein expression between healthy individuals and patients using mass spectrometry coupled to liquid-chromatography is one of the promising tools for the identification of candidate biomarker for various diseases. However, the determination of these biomarkers is analytically challenging since dynamic range of serum protein concentration is extremely wide.

In this study, we demonstrate a platform for biomarker discovery that combines 2DnanoLC/LIT-TOFMS system and Information Based Acquisition (IBA) technique. The 2D-nanoLC used in this system was configured with a strong cation exchange column(SCX)and a reverse phase capillary column(RP)interlocked via a column-switching technique. IBA is a data processing technique for the repetitive MS/MS analysis, which automatically excludes the previously analyzed ions from the MS spectrum according to their molecular weight, retention time, and also by charge number.

In this experiment, pseudo-patient serum was prepared by spiking two well-known biomarker proteins: C-reactive protein(CRP)and α -fetoprotein (AFP)to the serum in concentration equivalent to the patients. First, we evaluated the performance

of the system with 1D-nanoLC/LIT-TOFMS by comparing the protein hit number(during the single analysis). The system resulted in identification of 672 proteins in a single analysis run in contrast to the 1D-nanoLC/LIT-TOFMS of 169 proteins. Thus, the 2D-nanoLC's separation performance increased the protein identification number. Next, the combination of the system IBA technique was evaluated similarly. 2D-nanoLC/LIT-TOFMS analysis was repeated three times under IBA technique, and 1321 proteins were detected. Thyroglobulin, that the blood level range around ng/mL, was detected in the second run. Thus, IBA technique is effective in providing increased identification of proteins, as well as in the detection of trace components. In addition, from the CRP and AFP, six and three peptide fragments were detected respectively, by repeating 2D-nanoLC/LIT-TOFMS analysis three times under IBA technique.

These results suggest that this platform consisted of 2D-nanoLC/LIT-TOFMS and IBA technique could become a powerful tool for increasing the number of protein hits and detecting the low abundant proteins, consequently lead to the discovery of novel biomarkers.

7. Asianalysis2007(2007/11/4～7 韓国)

H. Sakamoto(日立ハイテクノロジーズ), 他: Speciation of Arsenic Compounds in Foods with HPLC-Hydrogeneration-Polarized Zeeman Background Correction Atomic Absorption Spectrometry.

Y. Harada(日立ハイテクノロジーズ), 他: Application of HPLC and new methods to study of food analyses.

【Summary】Improvement of habits of life including diet has been much demanded for rapidly rising uneasiness of human health such as a lifestyle-related disease and metabolic syndrome. Many health and functional foods are manufactured in large in Japan, and the size of the health food market has grown up to reach over 8.3 billion dollars in 2006. Because the multi-factor elements of foods are requested, food analysis with LC has become more important. We have developed HPLC systems to meet recent needs of foods analyses. (1) LCU which has cutting-edge column techniques, fast response and high pressure resistance systems realizes high throughput analyses for various

kinds of foods. It is suitable for analyses of a great number of samples. (2) L-8900 amino acid analyzer realizes specifically resolved, sensitive and precise amino acids analysis. You can choose either physiological fluid or proteins hydrolysates analysis method and analyze functional amino acids including glutathione, ornithine, taurine and GABA. (3) L-2000 series HPLC with post-column derivatization methods realize specific selectivity, sensitivity and reproducibility for sugars, organic acids and amino acids, etc because of their selective reactions of target compounds and reagents after columns restricting influences of contaminants.

8. 第18回クロマトグラフィー科学会議(2007/11/7～9 北海道)

井上(日立ハイテクノロジーズ), 他: 茶葉・茶飲料中の遊離アミノ酸の一斉分析
清水(日立ハイテクノロジーズ), 他: モノリスカラムによる超高速分析
伊藤伸(日立ハイテクノロジーズ): 日立NanoFrontier nLCのご紹介

9. 第208回液体クロマトグラフィー研究懇談会(2007/11/16 千葉県)

吉江(日立ハイテクノロジーズ): ナノLC-LIT/TOFMSのタンパク質同定への応用

10. 平成19年度 日本分光学会年次講演会(2007/11/12～14 東京都)

堀込(日立ハイテクノロジーズ), 他: 日立F-7000形蛍光光度計による固体試料に対応した蛍光分析の新展開-ランチョンセミナー

11. Separation Sciences 2007(2007/11/27～28 千葉県)

松崎(日立ハイテクノロジーズ), 他: HPLCを用いた蛍光誘導体化脂肪酸分析における高速化の検討

清水(日立ハイテクノロジーズ), 他: 超高速LCを用いた分析法移行性の検討

【要旨】HPLCにおいて、 $2\mu\text{m}$ 級の粒子径のカラムを用いた超高速分析が近年注目されている。既存の分析条件を超高速分析に移行する、または超高速分析で用いた条件を汎用の条件に移行するには、それぞれの分析条件で、化学特性が等しいカラムを用いて、注入量やグラジエントプログラムを変換する必要がある。本研究では、粒子径が2, 3, $5\mu\text{m}$ のオクタデシル基を持つ化学特性が等しい逆相クロマトグラフィー用シリカゲルカラムを、超高速LCにおいて一定のクロマトグラムが得られるようグラジエント条件を変更し、粒子間の分析移

行性を検討した。また、一般にグラジエント溶出法を用いる場合、タイムプログラム上で移動相を切り替えても、その移動相が実際にカラムに到達するまでに遅れの時間が発生する。この遅れとなる体積はデュエルボリュームと呼ばれているが、超高速分析ではグラジエント溶出法の妨げになるデュエルボリュームを極力小さくすることが必要である。そこでデュエルボリュームを考慮し、グラジエントプログラムをサンプル注入より先に開始させ相対的に注入動作工程を一定時間遅れさせて(先行グラジエント機能)、分離挙動を確認した。

12. 第15回 日環協・環境セミナー全国大会 in Miyazaki(2007/11/29～30 宮崎県)

山本(日立ハイテクノロジーズ), 他: ジフェニルカルバジドと固相抽出を前処理に用いる水試料中Cr(VI)の高感度分析

【要旨】クロムは自然界に広く分布し、天然水中の濃度は河川で $0\sim 0.1\mu\text{g/L}$ 、海水で $0.04\sim 0.07\mu\text{g/L}$ 程度とされている。通常存在するクロムは2, 3, 6価の価数をとる。3価クロムは、動物にとって毒性はほとんど無視できるが、クロム酸、重クロム酸といった6価クロムの毒性は非常に高く、天然水中のクロムの形態別存在量、特に6価クロムの存在量を知ることには大変重要である。水溶液中の6価クロムの測定方法としては、ジフェニルカルバジド-吸光光度法が公定法などで採用されている。しかし、天然水中のクロムの分析を行うには

感度が不足している。そこで、試料中の6価クロムをジフェニルカルバジド(DPC)の錯体として逆相系固相抽出剤ノビアスRP-OD 1(日立ハイテクノロジーズ)で抽出し、溶出液を電気加熱原子吸光法により定量することにより、数十 ng/L レベルの6価クロムを定量する手法を開発した。本法は電気加熱原子吸光法にて検出を行うため、試料の着色は影響しない。また、6価クロムの錯体のみを抽出できるため、電気加熱原子吸光法にて形態分析が可能となる。

13. LC-DAYs 2007(2007/11/29～30 静岡県)

谷川(日立ハイテクノロジーズ): データ処理装置を使う

14. 第4回茨城地区分析技術交流会(2007/12/7 茨城県)

和気(日立ハイテクノロジーズ), 他: ハイスループット電子捕獲解離による新しいタンパク解析法
清水(日立ハイテクノロジーズ), 他: 超高速LCを用いた食品分野アプリケーションの紹介
井上(日立ハイテクノロジーズ), 他: 陽イオン交換樹脂を用いたテアニンを含む遊離アミノ酸の分離と茶試料への応用

15. 第30回分子生物学会・第80回生化学会合同大会(2007/12/11～14 神奈川県)

中川(北海道大学), 他: ECD付きNanoLC/TOF-MSを用いた糖ペプチドの解析

【要旨】タンパク質の機能や生体内挙動を知る上で、糖鎖付加・リン酸化・硫酸化などの翻訳後修飾を解析することは非常に重要である。特定の糖タンパク質に結合している糖鎖構造の解析は、糖タンパク質を精製後に糖鎖を遊離して解析するのが一般的である。しかし、糖鎖付加が複数箇所で見られる場合、糖鎖結合位置と糖鎖構造の関係の情報が欠落する。糖タンパク質全体若しくは糖ペプチドの質量分析についても幾つか報告されるようになったが、まだ質量分析のみで糖鎖・タンパク質の情報を充分得られにくいのが現状である。nano-flow liquid chromatography (LC)-electrospray ionization (ESI) or sonic spray ionization (SSI)-linear ion trap (LIT)/time of flight (TOF)-mass spectrometry (MS) とCID (collision-induced dissociation) またはECD (electron-capture dissociation) を組み合わせて、糖ペプチド解析を行ったの

で報告する。CID-negative modeでは糖鎖のfragmentation (断片化) が起きる。予め既知糖鎖のfragmentation patternを分析しておくことにより、異性体まで含めた糖鎖構造の解析が可能となった。一方、ECD-positive modeの解析ではペプチドのfragmentation が起き、アミノ酸配列情報が得られる。従来のMSによるペプチドのアミノ酸配列解析と大きく異なるのは、1) 糖鎖が欠落しないため、糖鎖結合位置とその糖鎖の大きさの情報が得られる。2) Proを除くすべてのアミノ酸でほぼ同様に開裂が起きるため、広い範囲のアミノ酸配列情報を得ることができた。より大きなペプチドの修飾が解析できることにより、同一ペプチドの中で離れたアミノ酸上にある複数のタンパク質修飾の相互関係情報を得ることが期待できる。

栗林(長崎大学), 他: gp91phoxの細胞外部分を認識する抗体、7D5の可変領域の遺伝子クローニングと構造モデル
笹倉(日立ハイテクノロジーズ), 他: 固定化酵素を用いた微量溶液反応用マイクロチャンバーの開発および糖タンパク質構造解析への応用
野上(日立ハイテクノロジーズ), 他: 2D-nanoLC/LIT-TOFMSとInformation Based Acquisitionを組み合わせた血清タンパク質中のバイオマーカー探索

液体クロマトグラフ質量分析計(LC/MS)アプリケーションノート

日立ハイテックが発行している液体クロマトグラフ質量分析計(LC/MS)の“アプリケーションノート”のご紹介です。

題目	2D-nanoLC/LIT-TOFMSとIBAを組み合わせた血清タンパク質中のバイオマーカー探索		
機種	液体クロマトグラフ質量分析計 NanoFrontier		
シートNo	ANLCMS006	発行日	2007年7月
要約	質量分析技術を用い、網羅的にバイオマーカー探索を行う疾患プロテオームへの関心が高まっている中、高感度、高分離を実現する2D-nanoLC/ LIT-TOFMS(NanoFrontier LD)による測定と、微量タンパク質の検出に効果的なInformation Based Acquisition (IBA)機能を組み合わせることによりバイオマーカー探索向けのプラットフォームを構築しました。本実験では擬似患者試料として、血清に細菌性急性感染症等のバイオマーカーとして知られるC-reactive protein (CRP)および肝細胞癌・肝硬変等のバイオマーカーである α -fetoprotein (AFP)を、各々患者相当濃度の100 μ g/mLおよび32 μ g/mLを添加したものを調製し、本システムによる解析を行った結果をご紹介します。		

題目	抗体チップおよびNanoFrontier LDによる網羅的なプロテインキナーゼ解析技術の開発		
機種	液体クロマトグラフ質量分析計 NanoFrontier		
シートNo	ANLCMS007	発行日	2007年9月
要約	抗体チップおよびNanoFrontier LD (NanoLC/Linear-Trap-TOF MS)を用いたプロテインキナーゼの網羅的な解析手法について検討しました。抗キナーゼ抗体を基板上に固定化した抗体チップによりキナーゼをアフィニティー精製し、NanoFrontier LDによって同定する一連のプロトコルをご紹介します。		

題目	NanoFrontier LDを用いたカテキン類の測定		
機種	液体クロマトグラフ質量分析計 NanoFrontier		
シートNo	ANLCMS008	発行日	2007年10月
要約	近年、活性酸素を分解する働きのあるポリフェノール類が注目されています。その中でも緑茶中に含まれるカテキン類は、抗酸化作用、血圧上昇抑制作用、抗ガン作用など多くの作用を有することが報告されています。また最近では、肥満や糖尿病のもととなる糖分や脂質の代謝をうながし、カロリー消化を助け、余計なコレステロールを分解するなど無理なく総合的に肥満を抑制する効果があることからダイエット効果が期待され、多くの食品、飲料中の機能性成分として注目されています。今回は、ESI法を用いたNanoFrontier LDによる“緑茶中のカテキン類”の測定例をご紹介します。		

題目	NanoFrontier LDを用いた医薬品中の不純物分析		
機種	液体クロマトグラフ質量分析計 NanoFrontier		
シートNo	ANLCMS009	発行日	2007年10月
要約	NanoFrontier LD は、MS ⁿ 解析が可能なりニアトラップおよび高精度・高分解能TOFを組み合わせたハイブリッドLC/MS/MSシステムです。多彩なMS ⁿ 解析と高質量精度測定を同時に実現することで、信頼性の高い構造解析を可能としました。薬剤中の不純物分析のような高度な構造解析性能が必要とされる分析項目にも最適なツールとなります。今回は、代表的な抗生物質の一つであるErythromycin中に含まれる“不純物分析”についてをご紹介します。		

題目	質量分析法による糖鎖構造解析 N-およびO-結合型糖ペプチドの直接構造解析		
機種	液体クロマトグラフ質量分析計 NanoFrontier		
シートNo	ANLCMS010	発行日	2007年12月
要約	本解説では、最初にN-およびO-結合型糖鎖、糖ペプチドの直接構造解析の現状とその課題を述べる。そして、“MS ⁿ スペクトルマッチング法”が糖ペプチドの糖鎖構造解析にも適用可能であることをご紹介します。		

詳細の情報は下記のアドレスにアクセスいただければ、ご覧いただけます。
[http：//www.hitachi-hitec.com/science/apli/apli_ms.html](http://www.hitachi-hitec.com/science/apli/apli_ms.html)

テクニカルデータ発行ミニファイル (食品分析関連バックナンバー紹介)

日立ハイテックが製品別に発行しているアプリケーションデータシートの内、食品分析関連の発行済み“TECHNICAL DATA”のご紹介です。

分野		題目	シートNo	関連製品
健康食品		カテキン類の分析	LC No.173	高速液体クロマトグラフ
		コエンザイムQ10の分析	LC No.194	高速液体クロマトグラフ
		発芽豆乳中の γ -アミノ酪酸 (GABA) の分析	LC No.178	高速アミノ酸分析計
		L-カルニチンの分析	LC No.186	高速液体クロマトグラフ
農薬・動物薬		カルバメート系農薬の分析	LC No.129	高速液体クロマトグラフ
		食肉中の抗菌剤の分析 DADでモニタリング！	LC No.133	高速液体クロマトグラフ
		畜水産食品に残留する動物用医薬品の測定	LC No.139	高速液体クロマトグラフ
		セミマイクロLCによる食肉中抗菌剤の固相抽出自動分析法	LC No.143	高速液体クロマトグラフ
		N-メチルカルバメート系農薬の分析	LC No.145	高速液体クロマトグラフ
		鶏用飼料中の合成抗菌剤アンプロリウムの分析	LC No.163	高速液体クロマトグラフ
		OPA-ポストカラム法を用いたグリホサートの分析	LC No.179	高速液体クロマトグラフ
		カルバメート系農薬の分析	LC No.180	高速液体クロマトグラフ
添加物		DADを用いた食品中の抗菌剤の一斉分析	LC No.189	高速液体クロマトグラフ
		チアベンダゾールの分析	LC No.190	高速液体クロマトグラフ
栄養成分	アミノ酸	フォトダイオードアレイ検出器を用いた食品添加物の一斉分析	LC No.153	高速液体クロマトグラフ
		アミノ酸の特殊成分分析例	LC No.91	高速アミノ酸分析計
		高速90分生体液分析法	LC No.94	高速アミノ酸分析計
		HPLCによる食品の生体液アミノ酸分析	LC No.130	高速液体クロマトグラフ
		アミノ酸の高速分析	LC No.147	高速アミノ酸分析計
		アミノ酸の高速分析	LC No.148	高速アミノ酸分析計
		ビール中の生体液アミノ酸分析	LC No.151	高速アミノ酸分析計
		OPA-ポストカラム法を用いたアミノ酸の分析	LC No.181	高速液体クロマトグラフ
		ニンヒドリン-ポストカラム法を用いたアミノ酸の分析	LC No.182	高速液体クロマトグラフ
		グルタチオンを含むアミノ酸の高分離分析	LC No.193	高速アミノ酸分析計
	有機酸	食品の味覚チェックは有機酸分析	LC No.138	高速液体クロマトグラフ
		ブロムチモールブルー法 (BTB) による有機酸の分析	LC No.152	高速液体クロマトグラフ
		食品中の有機酸の分析	LC No.177	高速液体クロマトグラフ
	糖	糖、糖アルコールの高感度分析	LC No.199	高速液体クロマトグラフ
		りん酸フェニルヒドラジン法を用いた糖の分析	LC No.185	高速液体クロマトグラフ
		非還元糖を含む糖の分析	LC No.132	高速液体クロマトグラフ
	ビタミン	水溶性、脂溶性ビタミンの分析	LC No.150	高速液体クロマトグラフ
		セミマイクロLCによるビタミン分析	LC No.142	高速液体クロマトグラフ
		ビタミンB1 (チアミン) の分析	LC No.192	高速液体クロマトグラフ
		食用油中のビタミンEの測定	LC No.198	高速液体クロマトグラフ
	核酸	魚肉中の核酸関連物質の分析	LC No.196	高速液体クロマトグラフ
	その他	ナフチル酢酸の分析	LC No.172	高速液体クロマトグラフ
		食品中の臭素酸カリウムの分析	LC No.184	高速液体クロマトグラフ
有害成分		香辛料中のアフラトキシンの分析	LC No.167	高速液体クロマトグラフ
		テトロドトキシンの分析	LC No.191	高速液体クロマトグラフ

ここでご紹介しているアプリケーションデータの詳細をご希望の場合は下記のアドレスよりお申込みいただき、S.I.navi（会員制サイト）にご入会いただければ直接インターネットで参照することができます。
[http：//www.hitachi-hitec.com/sinavi/](http://www.hitachi-hitec.com/sinavi/)

情報広場ミニファイル

(食品分析関連バックナンバーの紹介)

情報広場は、分析機器が役に立つ分野の“旬の情報”と共に、当社製品の活用例をご紹介します。

分 野	タイトル	No.	関連製品
健康食品	ダイエット用健康食品中の日立新形セミマイクロ液体クロマトグラフによる甲状腺ホルモン様分析の高感度分析	30	高速液体クロマトグラフ
	γ-アミノ酪酸(ギャバ)の高感度測定	76	高速液体クロマトグラフ
	HPLC(NIN法, OPA法)を用いたγ-アミノ酪酸(ギャバ)の測定	85	高速液体クロマトグラフ
	HPLCを用いたカテキンの測定	88	高速液体クロマトグラフ
	HPLCを用いたコエンザイムQ10の測定	92	高速液体クロマトグラフ
	ダイエット用健康食品中の日立セミマイクロ液体クロマトグラフによる甲状腺ホルモン様物質の高感度分析	98	高速液体クロマトグラフ
農薬・動物薬	オキシテトラサイクロンの測定は日立HPLCにて高感度分析	57	高速液体クロマトグラフ
	オキシテトラ, クロルテトラ, テトラサイクリンの測定は日立HPLCにて高感度分析	60	高速液体クロマトグラフ
	シロマジンをHPLC三次元システムにて高感度分析	72	高速液体クロマトグラフ
	スピラマイシンをHPLC三次元システムにて高感度分析	75	高速液体クロマトグラフ
	エンロフロキサシンの測定は日立HPLCにて高感度測定	78	高速液体クロマトグラフ
	HPLCによる牛肉のサルファ剤の一斉分析	80	高速液体クロマトグラフ
	動物用医薬品のHPLC 蛍光検出器による分析例	81	高速液体クロマトグラフ
	シロマジンをHPLC(新型DAD)にて高感度分析	90	高速液体クロマトグラフ
	HPLCによる牛肉内のサルファ剤の一斉分析	95	高速液体クロマトグラフ
	超高速LC(FL)によるアミトロールの分析	111	高速液体クロマトグラフ
添加物	サイクラミン酸をHPLC三次元システムにて高感度分析	63	高速液体クロマトグラフ
栄養成分	食品分析用検査機器に役立ちます	56	高速液体クロマトグラフ
	HPLCを用いたビタミンEの測定	89	高速液体クロマトグラフ
	日立超高速液体クロマトグラフ LaChromUltra 第2弾!	107	高速液体クロマトグラフ
かび	パツリンをHPLC三次元システムにて高感度分析	68	高速液体クロマトグラフ
	アフラトキシンの測定は日立HPLCにて高感度分析	77	高速液体クロマトグラフ
飼料	サリノマイシン, モネシンの測定は日立HPLCにて高感度分析	93	高速液体クロマトグラフ

詳細の情報は下記のアドレスにアクセスいただければ、ご覧いただけます。

http://www.hitachi-hitec.com/science/square/index_square.html

新製品紹介

NEW PRODUCTS

U-3900/3900H形分光光度計の紹介

長年好評をいただいておりますU-3010/3310形分光光度計の後継機としてU-3900/3900H形を発売いたしました。

U-3900/3900Hでは水質, 環境, バイオ, 製薬, 材料



などの幅広い分野でご使用いただけるよう, 充実したアクセサリをラインナップして要望に応えます。また, 従来機に比べ, 迷光やベースライン安定度, 平坦度などの基本性能もアップし, 高精度な測定が可能です。

主な仕様:

項目	U-3900	U-3900H
分光器	シングルモノクロ	ダブルモノクロ
迷光	0.015%以下	0.00025%以下
ベースライン平坦度	±0.0003Abs以下	±0.0004Abs以下
ベースライン安定度	0.0002Abs以下	0.0002Abs以下

超高速液体クロマトグラフLaChromUltraシステム
検出器のラインナップを強化

超高速液体クロマトグラフ LaChromUltraシステム用検出器モジュールとしてL-2400U形UV検出器に加え, L-2420U形UV-VIS検出器, L-2485U形蛍光検出器, L-2455U形ダイオードアレイ検出器(DAD)を開発しました。高速でシャープな分離ピーク波形に追従できるように高速レスポンス(最小0.01s)を実現しています。分離成分は微小体積で溶出されるためフローセルの容積は3μLを標準としました。L-2455U形は, 新高輝度重水素ランプおよび新規光学系を採用し, 従来比2/3倍の低ノイズを達成しました。



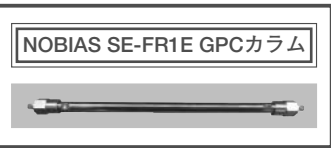
日立「ノビラス」GPC分画前処理カラム
(NOBIAS SE-FR1E) 発売

食品(農産物)中の残留農薬前処理用カラムです。食品抽出試料から, 夾雑物である色素や一部の脂肪酸などを除去し, 農薬を少量(10~20mL)の溶出容量で分取することができます。そのため, 分画を濃縮することなく, そのまま分析(GC/ECD)できます。

L-2000形HPLCにNOBIAS SE-FR1Eを搭載し, フラクションコレクタをつないだGPC分画前処理システムは以下の特長があります。①食品中残留農薬分析のための精製前処理を自動化できるため, 簡便。②個人差やロット差がなく, 濃縮工程が省けるため分析精度が向上。③溶離液の使用量は従来のGPCの半分以下。

GPC分画前処理システム

L-2000形HPLCシステム



フラクションコレクタ



2007分析展 新技術説明会報告

(株)日立ハイテクノロジーズ ライフサイエンス営業統括本部
バイオ・分析システム営業本部 マーケティング部 野村 貴将

1. 総括

今回の2007分析展は第45回の記念開催で、出展企業287社、展示総小間数1,015小間、来場者数21,842人、新技術説明会291テーマ、聴講者12,976人と過去最大の規模での開催でした。特に新技術説明会は昨年257テーマ、一昨年225テーマと毎年13%以上の大幅な件数増が見られます。

これは、自社ブースでは紹介できない製品特長の詳細や、競合メーカーに気付かれたくない活用事例をユーザーの皆様で紹介できる絶好の場として出展各社が利用することで、活性化されているようです。また、今年のトレンドを発表件数の増加で見てみると、装置別では光分析装置(37件 昨年29件)、表面分析装置(27件 昨年20件)が増加し、分野別ではナノテク、材料関係(95件 昨年78件)が大幅に増加し、先端材料評価に分析機器を適用した事例の増加が顕著でした。

2. 当社の報告

今回当社も新製品・機能紹介6テーマ、アプリケーション4テーマ、ノウハウ2テーマの計12テーマ(右記テーマ別聴講者数参照)で実施いたしました。各講演者が、この日のために各々のテーマで最新の事例を踏まえた、分かりやすい紹介となるよう説明に工夫をこらしたことにより、説明会後に個別に具体的な質問を受ける場面も多々あり、聴講者数だけでは測れない

装置に対しての強い興味喚起につながる良い機会になりました。この新技術説明会には今後も積極的に参画し、製品展示との連携を強めた出展とすることで、より良く製品を理解いただく場になるよう企画を進めていくべきと改めて実感しております。今後もよりよい新技術説明会、そして分析展とすべく関係者一丸となり準備を進めていきますので、是非ご来場ください。

〈テーマ別聴講者数〉

1. 最新の日立汎用SEMのご紹介	49名
2. 最新形自動加熱気化水分測定システムで省力化を推進	20名
3. 分光光度計を使いこなそう！ 溶液測定のが付きにくい落とし穴	104名
4. TEMトモグラフィーの最新応用	15名
5. HPLCを“さらに”上手に使いこなすコツ	204名
6. 日立イオンミリング装置のご紹介	31名
7. 新機能を搭載したZ-2010シリーズ 原子吸光度計の紹介	25名
8. 低分子化合物分析への前処理アプローチ (日立「NOBIAS」シリーズ)	26名
9. 日立超高速液体クロマトグラフ LaChromUltra(LCU)のご紹介	39名
10. 日立卓上顕微鏡Miniscope™ +EDX分析装置のご紹介	54名
11. 固体蛍光測定の実例！ 最新アプリケーションを例に	23名
12. 最新のFIBアプリケーション	47名

株式会社日立ハイテクノロジーズ

北海道支店	札幌	(011) 707-3200	本社(サポートセンタ)	東京	(03) 3504-7211	四国営業所	高松	(087) 814-9911
東北支店	仙台	(022) 264-2219	中部支店	名古屋	(052) 219-1881	中国支店	広島	(082) 221-4511
筑波支店	土浦	(029) 825-4801	関西支店	大阪	(06) 4807-2511	九州支店	福岡	(092) 721-3511
			京都営業所	京都	(075) 241-1591			

分析機器に関する各種お問い合わせは…

お客様サポートセンタ 電話(03)3504-7211

受付時間 8:50~11:50 12:45~17:30(土・日・祝日および弊社休日を除く)

本ニュースは会員情報検索サイト「S.I.navi」でもご覧いただけます。

ご入会は無料ですので、下記URLにアクセスください。

<http://www.hitachi-hitec.com/sinavi/>

〈編集後記〉

気候変動への関心が急速に高まるなか、「今年の冬は平年並」という報道に接し、ほっとする機会が多いと感じます。梅、桜、菜の花等、季節の話題が楽しみなってきました。

報道の関係では、昨年来『偽』の話題が花盛りとなり、信頼性と安心を見直す機運が高まっています。特に食品関係では、品質に関する工夫が間違えた目的で使われたために、大きな問題となりました。問題の摘出が、現場の関係者からの声であったことは、信頼性を重視する心が表面に出てきた現象として、頼もしくも感じられます。医薬、食品、環境等、化学分析分野に身をおくものにとって、身近な話題が多く、何らか

の貢献ができる可能性と責任感を感じます。

今回は、分析の信頼性が安全・安心に重要な役割を果たす分野を中心に、報文、記事を集めました。分析、計測の結果に対する信頼性をより高めることに、お役に立つことを願っております。ご意見等ありましたら、ご一報くださるよう、お願いいたします。(望月 記)

■インターネットホームページ

URL: <http://www.hitachi-hitec.com/science/>

■本ニュースに関するお問い合わせは、右記、または、(株)日立ハイテクノロジーズの上記各事業所へご連絡ください。

○(株)日立ハイテクノロジーズ 事業管理部

〒105-8717 東京都港区西新橋1-24-14

電話(03)3504-7811 FAX(03)3504-7756

○(株)日立ハイテクノロジーズ

那珂アプリケーションセンタ

〒312-0057 茨城県ひたちなか市石川町11-1

電話(029)354-1970(代)

HITACHI
SCIENTIFIC INSTRUMENT NEWS
MARCH, 2008 VOL. 51 No. 1

発行 2008年3月18日
編集人 望月 康平
発行人 岡田 務
発行 株式会社日立ハイテクノロジーズ
〒105-8717
東京都港区西新橋1-24-14
電話(03)3504-7811(ダイヤルイン)
印刷 日立インターメディアックス株式会社