

# 27L-am13

二次元 HPLC を用いる尿中キラルアミノ酸の由来および含量変化解析

○小川 亜都美<sup>1</sup>, 三次 百合香<sup>1</sup>, 佐藤 裕<sup>1</sup>, 三田 真史<sup>2</sup>, 浜瀬 健司<sup>1</sup> ( <sup>1</sup>九大院薬, <sup>2</sup>資生堂)

【目的】分析技術の進歩に伴い哺乳類体内で様々な D-アミノ酸の存在が明らかにされ、分布や生理機能の解明が進んでいる。特に尿は他の組織と比較して D-アミノ酸含量が多く、疾患モデル動物等での変動が認められている。ヒト尿中にも多数の D-アミノ酸が存在し、非侵襲臨床試料としてキラルアミノ酸に着目したバイオマーカー探索が期待されている。一方、尿中 D-アミノ酸の起源は殆ど未解明であり、疾患との関連解明を行う上で由来解析が望まれる。そこで本研究では、尿中に高濃度に存在する D-アミノ酸 (Ala、Asn、Pro、Ser) について迅速二次元 HPLC 分析法を構築すると共に、無菌マウスの尿中キラルアミノ酸含量解析を行った。

【方法】マウス尿は水で 10 倍希釈した後、4-Fluoro-7-nitro-2,1,3-benzoxadiazole (NBD-F) を用いて蛍光誘導体化した。二次元 HPLC は一次元目に内径 0.53 mm、全長 750 mm のモノリス型 ODS カラムを使用し、二次元目には内径 1.5 mm、全長 250 mm のオリジナル光学分割カラム (KSAACSP-001S) を使用した。

【結果・考察】Ala、Asn、Pro、Ser について二次元 HPLC の分離及び検出条件について検討した。その結果、一次元目では 5% 及び 15% アセトニトリル水溶液のステップワイズ溶離により 4 種のアミノ酸が 90 分で分離された。また、二次元目ではいずれのアミノ酸も 15 分以内で良好に光学分割され、それぞれの分離係数は Ala が 1.21、Asn が 1.18、Pro が 1.17、Ser が 1.26 であった。コントロールマウスの尿中ではいずれのアミノ酸も高濃度で D 体が確認され、Ala では %D ( $D/(D+L) \times 100$ ) = 14%、Asn では 77%、Pro では 26%、Ser では 56% であった。一方無菌マウス尿中では Ala が 0.6%、Asn が 24%、Pro が 17%、Ser が 26% であり、D-Ala は主に腸内細菌に由来し、D-Asn、Pro、Ser は他の生成経路が存在することが示唆された。