

血漿中遊離アミノ酸濃度の基準範囲と試験法の標準化

血漿中遊離アミノ酸は、生化学的・分析的観点双方からバイオマーカーとしてのポテンシャルが高く、その測定ニーズが高まっている。本稿では、「採血・検体の管理方法からアミノ酸濃度測定に至る全ての工程がバリデートされた試験法」とその試験法を用いて取得した「日本人の血漿遊離アミノ酸濃度の基準範囲」について解説する。本取り組みが今後のアミノ酸メタボロミクス研究にとって有用なプラットフォームになることを期待している。

中山 聡, 宮野 博

1 はじめに

アミノ酸はタンパク質の構成成分としてだけでなく、遊離アミノ酸として重要な機能をもち、食品分野はもちろんのこと生化学の領域でも非常によく測定される分析種である。臨床化学的には、アミノ酸はフェニルケトン尿症などの先天性代謝異常の診断¹⁾、栄養状態不良の患者の病態把握などに用いられ、肝機能不全の重症度判定や治療の指標でもある²⁾。また、フィッシャー比（分岐鎖アミノ酸対芳香族アミノ酸の比）は、肝疾患の診断および予測のための有用である。最近では、^{けっしょう}血漿中遊離アミノ酸濃度やそのバランスの変化と様々な疾病との関連性が報告されている。例えば、^{がん}肺癌、^{すい}胃癌、^{すい}結腸直腸癌、^{すい}乳癌、^{すい}膵癌および前立腺癌を含むいくつかの癌が血漿中遊離アミノ酸プロファイルに影響を及ぼし^{3)~5)}、また、血漿中アミノ酸プロファイルは、肥満日本人における内臓脂肪蓄積と関連している^{6)~9)}。

さて、血漿中遊離アミノ酸は、生化学的観点、分析的観点双方から、バイオマーカーとして実用的であり、ポテンシャルが高いといえる。早朝空腹時では、採血日が異なっても、同一アミノ酸であればその濃度にほとんど変化はない。すなわち高い恒常性が維持されていることが知られている¹⁰⁾。また、代表的な血漿中遊離アミノ酸の濃度は数十~数百 $\mu\text{mol/L}$ 程度であり、市販の自動アミノ酸分析装置（ニンヒドリンによるポストカラム誘導体化法）で、濃縮などの処理をせずに高い精度で分析できる¹¹⁾¹²⁾。さらに、複雑で膨大な代謝物の中で、アミノ酸は「ハブ」として代謝状態の全体を俯瞰できる指標とも考えられる。

このように、臨床化学的な重要な指標として、これらの濃度を正確に測定する重要性はますます高まっている。事実、これまで、多くの血液を試料とした研究が進められ、アミノ酸と疾病を関連付ける知見が数多く報告

されている。

しかし、いくつかの理由で、血漿中遊離アミノ酸濃度の精確な定量が行われていたとは証明できず、すなわち、論文間のデータ比較はできなかった。

一般に、アミノ酸の定量は、比色による自動アミノ酸分析計を代表とする液体クロマトグラフィー（HPLC）や、ガスクロマトグラフィー（GC）、質量分析（MS）または LC/MS を用いて行われる。これらの機器は定量値を提供するが、高価なため主要病院以外の医療機関にはほとんどなく、したがって、血液試料は、遠隔の臨床検査室に輸送されることが多い。そのため、しばしば一貫性のない試料の取り扱い（血漿分離や保管など）の後に定量化される。それ以外にも、後述するように、試料の種類（血液か血清か血漿か）、採血時間、定量用の標準物質や測定法などが統一されていない。

そこで、採血からの検体の管理方法からアミノ酸濃度測定に至るすべての工程がバリデートされた試験法と環境を整えること、健康人の血漿中遊離アミノ酸濃度の基準範囲を設定し、今後のアミノ酸メタボロミクスに有用なプラットフォームを提供するプロジェクトが進められてきた。この中には、アミノ酸標準液のトレーサビリティ確保も含まれている。

本稿では、採血から除タンパクに至るまでのアミノ酸の安定性、アミノ酸標準物質の整備、プレカラム誘導体化 LC/MS によるアミノ酸分析バリデーション、これらを基に測定した「日本人の健康人の血漿中遊離アミノ酸の基準範囲」、および、血漿中遊離アミノ酸濃度に関連する背景因子について解説する。

なお、血漿中遊離アミノ酸濃度の基準範囲の設定は、日本臨床化学会栄養専門部会のプロジェクトとして行われたものである。また、アミノ酸標準物質については、日本アミノ酸学会および産業技術総合研究所計量標準総合センターにご支援をいただいた。

Reference Intervals for Plasma-free Amino Acid in a Japanese Population and Validation Study of the Analytical Method.

2 採血から前処理までの血液試料安定性

メタボローム解析は、大量の代謝産物を分析・解析し、細胞や生体内代謝の働きを包括的に捉え、生体の表現型を理解するのに有効である。その変化の観察・測定は、健康や栄養などの様々な分野で利用されている。しかし、一般的な網羅的メタボローム解析では、データの量を重視して、代謝物の化学的および酵素的安定性は不明のまま、あるいは個々に注意を払うことなく、同じ前処理の方法で測定に供していることが多い。不適切な試料の取り扱い、不正確な定量値を与え、結果の解釈を誤る可能性がある。代謝物をアミノ酸に限定しても、側鎖構造が多様であるため、アミノ酸の種類によって異なる挙動を示す。酸や塩基に不安定なもの（グルタミン、アスパラギン）、容易に加水分解を受け、他のアミノ酸に変化するもの（アスパラギンがアスパラギン酸に、グルタミンがグルタミン酸に）、環化するもの（グルタミンがピログルタミンに）、酸化されやすいもの（Sを有するメチオニンやシステイン）、試料中に含まれる酵素で容易に代謝されるもの（アルギニンからオルニチンへの変換）などが知られている。このため、それぞれの異なるメカニズムに変化に対応できる処理や保管方法を選択しなければならない。

血液試料、血漿中試料の安定性に関するデータは前述のプロジェクト内でも取得されており、竹花らの論文で報告されている¹³⁾。以下重要なポイントについて解説する。

2.1 採血

血漿中遊離アミノ酸は、前述のように高い恒常性をもって濃度が維持されている一方、概日リズムを示すことが知られており、アミノ酸の種類によっては1日の中で約30%変化する¹⁴⁾。したがって、一定の時刻で血液を採取することが望ましい。また、容易に想像のつくことであるが、血漿中遊離アミノ酸濃度は、食事の影響を受けやすく、食直後では、タンパク質が消化されたり、遊離アミノ酸が吸収されたりするので、アミノ酸濃度が上昇する。これらのことを総合すると、一般的な健康診断で行われているタイミング、つまり早朝空腹時の午前7時～午前10時の間の採血したものが、血漿中遊離アミノ酸の試料としては適切である。

血球と血漿の遊離アミノ酸には、かなり濃度が異なるものがあることが知られている。必須アミノ酸の差は小さいが、非必須アミノ酸の濃度は血球で数倍になるという報告もある¹⁵⁾。近年整備が進んでいるバイオアナリシスのガイドラインでは、バリデーション試験において溶血の影響を評価することが求められている¹⁶⁾。遊離アミノ酸測定の場合は溶血により試料濃度自体が変化してしまう成分があるため影響は無視できない。1%を

超える溶血を示す場合には、アミノ酸の種類によっては測定値に影響がでることから、万一、血液試料が重度の溶血を示す場合は別の試料を採取することが望ましい¹³⁾。

なお、詳細は2.2項で解説するが、遊離アミノ酸測定は採血後の温度管理が重要となることから、血清試料を用いることは適切ではない。本プロジェクトでは、血漿調製用の抗凝固剤として、EDTA-2Naの使用を標準操作法として設定している。海外ではEDTA-2Na採血管が入手できない地域もある。この場合は、カウンターイオンが異なるEDTA-2Kを使用する。

2.2 採血後の温度管理

採取後、血液は室温で一定時間放置されることが一般的である。しかし、遊離アミノ酸を測定対象とする場合は採血直後に血液を（37℃から）0℃付近になるまで急冷し、凍結させないように保管することが極めて重要である。

室温で放置すると、代謝酵素によって多くのアミノ酸が代謝される。例えば、血球に存在するアルギナーゼによりアルギニンは加水分解されオルニチンとなる（図1）。また、グルタミンおよびアスパラギンは、グルタミン酸およびアスパラギン酸に代謝されることがよく知られている。つまり、通常の検査室での採血後の処理でよく見られるように、採血後の採血管をテーブル上で放置すると、採血管の中で代謝が進むため、身体の状態を反映しないアミノ酸濃度が得られてしまう。

これを回避するためには、アミノ酸代謝に関与する多くの酵素反応と化学的な分解・平衡反応を一斉に停止させるために、採取後即座に血液試料を0℃付近に冷却することが不可欠である。冷却速度がアミノ酸安定化の重要な因子であるため、冷蔵庫や氷ではなく、氷水を用いるのが適切である。両者の冷却能力は大きく異なることから、氷水での冷却は正確な遊離アミノ酸測定のための重要なポイントである。なお、血液を凍結すると溶血が起こるので、血液を冷凍庫やディープフリーザーで冷却・保管することは不可である。

実験室のような環境であれば氷水の調製は容易である

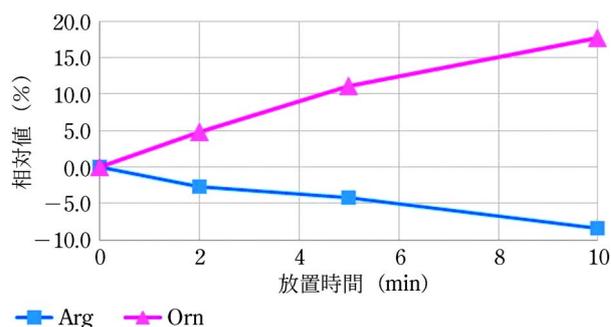


図1 室温での血漿中アルギニンとオルニチンの変化

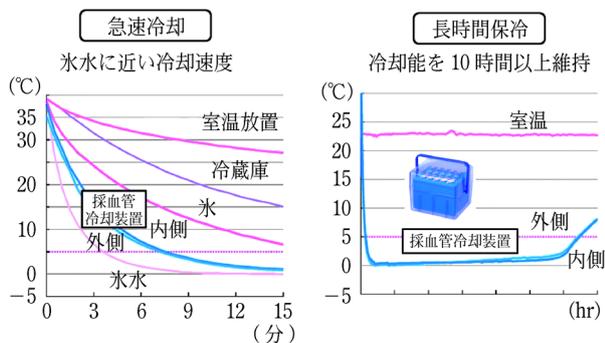


図2 ポータブル採血管冷却装置（キューブクーラー®）の冷却速度と保冷時間

が、血液採取時に医療機関で氷水の準備や維持することは容易ではない。ポータブル採血管冷却装置（CubeCooler®）は、医療機関や集団健康診断等で血液採取後の採血管を急速冷却するために開発されたものであり、氷水を用いた冷却と同等の効果を有する。高热伝導性容器（アルミニウム）および絶縁体（ポリエチレン形態）で構成され、10時間以上0℃の状態を維持し、採血現場で遊離アミノ酸を安定に取り扱うことができる（図2）。当該装置は、アミノ酸分析だけでなく、他の代謝研究の試料管理にも役立つと考えられる¹⁷⁾。

血漿分離時は、冷却遠心分離機を使用する。タウリンなど一部のアミノ酸は血小板中に多く含まれることが知られていることから、血小板で血漿を汚染しないような注意が必要である。血小板は血漿と血球の界面付近に存在するが視認することはできないため、十分な遠心力と遠心時間（2010g×15min）を確保して、界面付近を避けて血漿を採取する必要がある。

血漿保管についても温度管理は重要である。-20℃で保存すると、いくつかのアミノ酸、特にグルタミン酸、アスパラギン酸およびシステインが徐々に減少する可能性がある。したがって、長期保存する場合は-80℃の冷凍庫を使用する、試料を輸送する場合はドライアイスで満たされた箱に入れて運ぶ等、の注意が必要である。

2.3 除タンパク操作

血漿はアルブミンのようなタンパク質を含むので、分析装置に供する前に除タンパクが必要である。ニンヒドリンを検出試薬として用いるポストカラム誘導体化を原理としたアミノ酸分析計で分析する場合、トリクロロ酢酸またはスルホサリチル酸を用いて除タンパクを実施する。これらの試薬は強酸であるため、酸に不安定な遊離アミノ酸が分解されないように、処理後すぐに測定を行う必要がある。

一方、逆相HPLCを使用することを前提としているプレカラム誘導体化法ではマイルドな有機溶媒での除タンパクを使用することができる。ただし、有機溶媒はそ

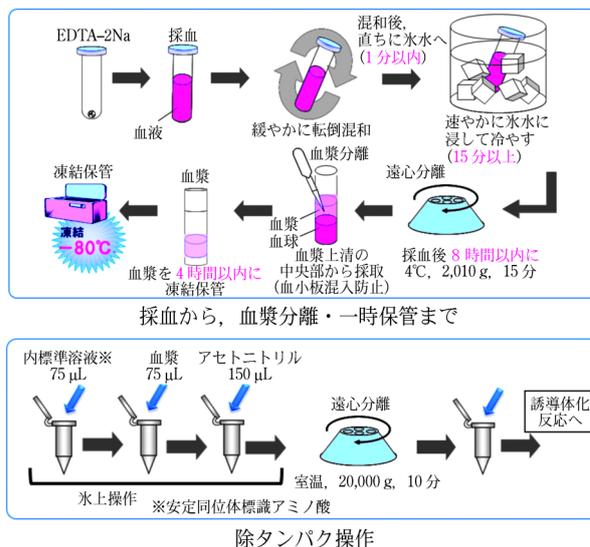


図3 血漿中遊離アミノ酸測定における血液試料の適切な前処理手順

の後のアミノ酸分離に影響を与えるため、除タンパク効率と分離への影響のバランスを取る必要がある。当該プロジェクトでは、酸に不安定なトリプトファン、グルタミン、アスパラギンなどを安定に取り扱うことが可能となるため、アセトニトリルを用いた除タンパク法が採用されている。

除タンパクは生体試料分析では一般的な操作であり、何気なく実施してしまうことが多いが、測定値に影響を与える最も重要な操作の一つである。ちょっとした操作の違いで、回収率やLC-MS測定でのマトリックス効果（同時に溶出する成分により測定値が変化する現象）に影響を与えることから、手順を統一することが必要である。また、可能であれば適切な段階で内標準物質を添加することが望ましい。プロジェクトで採用しているLC-MS法では、各種安定同位体標識アミノ酸を内標準物質として使用することで、試料ごとにわずかに変動する回収率やマトリックス効果を補正することができ、精確な定量値を得ることが可能となる。

以上の注意事項を踏まえて、当該プロジェクトで採用したLC-MSを用いたプレカラム誘導体化法での、適切な前処理手順を図3にまとめた。

3 標準物質の整備

定量分析を精確に行うには、精確な濃度値を付与された機器校正用の標準物質が必要である。アミノ酸においては、メーカーが濃度値を保証したアミノ酸混合溶液は市販されていたが、計量トレーサビリティに基づいたアミノ酸標準液は供給されていなかった。異なるメーカーのアミノ酸や調製ロットの変化による純度・濃度変動のリスクは否定できないし、それを検証する手段もなかった。

計量トレーサビリティとは、「個々の校正が測定不確

かさに寄与する、文書化された切れ目のない校正の連鎖を通じて測定結果を計量参照に関連付けることができる測定結果の性質」と定義されている。簡潔に言えば、「ある測定結果を国際単位系 (SI) に紐づけることで、その精確を保証すること」である。

日本アミノ酸学会、産業技術総合研究所計量標準総合センター (AIST/NMIJ) は、アミノ酸標準液の計量トレーサビリティを確保するための上位標準となるアミノ酸標準物質の整備を進めてきた。

タンパク質構成アミノ酸のうち、酸加水分解に安定なアミノ酸 (17 種類) については、純度を精確に決定した認証標準物質 (certified reference material, CRM) が開発され、現在、AIST/NMIJ より国家標準物質として供給されている。それ以外のタンパク質構成アミノ酸や非タンパク質性アミノ酸のうち、一般的な生体アミノ酸で測定ニーズの高いもの (22 種類) については、traceable reference material (TRM) として供給が開始されている。TRM とは、純度値が AIST/NMIJ を通じて SI 単位に紐づけられた標準物質である。特にアミノ酸の TRM は、SI トレーサブルに加え、約 40 種の不純物アミノ酸類の量が保証されており、CRM に準じる標準物質として使用することができる。

測定法は標準物質によって校正され、その測定法が校正の連鎖によって公的に定められた標準物質に辿り着け

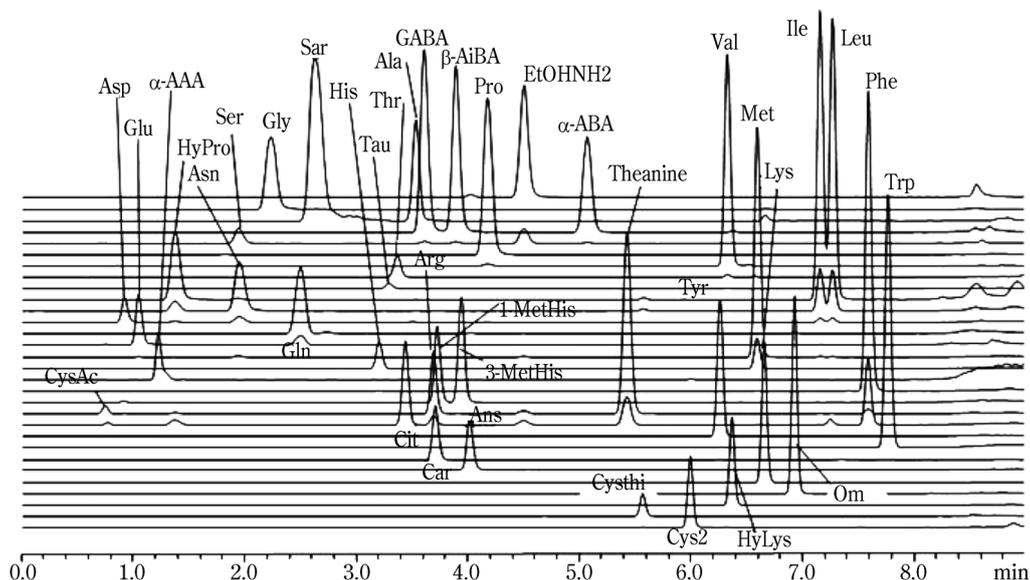
ることが確かめられている場合、この測定法は国家標準にトレーサブルであり、それにより値付けされたものである。

CRM, TRM による標準物質の調製方法の成果については、すでに報告がされている^{18)~21)}。現在、これらのアミノ酸を用いた混合標準溶液の調製法の検討が進められている。調製法が確立され、溶液中でのアミノ酸の安定性情報が取得された段階で、精確な濃度値が付与された安定性に優れたアミノ酸混合標準溶液が市販される予定である。

4 LC/MS プレカラム誘導体化アミノ酸分析法

アミノ酸分析の自動化システムは、既に 1958 年に Stein, Moore および Spackman によって開発された。カチオン交換樹脂で分離した後のニンヒドリン誘導体化アミノ酸の比色定量を用いるポストカラム誘導体化技術を採用したものである。この方法論によるシステムは改善を重ねられ、アミノ酸分析の重要な地位を築き上げ広く普及している¹¹⁾。しかし、代表的生体アミノ酸成分約 40 種類の測定に 2 時間程度を要することが、実用面での課題の一つであった。

血漿中遊離アミノ酸の有用性を訴求するには多くの試料を測定する必要があり、分析時間の短縮が必須である



アミノ酸の種類と濃度 (nmol/mL) Cysteic acid (CysAc) : 200 ; aspartic acid (Asp) : 200 ; glutamic acid (Glu) : 200 ; α -amino adipic acid (α -AAA) : 100 ; hydroxy proline (HyPro) : 200 ; asparagine (Asn) : 200 ; serine (Ser) : 200 ; glycine (Gly) : 200 ; glutamine (Gln) : 400 ; sarcosine (Sar) : 500 ; histidine (His) : 200 ; taurine (Tau) : 100 ; threonine (Thr) : 200 ; citrulline (Cit) : 200 ; alanine (Ala) : 200 ; 1-methyl-histidine (1-MetHis) : 200 ; arginine (Arg) : 200 ; carnosine (Car) : 200 ; γ -amino butyric acid (GABA) : 200 ; 3-methyl-histidine (3-MetHis) : 200 ; anserine (Ans) : 200 ; β -amino isobutyric acid (β -AiBA) : 100 ; proline (Pro) : 200 ; ethanolamine (EtONH₂) : 200 ; α -amino butyric acid (α -ABA) : 200 ; theanine : 200 ; cystathionine (Cysthi) : 100 ; cystine (Cys2) : 200 ; tyrosine (Tyr) : 200 ; Valine (Val) : 200 ; hydroxy lysine (HyLys) : 200 ; methionine (Met) : 200 ; ornithine (Orn) : 200 ; lysine (Lys) : 200 ; isoleucine (Ile) : 200 ; leucine (Leu) : 200 ; phenylalanine (Phe) : 200 ; and tryptophan (Trp) : 200

図 4 アミノ酸 38 種のマスクロマトグラム例

表1 APDS 試薬を用いた LC-MS プレカラム誘導体化法のバリデーション結果①：定量範囲

内標準溶液			アミノ酸	m/z	検量線用標準溶液/検量線の濃度範囲 (μM)									
安定同位体ラベルアミノ酸	m/z	濃度 (μM)			Std1	Std2	Std3	Std4	Std5	Std6	Std7	Std8	Std9	Std10
L-glutamic acid (¹³ C ₅ , ¹⁵ N)	274.1	100	Glutamic acid	268.1	2.5	5	10	20	30	40	50	60	80	100
L-asparagine (¹³ C ₄ , ¹⁵ N ₂)	259.1	90	Asparagine	253.1	6.25	12.5	25	50	75	100	125	150	200	250
L-serine (¹³ C ₃ , ¹⁵ N)	230.1	100	Serine	226.1	12.5	25	50	100	150	200	250	300	400	500
glycine (¹³ C ₂ , ¹⁵ N)	199.1	50	Glycine	196.1	25	50	100	200	300	400	500	600	800	1000
L-glutamine (¹³ C ₅ , ¹⁵ N ₂)	274.1	100	Glutamine	267.1	25	50	100	200	300	400	500	600	800	1000
L-histidine (¹³ C ₆ , ¹⁵ N ₃)	285.1	100	Histidine	276.1	12.5	25	50	100	150	200	250	300	400	500
L-citrulline (4,4,5,5-d ₄)	300.1	100	Citrulline	296.1	2.5	5	10	20	30	40	50	60	80	100
L-threonine (¹³ C ₄)	244.1	100	Threonine	240.1	12.5	25	50	100	150	200	250	300	400	500
L-alanine (3,3,3-d ₃)	213.1	100	Alanine	210.1	25	50	100	200	300	400	500	600	800	1000
L-arginine (¹⁵ N ₄)	299.1	100	Arginine	295.1	6.25	12.5	25	50	75	100	125	150	200	250
L-proline (¹³ C ₅ , ¹⁵ N)	242.1	25	Proline	236.1	12.5	25	50	100	150	200	250	300	400	500
3-methyl-L-histidine (methyl-d ₃)	293.1	100	α-Aminobutyric acid	224.1	1.25	2.5	5	10	15	20	25	30	40	50
L-tyrosine (ring- ¹³ C ₆)	308.1	100	Tyrosine	302.1	12.5	25	50	100	150	200	250	300	400	500
L-valine (¹³ C ₅ , ¹⁵ N)	244.1	50	Valine	238.1	25	50	100	200	300	400	500	600	800	1000
L-methionine (¹³ C ₅ , ¹⁵ N)	276.1	50	Methionine	270.1	2.5	5	10	20	30	40	50	60	80	100
L-ornithine (¹³ C ₅)	378.1	80	Ornithine	373.1	6.25	12.5	25	50	75	100	125	150	200	250
L-lysine·2HCl (¹³ C ₆ , ¹⁵ N ₂)	395.1	130	Lysine	387.1	12.5	25	50	100	150	200	250	300	400	500
L-isoleucine (¹³ C ₆ , ¹⁵ N)	259.1	80	Ileucine	252.1	12.5	25	50	100	150	200	250	300	400	500
L-leucine (5,5,5-d ₃)	255.1	80	Leucine	252.1	12.5	25	50	100	150	200	250	300	400	500
L-phenylalanine (¹³ C ₉ , ¹⁵ N)	296.1	80	Phenylalanine	286.1	12.5	25	50	100	150	200	250	300	400	500
L-tryptophan (¹³ C ₁₁ , ¹⁵ N ₂)	338.1	80	Tryptophan	325.1	6.25	12.5	25	50	75	100	125	150	200	250

ことから、プロジェクトでは、LC/MS プレカラム誘導体化法を採用し、自動プレカラム誘導体化液体クロマトグラフィー-質量分析計 (UF-Amino Station, 島津製作所) を使用することとした。本装置は、誘導体化試薬 (APDSTAG®, 富士フイルム和光純薬) と安定同位体標識アミノ酸 (APDSTAG®用アミノ酸内部標準混合液, 富士フイルム和光純薬) を使用するアミノ酸分析専用装置である。8分以内に少なくとも38種類の生理学的アミノ酸を分離することができ、注入間隔は12分である²³⁾²⁴⁾ (図4) APDSTAG®は、3-アミノピリジール-N-ヒドロキスクシンイミジルカルバメートの商標であり、アミノ酸同士 (特に、ロイシンやイソロイシンなど同じ質量をもつアミノ酸) の分離に優れ、イオン化効率が高い LC/MS 専用誘導体化試薬として開発されていたものである²²⁾。

血漿に存在する21種類の代表的な遊離アミノ酸については、採血から本装置を用いた測定までの全工程が評価されている²³⁾。

検出限界, 定量下限, 直線性および範囲は、ヒト血漿中遊離アミノ酸濃度を意識して設定されており、後述す

る基準範囲の2.5%から97.5%を十分カバーしている (表1)。また、ヒト血漿を用いた真度・精度評価では、希釈妥当性, 真度 (添加回収率1濃度), 精度 (4濃度) とも良好な値を示している (表2)。

図5に従来のアミノ酸分析計 (ニンヒドリンによるポストカラム誘導体化法) で測定したヒト血漿中遊離アミノ酸濃度と本法のそれとの相関を示した。いずれも極めてよい相関があり、データの同等性が証明されている。なお、APDSTAG®試薬は、体外診断用医薬品として承認されており、ニンヒドリンによるポストカラム誘導体化法と同様に臨床検査として使用することも可能である。また、本装置は、血漿試料のアミノ酸測定に特化したものではなく、食品や生化学領域の試料にも有用である²⁴⁾。

5 日本人における血漿中アミノ酸濃度の基準範囲

2008年の日本の人間ドックでの検診者7685名について、血漿中遊離アミノ酸濃度の測定を実施し、除外基準に基づき、最終的に1890名 (男性901名, 女性989

表 2 APDS 試薬を用いた LC-MS プレカラム誘導体化法のバリデーション結果 ②：ヒト血漿試料での真度・精度

	正確度				真度 (再現性)			
	血漿濃度	血漿添加濃度 (Std6)	回収率	希釈正確性	血漿添加試料高 (Std10)	血漿添加試料中-1 (Std9)	血漿添加試料中-2 (Std5)	血漿添加試料低 (Std2)
	(μM)	(μM)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)
Glutamic acid	40	40	98	102	2.4	1.5	2.3	3.4
Asparagine	42	100	97	102	2.0	2.6	1.5	2.5
Serine	100	200	99	101	2.0	1.8	2.1	2.3
Glycine	215	400	96	103	2.1	2.0	2.0	2.2
Glutamine	497	400	97	102	2.5	1.4	1.9	2.0
Histidine	72	200	99	100	1.8	2.4	1.8	3.7
Citrulline	35	40	98	104	2.7	2.1	2.2	2.1
Threonine	123	200	100	100	1.4	2.1	1.8	2.1
Alanine	291	400	102	102	3.0	2.0	2.8	2.8
Arginine	77	100	101	102	3.0	2.9	2.4	2.2
Proline	116	200	96	102	2.1	2.1	2.5	2.6
α -Aminobutyric acid	20	20	103	103	3.3	2.7	3.8	4.0
Tyrosine	54	200	97	100	2.6	2.2	2.6	2.2
Valine	174	200	97	100	2.2	1.6	1.7	1.7
Methionine	23	40	98	101	2.1	1.8	2.4	2.3
Ornithine	56	100	97	100	2.6	2.2	2.7	2.3
Lysine	146	200	96	102	2.7	2.6	2.5	2.6
Isoleucine	58	200	97	101	2.4	1.9	2.1	2.7
Leucine	100	200	102	102	3.0	2.9	2.4	2.5
Phenylalanine	53	200	100	99	1.7	1.6	2.0	2.6
Tryptophan	51	100	96	102	1.5	2.3	1.8	2.4

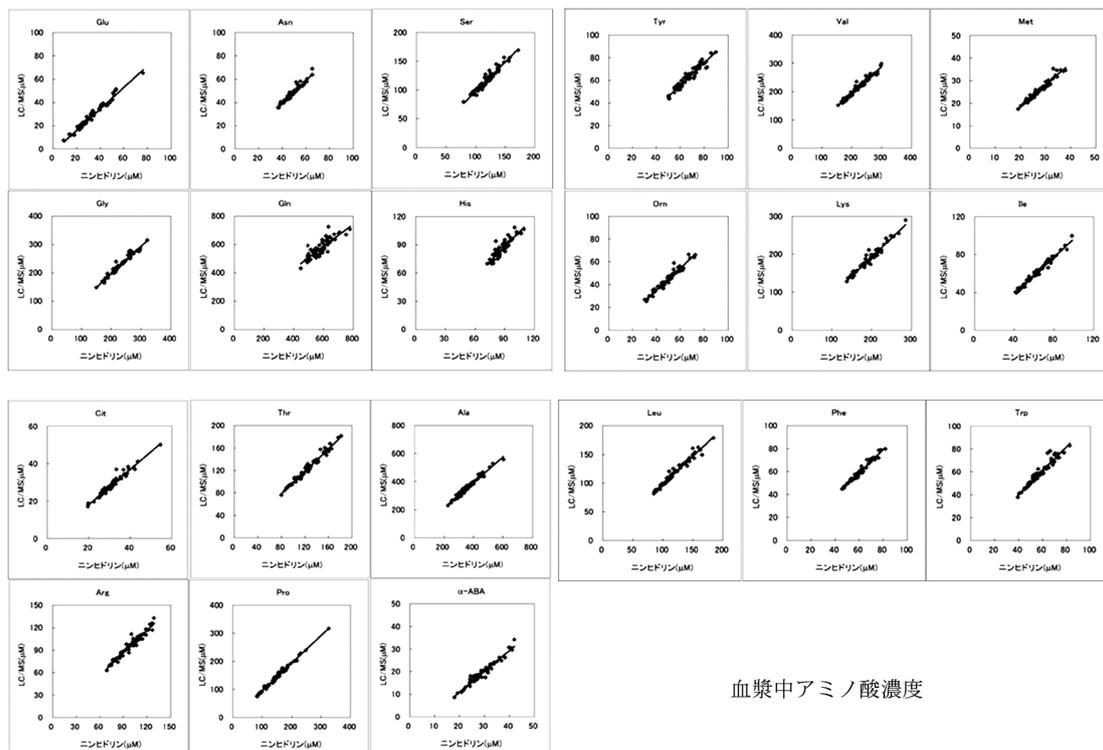


図 5 ニンヒドリンによるポストカラム誘導体化法と APDS 試薬を用いた LC-MS プレカラム誘導体化法による血漿中遊離アミノ酸濃度の比較 (横軸がニンヒドリン法, 縦軸が LC-MS 法)

名) を基準個体として選択した。表3に選択された基準個体の臨床的特徴を示した。

評価対象は、血漿中に比較的多く含まれ、これまでの報告で疾患や栄養状態との関連性が強く指摘されている、グルタミン酸、セリン、アスパラギン、グリシン、

グルタミン、ヒスチジン、スレオニン、アラニン、シトルリン、アルギニン、プロリン、 α -アミノ酪酸、チロシン、バリン、メチオニン、オルニチン、リジン、イソロイシン、ロイシン、フェニルアラニン、トリプトファン

の21種類のアミノ酸とした。
採血から血漿分離後の凍結保管までの手順は図3に従ったが、要点は以下のとおりである。被験者より、早朝空腹時にEDTA-2Na採血管により、5 mLの血液を採取した。採血後、穏やかに採血管内で混和し、採血後1分以内に氷水中で冷却を行い、15分以上冷却を行った。血液試料は2010 g、4℃で15分間遠心分離を行い、上清の血漿を回収し、回収後4時間以内に-80℃のフリーザー搬入、分析時まで凍結保存した。

また、血漿中遊離アミノ酸濃度測定の方法と手順については文献23に従ったが、要点は以下のとおりである。75 μ Lの内標準混合溶液 (APDSTAG®用アミノ酸内部標準混合液、富士フイルム和光純薬) と凍結融解した血漿75 μ Lを混合後、アセトニトリル150 μ Lを加え、混和攪拌、遠心分離したものを測定用試料とし、UF-Amino Stationに供し、内標準法により、定量分析を行った。

これらの手順に従って求められた個々のアミノ酸の濃度について、外れ値試料を除外したのちに2.5%点を下限値、97.5%点を上限値として血漿中アミノ酸濃度の基準範囲を設定した²⁵⁾²⁶⁾(表4)。

枝分かれ分散分析により血漿アミノ酸濃度に影響を及

表3 血漿中遊離アミノ酸の測定を実施した基準個体群のサンプル数とその臨床的特徴

	男性	女性	Total (男性+女性)	
サンプル数	901	989	1890	
年齢構成	40歳未満	101	157	258
	40歳以上 50歳未満	277	314	591
	50歳以上 60歳未満	292	311	603
	60歳以上	231	207	438
	BMI (kg/m ²) 構成	20.0未満	91	453
20.0以上 22.0未満		264	298	562
22.0以上 25.0未満		430	192	622
25.0以上		116	46	162
年齢分布		Mean	51.3	52.0
	Median	51	52	50
	Range	20-80	24-80	20-79
BMI (kg/m ²) 分布	Mean	21.5	22.6	20.5
	Median	21.4	22.6	20.2
	Range	14.2-29.7	15.4-29.7	14.2-29.5

表4 基準個体群全体、および男女別の血漿中アミノ酸濃度の基準範囲

単位: μ mol/L

	Total (男性+女性)			男 性			女 性		
	n	下限	上限	n	下限	上限	n	下限	上限
Glutamate	1890	13.5	68.9	901	19.0	76.6	989	12.1	57.2
Serine	1890	81.5	154.0	901	82.8	149.0	989	80.3	157.0
Asparagine	1890	33.6	59.2	901	35.9	59.7	989	32.7	58.9
Glycine	1889	150.2	369.6	901	151.3	295.5	988	149.1	396.7
Glutamine	1889	431.0	691.6	900	467.3	702.0	989	413.8	668.6
Histidine	1889	63.8	97.9	900	66.8	101.1	989	62.6	92.7
Threonine	1889	73.7	169.3	901	88.3	169.6	988	68.1	168.5
Alanine	1890	211.6	477.2	901	239.1	491.8	989	203.0	442.9
Citrulline	1889	18.9	42.7	901	21.0	43.3	988	17.7	41.7
Arginine	1890	54.3	121.4	901	64.3	122.5	989	50.3	119.2
Proline	1889	74.8	221.8	901	94.0	243.3	988	70.4	187.9
α -Aminobutyric acid	1890	11.2	31.6	901	11.7	32.5	989	10.7	30.7
Tyrosine	1889	41.9	80.9	901	47.0	84.0	988	39.9	74.4
Valine	1890	143.0	287.0	901	182.1	295.3	989	137.5	242.5
Methionine	1890	17.8	33.3	901	20.2	34.2	989	17.0	29.6
Ornithine	1886	27.3	72.4	897	36.2	75.3	989	24.8	68.4
Lysine	1889	124.9	237.3	901	147.2	242.4	988	114.9	223.1
Isoleucine	1890	36.4	85.0	901	47.4	89.9	989	34.9	65.5
Leucine	1890	76.7	159.5	901	100.9	166.7	989	73.5	125.3
Phenylalanine	1888	43.0	72.8	900	46.6	74.9	988	41.9	66.3
Tryptophan	1889	42.9	74.4	901	47.4	76.9	988	40.9	68.0

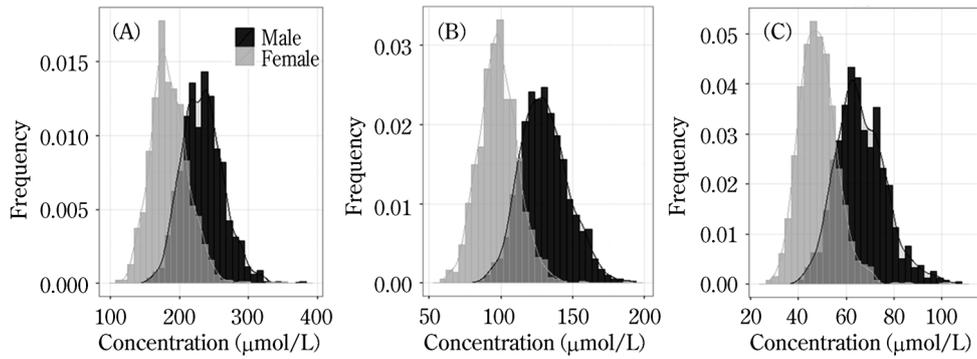


図6 Val(A), Leu(B), Ile(C)の男(黒), 女(グレー)別の基準個体の血漿中濃度分布のヒストグラム

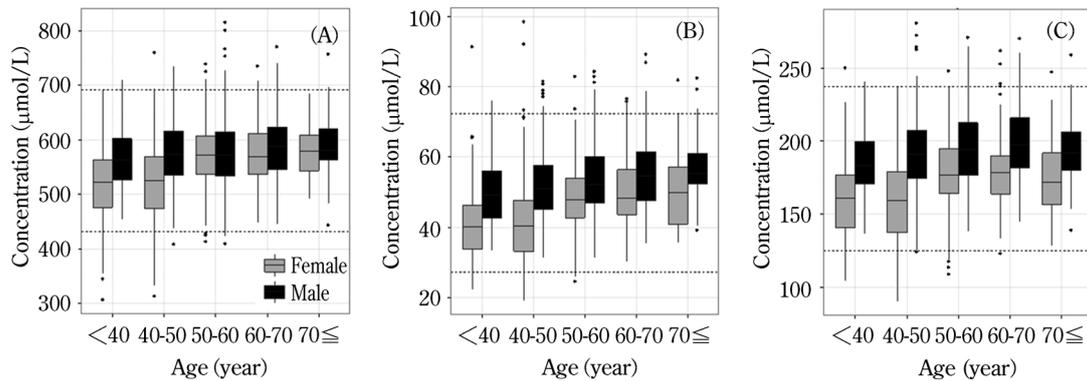


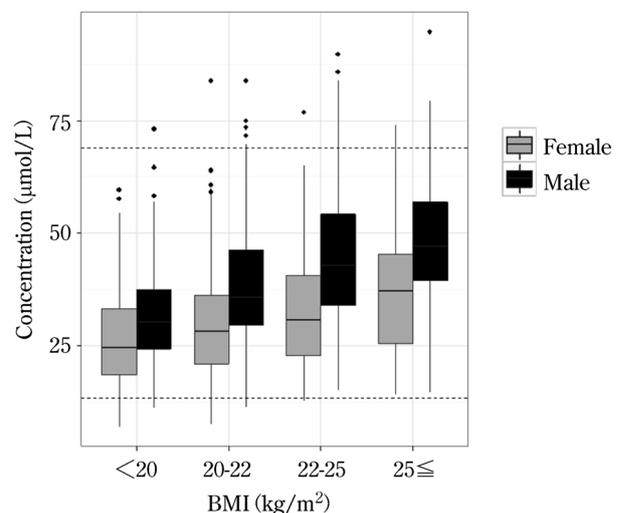
図7 Gln(A), Orn(B), Lys(C)の年齢層別, 男(黒), 女(グレー)別の基準個体の血漿中濃度分布のボックスプロット

ばすことが知られている背景因子 {性別, 年齢, 体格指数 (BMI)} の影響を評価した結果, 大多数のアミノ酸は性別の影響が有意であり, その影響は年齢やBMIよりも大きいと考えられた (図6)。また, シトルリン, グルタミン, オルニチンとリジン濃度は年齢の影響 (図7) が, さらにグルタミン酸の濃度は, BMIの影響が有意であった (図8)²⁵⁾²⁶⁾。

6 おわりに

生体内のアミノ酸情報, 特に血漿中遊離アミノ酸の濃度やその変化は, 身体の状態を把握できる重要なバイオマーカーとして認知されつつある。それを活用し, 人々の健康に有用な情報を提供するためには, 科学的に正確な試験方法を確立し, パリデートし, それにもとづいた健常人血漿アミノ酸濃度のデータベースを構築することが必要であった。ここで解説したプロトコルや方法を用いた血漿中遊離アミノ酸濃度の活用と新たな知見が増えていくことを期待したい。

また, これは血漿中遊離アミノ酸だけでなく, 様々な生理機能物質に対しても同様である。ここで示したアプローチからのプラットフォームができれば, 社会にとってももちろん有益であろうし, 企業にとっては, よりスピーディなビジネス展開につなげることも可能であると



BMIは<20 kg/m², 20-22 kg/m², ≥22 kg/m²で層別化した。

図8 GluのBMI(kg/m²)範囲ごと, 男(黒)女(グレー)別の基準個体の血漿中濃度分布のボックスプロット

考える。

文献

- 1) S. E. Waisbren : *JAMA*, **296** (8), 993 (2006).
- 2) E. Holm, O. Sedlaczek, E. Grips : *Curr. Opin. Clin. Nutr.*

