



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	高速液体クロマトグラフィーによる尿中フェニルアラニンの高感度定量
Author(s)	三浦, 敏明; 保井, 一太; 長谷部, 清
Citation	北海道大学医療技術短期大学部紀要, 8, 129-135
Issue Date	1995-12
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/37588
Type	departmental bulletin paper
File Information	8_129-136.pdf



原 著

高速液体クロマトグラフィーによる尿中 フェニルアラニンの高感度定量

三浦 敏明・保井 一太*・長谷部 清*

Highly Sensitive Determination of Phenylalanine in Urine by High-Performance Liquid Chromatography

Toshiaki Miura, Kazuta Yasui* and Kiyoshi Hasebe*

Abstract

A simple, specific and highly sensitive method was developed for the determination of L-phenylalanine. This method is based on the enzymatic conversion of L-phenylalanine ($\lambda_{\max}=257\text{nm}$, $\epsilon_{\max}=190$) to trans-cinnamic acid ($\lambda_{\max}=268\text{nm}$, $\epsilon_{\max}=20000$) with L-phenylalanine ammonia-lyase (PAL), followed by the measurement of trans-cinnamic acid by reversed-phase high-performance liquid chromatography with ultraviolet absorbance detection. A linear calibration curve was obtained over the L-phenylalanine concentration range of $0.2\text{--}30\ \mu\text{M}$, with a detection limit ($S/N=3$) of $1.0\ \text{pmol}$ per injection ($20\ \mu\ell$). The method was applicable to the determination of L-phenylalanine in urine. The recovery and reproducibility of the method were found to be satisfactory. The average content of L-phenylalanine in urine of 15 healthy men was determined to be $8.63 \pm 5.30\ \mu\text{g}/\text{mg}$ creatinine (mean $\pm$ SD, $n=15$), which was in good agreement with the values previously reported.

要 旨

フェニルアラニンアンモニアリアーゼは、分子吸光係数の小さなフェニルアラニンをその約100倍の分子吸光係数をもつケイ皮酸に変換する反応を触媒する。この酵素反応を利用すれば、フェニルアラニンの特異的高感度定量法を導く

ことができる。著者らはこの酵素反応と逆相高速液体クロマトグラフィーを組み合わせ、フェニルアラニンの簡易で高感度な定量法を開発した。本法の検量線は 0.2 から $30\ \mu\text{M}$ の濃度範囲で良好な直線性が成立した。また、本法の検出限界($S/N=3$)は $1.0\text{pmol}/\text{注入量}(20\ \mu\ell)$ であり、現在知られているフェニルアラニン定

北海道大学医療技術短期大学部

*北海道大学大学院地球環境科学研究科

College of Medical Technology, Hokkaido University

*Graduate School of Environmental Earth Science, Hokkaido University

量法の中では最も高感度であった。本法は尿中フェニルアラニンの定量にも応用可能であり、尿試料に対する添加回収率や定量精度も良好であった。本法により求めた15人の健康成人男子尿中の平均フェニルアラニン量は $8.63 \pm 5.30 \mu\text{g}/\text{mg}$ クレアチニンであり、既報の値とよい一致を示した。

緒 言

先天性代謝異常症であるフェニルケトン尿症(PKU)の診断をはじめ、臨床化学、生化学、食品化学分野におけるフェニルアラニン測定の意味は大きく、これまでに多数のフェニルアラニン定量法が開発されてきた。たとえば、枯草菌を用いるバイオアッセイ法は定量精度が低いものの、PKUのマスクリーニングには有用な方法として利用されている¹⁾。フェニルアラニン酸化酵素²⁾、フェニルアラニン脱水素酵素^{3, 4)}、フェニルアラニンアンモニアリアーゼ^{5, 6)}などによる酵素反応と吸光光度法、電極法あるいは生物発光検出-フローインジェクション分析法を組み合わせた定量法も報告されている。これらの方法の中には簡易な方法、特異性あるいは感度の優れた方法などがあり、測定目的に応じて使い分けられてきたが、特異性と簡易性を兼ね備えた高感度定量法は知られていない。また、信頼性の高い方法として、最近では高速液体クロマトグラフィー(HPLC)を利用したフェニルアラニンの高感度定量法の報告も多い。これらのHPLC法におけるフェニルアラニンの高感度検出には、発色または発蛍光性試薬でフェニルアラニンをプレまたはポストカラム誘導体化する方法⁷⁻⁹⁾、あるいは、紫外部短波長領域(210nm前後)の吸収でフェニルアラニン自体を検出する方法¹⁰⁻¹³⁾、のいずれかが採用されている。しかし、前者ではアミノ酸やアミンに共通の誘導体化反応を利用しているため、共存する他のアミノ酸やアミンとフェニルアラニンとの間の厳密な分離が要求される。一方、後者で

は、検出波長が紫外部短波長領域であるがゆえに避けられない高いノイズレベルや、低い選択性に起因する妨害ピークの出現などの問題点が多い。したがって、プレあるいはポストカラム誘導体化に利用できる、フェニルアラニンに特異的な反応があれば、簡易で特異的なフェニルアラニンのHPLC定量法を導くことができよう。著者らはこのような特異的な反応としてフェニルアラニンアンモニアリアーゼ(phenylalanine ammonia-lyase, PAL)が触媒する酵素反応に注目した。この酵素反応は、分子吸光係数の小さなフェニルアラニンを、その約100倍の分子吸光係数を示すトランスケイ皮酸(以下ケイ皮酸と略)に変換する反応(図1)であり^{14, 15)}、フェニルアラニンの高感度で選択的なプレカラム反応として利用できる。本論文ではこのような考えに基づき、PALによる酵素反応と逆相HPLCを組み合わせたフェニルアラニンの簡易で高感度な定量法を開発し、この方法が尿中フェニルアラニンの定量に応用できることを示した。

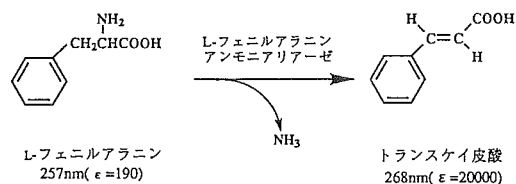


図1 フェニルアラニンアンモニアリアーゼが触媒するフェニルアラニンのケイ皮酸への酵素的変換

実験方法

1. 測定機器

HPLC システムには送液ポンプとして島津 LC-9A, インジェクターとして Rheodyne 7125型インジェクター(100 μl ループ), カラムオープンとして島津 CTO-6A, 検出器として島津 SPD-10AV 型紫外可視吸光光度検出器を用い、島津クロマトパック C-R3A によりクロマトグラムを記録した。恒温槽にはヤマト科学 BT-23型インキュベータを使用した。

2. 試薬類

PAL (EC 4.3.1.5) 酵素溶液としては、シグマ社 (St. Louis, MO) が市販している *Rhodoturula glutinis* 由来の酵素標品 (Grade I, グリセリン懸濁液, 比活性: $1.0 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg protein}$) を 0.1M トリス塩酸緩衝液 (pH 8.5) で所定の濃度に希釈して使用した。フェニルアラニンおよびケイ皮酸は和光純薬工業製試薬特級品を用い, その他の試薬類は, 特に記載のない限り, すべて最高純度の市販品を使用した。フェニルアラニンは 0.1M トリス塩酸緩衝液 (pH 8.5) に, ケイ皮酸はメタノールにそれぞれ溶解して濃度が 0.1M の溶液を調製し, これを原液として -20°C にて保存した。用時, 各原液を 0.1M トリス塩酸緩衝液 (pH 8.5) で所定の濃度に希釈して使用した。HPLC 用のメタノールには高速液体クロマトグラフ用 (Cica Merk, 関東科学) を用いた。また, 実験に用いたすべての水は Milli-Q Water システム (日本ミリポア) により精製したものである。

3. 尿中フェニルアラニンの定量操作法

3・1 尿試料の前処理

健康成人より採取した尿を 0.1M トリス塩酸緩衝液 (pH 8.5) で 10 倍希釈し, セルロースアセテート製メンブランフィルター ($0.45 \mu\text{m}$, DISMIC 25CS045AN, アドバンテック東洋) でろ過後, 以下に述べる酵素反応に付した。尿中クレアチニン濃度は Jaffé の方法の改良法⁹⁾ により求めた。

3・2 PAL による酵素反応

上記の 10 倍希釈尿またはフェニルアラニン標準溶液 ($0.2\text{--}30 \mu\text{M}$) $50 \mu\text{l}$ を PAL 溶液 ($0.23 \text{ unit}/\text{ml}$) $50 \mu\text{l}$ と混和し, 30°C で 30 分間インキュベートした後, 0.2M リン酸 $50 \mu\text{l}$ を加え反応を停止した。

3・3 逆相 HPLC によるフェニルアラニンの定量

カラムにはガードカラムとして Inertsil ODS-

2 ($5 \mu\text{m}$, $4.0 \times 10\text{mm}$, GL サイエンス) を, 分離カラムとして Develosil ODS HG-3 ($3 \mu\text{m}$, $4.6 \times 75\text{mm}$, 野村化学) を使用し, カラム温度は 40°C とした。また, 移動相には 50mM リン酸緩衝液 (pH 2.5) とメタノールの 7 : 3 の混液を用い, セルロースアセテート製メンブランフィルター ($0.45 \mu\text{m}$, C045A, アドバンテック東洋) でろ過し, 減圧下超音波脱気後, 流速 $1.0\text{ml}/\text{min}$ で送液した。上記酵素反応液の HPLC への注入量は $20 \mu\text{l}$ とし, 溶出成分は 268nm で検出した。

結果および考察

1. ケイ皮酸の逆相 HPLC による定量

最初にケイ皮酸を定量するための HPLC 条件について検討した。ガードカラムおよび分離カラムはそれぞれ逆相系の Inertsil ODS-2 ($5 \mu\text{m}$, $4.0 \times 10\text{mm}$) および Develosil ODS HG-3 ($3 \mu\text{m}$, $4.6 \times 75\text{mm}$) とし, 種々の移動相溶媒を用いてケイ皮酸の溶出時間やピーク形状を調べた結果, 50mM リン酸緩衝液 (pH 2.5) とメタノールの比が 7 : 3 の混液を移動相とし, 流速 $1.0\text{ml}/\text{min}$ で使用することにした。この条件で, ケイ皮酸は約 11.5 分で溶出されるシャープなピークとして観察された (図 2 a)。一方, 健康成人尿の 30 倍希釈液を直接 HPLC に注入して得られたクロマトグラム (図 2 b) にはケイ皮酸のピークと一致するピークは認められず, 健康成人尿中にはケイ皮酸が含まれていないことが確認された。したがって, PAL による酵素反応でフェニルアラニンをケイ皮酸に定量的に変換することができれば, 本 HPLC 法により尿中フェニルアラニンの定量が可能となる。

本 HPLC 法ではケイ皮酸の注入量が 2pmol から 6nmol の範囲で, ピーク面積と注入量の間に良好な直線性が得られ, その相関係数 (r) は 0.999 であった。また, 本法の検出限界 ($S/N = 3$) は $1.0\text{pmol}/\text{注入量}$ であり, PAL による酵素反応の生成物であるケイ皮酸が本法で高感度に定量できることが確認された。

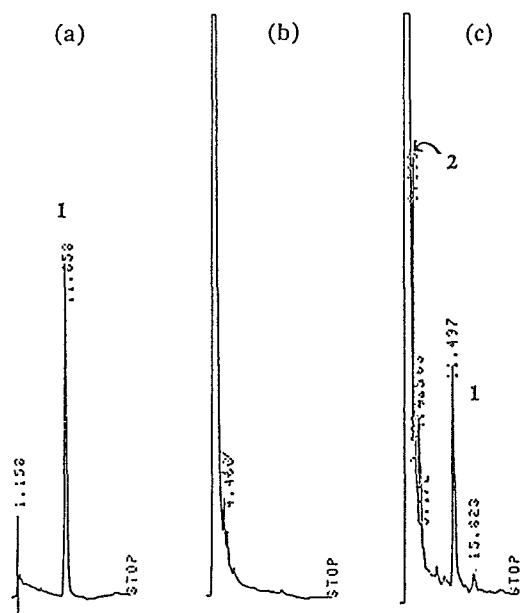


図2 ケイ皮酸，酵素未処理および酵素処理希釈尿のHPLCクロマトグラム

(a) ケイ皮酸 (40pmol), (b) 10倍希釈尿, (c) 実験の部に記載の定量操作法に従って処理した10倍希釈尿。

1 : ケイ皮酸, 2 : p-ヒドロキシケイ皮酸

2. PAL による酵素反応の至適条件

上述したように，HPLC によるケイ皮酸の定量法が確立できたので，フェニルアラニンをケイ皮酸に定量的に変換するための酵素反応条件について検討した。ただし，反応液の pH および反応温度は既報^{14, 15)}に従ってそれぞれ pH 8.5 および 30℃とし，種々の酵素濃度の下でのケイ皮酸の生成量を上記の HPLC 法で経時的に測定した。その結果を図 3 に示している。当然のことながら，PAL 濃度の増加に伴って反応完結に要する時間は短縮されたが，0.115 unit/ml（酵素溶液中の濃度 0.23 unit/ml に相当）でも 30 分以内で反応は完結した。したがって，PAL 濃度は 0.115 unit/ml に設定し，0.1 M リン酸緩衝液 (pH 8.5) 中，30℃で 30 分間の酵素反応を行うこととした。なお，本実験で使用した PAL は，PAL 活性の他に，その 16% 程度のチロシンアンモニリアーゼ活性も有している。そのため，試料中にチロシンが共存すると同様な反応によ

る p-ヒドロキシケイ皮酸の生成も認められた。しかし，上記の HPLC 条件では p-ヒドロキシケイ皮酸は約 3 分に溶出され（図 2 c），ケイ皮酸の定量を妨害しないことを確認した。

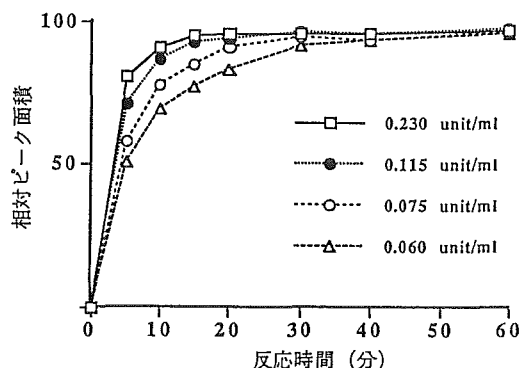


図3 フェニルアラニンからケイ皮酸への酵素的変換速度に及ぼすフェニルアラニンアンモニリアーゼの濃度

6.0 μM フェニルアラニン溶液 50 μl を試料とし，実験の部に記載の定量操作法に従って酵素反応および HPLC 分析を行った。縦軸は生成物であるケイ皮酸の相対ピーク面積。また，図中の酵素濃度は酵素反応液中の濃度を示している。

3. フェニルアラニンの高感度定量法

以上の検討結果に基づいて，PAL による酵素反応と逆相 HPLC を組み合わせたフェニルアラニンの定量操作法を確立した（実験方法の部を参照）。図 4 には本法の検量線を示しているが，フェニルアラニンの濃度が 1-30 μM の範囲で良好な直線性が成立し ($r=0.999$)，10 回の繰り返し測定における相対標準偏差は 15 μM で 1.68%，5 μM で 1.29% と良好であった。なお，この図中には示していないが，0.2 μM までの低濃度領域でも直線性は成立し，本法の検出限界 ($S/N=3$) は 1 pmol/注入量 (20 μl) であった。数あるフェニルアラニン定量法の中で現在最も高感度な方法は，最近報告された生物発光を検出系とするフローインジェクション分析法である⁴⁾。その検出限界は 10 pmol/注入量とされているので，本法はこの方法よりも高感度であり，体液中のフェニルアラニンの微量定量へ

の応用が期待される。

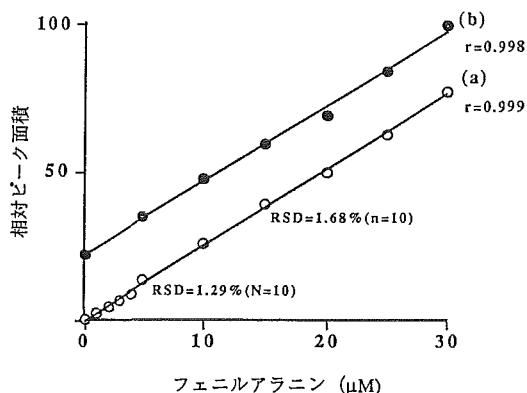


図4 フェニルアラニン標準溶液およびフェニルアラニン添加希釈尿についての検量線
フェニルアラニン標準溶液(a)および各濃度のフェニルアラニンを添加した10倍希釈尿(b)を実験の部に記載の定量操作法に従って酵素反応およびHPLC分析を行った。RSDは相対標準偏差。

4. 尿中フェニルアラニンの定量

前述したように、PALによる酵素反応と逆相HPLC法を組み合わせたフェニルアラニンの高感度定量法が確立できたので、この方法を利用して尿中フェニルアラニンの定量を試みた。尿中のフェニルアラニン濃度は、尿量によって変動するものの、20-100 μM の範囲内であると見積もられる¹⁹⁾。本法では1 μM 以下のフェニルアラニンも精度良く定量できるので、ヒト尿を分析する場合は、これを0.1M リン酸緩衝液 (pH 8.5) で10倍に希釈して用いた。実験の部に記載した定量操作法に従って10倍希釈尿を分析した

場合、HPLCに注入される反応液は30倍希釈尿に相当する。前述したように、酵素処理をしない30倍希釈尿のクロマトグラム (図2b)には酵素反応生成物であるケイ皮酸の定量を妨害するピークはほとんど認められなかった。ただし、尿中には酵素反応を阻害する物質が含まれている場合があるので、PALによる酵素反応が尿試料中でも定量的に進行することを確認する必要がある。図2cは10倍希釈尿を酵素処理した場合に得られたクロマトグラムであり、明瞭なケイ皮酸のピークが観察された。したがって、尿試料中でもフェニルアラニンからケイ皮酸への酵素的変換が起こることが示された。また、尿に添加したフェニルアラニンは、図3に示したフェニルアラニン標準液の場合と同様な速度でケイ皮酸に変換したので、尿試料中でもPALによる酵素反応が定量的に進行することが確認された。

図4は、各濃度のフェニルアラニン標準液およびフェニルアラニンを添加した10倍希釈尿を試料とした場合の本法の検量線を示している。両検量線においても良好な直線性が成立し、その相関係数はフェニルアラニン標準液で0.999、フェニルアラニン添加希釈尿で0.998であった。また、両直線の傾きの比が0.995であったことは、この検量線の濃度範囲における本法の平均添加回収率がほぼ100%であることを示している。

2種類の尿に対してフェニルアラニン無添加および添加 (添加濃度は10 μM) したものを試

表1 定量精度と添加回収率

尿試料	測定回数	フェニルアラニン濃度 (μM , 平均値 $\pm$ 標準偏差)			添加回収率 (%)
		未添加尿	添加濃度	添加尿	
No. 1	10	32.3 $\pm$ 0.6 (RSD=1.7%)	10	41.7 $\pm$ 1.0 (RSD=2.5%)	103
No. 2		83.1 $\pm$ 1.4 (RSD=1.8%)		138.2 $\pm$ 3.0 (RSD=2.2%)	96

2種類の尿に、添加濃度が10 μM になるようにフェニルアラニンを添加し、10倍希釈後、実験の部に記載の定量操作法に従って酵素反応およびHPLC分析を行った。RSDは相対標準偏差。

料とし、本法の繰り返し精度を調べた結果を表1に示している。いずれの場合も相対標準偏差(RSD)は2.5%以内であり、平均回収率もそれぞれ103および96%と良好であった。

以上のように本法が尿中フェニルアラニンの定量に応用可能であることが示されたので、15人の健康成人男子の尿中フェニルアラニン濃度を本法によって定量した。その結果をクレアチニン比で表すと、 $8.63 \pm 5.30 \mu\text{g}/\text{mg}$ クレアチニン(平均値 $\pm$ 標準偏差, $n=15$)と算出され、既報の値¹⁷⁾とよく一致した。また、ニンヒドリンによる発色反応をポストカラム検出法に用いるアミノ酸分析計で尿中フェニルアラニンを測定し、本法による測定値と比較したところ、両者の間の相関係数は0.989 ($n=10$)と良好であった。

結 語

フェニルアラニンアンモニアリアーゼによる酵素反応と逆相高速液体クロマトグラフィーを組み合わせた簡易で高感度なフェニルアラニン定量法を開発し、尿中フェニルアラニンの信頼性の高い定量法として利用できることを示した。本法の検出限界($S/N=3$)は $1.0\text{pmol}/\text{注入量}(20\mu\text{l})$ であり、現在知られているフェニルアラニンの定量法の中では最も高感度な方法であった。また、この方法は数 μl の血清やろ紙血液中のフェニルアラニンの定量にも応用可能であるので¹⁸⁾、フェニルケトン尿症の確定分析法としての利用も期待される。

謝 辞

本研究に際し、尿を提供下さった北海道大学大学院地球科学研究科の教官および学生諸氏、並びにアミノ酸分析を担当して頂いた北海道大学機器分析センターの松本弘子氏に感謝致します。

文 献

- 1) R. Guthrie and A. Susi: A simple phenylalanine method for detecting phenylketonuria in large populations of newborn infants. *Pediatrics*, **32**, 338-343, 1963.
- 2) H. Koyama: A simple and rapid enzymatic determination of L-phenylalanine with a novel L-phenylalanine oxidase (deaminating and decarboxylating) from *Pseudomonas* sp. P-501. *Clin. Chim. Acta*, **136**, 131-136, 1984.
- 3) U. Wendel, M. Koppelkamm and W. Hummel: Enzymatic phenylalanine estimation for the management of patients with phenylketonuria. *Clin. Chim. Acta*, **201**, 95-98, 1991.
- 4) S. Girotti, E. Ferri, S. Ghini, R. Budini, G. Carrea, R. Bovara, S. Piazzzi, R. Merighi and A. Roda: Bioluminescent flow sensor for L-phenylalanine determination in serum. *Talanta*, **40**, 425-430, 1993.
- 5) R. Shen and C. W. Abell: Phenylketonuria; A new method for the simultaneous determination of plasma phenylalanine and tyrosine. *Science*, **197**, 665-667, 1977.
- 6) K. Peterson, R. Slover, S. Gass, W. K. Seltzer, L. L. McCabe and E. R. B. McCabe: Blood phenylalanine estimation for the patients with phenylketonuria using portable device. *Biochem. Medicine and Metabolic Biology*, **39**, 98-104, 1988.
- 7) L. M. Neckers, L. E. Delisi and R. J. Wyatt: Liquid chromatographic quantification of plasma phenylalanine, tyrosine, and tryptophan. *Clin. Chem.*, **27**, 146-148, 1980.
- 8) P. S. Pitance and S. S. Barbette: Determination of aromatic and neutral amino acids by HPLC in blood specimens collected on filter paper. *Clin. Chim. Acta*, **166**, 91-97, 1987.
- 9) J. L. Rudy, J. C. Rutledge and S. L. Lewis: Phenylalanine and tyrosine in serum and eluates from dried blood spots as determined by reversed-phase liquid chromatography. *Clin. Chem.*, **33**, 1152-1154, 1987.
- 10) M. A. Hilton: Liquid-chromatographic di-

- rect determination of phenylalanine and tyrosine in serum or plasma, with application to patients with phenylketonuria. *Clin. Chem.*, **28**, 1215-1218, 1982.
- 11) Z. Lefeng, Y. Yunlu and Y. Ruiyu : Direct determination of phenylalanine in serum extracts of phenylketonuria patients by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.*, **282**, 333-339, 1983.
 - 12) N. D. Atherton and A. Green : HPLC measurement of phenylalanine in plasma. *Clin. Chem.*, **34**, 2241-2244, 1988.
 - 13) N. D. Atherton : HPLC measurement of phenylalanine by direct injection of plasma onto an internal-surface reversed-phase silica support. *Clin. Chem.*, **35**, 975-978, 1989.
 - 14) K. Ogata, K. Uchiyama, H. Yamada and T. Tochikura : Metabolism of aromatic amino acid in microorganisms ; Part. II . Properties of phenylalanine ammonia-lyase of *Rhodotorula*. *Agr. Biol. Chem.*, **31**, 600-605, 1967.
 - 15) D. S. Hodgins : Yeast phenylalanine ammonia-lyase : Purification, properties, and the identification of catalytically essential dehydroalanine. *J. Biol. Chem.*, **246**, 2977-2985, 1971.
 - 16) 加藤 勲, 佐々木胤則, 芝田和子, 羽賀健一, 三浦敏明, 矢沢洋一, 山本克博 : 基礎生化学実験, 113-114, 三共出版, 1992.
 - 17) 日本生化学会編 : 生化学データブック I, 1602-1603, 東京化学同人, 1979.
 - 18) T. Miura, K. Yasui, K. Hasebe and M. Fukushi : High-performance liquid chromatographic determination of phenylalanine in serum and eluates from dried blood spots. *Clin. Chem.*, submitted.