

HPLC を用いる競走馬生体成分 分析法の開発およびその応用

武蔵野大学大学院薬科学研究科
生命分析化学研究室
プロテオアナリシス客員研究部門

森 美和子

【要旨】

競馬においては、血統が重要視され、潜在的な競走能力に注目が集まっている。さらにその公正性を保ちつつ、競走馬の運動能力を高めることが重要である。そこで、本研究では、競走馬の運動能力に影響しうる血液中の生体成分の定量分析法の確立を試みた。まず、運動能力に影響する禁止薬物の使用（ドーピング）によって変動する高分子量成分であるタンパク質に着目し、その分析法を検討した。さらに運動能力や筋線維タイプに関連すると考えられる低分子量生体成分であるカルノシンに着目し、その定量分析法の確立を試みた。

通常、ドーピング検査においては、尿あるいは血液を検体として、禁止薬物自体、もしくはその代謝物を分析することによって禁止薬物の使用の有無が判定される。しかしながら、近年筋肉増強剤として使用されるアナボリックステロイドなど、ウマの尿や血液中から消失した後でも薬効が残る禁止薬物等、ドーピングに使用される禁止薬物が巧妙化しており、現行の検査法に加えて、薬物使用の証明のための新たな方法が希求されている。そこで我々は、薬物投与で変動する血漿中タンパク質をドーピングのバイオマーカーとして利用できないかと考え、Fluorogenic derivatization-liquid chromatography-tandem mass spectrometry (FD-LC-MS/MS) 法を用いて検討を行った。血漿中にはアルブミンなどの夾雑タンパク質が多量に含まれているため、まず前処理法について検討し、続いて血中から速やかに消失する鎮静剤であるキシラジンをモデル薬物としてサラブレッドに投与し、投与前後のプロテオーム解析を行った。その結果、キシラジンが血中から完全に消失した 48 時間後でも Haptoglobin、Ceruloplasmin、 β -2 glycoprotein1、 α -2 macrogloblin like の 4 種のタンパク質が有意に増加していることが明らかになった。このうち、3 種 (Haptoglobin、Ceruloplasmin、 α -2 macrogloblin like) は炎症等の後に増加することが知られている急性期タンパク質であり、興味深い結果である。この結果によって、プロテオーム解析をドーピング試験法として応用できる可能性が示された。今後、ステロイド等他のさまざまな薬物において測定可能かどうかを検討すると共に、より多数の試料を用いて正常値および異常値の偏差を明らかにすることによって、新規ドーピング検査法開発に繋がるのではないかと考えられる。さらに、我々は血漿中の低分子量成分であるカルノシン (β -alanyl-L-histidine) にも着目し、その分析法を開発した。カルノシンは内在

性の低分子量ジペプチドであり、抗酸化作用、抗クロスリンク作用、抗糖化作用等の有用な性質を持ち、脊椎動物の骨格筋や神経組織に多く存在することが知られている。また、筋肉中には高濃度で存在し、pH 緩衝作用などにより運動能力向上に関与していると考えられている。開発した簡便な前処理法を用いて、サラブレッド筋肉中のカルノシン量を HPLC にて定量分析した結果、部位によってカルノシン含量が大きく異なることが判明し、筋肉線維タイプとの関連が示唆された。今後、筋肉中のカルノシンを測定することによって、筋線維タイプの推定や運動能力の推定が可能となる可能性が考えられる。この結果は、サラブレッドの効率的な育成方法、効果的な栄養源の確立につながると共に、効果的なトレーニング法やレースの選択法につながる可能性も考えられる。我々にとって競走馬は古くから身近な存在であったにも関わらず、その性質については未だに不明の点が多い。本研究で行った新規ドーピング検査法の開発や競走馬生体成分の解析法は、社会的にも重要であり意義が大きいと考えられる。

参考文献：1) Mori M. *et al.* Journal of Equine Science. 26:141-146 (2015). 2) Mori M. *et al.* Biomedical Research on Trace Elements. 26:147-152 (2015). 3) Mori M. *et al.* Trace Nutrients Research. 32:49-53 (2015).

目次

【序】	1
【第 1 章】 プロテオーム解析による新規ドーピングテスト法の開発	
1-1 目的	5
1-2 前処理法の検討	7
1-2-1 OFFGEL 法の検討	7
1-2-2 NATIVEN 法の検討	9
1-2-3 ProMax アルブミン除去キット法の検討	23
1-3 FD-LC-MS/MS 法の条件検討	28
1-3-1 FD 化の条件検討および検量線の作成	29
1-3-2 HPLC の条件検討	30
1-4 キシラジン投与サラブレッド血漿のプロテオーム解析	36
1-4-1 キシラジンの血中濃度測定	37
1-4-2 キシラジン投与前後における血漿タンパク質の変動解析	39
1-5 小括	45
【第 2 章】 カルノシン濃度測定	
2-1 目的	48
2-2 カルノシン定量法の開発	52
2-2-1 分離カラムの検討	52
2-2-2 前処理法の検討	54
2-3 サラブレッド組織中カルノシン濃度の定量分析	57
2-4 小括	61
【結論】	62
【試薬・装置】	64
【参考文献】	68
【謝辞】	77

略号：

Ans : Anserine

BSA : Bovine serum albumin

β -LG : β -lactoglobulin

Car : Carnosine

Cys : Cysteine

CHAPS : 3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]propanesulfonic acid

DAABD-Cl : 7-Chloro-*N*-[2-(dimethylamino)ethyl]-2,1,3-benzoxadiazole-4-sulfonamide

2D-PAGE : Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis

FD : Fluorogenic derivatization

FD-LC-MS/MS : Fluorogenic derivatization-liquid chromatography-tandem mass spectrometry

HPLC : High performance liquid chromatography

IPG : Immobilized pH-gradient gel

MS : Mass spectrometry

MS/MS : Tandem mass spectrometry

Na₂EDTA : Ethylenediamine-*N,N,N',N'*-tetraacetic acid disodium salt

SDS : Sodium dodecyl sulfate

SDS-PAGE : Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis

TCEP : Tris(2-carboxyethyl)phosphine hydrochloride

TEMED : *N,N,N',N'*-Tetramethylethylenediamine

TFA : Trifluoroacetic acid

Tris : 2-Amino-2-hydroxymethyl-1,3-propanediol

【序】

競走馬（サラブレッド）を用いる競馬の歴史は古く、昔から国民に親しまれている。競馬においては、血統が重要視され、潜在的な競走能力に注目が集まっている。さらにその公正性を保ちつつ、競走馬の運動能力を高めることが重要である。そこで、本研究では、競走馬の運動能力に影響しうる血液中の生体成分の定量分析法の確立を試みた。まず、運動能力に影響する禁止薬物の使用（ドーピング）によって変動する高分子量成分であるタンパク質に着目し、その分析法を検討した。さらに運動能力や筋線維タイプに関連すると考えられる低分子量生体成分であるカルノシンに着目し、その定量分析法の確立を試みた。

競馬の公正性を保つために、競馬法においていくつかの薬物が“禁止薬物”すなわち「その馬の競走能力を一時的に高め又は減ずる薬品又は薬剤」として定義され、その使用が禁止されている。競走馬の薬物検査と検査法（ドーピング検査法）の開発・改良に関する研究を行うため、（公財）競走馬理化学研究所が 1965 年に設立されている。1965 年当時の対象薬物は 8 薬物であったが、現在では 122 の薬物が指定されており、その数は年々増加している。

通常、競走馬のドーピング検査においては、尿あるいは血液を検体として禁止薬物自体、もしくはその代謝物を HPLC 等の方法で分析することによって禁止薬物の使用の有無が判定される¹⁾。筆者は、（公財）競走馬理化学研究所において禁止薬物の分析に携わり、これまで $\beta 2$ 受容体刺激薬であるクレンプテロールや $\beta 2$ 受容体遮断薬であるプロプラノロールなどの薬物投与後の血中および尿中の定量分析を行ってきた²⁾。しかしながら、筋肉増強剤として使用されるアナボリックステロイドなど^{3,4)}、ウマの尿や血液中から消失した後でも薬効が残る禁止薬物の使用が近年問題となってきた⁵⁾。さらに最近では、薬物の分子構造を一部変更したデザイナードラッグ^{4,6)}や、もともとウマに存在する物質やその関連化合物である糖タンパク質ホルモン^{6,7)}等、ドーピングに使用される禁止薬物が巧妙化しており、現行の検査法に加えて、薬物使用の証明のための新たな方法が希求されている^{5,8)}。血液は侵襲性が小さく、多種の高分子量の生体成分であるタンパク質を含有するため、血漿を試料としたプロテオーム解析（血漿プロテオミクス）はドーピング検査に有効であると考えられる。しかしながら、Fig. 1 に示すように、血漿成分中のタンパク質は、アルブミンや IgG などが

90% 以上を占め、ドーピング検査の対象となり得るバイオマーカータンパク質（漏洩タンパク質や分泌タンパク質）の量は約 1.5% と非常に少ないことが知られている⁹⁾。従って、定量的プロテオミクスのためには、アルブミン等を除去し、バイオマーカー候補タンパク質のみを濃縮する前処理法の開発が必要と考えられる。

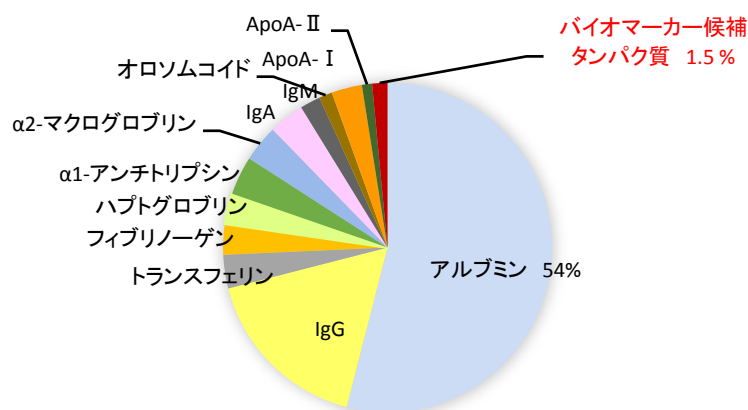


Fig.1 血漿中タンパク質の組成 (文献9を基に作成)

一方、従来から、潜在的に存在する競走能力については血統から判断していたが、これとは別に競走馬の競走能力を推測することを目的として、筋肉量を調整するミオスタチン遺伝子解析 (エクイノム・スピード遺伝子検査) 等、競走馬の競走能力や運動機能に関する分子遺伝学的研究をこれまで行っている。ミオスタチン遺伝子は、競走馬の距離適正に大きく影響するため、その遺伝子型を調べることによって、個々の競走馬が距離適性に応じた調教やレースを受けることが可能となる^{10,11)}。これに加えて競走馬における生体成分によって、競走能力並びに運動能力を判断することはできないかと考えた。そこで筋肉中に mM レベルで含有され、運動能力に大きな影響力があると考えられる、カルノシンについて着目し、それを迅速簡便に測定する分析法を検討した。カルノシンは抗酸化作用、抗糖化作用等の有用な作用を持ち、筋肉中では、運動中に増加する乳酸による pH 低下を防ぎ、運動機能増進に寄与すると考えられている¹²⁻¹⁶⁾。実際、カルノシン自体あるいはその構成成分である β アラニンを実験動物の食餌として投与することによって、筋肉中のカルノシン濃度が増強し、抗疲労効果が見ら

れることなどが報告されている¹⁷⁾。また、筋肉中のカルノシン濃度を比較した結果、運動によって濃度が増加することや^{16,18)}、アスリートにおいては筋肉中カルノシン濃度が高いことから¹⁹⁾、カルノシン含有製剤がアスリートに対する運動能力向上のサプリメントとして用いられている。さらに、筋肉中のカルノシンの量は筋線維タイプと相関することも報告されている²⁰⁻²⁵⁾。従って、サラブレッド筋肉中のカルノシン濃度を解析することによって、その運動能力を推定できる可能性が考えられる。

本研究では、競走馬における運動能力に関連する生体成分の分析法を確立するため、第 1 章では、血漿プロテオミクスを用いて競馬の公正性を保つ新たなドーピング検査法開発を、第 2 章では、競走馬の運動能力に繋がるカルノシンの HPLC を用いる簡便な定量法および筋肉組織の前処理法を開発するとともに、開発した方法を用いて様々な部位中のカルノシン濃度の定量分析を検討した。

【第 1 章】

プロテオーム解析による新規ドーピング

テスト法の開発

1-1 目的

プロテオーム解析においては、通常、Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis (2D-PAGE) 法²⁶⁻²⁹⁾およびショットガン法³⁰⁻³³⁾の二つが用いられることが多い。しかしながら、タンパク質そのものを分離し、ゲル内でトリプシン消化後得られたペプチド断片を MS/MS で同定する 2D-PAGE 法は、高分解能であるが、操作が煩雑で熟練を要する。また、その感度と再現性を向上させるため、CyDye などの蛍光標識試薬が開発されているが^{34,35)}、標識試薬の溶解度が低くタンパク質のシステイン残基の一部にしか反応しないという制限がある。一方、試料中のタンパク質を酵素加水分解し、得られたペプチド混合物を一次元もしくは二次元 HPLC で分離し、MS/MS でタンパク質を同定するショットガン法では³⁰⁻³³⁾、一つのタンパク質から多数のペプチド断片が生じるため、試料中に多く含まれるタンパク質や分子量の大きなタンパク質が優先的に同定されてしまう。また、翻訳後修飾の分析が不可能であり、定量的解析が困難である。そこで筆者は、当研究室で開発したプロテオーム解析法である Fluorogenic derivatization-liquid chromatography-tandem mass spectrometry (FD-LC-MS/MS) 法が新規ドーピング検査法へ応用することが出来ないかと考え、検討を行った。本法は、発蛍光試薬 7-Chloro-*N*-[2(dimethylamino)ethyl]-2,1,3-benzoxadiazole-4-sulfonamide (DAABD-Cl) を用いてタンパク質の Cys 残基を蛍光誘導体化し、誘導体化したタンパク質を第一段階 HPLC で分離検出した後、目的とするタンパク質のみを分取し、これを酵素加水分解して、第二段階 nano HPLC-MS/MS を用いてさらに詳細に分離し、ペプチド組成を同定する手法である³⁶⁾。本法は、DAABD-Cl 自身が無蛍光であり、目的化合物と反応して生じた生成物のみが蛍光を発するためバックグラウンドノイズが小さく高感度化が可能という利点を持つ。また、誘導体化したタンパク質そのものを HPLC で分離検出するため、再現性良く定量が可能であり、異性体や翻訳後修飾も識別が可能である。本法は既に、乳ガン細胞などのプロテオミクス解析に応用されている³⁶⁻⁴⁰⁾。

血液は侵襲性が小さく、多種のタンパク質を含有するため、血漿を試料としたプロテオーム解析(血漿プロテオミクス)はドーピング検査に有効であると考えられる。しかしながら、血漿成分中のタンパク質は、アルブミンや IgG などが

90% 以上を占め、ドーピング検査の対象となり得るバイオマーカータンパク質（漏洩タンパク質や分泌タンパク質）の量は約 1.5% と非常に少ないことが知られている⁹⁾。従って、定量的プロテオミクスのためには、アルブミン等を除去し、バイオマーカー候補タンパク質のみを濃縮する前処理法の開発が必要である。このような前処理法として、一般にアルブミンもしくはアルブミンを含む数種類の血漿中タンパク質の抗体が充填されたイムノアフィニティカラムが使用されている^{9,41-45)}。しかしながら Ichibangase らは、充填剤やカラム壁面などに対するタンパク質の非特異的吸着が生じることを報告している⁴⁶⁾。これら非特異的吸着の問題は近年、別の研究者からも報告されており⁴⁷⁾、定量的プロテオーム解析を行う際には大きな問題となる。そこで、本研究ではタンパク質を分画する前処理法として、OFFGEL 法（アジレント・テクノロジー（株））、NATIVEN 法（アトー（株））、ProMax アルブミン除去キット（Polyscience Inc）を用いて条件検討を行った。

次に、確立した前処理法を用いて、薬物投与前後でのウマ血漿タンパク質の変動を FD-LC-MS/MS 法を用いて解析し、血漿プロテオーム解析がドーピング検査法として応用可能かどうかについて検討した。

先行研究で、Barton らは、ドーピングのバイオマーカーを同定する目的で、HPLC/MS/MS 法を用いて長期作用型薬物であるテストステロンの投与によって、変動する血漿中タンパク質のプロテオーム解析を行った。その結果、ウマ血漿中で検出された 72 種のタンパク質のうち、2 つのタンパク質（clusterin および leucine-rich alpha-2-glycoprotein）が、テストステロンによって誘導されたことを報告している⁸⁾。本研究では、モデル薬物として、ウマの鎮静および麻酔に用いられ、代謝・排泄が早く^{48,49)}、血中タンパク質レベルに変動を与える可能性のある^{50,51)}キシラジンを選択して検討を行った。

1-2 前処理法の検討

1-2-1 OFFGEL 法の検討

OFFGEL 法 (アジレント・テクノロジー (株)) は、等電点電気泳動法の原理に基づいて、タンパク質の持つ等電点の違いによって分離を行う方法である⁵²⁾。Fig. 1-1 に示すように、固定化された Immobilized pH-gradient gel (IPG) ゲルにタンパク質試料溶液を添加して通電すると、タンパク質がそれぞれの等電点に対応したウェルに移動する。移動したタンパク質は各ウェルの溶液に受動拡散するため、分離したタンパク質を溶液として簡便に回収することが可能である。本研究ではアルブミン (pI=4.9) 除去を目的とすることから、IPG ゲルは pH 3 - 10 (12 分画) を使用することにした。まずは試料として BSA 標準溶液および着色済み分子量マーカーを用いて分画を行い、各ウェルのタンパク質定量を行った。

【実験】

操作は、Agilent 3100 OFFGEL Fractionator (アジレント・テクノロジー (株)) の取扱説明書に従って行った。Fig.1-1 にその概要を示す。まず、トレーに Immobilized pH-gradient gel (IPG) ゲル (pH 3 - 10) を置き、フレームをセット後、各ウェルに付属の IPG Strip Rehydration Solution 40 μ L を加え、IPG ゲルを 15 分間膨潤させる (Fig.1-1 ①)。その後、各ウェルに 150 μ L の試料 (着色済み分子量マーカーおよび 14 mg/mL BSA 標準溶液) を入れ、電流を流して分画を行う (②)。その結果、③のように各ウェル中に分画されたタンパク質を回収する。タンパク質濃度は、Bradford 法を用いて定量した。

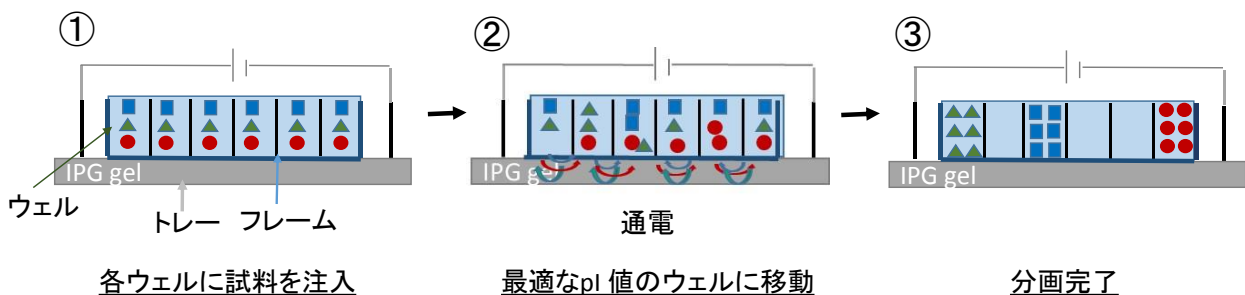


Fig.1-1. OFFGEL 法による分離メカニズム

【結果】

はじめに着色済み分子量マーカー（DynaMarker®、Protein Multicolor Stable, BioDynamics Laboratory 社）を用いて泳動を行ったが、18 hr を過ぎても泳動が完了せず、タンパク質を分離することは出来なかった。次に、14 mg/mL BSA 標準溶液（150 μ L）を加えて泳動し、BSA の pI 値である 4.9 付近のウェルの溶液を回収し、タンパク定量したが、BSA はほとんど回収できていないと判明した。他の全ウェルについてもタンパク質濃度を測定したが、BSA は検出されなかった。Agilent 社によると BSA の回収率は 40% であるが、本実験ではこれを再現することができなかったため、トレーやフレームなどの器具に非特異的に吸着し、回収できなかった可能性が考えられた。また、この方法では分画には 18 hr 以上の長時間が必要という欠点もあるため、これ以上の検討を行わなかった。

1-2-2 NATIVEN 法の検討

NATIVEN 法（アトー（株））は ポリアクリルアミドゲル電気泳動の原理に基づいてタンパク質を分子量に従って分画する。Fig.1-2 に示すように、円筒状の上部ゲルにおいてタンパク質を濃縮、分離する。分離されたタンパク質は、回収部溶液中に溶出され、圧縮空気によって移送される。本法は多くのタンパク質を付加することが可能であり、空気圧縮によって分取分画を捕集するため、分画成分が希釈されないという利点を持つ。本法はこれまで単一のタンパク質の精製のために用いられているが⁵³⁻⁵⁵、血漿中のアルブミン除去の前処理法として使用された報告はない。

装置は、上部ゲル、下部ゲルおよび回収部の 3 つの部分から構成されており、上部ゲルは試料を濃縮するための濃縮ゲルと試料を分離するための分離ゲルから構成されている。本手法での分離操作手順を Fig.1-3 に示す。

まず、試料を濃縮ゲル上に加え、通電して電気泳動を行う(①)。泳動通電時間 (EP Time) の後通電を停止する(②)。分離されたタンパク質は、順次回収部に送られる(②)。回収部に空気を送り込むことによって分離されたタンパク質が回収される(③)。その後、回収部に回収液を再充填し、通電を再開する(④)。

また、上部ゲルにはストレート管とロート管があり (Fig.1-4)、通常ストレート管を用いるが、ロート管を用いることによって、より大量の試料を負荷することも可能である。そこでまず、ストレート管を用いて条件検討を行った。試料として、着色済み分子量マーカータンパク質を用いて、泳動条件の予備的な検討を行い、サイズ排除クロマトグラフィー等を用いてタンパク質濃度を定量することによって、回収率の検討を行った。次に、ロート管を用いてより大量のタンパク質の負荷実験を行った。

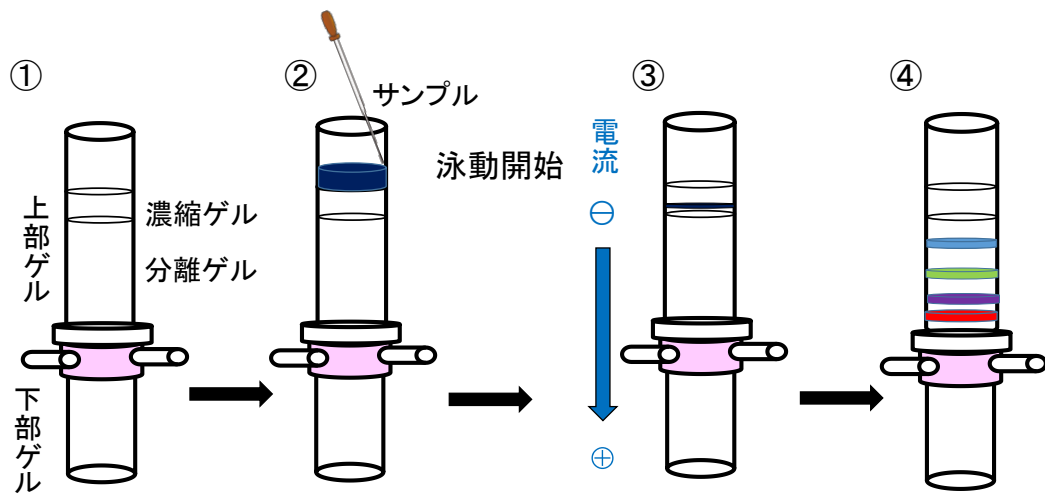


Fig.1-2. NATIVEN の装置図

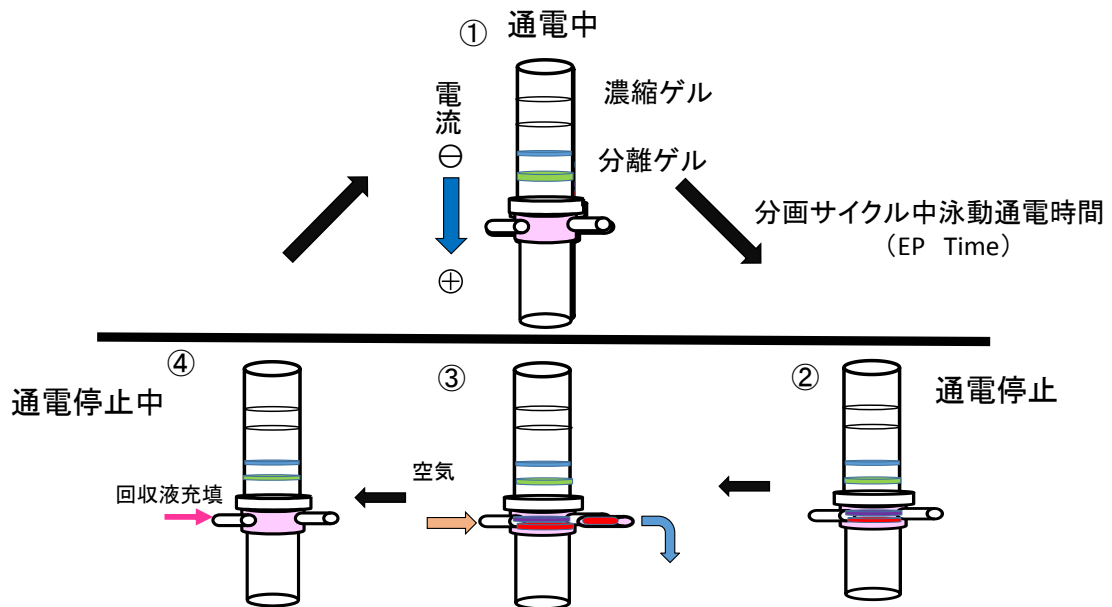


Fig.1-3. NATIVEN による分離操作手順

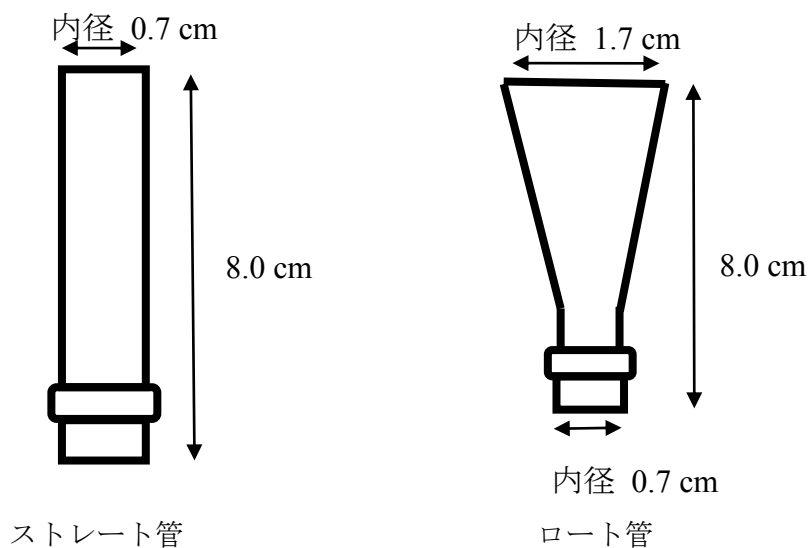


Fig.1-4. 上部ゲルの構造

1-2-2-1 ストレート管を用いる条件検討

【実験】

ストレート管内に濃縮ゲルおよび分離ゲルを作製し、着色済み分子量マーカータンパク質混合物（DynaMarker®、Protein Multicolor Stable、BioDynamics Laboratory 社）を負荷して泳動、分画を行った。DynaMarker®の組成を Table1-1 に示す。簡便のため、着色成分の溶出を目視することによって泳動条件（電流値、ゲル長、ゲル濃度、EP Time など）の最適化を行った。作製したゲルの組成を Table1-2 に示す。

バイオマーカーとなり得るタンパク質には低分子量タンパク質が多い。また、Cys 残基と反応する FD-LC-MS/MS 法では多くの Cys 残基を含むアルブミンが妨害成分となる。そこで、本実験では分子量マーカータンパク質混合物中で BSA よりも低分子量タンパク質である 73kDa 以下のタンパク質（ovalbumin、carbonic anhydrase、trypsin inhibitor、lysozyme）が BSA と効率よく分離されるための条件検討を行った。さらに、その後の蛍光誘導体化においてはこれらの成分の濃度がなるべく高くなるように捕集することが必要なため、これらの目的成

分の分画数 (fraction number) ができるべく少なくなるように条件の最適化を行った。

次に、最適化した条件を用いて、マウス (C57BL/6) 血漿試料 20 μ L を分画し、タンパク質の回収濃度を測定した。回収後のタンパク質濃度は Bradford 法で定量した。

Table1-1. DynaMarker®の組成

Protein Name	MW	Color	
Myosin	230,000	Red	
β -galactosidase	140,000	Blue	
Phosphorylase-b	96,000	Purple	
BSA	73,000	Green	
Ovalbumin	46,000	Blue	} 目的成分 (< 73 kDa)
Carbonic anhydrase	31,000	Red	
Soybean trypsin inhibitor	26,000	Orange	
Lysozyme	18,000	Blue	

Table1-2. ゲルの組成

ゲル濃度	濃縮ゲル	分離ゲル				
	4.5%	4.8%	4.9%	5.0%	6.0%	
アクリルアミド溶液*	0.90	0.96	0.98	1.00	1.20	
1.5 M Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.8)	-	1.50	1.50	1.50	1.50	
0.5 M Tris-HCl 緩衝液 (pH 6.8)	1.50	-	-	-	-	
10% 過硫酸アンモニウム	0.02	0.03	0.03	0.03	0.03	
TEMED	0.01	0.005	0.005	0.005	0.005	
純水	3.60	3.54	3.52	3.50	3.30	

*30%T, 3.33%C

【結果】

(1) 電流値の検討

濃縮ゲルの濃度をメーカー推奨値 4.5%、分離ゲル長を 5.0 cm、EP Time を 5.0 min とし、4.0 mA（メーカー推奨値）および 8.0 mA の電流値を用いて泳動を行った。その結果、目的成分の分画数は電流値に反比例して減少した（Fig.1-5）。目的成分を最小の分画数で捕集するため、ここでは 8.0 mA を最適値とした。

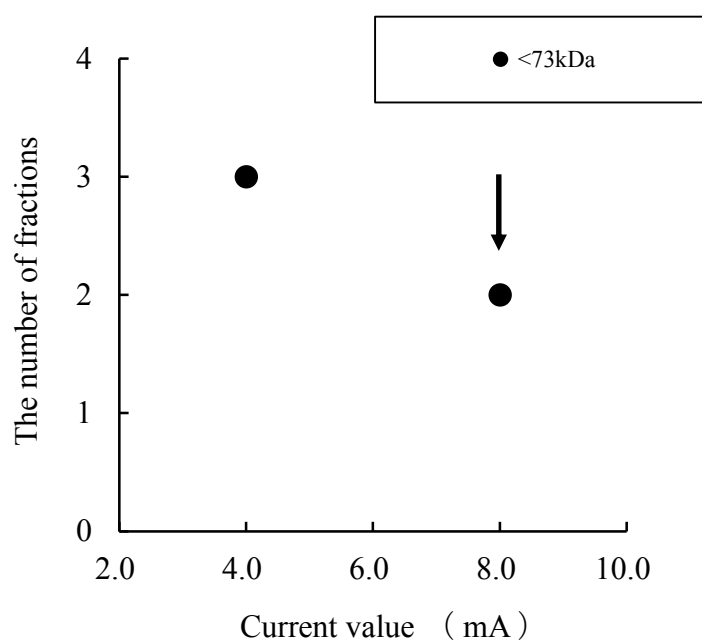


Fig.1-5. 電流値と目的成分の分画数の関係

濃縮ゲル濃度 4.5%、濃縮ゲル長 1.0 cm、分離ゲル濃度 6.0%、
分離ゲル長 5.0 cm、EP Time 5.0 min.

(2) 分離ゲル濃度の検討

分離ゲル長を 5.0 cm と固定し、分離ゲル濃度を 4.8 - 6.0% (メーカー推奨値) に変化させて検討を行った。Fig.1-6 に示すように目的成分の分画数は、5.0% から 6.0% において急激に増加した。ここでは最小分画数を示す 3 つのゲル濃度の中のうち、最も高濃度である 5.0% を最適値とした。

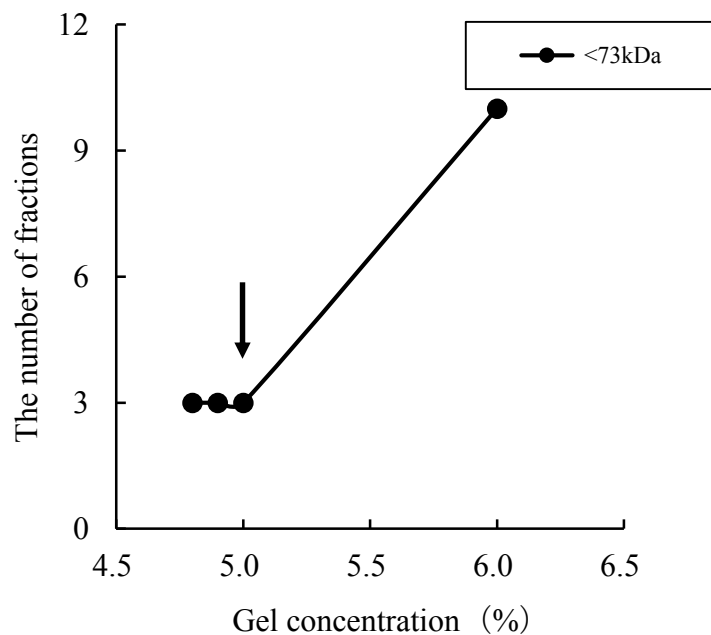


Fig.1-6. 分離ゲル濃度と目的成分の分画数との関係
濃縮ゲル濃度 4.5%、濃縮ゲル長 1.0 cm、分離ゲル長 5.0 cm、
電流値 8.0 mA、EP Time 5.0 min.

(3) NATIVEN 法における回収率測定

これまでに最適化した条件を用いて、マウス (C57BL/6) 血漿試料を分画し、タンパク質の回収濃度を測定した。その結果、得られた目的成分画分のタンパク質濃度は 0.36 mg/mL であり、55 μ g のタンパク質を回収することができた。通常、本血漿中には 33 mg/mL のタンパク質が含まれているため、約 8% のタンパク質が回収されたことになる。しかしながら、従来 FD-LC-MS/MS 法においては、タンパク質濃度 2.0 - 4.0 mg/mL の試料を解析に使用していたため、この前処理法で得られた試料を FD-LC-MS/MS 法に応用するためには濃度が不十分であると考えられる。

1-2-2-2 ロート管を用いる条件検討

ストレート管を用いた検討において、本前処理法でアルブミンよりも分子量の小さいタンパク質を回収可能であることが示されたが、プロテオーム解析のためにはタンパク質濃度が十分ではないため、さらなる濃縮が必要である。そこで、上部ゲル管をストレート管に比べて約 5 倍の試料容量を負荷出来る濃縮用ロート管に変更して条件の再検討を行った。次に、最適化した条件を用いて、タンパク質の回収率を Bradford 法で測定した。

【実験】

ロート管内に濃縮ゲルおよび分離ゲルを作成し、試料を負荷して泳動、分画を行い、再度泳動条件の最適化を行った。また、試料としてヒト血漿 (Sigma Aldrich) もしくはヒト血漿に DynaMarker®を添加したものをを用いた。作製したゲルの組成を Table1-3 に示す。

続いて、 β -lactoglobulin (β -LG) 標準品の添加血漿を分画後、サイズ排除 HPLC を用いて定量分析することにより、 β -LG の回収率を測定した。また、DynaMarker®中の ovalbumin を分取し、その吸光度 (λ_{\max} : 485 nm) を測定することによって回収率を計算した。

Table1-3. ゲルの組成

ゲル濃度	濃縮ゲル				分離ゲル
	3.0%	3.5%	4.0%	4.5%	5.0%
アクリルアミド溶液*	0.60	0.70	0.80	0.90	1.00
1.5 M Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.8)	-	-	-	-	1.50
0.5 M Tris-HCl 緩衝液 (pH 6.8)	1.50	1.50	1.50	1.50	-
10% 過硫酸アンモニウム	0.02	0.02	0.02	0.02	0.03
TEMED	0.01	0.01	0.01	0.01	0.005
純水	3.90	3.80	3.70	3.60	3.50

*30%T, 3.33%C

【結果】

(1) 濃縮ゲル濃度の検討

濃縮ゲル濃度をゲルが固まる最小濃度の 3.0% から メーカー推奨値である 4.5% の範囲で変化させて検討を行った。DynaMarker®のマーカートンパク質中の色素バンドの幅を測定して比較を行った結果、Fig. 1-7 に示すように 3.0% で着色の幅が最も狭く、4.0 および 4.5% では着色の幅が増加し、濃縮ゲル内での拡散が大きいことが判明したため、濃度 3.0% を最適値とした。

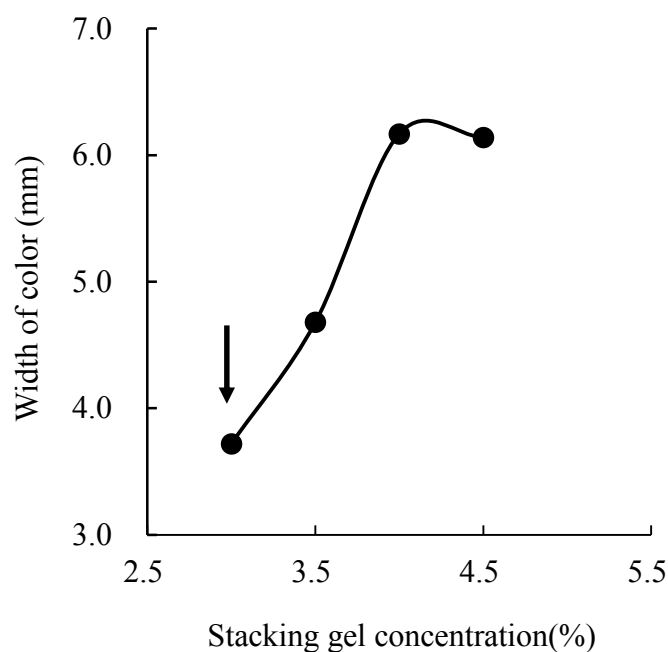


Fig.1-7. 濃縮ゲル濃度と分離能の関係

横軸に濃縮ゲル濃度、縦軸に濃縮された色素のバンド幅を示す
濃縮ゲル長 5.0 cm、電流値 8.0 mA.

(2) 分離ゲル長の検討

分離ゲル濃度を一定 (5.0%) にし、分離ゲル長を 1.5、2.5 および 5.0 cm に変化させて、分離幅を検討した。分離幅として、目的成分タンパク質画分のバンドと BSA 画分のバンドとの間の距離を測定した。またロート管への変更により、負荷する試料量が増加したため、十分に濃縮する目的で、濃縮ゲル長を 3.5 cm とした。

その結果、Fig.1-8 に示すようにゲル長が長くなるほど、分離幅は大きくなることが判明した。分離幅が小さいほど分画数は少なくなるため、ここでは最小値である 1.5 cm を最適値とした。

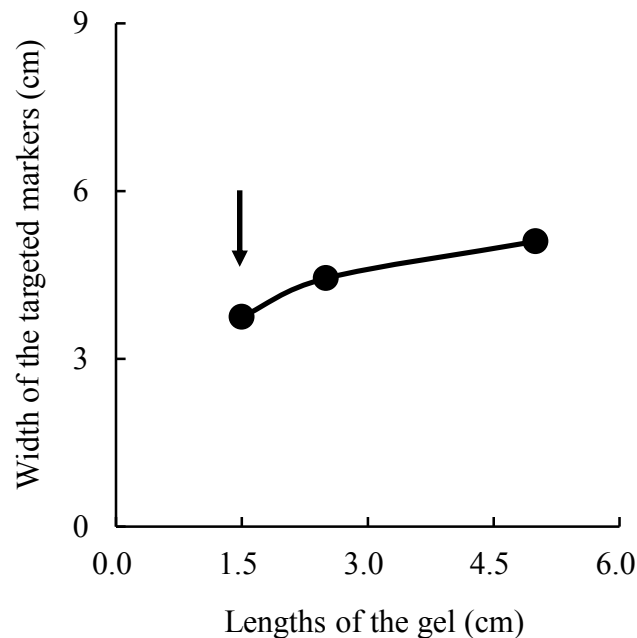


Fig.1-8. 分離ゲル長の影響

横軸に分離ゲル長、縦軸に目的成分タンパク質画分のバンドと BSA 画分のバンドとの間の距離を示す

濃縮ゲル濃度 3.0%、濃縮ゲル長 3.5 cm、分離ゲル濃度 5.0%、
電流値 8.0 mA、EP Time 5.0 min.

(3) EP Time の検討

次に、EP Time を 2.0 min - 10 min（推奨値 5.0 min）の間で変化させ、その影響について検討した。目的成分の回収開始から、BSA が回収部に溶出するまでの分画数で評価した。10 min 以上泳動するとタンパク質が回収部から回収される前に下部ゲルへ移行したため、2.0 - 10 min で検討を行った。Fig.1-9 に示すように 2.0 min では 4 分画、4.0 min では 2 分画となった。また 5.0 および 10 min では分画数が 1 となった。ここでは 1 分画となる最短時間である 5.0 min を選択した。

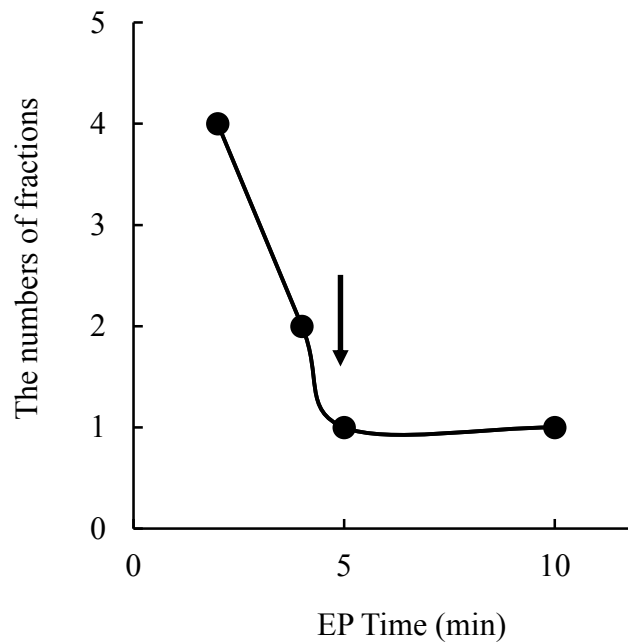


Fig.1-9. EP Time と分画数の関係

濃縮ゲル濃度 3.0%、濃縮ゲル長 3.5 cm、分離ゲル長 1.5 cm、
分離ゲル濃度 5.0%、電流値 8.0 mA.

(4) 電流値の検討

先述したように、ストレート管では 8.0 mA を電流値の最適値としたが、メーカーの取扱い説明書によれば、ロート管ではストレート管よりも高電流での使用が可能であるため、電流値についても再検討を行った。

成分の溶出開始時間を測定し評価した結果、Fig.1-10 に示すように電流値が上昇するにつれて目的成分の溶出開始時間は早くなった。しかしながら、電流値 10 mA および 15 mA ではバンド形状が変形したため、8.0 mA を最適値とした。

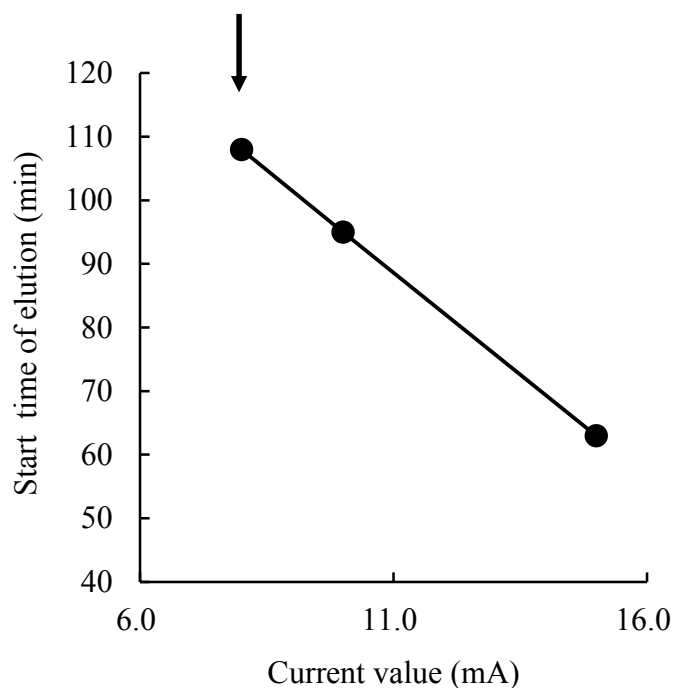


Fig.1-10. 電流値と溶出開始時間の関係

濃縮ゲル濃度 3.0%、濃縮ゲル長 3.5 cm、分離ゲル濃度 5.0%、
分離ゲル長 1.5 cm.

(5) NATIVEN 法における回収率測定

これまでに決定した分離最適条件を用いて、低分子量タンパク質 (β -LG および ovalbumin) の回収率を、サイズ排除 HPLC および分光光度計を用いて測定した。

a) サイズ排除 HPLC による β -LG の回収率測定

【実験】

ヒト血漿を NATIVEN で分画し得られた回収液に β -LG (分子量 18.4kDa) 標準品を添加後、サイズ排除 HPLC により分離・定量し、検量線を作成する。次にヒト血漿に β -LG を添加後、NATIVEN 法を用いて分画し、目的成分を分取、同様に分取分画をサイズ排除 HPLC に注入する。得られたピーク高さと先に作成した検量線より分取分画中の β -LG の濃度を算出し、回収率を算出する。サイズ排除 HPLC の条件は、Fig.1-11 に記す。

【結果】

サイズ排除 HPLC のクロマトグラムを Fig.1-11 に示す。A はヒト血漿、B は前処理後のヒト血漿、C は前処理後のヒト血漿に β -LG を 10 μ g/mL 添加したものである。結果、 β -LG 回収率は平均 60.2 \pm 0.50% (mean \pm S.E.M., n = 3) であった。

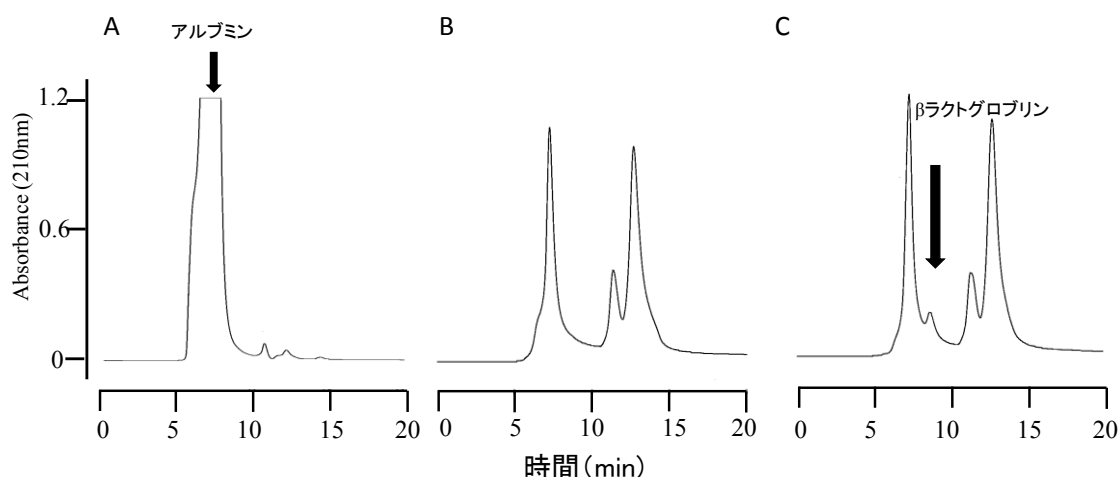


Fig.1-11. ヒト血漿および β -lactoglobulin のサイズ排除 HPLC によるクロマトグラム
 A: ヒト血漿 (10 μ L)、B: 前処理後のヒト血漿、C: 前処理後のヒト血漿に β -lactoglobulin を 10 μ g/mL 添加

カラム: TSK gel SW2000 (東ソー (株)) 350 \times 4.6 mm、

溶離液: 0.1M リン酸緩衝液 (pH 7.0) 0.3M NaCl、流速: 0.35 mL/min、

検出: UV 210 nm

b) 分光光度計による ovalbumin の回収率測定

【実験】

DynaMarker®を、最適化した NATIVEN 法分画条件で分離し、ovalbumin 分画のみを分取する (青色色素によりラベル)。次に得られた回収液を 2 つに分け、一方を再び NATIVEN 法の最適化条件で分画し、回収液を得る。残りの一方を標準溶液として、両者の吸光度 (λ_{\max} : 485 nm) から回収率を算出する。

【結果】

2 回の繰り返し実験を行った結果、その回収率は 48.5% および 53.9% であった。従って、これらの結果から、本法を用いる前処理法は定量的なプロテオーム解析に応用することは困難であると判定した。

1-2-3 ProMax アルブミン除去キット法の検討

ProMax アルブミン除去キット法は、磁気ビーズにアルブミン以外のタンパク質を吸着させ (Fig.1-12 ①)、アルブミンを洗浄除去した後 (②)、吸着したタンパク質をビーズから回収する (③、④)。アルブミン除去後の試料体積が少ないため、濃縮効率が高く、操作が簡便であるという利点を持つ。

そこで、試料としてヒト血漿を使用し、取扱い説明書の操作法を基に、前処理化条件の最適化を行った。続いて、逆相 HPLC-蛍光検出器を用いてアルブミン除去効果の検証を行った。

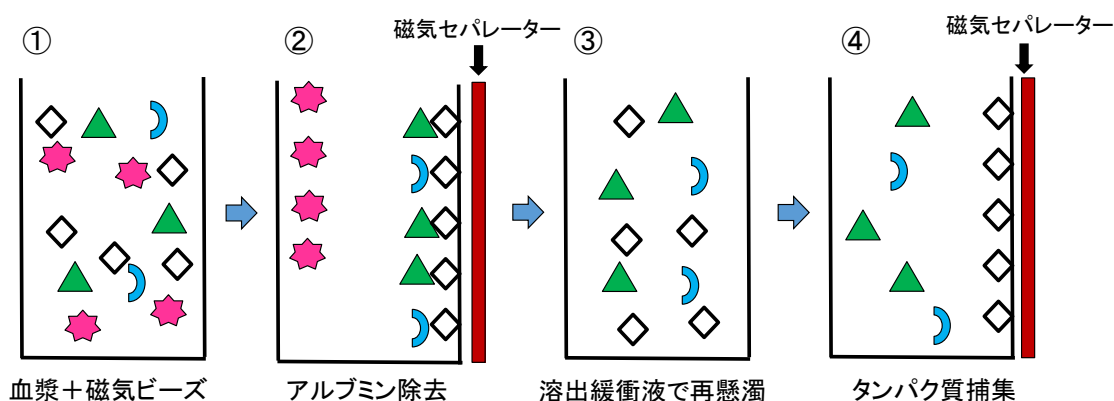


Fig.1-12. ProMax アルブミン除去キット法による分離メカニズム

(1) 条件検討

【実験】

ヒト血漿 (5.0-40 μL) の入ったチューブに 50 μL の Promax 磁気ビーズ粒子を添加し、混合後室温で 10 分間インキュベートした後、磁気粒子を結合させ、アルブミンを含んだ上清を除去する。洗浄用緩衝液 500 μL を用いて磁気ビーズ粒子を 3 回洗浄する。洗浄後、磁気ビーズ粒子に溶出用緩衝液 120 μL を加えて再懸濁し、10 分間室温でインキュベートした後、再度磁気粒子を磁石に結合させ、上清をとり、これをアルブミン除去タンパク質溶液とした。タンパク質濃度を Bradford 法で測定することによって、タンパク質濃度の測定を行った。

【結果】

異なる量のヒト血漿を添加し、回収タンパク質の濃度を測定した結果、Fig. 1-13 に示すように、20 μL 以上の血漿量になるとタンパク質の磁気ビーズへの吸着が飽和する事が判明した。従って、前処理後に使用する試料液量を考慮して、血漿量を 10 μL とし、Promax 磁気ビーズ粒子混合溶液の量を 50 から 2 倍の 100 μL に変更した。

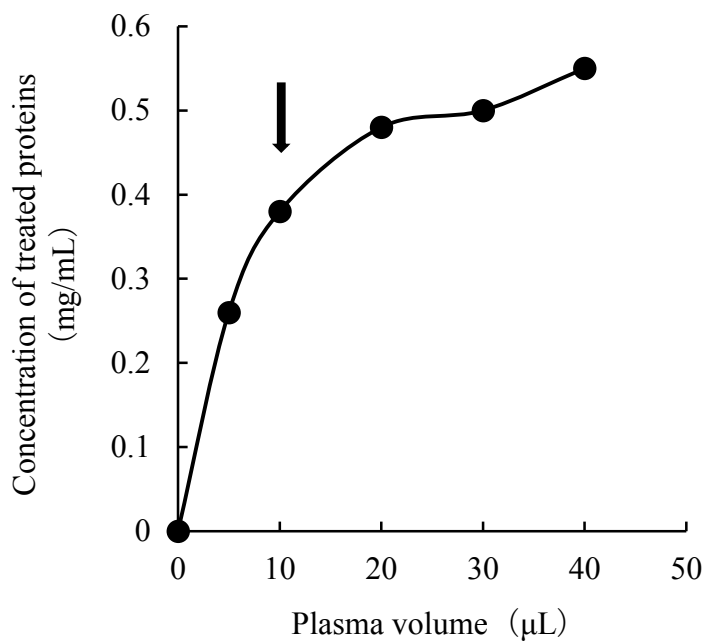


Fig.1-13. 負荷血漿量と回収タンパク質濃度との関連

(2) アルブミン除去効果の検証

磁気ビーズによるアルブミン除去の効果およびその再現性について、前処理後のタンパク質画分を蛍光誘導体化し、逆相 HPLC により検証した。

【実験】

未処理のヒト血漿および本法によって回収された前処理後のタンパク質画分を DAABD-Cl を用いて蛍光誘導体化を行った。

実際には、未処理のヒト血漿 35 μ L (総タンパク質量 1.4 mg) および前処理後の回収タンパク質画分 35 μ L (総タンパク質量 7.0 μ g) に対して、6.0 M 塩酸グアニジン緩衝液 (pH 8.7) で調製した 0.83 mM TCEP、3.3 mM Na₂EDTA、16.6 mM CHAPS、60 μ L を添加後、140 mM DAABD-Cl アセトニトリル溶液を 5.0 μ L 加え、40°C で 10 分間反応させた後、10% Trifluoroacetic acid (TFA) を 3.0 μ L を添加して反応を停止させ、反応溶液を逆相 HPLC に注入した (50 μ L)。

【結果】

逆相 HPLC を用いて誘導体化タンパク質の分離を行った結果、Fig.1-14 に示すように、前処理後のタンパク質画分ではアルブミンの大部分が除去されており、Fig.1-15 に示すように再現性にも問題ないことが判明した。従って、これらの検討結果から、本研究においては、アルブミンを除去するための前処理法として、ProMax アルブミン除去キット法を使用することに決定した。

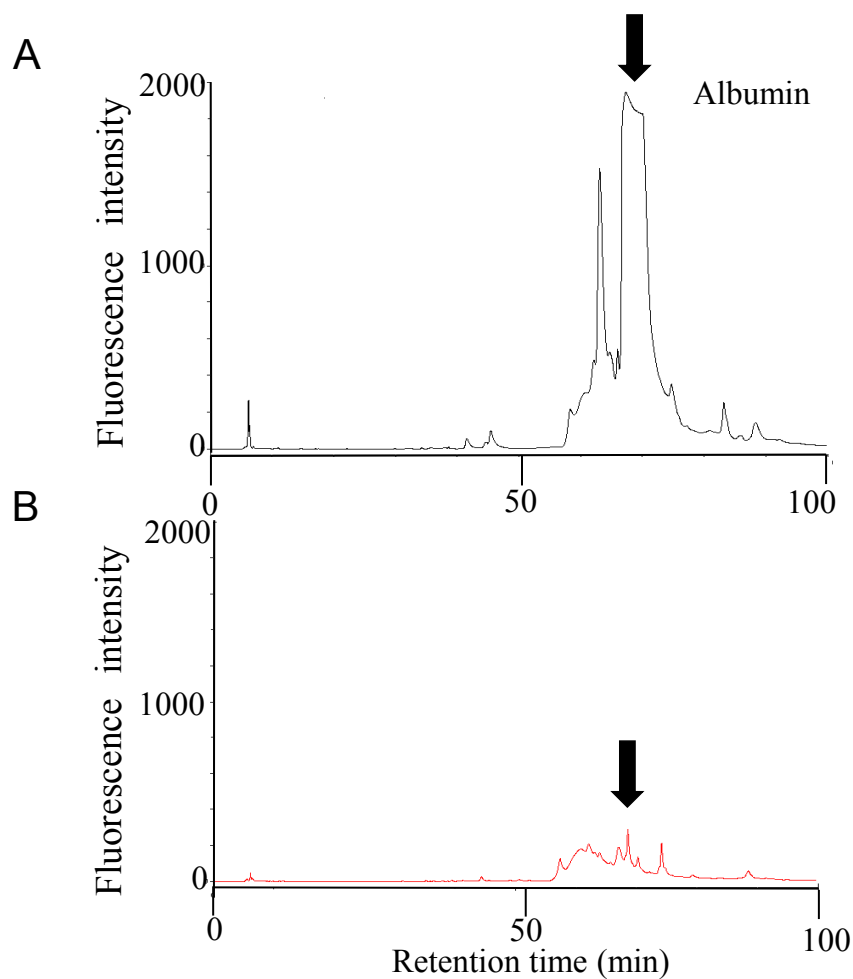


Fig.1-14. アルブミン除去効果の検証

A: 未処理のヒト血漿より得られたクロマトグラム

B: 前処理後のタンパク質画分のクロマトグラム

HPLC 条件:

カラム: Phenomenex Aeris WIDEPORE 3.6 μ m C4 column (250 \times 4.6 mm i.d.)

溶離液: (A) water-acetonitrile-isopropanol-TFA (90 : 9.0 : 1.0 : 0.10, v/v/v)

(B) water-acetonitrile-isopropanol-TFA (30 : 69 : 1.0 : 0.10, v/v/v)

グラジエント条件: 5.0% B held for 5.0 min; to 90% B in 100 min.

流速: 0.40 mL/min、オープン温度: 40°C、検出波長: ex 395 nm em 505 nm

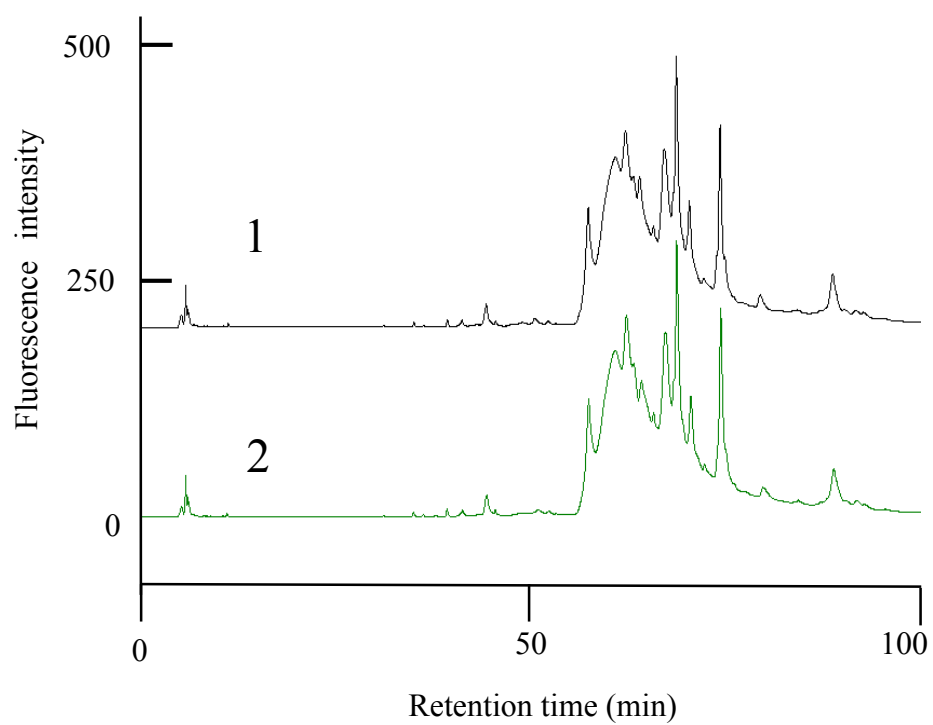


Fig.1-15. 前処理の再現性の確認

1: 第1回目前処理後のタンパク質画分のクロマトグラム

2: 第2回目前処理後のタンパク質画分のクロマトグラム

HPLC 条件は、Fig.1-14 と同じ。

1-3 FD-LC-MS/MS 法の条件検討

FD-LC-MS/MS 法を用いて血漿プロテオーム解析を行うに当たり、蛍光誘導体化反応条件および HPLC 条件の再検討を行った。FD-LC-MS/MS 法においては、発蛍光試薬である DAABD-Cl が Fig.1-16 の反応式に示すようにタンパク質中の Cys 残基と反応して蛍光誘導体化タンパク質を生成する。

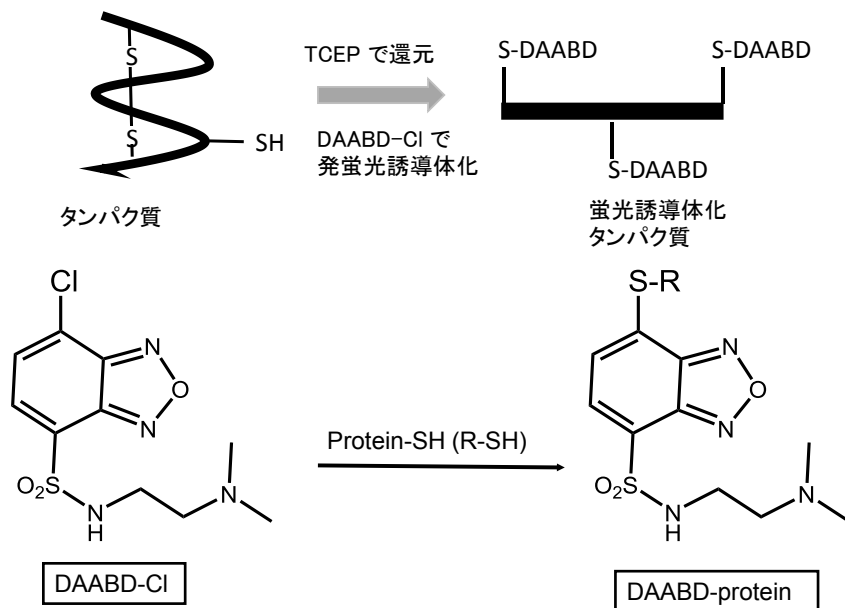


Fig.1-16. FD 化反応

得られた蛍光誘導体を逆相 HPLC (第一段階 HPLC) で分離し、定量解析する。比較解析を行う際には、比較対象を新たに蛍光誘導体化し、得られた蛍光クロマトグラムから、発現タンパク質の種類並びに量を比較する。有意差のあったタンパク質を同定する際には、変動タンパク質を第一段階 HPLC より分取後、引き続いて、第二段階 HPLC (nano HPLC-MS/MS) により行う。これまで DAABD-Cl を用いる蛍光誘導体化については、タンパク質濃度 2.0-4.0 mg/mL の試料を用いて研究を行ってきた。しかしながら、本研究においては前処理後に得られる血漿中タンパク質濃度が低いことが予想されたため、より低い濃度範囲で蛍光誘導体化を行い、その反応性を検討し、検量線の直線性を確認した。また、ヒト血漿を試料として用いて、第一段階逆相 HPLC における分離条件 (カラム、温度、溶離液など) の再検討を行った。

1-3-1 FD 化の条件検討および検量線の作成

【実験】

β -LG および BSA 標準品を用いて、0.01 - 0.20 mg/mL の低濃度範囲において、蛍光誘導体化反応の反応性を検討した。効率的な蛍光誘導体化を行うために、反応溶媒試料 100 μ L 中の試料の比率を 10 μ L から 35 μ L (反応溶媒中 35%) に増加させ、反応因子である EDTA、CHAPS および TCEP の反応中の濃度は変えずに、変性剤であるグアニジン緩衝液 (pH8.7) 量を減らして検討を行った。

反応は、 β -LG および BSA の溶液 35 μ L に対して、6.0 M 塩酸グアニジン緩衝液 (pH8.7) で調製した、0.83 mM TCEP、3.3 mM Na₂EDTA、16.6 mM CHAPS 60 μ L を添加後、140 mM DAABD-Cl アセトニトリル溶液を 5.0 μ L 加え、40°C で 10 分間反応させた後、10% Trifluoroacetic acid (TFA) を 3.0 μ L を添加して反応を停止させ、反応溶液を逆相 HPLC に注入 (35 μ L) し、蛍光強度 (ex 395nm、em 505nm) を測定した。

【結果】

検討の結果、Table1-4 に示すように 0.010 - 0.20 mg/mL の低濃度でも良好な直線性が得られることが確認できた。また、検出限界は 0.70 - 0.85 pmol と良好な感度が得られた。従来の FD 化反応との感度を BSA (0.70 pmol/inj) で比較すると 6.5 倍となり、FD 化反応の効率化が達成された。

Table1-4. β -LG および BSA の検量線

Compound	Calibration Curve	Correlation coefficient (r)	Calibration range (mg/mL)	Detection limit (pmol/inj) (S/N=3)
β -LG	y=628.9x-6.297	0.995	0.010 - 0.20	0.85
BSA	y=620.7x-9.131	0.985	0.010 - 0.20	0.70

1-3-2 HPLC の条件検討

(1) 血漿タンパク質分離のためのカラムの検討

これまで当研究室においては、蛍光誘導体化したタンパク質を分離するにあたって Presto FF C18 カラム (Imtakt 社) を用いる逆相クロマトグラフィーにより分離を行ってきた。このカラムは粒子径 $2\ \mu\text{m}$ のノンポーラス ODS 樹脂を充填剤として用いており、抗体などのタンパク質分離に広く使用されている。しかしながら、本研究においてヒト血漿を試料として分離を行ったところ、Fig.1-17 (a) に示すように良好な分離が得られなかった。そこで、分離能をより向上させるために、分離時間を 100 min から 200 min に延長し (Fig.1-17 (b))、あるいはカラム長を 15 cm から 25 cm に変更して検討を行ったが、大きな変化は見られなかった。

次に、Aeris widepore C4 カラム (Phenomenex 社) を使用して検討を行った。Aeris widepore C4 カラムは、粒子径 $3.6\ \mu\text{m}$ の Core-Shell 充填剤を用いており、タンパク質の浸透性が良好であり、吸着／脱離速度が速いことから良好な分離が得られることが期待される。Fig.1-18 に示すように、Aeris widepore C4 カラムでは Presto C18 カラムよりも分離ピークはシャープであり、得られるピーク数も多かったため、本研究においては Aeris widepore C4 カラムを今後の分析に用いることに決定した。

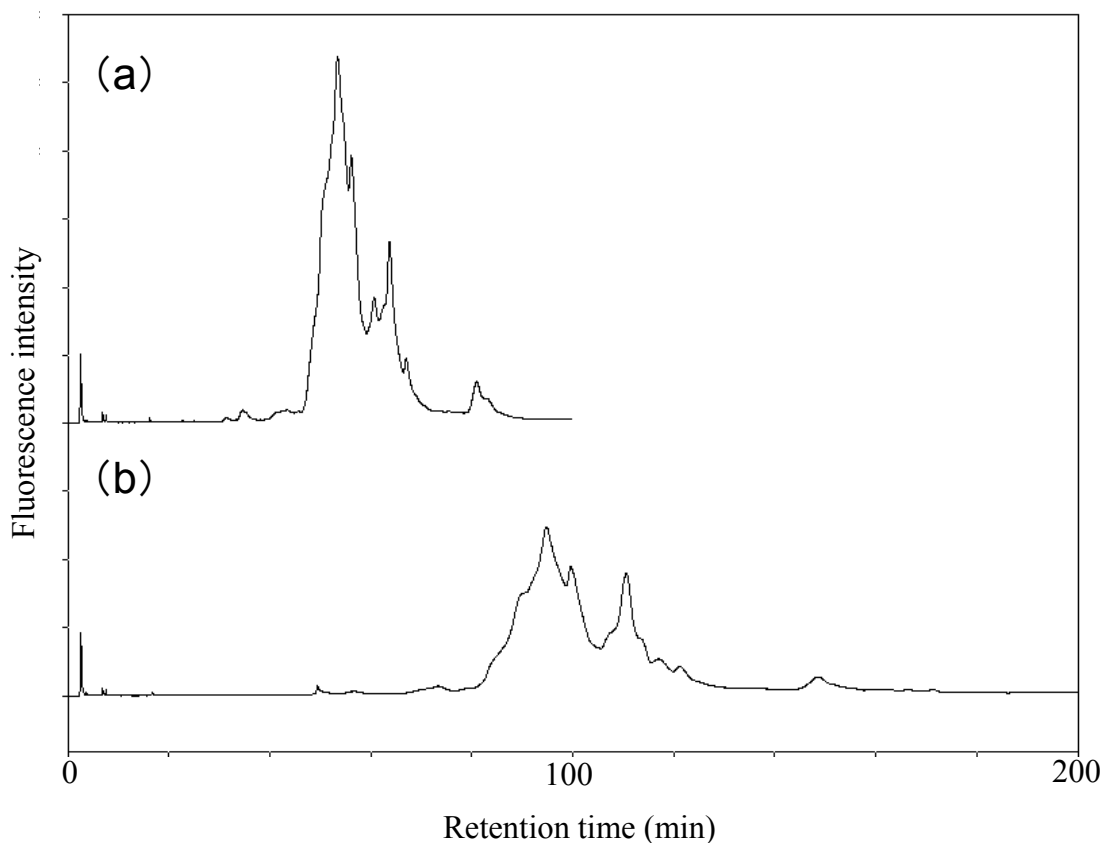


Fig.1-17. 分離に及ぼすグラジエント時間の影響

(a): 溶離液 A から B へのグラジエント時間 100 min

(b): 溶離液 A から B へのグラジエント時間 200 min

試料: ヒト血漿 10 μ L

HPLC 条件:

溶離液: (A) water-acetonitrile-isopropanol-TFA (90 : 9.0 : 1.0 : 0.10, v/v/v)

(B) water-acetonitrile-isopropanol-TFA (30 : 69 : 1.0 : 0.10, v/v/v)

グラジエント条件: (a) 5.0% B held for 5.0 min; to 90% B in 100 min.

(b) 5.0% B held for 5.0 min; to 90% B in 200 min.

流速: 0.40 mL/min、カラム温度: 40°C

検出波長: ex 395 nm em 505 nm

カラム: Presto FF C18 15 cm

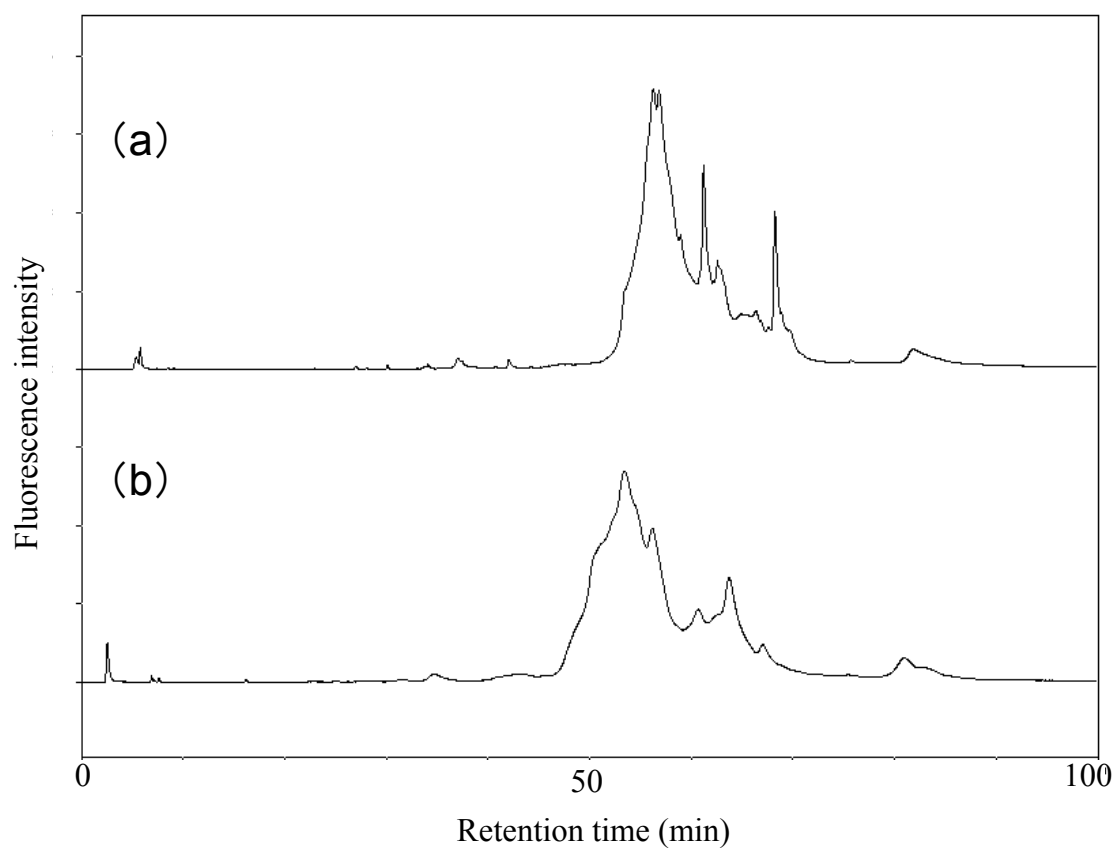


Fig. 1-18. 2種類のカラムの比較

(a): Aeris WIDEPORE 3.6 μm C4 (250 \times 4.6 mm i.d.)

(b): Presto FF C18 2.0 μm (150 \times 4.6 mm i.d.)

試料: ヒト血漿 10 μL

HPLC 条件:

溶離液: (A) water-acetonitrile-isopropanol-TFA (90 : 9.0 : 1.0 : 0.10, v/v/v)

(B) water-acetonitrile-isopropanol-TFA (30 : 69 : 1.0 : 0.10, v/v/v)

グラジエント条件: 5.0% B held for 5.0 min; to 90% B in 100 min.

流速: 0.40 mL/min、オープン温度: 40°C、検出波長: ex 395 nm em 505 nm

(2) 流速の検討

次に、流速を 0.20 - 0.60 mL/min の範囲で変化させて検討した。その結果、Fig.1-19 に示すように、ピークの本数が多く、よりシャープに分離された 0.40 mL/min を最適値とした (Fig.1-19)。

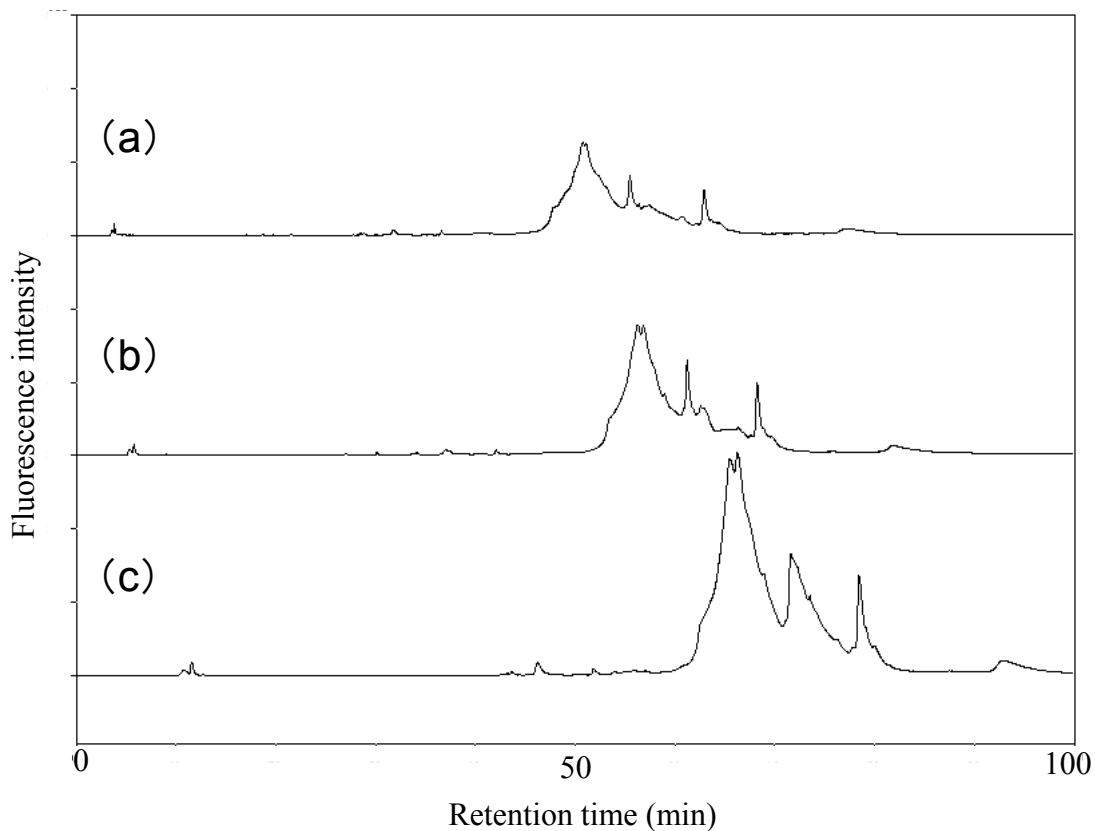


Fig.1-19. 流速の影響

(a): 流速 0.60 mL/min

(b): 流速 0.40 mL/min

(c): 流速 0.20 mL/min

試料: ヒト血漿

HPLC 条件:

溶離液: (A) water-acetonitrile-isopropanol-TFA (90 : 9.0 : 1.0 : 0.10, v/v/v)

(B) water-acetonitrile-isopropanol-TFA (30 : 69 : 1.0 : 0.10, v/v/v)

グラジエント条件: 5.0% B held for 5.0 min; to 90% B in 100 min.

オープン温度: 40°C、検出波長: ex 395 nm em 505 nm

(3) カラム温度の検討

一般にカラム温度を変えると分離能が変化する傾向があるため、カラム温度を 30、40 および 50°C に変化させてその影響について検討した。その結果、Fig.1-20 に示すように、50°C ではピーク形状が広がったものが認められたため、ピーク数の最も多い 40°C を最適値とした。

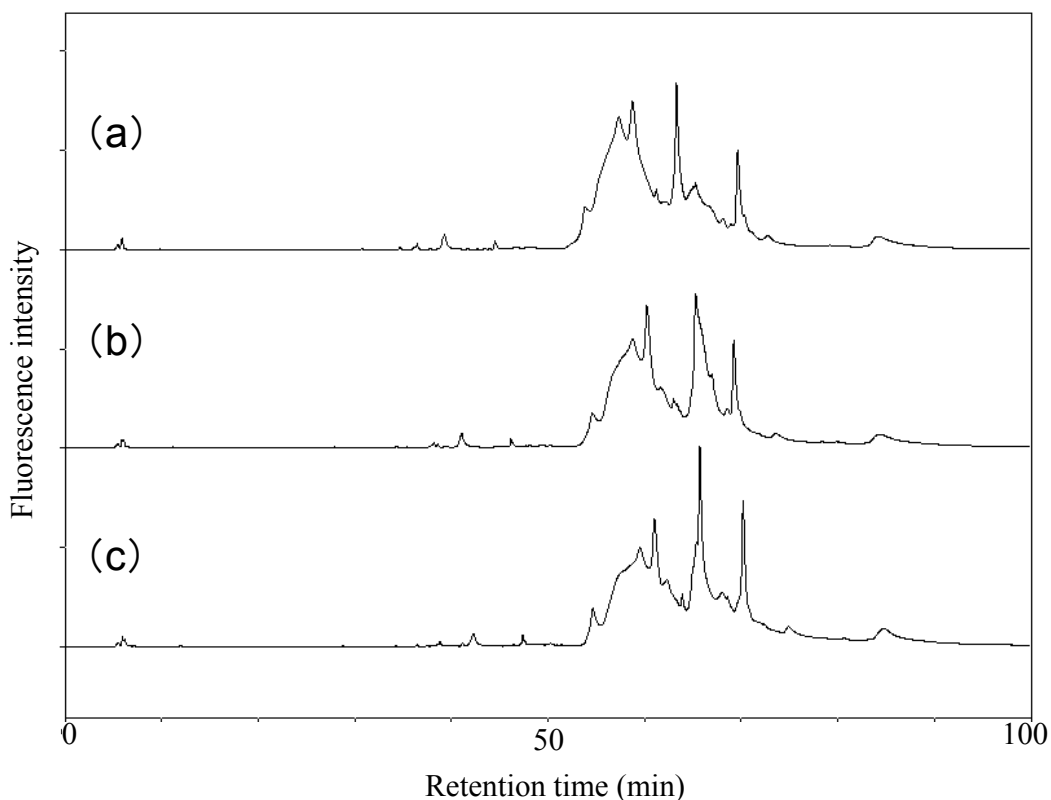


Fig.1-20. カラム温度の影響

(a): カラム温度 50°C

(b): カラム温度 40°C

(c): カラム温度 30°C

試料: ヒト血漿

溶離液: (A) water-acetonitrile-isopropanol-TFA (90 : 9.0 : 1.0 : 0.10, v/v/v)

(B) water-acetonitrile-isopropanol-TFA (30 : 69 : 1.0 : 0.10, v/v/v)

グラジエント条件: 5.0% B held for 5.0 min; to 90% B in 100 min.

流速: 0.40 mL/min、検出波長: ex 395 nm em 505 nm

(4) TFA 濃度の検討

トリフルオロ酢酸 (TFA) は固定相へのイオン性相互作用を抑え、逆相系の分離カラムにおける分解能を改善するとされる。しかしながら、TFA 濃度が高濃度となるとカラムの劣化を招くため、本研究では、溶離液 A および B の TFA 含有量を 0.01 - 0.10% の濃度範囲で比較した。Fig.1-21 に示すように TFA の濃度が上昇するとピーク数は増加し、ピーク形状は改善した。従って、本研究では TFA 濃度の最適値を溶離液 A および B とともに 0.10% とした。

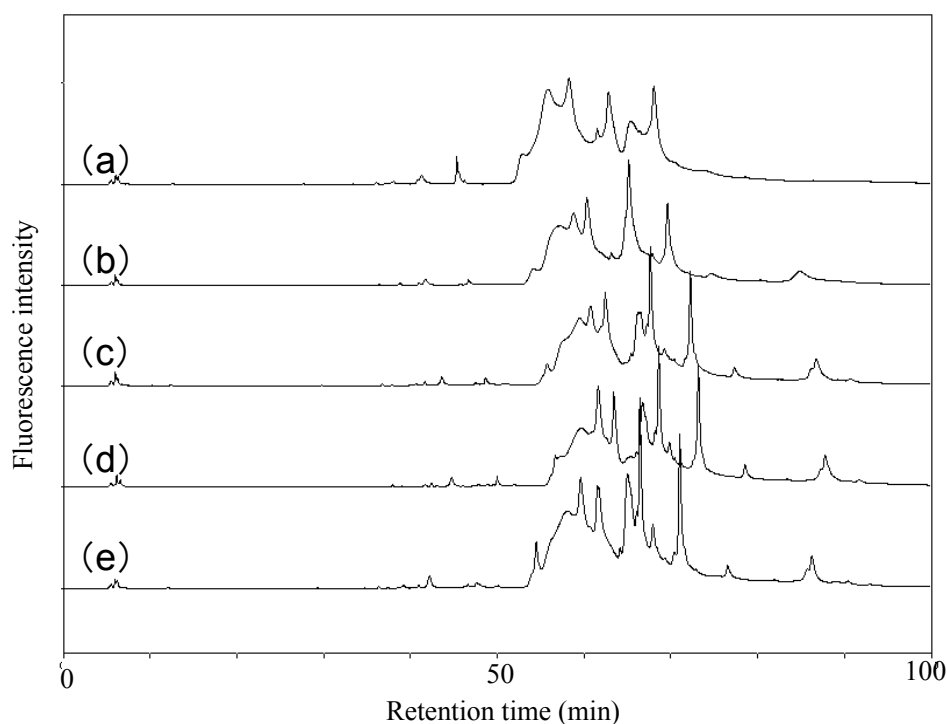


Fig. 1-21. TFA 濃度の影響

溶離液: (A) water-acetonitrile-isopropanol-TFA (90 : 9.0 : 1.0 : v/v/v)

(B) water-acetonitrile-isopropanol-TFA (30 : 69 : 1.0 : v/v/v)

(a): 溶離液 A 中の TFA 濃度 0.05%、溶離液 B 中の TFA 濃度 0.01%

(b): 溶離液 A 中の TFA 濃度 0.05%、溶離液 B 中の TFA 濃度 0.05%

(c): 溶離液 A 中の TFA 濃度 0.05%、溶離液 B 中の TFA 濃度 0.10%

(d): 溶離液 A 中の TFA 濃度 0.10%、溶離液 B 中の TFA 濃度 0.05%

(e): 溶離液 A 中の TFA 濃度 0.10%、溶離液 B 中の TFA 濃度 0.10%

グラジエント条件 : 5.0% B held for 5.0 min; to 90% B in 100 min.

流速 : 0.40 mL/min、オーブン温度 : 40°C、検出波長 : ex 395 nm em 505 nm

1-4 キシラジン投与サラブレッド血漿のプロテオーム解析

これまでに検討した前処理法を用いて、薬物を投与されたサラブレッド血漿のプロテオーム解析を検討した。そのモデル薬物としてまずキシラジンを選択した。キシラジンは $\alpha 2$ アドレナリン受容体のアゴニストであり、ウマの鎮静剤として用いられている (Fig.1-22) ⁵⁶⁾。キシラジンは投与後速やかに血中から消失することが報告されており ^{48,49)}、また、ヒツジ等に炎症を起こすことも報告されており ⁵¹⁾、タンパク質の変動を生じる可能性が高いのではないかと考え、最初のモデル薬物として選択した。

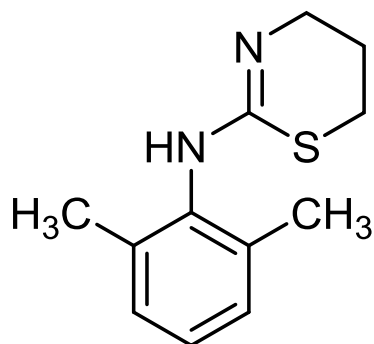


Fig.1-22. キシラジンの化学構造式

実験に際しては、サラブレッド 3 頭にキシラジンを静注投与し、血中濃度を測定することによって、血中から消失する時間を決定した。続いて、投与前と投与後、消失後の血漿を採取して、ProMax アルブミン除去キット法により前処理し、DAABD-Cl によって蛍光誘導体化後、第一段階 HPLC によって分離・定量することにより、プロテオーム解析を行った。なお、蛍光反応条件、HPLC 分離条件についても条件検討を行った。

1-4-1 キシラジンの血中濃度測定

キシラジンは、ウマに静注投与した後速やかに血中から消失し、その半減期は 50 min であると報告されている⁴⁸⁾。そこで、サラブレッド 3 頭に、キシラジンを静注投与し、その血中濃度の変動をみた。

【実験】

1) 薬物投与

サラブレッド 3 頭 (10 - 14 歳、体重 470 - 500 kg、去勢馬) にキシラジン製剤であるセラクター® 2% 注射液 (バイエル薬品 (株)) を 1.0 mg/kg の濃度で静注投与し、投与直前、投与 3、6、9、12、24、48、72、96 および 120 時間後の血液を採取した (各 20 mL)。投与後 120 時間の血液に関しては、3 頭のうち 1 頭分は採材不能であった。血液は採取後に 1600 × g で 10 分間遠心分離を行い、得られた血漿は分析まで -40℃ で凍結保存した。なお、本研究は日本獣医生命科学大学倫理委員会の承認のもとで行った。

2) 血中薬物濃度測定

血中キシラジン濃度は既報に従い測定した⁵⁷⁾。

まず、固相カラム (Oasis MCX cartridges (3.0 mL、60 mg、30 μm、Waters)) を用いて、血漿 1.0 mL を負荷後、0.50 (v/v)% トリエチルアミン含有メタノール 3.0 mL で溶出する。LC/MS/MS (Nexera、(株) 島津製作所、4000 Qtrap、AB SCIEX) には溶出液 5 μL 注入し定量分析を行った。データ解析は Analyst® software (Version 1.5、AB SCIEX) を使用した。

【結果】

血中キシラジン濃度の測定結果を Fig.1-23 に示す。

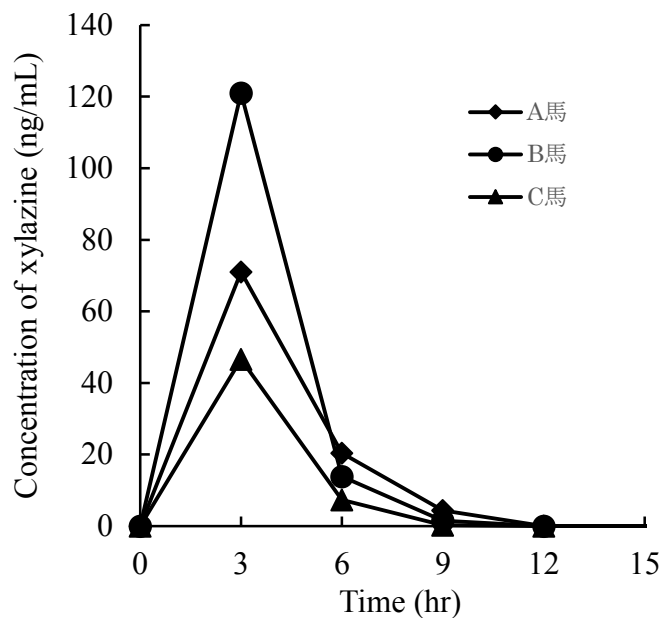


Fig.1-23. キシラジンの血中濃度

キシラジン投与 3 時間後では、3 頭各々で血中濃度が異なるが、これは速やかに減少し、投与 9 時間後には 3 頭ともに定量下限 (5.0 ng/mL) 以下の血中濃度となった。これは既報と同様の結果である⁴⁸⁾。そこで、血漿プロテオーム解析のために、キシラジン投与直前とキシラジンが血中に存在している投与 3 時間後、完全に消失した 48 および 120 時間後の血漿を以下の実験に用いた。

1-4-2 キシラジン投与前後における血漿タンパク質の変動解析

【実験】

(1) 血漿タンパク質の分離・定量

サラブレッド 3 頭より得られたキシラジン投与直前、投与 3、48 および 120 時間後の血漿タンパク質の変動を解析した。

まず、血漿を ProMax アルブミン除去キットにより前処理し、これまでに最適化した反応条件を用いて蛍光誘導体化および第一段階 HPLC により分離・定量を行った。

HPLC-蛍光検出より得られたクロマトグラムの各ピークの面積値は、解析ソフト Hitachi EZChrom Elite Chromatography Data system (OpenLAB EZChrom Edition Version A.0405、(株)日立ハイテクノロジーズ) を用いて定量した。投与前後で変動するタンパク質の変動比は、投与後血漿より得られたクロマトグラムのピーク面積値を投与前血漿より得られたクロマトグラムのそれぞれ対応するピーク面積値を除することで算出した。変動比の有意差は、Dunnett 法を用いて検定を行った (片側検定、 $P < 0.05$)。解析ソフトは KaleidaGraph® Version 4.5.1 (HULINKS) を使用した。

(2) タンパク質の加水分解

変動したタンパク質のピーク画分を第一段階 HPLC で分取し、遠心エバポレーターを使用して 50 μL まで濃縮後、50 mM Ammonium bicarbonate 水溶液 40 μL 、10 mM Calcium chloride 水溶液 5.0 μL を添加した。続いて、0.50 U Trypsin を含む 0.3% 酢酸水溶液 5.0 μL を加え、37°C で 2 時間インキュベートすることにより酵素加水分解処理を行った。

(3) タンパク質の第二段階 HPLC と変動タンパク質の同定

得られたペプチド混合溶液 7.0 μL を第二段階 nano HPLC システムに注入し分離した。nano HPLC システム (Ultimate 3000、Dionex) に直接注入し、ペプチド混合液を分離した。分離したペプチドは NANO HPLC CAPILLARY COLUMN (7.5 μL i.d. \times 100 mm) (日京テクノス) を介してエレクトロスプレーイオン化法タンデム質量分析計 (MS/MS) (LTQ Orbitrap XL Thermo Fisher Scientific) に供した。Pre-column に C18PM (LC Packings) を使用した。

分析条件は以下のとおりである。溶離液は (A) water/acetonitrile/formic acid (98/2.0/0.10、V/V/V)、(B) water/acetonitrile/formic acid (20/80/0.10、V/V/V)、グラジエント条件は B が 0 から 40% で、流速 0.3 μ L/min にて 35 分間測定した。

得られた MS/MS データは、NCBI データベースより *Equus Caballus* のみを抽出して作成したオリジナルデータ (76,330 sequences; 31,906,455 residues) を Mascot (version 2.3.01 program、Matrix Science) を用いて照合し、タンパク質を同定した。

【結果】

Fig.1-24 に、キシラジン投与前 (a) および投与 48 時間後 (b) の血漿から得られた第一段階 HPLC のクロマトグラムを示す。また、各々のクロマトグラムの部分拡大図を A および B に示す。全ピークを分取後、各々加水分解を行い、分取ピークの同定を第二段階 HPLC で行った結果、アルブミン以外に 10 種類のタンパク質 (ピーク 1-10) を同定できた。これらのタンパク質の名称および性質を Table1-5 に示す。この中で、 α -2-macroglobulin-like (Peak 9、10) は、2つのピークで検出されたが、これは異性化、翻訳後修飾などによるためではないかと考えられる。

次に、これらタンパク質のキシラジン投与後の経時的な変動を観察した (Table1-6)。投与前のピーク面積を 1 として増減を比較した結果、4 種のタンパク質 (ピーク 3、4、9 および 10) が有意に変動していることが明らかになった。Fig.1-25 にこれら 4 種のタンパク質の経時的变化を示す。

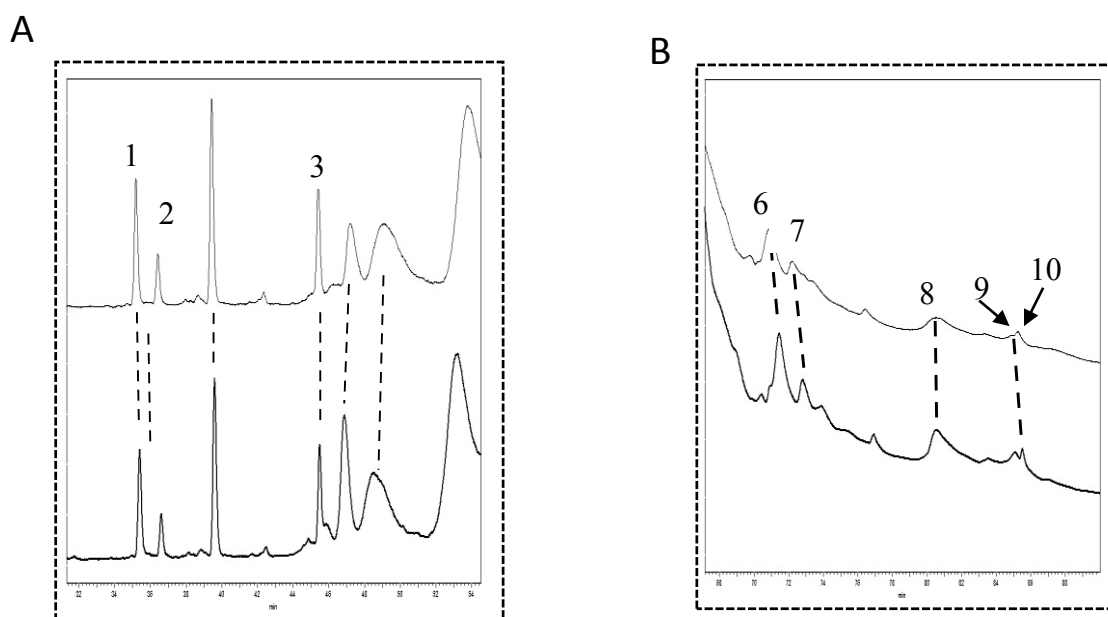
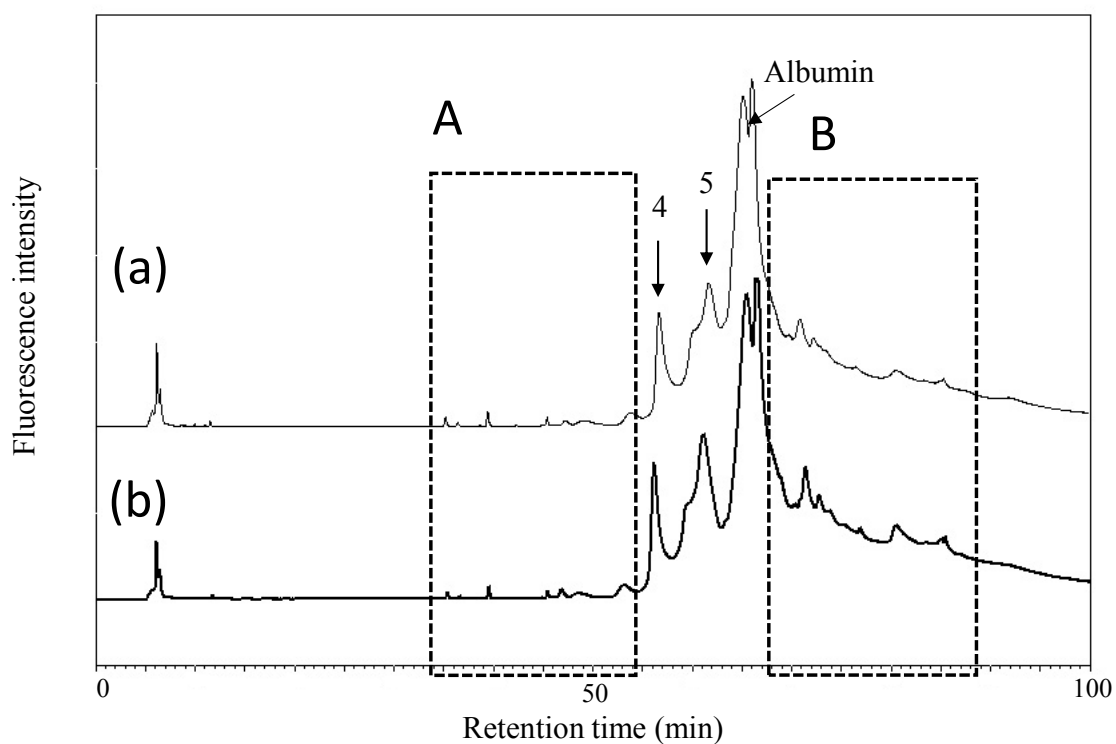


Fig.1-24. キシラジン投与前(a)および投与 48 時間後(b)の血漿中タンパク質より得られたクロマトグラム

A および B はそれぞれ点線部分の拡大図

HPLC 条件:

溶離液:(A) water-acetonitrile-isopropanol-TFA (90 : 9.0 : 1.0 : 0.10, v/v/v)

(B) water-acetonitrile-isopropanol-TFA (30 : 69 : 1.0 : 0.10, v/v/v)

グラジエント条件: 5.0% B held for 5.0 min; to 90% B in 100 min.

流速: 0.40 mL/min、オープン温度: 40°C、検出波長: ex 395 nm em 505 nm

Table1-5. 同定したサラブレッド血漿中タンパク質

Peak number	Protein Name	pI value	Accession No.	Score	Sequence coverage (%)
1	60 kDa heat shock protein, mitochondrial	5.71	gi 149730823	126	4
2	Immunoglobulin lambda light chain constant region, partial	8.85	gi 356494355	48	37
3	Haptoglobin	5.59	gi 149699777	293	6
4	β -2-glycoprotein 1	8.43	gi 149723623	315	51
5	Hemopexine	7.58	gi 545222763	544	53
6	Complement factor B	6.75	gi 149732066	1242	55
7	Ceruloplasmin	5.36	gi 149729967	795	28
8	Immunoglobulin gamma 4 heavy chain, partial	7.71	gi 42528293	97	22
9	α -2-macroglobulin-like	6.24	gi 194211675	963	38
10	α -2-macroglobulin-like	6.24	gi 194211675	717	36

Accession No. : データベースにおけるタンパク質の登録番号

Score : 適合したタンパク質の統計学的なデータベースとの一致度

Sequence coverage : 配列包括度

Table1-6. 血漿中タンパク質の経時的な変動

Peak number	Protein Name	Pre	Ratio		
			3hr/pre (n=3)	48hr/pre	120hr/pre (n=2)
1	60 kDa heat shock protein, mitochondrial	1.00 ± 0.07	1.02 ± 0.09	1.01 ± 0.25	1.06
2	Immunoglobulin lambda light chain constant region, partial	1.00 ± 0.35	0.68 ± 0.40	0.71 ± 0.25	1.07
3	Haptoglobin	1.00 ± 0.27	1.24 ± 0.77	2.23 ± 0.72*	1.30
4	β-2-glycoprotein 1	1.00 ± 0.09	1.04 ± 0.27	1.23 ± 0.10*	1.02
5	Hemopexine	1.00 ± 0.26	0.77 ± 0.41	1.89 ± 0.69	1.31
6	Complement factor B	1.00 ± 0.10	1.58 ± 0.76	1.31 ± 0.18	1.24
7	Ceruloplasmin	1.00 ± 0.24	1.72 ± 0.39*	1.54 ± 0.61	1.16
8	Immunoglobulin gamma 4 heavy chain, partial	1.00 ± 0.01	1.00 ± 0.13	1.30 ± 0.18	1.26
9	α-2-macroglobulin-like	1.00 ± 0.63	2.72 ± 0.45	10.70 ± 7.39*	3.83
10	α-2-macroglobulin-like	1.00 ± 0.30	1.43 ± 0.42	1.51 ± 0.58	1.88

(* $P < 0.05$)

Mean ± S.E.M. (n = 3)

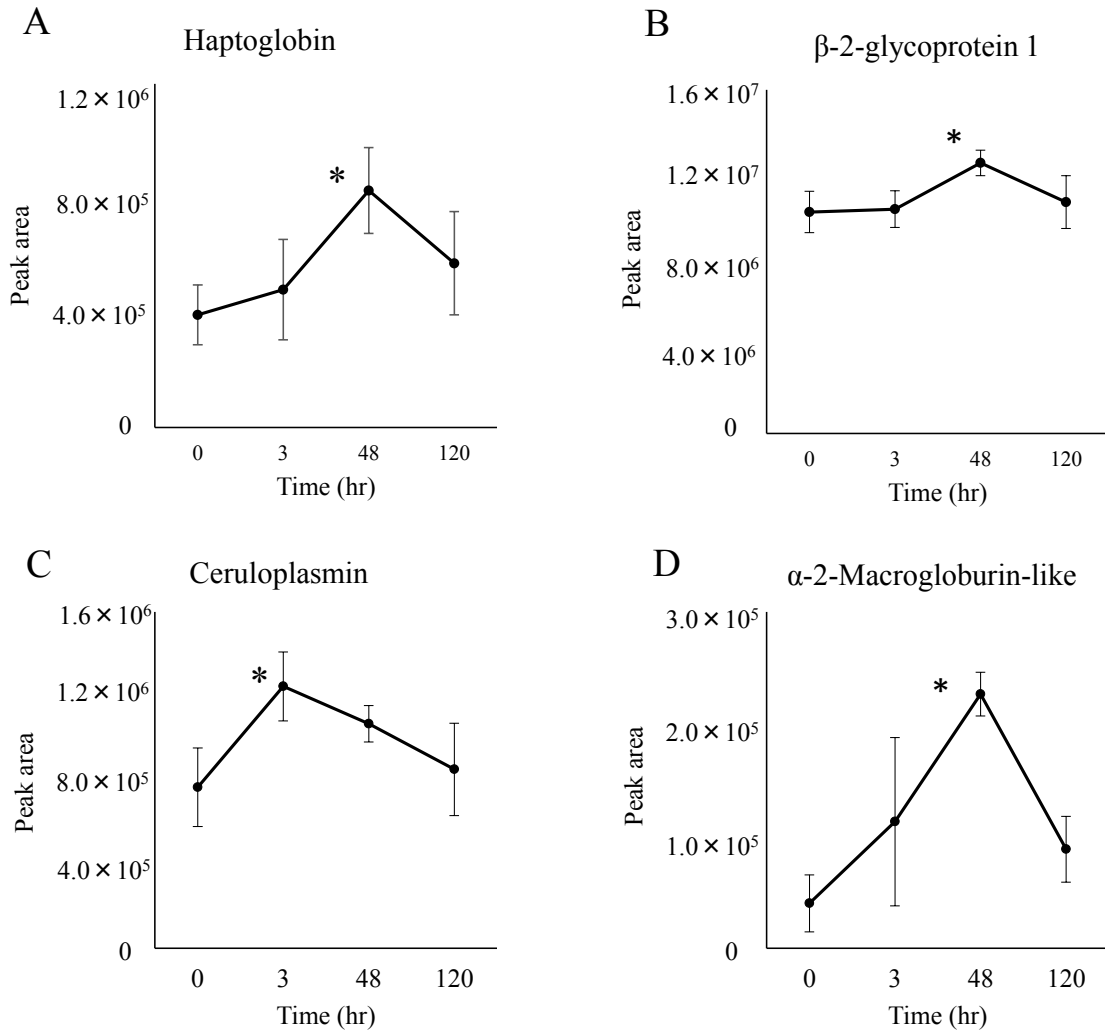


Fig.1-25. キシラジン投与により変動が観察されたタンパク質の経時的変化 (* $P < 0.05$)

Mean \pm S.E.M. (n = 3)

1-5 小括

新規ドーピング検査法開発のために、まず血漿タンパク質の前処理法を検討した結果、OFFGEL 法では、おそらくは非特異的吸着の為にタンパク質が回収されず、NATIVEN 法では、タンパク質の回収率が悪いことや処理に長い時間を要することなどから、本研究における血漿プロテオミクスの前処理法としては適さないことが判明した。さらに、ProMax アルブミン除去キット法を用いて検討した結果、アルブミンが効率的に除去され再現性にも問題ないことが判明した。そこで、以後のプロテーム解析においては、ProMax アルブミン除去キット法を用いて前処理を行った。

さらに、HPLC カラム、流速、溶離液、カラム温度などの実験条件を検討し、最適化した後、サラブレッドにモデル薬物であるキシラジンを投与し、投与前後のプロテオーム変動を経時的に解析した⁵⁸⁾。

その結果、10 個のタンパク質ピークが同定された。このうち 2 つのピークが α -2 macroglobulin like と同定されたが、おそらくは異性化や翻訳後修飾による一次構造の違いによるものと考えられた。

タンパク質の変動を経時的に比較した結果、その中で 4 種のタンパク質 (Haptoglobin、Ceruloplasmin、 β -2 glycoprotein1、 α -2 macroglobulin like) がキシラジン投与によって有意に増加することが判明した。この中で、 β -2 glycoprotein1 は、損傷細胞の膜表面リン脂質に結合し、内因性凝固カスケードの活性化を阻止する作用を持つ^{59,60)}。また、残りの 3 つ (Haptoglobin、Ceruloplasmin、 α -2 macroglobulin like) は急性期タンパク質に分類され、炎症時などに、炎症性サイトカイン (IL-1、IL-6、Tumor Necrosis Factor (TNF) α) によって血中に増加することが報告されている⁶¹⁻⁶³⁾。これらのタンパク質の増加と作用との関連については未だ不明であるが、キシラジン投与が肺に損傷を与え、肺浮腫を引き起こすことがラットやヒツジで報告されている^{50,51)}。さらに Atwal らはウマの肺のマクロファージの形が他の哺乳類と比べて異なっており、麻酔薬のハロタンがウマの肺の形を変形したことを報告している⁶⁴⁾。これらの結果から、ウマにおいてキシラジン投与が肺に損傷を引き起こした結果炎症性サイトカインが放出され、急性期タンパク質が増加する可能性も考えられる。しかしながら、ウマにおける

肺の損傷が生じているかどうかについては未だ明らかではないため、今後血漿中の TNF の濃度測定など更なる検討が必要である。

本研究において、薬物が完全に消失した後も血漿タンパク質の変動を解析することが可能であることが判明した。今後、ステロイドなど他の薬物に対して本法を応用することによって、新規ドーピング検査法開発に繋がるのではないかと考えられる。

【第 2 章】

カルノシン濃度測定

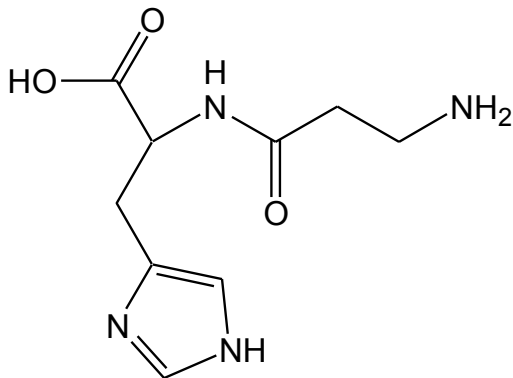
2-1 目的

競走馬の運動能力は、一般に遺伝的要因、体重、筋線維タイプ、栄養などに関係すると考えられている⁶⁵⁾。従って、運動能力を推定できる指標が存在すれば、競走馬の効率的な育成やトレーニングを行うことが出来ると考えられる。このような指標として我々はカルノシン (β -alanyl-L-histidine) に着目した。カルノシンは内在性の低分子量ジペプチドであり、脊椎動物の骨格筋や神経組織に多く存在することが知られている⁶⁶⁾。カルノシンは、抗酸化作用、抗クロスリンク作用、抗糖化作用等の有用な性質を持つことから、脳内で神経保護物質 (neuroprotector) として働いているのではないかと考えられており、アルツハイマー病モデルマウスにおいて老人斑の蓄積を抑制することなどが報告されている。また、当研究室ではカルノシンが脳血管性認知症やプリオン病に対して有効な実験結果を報告している⁶⁷⁻⁷³⁾。

カルノシンの筋肉中濃度は、クレアチンや ATP と同じく、mM レベルの高濃度であるために、運動機能に重要な役割を果たしているのではないかと古くから考えられてきた。

運動時には筋肉収縮により乳酸が生じ、その結果アシドーシスにより筋肉収縮疲労が引き起こされる。カルノシンの pKa は 7.01 であるため、筋肉内での pH バランス維持に働いているのではないかと考えられている。さらに、抗疲労作用、抗酸化作用等の有用な性質を考えると、筋肉中のカルノシン量は運動能力に関連することが考えられる。実際、渡り鳥やカツオ・マグロなどの回遊魚、クジラ、またイヌやウマなどの競走能力をもつ種ではカルノシン濃度が高いことが知られている。また能力の高いアスリートでは筋肉中のカルノシン濃度が一般人よりも高いことや、カルノシンあるいはその構成成分である β アラニンを食事に加えると、筋肉中のカルノシン濃度が増加し、疲労回復に繋がることも報告されている⁷⁴⁾。筋肉中では、カルノシンは類縁体であるアンセリン (1-methyl carnosine) と共に存在しており、筋肉中のカルノシンおよびアンセリン含量は、種や臓器によって大きく異なることが知られている。Fig.2-1 にカルノシンおよびアンセリンの化学構造を示す。Harris らは、ウマ (サラブレッド) 筋肉はヒト筋肉よりも 6 - 10 倍高い濃度のカルノシンを含有する⁶⁶⁾ことを報告している。

(a) carnosine



(b) anserine

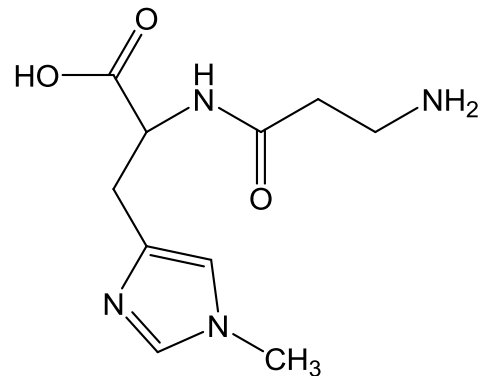


Fig.2-1. カルノシンおよびアンセリンの化学構造

競走馬においては Fig.2-2 に示すように、Gluteus medius（中臀筋）、Masseter（咬筋）、Triceps brachii muscle（上腕三頭筋）、Flexor carpi radialis（橈側手根屈筋）、Sternocleidomastoid（胸鎖乳突筋）などの筋肉が運動に用いられているが、特に中臀筋は競走時に重要な働きを持つことが知られている。また、ウマ筋肉中の筋線維には Type I（遅筋線維）、Type IIa（速筋（中間筋）線維）、Type IIx（速筋線維）の 3 種類が存在しており、一般に Type I 筋線維は、遅い持久的な運動に使われ、Type IIx 筋線維はスピードを要求する運動に用いられ、酸化系代謝は弱く、Type IIa は両者の中間的な働きをして、持久運動と速い運動の両方に用いられる。この筋線維の比率は筋肉種によって異なっており、Kawai⁷⁵⁾らは、各種筋肉中の筋線維タイプを調べた結果、Table 2-1 のように、中臀筋では Type IIa および Type IIx が多く、運動時にはあまり関与しないと考えられる咬筋では Type I が多いことを明らかにしている。中臀筋は集中的に速い運動に使われるため、速筋の割合が高く、咬筋は咀嚼といったゆっくりとした運動に使用されるため遅筋の割合が高いことが考えられる。さらに、Sewell⁷⁶⁾らは、サラブレッド中臀筋における筋線維タイプとカルノシン量の相関を調べた結果、Type I よりも Type II の方が、カルノシン含量が高いことを報告している。

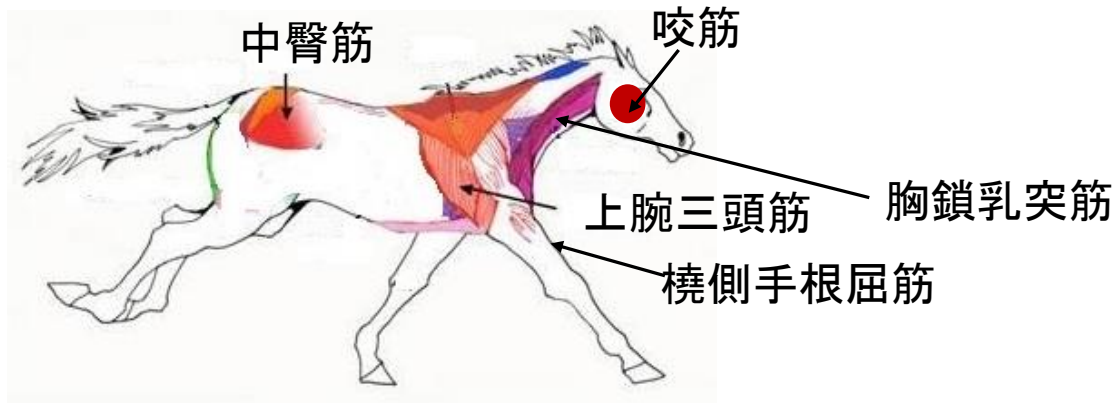


Fig.2-2. サラブレッドの筋肉部位

Table2-1. サラブレッドの筋肉における筋線維タイプの比較

筋肉タイプ (%)	咬筋	橈側手根 屈筋	上腕三頭筋 外側広筋	胸鎖乳突筋	中臀筋
Type I	77.8±18.2	36.3±4.4	18.8±5.9	23.4±11.8	5.2±5.7
Type IIa	22.0±18.0	59.9±0.6	76.7±5.7	72.4±6.6	52.6±9.1
Type IIx	0.3±0.6	3.8±3.8	4.5±3.3	4.2±6.6	42.2±6.4

文献 75) を基に作成

従って、筋肉中のカルノシン含量は運動能力や筋線維タイプと相関している可能性が考えられ、その定量分析によってサラブレッドの運動能力を推定できる可能性が考えられる。一般に、ペプチド類の分析には逆相系の ODS カラムが汎用されている。しかしながら、カルノシンは親水性が高く、ODS カラムにはほとんど保持されず溶媒先端に溶出してしまう (Fig.2-3 A)。さらに組織中にはカルノシンと共に類縁体であるアンセリンが同程度存在しているため、定量分析においてはアンセリン等と確実に分離可能な系を用いる必要がある。これまでに、2,4-dinitrofluorobenzene (DNFB) により誘導体化後 UV 検出を行う方法⁷⁷⁾ や、LC/MS/MS^{78,79)} を使用する方法などが報告されている。しかしながら、これらの手法は操作の煩雑性や、高価な分析機器が必要になることから、簡便で安価に分析する手法が求められていた。そこで我々は、汎用 UV 検出器で、迅速、

簡便にカルノシンを定量するための分析系の開発を試みた。さらに、カルノシンが熱に安定であることを利用して簡便な組織からの抽出法を検討した。本研究では、この方法を用いてサラブレッドの各種臓器および筋肉種中のカルノシン含量の定量分析を行った。

2-2 カルノシン定量法の開発

2-2-1 分離カラムの検討

種々の分離カラムを用いて検討した結果、Hypercarb™ column (Thermo Electron Corp) がカルノシン類の分離に有効であることが示唆された。このカラムの充填剤は、粒子径 3 μm の多孔性グラファイトカーボンであり、シリカ系の充填剤とは保持挙動が異なり、高極性物質の分離に有効であることが報告されている。また、このカラムは ODS 系と異なり、溶離液の種類や pH、温度などに制限がないことから使用しやすいことも報告されている。

そこで、このカラムを用いて分離条件の検討を行った。

【実験】

試料として、カルノシンおよびアンセリンの標準品混合溶液を用いた。Hypercarb™ column (75 × 4.6 mm i.d.) を HPLC-UV 検出器 ((株) 日立ハイテクノロジーズ) にセットし、カラム温度：常温、流速：1.0 mL/min として、検出は UV 215 nm の吸収を測定した。

【結果】

溶離液として、0.05% TFA-アセトニトリルを用いて検討を行った結果、アセトニトリル濃度 7.0% においてカルノシンとアンセリンに良好な分離が得られ、両者共に 10 min 以内に溶出することが判明した。また、溶離液の pH や有機溶媒を変更して検討を行ったが、大きな変化は見られなかった。Fig. 2-3 B にカルノシンおよびアンセリン標準品のクロマトグラムを示す。

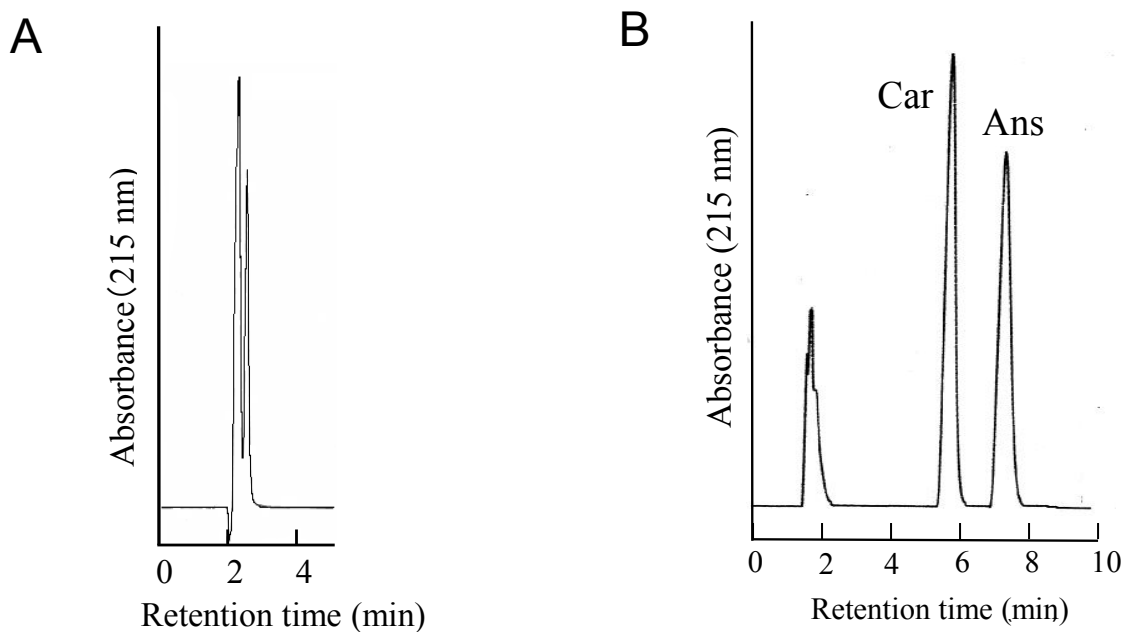


Fig.2-3. カルノシンおよびアンセリンの ODS column(A)および Hypercarb column(B)による分離

A: ODS column にカルノシンおよびアンセリン標準品 1 mM 混合溶液を 20 μ L 注入。溶離液:0.05% TFA、検出:UV 215 nm

B: Hypercarb column にカルノシンおよびアンセリン標準品 1 mM 混合溶液を 20 μ L 注入。溶離液:0.05% TFA-7.0% アセトニトリル、検出:UV 215 nm

この条件を用いて、カルノシンおよびアンセリンの検量線を作成した。その結果、両者ともに 0.50 - 500 μ M の範囲で相関係数が 0.999 と良好な直線性を示した (Table2-2)。また、検出限界は 0.24 μ M であった。

Table2-2. カルノシンおよびアンセリンの検量線

	Calibration curve	Correlation coefficient (r)	Calibration range (μ M)	Detection limit (μ M) S/N = 3
Car	$y = 2359 x - 2233$	0.999	0.50 - 500	0.24
Ans	$y = 2194 x - 2960$	0.999	0.50 - 500	0.24

2-2-2 前処理法の検討

予備検討の結果、カルノシンおよびアンセリン共に、95°C 30 min の加熱でも安定であることを確認している。そこで、筋肉組織からの抽出前処理法の検討を行った。

【実験】

サラブレッド筋肉組織 約 50 mg を秤量し、精製水 1.0 mL を加えて、ホモジナイザー（バイオマッシャーV、Nippi）を用いてホモジナイズした。これを加熱後、遠心分離（20,000g × 60 min、4°C）して得られた上清を分析試料として用い、20 μL を HPLC に注入した。

【結果】

(1) ホモジナイズ時間の検討

ホモジナイズ時間を 0.50、1.0、2.0 および 5.0 min とし、得られたカルノシンのピーク面積値を比較検討した。Fig. 2-4 に示すように、1.0 - 5.0 min のインキュベーション時間では差が見られなかったため 1.0 min を最適値とした。

なお、ホモジナイズに用いる溶媒等の検討も予備的に行ったが、大きな差は得られなかった。

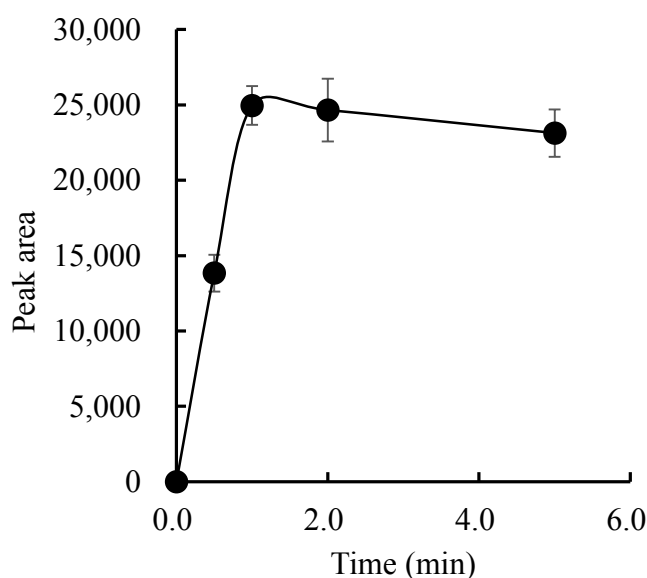


Fig.2-4. ホモジナイズ時間の影響

(2) 加熱時間および温度の検討

温度を 95°C に固定し、加熱時間を 15、30 および 60 min に変化させて、検討を行った。その結果、Fig.2-5 に示すように、30 min と 60 min ではほとんど差がみられなかったため、30 min を最適値とした。

次に、加熱時間を 30 min に固定し 加熱温度を 60、95 および 100°C へと変化させて比較検討した。その結果、Fig.2-6 に示すように 95 °C および 100°C では差が見られなかったため、95°C を最適値とした。

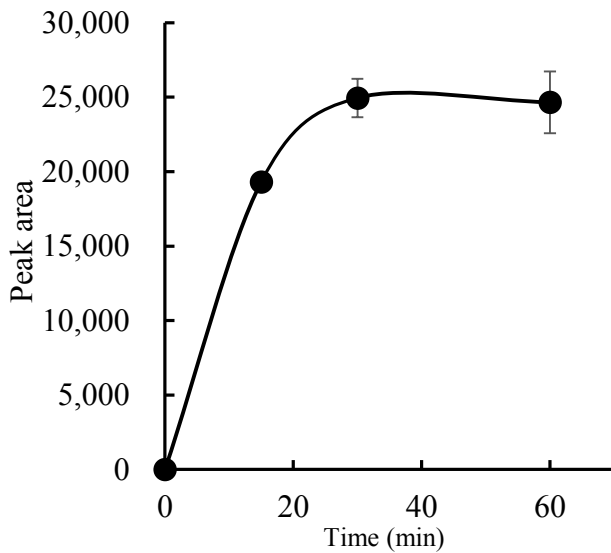


Fig.2-5. 加熱時間の影響

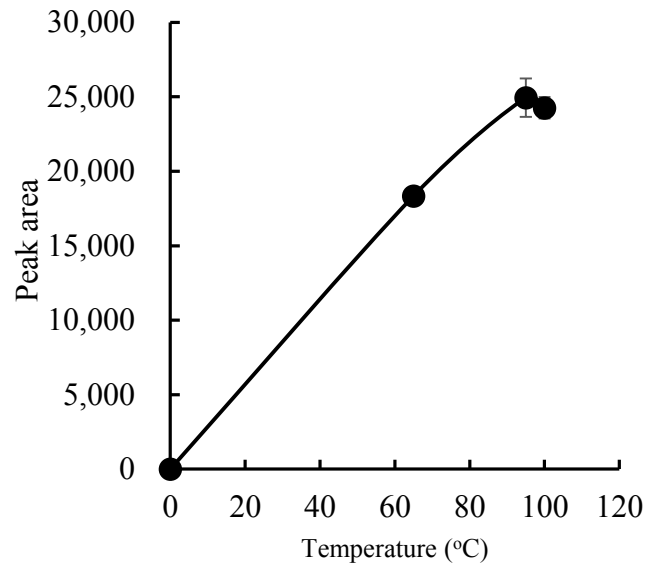


Fig.2-6. 加熱温度の影響

(3) 回収率の検討

これまでに最適化した方法を用いて、カルノシンおよびアンセリンの回収率について検討した。カルノシンおよびアンセリンについては、同程度の位置に溶出する適当な内部標準物質が現在市販されていないため、カルノシン標準品の添加による、添加回収実験を行った。

【実験】

筋肉組織を前述したように精製水でホモジナイズした後、溶液を 2 分し、片方にはカルノシン標準品を最終濃度 2.0 mM になるように添加する。2 つの試料を同様に 95°C で 30 min 加熱し、遠心分離 (20,000g × 60 min、4°C) して得られた上清を分析試料として用い、20 μL を HPLC に注入した。

【結果】

カルノシンの回収率は、 $98.8 \pm 6.6\%$ (n=15) であり、アンセリンの回収率は $99.4 \pm 1.8\%$ (n=4) であった。従って、95°C 30 min の加熱という単純な前処理によって、良好な回収率が得られた結果となる。

2-3 サラブレッド組織中カルノシン濃度の定量分析

これまでに確立した方法を使用して、サラブレッドのさまざまな組織および5種の筋肉中のカルノシン濃度を分析した。

なお、筆者は本法を用いて、鶏肉豚肉等の食品中のカルノシン類の分析も行っている。その結果、Fig.2-7 に示すように、鶏肉中にはカルノシンならびにアンセリンとともに多量に含まれていることを報告している⁸⁰⁾。先述したように、カルノシンとアンセリンの比は種によって異なるが、予備的に検討した結果、サラブレッド筋肉中にはカルノシンのみが存在しておりアンセリンは存在しなかったため、以後の検討ではカルノシン量のみの比較を行った。

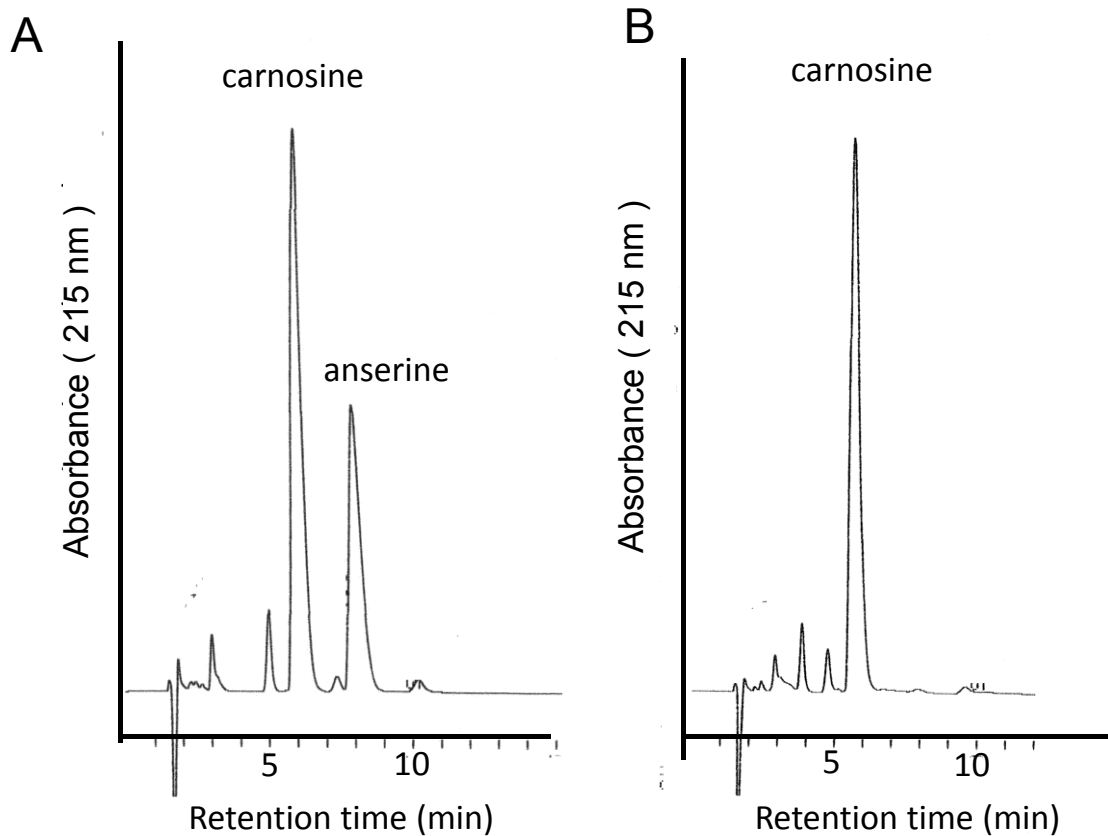


Fig.2-7. 鶏肉(A)およびサラブレッド筋肉(B)中のカルノシンおよびアンセリンの分析

【実験】

試料のサラブレッド 8 頭は、チオペンタール麻酔により屠殺後、5 種の筋肉組織（Gluteus medius（中臀筋）、Masseter（咬筋）、Triceps brachii muscle（上腕三頭筋）、Flexor carpi radialis（橈側手根屈筋）、Sternocleidomastoid（胸鎖乳突筋））を摘出した。採材したサラブレッドの性質を Table2-3 に記す。なお、採材の都合上、胸鎖乳突筋は 3 頭のサラブレッドからは採取することが出来なかった。なお、1 頭のサラブレッドから、筋肉以外の臓器（（肝臓（liver）、腎臓（kidney）、空腸（jejunum）、食道（esophagus）、胃（stomach）、脾臓（spleen）、膀胱（bladder）、大動脈（aorta））を摘出した。

各臓器は、3 つの部分に分割し、各々の部分から約 1 cm³ の組織を摘出し、液体窒素にて直ちに凍結した後、-40℃ にて保存した。各組織の離れた部位から約 50 mg の組織を 3 個採取し、ホモジナイズ後、抽出・定量を行った。なお、本研究は日本中央競馬会競走馬総合研究所倫理委員会の承認のもとで行った。

Table2-3. 使用したサラブレッドの特徴

	年齢	体重 (kg)	性別
A馬	3	505	牡
B馬	4	506	牡
C馬	5	467	去勢
D馬	3	420	牡
E馬	4	498	牝
F馬	4	497	牝
G馬	3	432	牡
H馬	5	550	牡

【結果】

(1) 筋肉以外の臓器中のカルノシン濃度分析

サラブレッドの筋肉以外の組織中でのカルノシン濃度の定量分析結果を Table2-4 に示す。その結果、ほとんどの組織でカルノシンは検出されず、食道と胃に比較的低濃度のカルノシンが存在していることが判明した。また、アンセリンはいずれの組織においても検出できなかった。

Table2-4. サラブレッドのさまざまな組織中のカルノシン濃度

組織	肝臓	腎臓	空腸	食道	膀胱	胃	脾臓	大動脈
カルノシン量	n.d.	n.d.	n.d.	10.0±1.0	8.0±1.0	11.0±3.0	n.d.	n.d.
アンセリン量	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

数値は、mg/100 g wet tissue、mean ± S.D.、1 頭より得られた組織の異なる 3 つの部位の平均を示す

(2) さまざまな筋肉中のカルノシン濃度

5 種類の筋肉組織中のカルノシン濃度定量結果を Table2-5 に示す。筋肉組織では、他の組織に比べて高濃度のカルノシンが存在している。この量は、最も多い中臀筋では 636 mg/100 g、すなわち約 0.6% (約 28 mM) にもおよぶ。また、いずれの組織においてもアンセリンは検出されなかった。筋肉種で比較した結果、カルノシン含量は、サラブレッドの中臀筋で最も高く、咬筋で最も低いことが判明した。

Table2-5. 筋肉組織中のカルノシン濃度

筋肉種	咬筋	橈側手根屈筋	上腕三頭筋	胸鎖乳突筋	中臀筋
カルノシン量	195 ± 79	329 ± 114	410 ± 97	534 ± 49	636 ± 143

数値は、mg/100 g wet tissue、mean ± S.D.、n = 8 (ただし、胸鎖乳突筋は n = 5)

この結果をより詳細に検討するために、Fig.2-8 にカルノシン含量を比較し、各々の筋肉組織中の筋線維タイプとの比較を行った。図下部の円グラフに文献値⁷⁵⁾より得られた筋線維タイプの比率を示すが、カルノシン含量は Type I が多い咬筋では少なく、Type II が多い中臀筋や胸鎖乳突筋では多い傾向が観察された。また、中臀筋では Type IIx の比率が特に高いことから、Type IIx との関連も示唆される。

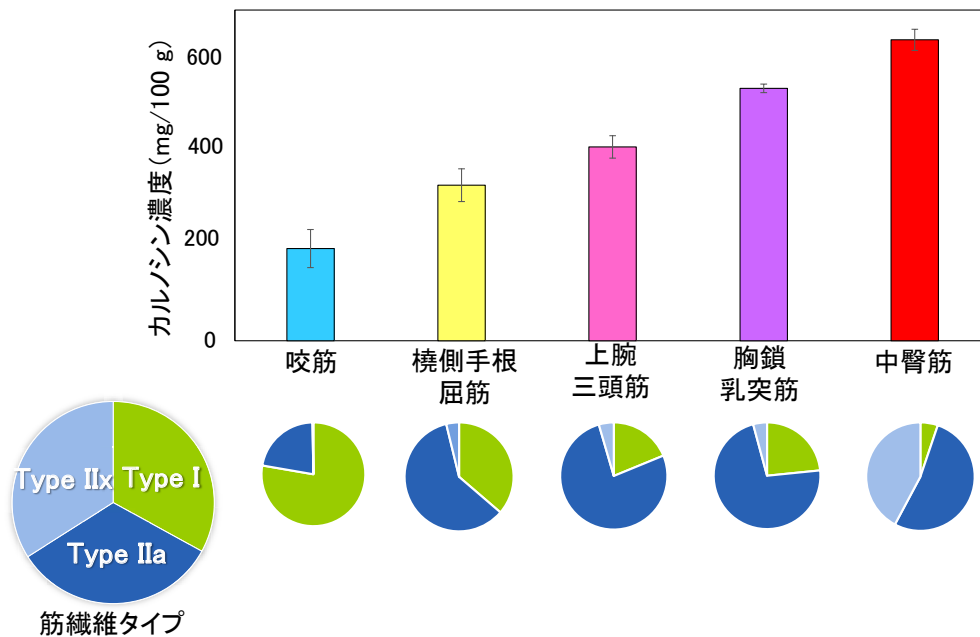


Fig.2-8. 種々の筋肉中カルノシン含量と筋線維タイプ
筋線維タイプの比率は文献⁷⁵⁾を基に作成 mean ± S.D.、n = 8

2-4 小括

ウマ組織中のカルノシンおよびアンセリンの濃度を、迅速、簡便に定量するため、HPLC 分離系および前処理法を検討した結果、多孔性グラファイトカーボンカラム (Hypercarb column) を用いると良好な分離が得られることが判明した。また、紫外可視吸光度検出器を用いて UV 215 nm の吸収を検出した結果、カルノシンおよびアンセリンの検出限界は両者ともに 0.24 μM であった。Gatti らはカルノシンを含めたアミノ酸を 2,4-dinitrofluorobenzen により誘導体化後、ODS カラム付 HPLC UV 検出器で測定している⁷⁷⁾。この手法の検出限界は 0.022 μM と報告されている。一方、Macià⁷⁹⁾ らは LC-MS/MS を使用してトリ肉中のカルノシンの測定を行っており、検出限界は 7.9 nM であった。これらの手法は本研究の手法よりも高感度であるが、本手法は煩雑な誘導体化操作が不要であり、安価で汎用されている紫外可視検出器を使用可能な点に大きな利点がある。また、組織の水抽出物を 95°C 30 min で加熱後、遠心分離するという簡便な前処理操作によって、98.8 \pm 6.6% (n = 15) という良好な回収率が得られることも判明した。本手法については様々な食肉中のカルノシンおよびアンセリンの濃度測定にも応用した⁸⁰⁾。

本研究では、ウマ筋肉組織中からカルノシンは検出されたが、アンセリンは検出されなかった。さらに他の臓器について測定した結果、肝臓、腎臓、空腸、脾臓および大動脈からはカルノシン、アンセリンともに検出されなかったが、食道、膀胱および胃からは、微量のカルノシンが検出された。この結果は先行研究と一致しており、Marlin⁸¹⁾ らはウマ筋肉からカルノシンのみを検出している。

さらに、5 種類の筋肉中カルノシン濃度を定量した結果、中臀筋で最もカルノシン濃度が高く、咬筋は最も低いことがわかった。先行研究で調べられた各種筋肉中の筋線維タイプを考慮すると、Type II の割合が高い筋肉ではカルノシンの濃度が高く、Type I の割合が高くなるほどカルノシンの濃度が低くなる傾向があることが示唆された⁸²⁾。この結果は、Sewell らの結果とも一致している⁷⁶⁾。また、Mora⁸³⁾ らはブタでは、咬筋においてカルノシン濃度が低いことを報告しており今回の結果と類似の結果である。

【結論】

本研究では、ウマの生体成分の分析法を開発することを目的とした。まずは、血漿プロテオミクスを競走馬のドーピング試験法に応用できないかと考えてその基礎検討として、血漿中のアルブミンなどの多量タンパクを除去するための前処理法について検討した後、FD-LC-MS/MS法の条件検討を行った。次に、薬物が血中から消失した後のタンパク質変動を解析するために、キシラジンをモデル薬物として用いて、投与前後のタンパク質変動を解析した。その結果、Haptoglobin、Ceruloplasmin、 β -2 glycoprotein1、 α -2 macrogloblin likeの4種のタンパク質がキシラジン投与によって増加することが明らかになった⁵⁸⁾。このうち、3種（Haptoglobin、Ceruloplasmin、 α -2 macrogloblin like）は炎症等の後に増加することが知られている急性期タンパク質であり、興味深い結果である。

この結果によって、プロテオーム解析をドーピング試験法として応用できる可能性が示された。しかしながら、今後、本法をドーピング検査に応用するためには、いくつかの課題が残されている。まず、ステロイド等他のさまざまな薬物において測定可能かどうか試験することが必要である。また、今回は実験の都合上、3頭しか投与実験を行うことが出来なかったが、より多くの試料を用いて正常値および異常値の偏差を明らかにする必要がある。今後のより幅広い研究によって、顕著に変動するタンパク質が明らかになれば、ドーピングの新たなバイオマーカーを見出すことが出来るのではないかと考えている。現在、遺伝子ドーピングなど、これまでに想定されなかったドーピング法が開発されてきており、その対策法が希求されていることを考えると、本研究の社会的意義は大きい。

さらに、本研究ではタンパク質成分のみならず低分子量成分であるカルノシンにも着目して、その分析法を開発し、サラブレッド筋肉中のカルノシン含量を定量分析した⁸²⁾。その結果、筋肉種によってカルノシン含量が異なることを明らかにすることが出来た。今後、筋肉中のカルノシンを測定することによって、筋線維タイプの推定や運動能力の推定が可能となる可能性が考えられる。

筋肉中のカルノシンは、血液中に漏出するが、通常カルノシナーゼによって速やかに分解される。ところが、Dunnettらは、ウマでは血液中にカルノシナーゼが存在しないため、血液中に μ Mレベルのカルノシンが存在し、その量は運動後に上昇することを報告しており、運動時に生じた筋肉損傷の結果、カルノシンが

漏出した可能性を示唆している⁸⁴⁾。従って、今後、本研究によって開発した定量法を用いて、サラブレッド血中カルノシン含量を測定することが可能となれば、サラブレッドの筋肉損傷の程度を簡便に推定できる可能性がある。この結果は、サラブレッドの効率的な育成方法、効果的な栄養源の確立につながると共に、効果的なトレーニング法やレースの選択法につながる可能性も考えられる。また、筆者は本法を食品中のカルノシン、アンセリンの定量分析に応用し、興味深い結果を得ている⁸⁰⁾。さらに、カルノシンは競走馬のみならず、人間の運動能力や老年性認知症にとっても有効であることが報告されており⁷³⁾、本研究で開発した分析法はこれらにも応用し得ると考えられる。

我々にとって競走馬は古くから身近な存在であったにも関わらず、その性質については未だに不明の点が多い。新規ドーピング検査法の開発や競走馬生体成分の解析を通じて社会へ貢献すべく、さらに研究を進めたいと考えている。

【試薬・装置】

第 1 章

装置

<HPLC-蛍光検出器>

HITACHI L-2000 series ((株) 日立ハイテクノロジーズ、東京)

HITACHI EZChrom Elite Chromatography Data System ((株) 日立ハイテクノロジーズ、東京)

<HPLC-UV 検出器>

HITACHI Pump L-7100 ((株) 日立ハイテクノロジーズ、東京)

HITACHI UV Detector L-7400 ((株) 日立ハイテクノロジーズ、東京)

<nano HPLC-MS/MS>

UltiMate 3000,

LTQ Orbitrap XL (Thermo Fisher Scientific、Waltham、MA、USA)

<LC/MS/MS>

Nexera ((株) 島津製作所、京都)

4000 QTRAP® (AB Sciex、MA、USA)

HITACHI U-2800 Spectrophotometer ((株) 日立ハイテクノロジーズ、東京)

<プレートリーダー>

Tristar LB941 (Berthold Technologies、Germany)

<タンパク質分取装置>

NATIVEN (アトー (株)、東京)

Agilent 3100 OFFGEL Fractionator (Agilent Technologies、CA、USA)

<遠心エバポレーター>

CC-105 ((株) トミー精工、東京)

<恒温槽>

Thermo minder EX (タイテック (株)、埼玉)

試薬

Acrylamide 電気泳動用 (和光純薬工業 (株)、大阪)

Acetonitrile (関東化学 (株)、東京)

Ammonium bicarbonate (Sigma-Aldrich、MO、USA)
Ammonium Peroxodisulfate 電気泳動用 (和光純薬工業 (株)、大阪)
BSA (Sigma-Aldrich、MO、USA)
 β -LG (Sigma-Aldrich、MO、USA)
Bradford Quick Start™ Bovine Serum Albumin Standard Set
(BIO-RAD Laboratories Inc.、CA、USA)
Quick Start™ Bradford Protein assay kit
(BIO-RAD Laboratories Inc.、CA、USA)
Calcium chloride 特級 (和光純薬工業 (株)、大阪)
CHAPS 試験研究用 (同仁化学研究所、熊本)
DAABD-Cl (東京化成工業、東京)
EDTA 試験研究用 (同仁化学研究所、熊本)
Glycine 特級 (和光純薬工業 (株)、大阪)
Glycerine 特級 (和光純薬工業 (株)、大阪)
6 mol/L Guanidine Hydrochloride pH8.7 (東京化成工業、東京)
Hydrochloric acid 特級 (和光純薬工業 (株)、大阪)
N,N'-Methylene-bis(acrylamide) 電気泳動用 (和光純薬工業 (株)、大阪)
TEMED 特級 (和光純薬工業 (株)、大阪)
SDS 生化学用 (和光純薬工業 (株)、大阪)
TCEP (Sigma-Aldrich、MO、USA)
Tris 生化学用 (和光純薬工業、大阪)
Trypsin (Promega、WI、USA)
ヒト血漿 (Sigma-Aldrich、MO、USA)
分子量マーカー DynaMarker Protein Multicolor Stable
(バイオダイナミクス研究所 (株)、東京)

NATIVEN 法

試薬

30% アクリルアミド溶液 :

Acrylamide 29.0 g、*N,N'*-Methylene-bis(acrylamide)を純水で 100 mL とした。

1.5 M Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.8) :

Tris(hydroxymethyl)aminomethane、 18.2 g、 Sodium Dodecyl Sulfate 0.4 g に Hydrochloric acid 2.0 mL を加え純水で 100 mL とした。

0.5 M Tris-HCl 緩衝液 (pH 6.8) :

Tris(hydroxymethyl)aminomethane、 6.1 g、 Sodium Dodecyl Sulfate 0.4 g に Hydrochloric acid 4.2 mL を加え純水で 100 mL とした。

10% 過硫酸アンモニウム

Ammonium Peroxodisulfate 0.1 g を純水 1 mL で溶解した。

試料処理液 :

Sodium Dodecyl Sulfate 0.1 g、 0.5 M Tris-HCl 緩衝液 (pH 6.8) 1 mL、 glycerine 2 mL を加え純水で 10 mL とした。

回収用緩衝液

Tris(hydroxymethyl)aminomethane 9.1 g を純水に溶解し Hydrochloric acid で pH 8.8 に調製し、 100 mL とした。

製剤

キシラジン製剤

セラクター®2%注射液 (バイエル薬品 (株)、大阪)

固相カラム

Oasis MCX cartridges (3.0 mL、 60 mg、 30 µm、 Waters、 Milford、 MA、 USA)

採材に使用したウマ

	年齢	体重 (kg)	性別	種
A馬	12	500	去勢馬	サラブレッド
B馬	14	480	去勢馬	サラブレッド
C馬	10	470	去勢馬	サラブレッド

第 2 章

装置

<HPLC 装置>

HITACHI UV-Detector L-7405 ((株) 日立ハイテクノロジーズ、東京)

HITACHI Pump L-7100 ((株) 日立ハイテクノロジーズ、東京)

HITACHI Chromato-Integrator D-2500 ((株) 日立ハイテクノロジーズ、東京)

<遠心分離器>

MX-200 ((株) トミー精工、東京)

KUBOTA 2410 (久保田商事 (株)、東京)

<恒温槽>

MC-0203 (Major Science、CA、USA)

試薬

Acetonitrile (関東化学 (株)、東京)

TFA (和光純薬工業 (株)、大阪)

【参考文献】

- 1) J.K. Wong, T.S. Wan: Doping control analyses in horseracing: a clinician's guide. *Vet J.* **200**:8-16 (2014).
- 2) S. Aramaki, M. Mori, M. Nakata, A. Shinohara, T. Koizumi: Pharmacokinetics of propranolol and its metabolites in horses after intravenous or oral administration. *Biol Pharm Bull.* **23**:1333-1340 (2000).
- 3) Z. Kaabia, G. Dervilly-Pinel, M.A. Popot, L. Bailly-Chouriberry, P. Plou, Y. Bonnaire, B. Le Bizec: Monitoring the endogenous steroid profile disruption in urine and blood upon nandrolone administration: An efficient and innovative strategy to screen for nandrolone abuse in entire male horses. *Drug Test Anal.* **6**:376-388 (2014).
- 4) P. Teale, C. Barton, P.M. Driver, R.G. Kay: Biomarkers: unrealized potential in sports doping analysis. *Bioanalysis.* **1**:1103-1118 (2009).
- 5) P.L. Toutain: Veterinary medicines and competition animals: the question of medication versus doping control. *Handb Exp Pharmacol.* **199**:315-339 (2010).
- 6) P. Teale, J. Scarth, S. Hudson: Impact of the emergence of designer drugs upon sports doping testing. *Bioanalysis.* **4**:71-88 (2012).
- 7) L.H. Duntas, V. Popovic: Hormones as doping in sports. *Endocrine.* **43**:303-313 (2013).
- 8) C. Barton, P. Beck, R. Kay, P. Teale, J. Roberts: Multiplexed LC-MS/MS analysis of horse plasma proteins to study doping in sport. *Proteomics.* **9**:3058-3065 (2009).
- 9) L. Huang, G. Harvie, J.S. Feitelson, K. Gramatikoff, D.A. Herold, D.L. Allen, R. Amunngama, R.A. Hagler, M.R. Pisano, W.W. Zhang, X. Fang: Immunoaffinity separation of plasma proteins by IgY microbeads: meeting the needs of proteomic sample preparation and analysis. *Proteomics.* **5**:3314-3328 (2005).
- 10) E.W. Hill, J. Gu, S.S. Eivers, R.G. Fonseca, B.A. McGivney, P. Govindarajan, N. Orr, L.M. Katz, D.E. MacHugh: A sequence polymorphism in MSTN predicts sprinting ability and racing stamina in thoroughbred horses. *PLoS One.* **5**:e8645 (2010).

- 11) J.L. Petersen, S.J. Valberg, J.R. Mickelson, M.E. McCue: Haplotype diversity in the equine myostatin gene with focus on variants associated with race distance propensity and muscle fiber type proportions. *Anim Genet.* **45**:827-835 (2014).
- 12) H. Abe: Role of histidine-related compounds as intracellular proton buffering constituents in vertebrate muscle. *Biochemistry (Mosc).* **65**:757-765 (2000).
- 13) A.R. Hipkiss: Carnosine and its possible roles in nutrition and health. *Adv Food Nutr Res.* **57**:87-154 (2009).
- 14) S. Budzeń, J. Rymaszewska: The biological role of carnosine and its possible applications in medicine. *Adv Clin Exp Med.* **22**:739-744 (2013).
- 15) A.A. Boldyrev, G. Aldini, W. Derave: Physiology and pathophysiology of carnosine. *Physiol Rev.* **93**:1803-1845 (2013).
- 16) C. Sale, G.G. Artioli, B. Gualano, B. Saunders, R.M. Hobson, R.C. Harris: Carnosine: from exercise performance to health. *Amino Acids.* **44**:1477-1491 (2013).
- 17) W. Derave, G. Jones, P. Hespel, R.C. Harris: Creatine supplementation augments skeletal muscle carnosine content in senescence-accelerated mice (SAMP8). *Rejuvenation Res.* **11**:641-647 (2008).
- 18) Y. Suzuki, O. to, H. Takahashi, K. Takamatsu: The effect of sprint training on skeletal muscle carnosine in humans. *International Journal of Sports and Health Science.* **2**:105-110 (2004).
- 19) W.S. Parkhouse, D.C. McKenzie, P.W. Hochachka, W.K. Ovalle: Buffering capacity of deproteinized human vastus lateralis muscle. *J Appl Physiol.* **58**:14-17 (1985).
- 20) M. Dunnett, R.C. Harris: Carnosine, and taurine contents of type I, IIA and IIB fibres in the middle gluteal muscle. *Equine vet. J. Suppl.* **18**:214-217 (1995).
- 21) M. Dunnett, R.C. Harris: High-performance liquid chromatographic determination of imidazole dipeptides, histidine, 1-methylhistidine and 3-methylhistidine in equine and camel muscle and individual muscle fibres. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl.* **688**:47-55 (1997).

- 22) R.C. Harris, M. Dunnett, P.L. Greenhaff: Carnosine and taurine contents in individual fibres of human vastus lateralis muscle. *J of Sports Sci.* **16**:639-643 (1998).
- 23) C.A. Hill, R.C. Harris, H.J. Kim, B.D. Harris, C. Sale, L.H. Boobis, C.K. Kim, J.A. Wise: Influence of beta-alanine supplementation on skeletal muscle carnosine concentrations and high intensity cycling capacity. *Amino Acids.* **32**:225-233 (2007).
- 24) M.J. Tallon, R.C. Harris, N. Maffulli, M.A. Tarnopolsky: Carnosine, taurine and enzyme activities of human skeletal muscle fibres from elderly subjects with osteoarthritis and young moderately active subjects. *Biogerontology.* **8**:129-137 (2007).
- 25) I.P. Kendrick, H.J. Kim, R.C. Harris, C.K. Kim, V.H. Dang, T.Q. Lam, T.T. Bui, J.A. Wise: The effect of 4 weeks beta-alanine supplementation and isokinetic training on carnosine concentrations in type I and II human skeletal muscle fibres. *Eur J Appl Physiol.* **106**:131-138 (2009).
- 26) A. Tsugita, T. Kawakami, T. Uchida, T. Sakai, M. Kamo, T. Matsui, Y. Watanabe, T. Morimasa, K. Hosokawa, T. Toda.: Proteome analysis of mouse brain: two-dimensional electrophoresis profiles of tissue proteins during the course of aging. *Electrophoresis.* **21**:1853-1871 (2000).
- 27) S.P. Gygi, G.L. Corthals, Y. Zhang, Y. Rochon, R. Aebersold.: Evaluation of two-dimensional gel electrophoresis-based proteome analysis technology. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **97**:9390-9395 (2000).
- 28) S. Schröder, H. Zhang, E.S. Yeung, L. Jansch, C. Zabel, H. Wätzig.: Quantitative gel electrophoresis: sources of variation. *J Proteome Res.* **7**:1226-1234 (2008).
- 29) S.R. Langley, J. Dwyer, I. Drozdov, X. Yin, M. Mayr: Proteomics: from single molecules to biological pathways. *Cardiovasc Res.* **97**:612-622 (2013).
- 30) Y. Zhang, B.R. Fonslow, B. Shan, M.C. Baek, J.R. Yates: Protein analysis by shotgun/bottom-up proteomics. *Chem Rev.* **113**:2343-2394 (2013).
- 31) S.L. Wu, H. Amato, R. Biringer, Choudhary G, P. Shieh, W.S. Hancock.:

- Targeted proteomics of low-level proteins in human plasma by LC/MSn: using human growth hormone as a model system. *Proteome Res.* **1**:459-465 (2002).
- 32) H. Liu, R.G. Sadygov, J.R. ^{3rd} Yates: A model for random sampling and estimation of relative protein abundance in shotgun proteomics. *Anal Chem.* **76**:4193-4201 (2004).
- 33) P. He H.Z. He, J. Dai, Y. Wang, Q.H. Sheng, L.P. Zhou, Z.S. Zhang, Y.L. Sun, F. Liu, K. Wang, J.S. Zhang, H.X. Wang, Z.M. Song, H.R. Zhang, R. Zeng, X. Zhao: The human plasma proteome: analysis of Chinese serum using shotgun strategy. *Proteomics.* **5**:3442-3453 (2005).
- 34) J. Shaw, R. Rowlinson, J. Nickson, T. Stone, A. Sweet, K. Williams, R. Tonge: Evaluation of saturation labelling two-dimensional difference gel electrophoresis fluorescent dyes. *Proteomics.* **3**:1181-1195 (2003).
- 35) R. Marouga, S. David, E. Hawkins: The development of the DIGE system: 2D fluorescence difference gel analysis technology. *Anal Bioanal Chem.* **382**:669-678 (2005).
- 36) K. Imai, T. Ichibangase, R. Saitoh, Y. Hoshikawa: A proteomics study on human breast cancer cell lines by fluorogenic derivatization-liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Biomed Chromatogr.* **22**:1304-1314 (2008).
- 37) T. Ichibangase, K. Moriya, K. Koike, K. Imai: A proteomics method revealing disease-related proteins in livers of hepatitis-infected mouse model. *J Proteome Res.* **6**:2841-2849 (2007).
- 38) T. Ichibangase, K. Imai: Application of fluorogenic derivatization-liquid chromatography-tandem mass spectrometric proteome method to skeletal muscle proteins in fast Thoroughbred horses. *J Proteome Res.* **8**:2129-2134 (2009).
- 39) T. Ichibangase, Y. Sugawara, A. Yamabe, A. Koshiyama, A. Yoshimura, T. Enomoto, K. Imai: An FD-LC-MS/MS proteomic strategy for revealing cellular protein networks: a conditional superoxide dismutase 1 knockout cells. *PLoS One.* **7**:e45483 (2012).
- 40) A. Koshiyama, T. Ichibangase, K. Imai: Comprehensive fluorogenic derivatization-liquid chromatography/tandem mass spectrometry proteomic analysis of colorectal

- cancer cell to identify biomarker candidate. *Biomed Chromatogr.* **27**:440-450 (2013).
- 41) W.J. Qian, J.M. Jacobs, T. Liu, D.G. 2nd Camp, R.D. Smith: Advances and challenges in liquid chromatography-mass spectrometry-based proteomics profiling for clinical applications. *Mol Cell Proteomics.* **5**:1727-1744 (2006).
- 42) T. Linke, S. Doraiswamy, E.H. Harrison: Rat plasma proteomics: effects of abundant protein depletion on proteomic analysis. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* **849**:273-281 (2007).
- 43) V. Polaskova, A. Kapur, A. Khan, M.P. Molloy, M.S. Baker: High-abundance protein depletion: comparison of methods for human plasma biomarker discovery. *Electrophoresis.* **31**:471-482 (2010).
- 44) E. Bellei, S. Bergamini, E. Monari, L.I. Fantoni, A. Cuoghi, T. Ozben, A. Tomasi: High-abundance proteins depletion for serum proteomic analysis: concomitant removal of non-targeted proteins. *Amino Acids.* **40**:145-156 (2011).
- 45) M. Kullolli, J. Warren, M. Arampatzidou, S.J. Pitteri: Performance evaluation of affinity ligands for depletion of abundant plasma proteins. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* **939**:10-16 (2013).
- 46) T. Ichibangase, K. Moriya, K. Koike, K. Imai: Limitation of immunoaffinity column for the removal of abundant proteins from plasma in quantitative plasma proteomics. *Biomed Chromatogr.* **23**:480-487 (2009).
- 47) A.K. Yadav, G. Bhardwaj, T. Basak, D. Kumar, S. Ahmad, R. Priyadarshini, A.K. Singh, D. Dash, S. Sengupta: A systematic analysis of eluted fraction of plasma post immunoaffinity depletion: implications in biomarker discovery. *PLoS One.* **6**:e24442 (2011).
- 48) R. Garcia-Villar, P. L. Toutain, M. Alvinerie, Y. Ruckebusch: The pharmacokinetics of xylazine hydrochloride: an interspecific study. *J Vet Pharmacol Ther.* **4**:87-92 (1981).
- 49) A. Santonastaso, J. Hardy, N. Cohen, V. Fajt: Pharmacokinetics and pharmacodynamics of xylazine administered by the intravenous or intra-osseous route in adult horses. *J Vet Pharmacol Ther.* **37**:565-570 (2014).

- 50) H.R. Amouzadeh, C. W. Qualls, Jr, J. H. Wyckoff^{3rd}, G. K. Dzata, S. Sangiah, A. Mauromoustakos, L.E. Stein: Biochemical and morphological alterations in xylazine-induced pulmonary edema. *Toxicol Pathol.* **21**:562-571 (1993).
- 51) C.S. Celly, O.S. Atwal, W.N. McDonell, W.D. Black: Histopathologic alterations induced in the lungs of sheep by use of alpha2-adrenergic receptor agonists. *Am J Vet Res.* **60**:154-161 (1999).
- 52) D.O. Azulay, H. Neubert, M.F. Ocaña: Visualisation tool for peptide fractionation data in proteomics: application to OFFGEL isoelectric focusing. *BMC Bioinformatics.* **11**:371 (2010).
- 53) M. Hashimoto, Y. Asai, T. Ogawa: Separation and structural analysis of lipoprotein in a lipopolysaccharide preparation from *Porphyromonas gingivalis*. *Int Immunol.* **16**:1431-1437 (2004).
- 54) M. Takeuchi, Y. Kimata, A. Hirata, M. Oka, K. Kohno: *Saccharomyces cerevisiae* Rot1p is an ER-localized membrane protein that may function with BiP/Kar2p in protein folding. *J Biochem.* **139**:597-605 (2006).
- 55) C. Ozawa, H. Hojo, Y. Nakamura, H. Katayama, K. Nabeshima, T. Akahane, Y. Nakahara: Synthesis of glycopeptide dendrimer by a convergent method. *Tetrahedron.* **63**: 9685-9690 (2007).
- 56) G.C.W. England, K.W. Clarke: Alpha2 adrenoceptor agonists in the horse-A review. *British Veterinary Journal.* **152**:641-657 (1996).
- 57) 永田俊一, 山田雅之, 山下正三, 黒澤雅彦 I-1. 鎮静作用を有する薬物の検査法開発に関する研究. 平成 22 年度日本中央競馬会委託研究・研究成績. 1-25 (2010).
- 58) M. Mori, T. Ichibangase, S. Yamashita, I. Kijima-Suda, M. Kawahara, K. Imai: Quantification of horse plasma proteins altered by xylazine using the fluorogenic derivatization-liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Equine Sci.* **26**:141-146 (2015).
- 59) J. Füvesi, J. Hanried, K. Bencsik, C. Rajda, S.K. Kovács, L. Kaizer, S. Beniczky, L. Vécsei, J. Bergquist: Proteomic analysis of cerebrospinal fluid in a fulminant case of multiple sclerosis. *Int J Mol Sci.* **13**:7676-7693 (2012).

- 60) Y. Ahmad, N.K. Sharma, M. Ahmad, F., M. Sharma, I. Garg, K. Bhargava: Proteomic entification of novel differentiation plasma protein markers in hypobaric hypoxia-induced rat model. *PLoS One*. **9**:e98027 (2014).
- 61) H. Okubo, O. Miyanaga, M. Nagano, H. Ishibashi, J. Kudo, T. Ikuta, K. Shibata: Purification and immunological determination of alpha 2-macroglobulin in serum from injured rats. *Biochim Biophys Acta*. **668**:257-267 (1981).
- 62) P.D. Eckersall, F.P. Lawson, L. Bence, M. Waterston, T.L. Lang, W. Donachie, M.C. Fontaine: Acute phase protein response in an experimental model of ovine caseous lymphadenitis. *BMC Vet Res*. **3**:35 (2007).
- 63) T.D. Munhoz, J.L. Faria, G. Vargas-Hernandez, J.J. Fagliari, A.E. Santana, R.Z. Machado, M. Tinucci-Costa: Experimental Ehrlichia canis infection changes acute-phase proteins. *Rev Bras Parasitol Vet*. **21**:206-212 (2012).
- 64) O.S. Atwal, W. McDonnell, H. Staempfli, B. Singh, K.J. Minhas: Evidence that halothane anaesthesia induces intracellular translocation of surface coat and Golgi response in equine pulmonary intravascular macrophages. *J Submicrosc Cytol Pathol*. **26**:369-386 (1994).
- 65) F. Hintz: Nutrition and equine performance. *J. Nutr*. **124**:2723S-2729S. (1994).
- 66) R.C. Harris, J.A. Wise, K.A. Price, H.J. Kim, C.K. Kim, C. Sale: Determinants of muscle carnosine content. *Amino Acids*. **43**:5-12 (2012).
- 67) H. Koyama, K. Konoha, Y. Sadakane, S. Ohkawara, M. Kawahara: Zinc neurotoxicity and the pathogenesis of vascular-type dementia: Involvement of calcium dyshomeostasis and carnosine. *J. Clin Toxicol*. S3-002 (2012).
- 68) M. Kawahara, Y. Sadakane, H. Koyama, K. Konoha, S. Ohkawara: D-histidine and L-histidine attenuate zinc-induced neuronal death in GT1-7 cells. *Metallomics*. **5**: 453-460 (2013).
- 69) D. Mizuno M. Kawahara: The molecular mechanism of zinc neurotoxicity and the pathogenesis of vascular type dementia. *Intern. J. Mol. Sci*. **14**:22067-22081 (2013).
- 70) M. Kawahara, D. Mizuno, H. Koyama, K. Konoha, S. Ohkawara, Y. Sadakane: Disruption of zinc homeostasis and the pathogenesis of senile dementia. *Metallomics*. **6**:209-219 (2013).

- 71) D. Mizuno, M. Kawahara: Carnosine: A Possible Drug for Vascular Dementia. *J Vasc Med Surg* **2**:146 (2014).
- 72) D. Mizuno, H. Koyama, S. Ohkawara, Y. Sadakane, M. Kawahara: Involvement of trace elements in the pathogenesis of prion diseases. *Curr Pharam Biotech.* **15**: 1049-1057 (2014).
- 73) Mizuno D, K. Konoha-Mizuno, M. Mori, Y. Sadakane, H. Koyama, S. Ohkawara, M. Kawahara; Protective activity of carnosine and anserine against zinc-induced neurotoxicity: a possible treatment for vascular dementia. *Metallomics.* **7**:1233-1239 (2015).
- 74) J.J. Quesnele, M.A. Laframboise, J.J. Wong, P. Kim, G.D. Wells: The effects of beta-alanine supplementation on performance: a systematic review of the literature. *Int J Sport Nutr Exerc Metab.* **24**:14-27 (2014).
- 75) M. Kawai, Y. Minami, Y. Sayama, A. Kuwano, A. Hiraga, H. Miyata: Muscle fiber population and biochemical properties of whole body muscles in Thoroughbred horses. *Anat Rec (Hoboken).* **292**:1663-1669 (2009).
- 76) D.A. Sewell, R.C. Harris, D.J. Marlin, M.Dunnett: Estimation of the carnosine content of different fibre types in the middle gluteal muscle of the thoroughbred horse. *J Physiol.* **455**:447-453 (1992).
- 77) R. Gatti, P. Andreatta, S.Boschetti: An high-performance liquid chromatographic method for the simultaneous analysis of acetylcarnitine taurinate, carnosine, asparagine and potassium aspartate and for the analysis of phosphoserine in alimentary supplements. *J Chromatogr A.* **1298**:95-102 (2013).
- 78) A.N. Fonteh, R.J. Harrington, M.G. Harrington: Quantification of free amino acids and dipeptides using isotope dilution liquid chromatography and electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Amino Acids.* **32**:203-212 (2007).
- 79) A. Macià, M.J. Motilva, M.P. Romero, A. Labrador, A. Domínguez, L. Peiro: Improved liquid-chromatography tandem mass spectrometry method for the determination of the bioactive dipeptides, carnosine and anserine: application to analysis in chicken broth. *Talanta.* **93**:293-300 (2012).
- 80) M. Mori, D. Mizuno, K. Konoha-Mizuno, Y. Sadakane, M. Kawahara:

- Quantitative of carnosine and anserine in foods by performing high performance liquid chromatography. *Biomedical Research on Trace Elements*. **26**:147-152 (2015).
- 81) D.J. Marlin, R.C. Harris, S.P. Gash, D.H. Snow: Carnosine content of the middle gluteal muscle in thoroughbred horses with relation to age, sex and training. *Comp Biochem Physiol A Comp Physiol*. **93**:629-632 (1989).
- 82) M.Mori, D.Mizuno, K.Konoha-Mizuno, Y.Sadakane, M.Kawahara: Carnosine concentration in the muscle of thoroughbred horses and its implications in exercise performance. *Trace Nutrients Research*. **32**:49-53 (2015).
- 83) L. Mora, M.Á. Sentandreu, F.Toldrá: Contents of creatine, creatinine and carnosine in porcine muscles of different metabolic types. *Meat Sci*. **79**:709-715 (2008).
- 84) M. Dunnett, R.C. Harris, C.E. Dunnett, P.A.Harris : Plasma carnosine concentration: diurnal variation and effects of age, exercise and muscle damage. *Equine Vet J Suppl*. **34**:283-287 (2002).

謝辞

本研究は、武蔵野大学薬学研究所プロテオアナリシス客員研究部門 今井一洋 教授ならびに武蔵野大学薬学部生命分析化学研究室 川原正博 教授の終始変わらざる暖かい御指導とご鞭撻のもとに行われました。謹んで感謝の意を表します。

本研究に際し、終始後懇篤なご指導と激励を賜りました、武蔵野大学薬学研究所プロテオアナリシス客員研究部門 一番ヶ瀬智子 講師ならびに山形大学医学部法医学講座 水野大 准教授に謹んで感謝いたします。

NATIVEN 装置をご提供いただいた ATTO 株式会社 久保田英博取締役に深く感謝いたします。

試料採材にご協力いただきました日本中央競馬会競走馬総合研究所 間弘子室長、桑野睦敏室長、琴寄泰光氏、関一洋氏に感謝の意を表します。

武蔵野大学大学院での研究の機会を与えてくださいました、公益財団法人競走馬理化学研究所 益満宏行理事長、黒澤雅彦常務理事、武田純太郎常務理事、水野豊香前理事長、栗田晴夫元理事長に感謝いたします。終始ご指導、ご鞭撻を賜りました、須田功部長、山下正三課長に深謝いたします。また、終始励ましをいただきました研究所の皆様にも心から感謝いたします。

最後に、私を温かく励まし支えてくれた母、家族、友人に心より感謝いたします。

2016 年 3 月