

薬理学的研究への応用を目的とした統合失調症関連  
内因性物質の LC-MS/MS 定量法の開発

木下幸之助

本学位論文は、下記の原著論文を基に作成され、東北大学大学院薬学研究科に提出されたものである。

1. K. Kinoshita, S. Jingu, J. Yamaguchi, A surrogate analyte method to determine D-serine in mouse brain using liquid chromatography–tandem mass spectrometry, *Anal. Biochem.* 432 (2013) 124–130.
2. K. Kawaura, H. Koike, K. Kinoshita, D. Kambe, A. Kaku, J. Karasawa, S. Chaki, H. Hikichi, Effects of a glycine transporter-1 inhibitor and D-serine on MK-801-induced immobility in the forced swimming test in rats, *Behav. Brain Res.* 278 (2015) 186–192.
3. K. Kinoshita, K. Arai, K. Kawaura, T. Hiyoshi, J. Yamaguchi, Development, validation, and application of a surrogate analyte method for determining *N*-acetyl-L-aspartyl-L-glutamic acid levels in rat brain, plasma, and cerebrospinal fluid, *J. Chromatogr. B* 1003 (2015) 1–11.

# 目 次

緒論.....	1
第1章 サロゲートアナライト法の構築と応用	
第1節 サロゲートアナライト法の構築と内因性物質定量における有用性	
1. 序.....	11
2. サロゲートアナライト法の構築.....	11
2.1. サロゲートアナライトの調製.....	11
2.2. サロゲートアナライトの性能評価.....	16
3. 内因性物質定量におけるサロゲートアナライト法の有用性の検討..	18
3.1. サロゲートアナライト法による生体試料中 NAAG の測定....	18
3.2. サロゲートマトリックス法による生体試料中 NAAG の測定..	21
3.3. サロゲートアナライト法とサロゲートマトリックス法の比較..	23
4. 小括.....	24
第2節 ラット生体試料中 NAAG の定量法開発と生体内変動の解析	
1. 序.....	25
2. サロゲートアナライト法を用いたラット脳、血漿および CSF 中 NAAG の定量法開発.....	25
2.1. LC 条件の設定.....	25
2.2. ラット脳および血漿中 NAAG の定量法.....	28
2.3. ラット CSF 中 NAAG の定量法.....	33
2.4. 標準添加法との性能比較.....	35
3. NAAG 分解酵素阻害剤投与時のラット脳、血漿および CSF 中 NAAG の動態.....	36
4. 小括.....	38

## 第2章 D-セリンの迅速光学分割法の開発と応用

### 第1節 生体試料中 D-セリンの定量法開発

1. 序.....	39
2. D-セリン定量法の開発.....	39
2.1. 光学分割条件の設定.....	39
2.2. マウス脳内 D-セリンの定量法.....	42
2.3. ラット脳および CSF 中 D-セリンの定量法.....	47
3. 小括.....	49

### 第2節 統合失調症の陰性症状モデル動物における陰性症状発症機序の考察

1. 序.....	50
2. 陰性症状モデルとしての MK-801 反復投与ラット強制水泳モデル の妥当性.....	51
3. 陰性症状モデル動物に対する D-セリンの効果.....	53
4. 陰性症状モデル動物における D-セリン濃度の変動.....	54
5. 小括.....	56

総括.....	57
---------	----

謝辞.....	59
---------	----

### 実験の部

第1章、第1節附属実験.....	60
第1章、第2節附属実験.....	65
第2章、第1節附属実験.....	69
第2章、第2節附属実験.....	74

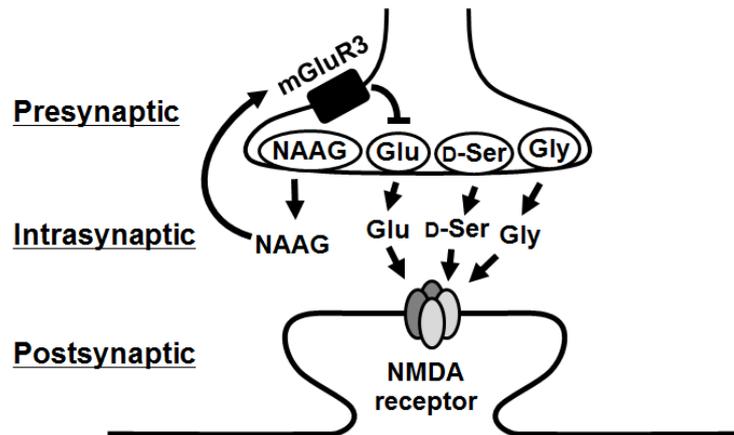
引用文献.....	77
-----------	----

## 略号一覧

CID	Collision-induced dissociation、衝突誘起解離
CSF	Cerebrospinal fluid、脳脊髄液
ED <sub>50</sub>	Median effective dose、50%効果量
ESI	Electrospray ionization、エレクトロスプレーイオン化
HILIC	Hydrophilic interaction chromatography、親水性相互作用クロマトグラフィー
LC	Liquid chromatography、液体クロマトグラフィー
LC-MS/MS	Liquid chromatography/tandem mass spectrometry、液体クロマトグラフィー／タンデム質量分析
LLOQ	Lower limit of quantification、定量下限
mGlu	Metabotropic glutamate、代謝型グルタミン酸
MS	Mass spectrometry、質量分析
MS/MS	Tandem mass spectrometry、タンデム質量分析
NAAG	<i>N</i> -acetyl-L-aspartyl-L-glutamic acid、 <i>N</i> -アセチルアスパラチルグルタミン酸
NMDA	<i>N</i> -methyl-D-aspartic acid、 <i>N</i> -メチル D-アスパラギン酸
ODS	Octadecyl silyl、オクタデシルシリル
PFC	Prefrontal cortex、前頭前皮質
QC	Quality control、品質管理
S/N	Signal-to-noise ratio、シグナルとノイズの比
SRM	Selected reaction monitoring、選択反応モニタリング
UV	Ultraviolet、紫外

## 緒 論

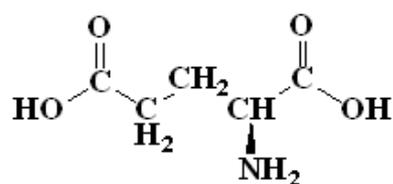
統合失調症は主に青年期に発症し、人口の約 1%が罹患する精神疾患である。幻覚や妄想等の陽性症状や、引きこもりや意欲低下等の陰性症状のほか、思考や判断等の生活および社会活動に支障をきたす認知機能障害が見られる。もともとドーパミン D2 受容体拮抗作用を有するクロルプロマジンおよびハロペリドールにより治療が行われたことから、ドーパミンの過剰放出が病因と考えられ、いわゆるドーパミン仮説が提唱された<sup>1)</sup>。その後、ドーパミン仮説に基づく薬剤が複数開発されたが、陽性症状には効果を示すものの、陰性症状や認知機能障害への効果は不十分とされている<sup>1)</sup>。そこで、ドーパミン仮説とは異なるメカニズムに基づく創薬が注目されるようになり、グルタミン酸仮説が提唱されるに至った<sup>1-6)</sup>。グルタミン酸仮説では、*N*-メチル-D-アスパラギン酸 (NMDA) 受容体拮抗薬が、健常者に対して陽性症状、陰性症状および認知機能障害と類似した症状を引き起こすこと、統合失調症患者に対して陽性症状、陰性症状および認知機能障害を増悪することから、本疾患がグルタミン酸神経機能異常、あるいは NMDA 受容体機能低下に起因するとしている<sup>4,7,8)</sup>。NMDA 受容体 (Fig. A) はグルタミン酸受容体の一種であり、NMDA やグルタミン酸が結合するアゴニストサイト、グリシンや D-セリンが結合するコ・アゴニストサイトを持つ<sup>2)</sup>。アゴニストサイトに作用する薬物 (作動薬) は、神経細胞死や痙攣を誘発する懸念があり、治療薬としては不適切とされる。一方、コ・アゴニストサイト作動薬は、NMDA 受容体機能を活性化することが報告されており、統合失調症の治療アプローチとして注目されている<sup>9-13)</sup>。



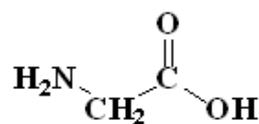
**Fig. A Schematic representation of NMDA receptor and related endogenous substances.**

**mGluR3: metabotropic glutamate receptor 3, NAAG: *N*-acetyl-L-aspartyl-L-glutamic acid, Glu: L-glutamic acid, D-Ser: D-serine, Gly: glycine**

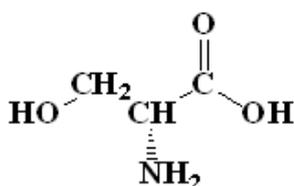
現在、統合失調症の診断は、臨床症状および世界保健機関の国際疾病分類第10版、あるいは米国精神医学会の精神疾患の診断統計マニュアル第5版に基づく問診で行われている。症状が重篤で患者本人への問診が不可能な場合は、家族に対して問診が行われることもあるが、いずれも診断法としては客観性に乏しい。こうした状況から、統合失調症は、疾患に関連する内因性物質、いわゆるバイオマーカーによる客観的な診断および治療効果等の測定が強く望まれている疾患の一つである<sup>14)</sup>。これまでに、グルタミン酸仮説に基づく統合失調症関連内因性物質として、グルタミン酸、グリシン、D-セリンおよび*N*-アセチルアスパラチルグルタミン酸 (NAAG) 等が報告されている<sup>2,15-17)</sup> (Fig. B)。これらの統合失調症発症の分子メカニズムとの関連を調べるとともに、診断や治療効果を測るマーカーとしての性能を評価するには、生体試料中濃度を再現性よく正確に測定する必要がある<sup>14)</sup>。



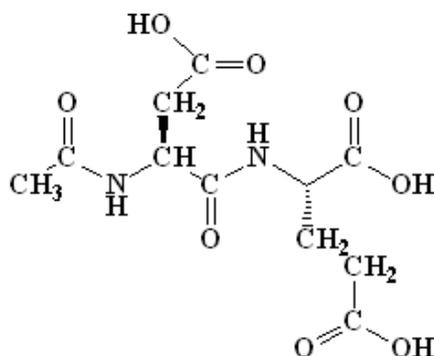
**L-Glutamic acid**  
(log *P* -3.2)



**Glycine**  
(log *P* -3.4)



**D-Serine**  
(log *P* -3.9)



**NAAG**  
(log *P* -2.3)

**Fig. B** Chemical structures of L-glutamic acid, glycine, D-serine, and NAAG, and their log *P* values.

血液、尿、脳脊髄液（CSF）および組織ホモジネート等の生体試料中の微量物質を定量するには、測定対象物（アナライト）を抽出したのちに何らかの方法で分析する必要があるが、このとき複雑な混合成分の分離に威力を発揮するクロマトグラフィーがよく用いられる。しかも、対象となる内因性物質にはアミノ基、水酸基、およびカルボキシ基等の極性官能基を有するものが多いことから、水溶液を移動相として用いることが可能な液体クロマトグラフィー（LC）が汎用されている<sup>18-30</sup>。LCの検出法には、紫外（UV）／可視吸光検出、蛍光検出、電気化学検出、放射線検出、質量分析（MS）およびタンデム質量分析（MS/MS）等がある。これらのうち、最も選択性の高いMS/MSは、複雑かつ

多量の夾雑物中のアナライトを高感度に検出可能であり、これを LC に接続した、液体クロマトグラフィー／タンデム質量分析 (LC-MS/MS) が内因性物質の測定に汎用されている<sup>18-20,24-29)</sup>。

LC-MS/MS を用いた測定では、その検出原理上、液体クロマトグラフと MS/MS 装置とのインターフェース部にあるイオン源でアナライトをイオン化する必要がある。エレクトロスプレーイオン化 (ESI) 法は、熱に不安定で極性が高い物質のイオン化も可能なことから、生体試料中の成分の分析に適している。しかしながら、ESI 法は、微細液滴中に共存する物質の影響により、アナライトのイオン化が増強あるいは抑制される、いわゆるマトリックス効果を生じやすい<sup>31)</sup> (Fig. C)。したがって、信頼性の高い定量法を構築するには、試料の前処理条件を工夫するとともに LC の分離条件を十分に吟味し、可能な限りマトリックス効果の回避を検討することが重要となる。

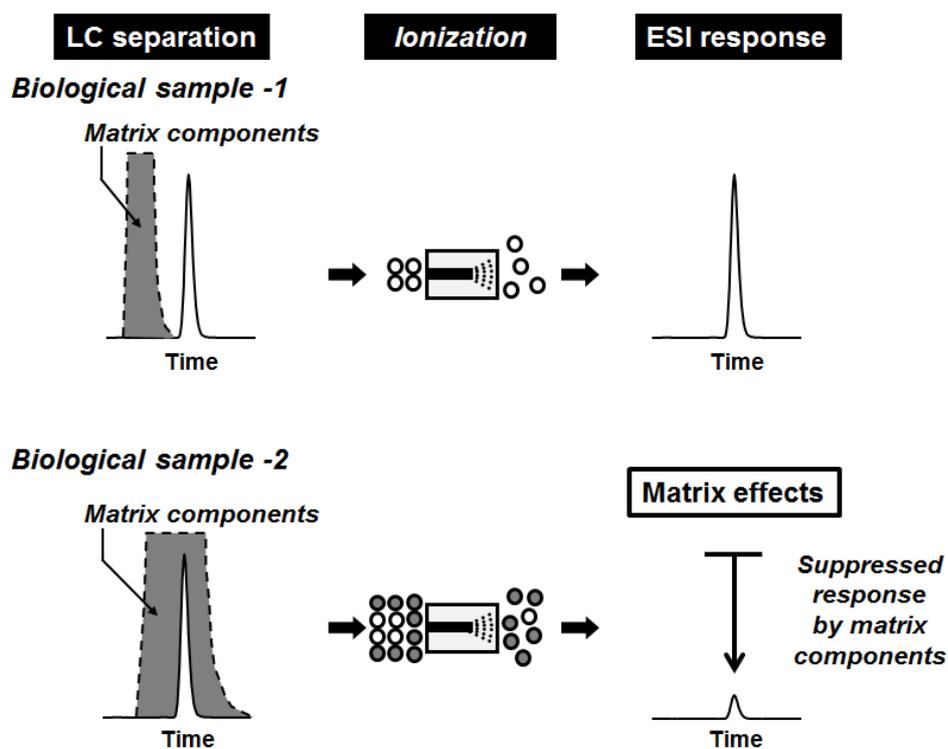
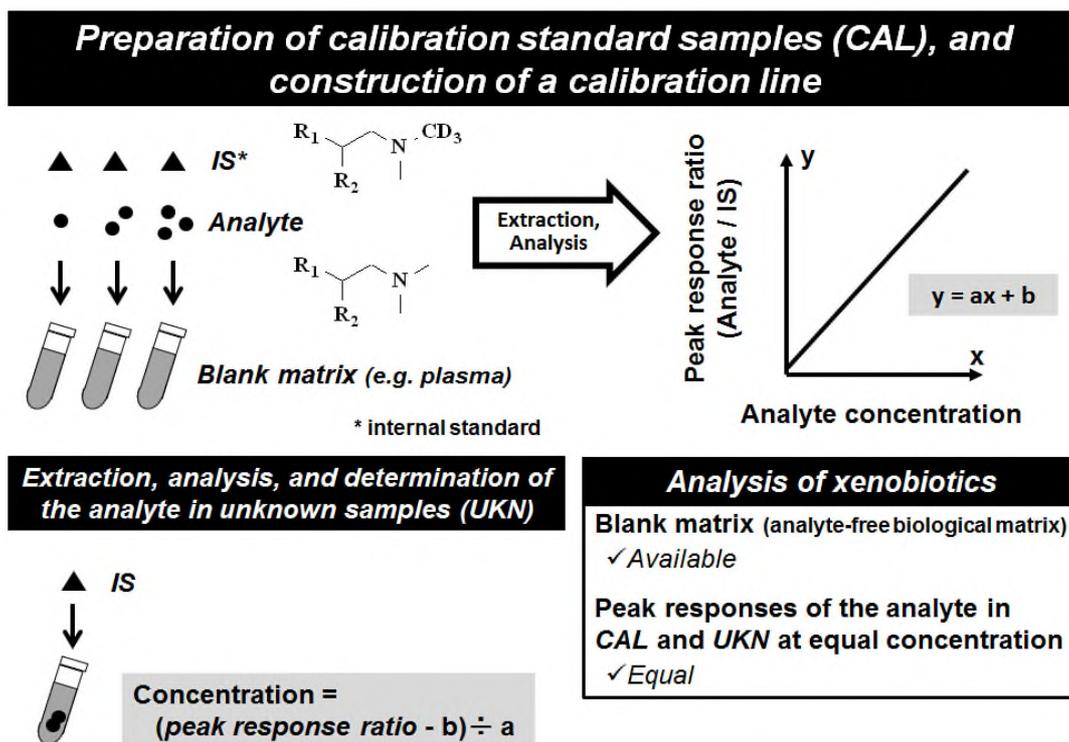


Fig. C Schematic representation of matrix effects in LC-ESI-MS/MS.

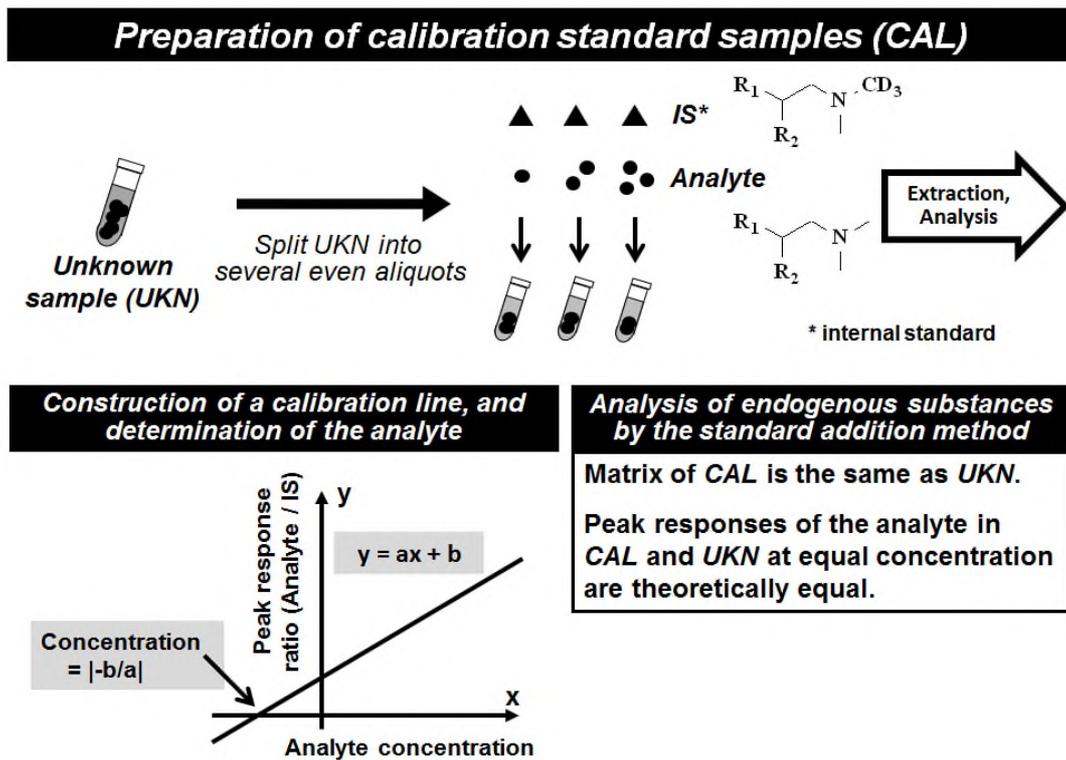
LC-MS/MS を用いて内因性物質を測定する場合、いくつかの解決すべき課題がある。その 1 つが、内因性物質は生体内にもともと存在するため、濃度の算出法や分析法バリデーションの考え方が、薬物のような生体外異物 (xenobiotics) の場合とは異なる<sup>32)</sup>、というものである。通常、濃度未知の検体 (実検体) 中のアナライト濃度を求めるには、アナライトの標準品濃度を段階的に変えて調製した一連の検体 (検量線検体) を測定して検量線を作成し、これを用いて実検体のピークレスポンスを濃度に換算する。また、得られた測定値の妥当性は、既知濃度のアナライトを含む品質管理 (QC) 検体を測定することにより保証する。したがって、正確な定量値を得るとともに、定量法の性能、すなわち定量下限 (LLOQ)、精度、真度、耐久性等を適切に検証 (バリデーション) するには、実検体と検量線/QC 検体の組成を同等にして、検体間におけるアナライトの検出応答性が同等 (モルあたりのレスポンスが同等) になる条件で測定する必要がある。Xenobiotics を定量する場合 (Fig. D) は、アナライトが検出されない生体試料 (ブランクマトリックス) を準備し、これに既知量の標準品を添加した検量線/QC 検体を調製して、検体間におけるアナライトの検出応答性を揃えたうえで、濃度の算出および分析法バリデーションを実施すればよい。しかしながら、そもそもブランクマトリックスの準備が不可能な内因性物質の定量においては、この方法は適用できない。



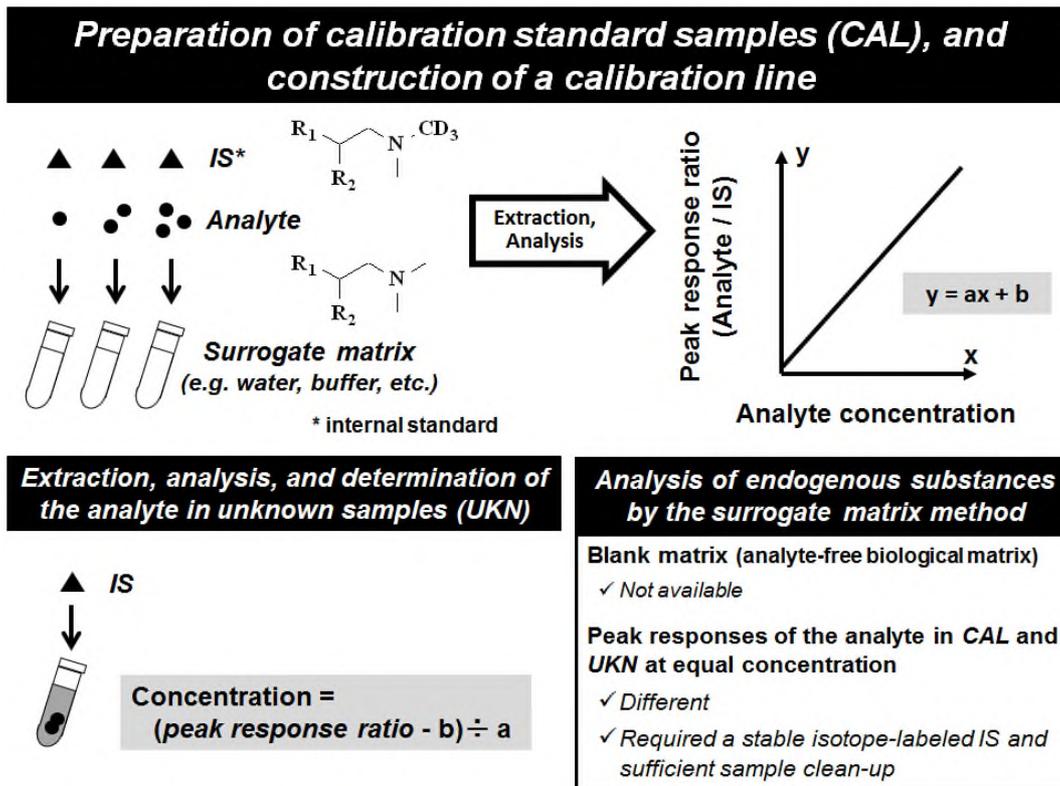
**Fig. D Schematic diagram of the method for the determination of xenobiotics.**

内因性物質の定量においては、主に標準添加法や代替（サロゲート）マトリックス法が用いられる<sup>32-39</sup>。標準添加法（Fig. E）では、まず1つの実検体を等量ずつ複数に分割したのち、それぞれに異なる量の標準品を添加して検量線検体を調製する。次いで、それらを測定し作成した検量線と濃度軸の交点から、実検体中にもともと存在するアナライトの濃度を算出する。実験体と同じマトリックスで検量線検体の調製が可能なることから、先に述べたように、実検体と検量線検体の検出応答性を同等にすることは可能である。しかしながら、微量の内因性物質の分析には不向きであり、測定検体数が実検体の数倍に増えるため、分析時間が長くなる。一方、内因性物質の定量法として汎用されているサロゲートマトリックス法（Fig. F）は、水や緩衝液等を代替マトリックスとして検量線/QC 検体を調製する方法である。本法の場合、実検体とサロゲートマトリックス中に含まれる夾雑物が異なるため、そもそもそれらの影響を正確に

把握することは不可能である。したがって、アナライトと物理化学的性質が同等な安定同位体標識化合物（生体内には存在しない）を内標準物質として実検体および検量線/QC 検体に一定量添加し、夾雑物によって変動したアナライトのレスポンスを補正するとともに、夾雑物の影響を最小限に抑えるために前処理を工夫して試料のクリーンアップを行い、検体間の検出応答性を同等、あるいは十分に近づける努力が不可欠となる<sup>40-42)</sup>。しかしながら、生体内には親水性の物質が多種多量に存在するうえ、それらの分離は困難な場合が多いことから<sup>43-45)</sup>、極性が高い内因性物質の測定においては、必ずしも複雑な夾雑成分との分離が達成できるとは限らない。



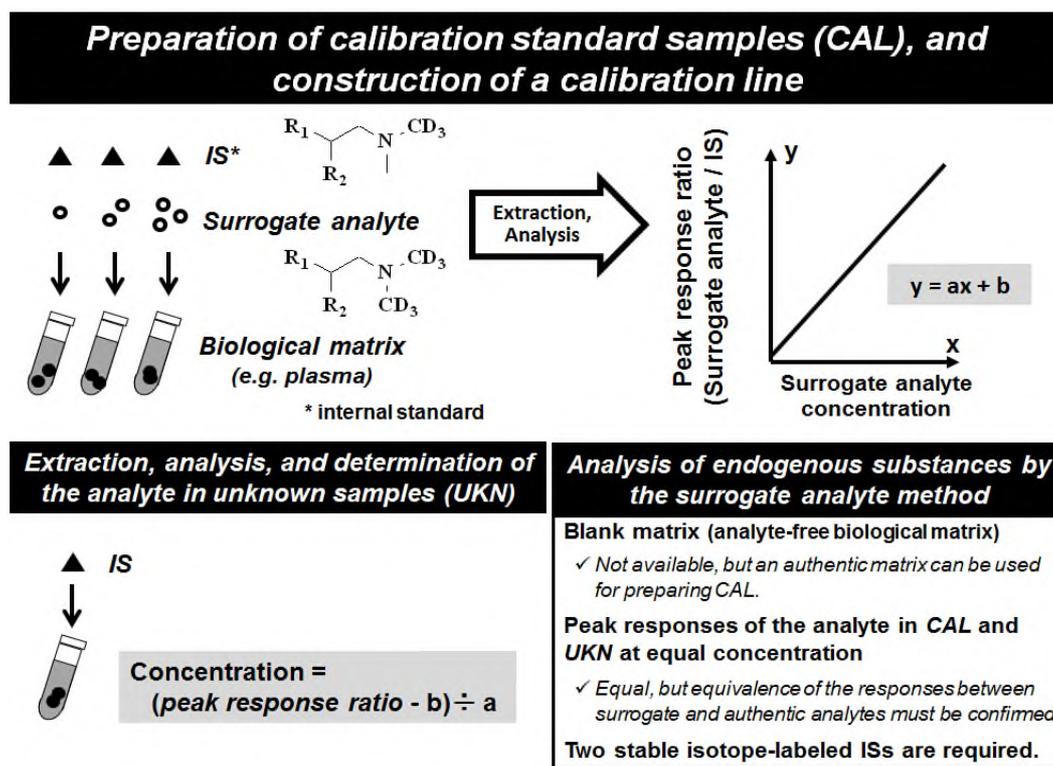
**Fig. E Schematic diagram of the standard addition method.**



**Fig. F Schematic diagram of the surrogate matrix method.**

上記の2種の方法の欠点を克服可能な方法として、サロゲートアナライト法 (Fig. G) があげられる<sup>32,33,36,46,47</sup>。本法は、アナライトの安定同位体標識化合物を2種類準備し、1つを代替 (サロゲート) アナライト、1つを内標準物質として実検体と同種のマトリックスを用いて検量線/QC 検体を調製する方法である。実検体中のアナライト濃度を求めるには、サロゲートアナライトで作成した検量線を用いて、実検体のアナライトのピークレスポンスを濃度に換算する。サロゲートマトリックス法の場合とは異なり、本法では実検体と検量線/QC 検体の組成がほぼ同等、あるいは類似していることから、検体間の夾雑物の違いを解消するための十分なクリーンアップは必ずしも必要なく、xenobiotics と同様に内因性物質を定量することが可能になる。このため、今回測定対象とする NAAG (Fig. B) のように、極性が非常に高く、親水性の夾雑

成分との分離が困難なことが想定される場合には、サロゲートアナライト法が有利と考えられる。これまでに、生体試料中 NAAG の測定法としてサロゲートマトリックス法を駆使した LC-MS/MS 法が 2 件報告されているが<sup>28,29)</sup>、いずれもクリーンアップ効率がよくない方法で前処理を行っているだけでなく、内標準物質を用いない、いわゆる絶対検量線法で定量している。したがって、夾雑物によって NAAG のイオン化が影響を受けやすく、正確に測定できていない可能性がある。そこで、本研究では、統合失調症関連内因性物質である NAAG の高感度定量法を構築するため、サロゲートアナライト法の適用を試みた。



**Fig. G Schematic diagram of the surrogate analyte method.**

さて、LC-MS/MS を用いて内因性物質の測定を行う場合、いくつかの解決すべき課題があると先に述べたが、もう 1 つ別の課題として、不斉炭素を有する内因性物質を測定する場合において、異性体、特に光学異性体（エナンチオマー）との相互分離（光学分割）の条件設定が難しい<sup>18,19)</sup>、というものがある。

内因性物質であるアミノ酸のなかには、タンパク質を構成する L 型ではなく、D 型のエナンチオマーが強力な生理活性を示すものがある<sup>18,19)</sup>。今回測定対象とする D-セリン (Fig. B) は極性が非常に高いアミノ酸の 1 つであり、脳内でセリンラセマーゼによって L-セリンから酵素的変換により生成することが知られている。そのレベルを適切に捉えるには、生体内に存在する多種多量の親水性成分と分離するとともに、多量の L-セリンと微量の D-セリンを確実に分離しなければならない。従来の D-セリン測定法では、光学分割と検出感度の向上を目的に、キラル誘導体化試薬を用いてセリンをジアステレオマーに誘導体化してから分析するアプローチが採られている<sup>18-27)</sup>。しかしながら、誘導体化法は、操作が煩雑でキラル誘導体化試薬の光学純度が結果に大きく影響する、大過剰の試薬自身が夾雑物であり、十分なクリーンアップが必要になる等の制約が多い。このため、光学分割の条件を迅速に設定するのがきわめて難しい。そこで、本研究では、統合失調症関連内因性物質である D-セリンの簡便かつ迅速な LC-MS/MS 定量法を構築するため、誘導体化を行わずに光学分割する方法の開発を試みた。

まず、第 1 章では、高極性物質である NAAG のサロゲートアナライト法を構築し、内因性物質定量法としての有用性につき検証した。次いで、動物において抗精神病作用を示すとの報告がある NAAG 分解酵素阻害剤 (ZJ43) を投与したラットの脳、血漿および CSF 中 NAAG の変動解析に本法を応用し、NAAG 分解酵素阻害剤の薬効発現機序について考察した<sup>48)</sup>。

第 2 章では、煩雑な誘導体化処理を回避した、D-セリンの簡便かつ迅速な光学分割法を開発した<sup>49,50)</sup>。次いで、統合失調症の陰性症状モデルラットの脳および CSF 中 D-セリンの変動解析に本法を応用し、統合失調症の発症、特に陰性症状の発症とこれら組織中の D-セリンとの関連性について考察した<sup>50)</sup>。

# 第1章 サロゲートアナライト法の構築と応用

## 第1節 サロゲートアナライト法の構築と内因性物質定量における有用性

### 1. 序

本節では、神経伝達物質の1つである NAAG のサロゲートアナライト法を構築し、その有用性につき調べることにした。NAAG は、脊椎動物の脳内ペプチドの中で最も高濃度に存在するものの1つであり<sup>51)</sup>、脳内グルタミン酸受容体に結合して神経伝達物質としての役割を果たす<sup>17)</sup>。Fig. B に構造を示したが、3つのカルボキシ基を含むきわめて極性の高い化合物であり、緒論で述べたように、液-液抽出や固相抽出による生体試料からの抽出は難しい。その反面、ジペプチドであるため、安定同位体標識化合物の調製は比較的容易である。

そこでまず、NAAG のサロゲートアナライトを調製し、その性能を評価した。次いで、サロゲートアナライト法を用いてラット生体試料中の NAAG を測定し、その結果について、サロゲートマトリックス法と比較した。

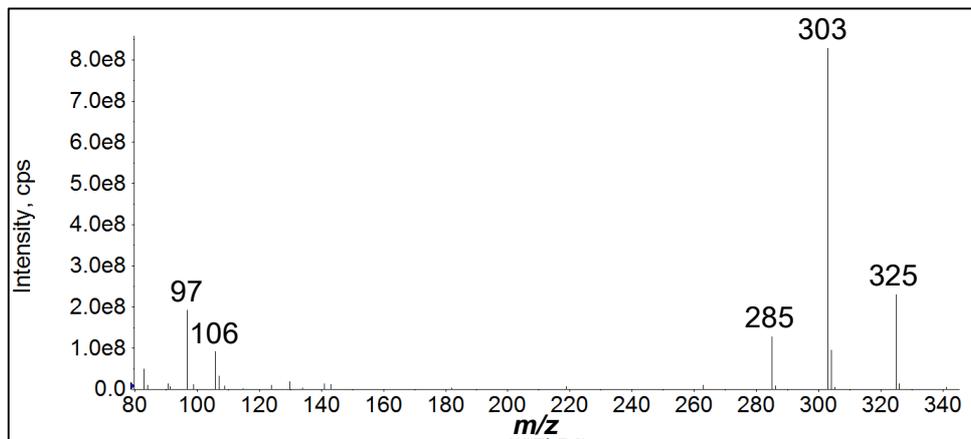
### 2. サロゲートアナライト法の構築

#### 2.1. サロゲートアナライトの調製

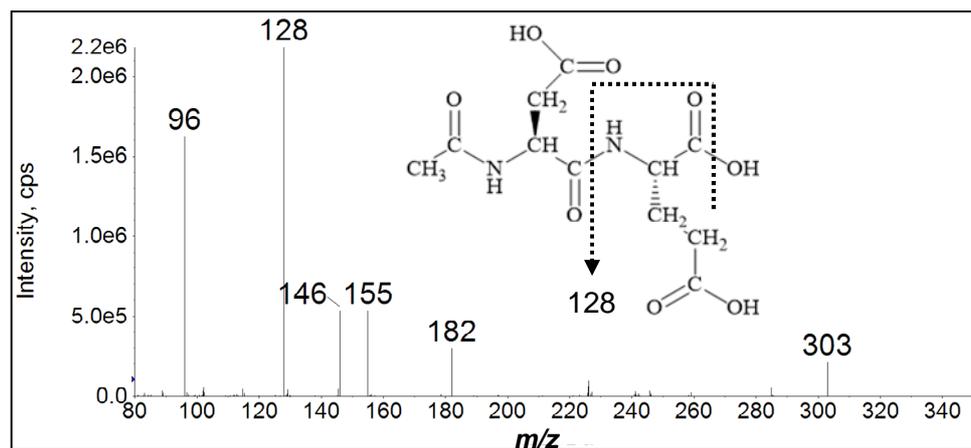
MS/MS は、質量分析計を直列に連結したタンデム質量分析計を用いる測定手法であり、イオン源で生成したアナライト由来のイオン（プリカーサーイオン）を最初の質量分析計で選択し、これを衝突誘起解離（CID）することによって生ずるプロダクトイオンを次の質量分析計で分離する。プロダクトイオンスペクトルの解析により、プリカーサーイオンの構造情報が得られるだけでなく、特定のプロダクトイオンのみを選択してモニターする選択反応モニタリング（SRM）モードを使用することで、きわめて高い選択性を実現できる。

SRM 分析を前提に適切なサロゲートアナライト法を構築するにあたり、キーポイントとなるのは次の 2 点である。すなわち、①アナライトと物理化学的性質が同等で、化学的純度および同位体純度が高い安定同位体標識化合物を準備すること（これをサロゲートアナライトとして利用する）、②アナライトとサロゲートアナライトの MS/MS におけるピークレスポンスを同等にすることである。

まず、NAAG の SRM モードにおけるモニタリングイオンの設定と適切なサロゲートアナライトのデザインのため、NAAG 溶液をインフュージョン分析して MS および MS/MS 解析を行った。NAAG は、分子内にカルボキシ基を 3 つ有することから、ネガティブイオンモードで NAAG を分析し、Fig. 1-1 に示すフルスキャンマススペクトルを得た。1 価の脱プロトン分子 ( $[M-H]^-$ ) が  $m/z$  303 にベースピークとして認められ、Na 付加体ならびに脱水ピークが、それぞれ  $m/z$  325、 $m/z$  285 に認められた。次に、 $m/z$  303 の脱プロトン分子をプリカーサーとして、NAAG の MS/MS 分析を行ったところ、グルタミン酸に由来するプロダクトイオン ( $m/z$  128) が最も強く認められたほか、 $m/z$  96 および  $m/z$  155 に *N*-アセチルアスパラギン酸に由来すると思われるピークが検出された (Fig. 1-2)。これらの結果から、NAAG の SRM モードにおけるモニタリングイオンには、NAAG の脱プロトン分子とグルタミン酸由来のプロダクトイオンを用い ( $m/z$  303  $\rightarrow$   $m/z$  128)、サロゲートアナライトには、NAAG のグルタミン酸部位を重水素 ( $^2\text{H}$  あるいは **D** と表記) で標識した化合物を調製して用いることにした<sup>52,53)</sup>。



**Fig. 1-1 Full scan mass spectrum of NAAG. NAAG standard solution (3  $\mu\text{g/mL}$ ) was introduced into the ionization source of the mass spectrometer at the flow rate of 5  $\mu\text{L/min}$ .**



**Fig. 1-2 Product ion spectrum and proposed fragmentation pattern of NAAG. NAAG standard solution (60  $\text{ng/mL}$ ) was introduced into the ionization source of the mass spectrometer at the flow rate of 5  $\mu\text{L/min}$ . Collision energy was set at -26 V.**

次に、NAAG のグルタミン酸部位に導入する重水素の数について検討した。NAAG（組成式  $\text{C}_{11}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_8$ ）を構成する水素、炭素、窒素および酸素には、質量数の異なる安定同位体が元素ごとに一定の割合で存在する。天然存在比が最も高い核種からなる NAAG の存在比を 100% とした場合、NAAG よりも質量が 1、2、3、4 および 5 大きい同位体の存在比（理論値）は、それぞれ 13%、2.4%、

0.24%、0.025%および 0.002%となる。これらの同位体は、検量線/QC 検体中のサロゲートアナライトの測定を妨害する可能性があるため、サロゲートアナライトに導入する重水素の数は、同位体による影響が無視できるレベルになるように設定する必要がある。内因性物質は、関連する酵素や受容体の変動によって産生や代謝、分布、排泄が大きく左右されることも多く、生体内の存在量が疾患の状態や薬物投与の有無によって、どの程度変動するかは不明なことが多い。そこで、内因性物質の正常時の濃度の 1%を LLOQ に設定することを想定し、かつ同位体による妨害が LLOQ の 1/10 以下であれば定量精度の点で許容できる<sup>54)</sup>ことを考慮して、同位体存在比の基準を 0.1%以下 ( $1\% \times 1/10 = 0.1\%$ ) に設定した。この場合、サロゲートアナライトとして、重水素を 4 つ以上導入した NAAG を調製すれば目的に合致する。そこで、入手が容易であった $[^2\text{H}_5]\text{L}$ -グルタミン酸をサロゲートアナライトの調製用原料として用い、重水素を 5 つ導入した $[^2\text{H}_5]\text{NAAG}$  を合成した (Fig. 1-3)。合成は、 $[^2\text{H}_5]\text{L}$ -グルタミン酸と L-アスパラギン酸保護体を縮合して脱保護した後に、アスパラギン酸の N 末端を塩化アセチルを用いてアセチル化することにより行った。合成した重水素標識体の化学的純度は 96.5%であった (LC-UV 法で算出)。 $[^2\text{H}_5]\text{NAAG}$  のプロダクトイオンスペクトル (Fig. 1-4) では、グルタミン酸に由来するプロダクトイオンが 5Da 高質量側 ( $m/z$  133) にシフトしていたことから、目的とする重水素標識体を得ることができたと判断した。サロゲートアナライト法を用いて定量法を構築するには、内標準物質として第 2 の安定同位体標識化合物が必要になるが、 $[^2\text{H}_5]\text{NAAG}$  を合成する際の塩化アセチルを $[^2\text{H}_3]$ 塩化アセチルに変更することによって重水素を 8 つ導入した $[^2\text{H}_8]\text{NAAG}$  を容易に調製できることから、これを内標準物質として使用することにした (Fig. 1-5)。合成した $[^2\text{H}_8]\text{NAAG}$  の化学的純度は 95.7%であった (LC-UV 法で算出)。

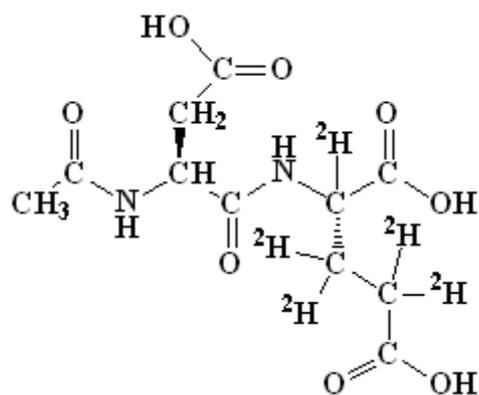


Fig. 1-3 Chemical structure of  $[^2\text{H}_5]\text{NAAG}$ .

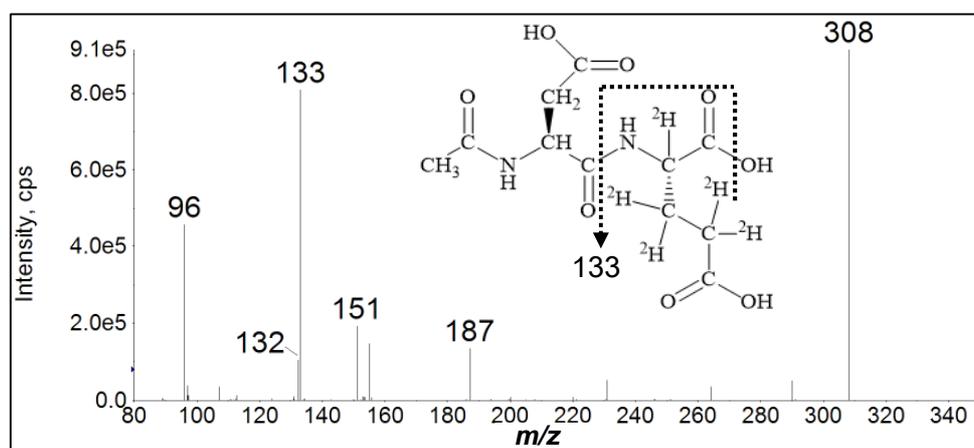


Fig. 1-4 Product ion spectrum and proposed fragmentation pattern of  $[^2\text{H}_5]\text{NAAG}$ .  $[^2\text{H}_5]\text{NAAG}$  standard solution (60 ng/mL) was introduced into the ionization source of the mass spectrometer at the flow rate of 5  $\mu\text{L}/\text{min}$ . Collision energy was set at -26 V.

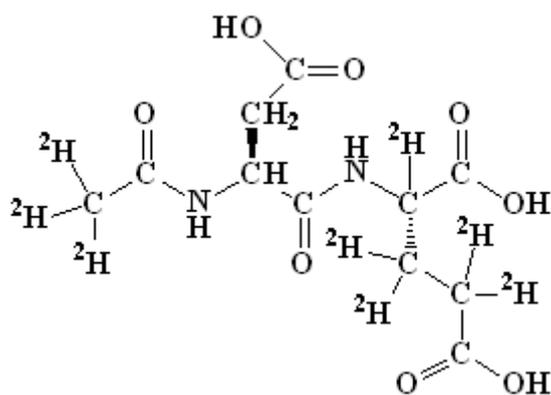


Fig. 1-5 Chemical structure of  $[^2\text{H}_8]\text{NAAG}$ .

## 2.2. サロゲートアナライトの性能評価

サロゲートアナライト法では、前述のように、MS/MSにおけるピークレスポンスがアナライトとサロゲートアナライトで同等でなければならない。しかしながら、重水素 (D) は比較的同位体効果が大きく、フラグメンテーションの過程で D の転移や脱離により、非標識体と標識体のフラグメンテーションパターンに若干の差がみられることがある。実際、 $[^2\text{H}_5]\text{NAAG}$  のプロダクトイオンスペクトルでは、グルタミン酸由来イオンとして  $m/z$  133 (D5 体) に加えて、 $m/z$  132 にもピークが確認された (Fig. 1-4)。一方、NAAG のプロダクトイオンスペクトルでは  $m/z$  128 のピークのみが認められ、1Da シフトした  $m/z$  127 のピークは観察されなかったことから (Fig. 1-2)、 $[^2\text{H}_5]\text{NAAG}$  はフラグメンテーションの過程で D が 1 つ転移あるいはプロトンが 1 つ脱離しているものと考えられ、これが NAAG と  $[^2\text{H}_5]\text{NAAG}$  のプロダクトイオンスペクトルの差の原因と推測された。このような場合には SRM 条件を最適化し、NAAG と  $[^2\text{H}_5]\text{NAAG}$  で同等のピークレスポンスが得られるようにしなければならない。そこで、想定される実用的な検量線濃度範囲 (およそ 1000 倍) において同等のピークレスポンスが得られるように、NAAG および  $[^2\text{H}_5]\text{NAAG}$  の各溶液 (それぞれ 10 pmol/mL および 10 nmol/mL の 2 濃度) を測定してピークレスポンスの確認と調整を行い、Table 1-1 に示した SRM 条件を得た。この SRM 条件にて NAAG と  $[^2\text{H}_5]\text{NAAG}$  を測定したとき、NAAG のピーク面積に対する  $[^2\text{H}_5]\text{NAAG}$  のピーク面積の比は、いずれの濃度においてもほぼ 1 となり、同等のピークレスポンスが得られることを確認した (Table 1-2)。このことから、サロゲートアナライト ( $[^2\text{H}_5]\text{NAAG}$ ) で作成した検量線と、NAAG で作成した検量線の傾きは同じになる、すなわち  $[^2\text{H}_5]\text{NAAG}$  で作成した検量線を用いて NAAG を定量することは妥当であると判断した。なお、Table 1-1 には、内標準物質として用いる  $[^2\text{H}_8]\text{NAAG}$  の SRM 条件についても示した。

**Table 1-1 Selected reaction monitoring conditions for NAAG, [<sup>2</sup>H<sub>5</sub>]NAAG, and [<sup>2</sup>H<sub>8</sub>]NAAG.**

Analyte	SRM Transition	Polarity	DP (V)	CE (V)	CXP (V)
NAAG	<i>m/z</i> 303 → <i>m/z</i> 128	negative	-50	-26	-13
[ <sup>2</sup> H <sub>5</sub> ]NAAG	<i>m/z</i> 308 → <i>m/z</i> 133	negative	-50	-22	-13
[ <sup>2</sup> H <sub>8</sub> ]NAAG	<i>m/z</i> 311 → <i>m/z</i> 133	negative	-50	-22	-13

DP: declustering potential、CE: collision energy、CXP: collision exit potential

**Table 1-2 Comparison of the peak responses between NAAG and [<sup>2</sup>H<sub>5</sub>]NAAG.**

	Peak area			
	10 pmol/mL		10 nmol/mL	
	NAAG	[ <sup>2</sup> H <sub>5</sub> ]NAAG	NAAG	[ <sup>2</sup> H <sub>5</sub> ]NAAG
1	18869	17970	16166805	16214796
2	18045	18138	16233669	16010767
3	17492	17705	16500616	16247095
Mean	18135	17938	16300363	16157553
Ratio ([ <sup>2</sup> H <sub>5</sub> ]NAAG/NAAG)	-	0.99	-	0.99

次に、サロゲートアナライトの性能評価の一環として、[<sup>2</sup>H<sub>5</sub>]NAAG の溶液 (10,000 ng/mL) を LC-MS/MS 装置に注入し、*m/z* 303 → *m/z* 128 (NAAG に相当)、*m/z* 308 → *m/z* 133 ([<sup>2</sup>H<sub>5</sub>]NAAG に相当)、および *m/z* 311 → *m/z* 133 ([<sup>2</sup>H<sub>8</sub>]NAAG に相当) の各反応をモニターしたときに観察されるピークについて調べた。Table 1-3 には、観察されたピークの面積、[<sup>2</sup>H<sub>5</sub>]NAAG のピーク面積を 100% としたときの各ピーク的面積百分率をそれぞれ示した。その結果、*m/z* 303 → *m/z* 128 (NAAG に相当) の反応をモニターしたときに観察されたピーク的面積は、[<sup>2</sup>H<sub>5</sub>]NAAG の面積の 0.1% 未満 (0.085%) と極僅かであった。一方、*m/z* 311 → *m/z* 133 ([<sup>2</sup>H<sub>8</sub>]NAAG に相当) の反応をモニターしたときに観察

されたピークの面積は、 $[\text{}^2\text{H}_5]\text{NAAG}$  の面積の 0.387%であった。この値は、 $[\text{}^2\text{H}_5]\text{NAAG}$  の 3Da 高質量側の天然同位体の存在比（理論値 0.24%）と概ね同じであり、検体中に $[\text{}^2\text{H}_5]\text{NAAG}$  が存在する場合には、この値の分だけ $[\text{}^2\text{H}_8]\text{NAAG}$  のピーク面積が大きくなる。したがって、信頼性の高い定量法を構築するには、 $[\text{}^2\text{H}_5]\text{NAAG}$  を含む検体、すなわち検量線/QC 検体については、 $[\text{}^2\text{H}_8]\text{NAAG}$  のピーク面積を補正するのが適切と判断した（ $[\text{}^2\text{H}_8]\text{NAAG}$  のピーク面積から、 $[\text{}^2\text{H}_5]\text{NAAG}$  のピーク面積に 0.0024 を乗じた値を減じる）。一方、 $[\text{}^2\text{H}_8]\text{NAAG}$  の溶液（10,000 ng/mL）を LC-MS/MS 装置に注入し、 $m/z$  303  $\rightarrow$   $m/z$  128 および  $m/z$  308  $\rightarrow$   $m/z$  133 の各反応をモニターしたときに観察されたピーク的面積は、いずれも $[\text{}^2\text{H}_8]\text{NAAG}$  のピーク面積の 0.1%未満と極僅かであった（Table 1-3）。

**Table 1-3 Isotope abundance in LC-MS/MS analyses of  $[\text{}^2\text{H}_5]\text{NAAG}$  and  $[\text{}^2\text{H}_8]\text{NAAG}$  solutions.**

Injected standard	Concentration (ng/mL)	Peak area (relative abundance)		
		$m/z$ 303 $\rightarrow$ $m/z$ 128 (monoisotopic)	$m/z$ 308 $\rightarrow$ $m/z$ 133 (+5Da, corresponding to $[\text{}^2\text{H}_5]\text{NAAG}$ )	$m/z$ 311 $\rightarrow$ $m/z$ 133 (+8Da, corresponding to $[\text{}^2\text{H}_8]\text{NAAG}$ )
$[\text{}^2\text{H}_5]\text{NAAG}$	10,000	1379 (0.085%)	1624391 (100%)	6288 (0.387%)
$[\text{}^2\text{H}_8]\text{NAAG}$	10,000	348 (0.022%)	760 (0.048%)	1592631 (100%)

### 3. 内因性物質定量におけるサロゲートアナライト法の有用性の検討

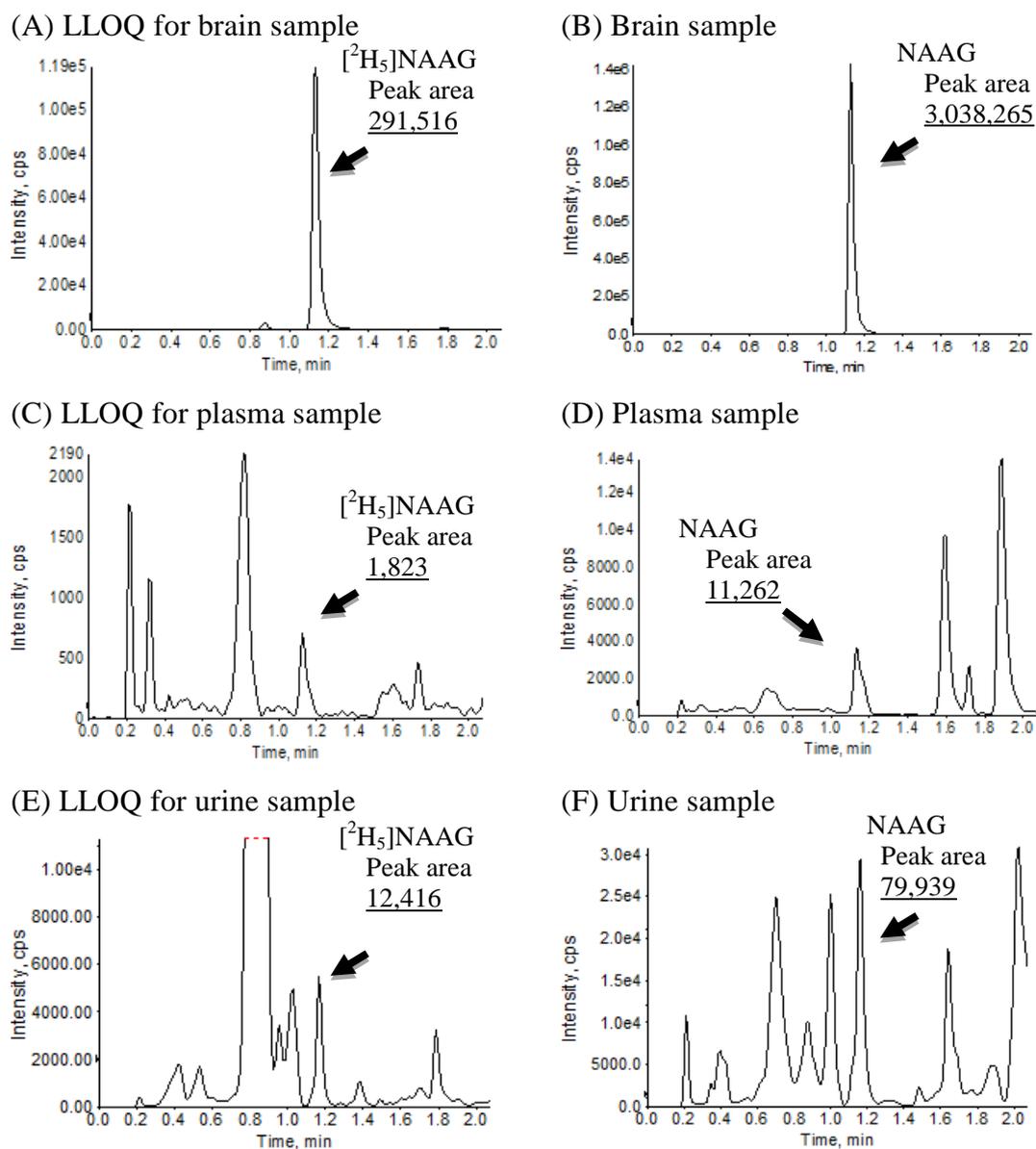
#### 3.1. サロゲートアナライト法による生体試料中 NAAG の測定

次に、ラットの脳、血漿および尿をメタノールで除タンパクしたのち、サロゲートアナライト法を用いて各試料中の NAAG を LC-MS/MS 分析することにした。なお、予め測定したラットの脳、血漿および尿中 NAAG のピークレスポ

ンスを基に、検量線濃度範囲は、30–1000 nmol/g（脳検体）、0.01–3 nmol/mL（血漿検体）および 0.3–10 nmol/mL（尿検体）とした。

まず、 $[^2\text{H}_5]\text{NAAG}$  をサロゲートアナライトとして用い、(A) 内標準物質として $[^2\text{H}_8]\text{NAAG}$  を用いる定量法、(B) 内標準物質として、サロゲートアナライトと構造の類似しない 7-ヒドロキシクマリンを用いる定量法、および (C) 内標準物質を用いない、すなわち絶対検量線法による定量法により、脳、血漿および尿中の NAAG を定量した。試料の調製および前処理は、以下の手順で行った。検量線/QC 検体は、 $[^2\text{H}_5]\text{NAAG}$  の標準溶液を脳ホモジネート、血漿または尿に添加し、それらを各生体試料で順次希釈して調製した。検量線/QC 検体および実検体（検量線/QC 検体とは異なる個体から採取した試料）各 50  $\mu\text{L}$  に、内標準物質を含むメタノール/蒸留水（95:5、v/v）200  $\mu\text{L}$  を加えて除タンパクし、その遠心上清を LC-MS/MS 装置に注入して測定した。Fig. 1-6 に、LLOQ 検体中の $[^2\text{H}_5]\text{NAAG}$  と、実検体中の NAAG の SRM クロマトグラムを示した。ラットの脳、血漿および尿中の NAAG のピーク面積は、LLOQ 検体中の $[^2\text{H}_5]\text{NAAG}$  のピーク面積のそれぞれ約 10 倍（ $3,038,265/291,516=10.4$ ）、6 倍（ $11,262/1,823=6.2$ ）、および 6 倍（ $79,939/12,416=6.4$ ）であった。Table 1-4 に、3 種の定量法を用いて NAAG を分析した結果をまとめて示した。いずれの定量法を用いても、脳内濃度は 310 nmol/g 程度、血漿中および尿中濃度は、それぞれ 0.065 nmol/mL、2.1 nmol/mL 程度であり、3 種の定量法間でほとんど差がなかった。これは、サロゲートアナライトとして NAAG の安定同位体標識化合物（ $[^2\text{H}_5]\text{NAAG}$ ）を用いることにより、仮に夾雑物の影響でそのピークレスポンスが減弱しても、実検体中の NAAG も同様にピークレスポンスが抑制される、すなわち検量線検体と実検体間でサロゲートアナライトとアナライトの検出応答性が揃うことによるものと考えられる。しかしながら、標準添加法でない限り、通常は検量線検体の調製には、実検体とは異なるロットの生体試料を用い

ることになるため、この結果だけでは、どの方法が優れているかについて評価するのは難しい。



**Fig.1-6 SRM chromatograms for  $[^2\text{H}_5]\text{NAAG}$  and NAAG. (A) LLOQ (brain), (B) brain sample, (C) LLOQ (plasma), (D) plasma sample, (E) LLOQ (urine), and (F) urine sample. (A), (C), and (E):  $m/z$  308  $\rightarrow$   $m/z$  133 for  $[^2\text{H}_5]\text{NAAG}$ , (B), (D), and (F):  $m/z$  303  $\rightarrow$   $m/z$  128 for NAAG.**

**Table 1-4 NAAG concentrations in rat biological samples determined by the surrogate analyte method.**

Internal standard		NAAG concentration (nmol/g or nmol/mL)		
		Brain	Plasma	Urine
A	[ <sup>2</sup> H <sub>8</sub> ]NAAG	311±8.15	0.0658±0.00498	2.10±0.104
B	7-Hydroxycoumarin	308±11.2	0.0654±0.00390	2.09±0.0689
C	None	311±27.7	0.0660±0.00446	2.18±0.0241

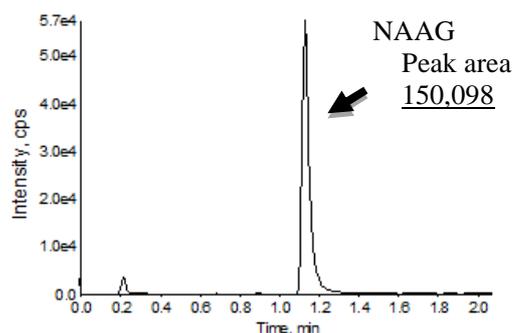
LLOQ: 30 nmol/g (brain), 0.01 (plasma) and 0.3 nmol/mL (urine) (Mean ± SD, n=5)

### 3.2. サロゲートマトリックス法による生体試料中 NAAG の測定

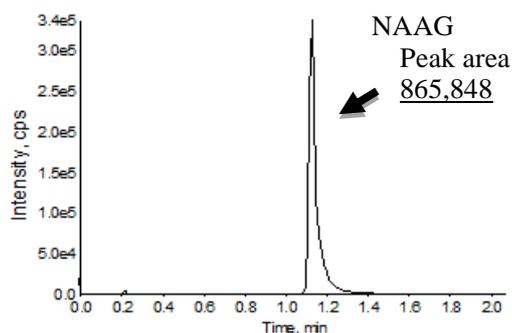
次に、生体試料中の NAAG の測定結果について、サロゲートマトリックス法と比較することにした。検量線/QC 検体は、NAAG 溶液をサロゲートマトリックス（水を使用）に添加して調製し、[<sup>2</sup>H<sub>5</sub>]NAAG あるいは 7-ヒドロキシクマリンを内標準物質として、前項と同様の手順で処理したのち測定に供した。まず、前項と同様に 3 種の定量法を用いて、生体試料中の NAAG を定量した。なお、定量法 (A) においては、安定同位体標識した内標準物質として [<sup>2</sup>H<sub>5</sub>]NAAG を用いた。Fig. 1-7 には、LLOQ 検体（水で調製）と実検体中の NAAG の SRM クロマトグラムを示した。ラット脳、血漿および尿中の NAAG 濃度は、LLOQ のそれぞれ約 10 倍、6 倍および 7 倍の高値を示したが (Table 1-5 A)、実検体中の NAAG のピーク面積は、マトリックス効果の影響で脳では LLOQ の約 6 倍 (865,848/150,098=5.8)、血漿では LLOQ と同程度 (10,147/7,135=1.4)、尿に至っては LLOQ の半分 (82,584/175,559=0.47) にまで低下していた (Fig. 1-7)。定量結果を Table 1-5 に示したが、内標準物質として [<sup>2</sup>H<sub>5</sub>]NAAG を用いたときのラット脳、血漿および尿中の NAAG 濃度は、それぞれ 316 nmol/g、0.0626 nmol/mL および 2.18 nmol/mL であった (Table 1-5 A)。しかしながら、NAAG とは構造が類似しない 7-ヒドロキシクマリンを内標準物質として使用した場合、それぞ

れ 197 nmol/g、0.0192 nmol/mL および 0.321 nmol/mL となり、 $[^2\text{H}_5]\text{NAAG}$  を内標準物質としたときに比べて大きく低下した (Table 1-5 B)。さらに、内標準物質を全く使用しない場合の定量値に至っては、 $[^2\text{H}_5]\text{NAAG}$  を内標準物質にしたときの 3/50–3/5 と著しく低い値となった (Table 1-5 C)。

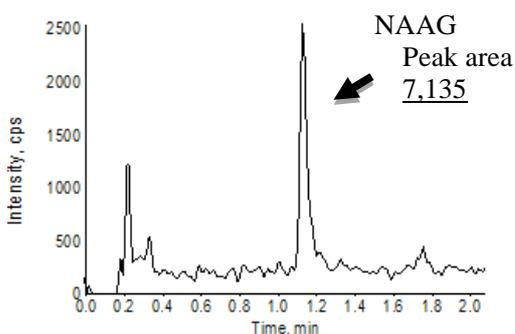
(A) LLOQ (water) for brain sample



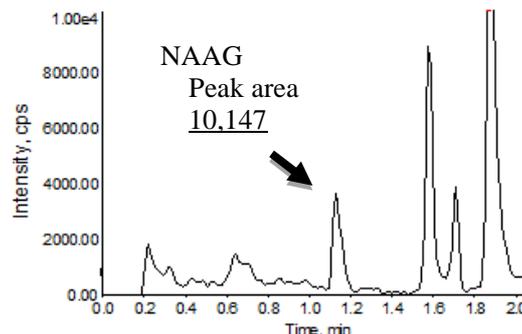
(B) Brain sample



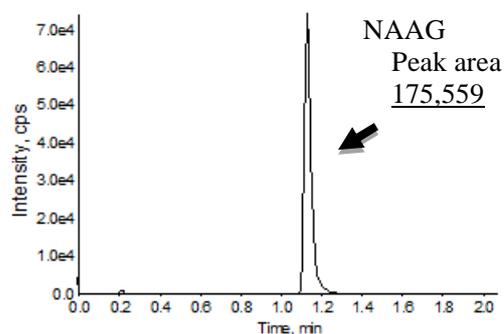
(C) LLOQ (water) for plasma sample



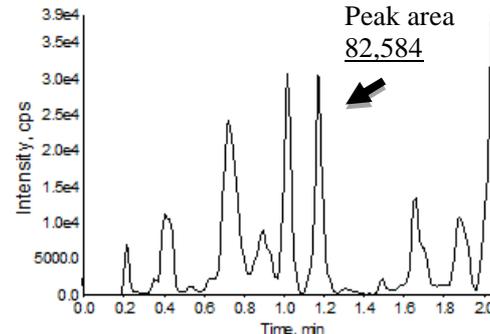
(D) Plasma sample



(E) LLOQ (water) for urine sample



(F) Urine sample



**Fig.1-7 SRM chromatograms for NAAG. (A) LLOQ (brain), (B) brain sample, (C) LLOQ (plasma), (D) plasma sample, (E) LLOQ (urine), and (F) urine sample:  $m/z$  303  $\rightarrow$   $m/z$  128 for NAAG.**

**Table 1-5 NAAG concentrations in rat biological samples determined by the surrogate matrix method.**

Internal standard		NAAG concentration (nmol/g or nmol/mL)		
		Brain	Plasma	Urine
A	[ <sup>2</sup> H <sub>5</sub> ]NAAG	316±4.44	0.0626±0.00178	2.18±0.648
B	7-Hydroxycoumarin	197±2.71	0.0192±0.00150	0.321±0.0692
C	None	205±2.89	0.0131±0.000466	0.130±0.0311*

LLOQ: 30 nmol/g (brain), 0.01 (plasma) and 0.3 nmol/mL (urine) (Mean ± SD, n=5)

\*: below the LLOQ

### 3.3. サロゲートアナライト法とサロゲートマトリックス法の比較

サロゲートアナライト法とサロゲートマトリックス法の結果を比較すると、後者の尿試料分析時の測定値のばらつきが大きいものの、安定同位体標識化合物を内標準物質として用いると両者に差は認められない。しかしながら、サロゲートマトリックス法では、測定値が3種の定量法間で異なることが判った。いずれの方法においても、試料の前処理は除タンパクのみであり、NAAGはマトリックス効果によってピークレスポンスが影響されているのは明らかである。サロゲートアナライト法で定量値を算出した場合は、3種の定量法間で測定値がほとんど一致した。これは、生体試料中の夾雑成分のうち、NAAGの分析に影響する物質の存在量が、検量線検体と実検体で偶然近いものであったことによるものと考えられる。すなわち、サロゲートアナライト法の場合、実際のアナライトとサロゲートアナライトが同様にマトリックス効果の影響を受けるため、全く影響されないサロゲートマトリックス法（水を代替マトリックスとして用いた場合）の検量線検体と、マトリックス効果の影響を受ける実検体とのピークレスポンスの差に比べると、その影響は小さくなるものと考えられる。

一方、サロゲートマトリックス法およびサロゲートアナライト法のどちらにおいても、安定同位体標識化合物を内標準物質として用いると、マトリックス効果はほぼ相殺され、信頼度の高い定量値が得られる。しかしながら、マトリックス効果によってピークレスポンスが極端に低下すると、定量精度に問題が生じる可能性もあるため、特にサロゲートマトリックス法においては、前処理に十分な工夫が必要であり、生体試料中の夾雑物を可能な限り除去することが重要である。逆に、サロゲートアナライト法では、こうした懸念はそれほど大きくないものの、サロゲートアナライトと内標準物質の両者ともに安定同位体標識化合物を用いることが必要であり、定量法構築のための準備がきわめて繁雑である。

#### 4. 小括

本節では、サロゲートアナライト法を用いて、ラット脳、血漿および尿中 NAAG の定量法につき検討した。その結果、マトリックス効果の影響を大きく抑制でき、精度の高い定量法の構築が可能であることが示唆された。サロゲートアナライト法の有用性を検証する目的で、サロゲートマトリックス法を用いて NAAG の定量を行い、両者による結果を比較したところ、サロゲートマトリックス法の場合、明らかにマトリックス効果の影響が大きく、その回避のために前処理を十分に工夫する必要があることが判った。一方、サロゲートアナライト法では、安定同位体標識化合物を複数準備する必要があり、操作が繁雑である反面、分析法そのものは、より簡便で精度の高い方法を構築可能であることが明らかとなった。

## 第2節 ラット生体試料中 NAAG の定量法開発と生体内変動の解析

### 1. 序

NAAG は神経ペプチドの一種であり、代謝型グルタミン酸受容体 3 (mGlu3 受容体) のアゴニストとして作用し<sup>17,51,55,56</sup>、NAAG 分解酵素により分解されることが知られている<sup>57,58</sup>。一方、動物において、NMDA 受容体拮抗薬により誘発される社会性行動低下を、NAAG 分解酵素阻害剤の ZJ43 等が抑制する、すなわち抗精神病作用を示すことが報告されており<sup>59,60</sup>、それらの詳細なメカニズムの解明が望まれている。

これまでに、サロゲートマトリックス法を駆使した LC-MS/MS によるラット生体試料中 NAAG の定量法が 2 件報告されているが<sup>28,29</sup>、いずれもクリーンアップ効率の低い前処理法 (メタノール除タンパクあるいは固相抽出) を用いているにもかかわらず、絶対検量線法で定量している。このため、緒論で述べたように、既存の定量法では夾雑物の存在によりイオン化が影響を受けやすく、NAAG 濃度を正確に測定できていない可能性がある。

そこで本節では、サロゲートアナライト法を用いて、ラットの脳、血漿および CSF 中 NAAG の定量法を開発することにした。次いで、ZJ43 を投与したラットの脳、血漿および CSF 中 NAAG を定量し、NAAG 分解酵素阻害剤のラット *in vivo* における薬理作用について、NAAG の体内動態面から考察を加えた。

### 2. サロゲートアナライト法を用いたラット脳、血漿および CSF 中 NAAG の定量法開発

#### 2.1. LC 条件の設定

LC-ESI-MS/MS では、移動相に電解質を含む水と有機溶媒の混合液が用いられる<sup>61</sup>。移動相中の有機溶媒比率が高いほど、生じた微細液滴の表面張力が低下して液滴の微細化が促進されることから、有機溶媒比率がある程度高いとイ

オン化効率が向上する<sup>61)</sup>。しかしながら、NAAGは水溶性が高く、有機溶媒を多量に含む移動相を使用すると、オクタデシルシリル（ODS）カラムを用いる逆相クロマトグラフィーでは保持されにくい。そこで、本研究では、親水性相相互作用クロマトグラフィー（HILIC）を駆使して分析法を構築することにした。

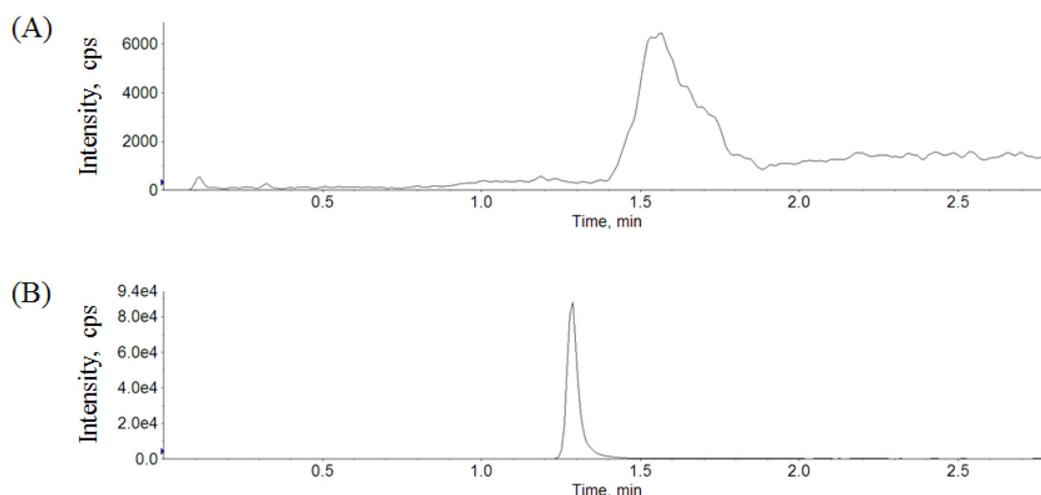
HILICでは、極性官能基を固定化したシリカゲル担体を充填したカラムが用いられるが、その極性官能基に水分子が水和して水和層が形成され、溶質はこの水和層と移動相間の分配平衡を繰り返すことで分離される<sup>62,63)</sup>。HILICのこのような特性から、極性物質は移動相中の有機溶媒比率が高いほど固定相によく保持され、水の割合が高くなると溶離する。したがって、NAAGをカラムに適度に保持させて夾雑成分との分離を狙うと同時に、移動相中の有機溶媒比率がある程度高い状態で溶離させることができれば、検出感度の面で有利になると期待される。そこで、LC-MS/MSで使用可能な揮発性の酸（ギ酸）あるいは塩（ギ酸アンモニウム）を用いて移動相のpHをコントロールすることで、上記の条件を見出すことが可能かにつき検討を行った。

移動相に用いる有機溶媒は、水と混合しやすく、かつLC-MS/MSで汎用される有機溶媒の中では比較的極性が低いアセトニトリルとした。カラムはアミド基を有するHILICカラム（Xbridge<sup>®</sup> Amide）とし、移動相条件は、NAAGの保持時間が2分以内になるように、アセトニトリル濃度を2分間で95%から60%に変化させる急勾配のグラジエント溶出（流速1 mL/min.）とした。

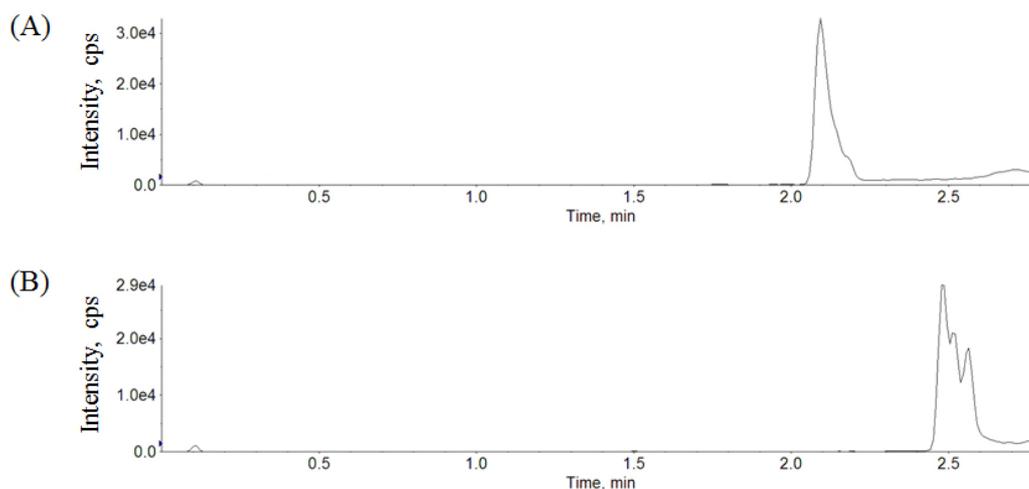
まず、移動相のギ酸濃度の影響を調べたところ、0.01%（v/v）（pH約3.2）ではNAAGの保持時間は2分以内となったものの、ピーク形状が良好ではなかった（Fig. 1-8 A）。一方、ギ酸濃度を0.1%（v/v）（pH約2.6）にすると、ピーク形状が改善し、保持時間も2分以内となった（Fig. 1-8 B）。同様にギ酸アンモニウム濃度（1および5 mmol/L、pH 6-7）の影響を調べたところ、NAAGの保持時間が2分を超えたうえ、ピークもブロードになった（Fig. 1-9）。NAAGの

$pK_a$  は 3.13、3.72 および 4.34 であり、ギ酸アンモニウムを添加した中性条件ではいずれのカルボキシ基も解離している。NAAG の 3 つのカルボキシ基が解離した状態になると、水和層との親和性が強くなるため保持時間が増大し、同時に分配以外の分子間相互作用も増強するためテーリングが生じてピーク形状が悪化したものと考えられる。さらに、5 mmol/L のギ酸アンモニウムでは、塩濃度の上昇に伴って固定相表面の水和層が増加するため<sup>63,64</sup>、NAAG の保持がより強くなり、ピーク形状のさらなる悪化に繋がったものと思われる (Fig. 1-9 B)。一方、0.01% (v/v) ギ酸の pH では、NAAG は解離型と非解離型のカルボキシ基が共存した状態となり、その結果ピーク幅が広がったものと考えられる (Fig. 1-8 A)。

以上の結果から、NAAG の測定は、0.1% (v/v) ギ酸を含有する水とアセトニトリルの混液を用いるグラジエント溶出により行うことにした。



**Fig. 1-8 Representative SRM chromatograms of NAAG (3- $\mu$ L injection of 3-nmol/mL standard solution). Mobile phase contained constant concentration of formic acid at (A) 0.01% (v/v), or (B) 0.1% (v/v).**



**Fig. 1-9 Representative SRM chromatograms of NAAG (3- $\mu$ L injection of 3-nmol/mL standard solution). Mobile phase contained constant concentration of ammonium formate at (A) 1 mmol/L, or (B) 5 mmol/L.**

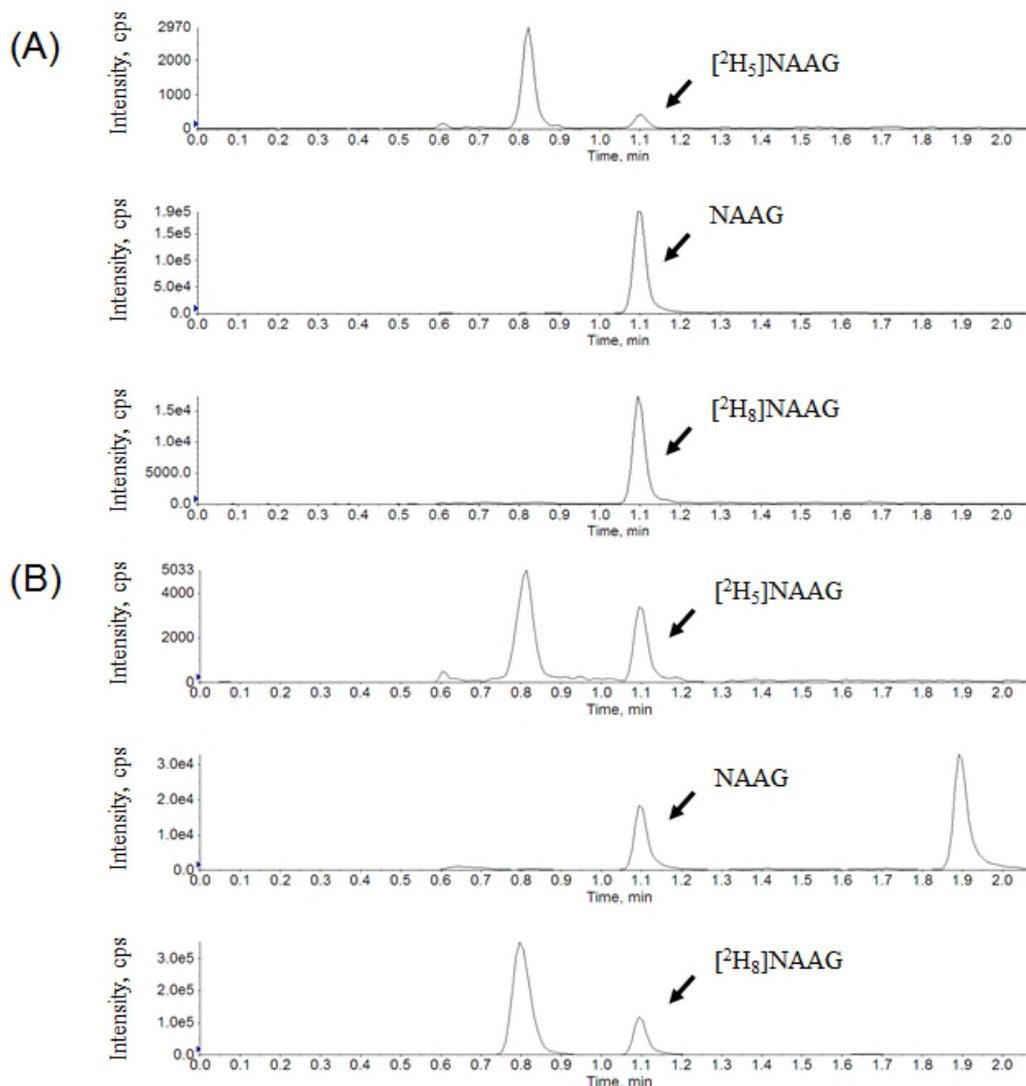
## 2.2. ラット脳および血漿中 NAAG の定量法

本項では、前項の LC 条件を基に、 $[^2\text{H}_8]$ NAAG を内標準物質として、 $[^2\text{H}_5]$ NAAG をサロゲートアナライトとして用いるラット脳および血漿中 NAAG 定量法を確立することにした。生体試料中の xenobiotics あるいは内因性物質を測定する際の前処理法として、除タンパク法や固相抽出法が汎用されている。このうち最もシンプルな、有機溶媒を用いた除タンパク法をラット脳および血漿中 NAAG の測定に適用したところ、特に脳検体を多数連続で分析した際に LC 装置の背圧が上昇した。これは、脳検体中の脂質等が有機溶媒除タンパク処理で抽出され、それらが不溶化してラインフィルターやカラム先端のフリットで目詰まりを起こしたことが原因と考えられた。そこで、測定法の堅牢性を高めるために、固相抽出による脂質の除去を検討した。なお、脳検体はもともと懸濁状態（ホモジネート）のため、不溶性物質による固相抽出カラムの目詰まりが想定されたことから、有機溶媒除タンパク後の遠心上清を固相抽出に供するコンビネーション処理法を適用することにした。

NAAG はカルボキシ基を有する酸性分子であることから、固相抽出には陰イオン交換能を有する基材 (Oasis<sup>®</sup> MAX) を用い、脂質除去のために有機溶媒による洗浄を加えた (NAAG の抽出効率 90%以上)。この方法で処理した検体を連続分析したところ、LC 装置の背圧上昇はみられなくなった。

本コンビネーション処理法をラット脳および血漿検体の処理に適用し、内標準物質として<sup>[2H<sub>8</sub>]</sup>NAAG を用いて LC-MS/MS 定量を実施したところ、1 nmol/g (脳検体) および 0.01 nmol/mL (血漿検体) の<sup>[2H<sub>5</sub>]</sup>NAAG のピークを、十分なシグナルとノイズの比 (S/N) で検出することができた (Fig. 1-10)。検量線は、1–1000 nmol/g (脳検体) および 0.01–10 nmol/mL (血漿検体) の濃度範囲で良好な直線性を示した ( $r>0.999$ )。脳検体測定時の日内再現性は精度 9.5%以下、真度 93.8–118.4%、日間再現性は精度 12.6%以下、真度 96.9–108.3%となり、良好であった (Table 1-6)。血漿検体測定時の日内再現性は精度 6.8%以下、真度 92.2–114.4%、日間再現性は精度 7.9%以下、真度 97.5–109.4%となり、良好であった (Table 1-7)。

以上、サロゲートアナライト法を適用したことで、その性能を適切にバリデートすることができた。



**Fig. 1-10** Representative SRM chromatograms of  $[^2\text{H}_5]\text{NAAG}$ , NAAG, and  $[^2\text{H}_8]\text{NAAG}$  of the LLOQ samples. (A) brain extract ( $[^2\text{H}_5]\text{NAAG}$  at 1.00 nmol/g), and (B) plasma extract ( $[^2\text{H}_5]\text{NAAG}$  at 0.0100 nmol/mL).

**Table 1-6 Intra-day and inter-day precision and accuracy for the determination of [<sup>2</sup>H<sub>5</sub>]NAAG in rat brain.**

		Concentration (nmol/g)			
		QC-1	QC-2	QC-3	QC-4
Nominal		1.00	3.00	250	800
Day-1	Found	1.08	2.90	237	789
		1.18	3.35	238	823
		1.24	3.22	240	801
		1.08	2.97	241	813
		1.34	3.66	248	791
	Mean (nmol/g)	1.18	3.22	241	803
	Intra-day precision (%)	9.4	9.5	1.8	1.8
Intra-day accuracy (%)	118.4	107.3	96.3	100.4	
Day-2	Found	1.20	3.23	248	773
		1.01	2.80	243	822
		1.16	3.34	245	811
		1.21	3.31	247	816
		1.06	2.86	256	850
	Mean (nmol/g)	1.13	3.11	248	814
	Intra-day precision (%)	7.9	8.3	2.0	3.4
Intra-day accuracy (%)	112.8	103.6	99.1	101.8	
Day-3	Found	0.873	2.79	231	850
		0.988	3.06	228	829
		0.909	3.32	246	814
		0.919	3.08	250	817
		1.00	3.11	237	802
	Mean (nmol/g)	0.938	3.07	238	822
	Intra-day precision (%)	5.8	6.1	4.0	2.2
Intra-day accuracy (%)	93.8	102.4	95.4	102.8	
Overall mean (nmol/g)		1.08	3.13	242	813
Inter-day precision (%)		12.6	7.8	3.1	2.6
Inter-day accuracy (%)		108.3	104.4	96.9	101.7

Precision: coefficient of variation, Accuracy: % of nominal concentration

**Table 1-7 Intra-day and inter-day precision and accuracy for the determination of [<sup>2</sup>H<sub>5</sub>]NAAG in rat plasma.**

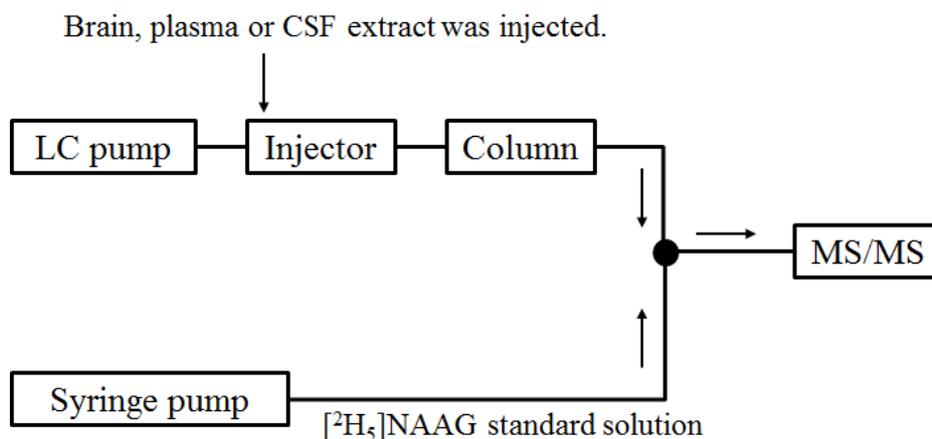
		Concentration (nmol/mL)			
		QC-1	QC-2	QC-3	QC-4
Nominal		0.0100	0.0300	0.300	8.00
Day-1	Found	0.0106	0.0287	0.275	7.95
		0.00999	0.0292	0.276	7.85
		0.0102	0.0290	0.271	7.97
		0.00950	0.0294	0.285	7.96
		0.00984	0.0296	0.276	7.94
	Mean (nmol/mL)	0.0100	0.0292	0.277	7.93
	Intra-day precision (%)	4.1	1.2	1.9	0.6
Intra-day accuracy (%)	100.3	97.3	92.2	99.2	
Day-2	Found	0.0121	0.0322	0.291	8.44
		0.0117	0.0327	0.307	8.71
		0.0110	0.0310	0.304	8.53
		0.0107	0.0322	0.306	8.61
		0.0112	0.0298	0.313	8.61
	Mean (nmol/mL)	0.0113	0.0316	0.304	8.58
	Intra-day precision (%)	4.9	3.7	2.7	1.2
Intra-day accuracy (%)	113.4	105.3	101.4	107.3	
Day-3	Found	0.0118	0.0305	0.287	8.36
		0.0110	0.0324	0.296	8.64
		0.0122	0.0328	0.299	8.79
		0.0119	0.0323	0.300	8.52
		0.0103	0.0328	0.303	8.77
	Mean (nmol/mL)	0.0114	0.0322	0.297	8.62
	Intra-day precision (%)	6.8	3.0	2.1	2.1
Intra-day accuracy (%)	114.4	107.2	99.0	107.7	
Overall mean (ng/mL)		0.0109	0.0310	0.293	8.38
Inter-day precision (%)		7.9	5.1	4.6	4.1
Inter-day accuracy (%)		109.4	103.2	97.5	104.7

Precision: coefficient of variation, Accuracy: % of nominal concentration

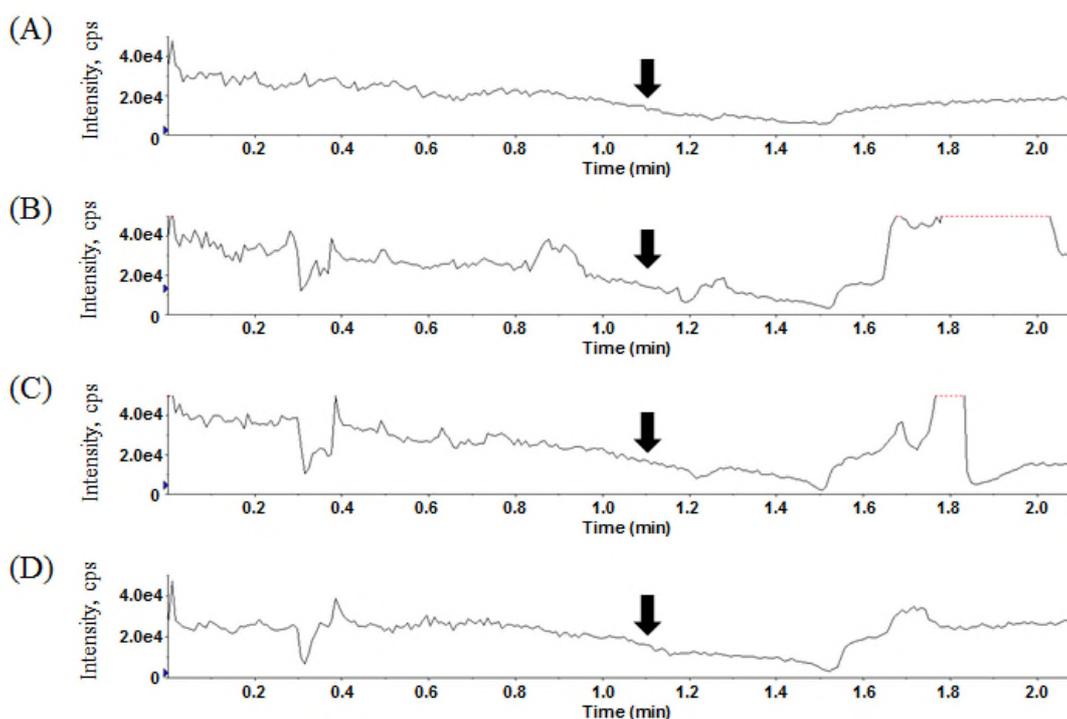
### 2.3. ラット CSF 中 NAAG の定量法

NAAG の神経伝達物質としての作用を考えると、脳実質細胞外液中の濃度の把握が重要になるものの、その採取は非常に煩雑である。そこで、本研究では、脳における細胞外液中濃度の代わりに、これを反映すると考えられる CSF 中の NAAG 濃度を測定することにした。ラットから採取可能な CSF 量は極僅かなため、検量線/QC 検体を CSF で調製するのは困難である。CSF の成分組成と同等のマトリックスは無いことから、代替マトリックスを準備する必要があるが、新たなマトリックスで CSF 専用の検量線/QC 検体を調製するよりも、脳あるいは血漿中濃度測定用の検量線/QC 検体を利用することができれば、より簡便かつ効率的に測定が行える。そこで、脳と血漿のどちらで調製した検量線/QC 検体が、CSF 中 NAAG の定量に適しているかにつき検証した。

まず、脳、血漿および CSF 由来の各抽出物中の夾雑成分によるマトリックス効果を調べるため、 $[^2\text{H}_5]\text{NAAG}$  の標準溶液 (100 ng/mL) をシリンジポンプ (10  $\mu\text{L}/\text{min.}$ ) を用いてポストカラム添加した状態で各抽出物を LC-MS/MS 装置に注入し、 $[^2\text{H}_5]\text{NAAG}$  のレスポンスの変動を調べた<sup>65)</sup> (Fig. 1-11)。その結果、 $[^2\text{H}_5]\text{NAAG}$  の保持時間付近では、いずれの抽出物においてもマトリックス効果はそれほど強くなく、血漿抽出物を注入した場合が CSF と最もクロマトグラムが類似していた (Fig. 1-12)。このことから、CSF 中 NAAG の定量には、血漿で調製した検量線/QC 検体を用いることにした。さらに、本法の妥当性を検証するため、ラット 3 個体から採取した CSF 検体を 2 分割し、一方は直接、他方は既知量の NAAG を添加後に前処理し、CSF 中濃度を求めた。その結果、既知量添加後の CSF 中 NAAG 濃度は、直接前処理したときの濃度から計算される理論値の  $100\pm 15\%$  以内 (88.2–93.6%) であったことから (Table 1-8)、血漿で調製した検量線を用いて CSF 中濃度を算出することは妥当であると判断した。



**Fig. 1-11 Schematic overview of the assay method for the assessment of matrix effects.**



**Fig. 1-12 SRM chromatograms of  $[^2\text{H}_5]\text{NAAG}$ .  $[^2\text{H}_5]\text{NAAG}$  standard solution (100 ng/mL) was introduced into the ionization source of the mass spectrometer at the flow rate of 10  $\mu\text{L}/\text{min}$ . by post-column infusion following the injection of (A) mobile phase, (B) brain extract, (C) plasma extract, or (D) CSF extract. The regions showing lower or higher responses compared with the chromatogram (A) indicated that the ionization of  $[^2\text{H}_5]\text{NAAG}$  was suppressed or enhanced by matrix components. The arrow indicates the eluting position of  $[^2\text{H}_5]\text{NAAG}$ .**

**Table 1-8 Accuracy for the determination of NAAG in rat CSF.**

Rat No.	Concentration (nmol/mL)		Accuracy (%)
	NAAG added	Found	
1	0	0.107	-
	1.000	1.02	92.1
2	0	0.105	-
	1.000	1.03	93.6
3	0	0.127	-
	1.000	0.994	88.2

#### 2.4. 標準添加法との性能比較

前項までの検討により、サロゲートアナライト法によるラット脳、血漿および CSF 中 NAAG 定量法の LLOQ、再現性（精度）、正確性（真度）および耐久性が確認された。そこで、本法の妥当性をさらに検証するため、ラットの脳および血漿検体を用いて、内因性物質を定量する際に古くから用いられている標準添加法との比較を行った。標準添加法での濃度算出は、次のように行った。まず、試料を 3 等分し、それぞれに異なる量の NAAG 標準品を添加して検量線検体を調製し、サロゲートアナライト法と同様の手順で抽出して測定に供した。次いで、検量線検体中の NAAG 標準品濃度を X 軸に、内標準物質に対する NAAG のピーク面積の比を Y 軸にプロットし、検量線と X 軸との交点から、もともと検体中に存在していた NAAG の濃度を求めた。標準添加法では、実検体を複数に分割して操作する必要があるため、検体量に限りのある CSF については本検証実験を実施しなかった。同じ個体の脳および血漿検体をサロゲートアナライト法と標準添加法による測定に供し、それぞれの方法で求めた NAAG 濃度を比較した結果、その差は概ね 10%以内であり、良好であった (Table 1-9)。

以上、サロゲートアナライト法は、生体試料中の NAAG 濃度を適切に評価できることが、本検証実験からも確認された。

**Table 1-9 Comparison of NAAG concentrations between the surrogate analyte and the standard addition methods.**

Rat No.	Surrogate Analyte Method	Standard Addition Method	Difference* (%)
	Concentration (nmol/g or nmol/mL) (A)	Concentration (nmol/g or nmol/mL) (B)	
	Brain	Brain	
1	392	440	-11.5
2	370	413	-11.0
3	394	378	4.1
4	376	357	5.2
5	414	409	1.2
	Plasma	Plasma	
1	0.0531	0.0527	0.8
2	0.0561	0.0540	3.8
3	0.0531	0.0516	2.9
4	0.0479	0.0443	7.8
5	0.0512	0.0490	4.4

\*: Difference (%) was calculated using the following formula:  $(A-B) / \text{Mean} \times 100$

### 3. NAAG 分解酵素阻害剤投与時のラット脳、血漿および CSF 中 NAAG の動態

前項までの検討で、ラット脳、血漿および CSF 中 NAAG 定量法が確立できたことから、次に、代表的な NAAG 分解酵素阻害剤の 1 つである ZJ43 をラットに投与し、そのときの NAAG の体内変動を解析した。ZJ43 は脂溶性が低いことから ( $\log P$  -0.56)、経口や腹腔内投与後の脳および CSF への移行性が個体間で大きくばらつくことが想定され、少数例の検討では適切な評価が行えないと考えられた。そこで、ZJ43 をラットの脳室内に投与することにした。ZJ43 の投与量は、*in vivo* 薬効が確認されたときの脳内 ZJ43 濃度（腹腔内投与、投与量 150 mg/kg）<sup>59)</sup>を参考にして、10  $\mu$ g/10  $\mu$ L 生理食塩液とした。

ラット脳室内に ZJ43 を投与し、投与後 60 分までの脳、血漿および CSF 中の NAAG 濃度を測定した結果、興味深いことに脳内の NAAG 濃度は変化しないが、血漿中濃度が対照群（生理食塩液のみを投与）の 2.11 倍に増加すること、そし

て CSF 中濃度が投与後 60 分で対照群の 504 倍にまで急激に増加することが示された (Table 1-10)。CSF 中濃度は脳実質細胞外液中の濃度を反映していると考えられることから、NAAG 分解酵素阻害剤による抗精神病作用は、細胞外液中 NAAG 濃度の上昇による前シナプスの mGlu3 受容体刺激<sup>55)</sup>、それに続くグルタミン酸の過剰遊離抑制という機序により発現する可能性が推測された。なお、NAAG 分解酵素は中枢神経系においてアストロサイトの細胞膜上に発現しているとの報告があることから<sup>66)</sup>、ZJ43 によって NAAG 分解酵素が阻害されても、脳実質細胞内の NAAG 濃度には直接影響しなかったものと推測された。

以上、本節の検討結果から、NAAG 分解酵素阻害剤の薬効発現には、脳実質細胞内の NAAG ではなく、細胞外液中の NAAG レベルが重要な役割を果たしていることが示唆された。本結果は、ZJ43 のラット *in vivo* における薬理作用を、NAAG の体内動態面から定量的に捉えた最初の例である。

**Table 1-10 NAAG concentrations in brain, plasma, and CSF after intraventricular administration of saline or ZJ43 to rats.**

Time after administration	NAAG Concentration (nmol/g or nmol/mL)		Fold-change (ZJ43/saline)
	Saline	ZJ43	
<b>Brain</b>			
10 min.	392 ± 39.0	398 ± 24.3	1.01
30 min.	382 ± 33.3	392 ± 31.6	1.03
60 min.	396 ± 21.0	418 ± 66.2	1.05
<b>Plasma</b>			
10 min.	0.0623 ± 0.00821	0.0722 ± 0.00458	1.16
30 min.	0.0666 ± 0.00712	0.0942 ± 0.0177	1.41
60 min.	0.0696 ± 0.00653	0.147 ± 0.0234	2.11
<b>CSF</b>			
10 min.	0.129 ± 0.0356	4.57 ± 0.889	35.3
30 min.	0.139 ± 0.0626	14.5 ± 6.15	104
60 min.	0.0938 ± 0.0122	47.3 ± 1.63	504

(Mean ± SD, n=4)

#### 4. 小括

本節では、まず、統合失調症関連内因性物質である NAAG のラット脳、血漿および CSF 中濃度を把握するため、 $[^2\text{H}_8]$ NAAG を内標準物質として、 $[^2\text{H}_5]$ NAAG をサロゲートアナライトとして用いる定量法を開発し、その性能を適切にバリデートした。次いで、本法を用いて、NAAG 分解酵素阻害剤 ZJ43 を投与したラットの脳、血漿および CSF 中 NAAG を定量した結果、脳実質細胞外液中濃度を反映していると考えられる CSF 中の NAAG 濃度が劇的に増加することを捉えた。このことから、NAAG 分解酵素阻害剤の抗精神病作用は、細胞外液中 NAAG 濃度の上昇による前シナプスの mGlu3 受容体刺激を介して発現する可能性が推測された。

## 第2章 D-セリンの迅速光学分割法の開発と応用

### 第1節 生体試料中 D-セリンの定量法開発

#### 1. 序

D-セリンは NMDA 受容体のコ・アゴニストであり、統合失調症のモデル動物あるいは患者において、陽性症状だけでなく、治療満足度の低い陰性症状に対しても効果を示すとの報告がある<sup>1,2,15,16,67-75</sup>。このことから、D-セリンのシグナル異常と統合失調症、特に陰性症状発症との関連性が注目されているが、未だ不明な点が多く、疾患発症時の D-セリンの体内動態の解明が望まれている。

これまでに報告されている生体試料中 D-セリン定量法の多くは、極性が非常に高いセリンをキラル誘導体化試薬を用いてジアステレオマーに誘導体化したのち、ODS 等の LC カラムで分離する方法<sup>18-27</sup>である。しかしながら、緒論で述べたように、この手法は煩雑であり、制約が多い。一方、D-セリンへの適用例はないが、誘導体化処理を行わず、多糖類が担体に固定化されたキラル LC カラムを用いて光学分割する方法もあるが<sup>76-78</sup>、光学分割に要する時間が長い<sup>76-78</sup>等の課題がある。

そこで本節では、LC-MS/MS を使い、誘導体化を行わずに D-セリンを簡便かつ迅速に分析する条件を見出し、これとサロゲートアナライト法を組み合わせ、生体試料中 D-セリン定量法を開発することにした。

#### 2. D-セリン定量法の開発

##### 2.1. 光学分割条件の設定

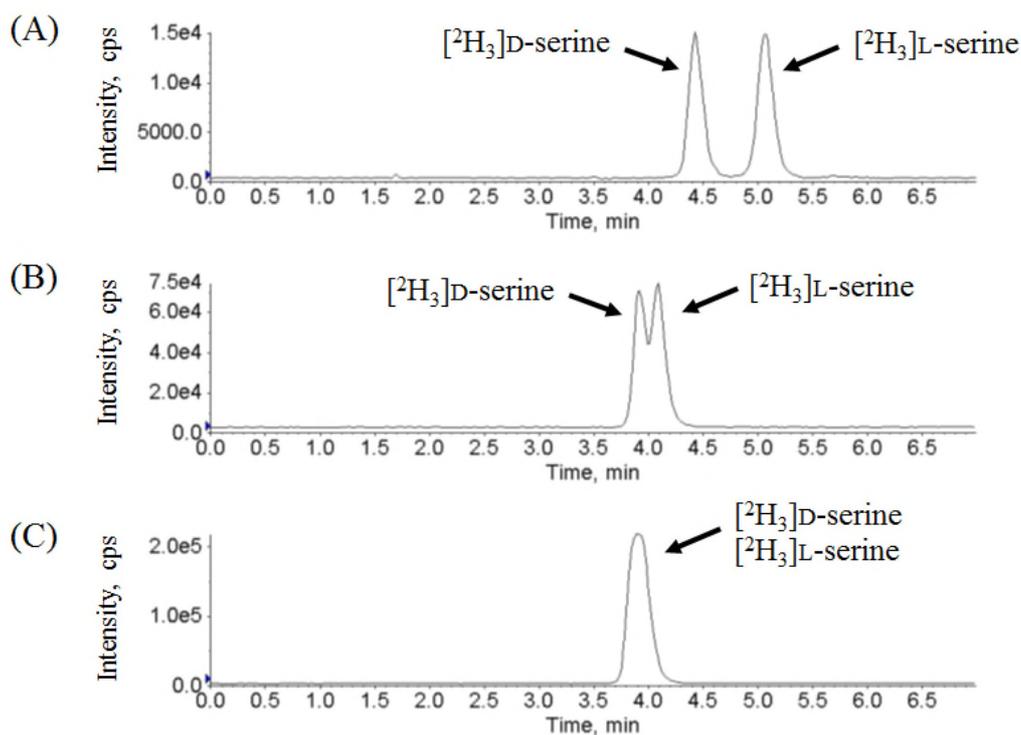
近年、クラウンエーテル (crown ether) が、アミノ基を有する化合物の光学分割に威力を発揮することが報告された<sup>79,80</sup>。CROWNPAK<sup>®</sup> CR (+)は、キラルセクターとして ((S)-18-crown-6 ether) が担体に固定化されたキラル LC カラ

ムである。光学活性なクラウンエーテルは、プロトン化したアミノ基 ( $R-NH_3^+$ ) を包接し、不斉中心近傍に一級アミノ基を有する分子を光学分割するため、セリン等のアミノ酸の光学分割に威力を発揮する<sup>79,80)</sup>。このカラムで光学分割を達成するには、アナライトのアミノ基のプロトン化が必須であるため、通常は過塩素酸等の強酸性移動相（不揮発性である）を使用し、しかも官能基の溶媒耐性の点から有機溶媒を含まない移動相の利用が推奨されている。このような移動相の制約は、アナライトのイオン化にとってきわめて不利なことから<sup>80)</sup>、ポストカラムモードで有機溶媒を混合するよう測定システムに工夫を加え、過塩素酸の代わりに ESI に適用可能な酸を用いて、分離条件の最適化を行うことにした。なお、本節ではサロゲートアナライト法を組み合わせた定量法を構築することから、セリンの重水素標識体 ( $[^2H_3]DL$ -セリン) を用いて検討を行った。移動相の流速は、カラムの耐圧性能の点から 0.3 mL/min. に設定し、ポストカラムモードで混合する有機溶媒は、極性が高いセリンの溶解性を考慮してメタノールとした（流速は 0.2 mL/min. に設定）。

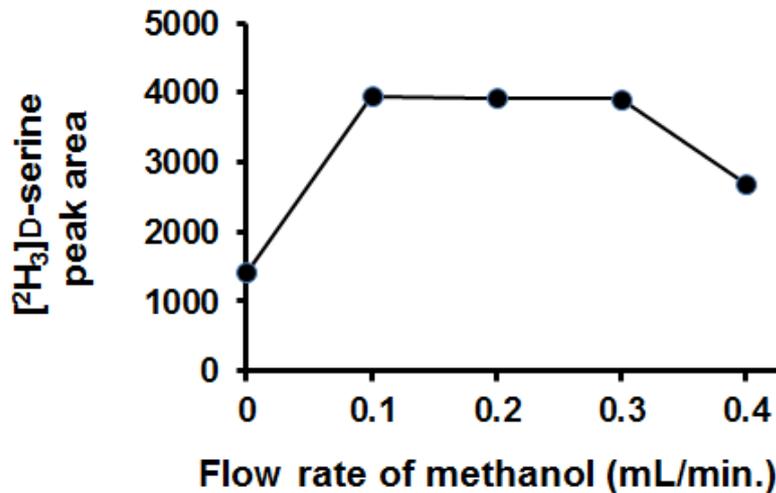
まず、酸として 0.3% (v/v) トリフルオロ酢酸 ( $pK_a$ : 0.23)、0.5% (v/v) ギ酸 ( $pK_a$ : 3.75) および 0.5% (v/v) 酢酸 ( $pK_a$ : 4.76) を用いたところ、Fig. 2-1 に示すように、トリフルオロ酢酸を用いたときには D 体と L 体がベースライン分離したものの、ギ酸では分離が不十分であり、酢酸ではほとんど分離しなかった。セリンは一級アミノ基 ( $pK_a$ : 9.15) とカルボキシ基 ( $pK_a$ : 2.21) を有するが、 $pK_a$  から考えるといずれの条件でもアミノ基は十分にプロトン化しているものと思われる。トリフルオロ酢酸を用いたとき、他の 2 条件に比べて保持時間が増大しているが、これは多量に存在するトリフルオロ酢酸がアミノ基とイオンペアを形成し、固定相への分布割合が増大したことによるものと考えられる。一方、カルボキシ基の電離状態が光学分割に影響した可能性も否定できず、分離メカニズムの詳細な検討が必要と思われる。次いで、ポストカラムで混合するメタ

ノールの流速が $[^2\text{H}_3]$ D-セリンのイオン化に与える影響につき、検討した。その結果、 $[^2\text{H}_3]$ D-セリンのピーク面積は、メタノールの流速が 0.1–0.3 mL/min.の範囲で大きくなることが確認された (Fig. 2-2)。測定法の堅牢性を高めるには、常に安定した感度が得られるように分析条件を設定する必要があることから、メタノールの流速は 0.2 mL/min. (0.1–0.3 mL/min.の中間) とした。

以上、キラルセクターによる保持および光学分割機構を損なうことがないように測定システムに工夫を加えると同時に、移動相に加える酸を最適化することで、CROWNPAK<sup>®</sup> CR (+)が、セリンのように極性が高い内因性物質のLC-MS/MS 分析にも適用できることを見出した。



**Fig. 2-1** Representative SRM chromatograms of  $[^2\text{H}_3]$ DL-serine (3- $\mu\text{L}$  injection of 1-nmol/ml standard solution). Mobile phase consisted of (A) 0.3% (v/v) trifluoroacetic acid, (B) 0.5% (v/v) formic acid, or (C) 0.5% (v/v) acetic acid.



**Fig. 2-2 Peak area of [<sup>2</sup>H<sub>3</sub>]D-serine (2- $\mu$ L injection of 0.15-nmol/mL standard solution) as a function of the flow rate of methanol. The flow rate of 0.3% (v/v) trifluoroacetic acid was set at 0.3 mL/min.**

## 2.2. マウス脳内 D-セリンの定量法

前項で D-セリンの光学分割条件を設定できたことから、まず統合失調症のモデル動物として広く用いられているマウスの脳を材料に、サロゲートアナライト法を適用した D-セリン定量法の開発を行った。天然存在比が最も高い核種からなるセリンの存在比を 100%とした場合、セリンよりも質量が 1、2 および 3 大きい同位体の存在比（理論値）は、それぞれ 3.8%、0.66% および 0.023% となる。そこで、前章第 1 節で述べたように、内因性物質の正常時の濃度の 1% を LLOQ に設定することを想定し、かつ同位体による妨害が LLOQ の 1/10 以下であれば定量精度の点で許容できる<sup>54)</sup>ことを考慮して、同位体存在比の基準を 0.1% 以下に設定した。この場合、サロゲートアナライトとして、重水素を 3 つ以上導入した D-セリンを利用すれば目的に合致する。そこで、市販品として入手可能な [<sup>2</sup>H<sub>3</sub>]D-セリン (Fig. 2-3) をサロゲートアナライトとして用いることにした。今回、第 2 の安定同位体標識化合物として、市販の [<sup>15</sup>N]D-セリン (Fig. 2-4) も入手できたことから、これを内標準物質として使用することにした。なお、

D-セリンと $^{15}\text{N}$ D-セリンは分子量の差が 1 であることから、検体中に存在する D-セリンの天然同位体によって $^{15}\text{N}$ D-セリンのピークレスポンスが影響を受ける（大きくなる）。したがって、信頼性の高い定量法を構築するために、D-セリンよりも質量が 1 大きい同位体の存在比（理論値 3.8%）を基に、 $^{15}\text{N}$ D-セリンのピーク面積を補正することにした（ $^{15}\text{N}$ D-セリンのピーク面積から、D-セリンのピーク面積に 0.038 を乗じた値を減じる）。次いで、D-セリンと $^2\text{H}_3$ D-セリンの各溶液（それぞれ 50 pmol/mL および 50 nmol/mL の 2 濃度）を測定して、ピークレスポンスの確認と調整を行い、Table 2-1 に示した SRM 条件を得た。この SRM 条件にて D-セリンと $^2\text{H}_3$ D-セリンを測定したとき、D-セリンのピーク面積に対する $^2\text{H}_3$ D-セリンのピーク面積の比は、いずれの濃度においてもほぼ 1 となり、同等のピークレスポンスが得られることを確認した（Table 2-2）。なお、Table 2-1 には、内標準物質として用いる $^{15}\text{N}$ D-セリンの SRM 条件についても示した。

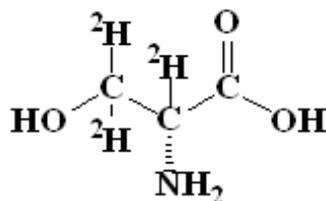


Fig. 2-3 Chemical structure of  $^2\text{H}_3$ D-serine.

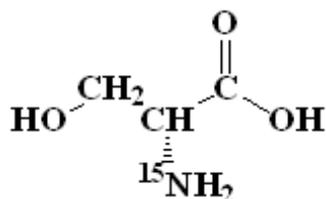


Fig. 2-4 Chemical structure of  $^{15}\text{N}$ D-serine.

**Table 2-1 Selected reaction monitoring conditions for D-serine, [<sup>2</sup>H<sub>3</sub>]D-serine, and [<sup>15</sup>N]D-serine.**

Analyte	SRM Transition	Polarity	DP (V)	CE (V)	CXP (V)
D-serine	<i>m/z</i> 106 → <i>m/z</i> 60	positive	35	15	4
[ <sup>2</sup> H <sub>3</sub> ]D-serine	<i>m/z</i> 109 → <i>m/z</i> 63	positive	20	15	4
[ <sup>15</sup> N]D-serine	<i>m/z</i> 107 → <i>m/z</i> 61	positive	35	15	4

DP: declustering potential、CE: collision energy、CXP: collision exit potential

**Table 2-2 Comparison of the peak responses between D-serine and [<sup>2</sup>H<sub>3</sub>]D-serine.**

	Peak area			
	50 pmol/mL		50 nmol/mL	
	D-serine	[ <sup>2</sup> H <sub>3</sub> ]D-serine	D-serine	[ <sup>2</sup> H <sub>3</sub> ]D-serine
1	13301	12667	10772872	10696331
2	11783	13511	10326551	10437444
3	13348	13068	10214198	10542836
Mean	12811	13082	10437874	10558870
Ratio ([ <sup>2</sup> H <sub>3</sub> ]D-serine/D-serine)	-	1.02	-	1.01

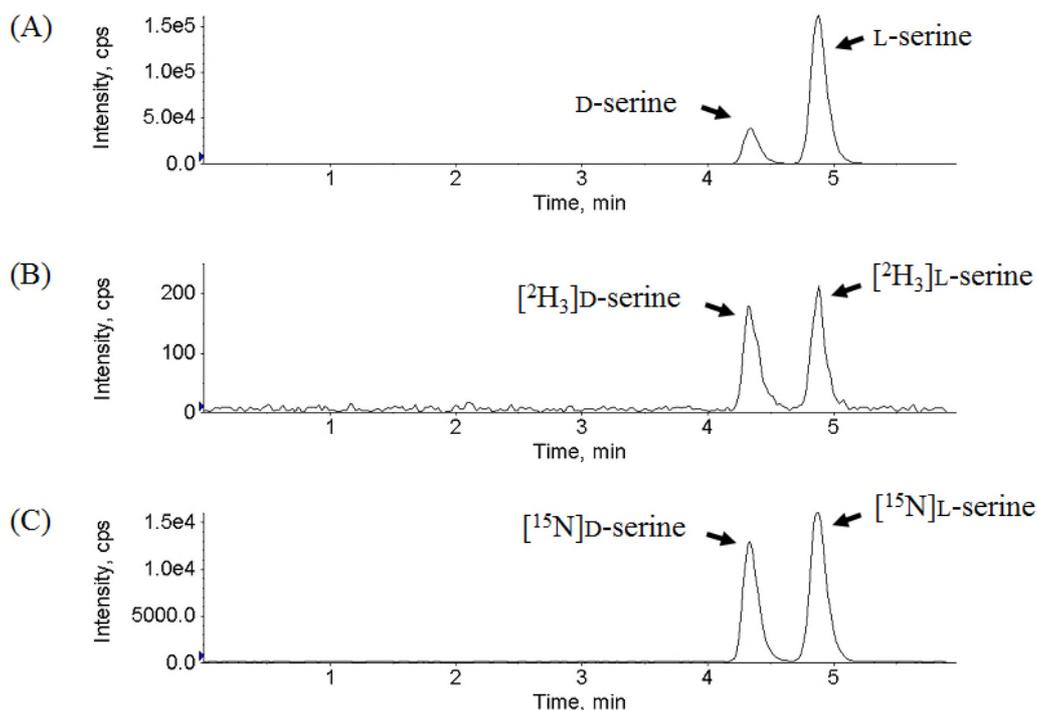
前章第 2 節において、生体試料の最もシンプルな前処理法である有機溶媒除タンパク法を脳検体に適用した際、脂質等の影響により LC カラムの背圧上昇が起きたことから、試料の前処理法には、有機溶媒除タンパク後の遠心上清を固相抽出に供するコンビネーション処理法を採用した。D-セリンの測定においても脳検体を試料とすることから、前章第 2 節と同様にコンビネーション処理法にて前処理を行うことにした。

セリンを含むアミノ酸は、酸性条件下でアミノ基がプロトン化することが期待されることから、固相抽出は酸性条件下で陽イオン交換能を有する基材

(Oasis<sup>®</sup> MCX) で行い、脂質除去のために有機溶媒による洗浄を加えた (D-セリンの抽出効率 90%以上)。

本コンビネーション処理法をマウス脳検体の処理に適用し、内標準物質として [<sup>15</sup>N]D-セリンを用いて LC-MS/MS 定量を実施したところ、1 nmol/g の [<sup>2</sup>H<sub>3</sub>]D-セリンのピークを十分な S/N で検出することができた (Fig. 2-5)。検量線は、1–300 nmol/g の濃度範囲において良好な直線性を示した (r>0.999)。日内再現性は精度 8.2% 以下、真度 89.8–102.3%、日間再現性は精度 8.7% 以下、真度 94.4–100.8% となり、良好であった (Table 2-3)。

以上、マウス脳内 D-セリンの定量法について、その性能を適切にバリデートすることができた。



**Fig. 2-5** Representative SRM chromatograms of (A) D-serine, (B) [<sup>2</sup>H<sub>3</sub>]D-serine, and (C) [<sup>15</sup>N]D-serine of the LLOQ sample in mouse brain ([<sup>2</sup>H<sub>3</sub>]D-serine at 1.00 nmol/g).

**Table 2-3 Intra-day and inter-day precision and accuracy for the determination of [<sup>2</sup>H<sub>3</sub>]D-serine in mouse brain.**

		Concentration (nmol/g)			
		QC-1	QC-2	QC-3	QC-4
Nominal		1.00	3.00	30.0	240
Day-1	Found	0.938	3.09	30.2	238
		0.923	2.84	30.2	242
		0.831	2.73	29.6	246
		0.925	2.96	30.5	240
		0.871	2.82	30.3	241
	Mean (nmol/g)	0.898	2.89	30.1	241
	Intra-day precision (%)	5.0	4.8	1.1	1.2
Intra-day accuracy (%)	89.8	96.3	100.5	100.5	
Day-2	Found	1.03	3.03	29.6	244
		0.976	3.05	29.6	245
		1.04	2.98	29.1	238
		1.12	2.89	30.7	237
		0.936	3.07	30.1	238
	Mean (nmol/g)	1.02	3.00	29.8	240
	Intra-day precision (%)	6.8	2.4	2.0	1.5
Intra-day accuracy (%)	102.1	100.1	99.4	100.1	
Day-3	Found	1.02	2.97	31.1	243
		0.845	2.94	30.6	246
		0.932	2.96	30.8	244
		0.932	2.93	30.4	239
		0.840	3.03	30.6	247
	Mean (nmol/g)	0.914	2.97	30.7	244
	Intra-day precision (%)	8.2	1.4	0.9	1.2
Intra-day accuracy (%)	91.4	98.8	102.3	101.6	
Overall mean (nmol/g)		0.944	2.95	30.2	242
Inter-day precision (%)		8.7	3.4	1.8	1.4
Inter-day accuracy (%)		94.4	98.4	100.8	100.8

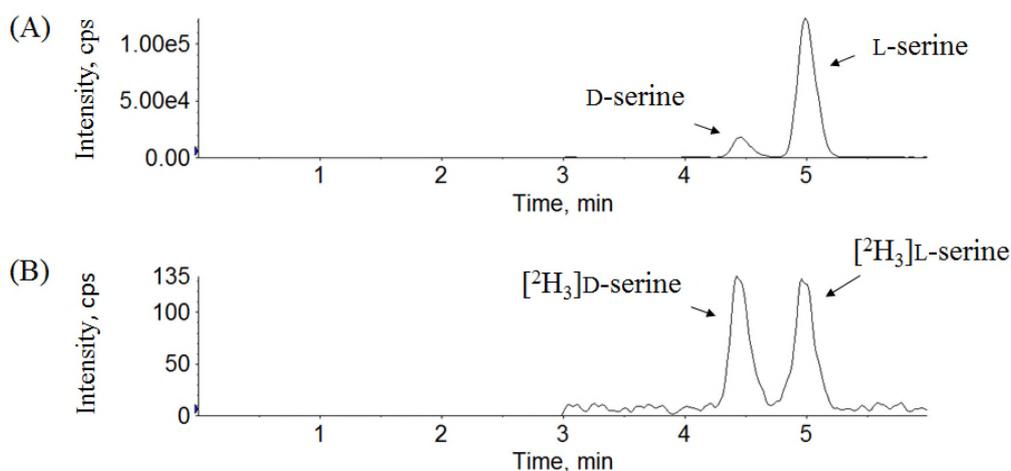
Precision: coefficient of variation, Accuracy: % of nominal concentration

### 2.3. ラット脳および CSF 中 D-セリンの定量法

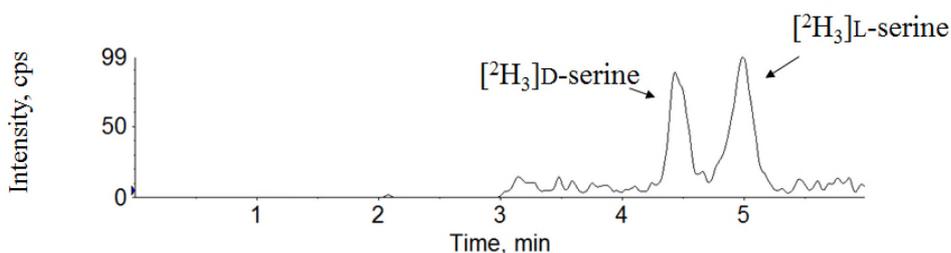
次に、統合失調症のモデルラットを用いた薬理学的研究への応用を目的として、ラット脳および CSF 中 D-セリン定量法の開発を行った。前章第 2 節において、希少マトリックスである CSF 中の NAAG 定量には、ラット血漿で調製した検量線/QC 検体を用いたが、D-セリンの定量では血漿を対象にした測定は行わない。そこで、CSF 中濃度測定用の検量線/QC 検体は、人工脳脊髄液 (artificial CSF) を用いて調製することにした。

前項で確立したマウス脳内 D-セリンの定量法を基に、前処理条件および分離条件には変更を加えず、LC-MS/MS 定量を実施したところ、1 nmol/g (脳検体) および 0.2 nmol/mL (CSF 検体) の [<sup>3</sup>H]D-セリンのピークを十分な S/N で検出できることを確認した (Figs. 2-6 および 2-7)。検量線は、1–1000 nmol/g (脳検体) および 0.2–60 nmol/mL (CSF 検体) の濃度範囲において良好な直線性を示した ( $r > 0.999$ )。4 濃度の QC 検体で日内再現性を確認した結果、脳検体測定時の精度は 3.3% 以下、真度は 98.8–107.1%、CSF 検体測定時の精度は 3.1% 以下、真度は 97.2–105.5% となり、良好であった (Tables 2-4 および 2-5)。

以上の結果から、本法は、ラットの脳および CSF 中 D-セリンの定量法として、統合失調症のモデルラットを用いた薬理学的研究に応用可能と判断した。



**Fig. 2-6 Representative SRM chromatograms of (A) D-serine and (B) [<sup>2</sup>H<sub>3</sub>]D-serine of the LLOQ sample in rat brain ([<sup>2</sup>H<sub>3</sub>]D-serine at 1.00 nmol/g).**



**Fig. 2-7 Representative SRM chromatogram of [<sup>2</sup>H<sub>3</sub>]D-serine of the LLOQ sample in artificial CSF ([<sup>2</sup>H<sub>3</sub>]D-serine at 0.200 nmol/mL).**

**Table 2-4 Intra-day precision and accuracy for the determination of [<sup>2</sup>H<sub>3</sub>]D-serine in rat brain.**

	Concentration (nmol/g)			
	QC-1	QC-2	QC-3	QC-4
Nominal	3.00	30.0	240	800
Found	3.26	29.8	238	796
	3.14	30.1	239	800
	3.34	30.5	234	780
	3.11	29.7	238	786
Mean (nmol/g)	3.21	30.0	237	791
Intra-day precision (%)	3.3	1.2	0.9	1.2
Intra-day accuracy (%)	107.1	100.1	98.9	98.8

Precision: coefficient of variation, Accuracy: % of nominal concentration

**Table 2-5 Intra-day precision and accuracy for the determination of [<sup>2</sup>H<sub>3</sub>]D-serine in artificial CSF.**

	Concentration (nmol/mL)			
	QC-1	QC-2	QC-3	QC-4
Nominal	0.600	6.00	48.0	160
Found	0.611	5.63	48.7	163
	0.652	5.78	47.5	160
	0.635	6.07	47.1	157
	0.635	5.84	48.0	161
Mean (nmol/mL)	0.633	5.83	47.8	160
Intra-day precision (%)	2.7	3.1	1.4	1.6
Intra-day accuracy (%)	105.5	97.2	99.6	100.2

Precision: coefficient of variation, Accuracy: % of nominal concentration

### 3. 小括

本節では、統合失調症関連内因性物質である D-セリンの生体内濃度を把握するため、プロトン化したアミノ基を選択的に包接するクラウンエーテルをキラルセクターに持つキラル LC カラム (CROWNPAK<sup>®</sup> CR (+)) を用い、移動相にトリフルオロ酢酸を添加し、さらにポストカラム法でメタノールを加えることで、煩雑な誘導体化処理を行うことなく、LC-MS/MS で簡便かつ迅速に D-セリンの光学分割が達成できることを実証した。設定した分析条件を用いて、[<sup>15</sup>N]D-セリンを内標準物質として、[<sup>2</sup>H<sub>3</sub>]D-セリンをサロゲートアナライトとして用いる定量法を構築し、マウス脳内の D-セリン濃度、ならびにラット脳および CSF 中の D-セリン濃度の測定が可能になった。CROWNPAK<sup>®</sup> CR (+) は、不斉中心の近傍にアミノ基を有する物質の光学分割に威力を発揮することから、本節で確立した LC-MS/MS を用いる光学分割法は、D-セリンだけでなく、他の D-アミノ酸<sup>81, 82)</sup>等の内因性物質や、アミノ基を有するその他の化合物、とりわけ極性が高い化合物の光学分割にも有用な方法になるものと期待される。

## 第2節 統合失調症の陰性症状モデル動物における陰性症状発症機序の考察

### 1. 序

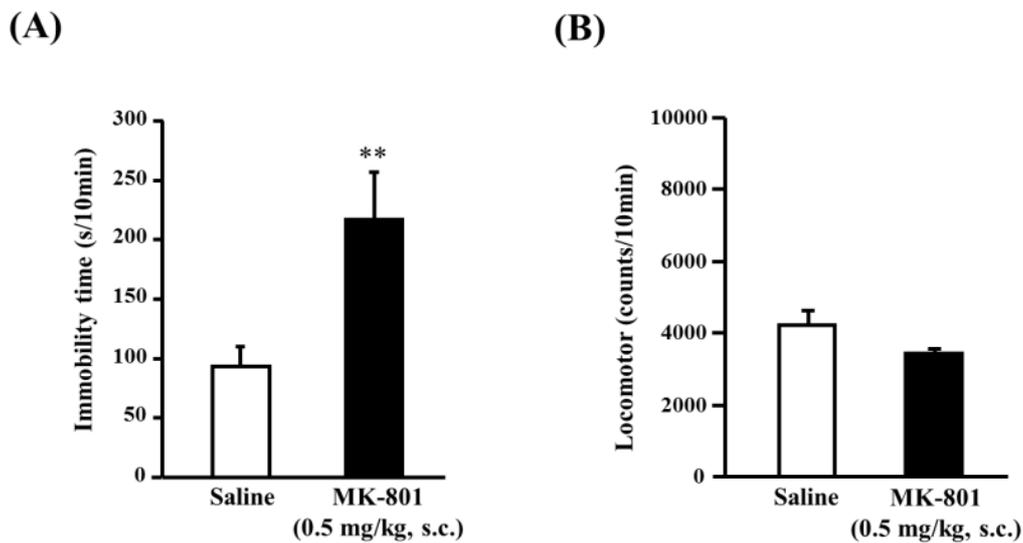
緒論で述べたように、グルタミン酸仮説（グルタミン酸神経機能異常あるいは NMDA 受容体機能低下を病因とする）に根ざした統合失調症の治療アプローチとして、NMDA 受容体のコ・アゴニストサイト作動薬による受容体機能の活性化が注目されている<sup>9-13)</sup>。NMDA 受容体の機能低下の要因としては、以下の報告等を基に、NMDA 受容体のコ・アゴニストである D-セリンのシグナル低下の可能性が指摘されている。すなわち、D-セリンは、統合失調症のモデル動物あるいは患者において、陽性症状だけでなく陰性症状に対しても治療効果を示したこと<sup>1,2,15,16,67-75)</sup>、脳内、特に前頭前皮質（PFC）の NMDA 受容体機能を増強あるいは活性化させること<sup>9-13)</sup>、NMDA 受容体に対する 50% 効果量（ED<sub>50</sub>）が同じくコ・アゴニストであるグリシンに比べ 3-4 倍低い（活性が強い）こと<sup>83)</sup>、患者の CSF 中 D-セリン濃度が低下していたこと<sup>84)</sup> 等である。しかし、一方で、患者の死後脳の D-セリン濃度には有意な変化がなかったとする報告もある<sup>85)</sup>。治療満足度の低い統合失調症、特に陰性症状に対する治療薬を創出するには、その発症機序の解明が重要であるが、D-セリンと陰性症状発症との関連性については未だ不明な点が多い。

そこで、NMDA 受容体拮抗薬を投与したラット強制水泳モデルを用い、このモデル動物が統合失調症の陰性症状を表すことを実験的に示すとともに、陰性症状に対する D-セリンの作用について検討を加えた。そして、モデル動物の脳内、特に PFC および CSF 中 D-セリンの変動について、D-セリンの迅速光学分析法を用いて解析し、グルタミン酸仮説における統合失調症の発症、特に陰性症状の発症と PFC および CSF 中 D-セリンとの関連性について考察した。

## 2. 陰性症状モデルとしての MK-801 反復投与ラット強制水泳モデルの妥当性

NMDA 受容体拮抗薬である MK-801 を反復投与したラット強制水泳モデルが、統合失調症の陰性症状を表すことを示すために、以下の実験を行った。

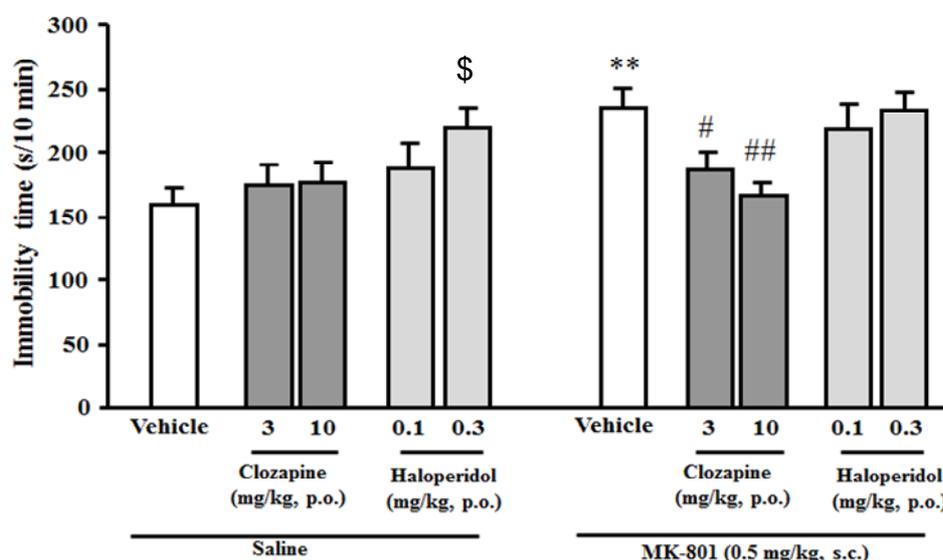
はじめに、生理食塩液あるいは MK-801 (投与量 0.5 mg/kg) をラットに 1 日 2 回 7 日間皮下投与し、その 2 日後、すなわち MK-801 が体内から消失したのちに強制水泳試験、あるいは自発運動量の測定を行った。強制水泳試験では、ラットが水中で全く動かないか、あるいは水に沈むのを防ぐために後肢を動かすのみの行動を無動として計測し、この無動時間を指標にして病態ならびに化合物の抗精神病作用を評価した。その結果、強制水泳試験において、MK-801 を投与した群で無動時間が有意に延長することが確認された (Fig. 2-8 A)。このとき、MK-801 投与群と生理食塩液投与群で自発運動量に差がなかったことから、運動機能は障害されていないと考えられた (Fig. 2-8 B)。



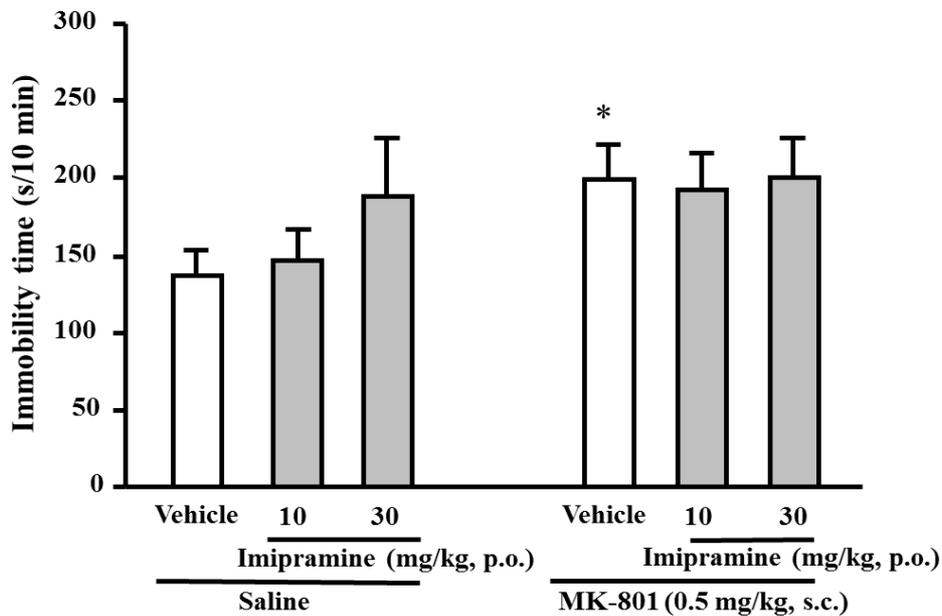
**Fig. 2-8** Effect of repeated administration of MK-801 on immobility time, and locomotor activity in the forced swimming test and open field test. (A) Immobility time in the forced swimming test. (B) Total counts for 10 min. in the open field test. Data are expressed as the mean + S.E.M., n = 8–12 animals per each group. \*\* $P < 0.01$ , compared with saline.

次に、MK-801 を反復投与したラット強制水泳モデルに対する既存の抗精神病薬の効果を調べるために、生理食塩液、クロザピン(投与量 3 および 10 mg/kg)、ハロペリドール (同 0.1 および 0.3 mg/kg)、あるいはイミプラミン (同 10 および 30 mg/kg) を、強制水泳試験の開始 60 分前にそれぞれ単回経口投与し、無動時間を計測した。その結果、統合失調症の陽性症状および陰性症状に効果を示すとの報告があるクロザピン<sup>86,87)</sup>が、無動時間を有意に短縮することが確認された。一方、陽性症状には効果を示すが陰性症状には効かないとされるハロペリドール<sup>88,89)</sup>では、無動時間の有意な短縮は認められなかった (Fig. 2-9)。抗うつ薬のイミプラミンについても、無動時間の有意な短縮は認められなかった (Fig. 2-10)。

以上の結果から、NMDA 受容体拮抗薬である MK-801 を反復投与したラット強制水泳モデルは、統合失調症の陰性症状を表すものと考えられた。



**Fig. 2-9** Effects of clozapine and haloperidol on immobility time in the forced swimming test in saline- or MK-801-treated rats. Data are expressed as the mean + S.E.M., n = 10–11 animals per each group. \*\**P*<0.01, compared with saline+vehicle, \$*P*<0.05, compared with saline+vehicle, #*P*<0.05, ##*P*<0.01, compared with MK-801+vehicle.



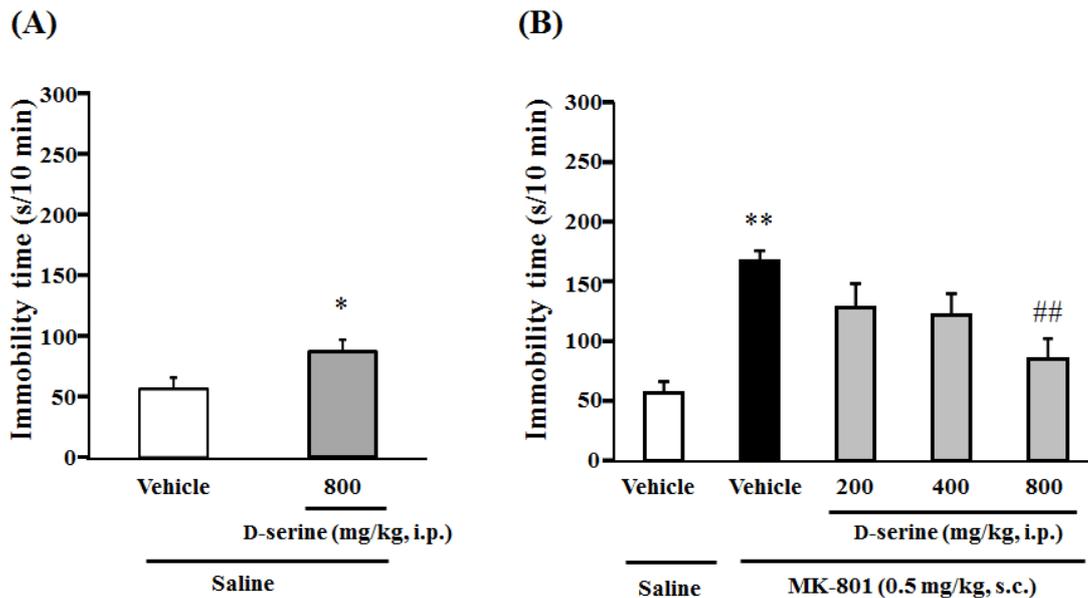
**Fig. 2-10 Effect of imipramine on immobility time in the forced swimming test in saline- or MK-801-treated rats. Data are expressed as the mean + S.E.M., n = 9–10 animals per each group. \* $P < 0.05$ , compared with saline+vehicle.**

### 3. 陰性症状モデル動物に対する D-セリンの効果

MK-801 を反復投与したラット強制水泳モデルを、統合失調症の陰性症状モデルとし、本モデルに対する D-セリンの効果調べた。

生理食塩液または MK-801 を反復投与したラットに、生理食塩液あるいは D-セリン（投与量 200、400 および 800 mg/kg）を、強制水泳試験の開始 60 分前にそれぞれ単回腹腔内投与し、無動時間を計測した。その結果、MK-801 により有意に延長した無動時間が、D-セリンの投与によって有意に短縮することが初めて確認された（Fig. 2-11）。

以上、本モデルを用いた試験としては初めて、D-セリンによる NMDA 受容体のコ・アゴニストサイトの活性化が、統合失調症の陰性症状の改善に有効であることを確認した。



**Fig. 2-11** Effect of D-serine on immobility time in the forced swimming test in saline- or MK-801-treated rats. (A) Immobility time in saline-treated rats, and (B) immobility time in MK-801-treated rats. Data are expressed as the mean + S.E.M.,  $n = 10$  animals per each group. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , compared with saline+vehicle, ## $P < 0.01$ , compared with MK-801+vehicle.

#### 4. 陰性症状モデル動物における D-セリン濃度の変動

前項の検討結果から、D-セリンのシグナル低下が、統合失調症の陰性症状の発症に関与している可能性が考えられた。そこで、本モデルの PFC および CSF 中の D-セリン濃度を測定し、生理食塩液のみを投与した動物と比較することで、陰性症状の発症と D-セリンの関連性について考察を試みた。

MK-801 (投与量 0.5 mg/kg) を 1 日 2 回 7 日間皮下投与し、その 2 日後に測定した PFC および CSF 中の D-セリン濃度、すなわち本モデルにおいて統合失調症の陰性症状の発症が実験的に確認されたときの濃度は、それぞれ 360 nmol/g および 1.03 nmol/mL であった (Table 2-6)。これは、生理食塩液のみを 1 日 2 回 7 日間皮下投与した対照群の動物の PFC および CSF 中の D-セリン濃度 (それぞれ 314 nmol/g および 1.05 nmol/mL) と同程度の値であった (Table 2-6)。これまで、統合失調症と D-セリンの関連性については相反する報告があったが、

本研究の結果から、本モデルにおける無動時間の延長は、PFC および CSF 中 D-セリンの濃度低下によって引き起こされたのではないこと、すなわち陰性症状の発症と PFC および CSF 中の D-セリンのレベルには関連性がないことが明らかとなった。Murai ら<sup>90)</sup>は、NMDA 受容体拮抗薬をマウスに反復投与して実施した強制水泳試験において、PFC 中のグルタミン酸レベルの低下と NMDA 受容体のコ・アゴニストサイトのリン酸化の抑制により NMDA 受容体の機能が低下することを報告している。引き続き詳細な検討が必要ではあるが、本研究と Murai ら<sup>90)</sup>の報告から、MK-801 を投与したラット強制水泳モデルにおける無動時間の延長、すなわち統合失調症の陰性症状の発症は、PFC の NMDA 受容体自体の機能低下が一要因である可能性が推測された。なお、統合失調症の発症には、PFC のほかに視床や大脳辺縁系等の脳組織も関連しているとの報告<sup>91,92)</sup>もあることから、今後はこれらの部位における D-セリンの変動についても検討することが重要と考えられる。

**Table 2-6 D-serine levels in PFC and CSF of saline- and MK-801-treated rats.**

	PFC		CSF	
	Saline (9)	MK-801 (10)	Saline (9)	MK-801 (10)
D-serine (nmol/g or nmol/mL)	314±16.2	360±13.7	1.05±0.161	1.03±0.125
D-serine, % of saline	100±5	115±4	100±15	98±12

Values are means ± S.E.M. Numbers in parenthesis are the number of animals tested.

## 5. 小括

本節では、まず、NMDA 受容体拮抗薬である MK-801 を反復投与したラット強制水泳モデルが、統合失調症の陰性症状を表すことを示した。次に、NMDA 受容体のコ・アゴニストである D-セリンによって陰性症状が改善することを、本モデルにおいて初めて示した。これらの結果から、D-セリンのシグナル低下が陰性症状の発症に関与している可能性が考えられたが、本モデルの PFC および CSF 中の D-セリン濃度には変動が認められなかった。これまで、グルタミン酸仮説において統合失調症の原因と考えられている NMDA 受容体の機能低下と、NMDA 受容体のコ・アゴニストである D-セリンの関連性については相反する報告があり不明であったが、本研究の結果から、陰性症状の発症は、PFC および CSF 中 D-セリンの濃度低下ではなく、NMDA 受容体自体の機能低下が一要因である可能性が推測された。

## 総 括

内因性物質の定量は、疾患発症の分子メカニズムの検討や診断、治療効果等の客観的な評価に不可欠であり、そのツールとして LC-MS/MS が活用されている。LC-MS/MS ではアナライトのイオン化が必須であり、その手法として ESI 法が汎用されているが、夾雑物の影響によりマトリックス効果を生じやすい。したがって、信頼性の高い定量法を構築するには、可能な限りマトリックス効果の影響を回避し、実検体と検量線/QC 検体間のアナライトの検出応答性を同等にする必要がある。Xenobiotics の定量では、ブランクマトリックスで検量線/QC 検体を調製して検出応答性を同等にするが、ブランクマトリックスの準備が不可能な内因性物質には、この方法は適用できない。このため、水や緩衝液等で検量線/QC 検体を調製するサロゲートマトリックス法が汎用されているが、安定同位体標識化合物を内標準物質として用いるとともに、夾雑物の影響を最小限に抑えるための十分なクリーンアップが不可欠となる。しかしながら、高極性物質を測定する場合、生体内に多種多量に存在する親水性成分との分離が困難なことも多く、その適用が難しい。一方、不斉炭素を有する内因性物質を測定する場合において、異性体、特に光学異性体との分離（光学分割）が必要になるが、条件設定が難しいことも課題となっている。

そこで、本研究では、統合失調症関連内因性物質の NAAG (mGlu3 受容体のアゴニスト) と D-セリン (NMDA 受容体のコ・アゴニスト) に関する薬理学的研究への応用を目的として、上記課題を克服する LC-MS/MS 定量法を開発した。

第 1 章では、実検体と同種の生体試料で検量線/QC 検体を調製するサロゲートアナライト法を構築し、内因性物質定量法としての有用性を検証した。次いで、本法を用いて、高極性物質である NAAG の定量法を開発し、NAAG 分解酵素阻害剤 (ZJ43) のラットにおける抗精神病作用発現機序の検討に応用した。

第1節では、サロゲートアナライト法構築のキーポイントを示したうえで、サロゲートアナライト ( $[^2\text{H}_5]\text{NAAG}$ ) を調製した。次に、生体試料中 NAAG の測定結果をサロゲートマトリックス法と比較した。その結果、サロゲートアナライト法では、安定同位体標識化合物を複数準備する必要があり操作が繁雑な反面、検体間のマトリックス効果の差を抑制することから、分析法そのものは、より簡便で精度の高い方法を構築可能なことが明らかとなった。第2節では、 $[^2\text{H}_8]\text{NAAG}$  を内標準物質、 $[^2\text{H}_5]\text{NAAG}$  をサロゲートアナライトとする定量法を開発し、ZJ43 による抗精神病作用が、細胞外液中 NAAG 濃度の上昇による前シナプスの mGlu3 受容体刺激を介して発現することを示唆する結果を得た。

第2章では、D-セリンの迅速光学分割法を開発し、統合失調症の陰性症状発症機序の検討に応用した。第1節では、測定システムと移動相に工夫を加えることで、煩雑な誘導体化処理を行うことなく、LC-MS/MS を用いて簡便かつ迅速に D-セリンの光学分割が達成できることを実証した。第2節では、本法を用いて、陰性症状モデルラットの前頭前皮質および CSF 中 D-セリンの変動解析を行い、陰性症状の発症がこれら組織中の D-セリン濃度の低下を伴わないことを明らかにした。さらなる検討が必要ではあるが、本結果から、陰性症状の発症は、NMDA 受容体自体の機能低下が一要因である可能性が推測された。

以上、本研究では、内因性物質を LC-MS/MS 定量する際に遭遇する課題を取り上げ、その克服法を提案した。まず、高極性物質である NAAG の簡便で精度の高い分析法として、サロゲートアナライト法を開発した。次いで、誘導体化処理を回避した、D-セリンの迅速光学分割法を開発した。これらを薬理学的研究に応用し、NAAG 分解酵素阻害剤の抗精神病作用発症機序について考察するとともに、統合失調症の陰性症状発症と D-セリンの関連性について、その一部を明らかにした。本研究で示した LC-MS/MS 定量法は、これら内因性物質を対象とした研究を推進するうえで、有用な分析手法になるものと考えられる。

## 謝 辞

本論文の作成に際し、終始ご懇篤なるご指導、ご鞭撻およびご校閲を賜りました東北大学大学院薬学研究科教授 眞野成康博士に謹んで感謝の意を表します。また、本論文のご校閲と適切なるご助言を戴きました東北大学大学院薬学研究科教授 大江知行博士、同教授 福永浩司博士に深く感謝致します。

本研究は、大正製薬株式会社総合研究所において行われたものであり、その間暖かいご理解、ご指導およびご鞭撻を戴きました大正製薬株式会社常務執行役員 奥山茂博士、同安全性・動態研究所長 堤俊輔博士、同薬物動態研究室長 山口順一博士に深謝致します。また、本研究の遂行にあたりご指導、ご助力を戴きました大正製薬株式会社医薬研究本部フェロー 茶木茂之博士、同薬物動態研究室 神宮茂司氏、同薬理第1研究室 日吉哲明博士、同 引地洋彦博士に厚く御礼申し上げます。さらに、本研究にご協力くださった大正製薬株式会社薬物動態研究室 大道満里氏をはじめとする薬物動態研究室の皆様、ならびに同薬理第1研究室、同化学第2研究室、同医薬事業企画部、同医薬開発部の関係諸氏に厚く御礼申し上げます。

## 実験の部

### 第1章、第1節付随実験

#### [標準物質および試薬]

NAAG および 7-ヒドロキシクマリンは、Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) から購入した。 $[^2\text{H}_5]\text{NAAG}$  および  $[^2\text{H}_8]\text{NAAG}$  は、Subasinghe らの方法<sup>93)</sup>に準じ、大正製薬株式会社で合成した。 $[^2\text{H}_5]\text{NAAG}$  は、 $[^2\text{H}_5]\text{L}$ -グルタミン酸の N 末端と L-アスパラギン酸の N 末端保護体を縮合して脱保護した後に、塩化アセチルを用いてアスパラギン酸の N 末端をアセチル化して得た (純度 96.5%、純度を補正して使用した)。 $[^2\text{H}_8]\text{NAAG}$  は、 $[^2\text{H}_5]\text{L}$ -グルタミン酸の N 末端と L-アスパラギン酸保護体を縮合して脱保護した後に、 $[^2\text{H}_3]$ 塩化アセチルを用いてアスパラギン酸の N 末端をアセチル化して得た (純度 95.7%)。L-アスパラギン酸の N 末端保護体、 $[^2\text{H}_5]\text{L}$ -グルタミン酸、塩化アセチルおよび $[^2\text{H}_3]$ 塩化アセチルは、関東化学株式会社から購入したものを使用した。その他の試薬および溶媒は、市販の特級品または高速液体クロマトグラフ用を使用した。

#### [動物および動物実験]

雄性 SD (Sprague-Dawley) ラット (7 週齢) は、日本チャールス・リバー株式会社から購入した。すべての動物は、一定の室温 ( $23\pm 3^\circ\text{C}$ ) および湿度 (50–20%)、ならびに 12 時間ごとの明暗周期に管理した飼育室にて飼育し、飲水と飼料は自由摂取とした。すべての動物飼育および動物実験は、大正製薬株式会社の動物実験に関する規程および実験動物に関するガイドライン (The Japanese Experimental Animal Research Association Standards) にしたがって行った。

ラット生体試料は、以下の手順で採取した。血漿は、イソフルラン麻酔下に腹部大静脈から採血し、ヘパリンナトリウム入りチューブに入れたのち、直

ちに遠心分離して得た。脳は、腹部大動脈から放血致死させたのち採取した<sup>94)</sup>。尿は、自然排泄された尿をメタボリカ<sup>®</sup>（株式会社スギヤマゲン）を用いて採集した。血漿、尿および脳検体は、採取後に直ちに液体窒素で凍結し、-80℃の冷凍庫に保存した。

#### [脳ホモジネートの調製]

脳検体は、4 倍量（1:4、w/v）のメタノール／蒸留水（95:5、v/v）に入れた状態で、氷浴中にてマルチビーズショッカー<sup>®</sup>（安井器械株式会社）を用いて破碎した（50  $\mu$ L のホモジネートは 10 mg の脳組織に相当する）。ホモジネートは、液体窒素で凍結し、-80℃の冷凍庫に保存した。

#### [標準溶液および内標準物質溶液の調製、ならびに検量線／QC 検体の調製]

NAAG、 $[^2\text{H}_5]$ NAAG、 $[^2\text{H}_8]$ NAAG および 7-ヒドロキシクマリンの標準溶液は、それぞれを正確に秤量し、10  $\mu$ mol/mL となるようにメタノールに溶解して調製した。サロゲートアナライト法に用いる内標準物質溶液は、 $[^2\text{H}_8]$ NAAG および 7-ヒドロキシクマリンの標準溶液をメタノール／蒸留水（95:5、v/v）で希釈し、それぞれを 2 nmol/mL および 1 nmol/mL となるように混合（脳検体用）、あるいは 0.2 nmol/mL および 0.1 nmol/mL となるように混合（血漿および尿検体用）して調製した。サロゲートマトリックス法に用いる内標準物質溶液は、 $[^2\text{H}_5]$ NAAG および 7-ヒドロキシクマリンの標準溶液をメタノール／蒸留水（95:5、v/v）で希釈し、それぞれを 2 nmol/mL および 1 nmol/mL となるように混合（脳検体用）、あるいは 0.2 nmol/mL および 0.1 nmol/mL となるように混合（血漿および尿検体用）して調製した。

脳内濃度測定用の検量線／QC 検体は、以下の通り調製した。まず、 $[^2\text{H}_5]$ NAAG の標準溶液（10  $\mu$ mol/mL）50  $\mu$ L を 950  $\mu$ L の脳ホモジネートに添加して、2500

nmol/g (ホモジネート中濃度として 500 nmol/mL) の添加脳を調製した。この添加脳を脳ホモジネートで順次希釈し、 $[^2\text{H}_5]\text{NAAG}$  濃度が 30、100、300 および 1000 nmol/g となる検量線検体とした。QC 検体は、 $[^2\text{H}_5]\text{NAAG}$  濃度が 80 および 800 nmol/g になるように検量線検体と同様に調製した。水を代替マトリックスとした NAAG の脳内濃度測定用の検量線/QC 検体は、 $[^2\text{H}_5]\text{NAAG}$  の代わりに NAAG を用いて同様に調製した。

血漿中濃度測定用の検量線/QC 検体は、以下の通り調製した。まず、 $[^2\text{H}_5]\text{NAAG}$  の標準溶液 (10  $\mu\text{mol/mL}$ ) 10  $\mu\text{L}$  を 990  $\mu\text{L}$  の血漿に添加して、100 nmol/mL の添加血漿を調製した。この添加血漿を血漿で順次希釈し、 $[^2\text{H}_5]\text{NAAG}$  濃度が 0.01、0.03、0.1、0.3、1 および 3 nmol/mL となる検量線検体とした。QC 検体は、 $[^2\text{H}_5]\text{NAAG}$  の濃度が 0.03 および 0.3 になるように検量線検体と同様に調製した。水を代替マトリックスとした NAAG の血漿中濃度測定用の検量線/QC 検体は、 $[^2\text{H}_5]\text{NAAG}$  の代わりに NAAG を用いて同様に調製した。

尿中濃度測定用の検量線/QC 検体は、以下の通り調製した。まず、 $[^2\text{H}_5]\text{NAAG}$  の標準溶液 (10  $\mu\text{mol/mL}$ ) 10  $\mu\text{L}$  を 990  $\mu\text{L}$  の尿に添加して、100 nmol/mL の添加尿を調製した。この添加尿を尿で順次希釈し、 $[^2\text{H}_5]\text{NAAG}$  濃度が 0.3、1、3 および 10 nmol/mL となる検量線検体とした。QC 検体は、 $[^2\text{H}_5]\text{NAAG}$  濃度が 0.3 および 8 nmol/mL になるように検量線検体と同様に調製した。水を代替マトリックスとした NAAG の尿中濃度測定用の検量線/QC 検体は、 $[^2\text{H}_5]\text{NAAG}$  の代わりに NAAG を用いて同様に調製した。

#### [検体の前処理]

検体の前処理は、有機溶媒除タンパク法により行った。脳ホモジネート、血漿または尿 (各 50  $\mu\text{L}$ ) は、内標準物質溶液 (200  $\mu\text{L}$ ) と混合してボルテックスミキサーで攪拌 (約 30 秒間) したのち、遠心分離 (3000 $\times$ g、10 分間、4 $^{\circ}$ C) し

た。得られた上清を、LC-MS/MS 装置に注入する試料とした。ブランク検体には、内標準物質溶液の代わりにメタノール／蒸留水（95:5、v/v）を加え、同様に処理した。

[装置および測定条件]

質量分析には、エレクトロスプレー（ターボイオンスプレー<sup>®</sup>）インターフェースを装着した AB Sciex 社製 Triple Quad<sup>™</sup>5500 四重極型タンデム質量分析計を使用した。スプレー電圧は-4500 V、ヒーターガス温度は 550°C、ネブライザーガス（GS1）、ターボガス（GS2）およびカーテンガスは 50 psi、80 psi および 30 psi に設定した。コリジョンガスには窒素を用い、設定値を 7 (arbitrary units) とした。移動相は、島津製作所社製の液体クロマトグラフ装置（LC-30AD シリーズ）を使用して、2 台の送液ポンプ（LC-30AD）で移動相 A（0.1%（v/v）ギ酸水溶液）と移動相 B（0.1%（v/v）ギ酸含有アセトニトリル）を下記のプログラムで混合し、流速 1 mL/min. で LC カラム（Waters 社製 XBridge<sup>®</sup> Amide、3 mm i.d. × 50 mm、3.5 μm）に送液した。カラム温度は 50°C に設定し、試料の注入量は 1-3 μL とした。

移動相送液プログラム

時間 (min.)	移動相 A (%)	移動相 B (%)
0.00	5	95
2.00	40	60
2.01	50	50
2.80	50	50
2.81	5	95
4.10	5	95

## MS/MS 条件

Analyte	SRM Transition	Polarity	DP (V)	CE (V)	CEP (V)
NAAG	$m/z$ 303 $\rightarrow$ $m/z$ 128	negative	-50	-26	-13
[ <sup>2</sup> H <sub>5</sub> ]NAAG	$m/z$ 308 $\rightarrow$ $m/z$ 133	negative	-50	-22	-13
7-HC	$m/z$ 161 $\rightarrow$ $m/z$ 133	negative	-41	-28	-9
[ <sup>2</sup> H <sub>8</sub> ]NAAG	$m/z$ 311 $\rightarrow$ $m/z$ 133	negative	-50	-22	-13

DP: declustering potential、CE: collision energy、CEP: collision exit potential、7-HC: 7-hydroxycoumarin

### [検量線の作成と定量値の算出]

検量線式は、検量線検体中の NAAG または [<sup>2</sup>H<sub>5</sub>]NAAG 濃度を x、内標準物質に対する NAAG または [<sup>2</sup>H<sub>5</sub>]NAAG のピーク面積の比を y として、最小二乗法（重み：1/x）による直線回帰を行い求めた。QC 検体中の NAAG または [<sup>2</sup>H<sub>5</sub>]NAAG 濃度は、内標準物質に対する NAAG または [<sup>2</sup>H<sub>5</sub>]NAAG のピーク面積の比を検量線式に代入して求めた。なお、[<sup>2</sup>H<sub>5</sub>]NAAG をサロゲートアナライト、[<sup>2</sup>H<sub>8</sub>]NAAG を内標準物質として検量線の作成ならびに QC 検体の濃度算出を行う際には、内標準物質のピーク面積の補正を行った（([<sup>2</sup>H<sub>8</sub>]NAAG のピーク面積）－（[<sup>2</sup>H<sub>5</sub>]NAAG のピーク面積）× 0.0024）。実検体中の NAAG 濃度は、内標準物質に対する NAAG のピーク面積の比を検量線式に代入して求めた。内標準物質を用いず、絶対検量線法で定量値を算出する際は、NAAG または [<sup>2</sup>H<sub>5</sub>]NAAG のピーク面積を y として計算した。

## 第1章、第2節付属実験

### [標準物質および試薬]

*N*-[[[(1*S*)-1-carboxy-3-methylbutyl]amino]carbonyl]-*L*-glutamic acid (ZJ43) は、Tocris (Bristol, UK) から購入した。その他の試薬および溶媒は、第1章、第1節付属実験で使用したものと同等のものを用いた。

### [動物および動物実験]

薬物投与および生体試料の採取は、以下の手順で行った。雄性SDラット(4週齢)に、生理食塩液(10 μL)またはZJ43(10 μg/10 μL生理食塩液)を、イソフルラン麻酔下にて脳室内に投与した。血漿は、投与10、30または60分後に、イソフルラン麻酔下にて腹部大静脈から採血し、ヘパリンナトリウム入りチューブに入れたのち、直ちに遠心分離して得た。CSFは、腹部大動脈から放血死させたのち、29ゲージの注射針を用いて大槽穿刺により採取し、その後に脳を採取した。これらの生体試料は、採取後に直ちに液体窒素で凍結し、-80℃の冷凍庫に保存した。その他、動物飼育および動物実験は、第1章、第1節付属実験と同じ条件およびガイドラインにしたがって行った。

### [脳ホモジネートの調製]

脳ホモジネートの調製は、第1章、第1節付属実験と同様に行った。なお、融解操作は室温で行い、融解後は直ちに氷上に静置し、2時間以内に使用した。

### [標準溶液および内標準物質溶液の調製、ならびに検量線/QC検体の調製]

NAAG、<sup>2</sup>H<sub>5</sub>NAAGおよび<sup>2</sup>H<sub>8</sub>NAAGの標準溶液は、それぞれを正確に秤量し、10 μmol/mLとなるようにメタノールに溶解して調製した。<sup>2</sup>H<sub>8</sub>NAAGの標

準溶液は、メタノール／蒸留水（95:5、v/v）で希釈し、2 nmol/mL（脳検体用）または 0.1 nmol/mL（血漿および CSF 検体用）の内標準物質溶液とした。

脳内濃度測定用の検量線／QC 検体は、第 1 章、第 1 節付属実験と同様の手順で調製した。検量線検体は、 $[^2\text{H}_5]\text{NAAG}$  濃度が 1、3、10、30、100、300 および 1000 nmol/g となるように調製し、QC 検体は、 $[^2\text{H}_5]\text{NAAG}$  濃度が 1 (Lower limit of QC; LLQC)、3 (Low QC; LQC)、250 (Middle QC; MQC) および 800 nmol/g (High QC; HQC) となるように調製した。

血漿中濃度測定用の検量線／QC 検体は、第 1 章、第 1 節付属実験と同様の手順で調製した。検量線検体は、 $[^2\text{H}_5]\text{NAAG}$  濃度が 0.01、0.03、0.1、0.3、1、3 および 10 nmol/mL となるように調製し、QC 検体は、 $[^2\text{H}_5]\text{NAAG}$  濃度が 0.01 (LLQC)、0.03 (LQC)、0.3 (MQC) および 8 nmol/mL (HQC) となるように調製した。

#### [検体の前処理]

検体の前処理は、有機溶媒除タンパクと固相抽出のコンビネーション処理法により行った。有機溶媒除タンパクは、以下の手順で行った。脳ホモジネート、血漿または CSF（各 50  $\mu\text{L}$ ）は、内標準物質溶液（200  $\mu\text{L}$ ）と混合してボルテックスミキサーで攪拌（約 30 秒間）したのち、遠心分離（8000 $\times$ g、10 分間、4 $^{\circ}\text{C}$ ）した。ブランク検体および選択性検討用検体には内標準物質溶液の代わりにメタノール／蒸留水（95:5、v/v）を加え、同様に処理した。固相抽出は、以下の手順で行った。有機溶媒除タンパク後の遠心上清（脳検体：20  $\mu\text{L}$ 、血漿および CSF 検体：200  $\mu\text{L}$ ）を、予めメタノール 1 mL および水 1 mL で活性化した固相抽出カートリッジ Oasis<sup>®</sup> MAX (30 mg/1 cc ; Waters, MA, USA) に負荷した。次いで、蒸留水 1 mL、メタノール 1 mL で固相抽出カートリッジを洗浄したのち、用時調製したギ酸／メタノール（2:98、v/v）500  $\mu\text{L}$  を負荷し、その通過液

を回収した。回収した通過液は窒素気流下にて室温で蒸発乾固し、残渣にメタノール／蒸留水（95:5、v/v）（脳検体：1000  $\mu$ L、血漿および CSF 検体：100  $\mu$ L）を加えて再溶解し、LC-MS/MS 装置に注入する試料とした。

#### [装置および測定条件]

測定は、第 1 章、第 1 節付属実験と同じ装置および条件にて行った。なお、試料の注入量は 3  $\mu$ L とした。

#### [検量線の作成と定量値の算出]

検量線式は、検量線検体中の $^{2}\text{H}_5$ ]NAAG 濃度を  $x$ 、内標準物質に対する $^{2}\text{H}_5$ ]NAAG のピーク面積の比を  $y$  とし、最小二乗法（重み： $1/x$ ）による直線回帰を行い求めた。QC 検体中の $^{2}\text{H}_5$ ]NAAG 濃度および実検体中の NAAG 濃度は、内標準物質に対する $^{2}\text{H}_5$ ]NAAG のピーク面積の比あるいは内標準物質に対する NAAG のピーク面積の比をそれぞれ検量線式に代入して求めた。なお、検量線の作成および QC 検体の濃度の算出に用いた内標準物質（ $^{2}\text{H}_8$ ]NAAG）のピーク面積は、 $^{2}\text{H}_5$ ]NAAG のピーク面積に 0.0024（ $^{2}\text{H}_5$ ]NAAG よりも質量が 3 大きい天然同位体の存在比）を乗じた値を減じた値とした（（ $^{2}\text{H}_8$ ]NAAG のピーク面積）－（ $^{2}\text{H}_5$ ]NAAG のピーク面積） $\times$  0.0024）。

#### [アッセイバリデーション]

米国食品医薬品局 (FDA) の分析バリデーションガイドライン<sup>54)</sup>にしたがい、以下の項目を評価した。選択性（脳、血漿および CSF 検体、各検体につき 6 個体分を評価）、検量線（脳は 1–1000 nmol/g、血漿は 0.01–10 nmol/mL の濃度範囲、3 ランで評価）、日内再現性（脳および血漿検体、各検体につき LLQC、LQC、MQC および HQC をそれぞれ  $n=5$  ずつ評価）、および日間再現性（脳および血

漿検体、各検体につき LLQC、LQC、MQC および HQC をそれぞれ n=5 ずつ、3 ランで評価)。その他、血漿中濃度測定用の検量線による CSF 中濃度算出の妥当性 (3 個体分の CSF を測定) を評価した。

[標準添加法]

脳ホモジネート (50  $\mu$ L) には、NAAG 濃度が 10、30 または 100 nmol/mL の標準溶液 (各 20  $\mu$ L) を、血漿 (50  $\mu$ L) には、NAAG 濃度が 0.01、0.03 または 0.1 nmol/mL の標準溶液 (各 20  $\mu$ L) を加えて攪拌したのち、それぞれをサロゲートアナライト法と同様の手順で前処理した。検量線検体中の NAAG の標準品濃度を X 軸に、内標準物質に対する NAAG のピーク面積の比を Y 軸にプロットし、回帰直線が X 軸と交差する点の絶対値を、検体中にもともと存在する NAAG 濃度とした。

## 第2章、第1節付属実験

### [標準物質および試薬]

D-セリン、L-セリンおよび DL-セリンは、和光純薬工業株式会社から購入した。 $[^2\text{H}_3]$ DL-セリンは、Cambridge Isotope Laboratories, Inc. (Andover, MA, USA) から購入した (純度 98%、純度を補正して使用した)。 $[^{15}\text{N}]$ DL-セリンは Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) から購入した (純度 98%)。その他の試薬および溶媒は、市販の特級品または高速液体クロマトグラフ用を用いた。

### [動物および動物実験]

雄性 ICR (Institute of Cancer Research) マウス (4 週齢) は日本エスエルシー株式会社から、雄性 SD ラット (7 週齢) は日本チャールス・リバー株式会社からそれぞれ購入した。動物飼育および動物実験は、第1章、第1節付属実験と同じ条件およびガイドラインにしたがって行った。マウスの脳、ならびにラットの脳および CSF の採取は、第1章、第2節付属実験と同様に行った。

### [脳ホモジネートの調製]

脳検体は、4 倍量 (1:4, w/v) の氷冷した蒸留水に入れた状態で、氷浴中にてヒスコトロンホモジナイザー (株式会社マイクロテック・ニチオン) を用いて破砕した (50  $\mu\text{L}$  のホモジネートは 10 mg の脳組織に相当する)。ホモジネートは、液体窒素で凍結し、 $-80^\circ\text{C}$  の冷凍庫に保存した。融解操作は室温で行い、融解後は直ちに氷上に静置し、2 時間以内に使用した。

[標準溶液および内標準物質溶液の調製、ならびに検量線/QC 検体の調製]

D-セリン、L-セリン、DL-セリン、 $[^2\text{H}_3]$ DL-セリンおよび $[^{15}\text{N}]$ DL-セリンの標準溶液は、それぞれを正確に秤量し、10  $\mu\text{mol/mL}$  となるように蒸留水に溶解して調製した。 $[^{15}\text{N}]$ DL-セリンの標準溶液は、蒸留水で希釈し、80  $\text{nmol/mL}$  の内標準物質溶液とした。

脳内濃度測定用の検量線/QC 検体は、以下の通り調製した。まず、 $[^2\text{H}_3]$ DL-セリンの標準溶液 (10  $\mu\text{mol/mL}$ ) を 24 倍量の脳ホモジネートに添加し、ラセミ体濃度として 2000  $\text{nmol/g}$  ( $[^2\text{H}_3]$ D-セリンとして 1000  $\text{nmol/g}$ ) の $[^2\text{H}_3]$ DL-セリン添加脳を調製した。この $[^2\text{H}_3]$ DL-セリン添加脳を脳ホモジネートで順次希釈し、 $[^2\text{H}_3]$ D-セリン濃度が、マウスについては 1、3、10、30、100 および 300  $\text{nmol/g}$ 、ラットについては 1、3、10、30、100、300 および 1000  $\text{nmol/g}$  となる検量線検体とした。QC 検体は、 $[^2\text{H}_3]$ D-セリンの濃度が、マウスについては 1 (LLQC)、3 (LQC)、30 (MQC) および 240  $\text{nmol/g}$  (HQC) になるように、ラットについては、3 (LQC)、30 (MQC1)、240 (MQC2) および 800  $\text{nmol/g}$  (HQC) になるように検量線検体と同様に調製した。

CSF 中濃度測定用の検量線/QC 検体は、以下の通り調製した。まず、 $[^2\text{H}_3]$ DL-セリンの標準溶液 (10  $\mu\text{mol/mL}$ ) 40  $\mu\text{L}$  を 960  $\mu\text{L}$  の人工脳脊髄液<sup>95)</sup>に添加し、ラセミ体濃度として 2000  $\text{nmol/mL}$  ( $[^2\text{H}_3]$ D-セリンとして 1000  $\text{nmol/mL}$ ) の $[^2\text{H}_3]$ DL-セリン添加 CSF を調製した。この $[^2\text{H}_3]$ DL-セリン添加 CSF を人工脳脊髄液で順次希釈し、 $[^2\text{H}_3]$ D-セリン濃度が 0.2、0.6、2、6、20 および 60  $\text{nmol/mL}$  となる検量線検体とした。QC 検体は、 $[^2\text{H}_3]$ D-セリンの濃度が 0.6 (LQC)、6 (MQC) および 48  $\text{nmol/mL}$  (HQC) になるように検量線検体と同様に調製した。

#### [検体の前処理]

脳ホモジネートあるいは CSF 検体 (50  $\mu$ L) は、内標準物質溶液 (20  $\mu$ L) およびアセトニトリル (200  $\mu$ L) と混合してボルテックスミキサーで攪拌 (約 30 秒間) したのち、遠心分離 (3000 $\times$ g、10 分間、4 $^{\circ}$ C) した。ブランク検体および選択性検討用検体には内標準物質溶液の代わりに蒸留水 (20  $\mu$ L) を加え、同様に処理した。固相抽出は、以下の手順で行った。有機溶媒除タンパク後の遠心上清 (50  $\mu$ L) を、予めアセトニトリル 1 mL および 2% (v/v) ギ酸 1 mL で活性化した固相抽出カートリッジ Oasis<sup>®</sup> MCX (30 mg/1 cc ; Waters、MA、USA) に負荷した。次いで、蒸留水/アセトニトリル (1:1、v/v) 1 mL、アセトニトリル/蒸留水 (95:5、v/v) 1 mL で固相抽出カートリッジを洗浄したのち、メタノール/アンモニア水 (95:5、v/v) 500  $\mu$ L を負荷し、その通過液を回収した。回収した通過液は窒素気流下にて 60 $^{\circ}$ C で蒸発乾固し、残渣に 0.3% (v/v) トリフルオロ酢酸水溶液 (150  $\mu$ L) を加えて再溶解し、LC-MS/MS 装置に注入する試料とした。

#### [装置および測定条件]

質量分析には、ターボイオンスプレー<sup>®</sup>インターフェースを装着した AB Sciex 社製 API4000<sup>™</sup>四重極型タンデム質量分析計を使用した。スプレー電圧は 1500 V、ヒーターガス温度は 600 $^{\circ}$ C とし、GS1、GS2 およびカーテンガスは 40 psi、50 psi および 30 psi に設定した。コリジョンガスには窒素を用い、設定値を 11 (arbitrary units) とした。移動相は 0.3% (v/v) トリフルオロ酢酸水溶液とし、島津製作所社製の液体クロマトグラフ装置 (LC-20AD シリーズ) を使用して流速 0.3 mL/min. で LC カラム (ダイセル社製 CROWNPAK<sup>®</sup> CR (+)、4 mm i.d.  $\times$  150 mm、5  $\mu$ m) に送液した。カラム温度は 5 $^{\circ}$ C に設定し、試料の注入量は 2  $\mu$ L と

した。なお、LC カラムからの溶離液にメタノールを 0.2 mL/min.の流速でポストカラムモードで混合したのち、質量分析計に導入した。

#### MS/MS 条件

Analyte	SRM Transition	Polarity	DP (V)	CE (V)	CEP (V)
D-serine	$m/z$ 106 $\rightarrow$ $m/z$ 60	positive	35	15	4
[ $^2\text{H}_3$ ]D-serine	$m/z$ 109 $\rightarrow$ $m/z$ 63	positive	20	15	4
[ $^{15}\text{N}$ ]D-serine	$m/z$ 107 $\rightarrow$ $m/z$ 61	positive	35	15	4

DP: declustering potential, CE: collision energy, CXP: collision exit potential

#### [検量線の作成と定量値の算出]

検量線式は、検量線検体における[ $^2\text{H}_3$ ]D-セリンの添加濃度を  $x$ 、内標準物質に対する[ $^2\text{H}_3$ ]D-セリンのピーク面積の比を  $y$  として、最小二乗法（重み： $1/x$ ）による直線回帰を行い求めた。QC 検体中の[ $^2\text{H}_3$ ]D-セリン濃度および実検体中の D-セリン濃度は、内標準物質に対する[ $^2\text{H}_3$ ]D-セリンのピーク面積の比および内標準物質に対する D-セリンのピーク面積の比を、それぞれ検量線式に代入することで求めた。なお、検量線の作成と、QC 検体および実検体の定量値の算出に用いた内標準物質（[ $^{15}\text{N}$ ]D-セリン）のピーク面積は、検体中 D-セリンのピーク面積に 0.038（D-セリンよりも質量が 1 大きい天然同位体の存在比）を乗じた値を減じた値とした（（[ $^{15}\text{N}$ ]D-セリンのピーク面積）－（D-セリンのピーク面積） $\times$ 0.038）。

#### [アッセイバリデーション]

FDA の分析バリデーションガイドライン<sup>54)</sup>にしたがい、以下の項目を評価した。マウスについては、選択性（脳 6 個体分を評価）、検量線（1–300 nmol/g の濃度範囲、3 ランで評価）、日内再現性（LLQC、LQC、MQC および HQC をそ

れぞれ n=5 ずつ評価)、日間再現性 (LLQC、LQC、MQC および HQC をそれぞれ n=5 ずつ、3 ランで評価)。ラットについては、マウスでの評価結果を踏まえて、検量線 (脳は 1-1000 nmol/g、CSF は 0.2-60 nmol/mL の濃度範囲で評価)、および日内再現性 (LQC、MQC および HQC をそれぞれ n=4 で評価) を追加評価した。

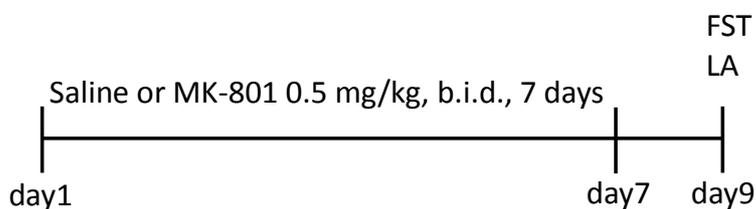
## 第2章、第2節付属実験

### [標準物質および試薬]

ラットに投与した D-セリンは、東京化成工業株式会社から購入した。  
(+)-5-methyl-10, 11-dihydro-5H-dibenzo(a,d)cyclohepten-5,10-imine maleate  
(MK-801) は、Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) から購入した。クロザピンは Toronto Research Chemicals Inc. (North York, Canada) から、ハロペリドールは大日本住友製薬株式会社から、イミプラミン塩酸塩は Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) からそれぞれ購入した。その他の試薬および溶媒は、第2章、第1節付属実験で使用したものと同等のものを用いた。

### [動物および動物実験]

雄性 SD ラット (7 および 9 週齢) は、日本チャールス・リバー株式会社から購入した。ラットに生理食塩液あるいは MK-801 を 1 日 2 回 7 日間皮下投与し、その 2 日後に強制水泳試験あるいは自発運動量の測定を行った (図参照)。クロザピン、ハロペリドール、イミプラミンおよび D-セリンは、強制水泳試験の開始 60 分前に、それぞれ単回経口投与あるいは単回腹腔内投与した。



FST: forced swimming test (強制水泳試験)、LA: spontaneous locomotor activity (自発運動量)

強制水泳試験は、生理食塩液あるいは MK-801 の最終投与 2 日後に行った。水温  $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ 、水深 30 cm になるように水を入れた円筒のシリンダー（直径 18 cm、高さ 50 cm）にラットを入れ、10 分間のラットの行動をカメラで撮影し録画した。ラットが水中で全く動かないか、あるいは水に沈むのを防ぐため後肢を動かすのみの行動を無動として、ストップウォッチを用いて無動時間を測定した。

自発運動量の測定には、強制水泳試験に使用したラットとは異なる個体を使用した。試験は、生理食塩液あるいは MK-801 の最終投与 2 日後に行った。防音箱に設置したアクリル製ケージ（幅 47 cm、奥行き 28 cm、高さ 30 cm）にラットを入れ、SCANET（ニューロサイエンス株式会社）を用いて 10 分間の運動量を測定した。

その他、動物飼育および動物実験は、第 1 章、第 1 節付属実験と同じ条件およびガイドラインにしたがって行った。

#### [脳ホモジネートの調製]

脳ホモジネートの調製は、第 2 章、第 1 節付属実験と同様に行った。

#### [標準溶液および内標準物質溶液の調製、ならびに検量線/QC 検体の調製]

標準溶液および内標準物質溶液の調製、ならびに検量線/QC 検体の調製は、第 2 章、第 1 節付属実験と同様に行った。

#### [検体の前処理]

検体の前処理は、第 2 章、第 1 節付属実験と同様に行った。

#### [装置および測定条件]

測定は、第 2 章、第 1 節付属実験と同じ装置および条件にて行った。

[検量線の作成と定量値の算出]

検量線の作成と定量値の算出は、第2章、第1節付属実験と同様に行った。

[統計学的解析]

統計学的解析は、SAS software (SAS Institute Japan, Tokyo, Japan) を用いて行った。行動実験データは、一元配置または二元配置の分散分析、あるいは Dunnett の多重比較により検定を行った。

## 引用文献

- 1) 安倍川智浩、伊藤候輝、仲唐安哉、小山司、統合失調症病態モデル動物の開発、精神経誌 114 (2012) 81–98.
- 2) 中藤和博、原田勝也、戸部貴彦、山路隆之、高倉昭治、グルタミン酸神経系賦活による統合失調症治療薬創製アプローチ、日薬理誌 136 (2010) 128–132.
- 3) J.T. Coyle, G. Tsai, The NMDA receptor glycine modulatory site: a therapeutic target for improving cognition and reducing negative symptoms in schizophrenia, *Psychopharmacology* 174 (2004) 32–38.
- 4) D.C. Javitt, S.R. Zukin, Recent advances in the phencyclidine model of schizophrenia, *Am. J. Psychiat.* 148 (1991) 1301–1308.
- 5) J.H. Krystal, D.C. D’Souza, D. Mathalon, E. Perry, A. Belger, R. Hoffman, NMDA receptor antagonist effects, cortical glutamatergic function, and schizophrenia: toward a paradigm shift in medication development, *Psychopharmacology* 169 (2003) 215–233.
- 6) J.W. Olney, J.W. Newcomer, N.B. Farber, NMDA receptor hypofunction model of schizophrenia, *J. Psychiatr. Res.* 33 (1999) 523–533.
- 7) J.H. Krystal, D.C. D’Souza, I.L. Petrakis, A. Belger, R.M. Berman, D.S. Charney, W. Abi-Saab, S. Madonick, NMDA agonists and antagonists as probes of glutamatergic dysfunction and pharmacotherapies in neuropsychiatric disorders, *Harvard Rev. Psychiat.* 7 (1997) 125–143.
- 8) A.C. Lahti, B. Koffel, D. LaPorte, C.A. Tamminga, Subanesthetic doses of ketamine stimulate psychosis in schizophrenia, *Neuropsychopharmacol.* 13 (1995) 9–19.

- 9) K.S. Wilcox, R.M. Fitzsimonds, B. Johnson, M.A. Dichter, Glycine regulation of synaptic NMDA receptors in hippocampal neurons, *J. Neurophysiol.* 76 (1996) 3415–3424.
- 10) L. Chen, M. Muhlhauser, C.R. Yang, Glycine transporter-1 blockade potentiates NMDA-mediated responses in rat prefrontal cortical neurons *in vitro* and *in vivo*, *J. Neurophysiol.* 89 (2003) 691–703.
- 11) M. Pitkänen, J. Sirviö, H. Lahtinen, E. Koivisto, P. Riekkinen, D-Cycloserine, a partial agonist at the glycine site, enhances the excitability of dentate granule cells *in vivo* in rats, *Eur. J. Pharmacol.* 253 (1994) 125–129.
- 12) D. Boulay, P. Pichat, G. Dargazanli, G. Estenne-Bouhtou, J.P. Terranova, N. Rogacki, J. Stemmelin, A. Coste, C. Lanneau, C. Desvignes, C. Cohen, R. Alonso, X. Vigé, B. Biton, R. Steinberg, M. Sevrin, F. Oury-Donat, P. George, O. Bergis, G. Griebel, P. Avenet, B. Scatton, Characterization of SSR103800, a selective inhibitor of the glycine transporter-1 in models predictive of therapeutic activity in schizophrenia, *Pharmacol. Biochem. Be.* 91 (2008) 47–58.
- 13) R. Depoortère, G. Dargazanli, G. Estenne-Bouhtou, A. Coste, C. Lanneau, C. Desvignes, M. Poncelet, M. Heaulme, V. Santucci, M. Decobert, A. Cudennec, C. Voltz, D. Boulay, J.P. Terranova, J. Stemmelin, P. Roger, B. Marabout, M. Sevrin, X. Vigé, B. Biton, R. Steinberg, D. Françon, R. Alonso, P. Avenet, F. Oury-Donat, G. Perrault, G. Griebel, P. George, P. Soubrié, B. Scatton, Neurochemical, electrophysiological and pharmacological profiles of the selective inhibitor of the glycine transporter-1 SSR504734, a potential new type of antipsychotic, *Neuropsychopharmacol.* 30 (2005) 1963–1985.
- 14) C.S. Weickert, T.W. Weickert, A. Pillai, P.F. Buckley, Biomarkers in schizophrenia: a brief conceptual consideration, *Dis. Makers* 35 (2013) 3–9.

- 15) U. Heresco-Levy, D.C. Javitt, R. Ebstein, A. Vass, P. Lichtenberg, G. Bar, S. Catinari, M. Ermilov, D-serine efficacy as add-on pharmacotherapy to risperidone and olanzapine for treatment-refractory schizophrenia, *Biol. Psychiat.* 57 (2005) 577–585.
- 16) T. Nishikawa, Analysis of free D-serine in mammals and its biological relevance, *J. Chromatogr. B* 879 (2011) 3169–3183.
- 17) R. Begeron, J.T. Coyle, *N*-Acetyl aspartyl-glutamate, NMDA receptor and psychosis, *Curr. Med. Chem.* 19 (2012) 1360–1364.
- 18) K. Hamase, A. Morikawa, K. Zaitso, D-Amino acids in mammals and their diagnostic value, *J. Chromatogr. B* 781 (2002) 73–91.
- 19) T. Cserhati, Chromatography of amino acids and short peptides. New advances, *Biomed. Chromatogr.* 21 (2007) 780–796.
- 20) D.L. Kirsner, T.K. Green, Separation and sensitive detection of D-amino acids in biological matrices, *J. Sep. Sci.* 32 (2009) 2305–2318.
- 21) T.-Y. Kim, H.-J. Kim, Chiral separation of 9-fluorenylmethyl chloroformate- and dansyl chloride-derivatized D,L-serine by  $\gamma$ -cyclodextrin-bonded high-performance liquid chromatography, *J. Chromatogr. A* 933 (2001) 99–106.
- 22) Y. Miyoshi, K. Hamase, T. Okamura, R. Konno, N. Kasai, Y. Tojo, K. Zaitso, Simultaneous two-dimensional HPLC determination of free D-serine and D-alanine in the brain and periphery of mutant rats lacking D-amino-acid oxidase, *J. Chromatogr. B* 879 (2011) 3184–3189.
- 23) T. Fukushima, J. Kawai, K. Imai, T. Toyooka, Simultaneous determination of D- and L-serine in rat brain microdialysis sample using a column-switching HPLC with fluorimetric detection, *Biomed. Chromatogr.* 18 (2004) 813–819.

- 24) Y. Song, Y. Feng, M.H. LeBlanc, S. Zhao, Y.-M. Liu, Assay of trace D-amino acids in neural tissue samples by capillary liquid chromatography/tandem mass spectrometry, *Anal. Chem.* 78 (2006) 8121–8128.
- 25) Y. Song, F. Liang, Y.-M. Liu, Quantification of D-amino acids in the central nervous system of *Aplysia californica* by liquid chromatography/tandem mass spectrometry, *Rapid Commun. Mass Sp.* 21 (2007) 73–77.
- 26) W.F. Visser, N.M. Verhoeven-Duif, R. Ophoff, S. Bakker, L.W. Klomp, R. Berger, T.J. Koning, A sensitive and simple ultra-high-performance-liquid chromatography-tandem mass spectrometry based method for the quantification of D-amino acids in body fluids, *J. Chromatogr. A* 1218 (2011) 7130–7136.
- 27) M.J. Berna, B.L. Ackermann, Quantification of serine enantiomers in rat brain microdialysate using Marfey's reagent and LC/MS/MS, *J. Chromatogr. B* 846 (2007) 359–363.
- 28) A.J. Shah, R. de la Flor, A. Atkins, J. Slone-Murphy, L.A. Dawson, Development and application of a liquid chromatography/tandem mass spectrometric assay for measurement of *N*-acetylaspartate, *N*-acetylaspartylglutamate and glutamate in brain slice superfusates and tissue extracts, *J. Chromatogr. B* 876 (2008) 153–158.
- 29) A.G. Thomas, C.J. Rojas, J.R. Hill, M. Shaw, B.S. Slusher, Bioanalysis of *N*-acetyl-aspartyl-glutamate as a marker of glutamate carboxypeptidase II inhibition, *Anal. Biochem.* 404 (2010) 94–96.
- 30) K. Arai, T. Fukushima, M. Tomiya, S. Mitsuhashi, T. Sasaki, T. Toyooka, Simultaneous determination of *N*-acetylaspartylglutamate and *N*-acetylaspartate in rat brain homogenate using high-performance liquid chromatography with pre-column fluorescence derivatization, *J. Chromatogr. B* 875 (2008) 358–362.

- 31) C. Bylda, R. Thiele, U. Kobold, D.A. Volmer, Recent advances in sample preparation techniques to overcome difficulties encountered during quantitative analysis of small molecules from biofluids using LC-MS/MS, *Analyst* 139 (2014) 2265–2276.
- 32) N.C. van de Merbel, Quantitative determination of endogenous compounds in biological samples using chromatographic techniques, *Trac-Trend Anal. Chem.* 27 (2008) 924–933.
- 33) B.R. Jones, G.A. Schultz, J.A. Eckstein, B.L. Ackermann, Surrogate matrix and surrogate analyte approaches for definitive quantitation of endogenous biomolecules, *Bioanalysis* 4 (2012) 2343–2356.
- 34) S. Chen, J.-T. Wu, R. Huang, Evaluation of surrogate matrices for standard curve preparation in tissue bioanalysis, *Bioanalysis* 4 (2012) 2579–2587.
- 35) S. Ho, H. Gao, Surrogate matrix: opportunities and challenges for tissue sample analysis, *Bioanalysis* 7 (2015) 2419–2433.
- 36) S. Ongay, G. Hendriks, J. Hermans, M. van den Berge, N.H.T. ten Hacken, N.C. van de Merbel, R. Bischoff, Quantification of free and total desmosine and isodesmosine in human urine by liquid chromatography tandem mass spectrometry: a comparison of the surrogate-analyte and the surrogate-matrix approach for quantitation, *J. Chromatogr. A* 1326 (2014) 13–19.
- 37) Y. Zu, C. Zhao, C. Li, L. Zhang, A rapid and sensitive LC-MS/MS method for determination of coenzyme Q10 in tobacco (*Nicotiana tabacum L.*) leaves, *J. Sep. Sci.* 29 (2006) 1607–1612.
- 38) R. Švobaitė, I. Solassol, F. Pinguet, L. Ivanauskas, J. Brès, F.M.M. Bressolle, HPLC with UV or mass spectrometric detection for quantifying endogenous uracil and dihydrouracil in human plasma, *Clin. Chem.* 54 (2008) 1463–1472.

- 39) L.-H. Ahlström, J. Raab, L. Mathiasson, Application of standard addition methodology for the determination of banned azo dyes in different leather types, *Anal. Chim. Acta* 552 (2005) 76–80.
- 40) A.-J.L. Ham, B.P. Engelward, H. Koc, R. Sangaiah, L.B. Meira, L.D. Samson, J.A. Swenberg, New immunoaffinity-LC-MS/MS methodology reveals that *Aag* null mice are deficient in their ability to clear 1,*N*<sup>6</sup>-etheno-deoxyadenosine DNA lesions from lung and liver *in vivo*, *DNA Repair* 3 (2004) 257–265.
- 41) A.N. Hoofnagle, J.O. Becker, M.H. Wener, J.W. Heinecke, Quantification of thyroglobulin, a low-abundance serum protein, by immunoaffinity peptide enrichment and tandem mass spectrometry, *Clin. Chem.* 54 (2008) 1796–1804.
- 42) Y. Wang, J.S. Heilig, Differentiation and quantification of endogenous and recombinant-methionyl human leptin in clinical plasma samples by immunocapture/mass spectrometry, *J. Pharmaceut. Biomed.* 70 (2012) 440–446.
- 43) P.L. Kole, G. Venkatesh, J. Kotecha, R. Sheshala, Recent advances in sample preparation techniques for effective bioanalytical methods, *Biomed. Chromatogr.* 25 (2011) 199–217.
- 44) H. Trufelli, P. Palma, G. Famiglini, A. Cappiello, An overview of matrix effects in liquid chromatography-mass spectrometry, *Mass Spectrom. Rev.* 30 (2011) 491–509.
- 45) T.G. Hall, I. Smukste, K.R. Bresciano, Y. Wang, D. McKearn, R.E. Savage, Identifying and overcoming matrix effects in drug discovery and development, *Tandem mass spectrometry - application and principles*, Dr. J. Prasain (Ed.) (2012) 407–438.
- 46) W. Li, L.H. Cohen, Quantitation of endogenous analytes in biofluid without a true blank matrix, *Anal. Chem.* 75 (2003) 5854–5859.

- 47) M. Jemal, A. Schuster, D.B. Whigan, Liquid chromatography/tandem mass spectrometry methods for quantitation of mevalonic acid in human plasma and urine: method validation, demonstration of using a surrogate analyte, and demonstration of unacceptable matrix effect in spite of use of a stable isotope analog internal standard, *Rapid. Commun. Mass Sp.* 17 (2003) 1723–1734.
- 48) K. Kinoshita, K. Arai, K. Kawaura, T. Hiyoshi, J. Yamaguchi, Development, validation, and application of a surrogate analyte method for determining *N*-acetyl-L-aspartyl-L-glutamic acid levels in rat brain, plasma, and cerebrospinal fluid, *J. Chromatogr. B* 1003 (2015) 1–11.
- 49) K. Kinoshita, S. Jingu, J. Yamaguchi, A surrogate analyte method to determine D-serine in mouse brain using liquid chromatography–tandem mass spectrometry, *Anal. Biochem.* 432 (2013) 124–130.
- 50) K. Kawaura, H. Koike, K. Kinoshita, D. Kambe, A. Kaku, J. Karasawa, S. Chaki, H. Hikichi, Effects of a glycine transporter-1 inhibitor and D-serine on MK-801-induced immobility in the forced swimming test in rats, *Behav. Brain Res.* 278 (2015) 186–192.
- 51) J.H. Neale, T. Bzdega, B. Wroblewska, *N*-Acetylaspartylglutamate: the most abundant peptide neurotransmitter in the mammalian central nervous system, *J. Neurochem.* 75 (2000) 443–452.
- 52) N.C. Hughes, E.Y.K. Wong, J. Fan, N. Bajaj, Determination of carryover and contamination for mass spectrometry-based chromatographic assays, *AAPS J.* 9 (2007) e353–e360.
- 53) L.-P. Morin, J.-N. Mess, M. Furtado, F. Garofolo, Reliable procedures to evaluate and repair crosstalk for bioanalysis MS/MS assays, *Bioanalysis* 3 (2011) 275–283.

- 54) U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research, Center for Veterinary Medicine, Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation Draft Guidance, September 2013, <  
<http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/UCM368107.pdf>>.
- 55) J.H. Neale, R.T. Olszewski, L.M. Gehl, B. Wroblewska, T. Bzdega, The neurotransmitter *N*-acetylaspartyl-glutamate in models of pain, ALS, diabetic neuropathy, CNS injury and schizophrenia, *Trends Pharmacol. Sci.* 26 (2005) 477–484.
- 56) B. Wroblewska, J.T. Wroblewski, S. Pshenichkin, A. Surin, S.E. Sullivan, J.H. Neale, *N*-Acetylaspartylglutamate selectively activates mGluR3 receptors in transfected cells, *J. Neurochem.* 69 (1997) 174–181.
- 57) P. Šácha, J. Zámečník, C. Bařinka, K. Hlouchová, A. Vřcha, P. Mřčořhová, I. Hilgert, T. Eckschlager, J. Konvalinka, Expression of glutamate carboxypeptidase II in human brain, *Neuroscience* 144 (2007) 1361–1372.
- 58) J. Nagel, I. Belozertseva, S. Greco, V. Kashkin, A. Malyshkin, A. Jirgensons, E. Shekunova, B. Eilbacher, A. Bepalov, W. Danysz, Effects of NAAG peptidase inhibitor 2-PMPA in model chronic pain - relation to brain concentration, *Neuropharmacology* 51 (2006) 1163–1171.
- 59) D. Zuo, T. Bzdega, R.T. Olszewski, J.R. Moffett, J.H. Neale, Effects of *N*-acetylaspartylglutamate (NAAG) peptidase inhibition on release of glutamate and dopamine in prefrontal cortex and nucleus accumbens in phencyclidine model of schizophrenia, *J. Biol. Chem.* 287 (2012) 21773–21782.

- 60) R.T. Olszewski, M.M. Wegorzewska, A.C. Monteiro, K.A. Krolikowski, J. Zhou, A.P. Kozikowski, K. Long, J. Mastropaolo, S.I. Deutsch, J.H. Neale, Phencyclidine and dizocilpine induced behaviors reduced by *N*-acetylaspartylglutamate peptidase inhibition via metabotropic glutamate receptors, *Biol. Psychiat.* 63 (2008) 86–91.
- 61) N.B. Cech, C.G. Enke, Practical implications of some recent studies in electrospray ionization fundamentals, *Mass Spectrom. Rev.* 20 (2001) 362–387.
- 62) P. Hemström, K. Irgum, Hydrophilic interaction chromatography, *J Sep. Sci.* 29 (2006) 1784–1821.
- 63) B. Buszewski, S. Noga, Hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC) - a powerful separation technique, *Anal. Bioanal. Chem.* 402 (2012) 213–247.
- 64) J.C. Heaton, J.J. Russell, T. Underwood, R. Boughtflower, D.V. McCalley, Comparison of peak shape in hydrophilic interaction chromatography using acidic salt buffers and simple acid solutions, *J. Chromatogr. A* 1347 (2014) 39–48.
- 65) R. Bonfiglio, R.C. King, T.V. Olah, K. Merkle, The effects of sample preparation methods on the variability of the electrospray ionization response for model drug compounds, *Rapid Commun. Mass Sp.* 13 (1999) 1175–1185.
- 66) U.V. Berger, R. Luthi-Carter, L.A. Passani, S. Elkabes, I. Black, C. Konradi, J.T. Coyle, Glutamate carboxypeptidase II is expressed by astrocytes in the adult rat nervous system, *J. Comp. Neurol.* 415 (1999) 52–64.
- 67) J. Karasawa, K. Hashimoto, S. Chaki, D-Serine and a glycine transporter inhibitor improve MK-801-induced cognitive deficits in a novel object recognition test in rats, *Behav. Brain Res.* 186 (2008) 78–83.
- 68) T. Shimazaki, A. Kaku, S. Chaki, D-Serine and a glycine transporter-1 inhibitor enhance social memory in rats, *Psychopharmacology* 209 (2010) 263–270.

- 69) G. Tsai, P. Yang, L.C. Chung, N. Lange, J.T. Coyle, D-Serine added to antipsychotics for the treatment of schizophrenia, *Biol. Psychiat.* 44 (1998) 1081–1089.
- 70) M. Weiser, U. Heresco-Levy, M. Davidson, D.C. Javitt, N. Werbeloff, A.A. Gershon, Y. Abramovich, D. Amital, A. Doron, S. Konas, Y. Levkovitz, D. Liba, A. Teitelbaum, M. Mashiach, Y. Zimmerman, A multicenter, add-on randomized controlled trial of low-dose D-serine for negative and cognitive symptoms of schizophrenia, *J. Clin. Psychiat.* 73 (2012) e728–e734.
- 71) I. Bendikov, C. Nadri, S. Amar, R. Panizzutti, J. De Miranda, H. Wolosker, G. Agam, A CSF and postmortem brain study of D-serine metabolic parameters in schizophrenia, *Schizophr. Res.* 90 (2007) 41–51.
- 72) R. Chiusaroli, P. Garofalo, S. Espinoza, E. Neri, G. Caselli, M. Lanza, Antipsychotic-like effects of the *N*-methyl-D-aspartate receptor modulator neoglutamine: an immunohistochemical and behavioural study in the rat, *Pharmacol. Res.* 61 (2010) 430–436.
- 73) M.D. Black, G.B. Varty, M. Arad, S. Barak, A. De Levie, D. Boulay, P. Pichat, G. Griebel, I. Weiner, Procognitive and antipsychotic efficacy of glycine transport 1 inhibitors (GlyT1) in acute and neurodevelopmental models of schizophrenia: latent inhibition studies in the rat, *Psychopharmacology (Berl)*. 202 (2009) 385–396.
- 74) F. Errico, V. D’Argenio, F. Sforazzini, F. Iasevoli, M. Squillace, G. Guerri, F. Napolitano, T. Angrisano, A. Di Maio, S. Keller, D. Vitucci, A. Galbusera, L. Chiariotti, A. Bertolino, A. de Bartolomeis, F. Salvatore, A. Gozzi, A. Usiello, A role for D-aspartate oxidase in schizophrenia and in schizophrenia-related

- symptoms induced by phencyclidine in mice, *Transl. Psychiat.* 5 (2015) e512-e520.
- 75) W. Danysz, C.G. Parsons, Glycine and *N*-methyl-D-aspartate receptors: physiological significance and possible therapeutic applications, *Pharmacol. Rev.* 50 (1998) 597–664.
- 76) D. Whittington, P. Sheffels, E.D. Kharasch, Stereoselective determination of methadone and the primary metabolite EDDP in human plasma by automated on-line extraction and liquid chromatography mass spectrometry, *J. Chromatogr. B* 809 (2004) 313–321.
- 77) I. Locatelli, V. Kmetec, A. Mrhar, I. Grabnar, Determination of warfarin enantiomers and hydroxylated metabolites in human blood plasma by liquid chromatography with achiral and chiral separation, *J. Chromatogr. B* 818 (2005) 191–198.
- 78) B. Chankvetadze, Recent developments on polysaccharide-based chiral stationary phases for liquid-phase separation of enantiomers, *J. Chromatogr. A* 1269 (2012) 26–51.
- 79) M. Lämmerhofer, Chiral recognition by enantioselective liquid chromatography: mechanisms and modern chiral stationary phases, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 814–856.
- 80) J. Chen, W.A. Korfmacher, Y. Hsieh, Chiral liquid chromatography-tandem mass spectrometric methods for stereoisomeric pharmaceutical determinations, *J. Chromatogr. B* 820 (2005) 1–8.
- 81) U. Heresco-Levy, M. Ermilov, P. Lichtenberg, G. Bar, D.C. Javitt, High-dose glycine added to olanzapine and risperidone for the treatment of schizophrenia, *Biol. Psychiat.* 55 (2004) 165–171.

- 82) G. Tsai, H.Y. Lane, P. Yang, M.-Y. Chong, N. Lange, Glycine transporter I inhibitor, *N*-methylglycine (sarcosine), added to antipsychotics for the treatment of schizophrenia, *Biol. Psychiat.* 55 (2004) 452–456.
- 83) T. Matsui, M. Sekiguchi, A. Hashimoto, U. Tomita, T. Nishikawa, K. Wada, Functional comparison of D-serine and glycine in rodents: the effect on cloned NMDA receptors and the extracellular concentration, *J. Neurochem.* 65 (1995) 454–458.
- 84) J.H. Schoemaker, W.T. Jansen, J. Schipper, A. Szegedi, The selective glycine uptake inhibitor org 25935 as an adjunctive treatment to atypical antipsychotics in predominant persistent negative symptoms of schizophrenia: results from the GIANT trial, *J. Clin. Psychopharm.* 34 (2014) 190–198.
- 85) 西川徹、脳の内在性 D-セリンの代謝・機能と精神神経疾患における意義、*生化学* 80 (2008) 267–276.
- 86) D.D. Miller, P.J. Perry, R.J. Cadoret, N.C. Andreasen, Clozapine's effect on negative symptoms in treatment-refractory schizophrenics, *Compr. Psychiat.* 35 (1994) 8–15.
- 87) J.S. Brar, K.N. Chengappa, H. Parepally, A.R. Sandman, S.B. Kreinbrook, S.A. Sheth, R. Ganguli, The effects of clozapine on negative symptoms in patients with schizophrenia with minimal positive symptoms, *Ann. Clin. Psychiatry.* 9 (1997) 227–234.
- 88) N.R. Schooler, Negative symptoms in schizophrenia: assessment of the effect of risperidone, *J. Clin. Psychiat.* 55 Suppl. (1994) 22–28.
- 89) P. Boyer, Y. Lecrubier, A.J. Puech, Treatment of positive and negative symptoms: pharmacologic approaches, *Mod. Probl. Pharmacopsychiatry.* 24 (1990) 152–174.

- 90) R. Murai, Y. Noda, K. Matsui, H. Kamei, A. Mouri, K. Matsuba, A. Nitta, H. Furukawa, T. Nabeshima, Hypofunctional glutamatergic neurotransmission in the prefrontal cortex is involved in the emotional deficit induced by repeated treatment with phencyclidine in mice: implications for abnormalities of glutamate release and NMDA-CaMKII signaling, *Behav. Brain. Res.* 180 (2007) 152–160.
- 91) G.J. Marek, B. Behl, A.Y. Bernal, G. Gross, Y. Lee, H. Schoemaker, Glutamatergic (*N*-methyl-D-aspartate receptor) hypofrontality in schizophrenia: too little juice or a miswired brain? *Mol. Pharmacol.* 77 (2010) 317–326.
- 92) B.J. Kinon, J.-C. Gómez, Clinical development of pomalutmetad methionil: a non-dopaminergic treatment for schizophrenia, *Neuropharmacology* 66 (2013) 82–86.
- 93) N. Subasinghe, M. Schulte, M.Y.-M. Chan, R.J. Roon, J.F. Koerner, R.L. Johnson, Synthesis of acyclic and dehydroaspartic acid analogues of Ac-Asp-Glu-OH and their inhibition of rat brain N-acetylated  $\alpha$ -linked acidic dipeptidase (NAALA dipeptidase), *J. Med. Chem.* 33 (1990) 2734–2744.
- 94) G. Paxinos, C. Watson, *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*, 6th Edition, Elsevier (2007).
- 95) M.V. Sanchez-Vives, D.A. McCormick, Cellular and network mechanisms of rhythmic recurrent activity in neocortex, *Nat. Neurosci.* 10 (2000) 1027–1034.