線維化進展度の測定 —ハイドロキシプロリンのLC/MSによる新測定法—

京谷庄二郎*†¹, 崔 泰林†², 濱田篤秀†², 横田淳子†², 小野正英†²,
吉岡三郎†¹, 楠瀬正彦†¹, 宮村充彦†¹, 西岡 豊†^{1,2}

高知医科大学医学部附属病院薬剤部†¹

高知医科大学大学院医学研究科†²

Determining of Degree of Fibrosis —New Method of Measuring Hydroxyproline by LC/MS—

Shojiro kyotani*†¹, Tailin Cui†², Atuhide Hamada†², Junko Yokota†², Masahide Ono†²,
Saburo Yoshioka†¹, Masahiko Kusunose†¹, Mituhiko Miyamura†¹ and Yutaka Nishioka†^{1,2}

Department of Pharmacy, Kochi Medical School Hospital†¹

Kochi Medical Graduate school†²

[Received November 1, 2002]
[Accepted March 21, 2003]

We investigated a highly sensitive method to determine the degree of fibrosis of various organs by Liquid chromatography/Mass Spectrometry (LC/MS). The results suggested that the method of LC/MS for determining hydroxyproline had a significantly higher sensitivity than colorimetric and fluorescent labelling methods. In addition, the effect of complex amino acid components from living body samples mixing with hydroxyproline was eliminated. According to the peak observed on the chromatography findings, the molecular structure of hydroxyproline could be accurately identified. Therefore, we concluded that the new method of LC/MS was very useful for measuring hydroxyproline in living body samples containing large amounts of complex amino acid components.

Keywords — hydroxyproline, liquid chromatography/mass spectrometry, living body sample, colorimetric method, fluorescent labelling method

緒 言

近年、肝臓および肺臓等に生じる線維化は、慢性肝炎、肝硬変、肝臓および肺線維症などの各種難治性疾患の発症に関与し、そのメカニズムの解明が急がれている。この問題を解決するには、各臓器の線維化進展度を正確に把握する必要がある。現在、各臓器の線維化の進展度は従来、組織中のハイドロキシプロリン量を指標と

して評価されている¹⁻³⁾。そのため、組織中のハイドロキシプロリン量を高精度で測定する必要がある。組織中のハイドロキシプロリンの測定は、エールリッヒ試薬による比色法および蛍光ラベル化法^{1,2,4,5)}により行われている。しかしながら、これらの測定法においては、生体成分由来の他のアミノ酸等の夾雑により、測定精度が低くばらつきが多い等の問題があり、高精度の測定法の確立が望まれている。

*†^{1,2} 高知県南国市岡豊町小蓮; Kohasu, Okatoyo-cho, Nangoku-shi, Kochi, 783-8505 Japan

そこで、著者らは、高速液体クロマトグラフ質量分析装置 (Liquid Chromatography-Mass Spectrometry: LC/MS) を用いて、肺臓および肝臓線維化モデルラットにおける各組織中のハイドロキシプロリン量の測定を行い、従来より行われてきた比色法、蛍光ラベル化法との比較検討を行ったので報告する。

方 法

1. 使用薬物

ジメチルニトロサミンはナカライテスク(株)製、ネンブタールは(株)大日本製薬製、ブレオマイシンは(株)日本化薬製、ハイドロキシプロリンはナカライテスク(株)社製を用いた。その他の試薬は、市販特級品を用いた。

2. 肺臓および肝臓線維化モデルラットの作成

肺臓線維化モデルラットは、Wistar 系雄性ラット (7 週齢) を用い、ネンブタール (50mg/kg) 麻酔下にて頸部を正中切開し、気管を露出させ、線維化誘発物質ブレオマイシン (0.30U/100g body weight) を気管内単回投与した。なお、対照として、生理食塩液を気管内投与したラットを用いた。

肝臓線維化モデルラットは、Wistar 系雄性ラット (7 週齢) を用い、線維化誘発物質ジメチルニトロサミン (40 mg/kg body weight) を腹腔内に単回投与して作成した。なお、対照として、正常ラットを用いた。

3. ハイドロキシプロリン量の測定

3-1. 比色法による組織中のハイドロキシプロリン量の測定

ブレオマイシン投与後28日にラットを屠殺し、肺臓を摘出する。また、ジメチルニトロサミン投与後14日にラットを屠殺し、肝臓を摘出する。摘出した臓器に重量の10倍量の5%トリクロロ酢酸溶液を加え、氷冷下、細胞粉碎機(アイラード社製)を用いてホモジナイズし、遠心分離(約2,900g, 10分間)後、沈渣を分取した。沈渣を、蒸留水で2回洗浄し、6N塩酸を加え、110℃で16時間、加水分解を行った。

反応後、トルエン3mLを加え、20分間振とうし、遠心分離(約2,900g, 10分間)後トルエン層を分取、エーリッヒ試薬を加え、測定用試料とした。測定用試料中のハイドロキシプロリンの測定は、マイクロプレート型吸光光度計(バイオラッド社製ウルトラマーク)を用い、波長561nmにて行った⁴⁾。

3-2. 蛍光ラベル化法による肝臓組織中のハイドロキシプロリン量の測定

ブレオマイシン投与後28日にラットを屠殺し、肺臓を

摘出する。また、ジメチルニトロサミン投与後14日にラットを屠殺し、肝臓を摘出する。摘出した臓器の一定部位を約0.3g秤量し、エタノール5mLを加え、氷冷下、細胞粉碎機(アイラード社製)を用いてホモジナイズし、遠心分離(約2,500g, 20分間)後、上清を分取した。この液につき、1mLをとり、60℃で8時間加温乾固した。残渣に、エタノール40μL, 0.1mol/L ほう酸緩衝液80μLを加え溶解後、蛍光ラベル化剤である100mmol/L 4-フルオロ-7-ニトロベンゾフラザン液を40μL添加し、室温遮光下、15時間反応させ蛍光ラベル化処理を行った。5mmol/L 塩酸液840μLを加え反応停止後、遠心分離(約1,900g, 20分間)を行い、上清をHPLC用試料とした^{1,2,5)}。

測定条件は、以下のとおりである。

装 置 日立 L6000高速液体クロマトグラフ

検 出 日立 L7480蛍光光度計

(Ex475nm Em530nm)

カラム YMC Pack ODS-AQ 150×6.0mm I.D.

分析温度 室温

移動相 アセトニトリル：水(35：65 →50：50への15分間のグラジュエント)

流 速 1 mL/min

3-3. LC-MS による組織中のハイドロキシプロリン量の測定

1) 測定試料の作成

①ブレオマイシン投与後28日にラットを屠殺し、肺臓を摘出する。また、ジメチルニトロサミン投与後14日にラットを屠殺し、肝臓を摘出する。摘出した臓器の一定部位を約0.3g秤量し、エタノール5mLを加え、氷冷下、細胞粉碎機(アイラード社製)を用いてホモジナイズし、遠心分離(約2,500g, 20分間)後、上清を分取した。

②ブレオマイシン投与後28日にラットを屠殺し、肺臓を摘出する。また、ジメチルニトロサミン投与後14日にラットを屠殺し、肝臓を摘出する。摘出した臓器に重量の10倍量の5%トリクロロ酢酸溶液を加え、氷冷下、細胞粉碎機(アイラード社製)を用いてホモジナイズし、遠心分離(約2,900g, 10分間)後、沈渣を分取した。沈渣を、蒸留水で2回洗浄し、6N塩酸を加え、110℃で16時間、加水分解を行い、測定用試料とした。

2) LC/MS 測定条件

これらの測定用試料について、装置としてLC-MS2010(島津製作所(株))を用い、ハイドロキシプロリン量を測定した。

測定条件は、以下のとおりである。

LC 側条件

移動相：5%アセトニトリル-10mM 酢酸アンモニ

ウム

カラム：Shin-pack VP-ODS (150mm×2 φ)

温度：40℃

移動相流速：0.2mL/min

試料注入量：10μL

検出波長：200–300nm

MS 側条件

イオン化法：大気圧イオン化 (APCI)

イオン検出：ポジティブ

プローブ電圧 4.5KV, プローブ電流 4.2μA

APCI プローブ温度 250℃, CDL 電圧 20.0V

CDL 温度 250℃, ブロック温度 200℃

分析モード

SCAN 測定 分析範囲 m/z 50–250

取込時間 0.5sec/SCAN

SIM 測定 分析範囲 m/z 173

取込時間 0.1sec/ch

3–4. ハイドロキシプロリンの添加回収率の測定

肺臓および肝臓組織の試料にハイドロキシプロリンの一定量を添加し、LC-MS により含量を測定し添加回収率を求めた。

4. 統計的検定

各群間の有意差は、一元配置の分散分析により比較検定した。群間に有意差が認められた場合、各群間において、Bonferroni 法により有意差検定を行った。また、相関係数の検定は、Student-t 検定にて行った。

結 果

1. LC-MS によるハイドロキシプロリンの測定

1–1. ハイドロキシプロリンの MS スペクトラムおよびクロマトグラム

ハイドロキシプロリン標準品の APCI-MS スペクトラムには、分子イオン (分子量131) およびイオン強度を増大させるため、また、高質領域にフラグメントを得るために添加した酢酸アンモニウムに由来する分子量173 [M^+CH_3CO] のフラグメントピークが認められた。また、分子量173における選択イオン検出 (Selected Ion Monitoring: SIM) の MS クロマトグラムには、保持時間 2.2分に濃度 1 ng/mL よりピークが認められ、濃度35ng/mL では、ピークが認められた。一方、ハイドロキシプロリン標準液の UV スペクトル (230nm) では、1000倍の濃度である 1 μg/mL においても、わずかなピークが認められる程度であった。

1–2. LC/MS におけるハイドロキシプロリンの検出感度

MS クロマトグラムによるハイドロキシプロリンの検量線をピーク面積法により作成した結果、35ng/mL 以下の濃度においてピーク面積との間に相関性が認められず、検量線が作成できなかった。一方、35ng/mL から 560ng/mL の濃度においては、ピーク面積との間に相関性が認められ、検量線 ($r=0.989$) は直線性を示した。

1–3. 肺臓および肝臓組織中ハイドロキシプロリンの MS クロマトグラムおよび MS スペクトル

Fig. 1 に肺線維化および肝線維化モデルラットにおける組織中のハイドロキシプロリンの MS クロマトグラムおよび APCI-MS スペクトルを示した。

肺臓および肝臓組織の MS クロマトグラムにおいても、ハイドロキシプロリン標準品と同様に、保持時間 2.2 分に m/z 173 のピークが認められた。また、そのピークの MS スペクトルには m/z 131 のピークが確認できたことより、ハイドロキシプロリンと同定した。

1–4. ハイドロキシプロリンの添加回収率

ハイドロキシプロリンの添加回収率は、肺臓では 107%、肝臓では 105% であった。

2. 肺臓および肝臓組織中のハイドロキシプロリン量

1. 比色法、蛍光ラベル化法および LC/MS 法による組織中ハイドロキシプロリン量

Fig. 2 に比色法、蛍光ラベル化法および LC/MS 法によるラット肺臓および肝臓組織中ハイドロキシプロリン量を示した。

ラット肺臓および肝臓組織中のハイドロキシプロリン量は、比色法、蛍光ラベル化法および LC-MS 法とも、対照群に比べ有意に高値を示した。また、蛍光ラベル化法による肺臓および肝臓組織中ハイドロキシプロリン量は、LC/MS 法よりも低値を示した。

Fig. 3 に比色法と LC/MS 法によるラット肺臓組織中ハイドロキシプロリン量の相関を示した。

対照群における肺臓組織中のハイドロキシプロリン量は、比色法による測定値と LC-MS 法による測定値との間に $r=0.972$ ($p<0.001$) と有意な相関が認められた。

また、プレオマイシン投与群における肺臓組織中のハイドロキシプロリン量は、比色法による測定値と LC/MS 法による測定値との間に $r=0.918$ ($p<0.001$) と有意な相関が認められた。肝臓組織中のハイドロキシプロリン量も同様に有意な相関が認められた。

Fig. 4 に蛍光ラベル化法と LC/MS 法によるラット肝臓組織中ハイドロキシプロリン量の相関を示した。

対照群における肝臓組織中のハイドロキシプロリン量は、蛍光ラベル化法による測定値と LC/MS 法による測定値との間に $r=0.957$ ($p<0.001$) と有意な相関が認め

られた。

また、ジメチルニトロソアミン投与群における肝臓組織中のヒドロキシプロリン量は、蛍光ラベル化法によ

る測定値と LC/MS 法による測定値との間に $r=0.981$ ($p<0.001$) と有意な相関が認められた。肺臓組織中のヒドロキシプロリン量も同様に有意な相関が認められた。

Fig. 1. Mass Chromatogram and Spectrum of Hydroxyproline in Lung and Liver of Rats.

Fig. 2. Hydroxyproline Concentration in Lung and Liver of Rats by Colorimetric, Fluorescent Labelling and LC/MS Methods.

Each column represents the mean $\pm$ S.D. of six to nine animals.

*, $p<0.05$, significantly different from the result of the control group.

■ : control (saline), ■ : bleomycin administration,

□ : control (normal rat), ■ : dimethylnitrosamine administration

Fig.3. Correlation between Hydroxyproline Concentration in Rat Lung Measured by Colorimetric and LC/MS Methods.

A : control, B : bleomycin administration group.

○ : The data were after administration of saline for 28 days.

● : The data were after administration of Bleomycin for 28 days.

Fig.4. Correlation between Hydroxyproline Concentration in Rat Liver Measured by Fluorescent Labelling Method and LC/MS Methods.

A : control, B : dimethylnitrosoamin administration group

○ : The data were after administration of normal food for 14 days.

● : The data were after administration of dimethylnitrosamin for 14 days.

考 察

線維化の進展度を正確に把握するため、ハイドロキシプロリンを指標物質としてLC/MSを用いた測定法の確立を試みた。また、LC/MS測定法の有用性を従来の測

定法である比色法および蛍光ラベル化法と比較検討した。

ハイドロキシプロリンのAPCI-MSスペクトルは、分子イオンピーク m/z 131とともに、 m/z 173のピークを示した。 m/z 173はハイドロキシプロリンに、イオン強

度を増大するために移動層に添加したイオンペア試薬である酢酸アンモニウムの酢酸部分が脱水付加したピークと同定した。また、 m/z 131と m/z 173のAPCI-MSスペクトルにおける相対強度は、ほぼ同一であったが、MSクロマトグラムにおけるSIM測定には、移動相溶媒等の妨害ピークが少ない高分子量の m/z 173のイオンの方が移動相溶媒等の妨害が少なかった。

ハイドロキシプロリン標準品のMSクロマトグラムは、 m/z 173において濃度1 ng/mLよりピークが認められた。また、LC測定により同時に得られるハイドロキシプロリンのUVスペクトル(230nm)は、1000倍の濃度である1 μ g/mLにおいても、わずかなピークが認められる程度であり、MSによる検出の有用性が認められた。しかしながら、今回のLC/MS測定条件においては、35ng/mL以下の濃度では、ピーク面積との間に相関性は認められず、検量線の作成はできなかった。このことは、各濃度におけるピークのS/N比が低濃度ほど小さいことより、35ng/mL以下の濃度では、移動相溶媒のピークによる影響が大きいものと推察した。一方、比色法および蛍光ラベル化法においては、ハイドロキシプロリンの検出限界は2 μ g/mLであった。

肺臓および肝臓組織中のハイドロキシプロリンのLC/MSクロマトグラムにおいては、ハイドロキシプロリン標準品のクロマトグラムと同様、保持時間2.2分に m/z 173のピークが認められた。また、MSスペクトルにおいても、ハイドロキシプロリンの分子イオンピーク(m/z 131)が確認できた。これらのことより、ハイドロキシプロリンのLC/MSによる測定は、高精度の測定が行えるとともに、そのピークの同定においてもハイドロキシプロリンの分子構造が確認出来る情報を得ることができ、生体試料等の夾雑物を多く含む試料中のハイドロキシプロリンの定量に有用であるものと考察した。

比色法による肺臓および肝臓組織中のハイドロキシプロリン測定値は、LC/MS法による測定値と同様の値を示した。一方、蛍光ラベル化法による測定値はLC/MS法による測定値より低値を示した。このことは、蛍光ラベル化法においては、測定試料の前処理の段階で、蛍光物質をハイドロキシプロリンに付加するという反応過程を経ることから、その収率に問題があるものと推察されるが、詳細については今後の検討課題である。

これらのことより、LC/MSを用いたハイドロキシプロリンの測定は、従来行われてきた比色法および蛍光ラベル化法に比べ簡便で高感度な測定が行えるものと考察

した。

また、このLC/MS法を臨床への適応を考えた場合、高感度で測定できることより極少量の組織で測定が可能である。肝臓等のバイオブシー可能な臓器においては、有用であると考えられるが、肺臓等バイオブシーに適さない臓器においては、菅野ら^{6,7)}の報告にもあるように血清中の遊離型のハイドロキシプロリンがコラーゲン代謝異常の病態を反映することより、このLC/MS法を用いて血清中ハイドロキシプロリン量を測定することにより十分適応できるものと考ええる。

一方、データにばらつきがみられたのは、線維化モデルを作成にあたり、実験に供するラットの週齢により線維化誘発物質に対する感受性が異なることおよび個体差が大きく影響しているものと考えられる。

引用文献

- 1) M. Ono, M. Miyamura, S. Kyotani, T. Saibara, S. Ohnishi, Y. Nishioka, Effects of Sho-saiko-to Extract on Liver Fibrosis in Relation to the Change in Hydroxyproline and Retinoid Levels of the Liver in Rats, *Journal of Pharmacy and pharmacology*, **51**, 1079-1084(1999).
- 2) M. Ono, M. Miyamura, S. Kyotani, T. Saibara, S. Ohnishi, Y. Nishioka, Effect of Sho-saiko-to Extract on HGF and TGF- β Levels of Intraorgans in Liver-injured Rats after Partial Hepatectomy, *Journal of Pharmacy and pharmacology*, **52**, 111-118(2000).
- 3) I. Shimizu, Y. Ma, Y. Mizobuchi, F. Liu, T. Miura, Y. Nakai, M. Yasuda, M. Shiba, T. Horie, S. Amagaya, N. Kawada, H. Hori, S. Ito, Effects of Sho-saiko-to, a Japanese herbal medicine, on hepatic fibrosis in rats, *Hepatology*, **29**, 149-160(1999).
- 4) H. Inoue, Y. Date, K. Kohashi, H. Yoshitomi, Y. Tsuruta, Determination of Total Hydroxyproline and Proline in Human Serum and Urine by HPLC with Fluorescence Detection, *Biol. Pharm. Bull.*, **19**, 163-166(1996).
- 5) J.S. Campa, R.J. McAnulty, G.J. Laurent, Application of High-pressure Liquid Chromatography to Studies of Collagen Production by Isolated Cells in Culture, *Anal. Biochem.*, **186**, 257-263(1990).
- 6) 菅野正彦, 山里藤男, 茂手木皓喜, 血清および尿中遊離型ハイドロキシプロリンの新測定法, 機器・試薬, **14**, 1-6(1991).
- 7) 茂手木皓喜, 狩野元成, 菅野正彦, 山里藤男, 飯田暢子, 並木脩, 血清遊離ハイドロキシプロリンの臨床的意義, 機器・試薬, **14**, 7-11(1991).