9-anthryldiazomethane-high performance
liquid chromatography による気管支喘息
患者末梢血中 prostaglandin 分析の試み

五十嵐 康・阿部 修三*・黒沢 元博

Jpn. J. Clin. Immun., 11(1): 1~8, 1988.

**An assay for plasma prostaglandins from bronchial asthmatic
patients using 9-anthryldiazomethane-HPLC method**

Yasushi Igarashi, Syuzo Abe* and Motohiro Kurosawa

First Department of Internal Medicine, Gunma University School of Medicine and

** Union Laboratory, Union Corporation*

【Summary】

Prostaglandins (PGs) are generated by the lung with physiologic stimuli. There are many evidences that PGs are involved in immediate hypersensitivity reactions and their pathophysiologic roles in bronchial asthma have been suggested. Even then, the significance of their roles has not yet been established at the *in vivo* level in clinical studies.

We describe here an efficient method for simultaneous and quantitative determinations of plasma PGs from bronchial asthmatic patients using reversed-phase HPLC.

An overnight reaction of plasma PGs with 9-anthryldiazomethane (ADAM) was performed at room temperature. The mixture was loaded on GPC column to avoid interferences for the assay and PG-ADAM fraction was collected. The fraction was loaded on ODS column and was eluted with water-methanol gradient at 40°C. Fluorescence of PG-ADAM was measured in fluorometer with excitation at 350 nm and emission at 412 nm. Detection and simultaneous quantitation of 20 pg PGE₁, PGE₂ and 100 pg 6-keto PGF₁α, thromboxane B₂ was possible.

Key words : 9-anthryldiazomethane,
high performance liquid chromatography,
prostaglandin,
bronchial asthma

【概 要】

Prostaglandin (PG) は生理的刺激により肺で産生される。PG は即時型過敏性反応に関与し、それゆえ、気管支喘息の病態生理に関与することが示唆されている。しかし、臨床研究において、生体におけるその役割ははまだ明確になされていない。今回筆者らは逆相高速液体クロマトグラフィーを用い、気管支喘息患者血漿中 PG を多成分同時に分析する有効な方法を開発したので報告する。血漿を 9-anthryldiazomethane (ADAM) と一晚反応させた。gel permeation chromatography (GPC) カラムを用いて測定時における妨害物質を除去し、PG-ADAM 分画を得た。ついで、octadecylsilyl (ODS) カラムを用い、水-メタノール混合比にグラジエントをつけて、40°C で溶出した。励起波長 350 nm, 蛍光波長 412 nm で、蛍光光度計を用いて蛍光を測定した。検出限界は PGE_1 , PGE_2 で約 20 pg, 6-keto $\text{PGF}_{1\alpha}$, TXB_2 で約 100 pg であった。

I. はじめに

肺は prostaglandin (PG) の生合成がきわめて高い臓器の1つで、気管支喘息の病態においても、従来より PG の関与が指摘されているが、詳細はまだまだ不明である¹⁾。気管支喘息患者末梢血中 PGF , PGE を測定した報告も散見されるが、一定した見解は得られていない^{2,3)}。これは PG の血中濃度測定が困難であることが、その大きな原因の1つとしてあげられる。

PG の分析法としては bioassay 法, gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) 法, radioimmunoassay (RIA) 法, および high performance liquid chromatography (HPLC) 法などがあげられる。bioassay 法では正確な定量が困難で、また特異性が低く、測定感度の低さも問題となる。GC-MS 法は体液中の PG 濃度測定に有用であるが、高価な装置と煩雑な前処理を必要とする。RIA 法は現在もっとも一般的に用いられている方法であるが、放射性物質を用いること、一度に1種類の PG しか測定できないこと、特殊な設備を必要とするなどの問題点があげられる。

HPLC は近年脂質研究の分野にも導入され、高圧ポンプの安定化をはじめとする技術的改良に加え、価格面でも購入が比較的容易になりつつある。PG の研究分野においてもカラム担体の開発が盛んで、シリカゲルを担体とする順相系のもの、octadecylsilyl (ODS) 基を結合させた逆相系のもの、シリカに銀を結晶させた argentation 担体などがある。HPLC 法により PG の定量を試みる場合、前処理として抽出操作が必要で、有機溶媒による抽出、順相シリカゲルカラムを用いた方法などが行われている。分離後の PG 定量法としては RIA 法⁴⁾、UV 法⁵⁾、蛍光測定法⁶⁾ などがある。UV 法は測定感度が低く、一般的には RIA 法が用いられている。蛍光測定法は従来より感度面で RIA 法に劣るとされてきたが、一度に

複数の PG を同時に測定できることが利点である。PG はその構造式より、それ自体有効な蛍光を発する基を有しないため、蛍光測定法では蛍光指示薬を PG の α 鎖カルボキシル基に導入し、蛍光を測定する。したがって、蛍光試薬、蛍光測定条件などが PG の測定感度に大きく関与するわけで、従来行われている HPLC-蛍光測定法による測定感度は ng $\sim$ μ g オーダーである。最近八巻ら⁷⁾は 9-anthryldiazomethane (ADAM) を用いた PG の定量法を報告したが、その検出感度は約 0.5 ng であった。

筆者らは ADAM-HPLC 法を用い、気管支喘息患者末梢血中 PG を 20 $\sim$ 100 pg まで検出可能とした方法を開発したので報告する。

II. 材料および方法

1. 試 薬

HPLC 用メタノール、エタノール、クロロホルム、酢酸エチル (関東化学)、リン酸水素二ナトリウム、リン酸二水素カリウム (和光純薬工業)、ADAM (フナコシ薬品)、各種 PG および thromboxane (TX) B_2 の標準物質は小野薬品より提供をうけた。

2. 血漿前処理法

1 mg/ml ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA)-2Na 加末梢血を 4°C で 10 分間、1,000 G で遠心し、血漿 2 ml を分離した。リン酸緩衝液 (0.01 M リン酸二ナトリウム, 0.01 M リン酸二水素カリウム, pH 7.4) 2 ml を加え、セントリフロー CF 25 (アミコン社製) を用い、4°C で 20 分間、1,000 G で遠心した。得られた濾過液にクロロホルム 3 ml を加え、激しく振とうした。室温で 10 分間静置した後クロロホルム層を採取し、窒素ガスで蒸発乾固させた。酢酸エチルに溶解した 0.2 mg/ml ADAM 溶液 100 μ l を加え、HPLC に供した。

3. 妨害物質除去操作法

試料を ADAM 溶液と反応させた後, gel permeation chromatography (GPC) カラムである日立 GL-A 110 カラムを用い, PG-ADAM 測定時における試料中の妨害物質を除去した. すなわち, 移動相にはクロロホルムを用い, 流速 1.0 ml/分, 室温で波長 250 nm の UV 法

により PG-ADAM 分画を溶出, 回収した. 窒素ガスで試料量を 150~200 μ l とした後, 再度 GPC カラムを用いて妨害物質を除去した. PG-ADAM 分画を窒素ガスで蒸発乾固させた後, 50% エタノール 150 μ l を加え, 分析系に供した.

4. 分析系

3 μ m ODS である日立ゲル #3057 を 4×150 mm のカラムに 550 kg/cm² の圧力で充填し, 40°C に加温して用いた. 溶離液には 75% メタノールを用い, 流速 0.7 ml/分で行った. PG-ADAM の検出には日立 F 1000 蛍光光度計を用いた. PG の同定はその標準物質と保持時間が一致した際に, 標準物質の PG と同一物質であると判定し, 標準物質のピーク高より試料中の PG 量を定量した.

図 1 PGE₂ (250 pg) と ADAM との経時的反応

図 2 PGE₂-ADAM 蛍光スペクトル

図 4 グラジエント曲線

図 3 各励起波長における 70% methanol-水混合液のラマンスペクトル

図 5 グラジエントと単一溶離の比較

III. 結果と考察

1. ADAM 誘導體化

PGE₂ 250 pg を 0.2 mg/ml ADAM 溶液と室温で 1, 2, 3, 4, 5 時間反応させ、それぞれの反応時間におけるピーク高を求めた。その結果、PGE₂ と ADAM 溶液との反応は図 1 に示すごとく、約 5 時間で平衡状態に達した。

2. 螢光測定条件

PG-ADAM は従来より励起波長 365 nm, 蛍光波長 412 nm で測定されてきた⁷⁾. 蛍光波長を 412 nm に固定し, 励起波長を 300~400 nm に変動させ, 蛍光を測定すると, 図 2 に示すごとく, 励起波長 350 nm, 365 nm, 388 nm にそれぞれピークが認められた. 各励起波長を用いて 70% メタノール-水混合液のラマンスペクトルを検討すると, 励起波長 388 nm を用いるとラマン光トップが蛍光波長の 412 nm 付近に現れ, また 365 nm を用いても 412 nm 付近にラマン光の一部が重なり, 蛍光測

図 6 ADAM ベースライン

図 7 prostaglandin 標準物質分析パターン

図 8 prostaglandin 検量線

図9 気管支喘息患者末梢血中 prostaglandin 分析に対する prostaglandin 標準物質の添加効果

A: 標準物質, B: 気管支喘息患者末梢血
C: 標準物質+気管支喘息患者末梢血

定時のノイズとなることが分った。一方, 350 nm を用いるとラマン光は 412 nm より外れ, 結果として蛍光測定時の感度を高めることが可能となった (図3)。

3. 溶離条件

PG-ADAM を蛍光光度計で分析する際, ADAM 試薬に起因する妨害が問題となった。そこで, 溶離液のメタ

ノールと水との混合比に図4に示すごとく 80→68→75%とゆるやかなグラジエントをつけ (グラジエント曲線で60分以降はカラム洗浄の目的である), 75% メタノール単一溶離の際と比較検討した。その結果, 図5に示すごとく, グラジエントを用いると, 単一溶離液を用いた際に比して ADAM 試薬中の妨害がより早く溶出された。

以上の結果より, 試料あるいは PG 標準物質に ADAM 溶液を加え, 遮光下に室温で一晩放置した後, GPC カラムにかけ, ついでグラジエントをつけて ODS カラムより溶出し, 励起波長 350 nm, 蛍光波長 412 nm で PG-ADAM を測定した。

4. PG 標準物質分析パターン

ADAM 試薬のみを用いて対照実験を行うと, 図6に示すごとく, PG 溶出がみられる25分ごろより後にはほとんど妨害はみられなかった。PG 標準物質として PGE₁, PGE₂, 6-keto PGF_{1α}, TXB₂ それぞれ 2 ng を用いた分析パターンを図7に示すが, PG の種類により異なったピーク高を示した。PG 濃度とピーク高は図8に示すごとく比例関係を示し, 検出限界は PGE₁, PGE₂ で約 20 pg, 6-keto PGF_{1α}, TXB₂ で約 100 pg であった。また, 全操作での回収率は 87% であった。

5. 気管支喘息患者末梢血中 PG の分析

まず, 本分析法による PG の同定が正確であることを確認する意味で, 気管支喘息患者末梢血中 PG 分析に対する PG 標準物質添加の影響を検討した。図9はその実験例を示す。気管支喘息患者末梢血より血漿を分離した後, 試料を二等分し, 半量を末梢血 PG 分析に供し, 残り半量は PG および TXB₂ 標準物質 600 pg 存在下に分析を行った。その結果, 気管支喘息患者末梢血中 PG および TXB₂ 量は TXB₂ 575 pg/ml, PGE₂ 13 pg/ml, 6-keto PGF_{1α} 125 pg/ml であったが, 標準物質共存下に分析を行うと, 末梢血の PG および TXB₂ に一致してピーク高が増加した。したがって, 筆者らが開発した HPLC 法では保持時間による末梢血中 PG の同定が正確であることが確認された。

図10は気管支喘息患者末梢血中 PG の分析例を示す。それぞれの患者における定量結果は以下のごとくである。TXB₂ 205 pg/ml, PGE₂ 32 pg/ml, PGE₁ 38 pg/ml (A.K. 男); TXB₂ 712 pg/ml, PGE₁ 206 pg/ml (M.I. 男); TXB₂ 117 pg/ml, PGE₂ 38 pg/ml, 6-keto PGF_{1α} 1,500 pg/ml, PGE₁ 22 pg/ml (I.K. 男); TXB₂ 1,125 pg/ml, PGE₂ 269 pg/ml (T.H. 男)。

図 10 気管支喘息患者末梢血中 prostaglandin 分析例

本研究では今回の分析結果が喘息患者特有なものか否かを明確にすることはできなかったが、筆者らが開発した方法により、気管支喘息患者末梢血中PGの複数同時分析が可能となったことは意義あることと思われる。気管支喘息患者における末梢血中PG量の変動の意義付け、非喘息患者との比較などについて現在広く検討中である。

IV. おわりに

ADAM-HPLC 法による PG の分析法に改良を加え、

それにより気管支喘息患者末梢血中 PG の複数同時分析を可能にした。

稿を終えるにあたり、御校閲を賜った群馬大学医学部第1内科学教室小林節雄教授に深謝致します。また、本研究遂行にあたり、御助言を賜った東京大学衛生学教室遠山和彦氏に感謝致します。

文 献

- 1) 黒沢元博・小林節雄：プロスタグランディンと喘息。総合臨床, 34: 2461~2464, 1985.
- 2) Nemoto, T., Aoki, H., Ike, A., Yamada, K., Kondo, T., Kobayashi, S., Inagawa, T.: Serum prostaglandin levels in asthmatic patients. J. Allergy Clin. Immunol., 57: 89~94, 1976.
- 3) Okazaki, T., Vervloet, D., Attallah, A., Lee, J.B., Arbesman, C.E.: Prostaglandins and asthma: the use of blood components for metabolic studies. J. Allergy Clin. Immunol., 57: 124~133, 1976.
- 4) Alam, I., Ohuchi, K., Levine, L.: Determination of cyclooxygenase products and prostaglandin metabolites using high pressure liquid

- chromatography and radioimmunoassay. *Anal. Biochem.*, 93 : 339~345, 1979.
- 5) Terragno, A., Rydzik, R., Terragno, N.A. : High performance liquid chromatography and UV detection of the separation and quantitation of prostaglandins. *Prostaglandins*, 21 : 101~112, 1981.
- 6) Turk, J., Weiss, S.J., Davis, J.E., Needleman, P. : Fluorescent derivatives of prostaglandins and thromboxanes for liquid chromatography. *Prostaglandins*, 16 : 291~309, 1978.
- 7) 八巻幸二・大石幸子 : 9-anthryldiazomethane 法によるアラキドン酸代謝物の定量. *炎症*, 7 : 87~88, 1987.
-