ラジオイムノアッセイ法による生体試料中の LTC₄ の測定

腰原康子・磯野豊和*

Measurement of immunoreactive leukotriene C₄ in biological fluids by radioimmunoassay The measurement of leukotriene (LT) C₄ in biological fluid by radioimmunoassay was studied. We have developed a rapid and simple extraction method of LTC₄ from human plasma and synovial fluid for radioimmunoassay. In this extraction method, LTC₄ was recovered in a final methanol fraction by 91% and 76% from plasma and synovial fluid, respectively. The propriety was confirmed by the recovery test and by the dilution method.

Yasuko Koshihara・Toyokazu Isono*

* Tokyo Metropolitan Institute of Gerontology

key words: leukotriene, LTC₄, plasma, synovial fluid

血液細胞で合成されるロイコトリエン (LT) 類においてはアレルギー炎症、即時型アレルギーやアトピー型喘息と深いかわかりを示唆する生物活性が明らかになってきた。しかし生体内での LT の真の役割はまだ不明である。その一つの理由が、病態に伴う生体内の LT 量の測定がほとんどなされていないことである。幸いにも昨年春より LTC₄ ラジオイムノアッセイ (RIA) キットが NEN 社より市販され、微量定量が可能になった。購入された方はお気づきかもしれないが、このキット内の説明書には血液など生体試料中の LT の抽出法が記載されていない。

われわれは、血漿や関節液を使って LTC₄ (およびベプチド LT) の抽出の基礎検討を行った。比較的簡単で、回収率がよく、しかも RIA 測定試料として可能であることを念頭に検討を行い、一応これらの目的を達成する方法を確立した。少しでもお役にたてたら幸甚である。

準備

(1) 器具

- a) Sep-Pak C₁₈ (Waters Associate)
- b) HPLC 装置
- c) 逆相カラム (C₁₈ μBondapak, 6×300mm)
- d) ボルテックスミキサー
- e) 共栓付きナシ型フラスコ (20 ml 用)
- f) ロータリーエバポレーター
- g) ポリスチレン試験管 (17×120mm, 栄研スピッツ, 栄研器材㈱)
- h) プラスチック注射筒 (テルモ社, 20ml)

(2) 試薬

- a) エタノール (特級)
- b) 石油エーテル (特級)
- c) 1N HCl (特級)
- d) メタノール (HPLC 用)
- e) 酢酸 (精密分析用)
- f) 蒸留水 (HPLC 用)
- g) 窒素ガス
- h) LTC₄ RIA キット (NEN 社, Cat No. NEK 030 (125 アッセイ用), Cat No. NEK 030 A (250 アッセイ用))
- i) ³H-LTC₄ (NEN 社, Cat No. NET 714)

生体試料の採取と保存

(1) 血漿の場合

採血量の1/10量の3.8%クエン酸ナトリウムの入った注射筒で採血し、0°Cで1,500 rpm 20分の遠心後、直ちに血漿を分離する。次いで、冷やしたエタノールを血漿の4倍量加え、よく混和して-70°C以下で保存する。

(2) 関節液の場合

採取した関節液を直ちに、0°Cで2,500 rpm 10分の遠心により細胞およびその残骸を除去し、上清の4倍量の冷やしたエタノールを加え、よく混和して-70°C以下で保存する。

LTC₄ の簡便な抽出法

LTC₄ の抽出は、Lewis¹⁾ および Powell²⁾ の方法を一部参考にして行った。

① 4倍量のエタノールを混和した試料を10,000 rpmで10分間遠心して除蛋白を行う。(注1)

② 上清を40°C以下で減圧濃縮する。

③ エタノール分を除去した水層に約10mlの蒸留水を

* 東京都老人総合研究所薬理学部

表 1 LTC₄ の回収率

分 画	回 収 率 (%)		
	pH 4.0	pH 5.1	pH 5.6
試 料	100	100	100
80%エタノール	94.3±3.8 (100)	98.4±3.46(100)	100.2±3.77(100)
Sep-Pak C ₁₈ 未吸着	10.3±3.5 (10.9)	3.9±0.68(4.0)	2.7±0.61(2.7)
蒸留水溶出	1.7±0.78(1.8)	1.2±0.17(1.2)	1.3±0.32(1.3)
石油エーテル溶出	0.6±0.26(0.6)	0.3±0.15(0.3)	0.2±0.12(0.2)
メタノール溶出	83.6±2.07(88.7)	93.7±2.63(95.2)	84.8±7.62(84.8)

Sep-Pak C₁₈ で分画する直前の試料の pH を 4.0, 5.1, 5.6 に合わせて分画した。

() 内の数字は80%エタノール分画を 100 にした場合の回収率。

加え、1N 塩酸にて pH 5.1 に調整する。最初の試料が少ない場合 (1 ml 以下) は加える蒸留水を 5 ml にしてもよい。(注 2)

④ Sep-Pak C₁₈ カラムを、20 ml のプラスチック注射筒につけ使用直前にエタノール 20 ml で洗浄後、20 ml の蒸留水で置換し③の水層をのせベスルでゆっくり押し出す。

⑤ 試料の入っていたナン型フラスコに 20 ml の蒸留水を加え、この洗浄液を Sep-Pak カラムに通すことにより、脱塩および水溶性物質の除去を行う。

⑥ 次に中性脂質などを除くために、カラムを石油エーテルで洗う。石油エーテルは注射筒のベスルのゴムを膨張させるので、速やかに行う。

⑦ 20 ml のメタノールによって LTC₄ を溶出する。

⑧ メタノール溶出画分をナン型フラスコに集め、乾固しないように減圧濃縮後窒素ガス下で残ったメタノールを蒸発させる。(注 3)

⑨ 20 μ l のメタノールを加えナン型フラスコの底面を洗った後、180 μ l の RIA 用緩衝液を加え RIA 用試料とする。

注) 1. ①の操作の際回収率をよくするために、生体試料と同量の80%エタノールで沈殿を遠心にて洗うとよい。80%エタノール溶液中は、LTC₄ が比較的安定で長期保存可能である。

2. LTC₄ は酸に不安定であるので、Sep-Pak C₁₈ で分離、抽出するために pH 5.1 に調整したら、速やかに Sep-Pak C₁₈ にのせ抽出を行う。

3. 濃縮の際、乾固は避ける。もし乾固してしまうと 20~30% ぐらいしか溶出されない。しかし湿った状態で 1/10 量のメタノールを加えて緩衝液で溶出すると、約 70~80% 溶出される。

LTC₄ の回収率

(1) 血漿の場合

血漿 1 ml に ³H-LTC₄ を加え、上記の方法で抽出した後、各分画の一部分の放射活性を測定し回収率を計算し

た(表 1)。Sep-Pak C₁₈ で分画する試料は、pH 5.1 がよい。pH 4.0 では未吸着分が多くなってくる。pH 5.6 の場合もかなりよい回収率が認められているが、pH 5.1 には及ばない。しかし大差はない。

(2) 関節液の場合

関節液 1 ml に ³H-LTC₄ を加え、上記の方法で抽出した(表 2)。

関節液は蛋白質やムコ多糖含量が多いためか、回収率が低い。結果は血漿の場合と同じような傾向を示し、Sep-Pak C₁₈ カートリッジにのせる試料は pH 5.1 に調整した場合は比較的よい回収率を示した。なお、メタノール溶出後ギ酸メチルを流しても、ほとんど何も溶出されなかった。

抽出過程における LTC₄ の分解

関節液 1 ml に ³H-LTC₄ を加え上記の方法で抽出した後、逆相 HPLC により分離した。図 1a は、RIA キットにある ³H-LTC₄ の純度を示してあるが、ほとんど分解は認められない。この ³H-LTC₄ は図 1b に示されるように、関節液と混和し上記の方法で抽出しても分解されない。しかし、37°C で ³H-LTC₄ を関節液とインキュベーションすると、明らかに LTD₄ および LTE₄ に分解されてくるので、抽出の過程はできるだけ低温を保つようにする。なお、血漿中にも代謝分解酵素が含まれている³⁾。

LTC₄ の RIA

³H-LTC₄ RIA キットに入っている説明書のとおりに行えばよい。すべて 0~4°C で行い、手順の概略は次のとおりである。

① キットに入っている緩衝液を使って LTC₄ 原液 (1.6 μ g/ml) を希釈して標準液をつくる。これは用事調整する。トレーサーである ³H-LTC₄ は緩衝液で 100 倍希釈する。

② 試料または標準液 100 μ l を試験管に入れ、³H-LTC₄ (約 5,000 cpm) を加え攪拌し、抗血清 100 μ l を加えて

表 2 LTC₄ の回収率

分 画	回 収 率 (%)		
	pH 4.0	pH 5.1	PH 5.6
試 料	100	100	100
80% エタノール	81.6 (100)	74.1 (100)	82.3 (100)
Sep-Pak C ₁₈ 未吸着	10.2 (12.5)	2.6 (3.5)	3.0 (3.6)
蒸留水溶出	1.0 (1.2)	0 (0)	1.7 (2.1)
石油エーテル溶出	0.6 (0.7)	0 (0)	0.1 (0.1)
メタノール溶出	64.5 (79.0)	76.2(102.8)	66.6 (80.9)

Sep-Pak C₁₈ で分画する直前の試料の pH を 4.0, 5.1, 5.6 に合わせて分画した.

() 内の数字は 80% エタノール分画を 100 にした場合の回収率を示す.

図 1a ³H-LTC₄ の純度

³H-LTC₄ RIA キット中の ³H-LTC₄ の純度を HPLC によって検討した. HPLC は μ Bondapak C₁₈ カラムで, mobil phase (メタノール:水:酢酸 = 65:35:0.1, pH 5.6), 流速 1 ml/min で行った.

図 1b 生体試料から抽出過程での LTC₄ の安定性

関節液 1 ml に ³H-LTC₄ を混和し, 本文中の方法によって抽出を行い図 1a のように HPLC によってその安定性を調べた. 保存時間の早期に出てくるピークは放射活性をもたない標準品の紫外吸収でもみられた.

図 2a 血漿抽出物質に加えられた LTC₄ の RIA による定量

「LTC₄ の簡便な抽出法」(本文中)にて 1 ml の血漿から調製した 2 つの試料にそれぞれ既知量の LTC₄ を加え RIA 法にて測定し, その回収率を検討した. 血漿の値 0.045 と 0.056 ng をバックグラウンドとして引いてある.
...理論値

さらに攪拌し, 4°C で 16~24 時間インキュベートする. なお本抗血清のほかの LT への交叉反応性は LTC₄ を 100 とした場合, (5 R, 6 R)-LTC₄ 100, 11-trans-LTD₄ 60.5, LTE₄ 8.6, LTB₄ 0.006 である.

③ デキストラン被膜活性炭をよく攪拌しながら 500 μ l ずつ各試験管に入れ, よく攪拌した後 0~4°C で 15 分間インキュベートする.

④ 2,500 rpm で 15 分間遠心して 活性炭に付着した遊離の ³H-LTC₄ を除き, 上清 0.6 ml を液体シンチレーションカウンターで測定する. 上清は全量測定するより一部のほうが, 再現性が高い.

⑤ 図 3 に標準曲線の一例を示す. 0.05~1.6 ng の範囲で測定するとよい.

血漿抽出 LTC₄ の RIA による測定の妥当性

上記の方法で血漿から LTC₄ 分画を抽出した試料に既

図 2b 血漿抽出精製物質の希釈による LTC_4 の RIA 測定への影響

「 LTC_4 の簡便な抽出精製法」(本文中)にて 2 ml の血漿から調整した試料に 0.8 ng の LTC_4 を加え、希釈して RIA 法で測定しその直線性を検討した。

知量の LTC_4 を加え、RIA にて測定を行った。正常 28 歳男子の血漿 1 ml の LTC_4 の値は 0.045~0.056 ng であり、測定限界である。この値が LTC_4 の真の値か、単純にバックグラウンドであるのか、確かでない。

既知量の LTC_4 を血漿抽出試料に加えて RIA で測定したところ、図 2a に示すように理論値の 83~89% の値が示され、血漿抽出物中に反応を阻害するような影響はほとんど認められなかった。

さらに試料に一定量の LTC_4 を加え、希釈して定量した値に直線性が得られるかを検討したところ、図 2b にみられるように 2 つの試料で直線性がみられた。なお、上記の方法で抽出後 HPLC で分離した LTC_4 の値は、分離前とほぼ同じ値が得られた。

おわりに

関節液は、血漿よりも回収率がよくないが、本文中にも述べたように 80% エタノールで抽出の際、蛋白やムコ多糖が多いために沈殿に逃げやすい。これは沈殿を何回か洗うことによって改良できると思われる。しかし大量になると濃縮に時間がかかるので、ある程度のところで妥協をせざるをえない。

われわれが確立した LTC_4 の抽出は、簡便で回収率もよく、RIA 法での測定に一応の妥当性がみられ、グルー

図 3 LTC_4 の RIA 測定における標準曲線

ブ間での比較を行う場合にはこの方法で問題がないと思われる。しかし本抗血清は、ほかのペプチド LT とかなり交叉するので LTC_4 だけを測定する場合は HPLC で分画して行う必要がある。また生体試料中の絶対量を厳しく測定するうえでは、さらに多くの過程を経なくてはならない。われわれの不十分な経験から記した内容であるので、さらに発展改良していただけたら幸甚である。

文 献

- 1) Leitch, A.G., Lee, T.H., Ringel, E.W., Prickett, J.D., Robinson, D.R., Pyne, S.G., Corey, E.J., Drazen, J.M., Austen, K.F., Lewis, R.A.: Immunologically induced generation of tetraene and pentaene leukotrienes in the peritoneal cavities of menhaden-fed rats. *J. Immunol.* 132: 2559-2565, 1984.
- 2) Salari, S.H., DeVoe, I.W., Powell, W.S.: Inhibition of leukotriene B_4 synthesis in human polymorphonuclear leukocytes after exposure to meningococcal lipopolysaccharide. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 104: 1517-1524, 1982.
- 3) Parker, C.W., Koch, D., Huber, M.M., Falkenstein, S.F.: Formation of the cysteinyl form of slow reacting substance (Leukotriene E_4) in human plasma. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 97: 1038-1046, 1980.