

氏 名（本籍）	八 巻 幸 二
学位の種類	博 士（薬 学）
学位記番号	薬 第 327 号
学位授与年月日	平成 4 年 6 月 24 日
学位授与の要件	学位規則第 5 条第 2 項該当

学位論文題目 高速液体クロマトグラフィーによる蛍光誘導体化
アラキドン酸代謝物測定法の確立と生体試料中の
アラキドン酸代謝物測定への応用

(主 査)
論文審査委員 教授 大内 和 雄 教授 佐 藤 進
教授 鈴木 康 男

論 文 内 容 要 旨

プロスタグランジン (PG), トロンボキサン (TX), およびロイコトリエン (LT) などのアラキドン酸代謝物は, 炎症反応あるいは免疫反応など重要な生体反応において, 種々の役割を担っていることが知られている。生体内におけるこれらのアラキドン酸代謝物の役割を解明することは極めて重要であるが, 生体内には微量にしか存在しないため, これらのアラキドン酸代謝物を高感度にしかも容易に測定できる方法を開発することが必要である。アラキドン酸代謝物の測定は, 主にラジオイムノアッセイ (RIA) 法によって行われているが, 放射性物質を使うための実験施設が必要であること, 測定に要する経費が高価であること, さらに, 特異的抗体がない限り測定できないことなどの問題があるため必ずしも満足できる方法とはいえない。最近, RIA 法に替わるエンザイムイムノアッセイ (EIA) 法による測定キットが市販されるようになったため, 放射性実験施設がなくても測定できるようになったが, 現状では特定のアラキドン酸代謝物の測定キットしか開発されていない。また RIA 法にしろ EIA 法にしろこれらの方法では, 1 回の測定において 1 種類のアラキドン酸代謝物しか測定できず, 数種類のアラキドン酸代謝物を同時に測定することは不可能である。

そこで, 本研究ではアラキドン酸代謝物がカルボキシル基を持っていることに着目し, カルボン酸の蛍光誘導体化剤である 9-anthryldiazomethane (ADAM) を用いてアラキドン酸代謝物を蛍光誘導体化し, 高速液体クロマトグラフィー (HPLC) により分画し, その蛍光を測定することにより数種類のアラキドン酸代謝物を同時に定量する方法 (ADAM-HPLC 法) を確立した。さらにその方法を用いて生体試料すなわちラット胸腔細胞, ウサギ血小板, ラット腹腔浸潤細胞, 単核球, および腹腔マクロファージが産生するアラキドン酸代謝物の測定, さらにウサギおよびラットの腎臓ホモジネートの遠心上清中のアラキドン酸代謝物の測定を行った。

第 1 章では標準品のアラキドン酸代謝物が ADAM 試薬により定量的に蛍光標識できるかどうか検討を行い, さらに, 多くの夾雑物が含まれている生体試料からアラキドン酸代謝物を抽出する方法や, 抽出物を ADAM 誘導体化したのち HPLC に負荷するための前処理法などについて詳細な検討を行った。次いで, ラット胸腔細胞を刺激した場合に産生されるシクロオキシゲナーゼ産物の測定を行い, ADAM-HPLC 法により得られた測定結果と RIA 法やバイオアッセイ法によって得られた測定結果との対比を行った。以上検討した結果, ADAM 誘導体化反応は室温で約 3 時間で定量的に終了すること, また反応生成物を SEP-PAK silica cartridge を用いて処理することにより夾雑物を除去することができることが明らかになった。この方法を用いることにより, 胸腔細胞を phorbol myristate acetate で刺激すると 6-keto-PGF_{1 α} , TXB₂ および PGD₂ が産生されることが確認された。また, これらの測定結果は RIA 法や血小板凝集によるバイオアッセ

イ法により得られた測定結果とよく一致することから、ADAM-HPLC法により得られる測定結果は十分に信頼できるものであることが示された。

第2章ではこの測定方法をウサギの多血小板血漿中のシクロオキシゲナーゼ産物の測定に応用した。ウサギ血小板浮遊液中にアラキドン酸を添加すると、血小板凝集反応が起こると同時に多量のTXB₂が放出される。そこでADAM-HPLC法を用いることにより、ウサギ血小板が産生するアラキドン酸代謝物を定量できるかどうか検討した。その結果、アラキドン酸刺激によりTXA₂の安定代謝物であるTXB₂が多量に産生されること、および少量のPGE₂が産生されることが確認された。またTX合成酵素阻害薬OKY-046を血小板浮遊液中に添加しておくこと、アラキドン酸刺激による凝集反応は大部分抑制され、TXB₂の産生も抑制されたがPGE₂、PGD₂およびPGF_{2α}の産生亢進が起こることが確認された。さらにシクロオキシゲナーゼ阻害薬であるインドメタシンを添加しておくこと、凝集反応は抑制され同時にアラキドン酸のシクロオキシゲナーゼ代謝物の産生も抑制されることが示された。またTXB₂とPGE₂についてRIA法により測定して得られた値と本法により測定して得られた値とを比較検討した結果、両者の間に良好な相関性があることが明らかになり、多血小板血漿中のシクロオキシゲナーゼ産物についてもADAM-HPLC法で測定することにより十分に信頼される結果が得られることが示された。

PGE₂およびPGF_{2α}代謝物である15-keto-体および13,14-dihydro-15-keto-体については、これらの測定方法の開発が遅れている。そこで第3章においては、これらの代謝物の測定にADAM-HPLC法が適用できるかどうか検討を加えた。PGE₂とPGF_{2α}およびそれらの代謝物の標準品をADAM誘導体化したのちHPLCにより分離したところ、それらの分離は良好に行われ、また定量性についても正確な結果が得られた。そこでPG代謝活性の強い臓器である腎臓に着目し、そのホモジネートの遠心上清を酵素液としてPGE₂およびPGF_{2α}を基質として添加して37℃でインキュベートしたのち、各種のPG代謝物が測定できるかどうか検討した。また、腎臓の部位によりPG代謝活性に違いがあるかどうかについて、ラットおよびウサギの腎臓を用いて解析した。その結果、RIA法による測定方法が確立されていないPG代謝物についてもこの方法で測定することが可能であることが明らかになり、また、この方法を活性することにより、ラットの腎臓では皮質および髄質にPG代謝活性が存在するのに対し、ウサギの腎臓では皮質に強い代謝活性が存在し髄質中の活性は極めて弱いことが明らかになった。

第4章では、アラキドン酸のリポキシゲナーゼ産物であるLTB₄の測定方法を確立し、ラットの腹腔浸潤細胞によるLTB₄産生について解析した。従来、LTB₄の測定にはHPLCで分画したのちに紫外吸収により測定する方法、あるいはRIA法が用いられているが、いずれの方法もLTB₄のみを測定する方法であって他のアラキドン酸代謝物を同時に測定することはできない。細胞レベルにおけるアラキドン酸代謝活性について解析するためには、シクロオキシゲナーゼ産

物とリポキシゲナーゼ産物とを同時に測定できる方法が開発されることが望まれていた。そこで、リポキシゲナーゼ産物の1つであるLTB₄をADAM誘導体化し、シクロオキシゲナーゼ産物のADAM誘導体と同時にHPLCで分離定量できる条件を検討した。種々検討した結果、HPLCで分離する際の溶出溶媒中のアセトニトリル濃度を高くすることにより、極性の低いLTB₄をPG類と共に一斉に分析することが可能になった。また、標準品のLTB₄を用い定量性について検討した結果、ngオーダーのLTB₄を定量することが可能であった。そこで、この方法によりラットの腹腔浸潤細胞が産生するアラキドン酸代謝物の測定を行った。その結果、腹腔浸潤細胞をCa-ionophore A23187 および血小板活性化因子 (platelet-activating factor, PAF) で刺激するとLTB₄が産生されることが明らかになった。しかもLTB₄の産生は急速に起こるが、その代謝も速く、ゆっくりと持続的に産生されるPG類とは産生様式が異なることが示された。また、PAF刺激によるLTB₄の産生は、ラットの白血球が主に産生する分子種であるC₁₆-PAFの方が、C₁₈-PAFより強いことが明らかになった。また、ADAM-HPLC法により得られた測定値とRIA法により得られた測定値とを比較した結果、両者の間で良好な相関関係が得られた。従って、LTB₄についてもADAM-HPLC法により正確に測定できること、ならびにシクロオキシゲナーゼ産物と同時に測定することができることが示された。

第5章においては、アラキドン酸とそのリポキシゲナーゼ産物である15-hydroxyeicosatetraenoic acid (15-HETE), 12-HETE, および5-HETEについてこの方法により測定できるかどうか検討し、さらにラットの多形核白血球と単核球および腹腔マクロファージが産生するこれらリポキシゲナーゼ産物の測定を行った。HETE類の測定はRIA法のほかにHPLCで分画したのち紫外吸収により測定する方法が行われているが、紫外吸収による方法は測定感度が低く実用性に乏しい。そこで、HETE類とアラキドン酸をADAM誘導体化したのちHPLCにより分離して蛍光を測定する方法を検討した。その結果、HETE類とアラキドン酸はstepwise溶出を行うことによりそれぞれを分離して測定することが可能になった。また、それらの定量性について検討した結果、ngオーダーで測定できることが明らかになった。なお、生体試料からPG類を抽出する時に一般的に使用されている抽出溶媒とSEP-PAK C₁₈ cartridgeとの組合せではHETE類とアラキドン酸を抽出することができないため、抽出溶媒を変えてSEP-PAK C₁₈ cartridgeによる全脂質の抽出を行った。またADAM誘導体化した後に、SEP-PAK silica cartridgeで精製を試みても夾雑物を完全に除去することはできなかったが、ADAM誘導体化したHETE類とアラキドン酸が含まれる画分を採取してHPLCの試料とした。この方法を適用することにより、ラットの腹腔をカゼイン刺激して採取した腹腔浸潤細胞は、A23187刺激により5-HETE, LTB₄および各種のシクロオキシゲナーゼ産物の産生亢進を起こすこと、および腹腔浸潤細胞を多形核白血球と単核球とに分画してA23187による刺激を行った結果、腹腔浸潤細胞

によるアラキドン酸代謝亢進には、腹腔浸潤細胞の90%を占める多形核白血球によるアラキドン酸代謝亢進の方が10%を占める単核球のアラキドン酸代謝亢進よりも大きく関与していることが明らかになった。さらに腹腔に浸潤した多形核白血球をA23187で刺激した場合、アラキドン酸の遊離はわずかにしか起こらないのに対し、可溶性でんぷんとbacto peptone刺激により採取した腹腔マクロファージの場合は、培養液中に多量の遊離アラキドン酸が蓄積してくることが明らかになった。両細胞間における遊離アラキドン酸量の違いは、アラキドン酸を細胞膜リン脂質へ取り込む活性に違いがある可能性が考えられたので、¹⁴C-アラキドン酸を用いて細胞への取り込み活性について検討を加えた。その結果、多形核白血球は¹⁴C-アラキドン酸添加後約10分で取り込みがプラトーに達するのに対し、マクロファージは多形核白血球に比べて持続的に取り込んだ。従って、多形核白血球とマクロファージのアラキドン酸遊離の違いは、アラキドン酸の取り込み速度が異なるためであることが示唆された。なお、アラキドン酸の定量はガスクロマトグラフィーで測定する方法が用いられていたが、本測定法を適用することによりアラキドン酸とHETE類を同一試料より同時に測定することが可能になった。

本研究では、カルボン酸の蛍光誘導体化剤であるADAMによりアラキドン酸代謝物を蛍光標識し、抽出用ミニカラムのSEP-PAK silica cartridgeを用いて夾雑物を除去し、HPLCにより分画してアラキドン酸代謝物の蛍光を測定することにより数種類のアラキドン酸代謝物を同時に定量する方法を開発した。この測定方法をいろいろな系に適用し、従来の測定法との比較を行った。そして主に炎症性細胞を用い、そのアラキドン酸代謝の相違について解析した。生体内では起炎性の刺激が加えられると防衛反応として炎症反応が誘発されるが、炎症誘発後の時期により炎症反応に関与する細胞は異なる。ここに開発した測定法を活用することにより、アラキドン酸のシクロオキシゲナーゼ産物は、常在性細胞、多形核白血球およびマクロファージなどから産生され、リポキシゲナーゼ産物は多形核白血球から産生されることが明らかになった。また生体内で産生されるPGE₂およびPGF_{2α}の腎臓における代謝活性についても明らかにした。

この方法により測定できるアラキドン酸代謝物は、PGD₂、PGE₂、PGF_{2α}、6-keto-PGF_{1α}、15-keto-PGE₂、13,14-dihydro-15-keto-PGE₂、15-keto-PGF_{2α}、13,14-dihydro-15-keto-PGF_{2α}、TXB₂、LTB₄、5-HETE、12-HETE、15-HETEおよびアラキドン酸である。ここに開発したADAM-HPLC法は測定試料中の多種類のアラキドン酸代謝物を同時に測定できる方法として優れた方法である。しかも、放射性物質を使わないですむため安価に測定できること、さらに抗体の開発されていない代謝物の測定にも応用できることなど、RIA法、EIA法およびGC-MS法などにはない優れた利点を備えているものである。

審査結果の要旨

プロスタグランジン (PG) を始めとするアラキドン酸代謝物は、炎症反応あるいは免疫反応などの重要な生体反応において種々の役割を担っていることが知られている。生体内におけるアラキドン酸代謝物の役割を解明することは極めて重要であるが、生体中には微量にしか存在しないため、これらのアラキドン酸代謝物を高感度にしかも容易に測定できる方法を開発することが必要である。アラキドン酸代謝物の測定は、主にラジオイムノアッセイ (RIA) 法によって行われているが、放射性物質を使うための実験施設が必要であること、測定に要する経費が高価であること、さらに、特異的抗体の必要性などの問題がある。一方、RIA 法に替わる測定法としてエンザイムイムノアッセイ (EIA) 法が確立されて測定キットが市販されるようになったため、放射性実験施設がなくても測定できるようになったが、現状では特定のアラキドン酸代謝物の測定キットしか開発されていない。また、RIA 法にしろ EIA 法にしろこれらの方法では数種類のアラキドン酸代謝物を同時に測定することは不可能である。

そこで、本研究はアラキドン酸代謝物がカルボキシル基を持っていることに着目し、カルボン酸の蛍光誘導体化剤である 9-anthryldiazomethane (ADAM) を用いてアラキドン酸代謝物を蛍光誘導体化し、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) により分画し、その蛍光を測定することにより数種類のアラキドン酸代謝物を同時に定量する方法 (ADAM-HPLC 法) を確立した。更にその方法を用いて生体試料中のアラキドン酸代謝物の測定を試みた。第 1 章では標準品のアラキドン酸代謝物が ADAM 試薬により定量的に蛍光標識できるかどうか検討を行い、夾雑物が含まれている生体試料からアラキドン酸代謝物を抽出する方法や、抽出物を ADAM 誘導体化したのち HPLC に負荷するための前処理法について詳細な検討を行った。また、ラット胸腔細胞を phorbol myristate acetate で刺激すると 6-keto-PGF_{1 α} , トロンボキサン (TX) B₂ および PGD₂ が産生されることが確認され、これらの測定結果は従来により得られた測定結果とよく一致することから、ADAM-HPLC 法により得られる測定結果は十分に信頼できるものであることを示した。第 2 章では ADAM-HPLC 法をウサギ血小板のシクロオキシゲナーゼ産物の測定に応用し、ウサギ血小板凝集反応とアラキドン酸代謝物との関係を TX 合成酵素阻害薬とシクロオキシゲナーゼ阻害薬を用いて検討した。その結果、血小板の代謝物についても ADAM-HPLC 法で測定できることを示した。第 3 章では PGE₂ および PGF_{2 α} の代謝物である 15-keto-体および 13,14-dihydro-15-keto-体についても ADAM-HPLC 法が適用できるかどうか検討を加え、腎臓の PG 代謝活性の測定に応用し、PG 代謝活性は動物の種や腎臓の部位で異なることを示した。第 4 章ではアラキドン酸のリポキシゲナーゼ産物である LTB₄ の測定方法を確立し、ラットの腹腔浸潤細胞による LTB₄ 産生について解析した。第 5 章ではアラキドン酸とそのリポキシゲナー

ゼ産物である 15-hydroxyeicosatetraenoic acid (15-HETE), 12-HETE, および 5-HETE について ADAM-HPLC 法により測定できるかどうか検討し, 更にラットの腹腔浸潤細胞および腹腔マクロファージが産生するこれらリポキシゲナーゼ産物の測定を行った。その結果, HETE 類とアラキドン酸は stepwise 溶出を行うことにより, それぞれを分離して測定することが可能になり, この方法をラット腹腔浸潤白血球と腹腔マクロファージが産生するアラキドン酸代謝物の測定に応用し, 両細胞間でアラキドン酸遊離が大きく異なることを明らかにした。

以上の様に本研究ではカルボン酸の蛍光誘導体化剤である ADAM によりアラキドン酸代謝物を蛍光標識し, 抽出用ミニカラムを用いて夾雑物を除去した後, HPLC により分画して蛍光を測定することにより数種類のアラキドン酸代謝物を同時に定量する方法を開発した。

本研究により開発された ADAM-HPLC 法は種々の試料中の複数のアラキドン酸代謝物を同時に測定することが可能であり, 炎症反応あるいは免疫反応における各種のアラキドン酸代謝物の関与について解明するために役立つ方法である。従って, 本論文は学位論文として十分に価値のある内容であると判定する。