

陽イオン交換高速液体クロマトグラフィー — OPA 蛍光法によるポリアミン定量 —

川崎医療短期大学 臨床検査科 川崎医科大学 薬理学教室*

永瀬 澄香 佐藤 彰一 *渡辺 悟 *斎藤 泰一

(平成3年8月26日)

Determination of Polyamines Using Cation-exchange High-Performance Liquid Chromatography with o-phthalaldehyde Fluorescence Detection

Sumika NAGASE, Shoichi SATO,
Satoru WATANABE* and Taiichi SAITO*

Department of Medical Technology, Kawasaki College of Allied Health Professions

**Department of Pharmacology, Kawasaki Medical School*

Kurashiki, Okayama 701-01, Japan

(Received on Aug. 26, 1991)

Key words : HPLC, ポリミアン, Putrescine, Cadaverine, Spermidine, Spermine

概 要

ポリミアン定量は、悪性腫瘍の診断、転移の有無、予後の治癒および治療効果の判定に有用であることが知られている。そこで我々は組織中ポリアミンの動態に着目し、定量を試みた。以前逆相 HPLC-Benzoyl 誘導体法の問題点を減少させるための改良を行った。しかし、この方法は前処理が煩雑であるのみならず、感度および精度にも問題があったので、今回陽イオン交換樹脂を用いた HPLC-OPA 蛍光法の検討を行った。ポリアミンの各成分 (Putrescine, Cadaverine, Spermidine, Spermine) は、単一移動相で陽イオン交換樹脂カラムにより分離後、o-フタルアルデヒド (OPA) 誘導体に変えて検出するポストカラム蛍光検出法で定量した。分析時間は移動相の pH および流出容量等を検討した結果、約45分に短縮でき、各ピーク間の分離能も良好であった。測定感度は従来行ってきた Benzoyl 誘導体法に比べ約20倍に向上した。また、各ポリアミンの最小検出量は 1~5 pmol であった。標準液の直線性と同時再現性、日差再現性および2回繰り返し再現性の結果はすべて良好であった。これらの結果はラット組織中のポリアミンの連続多検体測定が簡単に感度良く行えることを明らかにした。

はじめに

ポリアミンは1678年 Leeuwenhoer が人の精液中に、Spermine のりん酸塩の結晶として顕微鏡下で発見したのが最初である。ポリアミンとは、第一級アミノ基を2つ以上もつ直鎖の脂肪族炭化水素の総称であり、代表的なものに Putrescine (PUT), Cadaverine (CAD), Spermidine

(SPD), Spermine (SPM) などがある。これらのポリアミンは細胞分裂・核酸合成・蛋白合成に重要な役割を果たしていることが明らかになってきた。一方、1971年 Russel¹⁾²⁾が各種癌患者において、尿中ポリアミン排泄量と癌増殖との関連性を報告して以来、悪性腫瘍の有効な診断方法として注目されてきた³⁾⁴⁾。その後尿中ポリアミンの増加は必ずしも癌に特異的な

いことがわかり、腫瘍マーカーとしての意義は少なくなっている。

しかし、P. S. Sunkara らは1982年にルイス肺癌を移植したマウスにポリアミン生合成阻害剤を投与したところ、腫瘍の増殖抑制とともに肺への転移を強く抑制することを発見した⁵⁾。この転移の抑制はポリアミンの添加により完全に消失したために、癌の転移機構にもポリアミンが必須の働きをしていることが判明した。つまり、特定の臓器に作用するポリアミン生合成阻害剤は特定臓器に発生した癌の増殖と転移を抑制すると考えられる。斎藤らはフェルラ酸がラット前立腺のポリアミン合成を特異的に抑制したと報告している⁶⁾。

これらの臓器中のポリアミンを定量するには濾紙電気泳動、薄層クロマトグラフィーおよびガスクロマトグラフィー等が初期の段階で用いられたが、いずれも感度が低く、複雑な前処理を必要とした。以来多くの改良を重ねられ、最近では高速液体クロマトグラフィー (HPLC) が広く用いられるようになった。

我々は Verkoelen ら⁷⁾の逆相 HPLC によるポリアミンの Benzoyl 誘導体法を改良した⁸⁾。この改良点はポリアミンの誘導体合成の際に生成し、HPLC 測定に障害となる生成物を防ぐこ

とであった。しかし、いまだにこの逆相法は移動相と検出方法に多くの問題を有している。そこで前処理時間の短縮と測定精度を上げる目的で、陽イオン交換樹脂を用いた HPLC-OPA 蛍光測定法⁹⁾を検討したので報告する。

装置および試薬

1. 分析装置

装置は、システムコントローラ802-SC、オートサンプラ851-AS、送液ポンプ880-PU、カラムオープン860-CO、蛍光検出器821-FP、およびインテグレータ850-GI から構成した日本分光高速液体クロマトグラフを使用した。本実験に用いた流路構成を Fig. 1 に示した。

カラムは陽イオン交換樹脂である日本分光社製の POLYAMINEPAK (0.6cm ID×3.5cmL, 充填剤—スルホン化スチレン・ジビニルベンゼン共重合体) を用い、温度は分析中70℃に保った。

2. 試薬

Putrescine, Cadaverine, Spermidine, 1, 6-Diaminohexane, Spermine は Sigma (St. Louis, MO USA) 製のものを用いた。クエン酸二ナトリウム二水和物はアミノ酸分析用 (半井テスク K. K), OPA は蛍光分析用 (半井テス

HPLC (Japan Spectroscopic Co., Ltd, Tokyo, Japan)

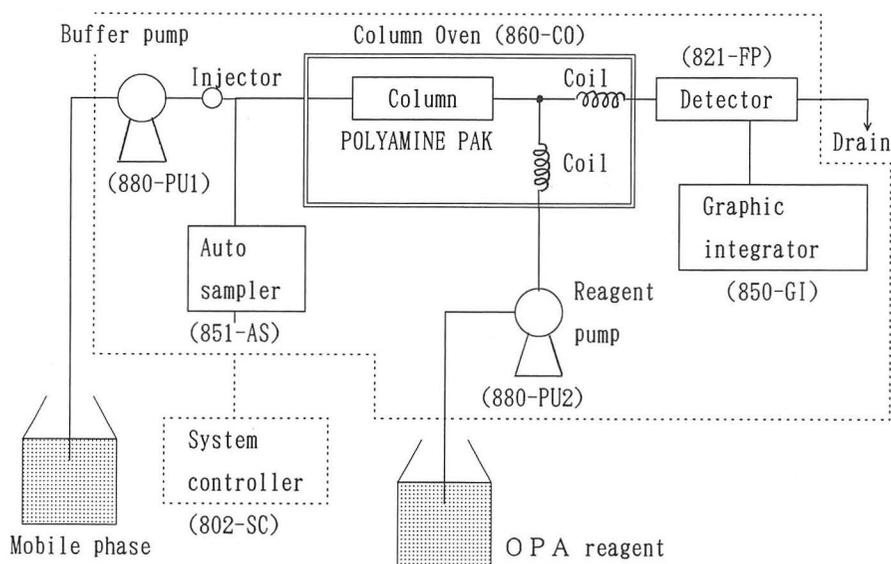


Fig. 1 Flow diagram of cation-exchange HPLC.

ク K. K), 他は和光純薬 K. K の特級 (生化学用) を用いた。

実 験

移動相と OPA 試薬の調製は次に示すとおりである。

移動相 (Buffer) : 3.0 M クエン酸二ナトリウム二水和物, H₂O を加えて 1 ℓ にし, 60% 過塩素酸で pH を調製した。

反応相 (OPA 反応液) : ほう酸 24.7 g, 水酸化カリウム 23.0 g, H₂O 980 ml, 10% Brig 35 水溶液 6.0 ml, 16% OPA エタノール溶液 10 ml, 最後に 2-メルカプトエタノール 2.0 ml を加えて調製した。

なお, 移動相および反応液はミリポアフィルター (pore size 0.45 μm) で濾過後, 20 分間脱気したものを HPLC に用いた。

ラット組織中ポリアミン定量に用いた試料の調製方法は Table. 1 に示した。最終的に得られた水溶液は移動相で 2 倍希釈し, ミリポアフィルターで濾過後, この溶液 10 μl を HPLC に注入した。

結果および考察

従来用いられた Benzoyl 誘導体法はポリアミンを Benzoyl 化するため, 水溶液相に 2 N-NaOH, benzoyl chloride を加え, 一夜 (約 12 時間) 60°C で加温を要する。生成した benzoyl polyamine はエーテル抽出をする。抽出後, エーテルを dry N₂ で除去し, 残渣をメタノールに溶解して HPLC に 10 μl 注入する。この方法は

Table 1 Extract procedure of various tissues and organs of rats.

various organs of the rats
←homogenization (10% TCA 2 ml)
←centrifugation 2500 rpm 15 min
←supernatants are washed by diethylether
H ₂ O layer
←filtration by 0.45 μm milliporefilter
10 μl of the filtrate is charged to the HPLC system

OPA 蛍光法に比べて前処理が煩雑で非常に時間を要するため, 迅速で高い精度のポリアミン定量には不向きである。

また, 従来の HPLC (OPA) 法による方法はイオン交換モード, 逆相分配モードであっても 2 種または 3 種の移動相を用いるグラジエント溶離法を使用していた。これは Putrescine, Cadaverine, Spermidine, Spermine の分離を単一移動相で行うと Spermine が強く保持されてしまうため, 同時分析が難しくなることから行われてきたものである。

しかし, グラジエント溶離法を用いる場合は一回分離後, 分析系を初期の移動相まで完全に置換し, 平衡になるまで待たねばならないなどの時間すなわちエージングが必要となる。また, 移動相の置換が行なわれるため, 試料導入のタイミングが一定しないことから, 保持時間がずれてしまい定量精度を悪くするなどの問題があった。

今回, 我々が行った HPLC-OPA 蛍光法によるポリアミン定量は単一組成の移動相で各成分を良好に分離する方法, 結晶析出を回避する方法としてブランジャー洗浄装置をポンプに取付けること, pH を調整する方法などの測定条件の検討と併せて精度・再現性試験を行った。

1) ポリアミンの検出

ポリアミンは紫外部, 可視部領域に吸収がなく, 自然蛍光もない。従って HPLC での検出は, 紫外部測定の場合ダビシル化, ダンシル化, トシル化などの誘導体, また, 蛍光測定の場合はフロレッサミン, OPA などの誘導体が利用される。我々は誘導体反応が容易で比較的簡単な自動化システム (日本分光) で利用できる OPA 法を用いた。検出最適波長を知るため, ポリアミン標準液と反応試薬を混和し, 蛍光スペクトルを見た。その結果, 検出波長は励起波長 340 nm, 蛍光波長 450 nm が最適であることがわかった。

組織中のポリアミンはカラム分離後, OPA-メルカプトエタノール反応試薬と反応させ, 生ずる発蛍光体の蛍光量を検出し, クロマトグラムの面積をインテグレータにより計算し定量した。

2) 移動相の pH 変化および流量の検討

① pH の検討

移動相における pH を 5.2~6.2 まで変化させた

ときの保持時間を比較検討したところ、移動相 pHが高くなるほど保持時間が延長した (Fig. 2)。しかし、pH5.0以下では移動相中に結晶を生じ測定が不可能となった。以上のことから移動相の分析に至適な pHは5.2~5.4であることが確認できた。

② 移動相流量の検討

移動相の pHを5.2とし、移動相流量を変化させたときの保持時間を検討した (Fig. 3)。流量を0.85ml/minより大きくするとポンプに負荷がかかり、1.0ml/min以上にすることは機械的に不可能であったが、流量が大きくなればなるほどポリアミンは小さい保持時間で流出した。各ポリアミンのピークは流量が0.65~0.85ml/minの間で重ならず、分析精度にも影響しなかった。

しかし、0.85ml/minの場合、移動相とOPA反応液との混液に混濁を生じた。以上のことから移動相流量は0.80ml/minが適当であると考えられた。

①および②の検討結果は移動相 pH5.2、流量0.80ml/minの分析条件が至適であることを示した。本条件下の HPLCでは Putrescineが6分、Spermidineが16分、1,6-Diaminohexaneが30分、Spermineが約41分で流出し、一回約45分で分析が可能となった (Fig. 4)。

3) 直線性

各ポリアミン濃度250 pmol/ μ l標準液は10, 20, 30, 50, 100, 200, 250 pmol/ μ lに段階希釈を行い直線性を調べた。ベースラインの乱れが生じない程度までインテグレータの感度を上げ、蛍

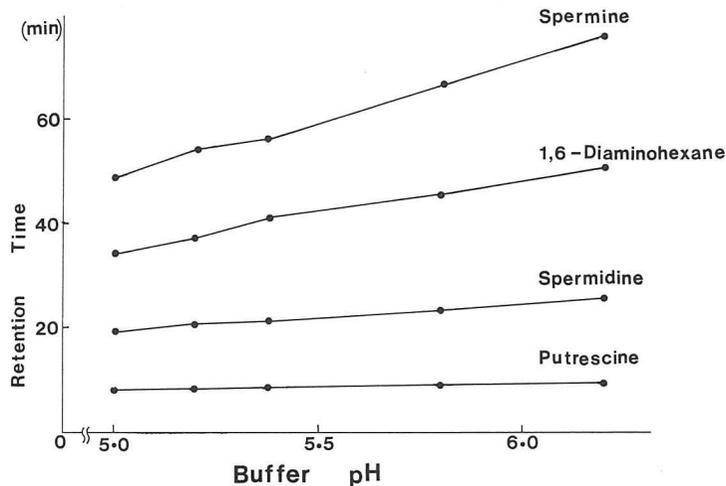


Fig. 2 A relation between the retention time of polyamine and pH of mobile phase buffer.

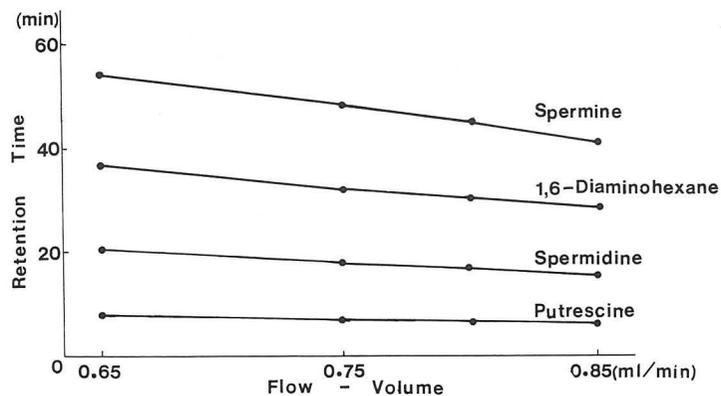


Fig. 3 A relation between the retention time of polyamine and flow-volume (ml/min) of mobile phase buffer.

Table 3 Simultaneous reproducibilities of a standard mixture and sample of the thymus calculated from peak area, and of separative time for putrescine (PUT), spermidine (SPD), 1,6-diaminohexane (DAH) and spermine (SPM).

Polyamine		PUT	SPD	DAH	SPM
Standard (nmol/10 μ l)	\bar{X}	2.601	2.648	2.603	2.678
	SD	0.0259	0.0326	0.0352	0.0597
	[n = 6]	CV%	1.000	1.229	1.350
Rat Thymus (nmol/10 μ l)	\bar{X}	0.204	2.684		0.856
	SD	0.0103	0.1338		0.0428
	[n = 10]	CV%	5.082	4.987	
Separative time (min)	\bar{X}	6.80	16.80		43.93
	SD	0.0100	0.0196		0.0351
	[n = 20]	CV%	0.417	0.117	

Table 3 Reproducibility of duplicate determination of sixty samples from various tissues of rats.

n = 60	PUT	SPD	SPM	Total PA	
\bar{X}	0.0643	1.3260	0.8430	2.2333	
SDX	0.0750	1.9124	1.1032	3.0611	
\bar{Y}	0.0657	1.3160	0.8191	2.2007	
SDY	0.0780	1.8968	1.0441	2.9934	
r	0.9830	0.9995	0.9977	0.9994	
Y = AX + B	A	1.023	0.991	0.944	0.977
	B	-0.0001	0.0014	0.0230	0.0180

Polyamine contents (nmol/mg)

光強度を拡大し検量線を作成した (Fig. 5)。その結果, Putrescine, Cadaverine, Spermidine, 1,6-Diaminohexane, Spermine の5成分すべてが原点を通る良好な直線性を示した。最小検出濃度は Putrescine が 1 pmol/ μ l, Spermidine が 3 pmol/ μ l, Spermine が 5 pmol/ μ l程度と高感度であった。分析に必要な標準液の最小量は Benzoyl 誘導体法⁷⁾で約 50 nmol であったが, 今回の OPA 法は約 2.5 nmol と約 20 倍感度が高いことが判明した。

4) 同時再現性および日差再現性

① 同時再現性

同時再現性をオートサンプラを用いて調べた結果, 2.5 nmol/10 μ l を標準液 (n = 6) は CV : 0.99%~2.23%となり, ラット胸線検体 (n = 10) は CV : 4.99%~5.08%であり, 測定精度は良好なことがわかった。

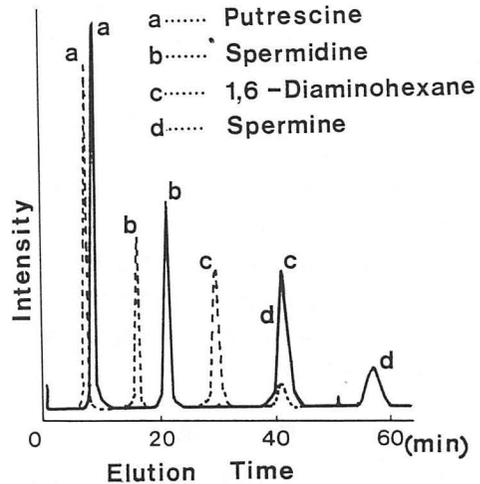


Fig. 4 Comparison between the present (---) and previous (—) analysis for determination of polyamines using cation-exchange HPLC with o-phthalaldehyde fluorescence detection.

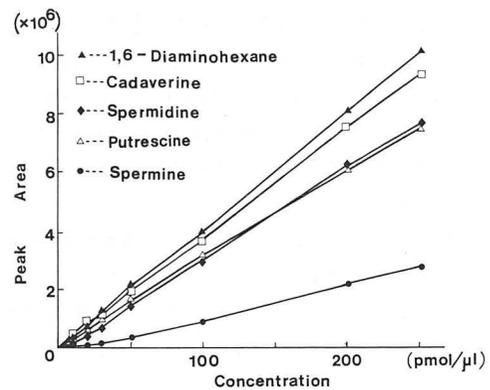


Fig. 5 Calibration curves for determination of polyamines.

次に分離時間の同時再現性を調べた結果, 2.5 nmol/10 μ l 標準液 (n = 20) は CV : 0.08%~0.15%となり再現性が良いことがわかった (Table. 2)。

② 日差再現性

日差再現性 (n = 6) は Putrescine で CV : 6.02%, Cadaverine で CV : 4.31%, Spermidine で 5.19%, 1,6-Diaminohexane で 5.10%, Spermine で 6.92%となった。

5) 2 回繰り返し測定 of 再現性

ラット Control 群 (体重 180 g 前後の 7 週齢

SD系雄ラットを使用)6匹について、各組織中ポリアミン (n = 60) における2回繰り返し測定の再現性は、満足すべき結果を示した (Table. 3)。

6) ラット組織中のポリアミン分析

ラット組織試料導入はオートサンプラを用い昼夜間連続測定しても問題を呈しなかった。一昼夜で約30検体連続測定が可能であった。ポンプヘッド自動洗浄装置 (日本分光 k. k) を導入することにより、結晶析出を回避することができ、保守面での問題が解決され連続多検体測定が十分可能となった。

結 論

陽イオン交換樹脂 HPLC-OPA 蛍光法を用いてポリアミン定量の検討を行った結果、検出感度は従来の Benzoyl 誘導体法に比べて20倍高く、一回の分析時間は単一組成の移動相で約45分に短縮することができた。また、検量線の直線性および再現性は良好であり、ラット組織中のポリアミン分析に応用できる結果を得た。

これらの検討結果より、今回行った HPLC-OPA 蛍光法は迅速で高感度なポリアミン分析法であり、制癌剤などの薬物療法の有効性をみるモニターとして今後応用するのに十分有用であると考えられる。

現在我々は、5-Fu, AraC の2種類の制癌剤およびフェルラ酸誘導体をラットに投与し、これらの薬剤がどのようにポリアミン代謝に影響を及ぼすか検討している。

謝 辞

稿を終えるに当たり、本研究にご協力いただいた臨床検査科第16期生、米田有希、吉田清子、黒木あい子、山中誉子および福田寿美の各君に深く感謝いたします。

文 献

- 1) Russell, D. H. : Increased polyamine concentrations in the urine of human cancer patients. *Nature New Biol.*, **233**, 144—145, (1971)
- 2) Russell, D. H., et al. : Urinary polyamines in cancer patients. *Cancer Res.*, **31**, 1555—1558, (1971)
- 3) Abdel-Monem, M. M. and Ohno, k. : Polyamine metabolism III : Urinary acetyl polyamines in human cancer. *J. Pharm. Sci.*, **67**, 1671—1673, (1978)
- 4) 久保田俊一郎, 他 : 腫瘍マーカーとしての尿中ポリアミンの新しい簡便・迅速測定法. *医学のあゆみ*, **124**, 22—24, (1983)
- 5) Sunkara, P. S. et al : An essential role for polyamine in tumor metastases. *FEBS Lett.*, **150**, 397—399, (1982)
- 6) T. Saito, et al : Trans-4-hydroxy-3-methoxycinnamic acid (ferulic acid) inhibits the effect of androgens on the rat prostate. *Experientia*, **35**, 696, (1979)
- 7) Verkoelen C., et al : Quantitation of polyamines in cultured cells and tissue homogenates by reversed-phase high performance liquid chromatography of their benzoyl derivatives. *J. Chromatography*, **462**, 41—54, (1988)
- 8) S. Watanabe, S. Sato, T. Saito, S. Nagase, M. Tomita, S. Ueda and : Investigation of interfering products in the high-performance liquid chromatographic determination of polyamines as benzoyl derivatives. *J. Chromatography*, **518**, 264—267, (1990)
- 9) C. Löser, et al : Reversed-phase liquid chromatographic separation and simultaneous fluorimetric detection of polyamines and their monoacetyl derivatives in human and animal urine, serum and tissue samples : an improved rapid and sensitive method for routine application. *J. Chromatography*, **430**, 249—262, (1988)