

ヒスタミン及びその代謝物の高速液体 クロマトグラフィー

— 最近の進歩 —

鶴田泰人, 石藤玲子, 小橋一彌

Recent Progress of Determination of Histamine and Its Related Compounds in Biological Fluids by HPLC

Yasuto TSURUTA, Reiko ISHIDO and Kazuya KOHASHI

ABSTRACT This review deals with mechanisms of the fluorescence reactions of histamine with OPA and recent development of the HPLC methods for determination of histamine and its related compounds in biological fluids with reference 60.

Procedures for determination of histamine in plasma and blood, simultaneous determination of histamine and methylhistamine in human urine and rat brain, which employ OPA reagent, are described. Determination of urinary imidazoleacetic acid and methylimidazoleacetic acid, derivatized with 4-Bromomethyl-7-methoxycoumarin, is detailed.

はじめに

ヒスタミンは、主に組織肥満細胞や血液好塩基球内に貯蔵されており、外的刺激によって遊離されると、気管支収縮、胃液分泌、また皮膚のかゆみ、発赤、アナフィラキシーなどの種々の生体反応を媒介する〔1, 2〕。遊離されたヒスタミンは酸化酵素やメチル基転移酵素などにより代謝され、代謝物は最終的に尿中に排泄される〔3〕。

ヒスタミンの遊離の機構や生理並びに薬理作用またレセプターに関しては一般に体液中のヒスタミンの量的変動と関連して研究が行なわれてきたが、最近ではヒスタミンと同時にヒスタミン代謝物の量的変動との関係も注目されている〔4〕。

ヒスタミンの測定には古くからモルモット回腸のヒスタミンによる収縮反応を利用した生物学

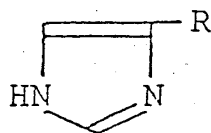
的定量法〔5〕が利用され、多数の検体を処理するための自動分析装置も考案されている〔6〕。一方、簡便さという点から化学的にヒスタミンを測定する方法の開発も試みられ、ヒスタミンの *p*-ニトロアニリンとのジアゾカップリング反応やジニトロフルオロベンゼンによる呈色反応を利用した比色定量法〔7, 8〕などを経て、*o*-フタルアルデヒド (OPA) によるけい光定量法が 1959 年 Shore らによって提出された〔9〕。その後、アミンの一般的なけい光試薬であるフルオレッサミンやダンシルクロリドによるヒスタミンのけい光定量法〔10, 11〕が開発されているが、OPA 法のように一般的に利用されるまでには至っていない。

分析機器の急速な進歩発展はヒスタミンの研究分野にも積極的に導入され始め、ヒスタミン-N-メチルトランスフェラーゼと¹⁴C-または³H-メチル-S-アデノシルメチオニンを用いてヒスタミンを¹⁴C-または³H-メチル基を持つN^T-メチルヒスタミンに変えて、その放射能を測定する酵素・ラジオアイソトープ法〔12, 13〕さらにガスクロマトグラフィー・マススペクトロメトリー (GC・MS 法)〔14, 15〕や液体クロマトグラフィー (LC 法)〔16, 17〕及び高速液体クロマトグラフィー (HPLC 法)〔18~26〕を利用して生体試料中のヒスタミンを定量する試みが相次いでなされた。このうち、酵素・ラジオアイソトープ法及び GC・MS 法は特別な施設・設備を必要とするため一般の研究室では簡便に利用できない。HPLC 法では装置の普及と簡易化、さらにカラム充填剤や前処理カラムの改良が急速に進んでおり、一般の研究室でも比較的簡便にヒスタミンの高感度定量ができるようになった。

筆者らは、1978 年に HPLC 法による血漿ヒスタミンの測定法〔4, 19〕、1981 年に HPLC 法によるヒスタミン及び N^T-メチルヒスタミンの同時定量法〔25〕を報告した。これらの方法は各方面で利用されているが〔27~31〕、その後さらにヒスタミンの代謝物であるイミダゾール酢酸及びメチルイミダゾール酢酸の HPLC 法による同時定量法も開発した〔32〕。

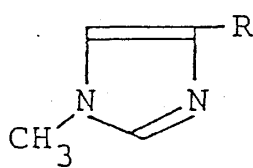
ヒスタミンの定量法に関する総説は、今までに数種あるが〔5, 33, 34〕、HPLC 法を中心にその代謝物の分析法まで含めてまとめられたものはない。

ここでは、はじめに現在最も広く用いられている OPA によるヒスタミンのけい光定量法における OPA とヒスタミンのけい光反応機構の最近の進展を述べ、次いで最近の 10 年間に報告されている HPLC 法によるヒスタミン及びその代謝物の分析法について、筆者らの研究成果を中心にまとめ、その現況を紹介する。なお、本稿で述べるヒスタミン関連化合物の命名は、Black ら〔35〕に従った (図 1)。



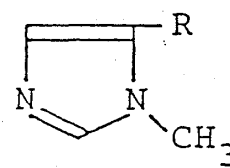
R = CH₂CH₂NH₂
ヒスタミン

R = CH₂COOH
イミダゾール酢酸



N^r-メチルヒスタミン

N^r-メチルイミダゾール酢酸



N^m-メチルヒスタミン

N^m-メチルイミダゾール酢酸

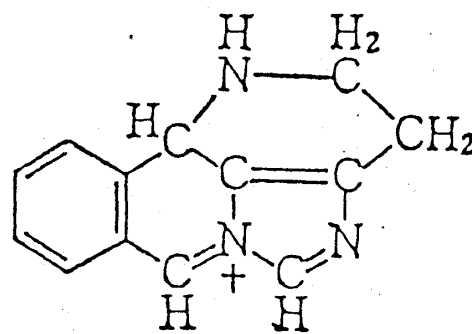
図1 ヒスタミン関連化合物

I ヒスタミン及びメチルヒスタミンの分析

I・1 OPAとヒスタミンのけい光反応機構

ヒスタミンの化学的測定法としては、はじめにも述べたように、OPAによるけい光定量法が現在最も広く利用されている。このけい光定量法は、ヒスタミンをOPAと水酸化アルカリ性で反応させた後、酸性にして反応液のけい光強度の増大とけい光の安定化をはかるShoreらの方法〔9〕と、Rothによる2-メルカプトエタノール存在下のOPAと一般のアミノ酸とのけい光反応〔36〕を応用した方法とに大別される。

Shoreらの方法におけるヒスタミンとOPAのけい光反応生成物として、ピリドキサルとヒスタミンの反応機構〔37〕からの類推により、図2に示した構造(I)の化合物が1959年Shoreらによって提出された〔9〕。その後、天野らによるOPAと芳香族一級アミンのけい光反応機構〔38〕や次に述べるSimonsらによるOPAと一般の脂肪族アミン類とのけい光反応機構〔39〕に関する研究結果などから、Shoreらの推定した構造(I)には疑問が持たれていた。Håkansonらは、1973年Shoreらのけい光反応を精査して、OPAとヒスタミンの最適のけい光反応条件を設定〔40, 41〕したが、反応機構を解明することはできなかった。最近、再びこの反応について検討を行ない、この



(I)

図 2

反応条件下で生じるけい光物質の単離を試み、三種の立体異性体をもつ構造の化合物(II)がけい光の本体であろうと推定し、図3に示すようなヒスタミンとOPAのけい光反応機構を提出した〔42〕。

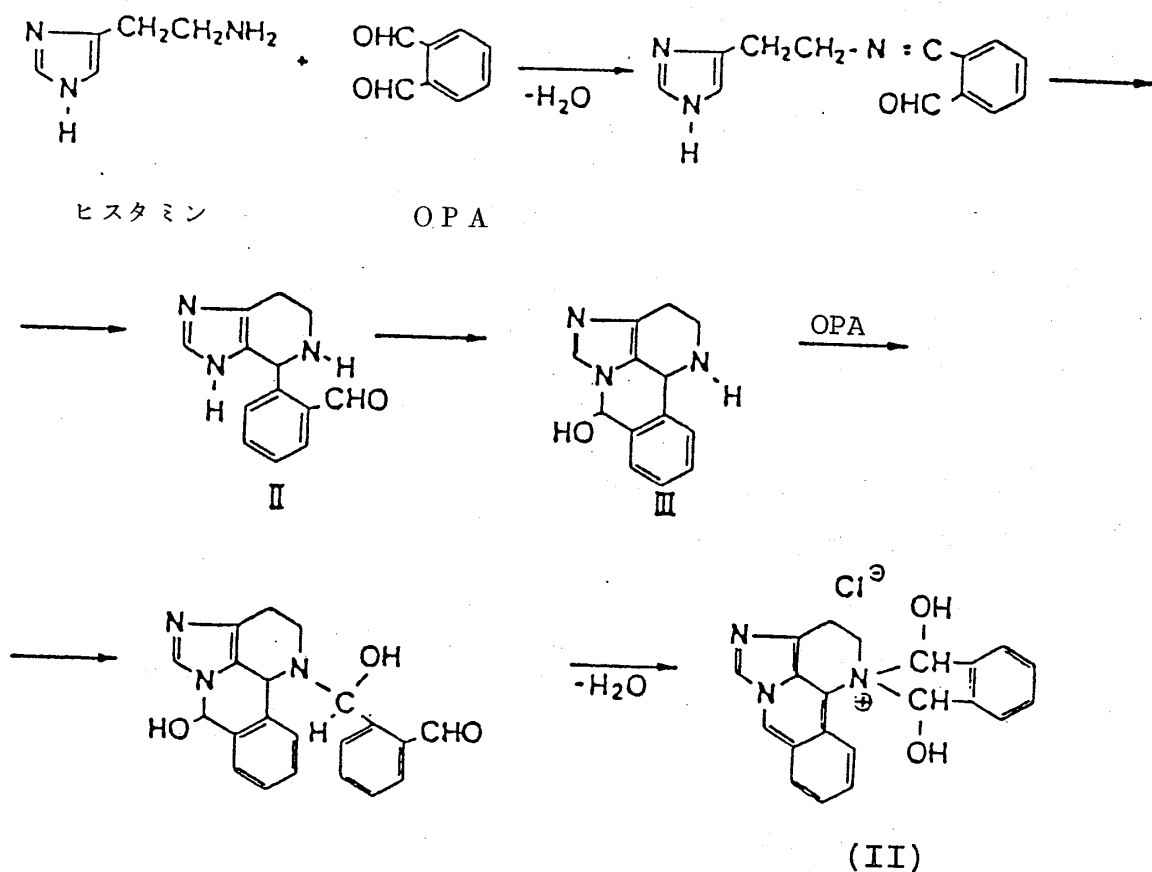


図3 OPAとヒスタミンのけい光反応機構

一方、2-メルカプトエタノールを用いる Roth の反応条件では、一級アミノ基を有するほとんど全ての脂肪族アミンやアミノ酸がけい光を発する。Simons らは、2-メルカプトエタノールとその他のチオール系還元剤の存在下における OPA と脂肪族アミンとのけい光反応を系統的に研究し、図4に示すような反応機構を提出した〔39〕。この反応条件での OPA とヒスタミンのけい光物質は単離されていないが、一般の脂肪族一級アミンと同様に図5の構造を持つと考えられる。

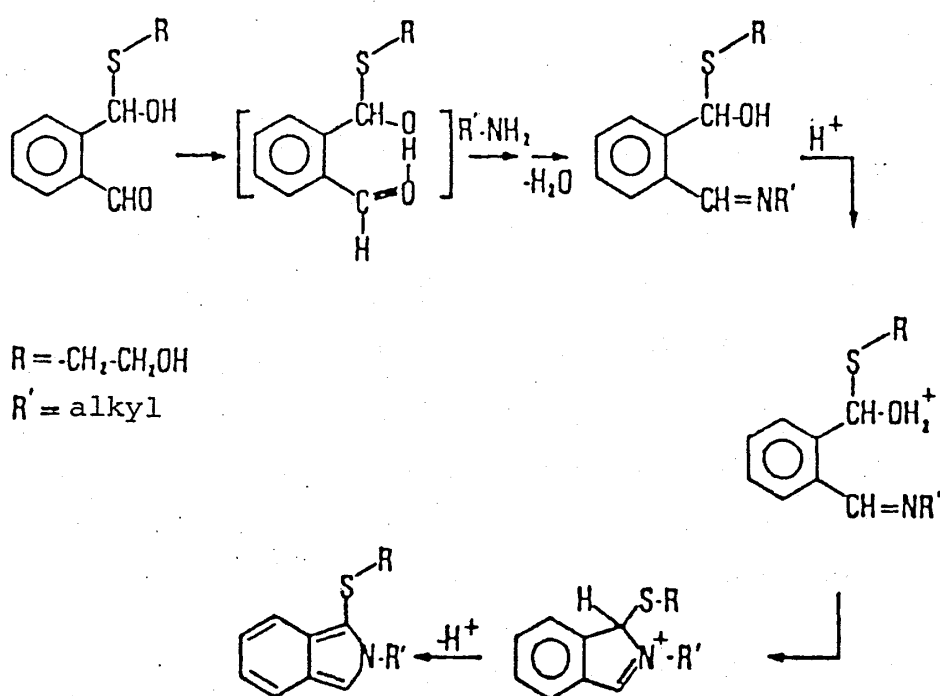


図4 2-メルカプトエタノール存在下でのOPAと脂肪族アミンのけい光反応機構

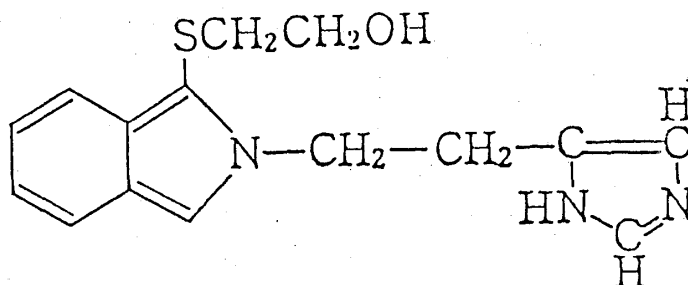


図5

1.2 HPLC法によるヒスタミンの分析

臓器、組織、体液中に含まれるヒスタミンを従来の化学的測定法で定量する場合には、除タンパク操作のほかに、種々の生体アミンによる妨害を除去するための溶媒抽出或はイオン交換クロマトグラフィーなどの前処理操作を必要とする。HPLC法の場合にもこれらの前処理操作は省略できないが、HPLCの利用により高感度で特異的にしかも再現性よく定量することができる。

HPLC法によるヒスタミンの測定法としては、ヒスタミンの紫外部吸収を利用して検出するHPLC-UV検出法とOPAとヒスタミンの反応で生成したけい光物質を検出するHPLC-けい光

検出法が報告されている。

Mettらによって報告されたHPLC-UV法〔14〕は、比較的高濃度のヒスタミン含有の試料の分析に適した方法で、陽イオン交換樹脂を充填したカラム（Partisil 10 SCX, Whatmann, 25×0.46 cm）に、溶離液として0.03Mリン酸二水素カリウム液（pH 4.5）（塩酸エチレンジアミン 0.25%含有）を用い、210 nmにおけるヒスタミンの吸光度を検出して、定量が行なわれている。

HPLC-けい光検出法によるヒスタミンの定量法では、1・1で述べたようにけい光反応条件によりShoreらの方法〔4, 19~22〕とRothの方法〔23~26〕に分けられる。前者の反応系で生じたヒスタミンのけい光物質の分離には主としてODS逆相分配系のカラムが用いられ、後者の場合は、ODSの他 μ -Bondapak phenyl/porasilや μ -Bondapak CNを充填したカラムも用いられている。表1に今までに報告されているヒスタミンのHPLC-OPAけい光法について、試料の前処理操作の概略、HPLC分離条件等をまとめて示した。

表1 HPLC-けい光検出によるヒスタミンの測定法

Shoreらの反応を利用した方法

	試料	操作	HPLC条件
Tsuruta(4) (16)	血漿	除タンパク 溶媒抽出 けい光反応 HPLC分析	TSKGEL LS-410 ODS (5 μ m, Toyo soda, 15×0.4 cm i. d) またはLiChrosorb RP-18 (5 μ m, Merck, 15×0.4 cm i. d) 0.2M塩化ナトリウム/メタノール(55:45) + 0.1M塩酸(pH 3)
Skofitsch(20)	組織	除タンパク けい光反応 HPLC分析	μ -Bondapak C ₁₈ (10 μ m, Waters, 30×0.39 cm i. d) 0.1M酢酸(0.1%ペンタンスルホン酸含有) /アセトニトリル(75:25)
Robert(21)	尿	陽イオン交換 クロマトグラフィー 溶媒抽出 けい光反応 HPLC分析	μ -Bondapak C ₁₈ (10 μ m, Waters, 30×0.4 cm i. d) メタノール/0.02M酢酸ナトリウム/酢酸 (55:43:2) (0.1%オクタンスルホン酸含有)
Rönnberg(22)	組織	除タンパク 陽イオン交換 クロマトグラフィー けい光反応 HPLC分析	Nucleosil C ₁₈ (5 μ m, Mecherey-Nagel, 25×0.5 cm i. d) 硫酸/25%メタノール(1g:1 ℓ)

Roth の反応を利用した方法

	試料	操作	HPLC条件
Davis (23)	血漿 組織 尿	除タンパク けい光反応 溶媒抽出 HPLC分析	μ -Bondapak phenyl/porail (Waters, 30×0.4cm i. d) 0.05Mリン酸二水素ナトリウム/メタノール (68:32)
Mell (24)	組織 尿	同上	μ -Bondapak CN (Waters) メタノール/0.08M酢酸(52:48)
Tsuruta* (25)	組織 尿	除タンパク 溶媒抽出 陽イオン交換 クロマトグラフィー けい光反応 HPLC分析	LiChrosorb RP-18 (5 μ m, Merck, 30×0.4cm i. d) 0.07Mリン酸水素二ナトリウム/メタノール (47:53)
Granerus* (26)	尿	溶媒抽出 陽イオン交換 クロマトグラフィー けい光反応 HPLC分析	Nucleosil C ₁₈ (5 μ m) 0.1Mリン酸塩緩衝液(pH 6.4, 0.4%トリ エチルアミン含有)/メタノール/アセトニ トリル(3:2:1)

* N^T-メチルヒスタミンとの同時定量

なお、Shoreらの方法によって得られるヒスタミンのけい光反応液及びRothの2-メルカプトエタノールを用いたけい光反応液とその酢酸エチル抽出液の3者のけい光強度とその安定性についての比較ではShoreらの方法で得られる反応液のけい光強度が最も強く、安定性の比較では、OPA/2-メルカプトエタノール反応液の酢酸エチル抽出液のけい光が最も安定であることが報告されている〔43〕。

筆者らの報告した血漿及び全血中のヒスタミンの定量法〔4, 19〕を以下に示す。

『血漿の一定容量(200-500 μ l)を遠沈管にとり0.2M過塩素酸2.0mlを加えて除タンパクする。1,200×gで遠心分離後、上清1.0mlを5M水酸化ナトリウム液0.3ml、塩化ナトリウム0.4g及びn-ブタノール4.5mlを入れた遠沈管に入れ、5分間振とうする。遠心分離後、水層を除去し、塩化ナトリウムで飽和した1M水酸化ナトリウム液1.5mlを加え振とうする。遠心分離後、有機層4.0mlを0.1M塩酸0.25ml及びベンゼン4.0mlを入れた遠沈管にとり振とうする。遠心分離後、有機層を吸引除去し、塩酸層を次のけい光反応に用いる。』

塩酸層0.1mlを小試験管に入れ、1M水酸化ナトリウム液20 μ lを加え、これに1%OPA液5 μ lを加えよく振りまぜる。正確に4分後、1M硫酸10 μ lを加え酸性にして反応を停止する。こ

の反応液 100 μ l を HPLC の注入試料とする。

HPLC の分離条件は表 1 に示したように、カラムとして TSKGEL LS-410 ODS (5 μ m) を 15 \times 0.4 cm に充てんしたもの、溶離液として 0.2M 塩化ナトリウム液/メタノール (55:45) を 0.1M 塩酸で pH 3 に調整したものを用い、流速 0.5 ml/min で Ex 350 nm, Em 450 nm のけい光を検出する。』

本法による検出限界は 0.2 pmol/ml 血漿であった。

図 6 は、ヒスタミン 0.8 ng/ml 含有の血漿について上記定量操作を行なった結果得られた HPLC-クロマトグラムである。

全血中のヒスタミンを定量する場合には、血液を 20~30 倍に希釈した後、同様の操作を行なう。

本法は、血漿中ヒスタミンレベルとアレルギーに関する研究に利用されている [27]。

I・3 ヒスタミン及びメチルヒスタミンの同時定量

ヒスタミンの主な代謝物の 1 つである N^T -メチルヒスタミンの測定法としては、2,4-ジニトロフルオロベンゼンを発色試薬とする吸光度法 [44] とヘプタフルオロブチル誘導体にして測定する GC-MS 法 [45] があるが、最近、ヒスタミンと N^T -メチルヒスタミンを同時に測定する方がこれらの生体内における動態をよく知ることができるという観点から、これらの同時定量法の開発が行なわれ、LC 法 [16, 17], HPLC 法 [21, 25, 44] 及び GC-MS 法 [15] を利用した同時定量法が報告された。

LC 法としてはダンシルクロリドや OPA/2-メルカプトエタノールを試薬としたけい光プレラベル及びポストラベル法がそれぞれ報告されている。

LC-けい光プレラベル法 [16] では、組織の除タンパク液上清を Amberlite CG 50 (Type II, Na⁺, 9.5 \times 0.4 cm i. d) 及び Dowex 50w \times 8 (Na⁺, 5.0 \times 0.4 cm i. d) で分離し、溶出したヒスタミン及びメチルヒスタミンをダンシルクロリドでけい光ラベルした後、LC-けい光検出し定量している。この方法でマウス脳を分析したときのクロマトグラムを図 7 に示す。

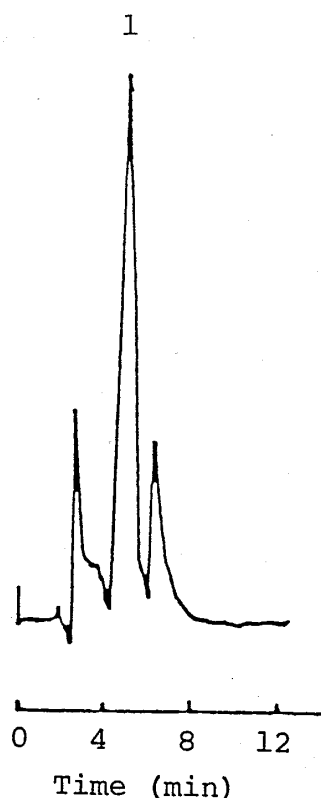


図 6 血漿ヒスタミンの HPLC
クロマトグラム
HPLC 条件は本文参照
1. ヒスタミン

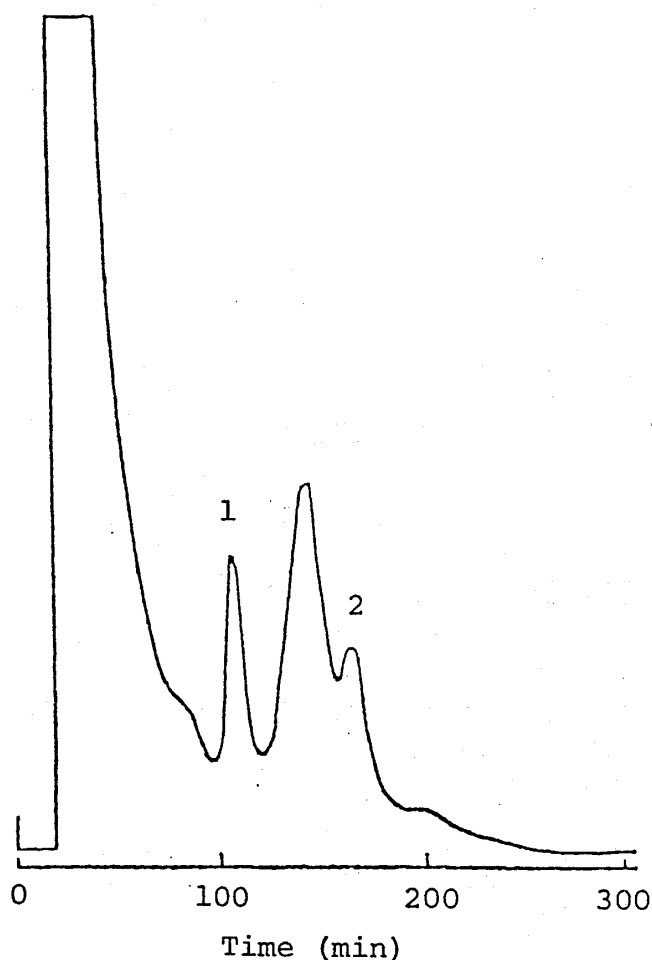


図7 マウス脳のLC-クロマトグラム

カラム, Ambeilite IRC-50 (Na^+ , $10 \times 0.8 \text{ cm}$) ; カラム温度 42°C ; 溶離液, 0.1 M クエン酸ナトリウム/テトラヒドロフラン/エチルメチルケトン/アセトン/メタノール/2,2'-チオジエタノール ($12:1:2:3:2:0.05$)

流速, 14 ml/h ; けい光検出 (Ex $230-400 \text{ nm}$, Em $410-800 \text{ nm}$, フィルター)

1. ヒスタミン, 2. N^T -メチルヒスタミン

LC-けい光ポストラベル法〔17〕は、尿やラット乳房抽出液をアミノ酸分析計 (Durrum D-500 analyzer, 陽イオン交換カラム, $115 \times 1.75 \text{ mm, d}$) で3種類の緩衝液により溶離し、溶出したヒスタミン, N^T -メチルヒスタミン及びポリアミン類をOPA/2-メルカプトエタノール試液と反応させ、それらのけい光を検出するものである。図8に、この方法により急性リンパ性白血病患者尿を分析したクロマトグラムを示す。

HPLC法では、1・2で述べたヒスタミンの場合と同様、UV検出法〔21〕とけい光検出法〔25, 26〕が報告されている。

HPLC-UV検出法では、ヒスタミン, N^α -メチルヒスタミン, N^T -メチルヒスタミン及び N^π -メチルヒスタミンを陽イオン交換樹脂のカラム (Partisil 10 SCX, (Whatman)) 及び溶離液

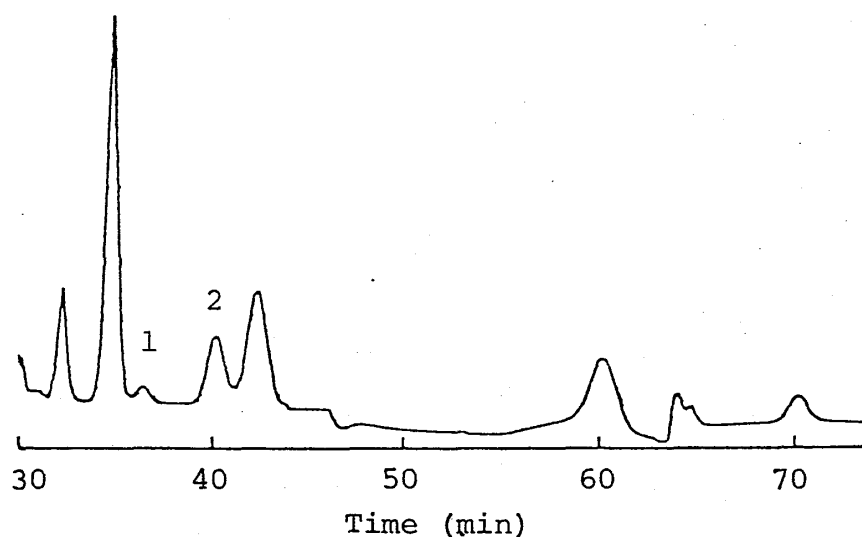


図8 急性リンパ性白血病患者尿のLC-クロマトグラム

カラム, HPLC-陽イオン交換樹脂 (Na^+); カラム温度 78°C ; 溶離液, (a) 0.2M クエン酸ナトリウム, 26min ; (b) 0.2M クエン酸ナトリウム + 1.7M 塩化ナトリウム, 30min ; (c) 0.2M クエン酸ナトリウム + 3.3M 塩化ナトリウム, 19min ; 流速 $0.45\text{ml}/\text{min}$ けい光検出 (Ex 340nm , Em 455nm)

1. N^T -メチルヒスタミン, 2. ヒスタミン

0.4M リン酸二水素ナトリウム ($\text{pH } 4.5$) で分離し, それらを 210nm における吸光度で検出している。

HPLC-けい光法は, ヒスタミン及びメチルヒスタミンを OPA/2-メルカプトエタノール試薬でけい光誘導体とした後, 逆相分配系カラムで分離し, それらのけい光を検出する方法で, 人尿及びラット脳中のヒスタミン及び N^T -メチルヒスタミンの同時定量へ応用された。この方法では, N^T -メチルヒスタミンの異性体であるが, 生体中には含まれない N^π -メチルヒスタミンを内部標準として用いている。

以下に, 筆者らの開発した人尿中のヒスタミン及び N^T -メチルヒスタミンの同時定量法〔25〕を示す。

『尿 (1.0ml) に内部標準として N^π -メチルヒスタミンを添加し, 水酸化ナトリウム液を加えてアルカリ性とし, n -ブタノール 4.5ml で抽出する。 n -ブタノール層 4.0ml を 0.1M 塩酸及びベンゼン 4.0ml を入れた遠心管にとり遠心分離する。有機層を吸引除去したのち, 塩酸層に 0.01M リン酸塩緩衝液 ($\text{pH } 6.0$) 1.0ml を加え, Cellex-P カラム (Na^+ , 上記緩衝液で平衡化, $25 \times 5\text{mm i.d}$) に付す。上記緩衝液 4.0ml , 水 1.0ml で洗った後, 0.12M 塩酸 1.2ml でヒスタミン及びメチルヒスタミンを溶出する。溶出液をアルカリ性 (約 $\text{pH } 10$) にし減圧下乾固する。この残渣に反应用緩衝液 0.2ml を加え, 0.5% OPA メタノール溶液 $5\mu\text{l}$ を加え反応する。反应用緩衝液は, 0.05M ホウ

酸塩緩衝液 (pH 10.0) / メタノール / 0.5% 2-メルカプトエタノール (50:50:1) に混合して調製する。この反応液 50 μ l を HPLC に注入する。分離条件は、表 1 にも示したようにカラムとして LiChrosorb RP-18 (5 μ m, 15 \times 0.4 cm i. d.), 溶離液として 0.07 M リン酸水素二ナトリウム / メタノール (47:53) を用い、流速 0.7 ml/min で Ex 335 nm, Em 445 nm のけい光を検出する。』

図 9 に上の操作で得られた人尿中ヒスタミン及び N^T-メチルヒスタミンの HPLC-クロマトグラムを示す。検出限界は、ヒスタミンで 2.0 pmol/ml 尿, N^T-メチルヒスタミンで 3.8 pmol/ml 尿であった。ラット脳中のヒスタミン及び N^T-メチルヒスタミンの同時定量には、脳を過塩素酸で除タンパクした上清について上記と同様の操作を行なう。この筆者らの方法は、種々の条件下での脳内ヒスタミンの分布や turnover に関する研究に利用されている [28~31]。

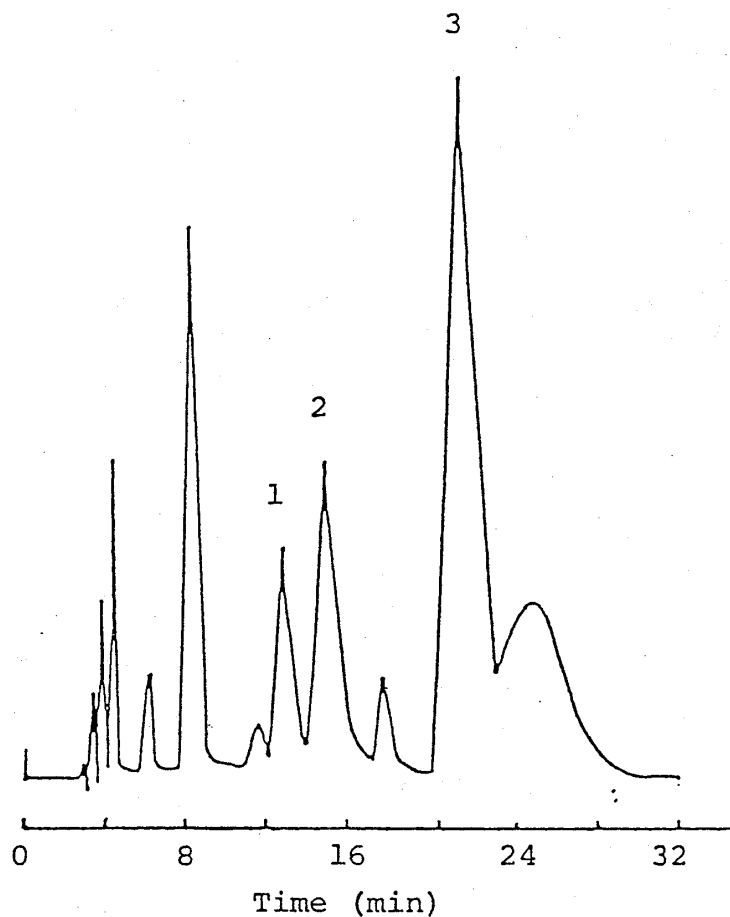


図 9 健康人尿の HPLC クロマトグラム

HPLC 条件は本文参照

1. ヒスタミン, 2. N^T-メチルヒスタミン (内部標準)
3. N^T-メチルヒスタミン

なお, Granerus ら [26] は, 筆者らの方法を一部改変した尿中ヒスタミン及びメチルヒスタミ

ンの同時定量法を報告している。

Ⅱ イミダゾール酢酸及びメチルイミダゾール酢酸の分析

Ⅱ・1 イミダゾール酢酸の測定法

イミダゾール酢酸の測定法としては、次に述べるメチルイミダゾール酢酸との同時定量法以外に、ペーパークロマトグラフィー〔46〕や薄層クロマトグラフィー（TLC）〔47〕で分離したイミダゾール酢酸をジアゾ試薬で発色させた後、呈色物質を抽出し、抽出液の 500 nm における吸光度を測定して定量する方法が知られているが、最近、酵素を利用した吸光度法〔48〕が開発された。この方法の原理を図10に示した。イミダゾール酢酸は NADH の存在下、イミダゾール酢酸モ

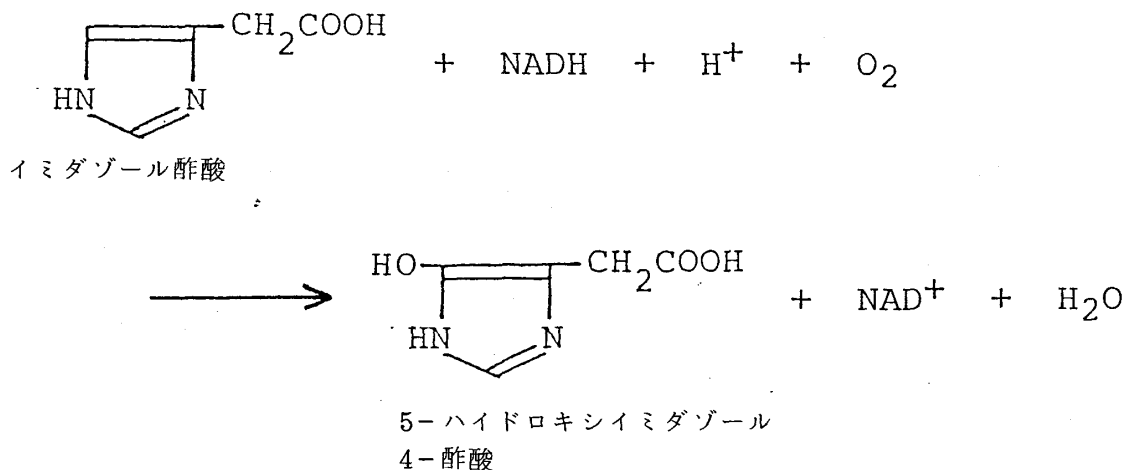


図 10

ノオキシゲナーゼにより 5-ヒドロキシ-4-イミダゾール酢酸へ変化するが、このとき NADH は NAD⁺ へ酸化されるので、NADH の減少量を 340 nm における吸光度の変化から求め、イミダゾール酢酸を定量する。この方法は、組織中のイミダゾール酢酸の定量に利用されている。

Ⅱ・2 N^r-メチルイミダゾール酢酸の測定法

N^r-メチルイミダゾール酢酸の測定法としては、メチルエステルやエチルエステル、プロピルエステルとして測定する GC 法〔49～52〕、ブチルエステルやヘptaフルオロブチル化して測定する GC・MS 法〔53, 54〕及び HPLC-UV 検出法〔55〕が報告されている。

GC 法や GC・MS 法は、尿、脳、血漿及び脊髄中の N^r-メチルイミダゾール酢酸の定量に利用されている。なお、これらの方法で、ヒスタミンの代謝物ではないが N^r-メチルイミダゾール酢酸も同時定量している。

HPLC-UV 検出法〔55〕では、尿 (50 μl) を緩衝液で 20 倍希釈して、そのまま HPLC 注入試料

とし、220 nmにおける吸光度を検出し定量を行なっている。図11にUV法で得られた尿中N^T-メチルイミダゾール酢酸のHPLC-クロマトグラムを示す。

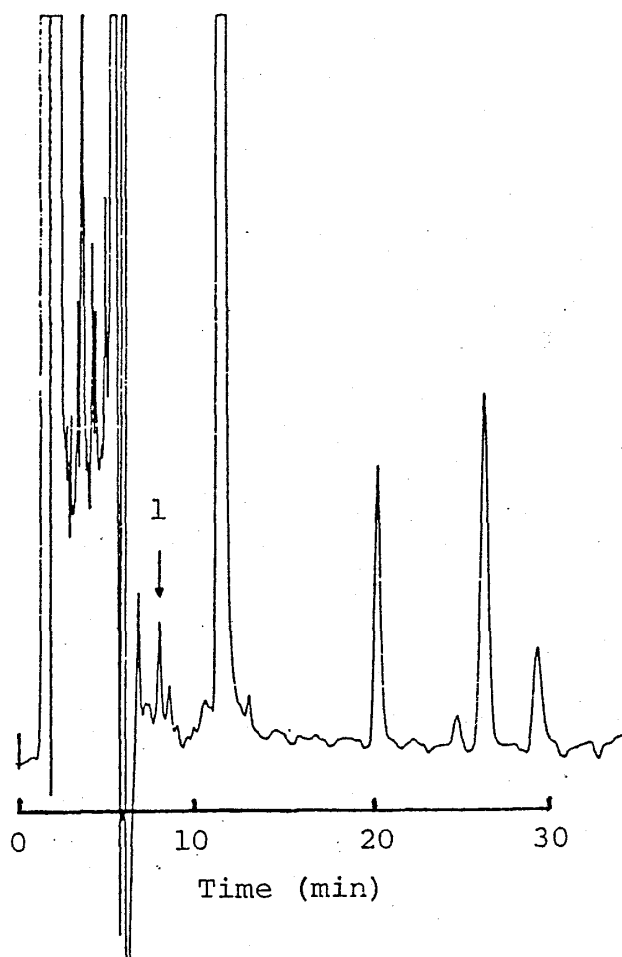


図11 人尿中N^T-メチルイミダゾール酢酸のHPLCクロマトグラム

カラム, Hibar[®] - RT 250-4 LiChrosorb RP-18 (5 μ m); カラム温度, 45 $^{\circ}$ C;
 溶離液, リン酸 (1ml) + リン酸二水素ナトリウム (0.69g) + ドデシル硫酸ナトリウム (10g) + 1N水酸化ナトリウムの混液 (1L) (pH 2.80) / アセトニトリル (180 : 70); 流速, 1.5ml/min; UV検出 (220 nm, 0.04 AUFS)

1. N^T-メチルイミダゾール酢酸

II・3 イミダゾール酢酸及びメチルイミダゾール酢酸の同時定量

イミダゾール酢酸及びメチルイミダゾール酢酸の同時測定法としては, GC法〔56〕, TLC-けい光法〔57, 58〕及び筆者らの開発したHPLC-けい光法〔28〕がある。GC法では標準物質の測定が試みられているが, 生体試料へ応用した報告はまだない。

TLC-けい光法は, 前処理した尿 (50 ml) をシリカゲルプレート上で分離し, このプレートをヨウ素蒸気に浸した後, 300 $^{\circ}$ Cで加熱し, このとき生じるプレート上のけい光をクロマトスキャ

ナーで測定する方法である。この方法ではイミダゾール酢酸及び N^T -メチルイミダゾール酢酸のほかヒスタミン及び N^T -メチルヒスタミンもけい光を発するが、感度が低いため、生体試料中のヒスタミン及び N^T -メチルヒスタミンの定量には利用されていない。

筆者らの報告したHPLC-けい光法は、イミダゾール酢酸及びメチルイミダゾール酢酸がジメチルホルムアミド (DMF) 溶媒中で炭酸カリウム及び18-クラウン-6-エーテルの存在下カルボン酸のけい光ラベル化剤である4-ブロモメチル-7-メトキシクマリンと容易に反応し安定なけい光誘導体 (図12) を生成することを利用したものである。以下に、尿中イミダゾール酢酸, N^T -

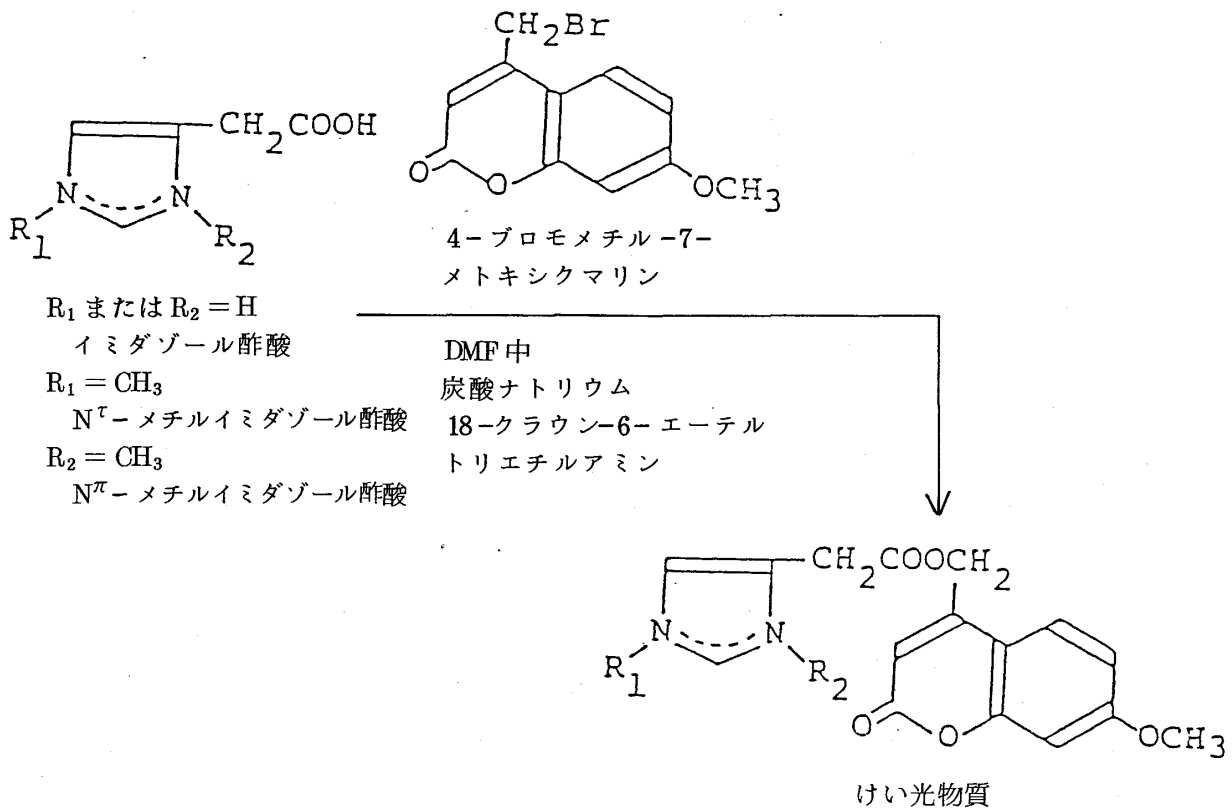


図12 イミダゾール酢酸及びメチルイミダゾール酢酸と4-ブロモメチル-7-メトキシクマリンのけい光反応

及び N^N -メチルイミダゾール酢酸の同時定量操作を示す。

『尿0.5 mlに50mM トリス-酢酸塩緩衝液 (pH 7.4) 1.5 mlを加え, 1M水酸化ナトリウム液でpH 7.4に調整し, Bond Elute C_{18} (Analytichem International) に付す。このろ液及び洗液 (水3 ml) を陰イオン交換樹脂 AG 1×4 のカラム (Bio Rad, CH_3COO^- , 3×1cm i.d) に付し, このカラムを水3 ml及び0.05M酢酸2mlで洗浄後, 0.05M酢酸1.5mlで溶出する。溶出液を減圧下乾固し, 残渣に10mM 18-クラウン-6-エーテルのDMF溶液 (トリエチルアミン0.05%含有) 50 μ l及び無水炭酸カリウム0.4gを加え, よく混和後, 10mM 4-ブロモメチル-7-メトキシクマリン

のDMF溶液 50 μ l を加え, 20分間室温で反応する。この反応液 10 μ l をHPLCの注入試料とする。HPLC条件は, カラムとしてラジアルパックシリカ (10 μ m, Waters, 10 \times 0.8 cm i. d), 溶離液としてアセトン/ベンゼン/酢酸 (70 : 30 : 0.05) を用い, 流速 2.0 ml/min で, Ex 336 nm, Em 391 nm のけい光で検出する。』

図13に上記操作で得られた尿中イミダゾール酢酸, N^T -及び N^π -メチルイミダゾール酢酸のHPLCクロマトグラムを示す。検出限界は N^T -メチルイミダゾール酢酸, イミダゾール酢酸及び

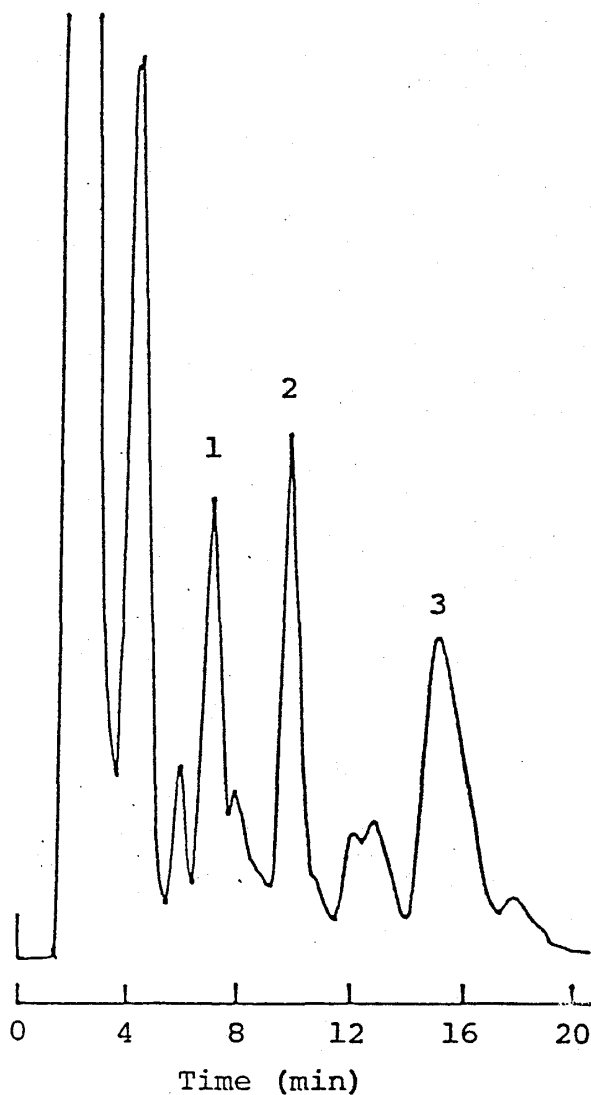


図13 健常人尿のHPLCクロマトグラム

HPLC条件は本文参照 1. N^T -メチルイミダゾール酢酸, 2. イミダゾール酢酸, 3. N^π -メチルイミダゾール酢酸

N^π -メチルイミダゾール酢酸でそれぞれ 10, 15 及び 20 pmol/ml 尿であった。また, 本法は高感度であることから, 組織中のイミダゾール酢酸類の分析も可能と考えられている。

おわりに

ヒスタミンの最終代謝物として尿中に排泄されるものは、本稿で扱ったイミダゾール酢酸及びN^ε-メチルイミダゾール酢酸のほかに、イミダゾール酢酸のリボチド及びリボシド、イミダゾールエタノールなどが同定されている〔3, 29〕。ヒスタミンの代謝経路は動物の種類や臓器によって異なることが知られており、上記以外にまだ同定されていない最終代謝物の存在することも予想されている。

ヒスタミンに関しては、貯蔵、遊離、代謝、生理作用、レセプターと広範囲に亘り膨大な数の研究報告があり、これらは数種の成書によくまとめられている〔1, 2, 5, 29, 59, 60〕が、今もって解明されてないことも多く、現在もなお各国で盛んに研究が進められている。これらの研究は、新しい分析法の開発とその利用により飛躍的に進展するものと思われる。

筆者らの研究室における今後の研究課題として、ヒスタミン代謝関連酵素類の測定法の確立、ヒスタミン代謝物の一斉分析法の開発などを予定している。

最後に、筆者らの今までに報告したヒスタミン関連化合物のHPLC分析に関する研究は、主として九州大学薬学部・大倉洋甫教授のご指導によるもので、ここに感謝の意を表す。また、岡山大学薬学部・田坂賢二教授、同医学部・佐伯清美教授、大阪大学医学部・和田博教授には、ヒスタミンの薬理・生理作用に関していろいろとご教示いただいた。併せてここに謝意を表す。

文 献

- 1) 山崎英正 “生体アミン”，山崎英正，吉田博編，医歯薬出版，p-141 (1975)。
- 2) M.A. Beaven “Histamine: Its Role in Physiological and Pathological Processes” in *Monographs in Allergy*, Vol. 13, ed. by S. Karger, S. Karger AG, (1978).
- 3) R.W. Schayer, *Annu. Rev. Physiol.*, **39**, 116 (1959).
- 4) B. Uvnas and K. Tasaka “Advances in the Biosciences, Vol. 33, Advances in Histamine Research” Pergamon Press, Oxford and New York (1982).
- 5) C.F. Code, F.C. McIntire, “Methods of Biochemical Analysis”, ed. by D. Glick, Interscience, New York, Vol. III, p.45 (1956).
- 6) D. Colquhoun, M.L. Tattersall, *Br. J. Pharmacol.*, **38**, 241 (1970).
- 7) S.M. Rosenthal, H. Tabor, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **92**, 426 (1948).
- 8) O.H. Lowry, H.T. Graham, F.B. Harris, M.K. Priebat, A.R. Marks and R.U. Bregman, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **112**, 116 (1954).

- 9) P.A. Shore, A. Burkhalter and V.H. Cohn, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **120**, 182 (1959).
- 10) H. Nakamura and J.J. Pisano, *Arch. Biochem. Biophys.*, **177**, 334 (1976).
- 11) T. Seki and H. Wada, *J. Chromatogr.*, **102**, 251 (1974).
- 12) S.H. Snyder, R.J. Baldessrini and J. Axelrod, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **153**, 544 (1966).
- 13) Y. Kobayashi and D.V. Mandsley, *Anal. Biochem.*, **46**, 85 (1972).
- 14) H. Mita, H. Yasueda and T. Shida, *J. Chromatogr.*, **181**, 153 (1980).
- 15) H. Mita, H. Yasueda and T. Shida, *J. Chromatogr.*, **221**, 1 (1980).
- 16) A. Yamatodani, T. Seki, M. Taneda and H. Wada, *J. Chromatogr.*, **144**, 141 (1977).
- 17) F. Perini, J.B. Sadow and C.V. Hixson, *Anal. Biochem.*, **94**, 431 (1979).
- 18) C.L. Mett and R.J. Sturgeon, *J. Chromatogr.*, **235**, 536 (1982).
- 19) Y. Tsuruta, K. Kohashi and Y. Ohkura, *J. Chromatogr.*, **146**, 490 (1978).
- 20) G. Skofitsch, A. Saria, P. Holzer and F. Lembeck, *J. Chromatogr.*, **226**, 53 (1981).
- 21) J.C. Robert, J. Vatie, B.K. Nguyen Phuoc and S. Bonfils, *J. Chromatogr.*, **273**, 275 (1983).
- 22) A.L. Rönnerberg, C. Hansson and R. Håkanson, *Anal. Biochem.*, **139**, 338 (1984).
- 23) T. Davis *et al.*, *J. Chromatogr.*, **162**, 293 (1979).
- 24) L.D. Mell, R.N. Hawkins and R.S. Thompson, *J. Liquid Chromatogr.*, **2** (9), 1393 (1979).
- 25) Y. Tsuruta, K. Kohashi and Y. Ohkura, *J. Chromatogr.*, **224**, 105 (1981).
- 26) G. Granerus and U. Wass, *Agents and Actions*, **14**, 341 (1984).
- 27) 今田義郎, 吾郷晋浩, 手嶋秀毅, 永田領史, 榊 吉彦, アレルギー, **29**, 970 (1980).
- 28) R. Oishi, M. Nishibori and K. Saeki, *Brain Res.*, **261**, 180 (1983).
- 29) R. Oishi, M. Nishibori and K. Saeki, *Brain Res.*, **280**, 172 (1983).
- 30) M. Nishibori, R. Oishi and K. Saeki, *J. Neurochem.*, **43**, 1544 (1984).
- 31) R. Oishi M. Nishibori and K. Saeki, *Life Sci.*, **34**, 691 (1984).
- 32) 鶴田泰人, 石藤玲子, 富田久夫, 田中哲郎, 小橋一彌, 大倉洋甫, 日本薬学会第105年会講演要旨集.
- 33) 大和谷厚, 和田 博, 渡辺建彦, 杉山勝三, 山崎英正, 佐伯清美, “生化学実験講座11, アミノ酸代謝と生体アミン(下)”, 日本生化学会編, 東京化学同人, p-823.
- 34) 佐伯清美, “神経伝達物質測定法マニュアル”, 森昭 胤編集, 医歯薬出版, p-92 (1979)
- 35) J.W. Black and C.R. Ganellin, *Experientia*, **30**, 111 (1974).
- 36) M. Roth, *Anal. Chem.*, **43**, 880 (1971).

- 37) D. Heyl, E. Luz, S.A. Harris and K. Folkers, *J. Amer. Chem. Soc.*, **70**, 3669 (1948).
- 38) 天野為之, 水上 聡, 薬学雑誌, **85**, 1035 (1965).
- 39) S.S. Simons, Jr. and D.F. Johnson, *J. Org. Chem.*, **43**, 2886 (1978).
- 40) R. Håkanson, A.L. Rönnerberg, and K. Sjolund, *Anal. Biochem.*, **47**, 356 (1972).
- 41) R. Håkanson and A.L. Rönnerberg, *Anal. Biochem.*, **54**, 353 (1973).
- 42) A.L. Rönnerberg, C.Hansson, T. Drakenberg and R. Håkanson, *Anal. Biochem.*, **139**, 329 (1984).
- 43) C. Buteau, C.L. Duitschaever and G.C. Ashton, *J. Chromatogr.*, **212**, 23 (1981).
- 44) D.H. Fram and J.P. Green, *J. Biol. Chem.*, **240**, 2036 (1965).
- 45) L.B. Hough, P.L. Stetson and E.F. Domino, *Anal. Biochem.*, **96**, 56 (1979).
- 46) H. Dunér, S.O. Liljedahl and B. Pernow, *Acta Physiol. Scand.*, **51**, 41 (1961).
- 47) J.L. Dhondt, B. Cartigny and J.P. Farriaux, *Clin. Chim. Acta*, **50**, 297 (1974).
- 48) T. Watanabe, H. Kambe, I. Imamura, Y. Taguchi, T. Tamura and H. Wada, *Anal. Biochem.*, **130**, 321 (1983).
- 49) R. Tham and B. Holmstedt, *J. Chromatogr.*, **23**, 207 (1966).
- 50) A.S. Kelvin, *J. Pharm. Pharmacol.*, **20**, 659 (1968).
- 51) J.J. Keyzer, B.G. Wolthers, H. Breukelman, H.F. Kauffman and J.G.R. deMonchy, *Clin. Chim. Acta*, **121**, 379 (1982).
- 52) E. Evans and P.J. Nicholls, *J. Chromatogr.*, **82**, 394 (1973).
- 53) J.K. Khandelwal, L.B. Hough, B. Pazhenchevsky, A.M. Morrishow and J.P. Green, *J. Biol. Chem.*, **257**, 12815 (1982).
- 54) C.G. Swahn and G. Sedvall, *J. Neurochem.*, **40**, 688 (1983).
- 55) I. Søndergaard, *Allergy*, **37**, 581 (1982).
- 56) N. Mahy and E. Gelpi, *J. Chromatogr.*, **130**, 237 (1977).
- 57) R.M. Schwartzman, *J. Chromatogr.*, **86**, 263 (1973).
- 58) R.M. Schwartzman and R.E.W. Halliwell, *J. Chromatogr.*, **115**, 129 (1975).
- 59) R.S. Tuttle, M. McCleary "Histamine", ed. by C. Maslinsky, Dowden, Hutchinson & Ross, Inc., (1971).
- 60) D.M. Paton, "Histamine and Anti-histamines", ed. by M. Schachter, Pergamon Press, Oxford, Vol. 1 (1973), 小倉保己, 佐伯清美, 和田 博共訳, "ヒスタミン" 理工学社 (1981).