

アミノ酸類の蛍光誘導体化試薬の開発及び
生体試料中ヒドロキシプロリン、プロリン及び
プロリルジペプチド類の
高感度蛍光プレラベルHPLC分析

井上裕文、峠 佳江、鶴田泰人

**Development of fluorescent labeling reagents for
determination of amino acids and their applications for
highly sensitive determination of hydroxyproline,
proline and prolyl dipeptides in biological samples by
pre-label HPLC with fluorescence detection**

Hirofumi Inoue, Yoshie Tao, Yasuto Tsuruta

Abstract

Highly sensitive fluorescent labeling reagents, 4-(5,6-dimethoxy-2-phthalimidinyl)phenylsulfonyl chloride (DPS-Cl) and 4-(5,6-dimethoxy-2-phthalimidinyl)-2-methoxyphenylsulfonyl chloride (DMS-Cl), for determination of amino acids by HPLC were developed. DPS-Cl and DMS-Cl reacted with amino acids in the basic medium to produce the corresponding fluorescent sulfonamides (DPS derivatives; Ex 315 nm, Em 385 nm; DMS derivatives; Ex 318 nm, Em 406 nm; in aqueous acetonitrile). When the reactivities of DPS-Cl and DMS-Cl were investigated by means of reversed phase HPLC using hydroxyproline (Hyp) and alanine (Ala) as model compounds, the reactions of Hyp with DPS-Cl and DMS-Cl were completed within 5 min at 25°C and those of Ala were within 15 min at 70°C. The detection limits (signal-to-noise ratio = 3) of almost all amino acids labeled with DPS-Cl and DMS-Cl were less than 5 fmol/injection. DPS-Cl and DMS-Cl were applied to highly

sensitive determination of Hyp, proline (Pro) and prolyl dipeptides in biological samples and HPLC methods for determination of free Hyp and Pro in serum, determination of total Hyp and Pro in serum and urine and determination of prolyl dipeptides, Pro and Hyp in urine were established.

はじめに

HPLC-蛍光検出法は試料中に極微量しか存在していない多成分を同時かつ高感度に測定することができる有用な分離分析法の一つである。HPLC-蛍光検出法を利用するとき、分析対象物がそのままでは検出できないかあるいは低い検出感度しか与えない場合、分析対象物を蛍光誘導体に導くことにより高感度検出が可能となることから、これまでに種々の官能基に対する蛍光誘導体化試薬が開発されている¹⁾。その中で、アミノ基に対する蛍光誘導体化試薬としては、発蛍光団に反応基としてハロカルボニル基、ハロスルホニル基又はイソチオシアネート基を導入した試薬、芳香族ジアルデヒド類、フルオレッサミン類及びハロゲンニトロベンゾフラザン類などが知られているが、これらの試薬のいくつかは感度的に不十分であり、試薬自身または誘導体が不安定であるなどの欠点を有している。

そこで本研究では、アミノ酸類に対する蛍光誘導体化試薬として 4-(5,6-dimethoxy-2-phthalimidinyl)phenylsulfonyl chloride (DPS-Cl, 2-[4-(chlorosulfonyl)phenyl]-5,6-dimethoxyisoindolin-1-one) 及び 4-(5,6-dimethoxy-2-phthalimidinyl)-2-methoxyphenylsulfonyl chloride (DMS-Cl, 2-[4-(chlorosulfonyl)-3-methoxyphenyl]-5,6-dimethoxyisoindolin-1-one) を開発し、これらの試薬のアミノ酸に対する反応性について検討し、これらの試薬がアミノ酸類に対する高感度な逆相系 HPLC 用蛍光誘導体化試薬であることを見出した。また、両試薬が一級アミノ基はさることながら二級アミノ基との反応性が高いことから、生体試料中のヒドロキシプロリン (Hyp) 及びプロリン (Pro) などの二級アミノ基を有するアミノ酸類の高感度な分析試薬として有用であることがわかった。

Hyp 及び Pro はコラーゲン中に特異的に含まれるアミノ酸であり、これらのアミノ酸はコラーゲンの分解により血液中に放出され、尿中に遊離型及びペプチド型として排泄される^{2,3)}。尿毒症^{4,5)}において血清中の Hyp 及び Pro の濃度は上昇し、骨髄腫などの癌⁶⁻¹⁵⁾及び腎性及び代謝性骨形成異常症¹⁶⁻²⁵⁾などのコラーゲン代謝に関連する疾病により血清及び尿中の濃度は変動する。特に、血清及び尿中の濃度は前立腺癌や乳癌などにおける骨転移の診断と治療経過を診る上で有用であることが示唆されている⁸⁻¹⁵⁾。また、尿中の Hyp 及び Pro を含有するジペプチド類の濃度もコラーゲン代謝に関連する疾病²⁶⁻²⁸⁾により変動するといわれている。したがって、血清及び尿中の Hyp、Pro 及びプロリルジペプチド類を測定するこ

とは、種々の疾病の診断と治療経過を診る上で重要であると考えられる。

そこで、開発した DPS-Cl 及び DMS-Cl を Hyp、Pro 及びプロリルジペプチド類の分析に応用すべく検討を行い、血清中遊離型 Hyp 及び Pro の測定、血清及び尿中の総 Hyp 及び Pro の測定及び尿中プロリルジペプチド類及び遊離型の Pro 及び Hyp の測定を高感度に行う選択的蛍光プレラベル HPLC 同時分析法を確立した。

1. 蛍光誘導体化試薬の開発とそれらの蛍光誘導体の蛍光特性

著者らは、*o*-フタルアルデヒド (OPA) と芳香族第一アミンとの反応で得られる 2-フェニルフルイミジン類が比較的高感度で光に対して安定であることから、これを発蛍光団とし、各種反応基を導入した蛍光誘導体化試薬の開発を行っている²⁹⁻³⁶⁾。その中で、増感基としてメトキシ基を導入した 5,6-ジメトキシ-2-フェニルフルイミジン類はより強い蛍光を発する発蛍光団として有用であることも見出ししている³³⁾。

そこで、増感基としてメトキシ基を導入した 5,6-ジメトキシ-2-フェニルフルイミジン及び 5,6-ジメトキシ-2-(3-メトキシフェニル)フルイミジンを発蛍光団とし、反応基としてスルホニルクロライド基を導入したアミノ化合物に対する蛍光誘導体化試薬 DPS-Cl 及び DMS-Cl を開発し、DPS-Cl 及び DMS-Cl の Hyp との誘導体 (DPS-Hyp 及び DMS-Hyp) を合成単離して、その蛍光特性について検討した。さらに各試薬のアミノ酸に対する反応性について、モデル化合物として Hyp 及びアラニン (Ala) を用いて検討した。

1-1. 実験

1) 誘導体化操作

アミノ酸溶液 (20 μ l) にホウ酸塩緩衝液 (0.1 M, pH 8.0, 280 μ l) 及び DPS-Cl 又は DMS-Cl (3 mM アセトン溶液, 500 μ l) を順次加え、70℃で 15 分間誘導体化反応を行う。反応終了後、ジクロロメタン (800 μ l) を加えて攪拌・遠心分離する。この水層 20 μ l を HPLC に注入する。

2) HPLC 条件

カラムとして TSK-gel ODS-80Ts (4.6×150mm, i.d., 5 μ m, Tosoh) を 20℃で用い、リン酸塩緩衝液 (5 mM, pH 2.5) - アセトニトリル (75/25, v/v) のイソクラティック溶出法により流速 1 ml/min で溶出し、DPS-Cl では励起側 315 nm 及び蛍光側 385 nm、DMS-Cl では励起側 318 nm 及び蛍光側 392 nm における蛍光を検出した。

1-2. 検討結果

1) 試薬及び誘導体の合成及び構造

DPS-Cl 及び DMS-Cl はそれぞれ 4,5-ジメトキシフタルアルデヒドとアニリン又は *m*-アニシジンとの反応により得られる 5,6-ジメトキシ-2-フェニルフタルイミジン及び 5,6-ジメトキシ-2-(3-メトキシフェニル)フタルイミジンをそれぞれクロルスルホン酸で処理して合成された。DPS-Cl 及び DMS-Cl はいずれもそれ自身蛍光を発しないが、塩基性下、一級及び二級アミノ基を有する化合物と反応して発蛍光性のスルホンアミド誘導体を生成した (Fig. 1-1)。DPS-Cl、DMS-Cl、DPS-Hyp 及び DMS-Hyp の構造は元素分析、MS スペクトル及び ^1H NMR スペクトルにより確認した。

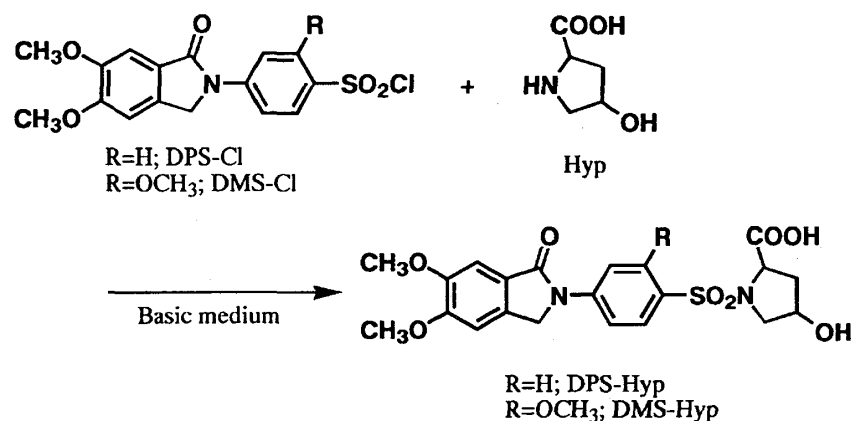


Fig. 1-1. Labeling reactions of Hyp with DPS-Cl and DMS-Cl

2) 誘導体の蛍光特性

合成単離した DPS-Hyp 及び DMS-Hyp の蛍光特性について、各誘導体の $1\ \mu\text{M}$ 溶液を用い、蛍光スペクトルを測定して検討した。

DPS-Hyp 及び DMS-Hyp のアセトニトリル-水系溶媒中での蛍光極大波長はそれぞれ励起側 315 nm、蛍光側 385 nm 及び励起側 318 nm、蛍光側 406 nm であった (Fig. 1-2)。

DPS-Hyp 及び DMS-Hyp のいずれも 20% v/v アセトニトリル水溶液中で最大の蛍光強度を示し、アセトニトリル含量が増加するにしたがって蛍光強度は減少した (Fig. 1-3)。DPS-Hyp の励起及び蛍光極大波長及び蛍光強度はいずれも溶媒の pH に影響されなかったが、DMS-Hyp では酸性 (pH 2.5~3) で蛍光極大波長が短波長側にシフト (392 nm) し、pH 5~8 の溶液中に比べて約 1.3 倍強い蛍光を発した (Fig. 1-4)。DPS-Hyp と DMS-Hyp の蛍光強度を比較した場合、中性領域ではほぼ同程度であったが、酸性側では DMS-Hyp が DPS-Hyp に比べ約 1.6 倍強い蛍光を発した。このことから、DPS-Cl 及び DMS-Cl は逆相系 HPLC 用の蛍光誘導体化試薬として有用であり、DMS-Cl は酸性側溶離液を用いる

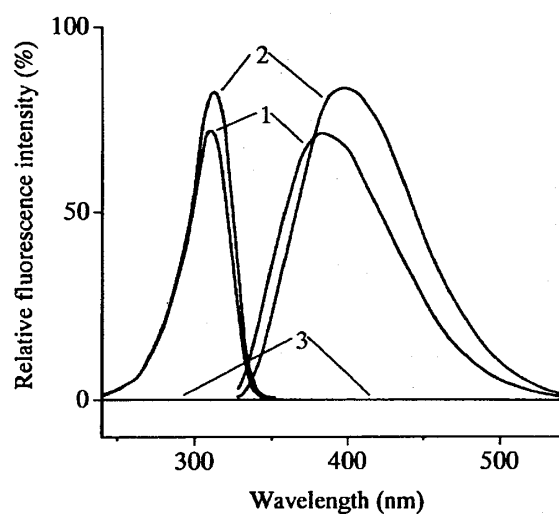


Fig. 1-2. Fluorescence spectra of DPS-Hyp and DMS-Hyp in 25% v/v aqueous acetonitrile. Curves: 1=DPS-Hyp (Ex: 315 nm, Em: 385 nm); 2=DMS-Hyp (Ex: 318 nm, Em: 406 nm); 3=Blank.

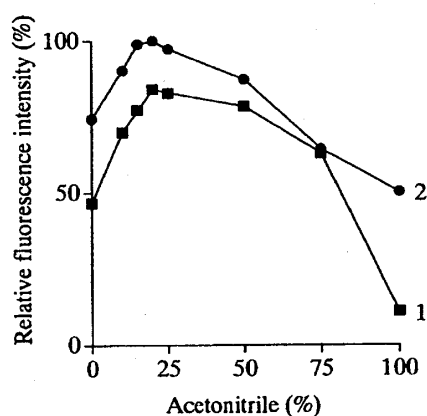


Fig. 1-3. Effect of acetonitrile content in the medium on the fluorescence intensities of DPS-Hyp and DMS-Hyp. Curves: 1=DPS-Hyp; 2=DMS-Hyp.

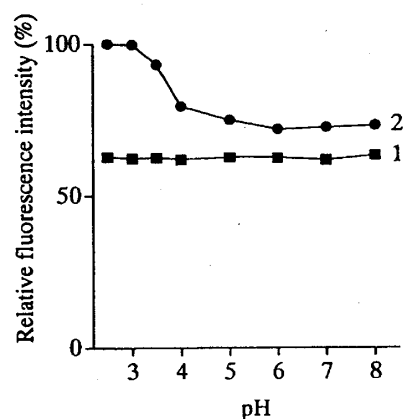


Fig. 1-4. Effect of pH of phosphate buffer (5 mM) in the medium on the fluorescence intensities of DPS-Hyp and DMS-Hyp. Curves: 1=DPS-Hyp; 2=DMS-Hyp.

とき、特に有用であることが示唆された。

3) DPS-Cl 及び DMS-Cl のアミノ酸に対する反応性

アミノ酸の DPS-Cl 及び DMS-Cl による誘導体化反応条件についてモデル化合物として Hyp 及び Ala の標準混液 (各 20 μ M) を用い、逆相系 HPLC により検討した。

(i) HPLC クロマトグラム

DPS-Cl 又は DMS-Cl により誘導体化された Hyp 及び Ala は逆相系 HPLC により良好に分離され、いずれのピークも試薬ブランクに基づくピークと完全に分離した (Fig. 1-5)。

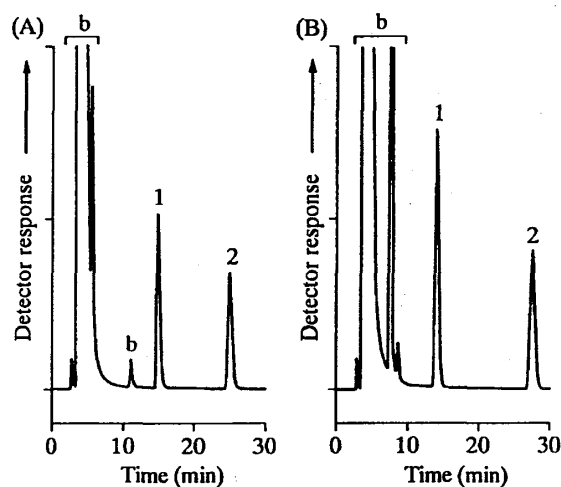


Fig. 1-5. Chromatograms obtained from standard solution of Hyp and Ala (20 μ M, each) labeled with (A) DPS-Cl and (B) DMS-Cl. Peaks: 1=Hyp; 2=Ala; b=reagent blank.

(ii) 誘導体化反応条件

DPS-Cl 及び DMS-Cl によるアミノ酸の誘導体化反応は塩基性下進行し、Ala の誘導体化反応における至適 pH は 70℃において pH 8 付近、Hyp では pH 7.5~9.5 であった。また、Hyp では 25℃においても幅広い pH 範囲で反応は進行することがわかった (Fig. 1-6)。

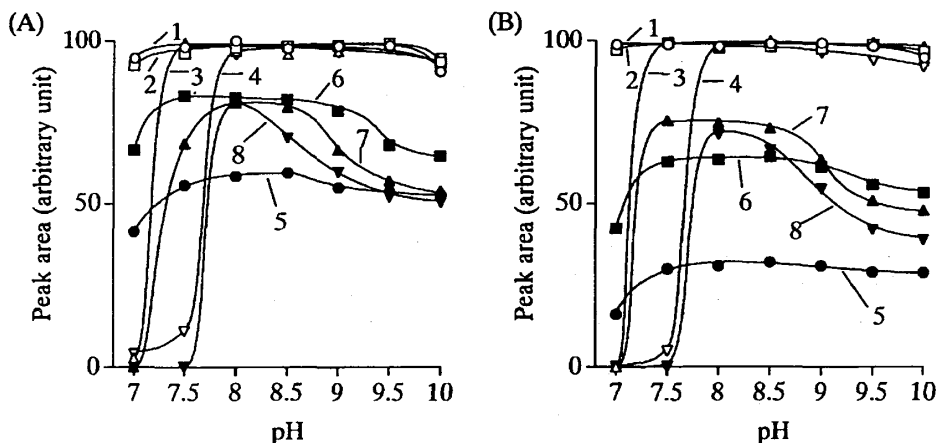


Fig. 1-6. Effect of pH of borate buffer (0.1 M) on the labeling reactions of Hyp and Ala with (A) DPS-Cl and (B) DMS-Cl at various temperatures. Curves: 1=Hyp at 25°C; 2=Hyp at 50°C; 3=Hyp at 70°C; 4=Hyp at 100°C; 5=Ala at 25°C; 6=Ala at 50°C; 7=Ala at 70°C; 8=Ala at 100°C.

DPS-Cl 及び DMS-Cl による Hyp の誘導体化反応は、いずれにおいても温度に関係なく迅速に進行し、5 分間で完了したが、Ala の誘導体化反応は、いずれの試薬においても反応温度が高いほど誘導体化反応はより迅速に進行し、DPS-Cl では 50℃、10 分間で完了し、DMS-Cl では 70℃、15 分間で完了した (Fig. 1-7)。

なお、ジクロロメタン抽出は、未反応の試薬が反応液中に多量に残存すると HPLC カラ

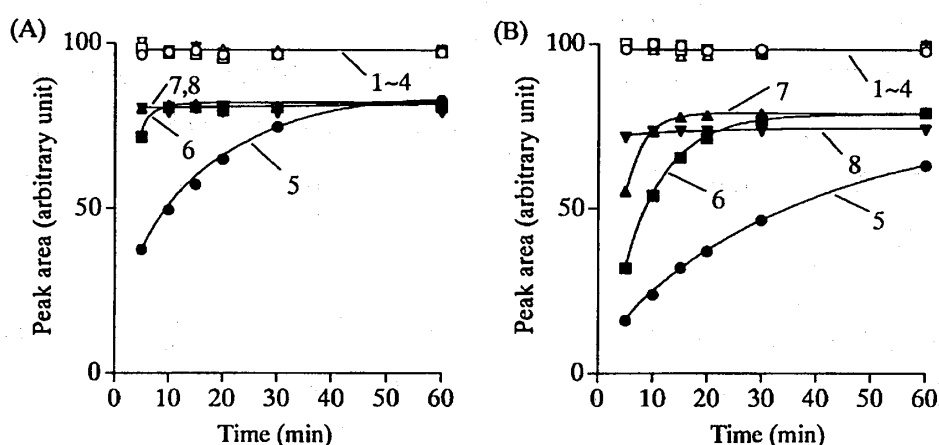


Fig. 1-7. Effect of reaction time and temperature on the labeling reactions of Hyp and Ala with (A) DPS-Cl and (B) DMS-Cl. Curves: 1=Hyp at 25°C; 2=Hyp at 50°C; 3=Hyp at 70°C; 4=Hyp at 100°C; 5=Ala at 25°C; 6=Ala at 50°C; 7=Ala at 70°C; 8=Ala at 100°C.

ムの劣化が速くなることがわかったので、過剰の試薬を抽出除去するために行っている。

(iii) 誘導体化率

合成単離した誘導体から求めた Hyp の誘導体化率は DPS-Cl で $99.1 \pm 0.90\%$ (mean \pm S.D., $n=5$)、DMS-Cl で $99.7 \pm 2.55\%$ (mean \pm S.D., $n=3$) であった。

(iv) 他の誘導体化試薬との比較

DPS-Cl 及び DMS-Cl と市販のアミノ酸分析用試薬 7-Fluoro-4-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazole (NBD-F)³⁷⁾ 及び 1-dimethylaminonaphthalene-5-sulfonyl chloride (Dansyl-Cl)³⁸⁾ との感度の比較を Hyp 及び Ala について逆相系 HPLC (酸性溶離液) を用いて行った。DPS-Cl 及び DMS-Cl は NBD-F 及び Dansyl-Cl に比べ数十倍～数百倍高感度であった (Table 1-1)。また、DPS-Cl と DMS-Cl を比較した場合、DMS-Cl は DPS-Cl に比べ約 1.6 倍高感度であった。

Table 1-1. Detection wavelength, retention time and relative detector response of Hyp and Ala labeled with DPS-Cl, DMS-Cl, Phisyl-Cl, NBD-F and Dansyl-Cl.

Reagent	Detection wavelength (Ex/Em, nm)	Retention time (min)		Relative detector response ^a	
		Hyp	Ala	Hyp	Ala
DPS-Cl	315/385	14.7	24.7	436	244
DMS-Cl	318/392	13.9	27.5	704	361
NBD-F	470/530	4.7	10.8	23	15
Dansyl-Cl	340/538	7.0	12.8	1	1

^a The ratio of peak area/mol. The detector response (peak area/mol) of each Dansyl derivative was taken as 1.

(v) 他のアミノ酸との反応及び検出限界

DPS-Cl 及び DMS-Cl の反応性について 27 種類のアミノ酸類を用いて逆相系 HPLC (酸性溶離液) により検討した。DPS-Cl 及び DMS-Cl のいずれを用いた場合もすべてのアミノ酸で反応は確認され、検出限界はほとんどすべてのアミノ酸で 5 fmol/injection (S/N=3) 以下であった。

以上のことから、DPS-Cl 及び DMS-Cl はいずれもアミノ酸類の高感度な逆相系 HPLC 分析用蛍光誘導体化試薬であり、特に、二級アミノ基を有する Hyp 及び Pro との反応性が高いことがわかった。

2. 血清中遊離型Hyp及びProの高感度蛍光プレラベルHPLC分析

血清 (又は血漿) 中遊離型 Hyp の定量法としてこれまでに種々の方法が開発されており、この中で Hyp 及び Pro の同時分析法として GC³⁹⁾ 及び HPLC⁴⁰⁻⁴⁵⁾ を利用した方法が報告されている。GC 法では、Hyp 及び Pro を揮発性の誘導体に導くために煩雑な 2 段階の誘導体化操作法を必要とする。一方、HPLC 法では、ポスト又はプレラベル誘導体化法を利用した紫外部又は蛍光検出による測定が行われているが、Hyp 及び Pro を検出するのに十分な感度を得られていない。

そこで、DPS-Cl を用いて血清中の遊離型 Hyp 及び Pro を蛍光誘導体に導き逆相系 HPLC で分離検出するための検討を行い、高感度で精度の高い Hyp 及び Pro の蛍光プレラベル HPLC 同時分析法を確立した。さらに、本法を健常人及び慢性腎不全患者の血清中の遊離型 Hyp 及び Pro の定量への応用を行った。

2-1. 実験

1) 定量操作

血清 (10 μ l) に内標準物質 (IS) としてニペコチン酸 (50 μ M, 20 μ l)、ホウ酸塩緩衝液 (0.1 M, pH 8.5, 270 μ l) 及び OPA (4% w/v アセトン溶液, 50 μ l) を順次加え、室温で 3 分間放置する。DPS-Cl (1.2 mM アセトン溶液, 450 μ l) を加え、30℃で 10 分間誘導体化反応を行ったのち、ジクロロメタン (800 μ l) を加えて攪拌・遠心分離する。この水層 10 μ l を HPLC に注入する。

2) HPLC 条件

カラムとして Nova-Pak C18 (3.9 \times 150mm, i.d., 4 μ m, Waters) を 25℃で用い、(A) リン酸塩緩衝液 (1 mM, pH 7.0) - (B) アセトニトリルのグラジエント溶出法で分析した。グラジエントプログラムとして、10 \rightarrow 22% B へのリニアグラジエントを 12 分間行い、続

いてステップワイズにより 80% B として 5 分間カラムを洗浄したのち、さらにステップワイズにより 10% B として 5 分間送液しカラムの平衡化を行った。流速は 1 ml/min とし、励起側 315 nm 及び蛍光側 385 nm における蛍光を検出した。

2-2. 検討結果

1) HPLC クロマトグラム

DPS-Cl により誘導体化された Hyp、Pro 及び IS に基づくピークは、グラジエント溶出法による逆相系 HPLC により、試薬ブランク及び他の生体成分に基づくピークと完全に分離し、単一のピークとして溶出した (Fig. 2-1)。なお、標準混液及び血清中の Pro の濃度は Hyp の濃度よりも高いため、Hyp に基づくピークが溶出したのちに感度を下げて Pro 及び IS を検出した。

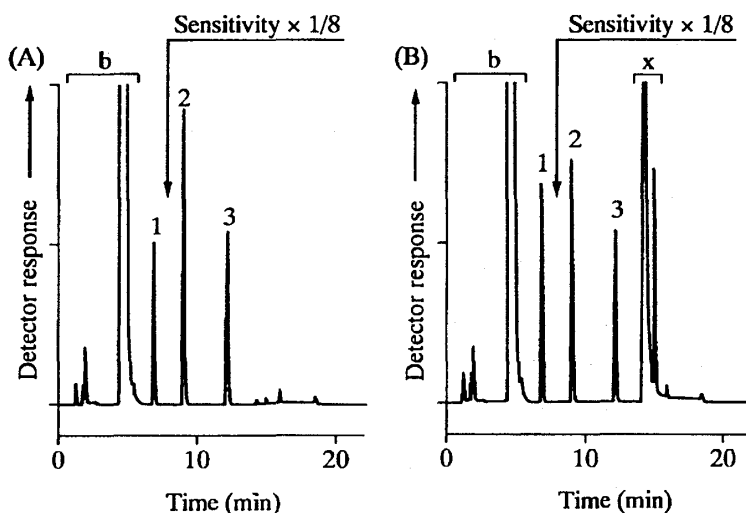


Fig. 2-1. Chromatograms obtained from (A) standard solution and (B) normal human serum. Peaks: 1=Hyp; 2=Pro; 3=IS; b=reagent blank; x=unknown. Concentration: (A) Hyp=10 μ M; Pro=200 μ M; (B) Hyp=13.5 μ M; Pro=164.5 μ M.

2) OPA 処理

血清中には数多くの一級アミノ基を有する化合物が含まれており、これらは DPS-Cl と反応して蛍光誘導体を生成し、Hyp 及び Pro の分析を妨害することが予想される。25 種のアミノ酸存在下、OPA 処理を省いて Hyp 及び Pro の誘導体化反応を行ったところ、クロマトグラムは極めて複雑なものとなった (Fig. 2-2)。しかしながら、誘導体化反応の前に OPA を用いて試料を処理したとき、これら一級アミノ基を有するアミノ酸類に基づくピークは完全に消失し、Hyp 及び Pro が選択的に検出された。

3) 精度、添加回収率及び検量線

本法の精度について、健常人及び慢性腎不全患者の血清を用いて検討したところ、日内変

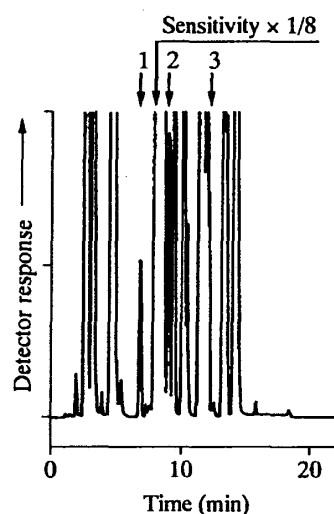


Fig. 2-2. Chromatogram obtained from standard solution containing 25 amino acids (500 μ M each) according to the procedure without OPA treatment. Peaks: 1=Hyp; 2=Pro; 3=IS. Concentration: Hyp=10 μ M; Pro=200 μ M.

動 (n=10) 及び日差変動 (n=5) の相対標準偏差 (R.S.D.) はいずれにおいても 3.25% 以下であり、良好な再現性が得られた (Table 2-1)。

Table 2-1. Precision of determination of free Hyp and Pro in human serum.

			Within-day ^a (n=10)	Day-to-day ^b (n=5)
<i>Normal serum</i>				
Serum 1	Hyp	Mean±S.D. (μM)	5.4±0.09	5.4±0.12
		R.S.D. ^c (%)	1.67	2.22
	Pro	Mean±S.D. (μM)	182.9±2.68	185.2±4.75
		R.S.D. ^c (%)	1.47	2.56
Serum 2	Hyp	Mean±S.D. (μM)	13.0±0.17	13.1±0.36
		R.S.D. ^c (%)	1.31	2.75
	Pro	Mean±S.D. (μM)	177.7±3.13	176.2±5.73
		R.S.D. ^c (%)	1.76	3.25
<i>Chronic renal failure serum</i>				
	Hyp	Mean±S.D. (μM)	25.9±0.56	25.7±0.65
		R.S.D. ^c (%)	1.41	2.61
	Pro	Mean±S.D. (μM)	357.3±8.21	359.9±8.54
		R.S.D. ^c (%)	2.30	2.37

^a Within-day precision tested on ten replicate in one day.

^b Day-to-day precision tested on five different days.

^c R.S.D.=relative standard deviation.

本法における添加回収試験について、血清に異なる 2 種類の量の Hyp 及び Pro を添加して検討したところ、添加回収率はいずれにおいても 96.9% 以上であり、ほぼ完全に回収されていることがわかった (Table 2-2)。

Hyp 及び Pro の標準混液 (各 0.1 μ M~1 mM) を用いて検量線を作成したところ、Hyp 及び Pro の濃度とこれらの IS に対するピーク面積比とは比例し、ほぼ原点を通る直線を示

Table 2-2. Recovery of Hyp and Pro added to serum.

Hyp			Pro		
Content (μM)	Added ^a (pmol)	Recovery (Mean \pm S.D., n=3, %)	Content (μM)	Added ^a (nmol)	Recovery (Mean \pm S.D., n=3, %)
13.9	50	96.9 \pm 3.44	185.7	1.5	99.1 \pm 0.72
	200	98.0 \pm 0.10		3.0	98.6 \pm 2.03

^a Various amounts of standard were added to serum (10 μl).

した。なお、相関係数はいずれにおいても 0.9999 であった。

4) 血清中遊離型 Hyp 及び Pro の測定

本法を用いて健常人 13 名の血清について遊離型 Hyp 及び Pro を測定したところ、その濃度はそれぞれ 9.5 ± 3.58 及び $200.7 \pm 33.26 \mu\text{M}$ であった。これらの値はすでに報告されている値^{24,39,44,45)} とほぼ一致している。慢性腎不全患者 5 名の血清についても測定したところ、Hyp 及び Pro の濃度はそれぞれ 24.0 ± 6.53 及び $328.1 \pm 106.09 \mu\text{M}$ であった。また、慢性腎不全患者血清及び健常人血清中の Hyp 及び Pro の濃度の平均値を比較した場合、慢性腎不全患者では検体数が少ないものの健常人に比べそれぞれ約 2.6 及び 1.6 倍高い値を示した。

以上のことから、本法は試料量が少量 (10 μl) で簡便な操作により高感度に精度良く選択的に血清中遊離型 Hyp 及び Pro を測定でき、臨床的利用や生化学的研究に有用であると考えられる。

3. 血清及び尿中総Hyp及びProの高感度蛍光プレラベルHPLC分析

Hyp 及び Pro は血清 (又は血漿) 及び尿中に遊離型、ペプチド型及びタンパク型として存在し、これらを総計した Total (総) の Hyp 及び Pro の同時分析法として GC^{39,46)} 及び HPLC⁴⁵⁾ 法が報告されている。このうち GC 法は、血漿³⁹⁾ 及び尿⁴⁶⁾ 試料に応用されているが、煩雑な操作法を必要とする。一方、HPLC 法は、尿中の Hyp 及び Pro を蛍光誘導体に導いたのち HPLC で分析しているが、定量のための検討が十分にされておらず、血清への応用はされていない。

そこで、DPS-Cl を用いて、血清及び尿中総 Hyp 及び Pro を蛍光誘導体に導き逆相系 HPLC で分離分析する高感度で精度の高い蛍光プレラベル HPLC 同時分析法を確立するための検討を行った。また、本法を用いて健常人及び慢性腎不全患者の血清及び尿中総 Hyp 及び Pro の定量を行った。

3-1. 定量操作法及び HPLC 条件

1) 定量操作

血清又は尿 (10 μ l) に IS としてニペコチン酸 (血清の分析では 2 mM 又は尿の分析では 50 μ M, 各 100 μ l) 及び濃塩酸 (100 μ l) を順次加え、120℃で 16 時間加水分解を行ったのち、炭酸ナトリウム (2 M, 300 μ l) を加えて中和する。この中和液の一部 (100 μ l) を試験管に入れ、ホウ酸塩緩衝液 (0.1 M, pH 8.5, 300 μ l) 及び OPA [4% w/v アセトニトリル-ホウ酸塩緩衝液 (1/1, v/v) 溶液, 100 μ l] を順次加える。室温で 3 分間放置したのち、OPA 処理液の一部 (200 μ l) を Bond Elut C18 カラム (100 mg/1 ml, Varian) に注入し、ホウ酸塩緩衝液 (0.1 M, pH 8.5, 400 μ l) で 2 回溶出し、素通り液及び溶出液を混合する。この液の一部 (300 μ l) に DPS-Cl (1.2 mM アセトン溶液, 500 μ l) を加え、30℃で 10 分間誘導体化反応を行う。反応終了後、ジクロロメタン (800 μ l) を加えて攪拌・遠心分離する。この水層 10 μ l を HPLC に注入する。

2) HPLC 条件

カラムとして Nova-Pak C18 (3.9×150mm, i.d., 4 μ m, Waters) を 25℃で用い、(A) リン酸塩緩衝液 (1 mM, pH 7.0) - (B) アセトニトリルのグラジエント溶出法で分析した。グラジエントプログラムとして、12→20% B へのリニアグラジエントを 15 分間で行い、続いてステップワイズにより 80% B として 5 分間カラムを洗浄したのち、さらにステップワイズにより 12% B として 5 分間流しカラムの平衡化を行った。流速は 1 ml/min とし、励起側 315 nm 及び蛍光側 385 nm における蛍光を検出した。

3-2. 検討結果

1) HPLC クロマトグラム

濃度の異なる 2 種類の Hyp 及び Pro の標準混液、血清及び尿を用いて上記の定量操作を行って得られた HPLC クロマトグラムを Fig. 3-1 に示した。Hyp、Pro 及び IS に基づくピークは、グラジエント溶出法による逆相系 HPLC により、試薬ブランク及びその他の血清又は尿成分に基づくピークと完全に分離した。血清及び尿の分析に用いる IS は、血清と尿中の総 Pro の濃度が異なるために、それぞれ 2 mM 及び 50 μ M の濃度を用いた。なお、血清の加水分解液中の総 Pro の濃度は総 Hyp の濃度よりも高いため、Hyp に基づくピークが溶出したのちに感度を下げて Pro 及び IS を検出した。

2) 血清及び尿の前処理 (Bond Elut C18 カラム)

血清及び尿の加水分解液を OPA で処理すると、液が著しく呈色し、分析カラムの劣化や HPLC 分離の乱れが懸念されたので、この呈色物質を Bond Elut C18 カラムにより除去す

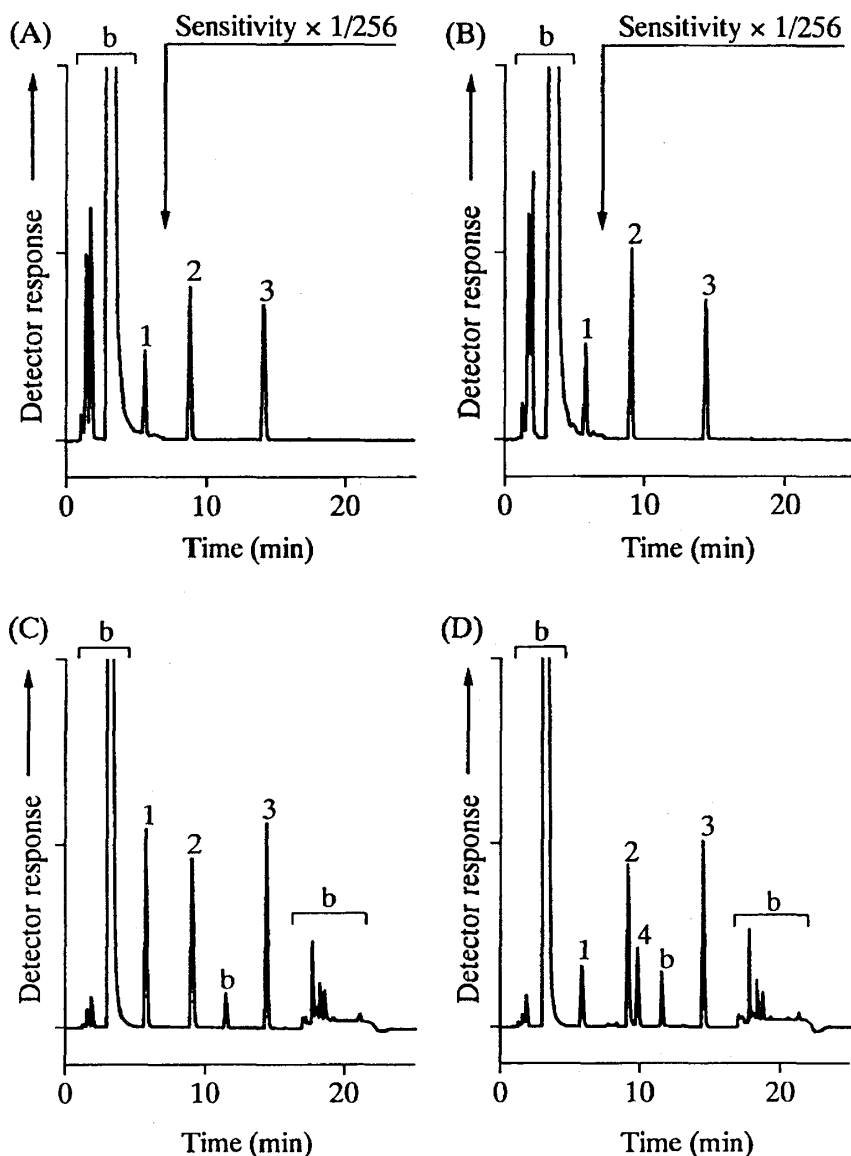


Fig. 3-1. Chromatograms obtained from (A) standard solution and (B) normal human serum according to the procedure for serum analysis and (C) standard solution and (D) normal human urine according to the procedure for urine analysis. Peaks: 1=Hyp; 2=Pro; 3=IS; b=reagent blank. Concentration: (A) Hyp=40 μ M; Pro=30 mM; (B) Hyp=42.3 μ M; Pro=35.7 mM; (C) Hyp=500 μ M; Pro=500 μ M; (D) Hyp=165.7 μ M; Pro=458.5 μ M.

ることとし、Bond Elut C18 カラムからの Hyp、Pro 及び IS の回収について検討した。OPA 処理液を Bond Elut C18 カラムに注入し、続いてホウ酸塩緩衝液で順次溶出させたところ、Hyp、Pro 及び IS はいずれもフラクション 1~4 でほぼ完全に回収されていることがわかった (Fig. 3-2)。このときの Bond Elut C18 カラムからの Hyp、Pro 及び IS の回収率は 98.3~99.9%であった。なお、呈色物質は Bond Elut C18 カラムに完全に保持され溶出されなかった。

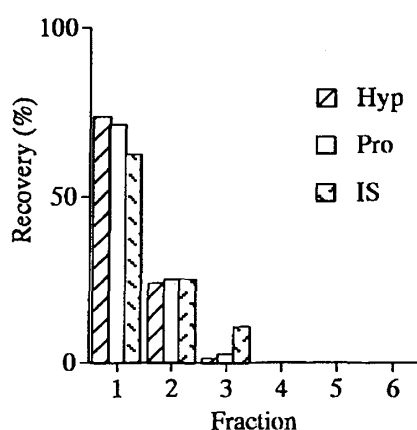


Fig. 3-2. Recoveries of Hyp, Pro and IS (0.39 nmol each) from Bond Elut C18. Fractions: 1=Effluent of OPA treated sample passed through the column; 2-6=Fractions obtained by elution with borate buffer (0.1 M, pH 8.5, 200 μ l each).

3) 精度、添加回収率及び検量線

本法の精度について、健常人の血清及び尿を用いて検討したところ、日内変動 (n=10) 及び日差変動 (n=5) の相対標準偏差 (R.S.D.) は血清及び尿のいずれの分析においても 3.19% 以下であり、良好な再現性が得られた (Table 3-1)。

Table 3-1. Precision of determination of total Hyp and Pro in human serum and urine.

			Within-day ^a (n=10)	Day-to-day ^b (n=5)
Serum	Hyp	Mean \pm S.D. (μ M)	40.1 \pm 1.28	40.9 \pm 0.89
		R.S.D. ^c (%)	3.19	2.18
	Pro	Mean \pm S.D. (mM)	28.1 \pm 0.35	27.9 \pm 0.51
		R.S.D. ^c (%)	1.25	1.83
Urine	Hyp	Mean \pm S.D. (μ M)	198.3 \pm 2.79	197.0 \pm 5.14
		R.S.D. ^c (%)	1.41	2.61
	Pro	Mean \pm S.D. (μ M)	449.2 \pm 7.92	447.3 \pm 10.37
		R.S.D. ^c (%)	1.76	2.32

^a Within-day precision tested on ten replicate in one day.

^b Day-to-day precision tested on five different days.

^c R.S.D.=relative standard deviation.

本法における添加回収試験について、血清及び尿にそれぞれ異なる 3 種類の量の Hyp 及び Pro を添加して検討したところ、血清及び尿のいずれの分析においても Hyp 及び Pro の添加回収率は 97.7% 以上であり、ほぼ完全に回収されていることがわかった (Table 3-2)。

Table 3-2. Recovery of Hyp and Pro added to serum and urine.

	Hyp			Pro		
	Content	Added ^a	Recovery (n=2)	Content	Added ^a	Recovery (n=2)
Serum	μ M	(nmol)	(%)	mM	(nmol)	(%)
		0.2	101.3		100	97.7
		0.5	100.7		250	98.4
		1.0	98.6		500	98.6
Urine	μ M	(nmol)	(%)	μ M	(nmol)	(%)
		1.0	98.0		2.0	100.2
		2.0	99.3		4.0	101.8
		4.0	103.3		8.0	103.2

^a Various amounts of standard were added to serum (10 μ l) and urine (10 μ l).

Hyp 及び Pro の標準混液 (各 $10\ \mu\text{M}$ ~ $100\ \text{mM}$) を用いて検量線を作成したところ、血清及び尿のいずれの分析においても Hyp 及び Pro の濃度とこれらの IS に対するピーク面積比とは比例し、ほぼ原点を通る直線を示した。なお、相関係数はいずれにおいても 0.9995 以上であった。

4) 血清及び尿中総 Hyp 及び Pro の測定

本法を用いて健常人の血清及び尿について総 Hyp 及び Pro を測定したところ、その濃度は、血清中でそれぞれ $36.6 \pm 4.8\ \mu\text{M}$ 及び $29.6 \pm 1.7\ \text{mM}$ 、尿中でそれぞれ 175 ± 54 及び $426 \pm 52\ \text{nmol/mg Creatinine}$ であった。これらの値はすでに報告されている値^{7,15,24,44,46)} とほぼ一致している。

また、慢性腎不全患者 4 名の血清及び尿についても総 Hyp 及び Pro を測定したところ、その濃度は、血清中でそれぞれ $61.4 \pm 7.3\ \mu\text{M}$ 及び $27.9 \pm 1.7\ \text{mM}$ 、尿中でそれぞれ 140 ± 17 及び $3744 \pm 2628\ \text{nmol/mg Creatinine}$ であった。慢性腎不全患者の検体数は少ないが、慢性腎不全患者と健常人の血清及び尿中の総 Hyp 及び Pro の濃度の平均値を比較した。血清については、慢性腎不全患者の総 Hyp の濃度は健常人に比べ約 1.6 倍高い値を示したが、総 Pro の濃度は両者の間に差は認められなかった。尿については、慢性腎不全患者の総 Hyp の濃度は健常人に比べわずかに低い値を示したが、総 Pro の濃度では著しく高い値を示した。

以上のことから、本法は試料量が少量 ($10\ \mu\text{l}$) で高感度に精度良く血清及び尿中総 Hyp 及び Pro を選択的に測定でき、臨床的利用及び生化学的研究に有用であると考えられる。

4. 尿中プロリルジペプチド類、Pro 及び Hyp の高感度蛍光プレラベル HPLC 分析

尿中の Hyp 及び Pro は遊離型及びペプチド型として存在する。尿中の Hyp 又は Pro を含有するジペプチド類の測定法としては GC-MS^{26-28,47)}、LC-MS^{48,49)} がこれまでに開発されている。しかしながら、これらの方法は煩雑な前処理操作を必要とし、感度も不十分である。また、これらの GC-MS 及び LC-MS 法では Hyp 及び Pro は分析されていない。尿中のプロリルジペプチド類及び遊離型 Pro 及び Hyp の同時分析法としては蛍光プレラベル HPLC 法⁵⁰⁾ が唯一報告されている。しかしながら、この方法では微量のプロリルジペプチド類、Pro 及び Hyp を測定するためには感度が不十分であり多量の試料 (5 ml) を必要とする。

そこで、第 1 章において開発した DMS-Cl を用いて、尿中のプロリルジペプチド類及び遊離型 Pro 及び Hyp を蛍光誘導体に導き逆相系 HPLC で分離分析する高感度で精度の高い蛍光プレラベル HPLC 同時分析法を確立するための検討を行った。本法を用いて健常人の

尿中のプロリルジペプチド類及び遊離型 Pro 及び Hyp の定量を行い、さらに多発性骨髄腫及び骨転移癌患者尿についても分析した。

4-1. 実験

1) 誘導体化操作

プロリルジペプチド類、Pro、Hyp 及び IS として 3,4-デヒドロ-DL-プロリンを含む標準混液 (20 μ l) にリン酸水素二ナトリウム (50 mM, pH 約 9.3, 280 μ l) 及び DMS-Cl (2 mM アセトン溶液, 500 μ l) を順次加え、70℃で 20 分間誘導体化反応を行う。反応終了後、ジクロロメタン (800 μ l) 及び炭酸ナトリウム (0.1 M, 30 μ l) を加えて攪拌・遠心分離する。この水層 10 μ l を HPLC に注入する。

2) 尿中のプロリルジペプチド類、Pro 及び Hyp の定量操作

(i) Method A (推奨法): 固相抽出法

尿 (25 μ l) に IS (10 μ M, 25 μ l) 及びリン酸水素二ナトリウム (50 mM, 150 μ l) 及び OPA [4% w/v アセトニトリル-リン酸水素二ナトリウム (1/1, v/v) 溶液, 50 μ l] を順次加える。室温で 3 分間放置したのち、OPA 処理液の一部 (200 μ l) を Bond Elut C18 カラム (100 mg/1 ml, Varian) に注入し、アセトニトリル-リン酸水素二ナトリウム (50 mM) (1/9, v/v) 溶液 (800 μ l) で溶出し、素通り液及び溶出液を混合する。この液の一部 (300 μ l) に DMS-Cl (2 mM アセトン溶液, 500 μ l) を順次加え、70℃で 20 分間誘導体化反応を行う。反応終了後、ジクロロメタン (800 μ l) 及び炭酸ナトリウム (0.1 M, 30 μ l) を加えて攪拌・遠心分離する。この水層 10 μ l を HPLC に注入する。

(ii) Method B: 溶媒抽出-逆抽出法

尿 (20 μ l) に IS (10 μ M, 20 μ l) 及びリン酸水素二ナトリウム (50 mM, 260 μ l) 及び OPA [4% w/v アセトン溶液, 50 μ l] を順次加える。室温で 3 分間放置したのち、DMS-Cl (2 mM アセトン溶液, 450 μ l) を加え、70℃で 20 分間誘導体化反応を行う。反応終了後、塩酸 (5 M, 50 μ l) 及び塩化ナトリウム (約 150 mg) を加えたのち、ジクロロメタン (1 ml) を加えて攪拌・遠心分離する。有機層 (1 ml) に炭酸ナトリウム (10 mM, 300 μ l) を加えて攪拌・遠心分離する。この水層 10 μ l を HPLC に注入する。

3) HPLC 条件

カラムとしては、Nova-Pak C18 (3.9×150mm, i.d., 4 μ m, Waters) を 2 本直列に接続したものを 55℃で用い、(A) 酢酸水溶液 (10 mM) - (B) アセトニトリル-酢酸水溶液 (50 mM) (8/2, v/v) のグラジエント溶出法で分析した。グラジエントプログラムとしては、25

% B のイソクラティック溶出を 20 分間、続いて 25→55% B へのリニアグラジエント溶出を 30 分間行い、その後ステップワイズにより 25% B として 10 分間送液しカラムの平衡化を行った。流速は 1 ml/min とし、励起側 318 nm 及び蛍光側 392 nm における蛍光を検出した。

4-2. 検討結果

1) 標準液による検討

DMS-Cl によるプロリルジペプチド類の誘導体化反応条件及び HPLC 分離について、標準混液 (各 10 μ M) を用いて検討した。

(i) HPLC クロマトグラム

DMS-Cl は塩基性下プロリルジペプチド類と反応し、強い蛍光を発する誘導体を生成した (Fig. 4-1)。上記の誘導体化操作で得られる反応液の HPLC クロマトグラムを Fig. 4-2 に示した。プロリルジペプチド類、Pro、Hyp 及び IS に基づくピークの分離は溶離液の pH に影響され、溶離液の pH の上昇とともに試薬ブランク以外の全てのピークの保持時間は短くなり、pH 4 以上ではほとんどのピークは分離せずに互いに重なった。溶離液として酢酸水溶液 (10 mM, 約 pH 3.4) を用いることにより 12 種類のプロリルジペプチド類、Pro、Hyp 及び IS は良好に分離された (Fig. 4-3)。プロリルジペプチド類の検出限界は 1~5 fmol/injection (S/N=3) であった。

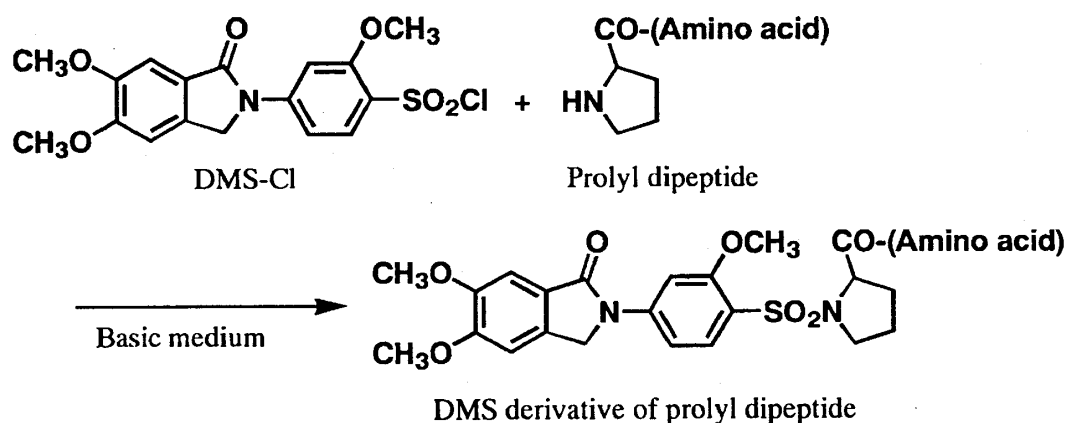


Fig. 4-1. Labeling reaction of prolyl dipeptide with DMS-Cl.

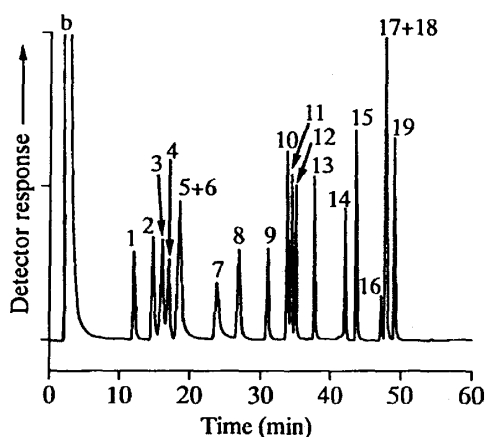


Fig. 4-2. Chromatogram obtained from standard solution of prolyl dipeptides, Pro, Hyp and IS ($10 \mu\text{M}$ each) labeled with DMS-Cl according to the derivatization procedure. Peaks: 1=Hyp; 2=Pro-Asn; 3=Pro-Gln; 4=Pro-Hyp; 5=Pro-Asp; 6=Pro-Ser; 7=Pro-Glu; 8=Pro-Gly; 9=IS; 10=Pro-Ala; 11=Pro; 12=Pro-Pro; 13=Pro-Tyr; 14=Pro-Met; 15=Pro-Val; 16=Pro-Trp; 17=Pro-Ile; 18=Pro-Leu; 19=Pro-Phe; b=reagent blank.

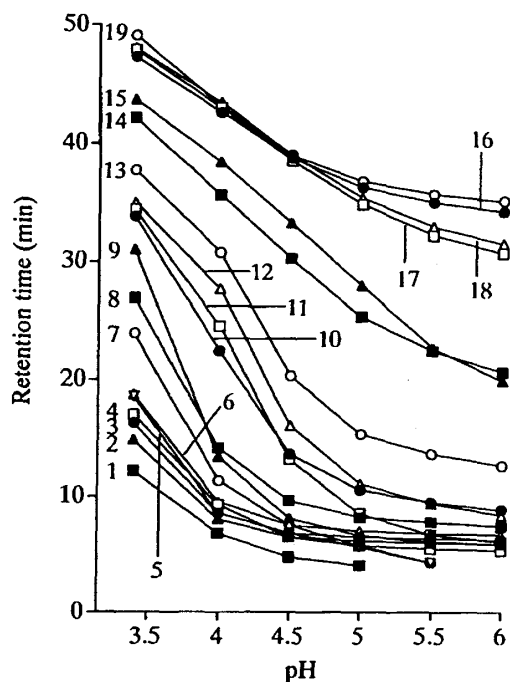


Fig. 4-3. Effect of pH of acetate buffer in the mobile phase on the retention times of the peaks due to prolyl dipeptides, Pro, Hyp and IS. Legend numbers are as in Fig. 4-2.

(ii) 誘導体化反応条件

DMS-Cl によるプロリルジペプチド類の誘導体化反応は、pH 8~10 の範囲で 70°C 、10 分以上で完了した (Fig. 4-4 及び Fig. 4-5)。なお、炭酸ナトリウムはプロリルジペプチド誘導体の水層への抽出を良くするために添加している。

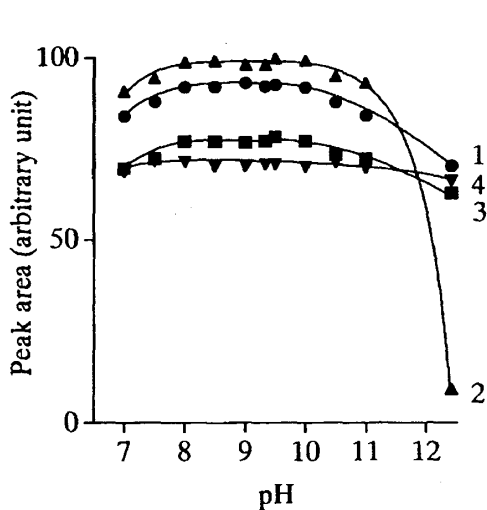


Fig. 4-4. Effect of pH of phosphate buffer (50 mM) on the labeling reactions of Pro-Hyp, Pro-Gly, Pro-Pro and IS with DMS-Cl. Curves: 1=Pro-Hyp; 2=Pro-Gly; 3=Pro-Pro; 4=IS.

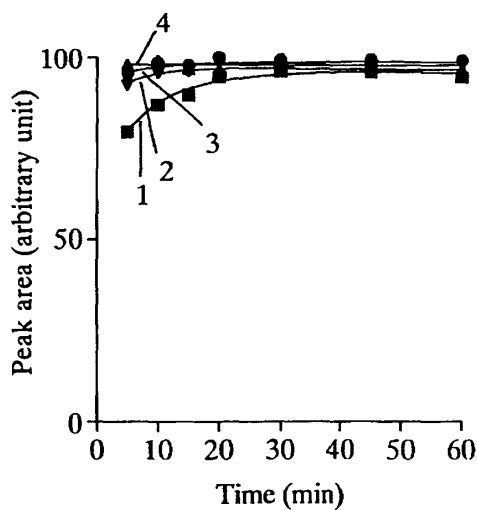


Fig. 4-5. Effect of reaction time and temperature on the labeling reaction of Pro-Hyp with DMS-Cl. Curves: 1= 25°C ; 2= 50°C ; 3= 70°C ; 4= 100°C .

2) 尿中プロリルジペプチド類、Pro 及び Hyp の定量法

本法では尿中にプロリルジペプチド類、Pro 及び Hyp と共存する一級アミノ基を有する化合物を除去するために、OPA 処理を行なっているが、OPA 処理により液が著しく呈色した。この呈色物質を除去するため、定量操作法として Method A (固相抽出法) 及び Method B (溶媒抽出-逆抽出法) の2つの方法について検討した。

(i) HPLC クロマトグラム

標準液及び尿を用いて Method A に従って得られた HPLC クロマトグラムを Fig. 4-6 に示した。Method A に従って尿試料を分析したとき、Pro-Hyp、Pro-Gly、Pro-Pro、Pro 及び Hyp に基づくピークが同定され (Fig. 4-6 (B))、尿中に認められるプロリルジペプチド類、Pro、Hyp 及び IS に基づくピークは試薬ブランク及びその他の尿成分と分離した。標準液を用いて Method A に従って分析する場合、7 種のプロリルジペプチド類 (Pro-Tyr, Pro-Val, Pro-Met, Pro-Trp, Pro-Ile, Pro-Leu 及び Pro-Phe) は Bond Elut C18 カラムに保持されるために測定することができなかった (Fig. 4-6 (A))。一方、Method B に従って標準液を用いて分析する場合、すべてのプロリルジペプチド類が検出されたが、尿中のプロリルジペプチド類として同定されたのは前述の3種のプロリルジペプチド類であり、Method A において測定できない7種のプロリルジペプチド類は尿中に認められなかった。なお、プロリルジペプチド類、Pro、Hyp 及び IS の Bond Elut C18 カラムからの回収率は 96.1~101.1% であった (前述の7種のプロリルジペプチド類は除く)。

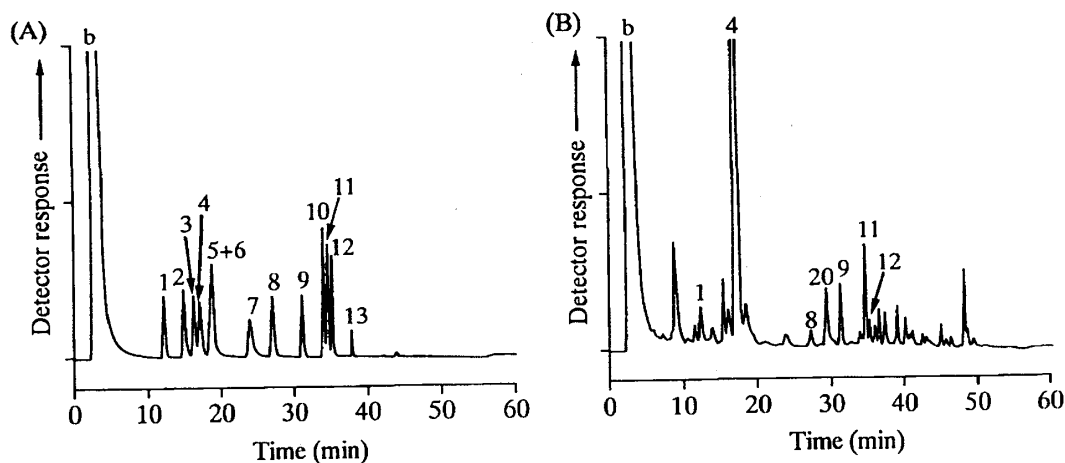


Fig. 4-6. Chromatograms obtained from (A) standard solution and (B) normal human urine according to Method A. Legend numbers except 20 (sarcosine) are as in Fig. 4-2. Concentration: (A) prolyl dipeptides, Pro and Hyp=10 μ M each; (B) Pro-Hyp=179.4 μ M (96.9 nmol/mg Creatinine); Pro-Gly=2.62 μ M (1.42 nmol/mg Creatinine); Pro-Pro=1.93 μ M (1.04 nmol/mg Creatinine); Pro=9.42 μ M (5.09 nmol/mg Creatinine); Hyp=5.47 μ M (2.96 nmol/mg Creatinine).

(ii) 検量線及び添加回収率

Method A 及び Method B における添加回収試験について、3 種類の尿に Pro-Hyp、Pro-Gly、Pro-Pro、Hyp 及び Pro を添加して検討した。Method A 及び Method B のいずれにおいても各測定成分の濃度と各成分の IS に対するピーク面積比とは比例し、ほぼ原点を通る直線を示した。添加回収率を、尿の代わりに水を用いて標準液を添加して得られる回帰直線式の傾きに対する尿に標準液を添加して得られる回帰直線式の傾きの比から求めた。Method A における添加回収率は Pro-Gly (86.6%) 以外は 98.2~102.4% であり (Table 4-1)、Method B における添加回収率は 68.9~116.9% であった。各成分の添加回収率から考えて、尿中プロリルジペプチド類、Pro 及び Hyp の定量には Method A が適していることがわかった。したがって、尿中プロリルジペプチド類、Pro 及び Hyp の定量には Method A を用いることにした。なお、尿中 Pro-Gly の定量値は、さらに 3 種類の尿を用いた追加実験で得られた添加回収率 (85.8, 85.9 及び 86.8%) を含めた平均値 (0.866, n=6) で補正して求めた。

Table 4-1. Slope of regression equation of Pro-Hyp, Pro-Gly, Pro-Pro, Pro and Hyp with and without urine and recovery (according to Method A).

	Urinary concentration (μM)	Slope of regression equation ^a	Recovery (%) ^b (Mean \pm S.D.)
Pro-Hyp	----- ^c	0.1300	
	Urine 1 81.3	0.1317	101.3
	Urine 2 157.6	0.1325	101.9 (102.4 \pm 1.42)
	Urine 3 430.0	0.1352	104.0
Pro-Gly	----- ^c	0.1384	
	Urine 1 3.83	0.1288	93.1
	Urine 2 3.63	0.1162	84.0 (87.1 \pm 5.20)
	Urine 3 3.00	0.1166	84.2
Pro-Pro	----- ^c	0.1069	
	Urine 1 1.29	0.1042	97.5
	Urine 2 2.17	0.1021	95.5 (98.2 \pm 3.06)
	Urine 3 6.59	0.1085	101.5
Pro	----- ^c	0.1135	
	Urine 1 6.08	0.1121	98.8
	Urine 2 10.70	0.1164	102.6 (102.1 \pm 3.13)
	Urine 3 17.10	0.1192	105.0
Hyp	----- ^c	0.1140	
	Urine 1 1.14	0.1135	99.6
	Urine 2 6.28	0.1110	97.4 (99.1 \pm 1.55)
	Urine 3 3.18	0.1145	100.4

^a Concentration of standard solution: Pro-Hyp=25, 50, 100, 250 and 500 μM ; Pro-Gly, Pro-Pro and Hyp=0.5, 1, 2, 5 and 10 μM ; Pro=1, 2, 4, 10 and 20 μM .

Each correlation coefficient (r) of regression equation was above 0.9980.

^b The recovery was obtained from the ratio of slope of a regression equation with urine to that without urine.

^c Distilled water was used instead of urine.

(iii) 精度

本法の精度について、健常人の尿を用いて検討したところ、日内変動 (n=10) 及び日差変動 (n=5) の相対標準偏差 (R.S.D.) はいずれにおいても 5.80% 以下であり、良好な再現性が得られた (Table 4-2)。

Table 4-2. Precision of determination of urinary Pro-Hyp, Pro-Gly, Pro-Pro, Pro and Hyp.

	Mean \pm S.D. (μ M)				
	R.S.D. ^a (%)				
	Pro-Hyp	Pro-Gly	Pro-Pro	Pro	Hyp
Within-day ^b (n=10)					
Urine 1	84.3 \pm 1.7 2.02	4.38 \pm 0.21 4.79	1.29 \pm 0.06 4.65	6.21 \pm 0.21 3.38	1.08 \pm 0.04 3.70
Urine 2	164.3 \pm 3.6 2.19	3.68 \pm 0.17 4.62	2.38 \pm 0.08 3.36	10.10 \pm 0.20 1.98	6.26 \pm 0.17 2.72
Urine 3	440.9 \pm 6.4 1.45	2.98 \pm 0.12 4.03	6.79 \pm 0.12 1.77	16.50 \pm 0.43 2.61	3.08 \pm 0.06 1.95
Day-to-day ^c (n=5)					
Urine 1	83.5 \pm 1.7 2.04	4.14 \pm 0.24 5.80	1.29 \pm 0.04 3.10	6.07 \pm 0.12 1.98	1.07 \pm 0.06 5.61
Urine 2	163.9 \pm 3.6 2.20	3.73 \pm 0.16 4.29	2.33 \pm 0.09 3.36	10.35 \pm 0.34 3.29	6.18 \pm 0.15 2.43
Urine 3	440.9 \pm 7.2 1.66	2.85 \pm 0.13 4.56	6.60 \pm 0.14 2.12	16.84 \pm 0.40 2.38	3.14 \pm 0.08 2.55

^a R.S.D.=relative standard deviation.

^b Within-day precision tested on ten replicate in one day.

^c Day-to-day precision tested on five different days.

(iv) アミノ酸の影響

尿中プロリルジペプチド類、Pro 及び Hyp の定量に及ぼす他のアミノ酸の影響について、25 種のアミノ酸 (各 5 nmol) を尿 (25 μ l) に添加して検討した。本法による Pro-Hyp、Pro-Gly、Pro-Pro、Pro 及び Hyp の定量ではこれらのアミノ酸類による妨害はなかった。

(v) 尿中プロリルジペプチド類、Pro 及び Hyp の測定

本法を用いて、健常人の尿について尿中プロリルジペプチド類、Pro 及び Hyp を測定したところ、健常人尿中の Pro-Hyp、Pro-Gly、Pro-Pro、Pro 及び Hyp の濃度はそれぞれ 97.6 \pm 28.2、2.74 \pm 1.48、2.08 \pm 1.13、6.71 \pm 3.34 及び 2.30 \pm 1.59 nmol/mg Creatinine であった。また、尿中の総 Hyp に対する Pro-Hyp 及び遊離型 Hyp の濃度比を求めたところ、その濃度比はそれぞれ 47.5~64.5% (53.1 \pm 6.7%) 及び 0.4~2.2% (1.3 \pm 0.7%) であった。これらの濃度比の平均値はすでに報告されている値(4,51)とほぼ一致している。

また、多発性骨髄腫患者 1 名及び骨転移癌患者 2 名の尿について分析し、その一例の HPLC クロマトグラムを Fig. 4-7 に示した。これらの患者においては、いずれも健常人と比べ特に Pro-Hyp で高値を示した。

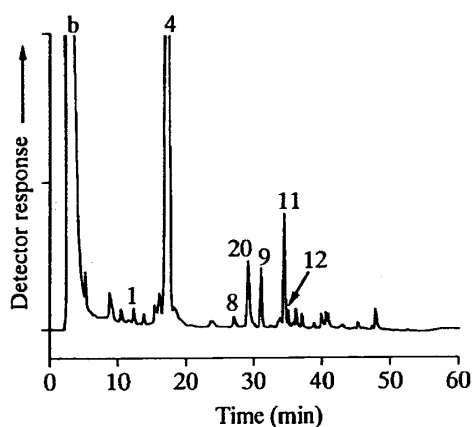


Fig. 4-7. Chromatogram obtained from urine of patient with multiple myeloma according to Method A. Legend numbers except 20 (sarcosine) are as in Fig. 4-2. Concentration: Pro-Hyp=131.3 μ M (224.1 nmol/mg Creatinine); Pro-Gly=1.89 μ M (3.23 nmol/mg Creatinine); Pro-Pro=1.40 μ M (2.39 nmol/mg Creatinine); Pro=11.42 μ M (19.49 nmol/mg Creatinine); Hyp=2.59 μ M (4.42 nmol/mg Creatinine).

以上のことから、本法により尿中プロリルジペプチド類及び遊離型 Pro 及び Hyp が高感度に精度良く選択的に分析されることがわかった。

おわりに

本研究において、アミノ酸類の高感度な蛍光誘導体化試薬として DPS-Cl⁵²⁾ 及び DMS-Cl⁵³⁾ を開発し、これらの試薬を血清及び尿中の Hyp、Pro 及びプロリルジペプチド類の分析へ応用し、必要試料量が少なく選択的で精度の高い高感度な蛍光プレラベル HPLC 分析法を確立した^{52,54-56)}。今後、これらの分析法を用いて、種々の骨疾患について血清及び尿中の Hyp、Pro 及びプロリルジペプチド類の定量を行い、それらの濃度と疾患との関連性を明らかにすることにより種々の疾患の診断や治療経過を診る上で有用な知見が得られるものと思われる。

本総説は、学位論文（井上裕文、福山大学、1999年3月）の要録である。

参考文献

1. Y. Ohkura and M. Kai and H. Nohta, *J. Chromatogr. B*, **659**, 85 (1994).
2. D.J. Prokop, K.I. Kivirkko, L. Tuderman and N.A. Guzman, *N. Engl. J. Med.*, **301**, 18 (1979).
3. R. Smith, *Clin. Sci.*, **59**, 215 (1980).
4. J. Dubovsky, EVA Dubovska, V. Pacovsky and J. Hrba, *Clin. Chim. Acta*, **19**, 387 (1968).
5. L.V. Avioli, C. Scharp and S.J. Birge, *Amer. J. Pharma.*, **217**, 536 (1969).
6. P.C. Kelleher and C.J.P. Smith, *Clin. Lab. Med.*, **2**, 519 (1982).
7. H.B. Niell, C.L. Neely and G.M. Palmieri, *Cancer*, **48**, 783 (1981).
8. A.B. Gasser, D. Depierre and B. Courvoisier, *Br. J. Cancer*, **39**, 280 (1979).
9. M.J. Kontturi, E.A. Sotaniemi and T.K. Larmi, *Scand. J. Nephrol.*, **8**, 91 (1974).
10. M.M.U. Mooppan, H. Kim, J.C. Wang, M.S. Tobin and S.H. Wax, *Prostate*, **4**, 397 (1983).
11. S.C. Hopkins, G.M. Palmieri, H.B. Niell, M. Moinuddin and M.S. Soloway, *Cancer*, **53**, 117 (1984).
12. W.M. O'Brien and J.H. Lynch, *J. Urol.*, **139**, 66 (1988).
13. T.J. Powles, C.L. Leese and P.K. Bondy, *Br. Med. J.*, **2**, 164 (1975).
14. T.J. Powles, G. Rosset, C.L. Leese and P.K. Bondy, *Cancer*, **38**, 2566 (1976).
15. H.B. Niell, C.L. Neely, G.M. Palmieri and M.W. McDonald, *Cancer*, **52**, 1442 (1983).
16. A. Saifer, *Adv. Clin. Chem.*, **14**, 145 (1971).
17. M.C. Bishop and R. Smith, *Clin. Chim. Acta*, **33**, 403 (1971).
18. Z. Varghese, J.F. Moorhead, G.L.V. Tatler, R.A. Baillod and M.R. Wills, *Proc. Eur. Dial. Transplant. Assoc.*, **10**, 189 (1973).
19. Z. Varghese, J.F. Moorhead and M.R. Wills, *Clin. Chim. Acta*, **110**, 105 (1981).
20. J.G. Handdad, Jr., S. Couranz and L.V. Avioli, *J. Clin. Endocr.*, **30**, 282 (1970).
21. B. Nusgens and CH.M. Lapiere, *Clin. Chim. Acta*, **48**, 203 (1973).
22. M. Horowitz, A.G. Need, J.C. Philcox and B.E.C. Nordin, *Am. J. Clin. Nutr.*, **39**, 857 (1984).
23. L. Hyldstrup, P. McNair, G.F. Jensen, H.R. Nielsen and I. Trasbøl, *Calcif. Tissue Int.*, **36**, 639 (1984).
24. H. Nishino, T. Tanaka, K. Shiroishi, S. Sato, Y. Naruse and S. Kagamimori, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **47**, 609 (1991).

25. S.D. vasikaran, E.V. McCloskey, S. Kahn and J.A. Kanis, *Ann. Clin. Biochem.*, **31**, 272 (1994).
26. R.A.W. Johnstone, T.J. Povall, J.D. Baty, J.-L. Pousset, C. Charpentier and A. Lemonnier, *Clin. Chim. Acta*, **52**, 137 (1974).
27. K.F. Faull, G.M. Schier, P. Schlesinger and B. Halpern, *Clin. Chim. Acta*, **70**, 313 (1976).
28. C. Charpentier, R.A.W. Johnstone, A. Lemonnier, I. Myara, M.E. Rose and D. Tuli, *Clin. Chim. Acta*, **138**, 299 (1984).
29. Y. Tsuruta and K. Kohashi, *Anal. Chim. Acta*, **192**, 309 (1987).
30. Y. Tsuruta, H. Tomida and K. Kohashi, *Anal. Sci.*, **4**, 531 (1988).
31. Y. Tsuruta. Y. Date and K. Kohashi, *J. Chromatogr.*, **502**, 178 (1990).
32. Y. Tsuruta. Y. Date and K. Kohashi, *Anal. Sci.*, **7**, 411 (1991).
33. Y. Tsuruta, K. Moritani, Y. Date and K. Kohashi, *Anal. Sci.*, **8**, 393 (1992).
34. Y. Tsuruta, H. Tonogaito, Y. Takata, Y. Date, H. Fujioka, K. Sato and K. Kohashi, *Chem. Pharm. Bull.*, **40**, 1626 (1992).
35. Y. Tsuruta, H. Tonogaito, Y. Date, E. Sugino and K. Kohashi. *Anal. Sci.*, **9**, 311 (1993).
36. Y. Tsuruta, T. Teranishi, Y. Date and K. Kohashi, *J. Chromatogr.*, **617**, 213 (1993).
37. Y. Watanabe and K. Imai, *Anal. Biochem.*, **116**, 471 (1981).
38. Y. Tapuhi, D. E. Schmidt, W. Lindner and B. L. Karger, *Anal. Biochem.*, **115**, 123 (1981).
39. H. Kataoka, K. Nagano and M. Makita, *Biomed. Chromatogr.*, **7**, 296 (1993).
40. M. Roth, *Clin. Chim. Acta*, **83**, 273 (1978).
41. K. Nakazawa, H. Tanaka and M. Arima, *J. Chromatogr.*, **233**, 313 (1982).
42. K. Yaegaki, J. Tonzetich and A S.K. Ng, *J. Chromatogr.*, **356**, 163 (1986).
43. H. Tsuchiya, T. Hayashi, M. Tatsumi, T. Fukita and N. Takagi, *J. Chromatogr.*, **339**, 59 (1985).
44. C.A. Palmerini, C. Fini, A. Floridi, A. Morelli and A. Vedovelli, *J. Chromatogr.*, **339**, 285 (1985).
45. S. Einarsson, *J. Chromatogr.*, **348**, 213 (1985).
46. H. Kataoka, N. Nabeshima, K. Nagano and M. Makita, *Clin. Chim. Acta*, **214**, 13 (1993).
47. J. Jandke and G. Spiteller, *J. Chromatogr.*, **382**, 39 (1986).

48. H. Kodama, H. Nakamura and K. Sugahara, *J. Chromatogr.*, **527**, 279 (1990).
49. H. Kodama and K. Sugahara, *Anal. Chim. Acta*, **352**, 141 (1997).
50. M. Codini, C.A. Palmerini, C. Fini, C. Lucarelli and A. Floridi, *J. Chromatogr.*, **536**, 337 (1991).
51. J.D. Smiley and M. Ziff, *Physiol. Rev.*, **44**, 30 (1964).
52. H. Inoue, K. Moritani, Y. Date, K. Kohashi and Y. Tsuruta, *Analyst*, **120**, 114 (1995).
53. Y. Tsuruta and H. Inoue. *Anal. Biochem.*, **265**, 15(1998).
54. H. Inoue, Y. Date, K. Kohashi, H. Yoshitomi and Y. Tsuruta. *Biol. Pharm. Bull.*, **19**, 163(1996).
55. H. Inoue, K. Kohashi and Y. Tsuruta. *Anal. Chim. Acta*, **365**, 219(1998).
56. H. Inoue, H. Iguchi, A. Kono and Y. Tsuruta. *J. Chromatogr. B*, **724**, 221(1999).