

脂質過酸化アルデヒド類、4-ヒドロキシノネナル及びアクロレインの 蛍光誘導体化 HPLC 定量法の開発と生体試料への応用に関する研究

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科生命薬科学専攻 今里 孝宏

【はじめに】脂質過酸化の原因となる活性酸素は生体内で日常的に生成されているが、健常者では抗酸化機構と過酸化の修復機構が正常かつ効果的に働くため、酸化障害はほとんど顕在化しない。しかし、様々な要因により強い酸化ストレスが生じると、このバランスが崩れ脂質の過酸化が進行する。脂質の過酸化は様々な疾病との関わりが指摘されていることから、生体試料中の脂質過酸化物を定量することにより、症状の進行程度あるいは疾病に罹かるリスクを評価できると期待される。4-ヒドロキシノネナル (4-hydroxynonenal, 4HNE) やアクロレインといった低分子不飽和アルデヒドは脂質過酸化に伴って生成する代表的な化合物であり、脂質過酸化物の中でも疾患との関連性が高いとされている。実際に、関節リウマチ、糖尿病や脳梗塞といった酸化ストレスが関与する疾患の患者において、血中アルデヒド濃度が健常者よりも高い値を示すとの報告がなされている。また、高い反応性を有するアルデヒド類は生体成分と反応してその機能を阻害することにより様々な疾患の原因になると考えられている。このような観点から、アルデヒド類の高感度定量法は疾患の早期発見やリスク評価に有用であると考えられている。

本研究では、4HNE 及びアクロレインを対象として高感度な蛍光誘導体化 HPLC 定量法を開発し、ヒト血清試料へと応用することでその実用性を評価した。さらに、開発した方法を関節リウマチ及び糖尿病患者、健常者から得られた血清試料へと応用し、疾患の発症に伴うアルデヒド濃度の変動の解析を行った。

(1) 血中 4HNE のプレカラム蛍光誘導体化 HPLC 定量法の開発¹⁾

血中の 4HNE の遊離体を直接定量する方法として、蛍光誘導体化試薬 4-(*N,N*-dimethylaminosulfonyl)-7-hydrazino-2,1,3-benzoxadiazole (DBD-H) を用いる HPLC-蛍光定量法の開発を行った。4HNE は DBD-H と反応することにより蛍光誘導体へと変換され、励起波長 460 nm 及び蛍光波長 565 nm の蛍光を発することから高感度に蛍光検出することが可能となる (Fig. 1)。最初に 4HNE 標準溶液を用いて各種誘導体化反応条件がピーク高さに与える影響を調査した結果、DBD-H 濃度は 0.4mM、TFA 濃度は 0.8% 及び反応時間は 20 分を最適値として選択した。

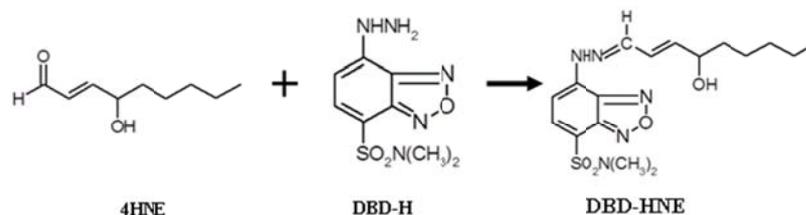


Fig. 1 Fluorescence derivatization reaction of 4HNE with DBD-H

次に、開発した方法をヒト血清中 4HNE の定量へと応用するために、アセトニトリルを用いる除タンパクを前処理法として検討したところ、反応溶液中の水の存在が DBD-H による蛍光誘導体化反応を阻害することが判明した。そこで、sub-zero temperature extraction を適用して血清抽出液から水を可能な限り除去することにより、DBD-H による蛍光誘導体化を進行させて定量することが可能となった。4HNE 標準品を添加したヒト血清試料を用いて添加検量線を作成したところ、0.3-12.5 μM の濃度範囲において血中 4HNE 濃度とピーク高さ比との間に相関係数 $r = 0.999$ の良好な直線関係が得られ、その検出下限 ($S/N = 3$) は 0.06 μM であった。

本法を関節リウマチ患者及び健常者から得られた血清試料中の 4HNE の定量へと応用した。Fig.2 のクロマトグラムに示すように、関節リウマチ患者の血清中から、生体内成分の妨害を受けることなく 4HNE 誘導体を選択的に検出して定量することが可能であった。関節リウマチ患者の血清中 4HNE 濃度 ($n=3$) は 0.56-0.64 μM であり、これまでに報告されている 4HNE 濃度 (0.34 μM) と非常に近い値であった。一方で、健常者の血清からは 0.3 μM 以下の微量の 4HNE が検出された。本研究の検討範囲において、関節リウマチ患者血清中の 4HNE 濃度は健常者のそれと比較して高値を示す傾向が観察されたことから、生体の脂質過酸化と関節リウマチの発症との間に関連性があることが示唆される結果となった。

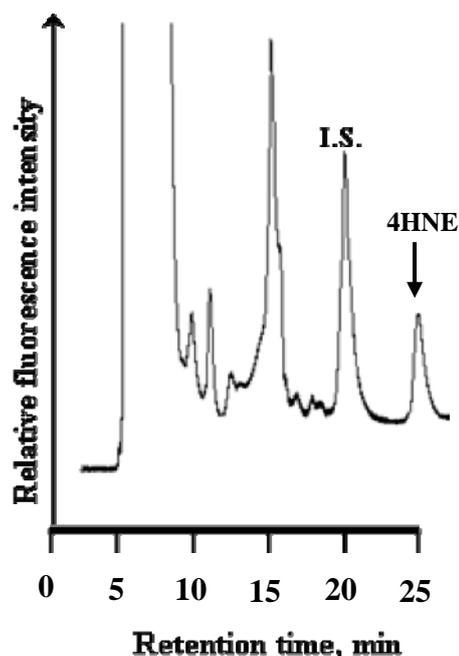


Fig. 2 Chromatogram of 4HNE in serum obtained from a patient with rheumatoid arthritis.

(2) アクロレインの発蛍光誘導体化 HPLC 定量法の開発²⁾

アルデヒドに対する蛍光誘導体化試薬 1,2-diamino-4,5-dimethoxybenzene (DDB) を用いるアクロレインの発蛍光誘導体化 HPLC 定量法の開発を行った。無蛍光性であるアクロレインは同じく無蛍光性の DDB と混合・加熱することにより蛍光性ベンズイミダゾール誘導体へと変換され (Fig. 3)、励起波長 330 nm 及び蛍光波長 415 nm の蛍光を発することが確認された。このため、過剰の DDB に由来する試薬ブランクの影響を受けることなくアクロレインの誘導体ピークを検出可能であった。アクロレイン標準溶液を用いて各種誘導体化反応条件が誘導体のピーク面積に与える影響を調査した結果、DDB 濃度は 1 mM、反応温度及び反応時間はそれぞれ 80 $^{\circ}\text{C}$ 及び 10 分を最適値として選択した。最適条件下でアクロレインの標準溶液を用いて検量線を作成したところ、0.025 - 10 μM の濃度範囲でアクロレイン濃度とピーク面積比との間に良好な直線性が得られ、検出下限 ($S/N=3$) は 10 nM (0.1 pmol/injection) であった。

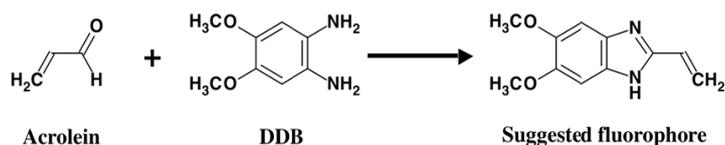


Fig. 3 Fluorescence derivatization reaction of acrolein with DDB.

次に、開発した方法をヒト血清中アクロレインの定量へと応用した。前処理法としてメタノール 390 μL を添加してから遠心分離を行うという単純な除タンパク操作のみで血清中のアクロレインを生体成分の影響を受けることなく良好に定量することが可能であった (Fig. 4)。アクロレイン標準溶液を添加したヒト血清試料を用いて添加検量線を作成したところ、2.0-800 μM の濃度範囲において血中アクロレイン濃度とピーク面積比との間に相関係数 $r=0.999$ の良好な直線関係が得られた。

さらに、本法を糖尿病患者及び健常者の血清試料へと応用し、測定結果を比較した。その結果、糖尿病患者の血清中アクロレイン濃度は健常者のそれと比較して高い値を示した。従って、糖尿病の発症や病態と酸化ストレスに伴う脂質過酸化に何らかの関連性があり、結果として血清中アクロレイン濃度が増加していることが示唆された。

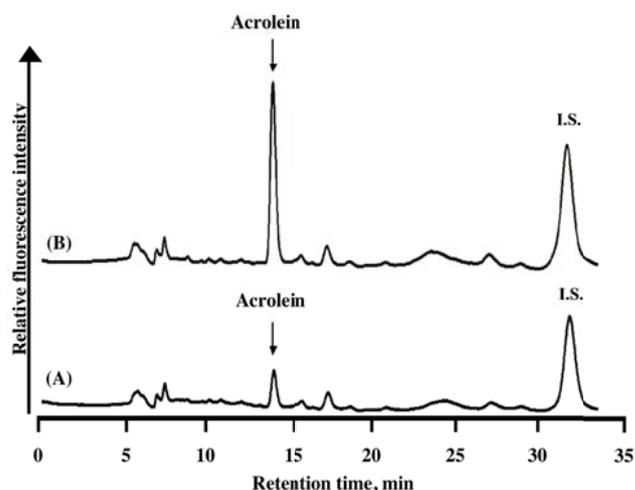


Fig. 4 Chromatograms of (A) an extract from human serum and (B) serum spiked with standard solution of acrolein (80 μM).

【総括】本研究では 4HNE やアクロレインといったアルデヒド類の高感度 HPLC 蛍光定量法を確立し、簡便な前処理操作で血中のアルデヒド類を選択的に定量可能であることを確認した。また、実際に酸化ストレス関連疾患患者の血清中 4HNE 及びアクロレイン濃度は健常者よりも高値を示すことが明らかとされ、疾患患者の体内では酸化ストレスの亢進とそれに伴う脂質過酸化が進展していることを示唆する結果を得た。従って、本研究で開発した定量法は 4HNE やアクロレインといった生体内アルデヒドをバイオマーカーとする疾患の早期診断法の開発やこれらのアルデヒドの疾患発症への関与を調査するためにも有用であると期待される。

【基礎となる学術論文】

1. Imazato T., Shiokawa A., Kurose Y., Katou Y., Kishikawa N., Ohyama K., Ali M.F.B., Ueki Y., Maehata E., Kuroda N., Determination of 4-hydroxy-2-nonenal in serum by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection after pre-column derivatization using 4-(N,N-dimethylaminosulfonyl)-7-hydrazino-2,1,3-benzoxadiazole. *Biomed. Chromatogr.* **28**, 858-61 (2014).
2. Imazato T., Kanematsu M., Kishikawa N., Ohyama K., Hino T., Ueki Y., Maehata E., Kuroda N., Determination of acrolein in serum by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection after pre-column fluorogenic derivatization using 1,2-diamino-4,5-dimethoxybenzene. *Biomed. Chromatogr.* in press (2014).