The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	ガスクロマトグラフィー・マススペクトロメトリーによるヒト血漿中トロンボキサンB2・6-ケトプロスタグランディンF1α微量定量法の開発
Author(s)	松田, 尚雄
Citation	大阪大学, 1984, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/33943
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

【32】

氏名・（本籍）	松田尚雄（まつだ ひさお）
学位の種類	医学博士
学位記番号	第 6412 号
学位授与の日付	昭和59年3月24日
学位授与の要件	医学研究科 内科系専攻 学位規則第5条第1項該当
学位論文題目	ガスクロマトグラフィー・マススペクトロメトリーによるヒト血漿中トロンボキサンB_2・6－ケトプロスタグランディン$F_{1\alpha}$微量定量法の開発
論文審査委員	（主査） 教授 阿部 裕 （副査） 教授 吉田 博 教授 川島 康生

論文内容の要旨

（目　的）

血管壁・血小板機能調節においては，トロンボキサンA_2（TXA_2）・プロスタサイクリン（PGI_2）に代表されるアラキドン酸代謝物質，プロスタノイド（PG）が，制御因子として作動することが指摘され，これらPGの代謝異常が動脈攣縮・血栓塞栓症などの臓器循環障害の病態発生に密接に関連することが示唆されている。事実，冠動脈疾患において，TXA_2産生が亢進し，PGI_2産生が低下することが示された。従って，PGの病態生理学的意義を解明する上で，その生体内動態を正確に把握することが第一義的に重要である。

PGは生体試料中に極めて微量しか存在しないため，ラジオイムノアッセイを用いる場合，抗体特異性に基づく精度に問題点を有する。これに対してガスクロマトグラフィー・マススペクトロメトリー（GC／MS）は，物質の分子構造特性を測定基盤としており，種々の生体成分の混合物中の微量PGの解析に適した方法と考えられる。

しかしながら，従来汎用されてきた，トリメチルシリルエーテル（TMS）誘導体を用いたPGのGC／MS 分析は，生体試料を対象とした場合，感度・精度の点で不充分であった。本研究では，新しい誘導体として三級ブチルジメチルシリルエーテル（t－BDMS）誘導体を選定しPGのGC／MS 定量の最適化を図り，ヒト血漿中トロンボキサンB_2（TXB_2）・6－ケトプロスタグランディン$F_{1\alpha}$（6－keto－$PGF_{1\alpha}$）（各々TXA_2・PGI_2の安定代謝物質）定量を試みた。

（方　法）

1）血液採取：前腕肘静脈より採血後，直ちにポリプロピレン管にて1mM EDTA・0.1mMインド

メサシン処理下に血漿分離し，内部標準として重水素標識TXB_2・6－keto－$PGF_{1\alpha}$を各々5ng／mlplasmaずつ添加した。

2) PGの抽出・精製：Gréen らの方法に準じ，冷アセトン及びn－ヘキサンにて除蛋白・中性脂肪除去の後，塩酸々性（pH3－4）下に酢酸エチルにてPGを抽出した。抽出液を逆相分配系カラム（Sep-Pak C_{18} カートリッジ，Waters Assoc.）に通すことにより脂肪酸を初めとする夾雑物を除去しPGを粗精製した。得られたPG分画を高速液体クロマトグラフィーにて，さらに精製しTXB_2及び6－keto－$PGF_{1\alpha}$が溶出してくる分画を各々採取した。

3) PGの誘導体化：TXB_2はメチルエステル（Me）－t－BDMS誘導体に，6－keto－$PGF_{1\alpha}$はMe－メチルオキシム（MO）－t－BDMS誘導体に各々導いた。メチルエステル化はジアゾメタンにて行い，メチルオキシム化並びにt－BDMS化は，各々*o*－methylhydroxylamine 及び *tert*-butyldimethylchlorosilane と反応させることにより行った。

4) GC／MS測定：ソルベントレス・インジェクターを装着した島津GC－7Aガスクロマトグラフおよび日本電子D－300質量分析計を用いて測定を行った。カラムはSE－30融合シリカ・キャピラリーカラムを用い，カラム槽温度＝270℃，注入部温度＝290℃，キャリヤーガス流量＝2.2 ml・min^{-1}，イオン化電圧＝70eV，イオン化電流＝300 μAの条件下に測定を行った。

（結　果）

1) PG－t－BDMS誘導体の質量スペクトル：TXB_2のMe－t－BDMS誘導体，6－keto－$PGF_{1\alpha}$のMe－MO－t－BDMS誘導体いずれの場合も分子イオンより三級ブチル基の脱離した〔M－57〕$^+$ が基準ピークもしくはそれに準ずる強度を有するイオンとして観察され，対応するTXB_2及び6－keto－$PGF_{1\alpha}$ のTMS誘導体の高質量域に存在するイオンに比して大きな相対強度を有していた。

2) PG－t－BDMS誘導体のガスクロマトグラフィーによる分離および安定性：PGD_2・PGE_2・$PGF_{2\alpha}$・TXB_2・6－keto－$PGF_{1\alpha}$のt－BDMS誘導体はキャピラリーカラムにより良好な分離を示した。又，PGのt－BDMS誘導体の崩壊速度は，TMS誘導体に比して相対的に遅いことが観察され，安定性の点でもTMS誘導体に比して優れていた。

3) TXB_2・6－keto－$PGF_{1\alpha}$の定量性：重水素標識TXB_2・6－keto－$PGF_{1\alpha}$を内部標準とし，t－BDMS誘導体に特徴的なイオンである〔M－57〕$^+$ をモニタリングイオンとして選択的イオンモニタリング（SIM）を行い，検量線を作成した結果，TXB_2・6－keto－$PGF_{1\alpha}$共，1ng以下の範囲で良好な定量性が得られた。

4) ヒト末梢静脈血中TXB_2・6－keto－$PGF_{1\alpha}$の定量：〔M－57〕$^+$ をモニタリングイオンとしてSIMを行うことにより，ヒト末梢静脈血中TXB_2・6－keto－$PGF_{1\alpha}$ を定量した結果，TXB_2＝215±21.7pg／ml，6－keto－$PGF_{1\alpha}$＝182±29.0pg／ml（平均±標準偏差，N＝5）という値を得た。

（考案・総括）

生体試料を対象とする場合，TMS誘導体を用いたGC／MS分析では，共存する多くの夾雑物による妨害を受け易く，微量PGの定量を満たすに充分な感度・精度を有していなかった。これに対して，

本研究にて新たに選定したｔ－ＢＤＭＳ 誘導体は，高質量域に相対強度の大きなイオンを生成し，共存する夾雑物の影響が少ない状況下でＰＧを測定することを可能ならしめ，生体試料を対象とした場合のＰＧ定量に有用と考えられる。又，ＴＭＳ 誘導体に比して安定である点も，ＰＧの分析上有利な点と考えられる。本誘導体を用いることにより，ヒト血漿中TXB_2・６－ketoー$PGF_{1\alpha}$を精度・感度よく定量することが可能となり，さらに本誘導体を用いたＧＣ／ＭＳ分析は未知物質の検定にも応用可能であり，臓器循環の機能診断ひいては臓器循環障害の予防・治療面に資するものと考えられる。

論文の審査結果の要旨

臓器循環障害における血管作動性プロスタノイド（ＰＧ）の病態生理学的意義を明らかにする上で，その生体内動態を把握することが重要である。本研究は，ヒト血漿中ＰＧをガスクロマトグラフィー・マススペクトロメトリーで定量するに際し，血漿試料の分離・精製法に改良を加え，新たな誘導体化を用いることにより，その最適化を図った点に独創性を有する。本法をＰＧカスケード由来の他の生理活性物質の解析に応用することにより循環障害の病態解明への手がかりとなるものと期待される。