

Title	高速液体クロマトグラフィー（HPLC）によるヒト血小板リン脂質の分析
Author(s)	川崎, 富夫
Citation	大阪大学, 1987, 博士論文
Version Type	VoR
URL	<a href="https://doi.org/10.18910/35748">https://doi.org/10.18910/35748</a>
rights	
Note	

*Osaka University Knowledge Archive : OUKA*

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

Osaka University

氏名・(本籍)	川崎富夫
学位の種類	医学博士
学位記番号	第 7502 号
学位授与の日付	昭和 62 年 1 月 7 日
学位授与の要件	学位規則第 5 条第 2 項該当
学位論文題目	高速液体クロマトグラフィー (HPLC) によるヒト血小板リン脂質の分析
論文審査委員	(主査) 教授 森 武貞 (副査) 教授 多田 道彦 教授 田川 邦夫

## 論文内容の要旨

### [目的]

血小板は生理的刺激の受容に引き続き、形態変化、分泌反応、プロスタグランジン合成を行い一次止血血栓形成の主役をなす。この反応の進行に密接に関与するリン脂質代謝の解析には、主として放射性同位元素 (R I) と薄層クロマトグラフィー (T L C) を用いられてきた。しかしながら各脂質分画に取り込まれる R I の量は一定でなく、その結果は必ずしも真の動態を反映していない。そのため、より正確な測定が必要であった。この研究は、H P L C を用いてヒト血小板リン脂質の簡便かつ迅速な分析定量を目指したものである。特に phosphatidyl-inositol (P I) サイクルの重要なリン脂質の 1 つである phosphatidic acid (P A) の分離定量の確立、内部標準物質の選定、さらに H P L C によるヒト血小板リン脂質分析時に出現する unknown peak (P X) の本態を明らかにする目的で以下の実験を行った。

### [方法ならびに成績]

#### 1. H P L C によるリン脂質の分析定量法

カラムは順層系 L S-320<sup>®</sup> (東洋曹達製, 4.0mm I D × 300mm, 粒径 5 ~ 8 μm) を室温で使用し, 流速 1 ml/min, 検出波長 203nm, 検出感度 0.063 A U / F S の条件で分析を行った。溶媒は P I, phosphatidylserine (P S), phosphatidylethanolamine (P E), phosphatidylcholine (P C) の分析には acetonitrile/methanol/85% phosphoric acid (130 : 5 : 1.3 v/v) を使用し, P A の分析には (130 : 5 : 0.006 v/v) の溶媒を使用した。分析は 30 分以内に終了した。

SERDARY 社製のリン脂質キットを標準品として標準曲線を作成した。P A, P I, P S, P E は

10ngより、PCは150ngより定量可能であった。また検討の結果、内部標準物質としてfluoresceinが最も適切なものであることを明らかにした。

## 2. ヒト血小板リン脂質の定量

ヒト洗浄血小板 $500\mu\text{l}$ に〔chloroform/methanol/HCl/fluorescein ( $200\mu\text{g}/\text{ml}$  in methanol) 100:200:2:1 v/v) 2mlを添加, 順次chloroform  $600\mu\text{l}$ を添加混和後有機層を乾固した。methylenedichlorideに溶解後HPLCに注入した。この結果を標準曲線より計算すると、ヒト血小板 $10^9$ あたりPI:  $19.9\pm 2.7$ , PS:  $71.0\pm 9.0$ , PE:  $38.2\pm 5.9$ , PC:  $13.8\pm 20.3$  ( $\mu\text{g}$ , mean  $\pm$  SD)であった。しかしながら使用した標準品はヒト血小板由来でないため、若干の誤差があるものと考えられる。

血小板に刺激剤を添加し一定時間毎に反応を停止, HPLCにて分析を行った結果では, thrombin ( $0.5\text{U}/\text{ml}$ ) 刺激により15秒以内にPIの著明な減少とのPAの増加が観察され, A23187 ( $4\mu\text{M}$ ) 刺激によりPI, PE, PCは減少したがPAの増加は認めなかった。

このHPLCにおける検出方法は主に不飽和二重結合の203nmにおける吸光によるものだが、その変化により少なくともリン脂質の質的变化を捉えることは可能である。

## 3. unknown peak (PX) の解析

ヒト血小板リン脂質の分析中、PC近傍に大きなピークを有する未知物質(PX)の存在が認められた。PXを抽出し中性のTLC〔chloroform/methanol/water (70:35:7 v/v)〕で展開すると2-lysoPEに一致するspotを与えた。逆に2-lysoPEをHPLCにて分析するとPXに一致するピークを与えた。次に、ヒト血小板よりBligh&Dyer(中性)抽出を行い、前述のTLCにて展開分離後、各spotをHPLCにて分析を行った。PEのRfに相当するspotより抽出した検体のみPXのピークが出現した。以上の結果から、PXはPE分画中の一成分がHPLC分析中に分離して出現するピークであり、構造が2-lysoPEに似た脂質であると考えられた。このHPLC溶媒はリン酸を約1%含有しており、PE分画中に存在するalkenyl基を有するPE plasmalogen (PEP)は、この濃度により容易に分解されることを明らかにした。以上の検討より、PXの本態はPEPのグリセロール骨格のC<sub>1</sub>のalkenyl基がHPLC溶媒中のリン酸により分解された1-lysoPEであると結論された。

ヒト血小板中のPEP含量はPE分画の約50%であり、特にアラキドン酸含量も高いことから、203nmにおける吸収が強く、高いピークを与えていると考えられた。また、thrombin ( $1\text{U}/\text{ml}$ ) 刺激5分以内にPXの減少が観察されることから、PEPも他のリン物質と同様、血小板反応に密接に関与していることが示唆される。

### [総括]

- 1) HPLCによるヒト血小板リン脂質の高感度、迅速定量分析法を確立した。
- 2) 未知物質のピークがPE plasmalogenのリン酸による分解産物であり、ピーク面積値より従来分析困難であったPE plasmalogenの分析も可能となった。
- 3) 内部標準物質としてfluoresceinが最も適切であることを明らかにし、これを用いることにより、P

I, PS, PE, PC, PA及びPE plasmalogenの分析定量が可能となった。

### 論文の審査結果の要旨

本研究は、高速液体クロマトグラフィーを血小板リン脂質の動態観察に応用したものである。ラジオアイソトープを薄層クロマトグラフィーを組み合わせた従来の方法では、真のリン脂質動態を観察することは困難であったが、HPLCを用いた本法によって初めてリン脂質の絶対量の測定ができるようになった。とくに、plasmalogen量の解析を可能とした点が高く評価される。