

生体液の HPLC に関する研究

Studies on Body fluid by high-performance liquid chromatography

高井 信治*・妹尾 学*

Nobuharu TAKAI and Manabu SENŌ

生体液を精密に分離分析するための手法として HPLC をとりあげ、まず充てん剤の設計法についてのべ、これを用いて行った HPLC のいくつかの応用例についてのべ、特に癌疾患、人工臓器の設計などに適応できる可能性について解説した。

1. はじめに

1960 年代の末に、HPLC が開発され、過去十数年の間に大きく飛躍し、開発当初から用いられた医薬品などの工程管理や高分子化合物の分子量分布の測定ほか、最近では、原子吸光や ICP のほうが有利と考えられていた無機物質の系統的な分析や、バイオリアクター等の管理にも使用されるようになってきた。

このうち、ここでは生体関連物質、特に生体液に的を絞って、当研究室で開発に成功した HPLC 用充てん剤を中心にしてのべてみたい。

2. HPLC 用充てん剤の設計

HPLC に使用される機能性高分子は、現在多数の種類が知られている。たとえば、スチレン-ジビニルベンゼンの共重合体については、粒子径および孔径を精密に設計したものを、GPC 用充てん剤として、特定の孔径分布(乾燥状態で 250 Å ~ 350 Å) のものは、逆相クロマトグラフィーの充てん剤として繁用している。

その他種々のモノマーから出発したポラスポリマーは、特異的な分離剤として、多くの分野で使われているがこの中で、特に生体関連物質については、親水性モノマーから出発したポラスポリマーと、イオン交換体が良い性能を持っている。親水性モノマーから出発した充てん剤は、分子量の差を利用して分離する GFC として使用され、イオン交換体は極性の差を利用して分離する HPLC に使われる。

ここでは、主に生体液を分離するのに適したイオン交換体の製法についてのべる。

合成高分子から得られる、イオン交換体は、スチレン-ジビニルベンゼン共重合体に官能基を導入したものが最

も一般的であるが、このほかにフェノール系、エポキシ系やアクリル酸系のもも知られている。

生体液については、現在のところ特に基体との親和性について考えなくても良いので、スチレン-ジビニルベンゼン系についての研究例が多くわれわれも同様の研究を行った。

スチレン-ジビニルベンゼンを基体を用いてイオン交換体を設計することについては、現在その製法は確立されている。

すなわち、ジビニルベンゼンの添加量を変化させて、種々の架橋度のイオン交換体が市販されているが、これらのものは、特に生体関連物質を対象とした HPLC については、アミノ酸などの一部を除いて、良い結果が得られていない。

そこで、もう一つの方法、すなわちマクロポラスを有する、スチレン-ジビニルベンゼン系ポラスポリマーに官能基を導入したイオン交換体の開発に着手した。

開発当初ポラスポリマーの製法は、次にのべる三つの方法がすでに知られていた。

- 1) 沈殿溶媒存在下に共重合を行う。
- 2) 同種のポリマーを溶解して共重合を行い後で抽出する。
- 3) 良溶媒存在下に共重合を行って後で除く。

以上の方法で得られたポラスポリマーの機能には、非常に大きな差がみられた。

すなわち、1) 2) 3) の方法で得られたポラスポリマーは、どれも白色のピース状のものであるが、それぞれを、クロマト管に充てんして、同一サンプルでテストすると溶離挙動は、皆異なっている。

そこで、孔径等について調べてみると、孔径分布、孔の形状等がそれぞれ異なっていることが明らかにされた。そして、これらの方法によって得られた、ポラス

* 東京大学生産技術研究所 第 4 部

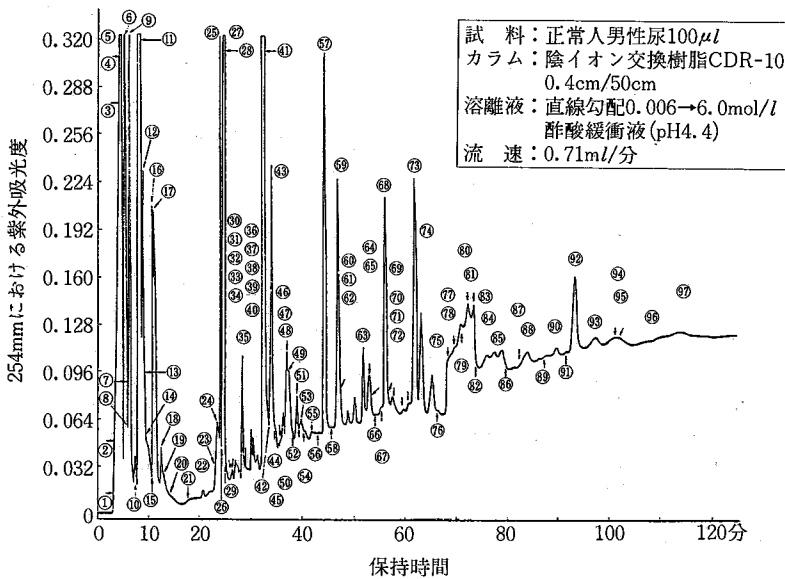


図1 正常人男性尿のクロマトグラム

ポリマーはおののいろいろな性質を持っているが、それらの性質は良い点と悪い点を併せて備えているので、良い性能を強調できるように、前記の方法を適当に組み合わせ設計した。

このようにして得られたのが、CDR-10 (三菱化成)、Hitach Gel 3013-N である。これを用いて尿について行った代表的な分離を図1に示す。

3. 生体液の HPLC

HPLC を使用して、生体液から情報を得ることについては、現在二つのことが知られている。一つは、生体液中に含まれている特定成分を分析する際、混合状態では、誤差が生じたり、検出できない物質について、妨害する物質を分離し、できるだけ正確に情報を得ようとする方法についてである。

このような物質としては、プロスタグランジン、カテコールアミン、各種ステロイドのほか、薬剤の代謝産物もこれに含まれる。

通常の紫外検出器では、 10^{-3} ~ 10^{-6} g 程度の検出感度であるが蛍光法では 10^{-12} g、レーザー蛍光では 10^{-18} g 程度まで感度を上げることが可能で、溶液中の分子を何個という単位で検出できるようになってきている。

このように高感度検出が可能となると、共存する物質によっては、大きな影響を持つこともある。この場合 HPLC は有用な手段として使用されている。

もう一つは、生体中に含まれている物質を情報に変換して、できるだけ多く取り出して、それらの情報を総合的に判断して、一つの結論を得ようとする方法である。

この手法は、できるだけ多くの成分に分離することができれば含まれている物質が必ずしもその時点で明らかにされていないとしても、有用な情報として使用できるメリットがある。

そこで、ここでは主として後者のことがらについてのべてみる。

生体液、特に尿や血清中には、分子量や極性の異なる物質が多数混在し、単純な操作で分離することは並大抵ではない。

しかし、いくつかの分離方法を組み合わせれば、分離能は多少向上するが、操作が複雑になり、長時間を要するので、臨床診断等を目的とする場合には実際的でない。

これらのことがらに対して、多くの先人達の優れた研究が知られており、中でも C. D. Scott¹⁾ は、実用可能な結果を引き出した。

けれども、彼の仕事は、1960年代の末で、多くの可能性を秘めながら、実用化されなかった。この最大の原因は、当時の技術的背景では、時間がかかり過ぎたからである。

その後わが国で、分離能を変化させないで高速化することに成功し、多くの研究者の関心を呼んだ。この最大の原因は、新たに開発されたカラム充填剤が大きく寄与している。

まず最初に行われた仕事は、分離を犠牲にしないで、いかに時間を短縮するかであった。同一の溶離液組成で行った結果、当時24時間を要したものが、一気に2時間で行うことが可能となった。

この時点でこの仕事は大いに内外の研究者の関心を集

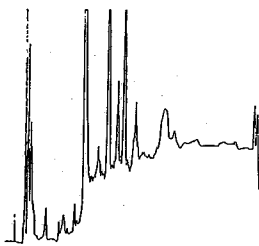
めた。

さらに、臨床に使用する目的で、多少分離は悪くなるが1時間まで短くすることができるようになった。図2に1時間の例を示す。

パターン分析で、疾患を判断しようとするとき、得られた情報をすでに求められている結果と比較する必要がある。

このとき最も大切なのが健常者の情報であるが、これが現在最も遅れている。その理由は、現在の医学で健常であるという判断を行う方法が確立されていないことが原因となっている。

そこで、現在は、比較的健常と思われる人の日内変動、個性差等について、研究が着手され始めた。²⁾結果を図3に示す。



Sample normal Human Urine 35 ♂
 Sample size 100 μ
 Column CDR-10 5 ϕ ×250mm
 Eluent 0→6M AcAm (pH4.4) 60min
 Flow rate 0.8ml/min
 Temp 60°C
 Detector 254nm 0.32AUFS

図2

このチャートは、同一人物の日内変動を示したものである。同一人物でも食事、時期等により大きく変化していることが明らかである。特に食事の影響は著しい。

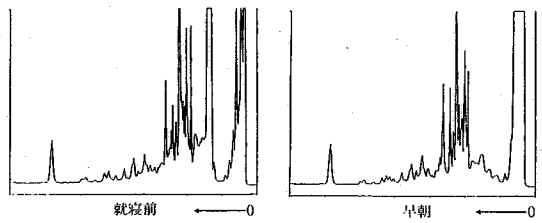


図3-1

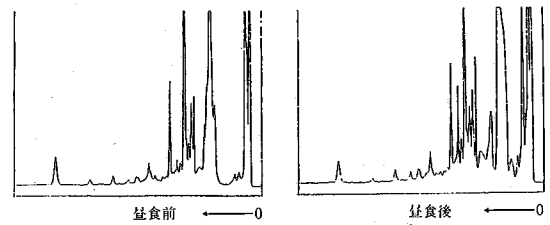


図3-2

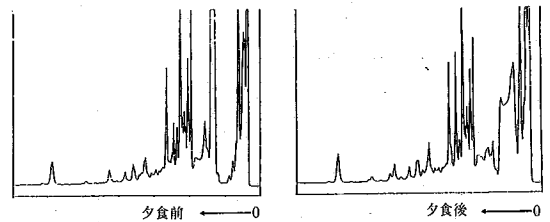


図3-3

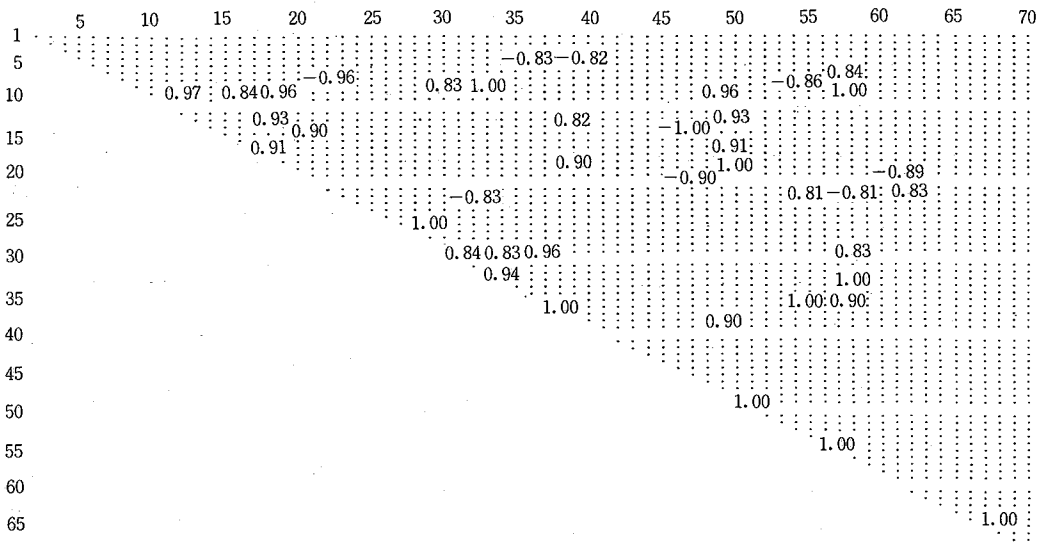


図4 各ピークの間係数

次に、何人かの人について同一の環境のもとで得られた個体差について、検討を行った。得られた結果から各ピークの相関を求めてみると、相関のあるピークと全く相関を持たないピークのあることが分かった。図4に結果を示す。物質名については、明らかにされないものも含むので、ここでは、ピークナンバーのみを示す。

人工腎臓は、すでに腎臓の機能が無くなった場合や、

急性腎不全、および急性薬物中毒などのときに、延命または治療を目的として使用されている。

開発当初は、血中から、水分、塩分および尿毒症に関係ある物質が除去されるだけで、治療効果があると考えられているが、治療期間が長くなるにつれて、生体から除去されない物質や、または生命を保つために必要な物質が除かれたり、不都合なことも、いろいろと明らかに

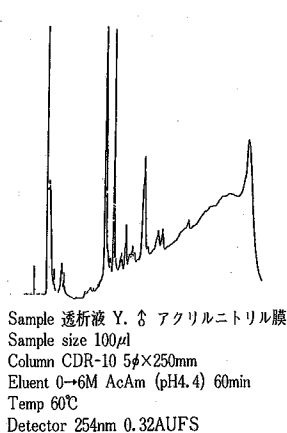


図5-1

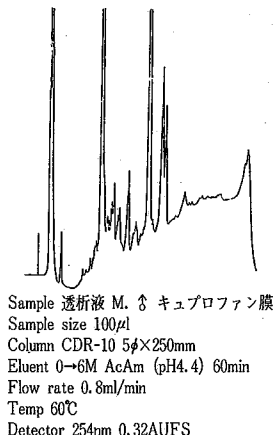


図5-2

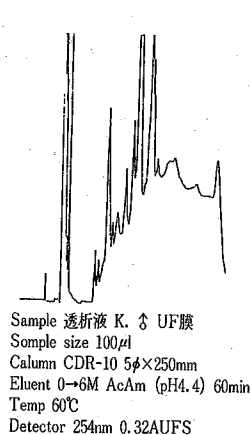
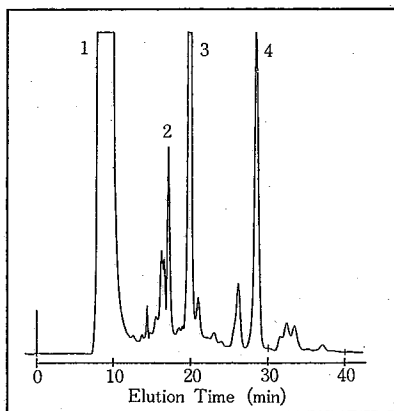
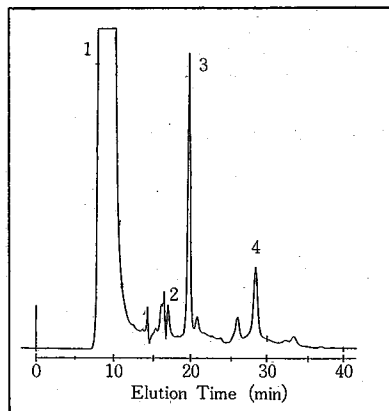


図5-3



- 分析条件
 サンプル：血清(透析前) 20 μ l
 カラム：GS-320
 サイズ：7.6mmID-500mmL
 移動相：0.1Mリン酸ナトリウム
 +0.3M塩化ナトリウム
 (PH=7.0)
 流速：1.0ml/min
 圧力：28kg/cm 2
 温度：30 $^{\circ}$ C
 検出：UV-250nm

図5-4



- 分析条件
 サンプル：血清(透析後) 20 μ l
 カラム：GS-320
 サイズ：7.6mmID-500mmL
 移動相：0.1Mリン酸ナトリウム
 +0.3M塩化ナトリウム
 (PH=7.0)
 流速：1.0ml/min
 圧力：28kg/cm 2
 温度：30 $^{\circ}$ C
 検出：UV-250nm

図5-5

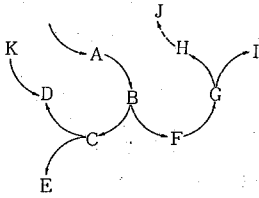


図 6

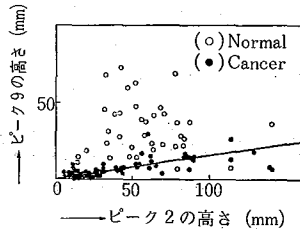


図 7

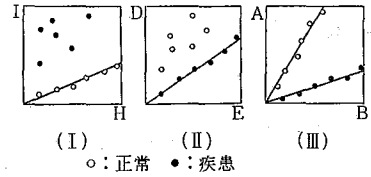


図 8

なってきた。

そこで、かなり以前から、除去したい物質や、残さなければならない物質を明らかにする目的で、HPLCが使用されるようになり、現在有用な手段の一つと考えられている。

われわれも比較的早い時期に、これに着目し、膜を構成する材質の違いや、製膜法、形状などにより、同一の腎疾患患者でも、種々の透過性を示すことを明らかにした。³⁾この結果、膜の開発や治療の指標を求める手段として使用されるようになってきた。図5に例を示す。

さらに、現在では、人工腎臓以外の人工臓器、たとえば人工肝臓、などの開発にも使用され、各種医用材料、たとえば人工血管などの評価にも応用されようとしている。

HPLCによる人工臓器の評価が可能になったので、次に生体液を同様の方法で判断し、疾患と関係づけようとする研究が行われた。

生体液は、尿のほか血清、脊髄液、唾液等について検討され、尿は未処理で、ほかのものは、除蛋白を行ってから HPLCが行われた。

しかし、最近では、蛋白を含んだまま HPLCを行い含まれている蛋白質を測定し、診断をする方法についても検討が行われている。

この研究で、世界的に興味を持たれているのは、癌マーカーの発見ができるのではないかと期待である。癌マーカーは、癌疾患になったとき、癌細胞の代謝物が、生体から排出され、これを捉えることにより癌を早期に発見したり、新たな治療法を開発したりするのに役立つと考えられているのがその理由である。

われわれも、いくつかの癌疾患について検討を行って見たが現在までのところ、確実な癌疾患特有の物質は見出されていない。しかし、全く希望がないわけではなく、得られたデータを適当に情報処理を行うと、多少このことについてみえてくるのが明らかになりつつある。その一例を次に述べる。

クロマトグラムから得られた情報を処理する方法としては、いくつかの方法が知られているが、最もポピュラーな各ピーク値の相関をとる方法について検討を行っ

た。この方法は、もし疾患を判断できることが可能なら、疾患により各ピーク間の比が異なると考えたからである。この理由としては、生体内では、きわめて多数の種類の代謝が行われており、通常健康のときにはこの代謝はほぼ一定のレベルで行われており、次の代謝は、これを受けて行われると考えたからである。

ここでもし、代謝が大きくなるかまたは逆のときには、代謝によってその成分は、通常の場合と異なるはずである。こうなるとこの代謝物を受ける次の代謝も影響を受けるはずである。そして、他の影響を受けていない代謝系と比較することにより、疾患を判断しようとする考え方である。この関係を図6に示す。

またこの関係から得られた、相関プロットを図7に示す。

この相関プロットからは、三種類のことがらが考えられる。

- a) 疾患のある場合のみ相関がある場合
- b) 疾患のない場合のみ相関がある場合
- c) 疾患のあるときも無いときも相関があるが傾斜が異なる場合

これらのことがらを図8に示す。

以上のようなことがらについて検討した結果、いくつかの疾患について、判断できる可能性が得られた。

4. おわりに

以上、HPLCを用いて、生体液等の分離について述べたが、まだ研究の緒についたばかりなので、今後ソフトも含めて、種々の問題について検討を行い、生命現象の解明や、自動診断機を開発を行っていく予定である。

(1985年6月3日受理)

参 考 文 献

- 1) C. D. Scott Clin. Chem. 14(1968)521
K. S. Worren and C. D. Scott. Clin. Chem. 15(1969) 1147
R. L. Jolley and C. D. Scott. Clin. Chem. 16(1970)687
C. D. Scott and N. E. Lee J. Chromatogr 83(1973)383
- 2) 永田ほか：第2回診断クロマトグラフィー p.17(1984)
- 3) 高橋ほか：生産研究 30 122(1978)