

演題名 リハビリテーション患者の運動療法評価に利用可能な血清・尿中成分検索条件の検討 (4)

Ultra Performance Liquid Chromatography を用いた尿および血清中の遊離アミノ酸の測定

氏名 別府秀彦¹、林 宣宏²、岡崎英人³、山口久美子¹、水谷謙明¹、高崎昭彦⁴、園田 茂^{1,3}

所属 藤田保健衛生大¹藤田記念七栗研、²総合医科学研、³七栗サナトリウム ⁴岐阜医療科学大学

【目的】スポーツ医学領域で行われている筋肉関連成分の意義づけと同様に、脳卒中リハ医学運動療法領域に関連する特異的生体成分の検索を研究の目的としている。我々は、運動負荷による骨格筋蛋白分解産物のひとつである 3-Methylhistidine (3-MH) に着目し、血液や尿を検体として用いた測定法を検討している。第 18 回本大会では、HPLC に装着した Zorbax SCX 陽イオン交換カラム (DuPont 社) を用いて、3-MH の分離および定量法を報告した。その知見として、健常者における運動負荷 (ベンチプレス (75%Max) + スクワット 10 回 x 3 回) 30 分後の血中、2 時間後の尿中に負荷前に対し有意な頂値を観察した。その結果を踏まえ、最近開発された、HPLC よりも分析時間が短く、アミノ酸の一斉分離と解析能が高いとされる、Ultra Performance Liquid Chromatography Amino acid analysis (ACQUITY UPLC) systems (Waters 社) を用い、3-MH の測定に加え血中・尿中の遊離アミノ酸を網羅的に測定する条件を検討することとした。今回、運動負荷に連動する特異的遊離アミノ酸を検索する測定条件や特異的アミノ酸の検索を検討した。

【方法】試料は、健常者あるいは回復期リハ訓練患者血液・尿および筋廃用作製マウス血液・尿を用いた。血液は血漿あるいは血清を、冷メタノールあるいはアセトニトリルを 3 倍量で除タンパクし、尿は Ultrafee-MC (0.22 μ m) でろ過後ろ液を試料とした。ついで検体 10 μ L とアミノ酸誘導体化化合物である AccQ・Tag Ultra (N-hydroxysuccinimid 活性化複素環状カルバメート) 20 μ L を混合させ 55°C 10 分間の誘導化を行った。分析用カラムには AccQ-TagTM Ultra 2.1x100mm を用い 55°C の

加温下で、移動相には溶離液 A, BTM を用い分離後、各アミノ酸を 260nm で測定した。

【結果】1) ACQUITY- UPLC systems は 3 年前に販売され、低分子成分からペプチドを高流速耐圧力で高感度高速で分離することが可能である。一方アミノ酸の定量については、AccQ・Tag Ultra を用いるプレカラム誘導体化法で蛍光検出器を用いず安定した分析法とされているが、現在条件の検討が必要とされている段階である。今回まず、Amino Acids Mixture Standard Solution, TypeB を用いて誘導化後分析を行ったところ、ヒスチジン (H) が 2.06 ± 0.1 (分)、3-MH が 2.60 ± 0.2 、1-MH が 3.12 ± 0.2 に分離され、他の 9 種のアミノ酸も良好な分離を示した。また、これらの検出感度を求めたところ、6pg/Inject の検出限界の結果を得た。2) 健常学生の血中遊離アミノ酸のピーク数は、分離時間 8 分間で 54 ± 12.9 (n=10) であった。3) 回復期リハ患者血清中遊離アミノ酸ピーク数は、入院直後で 68.1 ± 10 (n=19)、リハ訓練後の退院直前では 64.2 ± 9 (n=19) であった。更に同患者のピーク数を、入院直後が高い群 (n=11: ピーク数 63.4 ± 9)、退院直前が高い群 (n=7: 66.4 ± 10) に層別し検定を行ったところ、退院直前に有意に (t-test; $P < 0.005$) 差が見られた。また、入退院患者血清中の遊離アミノ酸の増減を観察したところ、数種のアミノ酸が認められたので、MALDI-TOF で解析中である。

【考察】リハ患者へは低侵襲性医療の立場から採血回数、量に制限がある。UPLC 法は 10 μ L で解析が可能である。リハ訓練中の筋肉増減に連動する特異的アミノ酸あるいは低分子の検索に同システムは有用であるかもしれない。