

## ジニトロベンゾイル誘導体を用いた高速液体クロマトグラフィーによるリン脂質分子種の高感度定量分析

林 秀 紀 足 立 英 明

札幌医科大学化学第1講座 (主任 秋野豊明 教授)

片 岡 賢 治 本 田 泰 人

札幌医科大学内科学第3講座 (主任 鈴木 明 教授)

### A Sensitive, Quantitative Analysis of Molecular Species of Phospholipid by High-performance Liquid Chromatography Using Dinitrobenzoyl Derivatives

Hidenori HAYASHI, Hideaki ADACHI

*Department of Biochemistry (Section 1), Sapporo Medical College*  
(Chief : Prof. T. Akino)

Kenji KATAOKA and Yasuhito HONDA

*Department of Internal Medicine (Section 3), Sapporo Medical College*  
(Chief : Prof. A. Suzuki)

A high-performance liquid chromatographic(HPLC) method for quantitative microanalysis of phospholipid molecular species was studied. Diacylglycerols were prepared from phospholipids by phospholipase C treatment and converted to the corresponding dinitrobenzoyl derivatives(DNB-DG), which could be sensitively detected at 254 nm. The DNB-DGs were resolved by HPLC using a reverse column with an isocratic solvent. Peak areas of DNB-DGs prepared from dipalmitoyl and dioleoyl phosphatidylcholines were proportional to the amounts of the derivatives. The quantification could be done at pmole level. The molecular species profiles of phosphatidylcholine of rat lung and liver obtained by the DNB-DG method were almost identical with those determined by DG-acetate RI method reported by Itoh *et al.* These results indicate that the peak areas of DNB-DG obtained at 254 nm are not affected by differences in the structure of molecular species, such as the numbers of the isolated double bond.

This sensitive DNB-DG HPLC method was applied for the microdetermination of molecular species of acidic phospholipids, i. e., phosphatidylglycerol and phosphatidylinositol, in human bronchoalveolar lavage fluids. Their contents in the fluids seemed to change according to the state of alveolar proteinosis. It was found that the molecular species of phosphatidylglycerol and phosphatidylinositol were distinctly different from each other in human bronchoalveolar lavage fluids.

(Received September 4, 1987 and accepted September 27, 1987)

**Key words :** High-performance liquid chromatography, Dipalmitoyl phosphatidylcholine, Phosphatidylglycerol, Phosphatidylinositol, Bronchoalveolar lavage fluid

#### Abbreviation

PC : phosphatidylcholine	DNB-DG : 3, 5-dinitrobenzoyl-diacylglycerol
PG : phosphatidylglycerol	BALF : bronchoalveolar lavage fluid
PI : phosphatidylinositol	RI : refractometry indicator
HPLC : high-performance liquid chromatography	

## 1 緒 言

近年、生体におけるリン脂質の生理活性や物理化学的性質の重要性が明らかにされ始めるとともに、ホスファチジルコリン(PC)、ホスファチジエタノールアミン(PE)、ホスファチジルイノシトール(PI)、ホスファチジルグリセロール(PG)といった極性基によるリン脂質の分類のみならず、その構成脂肪酸に基づく分子種としての検討が必要となってきた。グリセロール脂質はグリセロール骨格の1位と2位に結合する脂肪酸の組み合わせによって多数の分子種が存在する<sup>1,2)</sup>が、各々のリン脂質分子種は特定の合成経路で生成される<sup>1)</sup>ことが示されており、また分子種の単位で生体機能に関与していると考えられる。

リン脂質の分子種は、硝酸銀薄層クロマトグラフィー<sup>3-5)</sup>、カピラリー・ガスクロマトグラフィー<sup>6,7)</sup>、マスキングクロマトグラフィー<sup>8,9)</sup>で分析されてきたが、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)による分子種の分析が(1)高分離能であること、(2)試料の回収が可能であること、(3)迅速であることの理由で広く行われるようになってきている。リン脂質分子種は、逆層カラムを用いたHPLCで非常によく分離するが<sup>10-13)</sup>、種々の不飽和度をもつ分子種を定量的に検出する方法が問題となる。Itoh *et al.*<sup>14)</sup>は、リン脂質をジアシルグリセロールアセテート(DG-acetate)へ導いてHPLCで分離し、示差屈折計(RI)で検出する方法により、飽和、不飽和分子種相互が定量的に検出されることを示した。しかし、RI検出法の欠点は、検出感度がnmoleレベルであること、及び単一溶媒でしか用いられないことであった。最近、1, 2-DGの3位の水酸基に紫外部(UV)吸収物質を化学的に結合した誘導体を作製し、UV検出器により高感度に検出する方法が種々考案されている<sup>15,16)</sup>。この中で、Kito *et al.*<sup>15)</sup>の報告した方法が注目される。彼らは1, 2-DGの3, 5-ジニトロベンゾイル(DNB)誘導体をHPLCで分離し、254 nmで検出する方法を確立、この方法による不飽和分子種の分離と分子種相互間の定量性について検討した。

本研究は、肺に広く存在するジパルミトイル分子種など飽和分子種に着目、Kito *et al.*<sup>15)</sup>が報告したDNB-DGによるHPLC法が飽和、不飽和分子種を高感度かつ定量的に検出し、本法が飽和分子種を含む肺リン脂質分子種の微量分析に有用であることを示した。ついで、極めて微量存在するために、従来、分子種分析がなされなかった例として、ヒト気管支肺洗浄液中のホスファチジルグリセロール(PG)、ホスファチジルイノ

シトール(PI)分子種を本法を用いではじめて分析した。

## 2 実験方法

ウィスター系雄ラット(体重250 g)をエーテル麻醉下に脱血屠殺後直ちに肺、肝を摘出して用いた。正常ヒト気管支肺胞洗浄液(BALF)は、成人男子から採取した。肺胞蛋白症患者のBALFは、岩手県立中央病院呼吸器内科において診断・治療的に採取したものを使用した。1例は、昭和59年2月と昭和60年1月、もう1例は昭和61年6月に採取したBALFを分析した。BALFは採取後直ちに500×g、10分間遠心し、沈渣と上清に分画した。

ホスファチジルコリン(PC)のジパルミトイル(16:0/16:0)(DPPC)、ジオレオイル(18:1/18:1)(DOPC)分子種はSigma社(St. Louis, Mo.), 1, 2-ジ[1-<sup>14</sup>C]オレオイルホスファチジルコリン(114 mCi/mmol)はNew England Nuclear社(Boston, Mass.), 1, 2-ジ[1-<sup>14</sup>C]パルミトイルホスファチジルコリン(120 mCi/mmol)はAmersham International plc. (Buckinghamshire, England), ホスホリパーゼC (*C. perfringens*, type I及び*B. cereus*, type III)はSigma社(St. Louis, Mo.)より購入した。高速液体クロマトグラフィー用溶媒としてアセトニトリル、イソプロパノールは片山化学社より購入した。3, 5-ジニトロベンゾイルクロライドは片山化学社より購入した。薄層板はMerck社(Darmstadt, FRG)のシリカゲル60TLCプレート(20×20 cm, 厚さ0.25 mm)を用いた。

### 2.2 リン脂質から1, 2-ジアシルグリセロール(1, 2-DG)の調製

ラット肺、肝及びヒトBALFの総脂質をBrigh and Dyer法<sup>7)</sup>で抽出した。この総脂質抽出液よりPCを分離するため、シリカゲルG(Merck社)/0.4 M ほう酸(25 g/50 ml)で作製した厚さ0.25 mmの薄層板にリン脂質2 μmoleをスポットし、一次元方向ヘクロホルム/メタノール/水/濃アンモニア(70:30:3:2, v/v)、二次元方向ヘクロホルム/メタノール/水(70:30:5, v/v)の溶媒系<sup>18)</sup>で展開、0.2%フローレクセン・エタノール液を噴霧後、紫外線下で脂質を抽出、PCあるいはPG、PI部分をかき取って、Arvidson法<sup>4)</sup>によりそれぞれのリン脂質を回収した。Okano *et al.*<sup>5)</sup>の方法によりホスホリパーゼC(PCには*C. perfringens*, PG, PIには*B. cereus*由来のものを用いた。)でリン脂質を加水分解し、1, 2-ジアシルグリセロール(1, 2-DG)とした後、シリカゲルG(Merck社)プレートを用い

ヘキサン/エチルエーテル/酢酸 (50:50:1, v/v) で展開, リン脂質の場合と同じように1, 2-DGを検出, 回収した。

### 2.3 1, 2-ジアシルグリセロール-3-アセチルグリセロール (DG-acetate) の調製

1, 2-ジアシルグリセロール-3-アセチルグリセロール (DG-acetate) は, Kuksis *et al.*<sup>3)</sup> の方法により調製した。すなわち1, 2-DGを無水ピリジンに溶解, 無水酢酸を加えて室温, 暗所に一晚放置してアセチル化を行った。ついで溶媒を窒素気流下に蒸発せしめた後, 少量のクロロホルム/メタノール (2:1) に溶解してシリカゲル G TLC プレートにスポットし, ヘキサン/エーテル/ギ酸 (60:20:1.5, v/v) の溶媒で展開, DG-acetate を調製した。

### 2.4 1, 2-ジアシルグリセロールのジニトロベンゾイル誘導体 (DNB-DG) の調製

Kito *et al.*<sup>15)</sup> の方法に準じて, 1, 2-ジアシルグリセロールのジニトロベンゾイル誘導体 (DNB-DG) を調製した。1, 2-DGにデシケーター内でP<sub>2</sub>O<sub>5</sub>存在下30分間乾燥した3, 5-ジニトロベンゾイルクロライド (DNBC) 25 mgを加えた後, 無水ピリジン (0.5 ml) に溶解, 封管中で60°C, 10分間インキュベートした。ついで水 (0.5 ml) を加えて再び60°C, 15分間インキュベートした。これに0.1 N HCl 2 mlを加えn-ヘキサン (1.5 ml) で抽出, ヘキサン層を水で洗浄してピリジンを除去した後, ヘキサン抽出液を窒素気流下に蒸発乾固した。この残渣を再びn-ヘキサン (2.0 ml) に溶解, 0.1 N HCl, 0.1 N NaHCO<sub>3</sub>, 1 N NaCl各2 mlでそれぞれ3回, 1回, 1回洗浄し, このヘキサン層からDNB-DGを得た。[1-<sup>14</sup>C]ジオレオイル・PCより調製した[<sup>14</sup>C]1, 2-DGからDNB-DGの回収は92.4%であった。

### 2.5 ジニトロベンゾイル-[1-<sup>14</sup>C]ジアシルグリセロール (DNB-[<sup>14</sup>C]DG) の調製

[<sup>14</sup>C]DPPC, [<sup>14</sup>C]DOPCに各1 μmoleの未標識DPPC, DOPCを加えて比活性を測定した後, 2.2, 2.4に述べた方法によって, DNB-[<sup>14</sup>C]ジパルミトイル (DP) DG, DNB-[<sup>14</sup>C]ジオレオイル (DO) DGを調製した。比活性はDNB-[<sup>14</sup>C]DPDG, 220×10<sup>4</sup>dpm/μmol, DNB-[<sup>14</sup>C]DODG, 130×10<sup>4</sup>dpm/μmolであった。

### 2.6 高速液体クロマトグラフィーによる DC-acetate, DNB-DG の分離

DG-acetateはItoh *et al.*<sup>14)</sup>の方法, DNB-DGはKito *et al.*<sup>15)</sup>の方法を用いて高速液体クロマトグラフィー (HPLC) により分離した。装置は655 Liquid

chromatograph (日立製) シングルポンプタイプに, 溶媒脱気装置 (ERC-3310, エルマ光学社) を併用した。カラムは, 内径6 mm×長さ10 cm (ERC-ODS-1161, エマル光学社) を2本に5.5 cmのリードカラム (ERC-ODS-1642, エマル光学社) を接続し室温にて用いた。溶媒はアセトニトリル/イソプロパノール (80:20, v/v) の単一移動相を用い, 流速は1.0 ml/minとした。DNB-DGの場合, 検出器は紫外線検出器 (日本分光社, UVIDEC-100), 波長254 nmを用い, DG-acetateの場合の検出器は示差屈折計 (RI, エルマ社, ERC-7520) を用いた。これに島津クロマトバック EIA を接続し, ピーク面積を算定した。

### 2.7 リン脂質組成の分析

ヒトBALF脂質抽出液の一部を用いてリン脂質組成を分析<sup>19)</sup>した。シリカゲル60TLCプレート (Merck社, 20×20 cm) に, リン脂質 (0.4 μmole) をスポットし, 一次元方向へクロロホルム/メタノール/ジイソブチルケトン/ピリジン/水 (30:25:25:35:8, v/v) の溶媒系で展開後, さらに一次元方向へアセトンで2回展開し, ヨウ素蒸気により各脂質を検出, 薄層板から各スポット部分のシリカゲルをかきだした。このゲルに70%過塩素酸を加えて酸化し, 脂質リンを測定した。

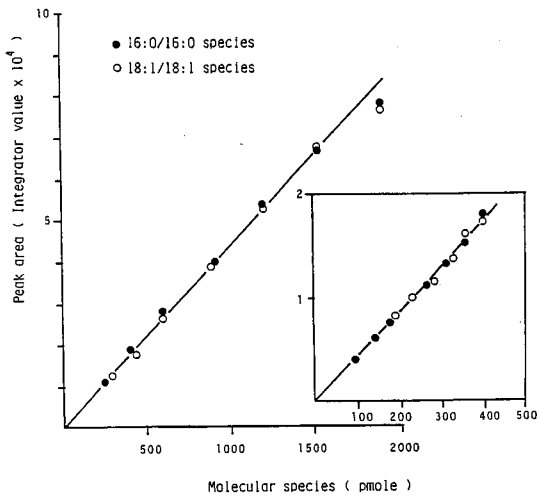
### 2.8 その他の分析法

脂質リンはBartlett法<sup>20)</sup>で測定した。放射活性は, トルエンシンチレーター<sup>21)</sup>を用い, 液体シンチレーションカウンターで測定した。

## 3 成 績

### 3.1 DNB-DG法による飽和, 不飽和分子種の定量性

飽和分子種ジパルミトイル (DP) PC, 不飽和分子種ジオレオイル (DO) PCから調製したDNB-DPDG, DNB-DODGはHPLCによりそれぞれ単一ピークを示した。あらかじめ比活性を測定したDNB-[<sup>14</sup>C]DPDG, DNB-[<sup>14</sup>C]DODGをHPLCで分離した時のピーク面積とピーク部分の放射活性値から, DNB-DG量に対するUV検出ピーク面積値を求めた。Fig. 1は, このようにして測定した16:0/16:0, 18:1/18:1両分子種の量とUV検出値の関係を示している。すなわち, 16:0/16:0, 18:1/18:1の分子種は同一直線上にあることが認められ, 両分子種のmole当たりのピーク面積は同じであった。この結果, DNB-DGの254 nmによる検出は, 飽和, 不飽和分子種を区別なく検出することが確認され, 254 nmのピーク検出は遊離二重結合による吸収は無視され, ジニトロベンゼンによる吸収に基づくと思われた。

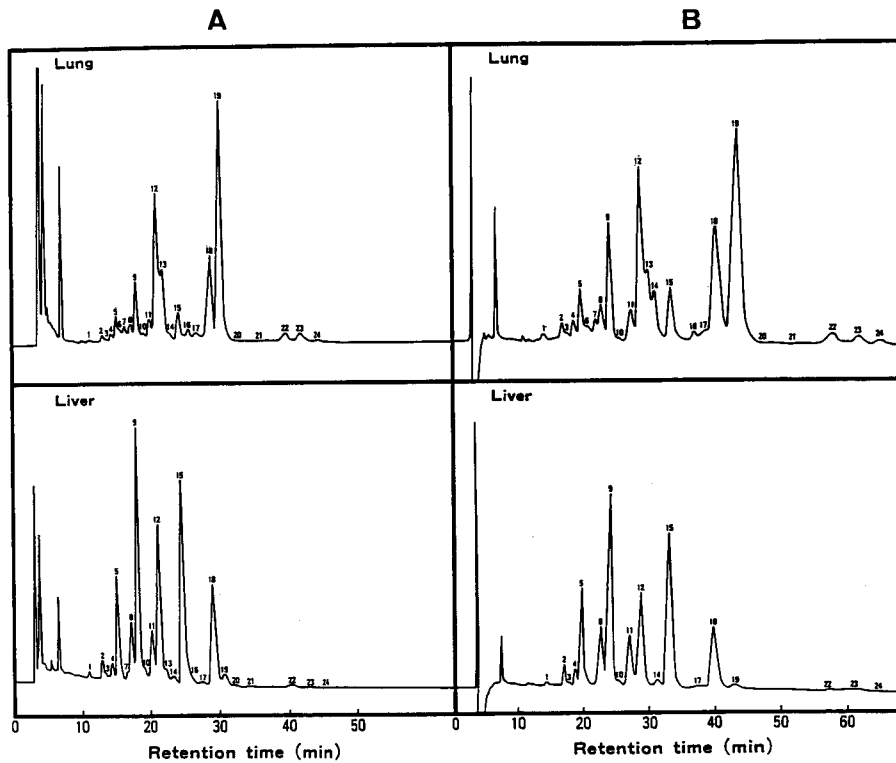


**Fig. 1** Proportionality between the amounts of the DNB-molecular species and the peak areas. Different amounts of DNB-DG derivatives prepared from dipalmitoylphosphatidylcholine and dioleoylphosphatidylcholine were separated by high-performance liquid chromatography and detected at 254 nm.

DNB-DG の検出感度は 100 pmol であった。Itoh *et al.*<sup>14)</sup> が報告した DG-acetate の RI 検出による検出感度は 100 nmol であったので、DNB-DG 法は極めて高感度に分子種を検出でき、微量の生体試料を用いたリン脂質分子種の分析に有用であると思われた。

### 3.2 DNB-DG 法と DG-acetate 法の比較

ラット肺、肝 PC から DNB-DG 及び DG-acetate を調製し、同一カラム、同一溶媒を用いた HPLC において、DNB-DG は 254 nm により検出し、DG-acetate は RI 検出を行い、両者の分離パターンを比較した。両法による分離パターンは Fig. 2 に、ピーク面積から算出した分子種組成は Table 1 に示した。ラット肺、肝 PC 分子種の両法による分離パターンは極めて類似し、分子種組成もよく一致していた。この結果は、DNB-DG の UV 検出と DG-acetate の RI 検出は、PC 分子種を区別なく検出することを示す。両法で不一致がみられたのは肺 PC におけるピーク番号(PN)13 と 14 で、DG-acetate 法では PN14 は認められたが、DNB-DG 法では PN13 と 14 は重なっていると思われ、DNB-DG 法の PN13 の値は、DG-acetate 法の PN13, 14 両値



**Fig. 2** High-performance liquid chromatographic separations of the DNB-DG derivatives detected at 254 nm (A) and the DG-acetates detected with RI (B) which were prepared from phosphatidylcholines of rat lung and liver. The full scale absorbance was 0.16.

**Table 1** Quantification of molecular species separated by high-performance liquid chromatographies with DNB-diacylglycerol method and diacylglycerol acetate method of rat lung and liver phosphatidylcholines

Peak No. <sup>a)</sup>	RRT <sup>b)</sup>	Main molecular species	Percent distribution (%)			
			Lung phosphatidylcholine		Liver phosphatidylcholine	
			DNB-DG (detected at 254 nm)	DG-acetate (detected with RI)	DNB-DG (detected at 254 nm)	DG-acetate (detected with RI)
1	74	U. I.	0.9	0.5±0.1	0.5±0.1	0.4
2	87	U. I.	0.3±0.1	0.6±0.2	1.6±0.1	1.6±0.1
3	90	U. I.	0.1	0.2±0.2	0.1±0.1	0.2±0.1
4	95	U. I.	0.7	0.9±0.2	1.3±0.2	1.6±0.1
5	100	16 : 0/22 : 6	1.9±0.3	3.0±0.3	8.6±0.5	9.2±0.1
6	104	U. I.	0.8±0.1	0.8±0.1	tr	tr
7	109	U. I.	1.4±0.2	1.4±0.2	0.2±0.2	tr
8	114	18 : 1/18 : 3	1.4±0.2	2.2±0.1	5.4±0.2	6.7±0.2
9	119	16 : 0/20 : 4	5.6±0.3	6.8±0.5	21.8±0.1	21.2±0.4
10	126	U. I.	0.5±0.3	0.1±0.1	tr	0.1±0.1
11	133	18 : 1/18 : 2	2.0±0.5	2.9±0.4	5.2±0.3	6.7±0.1
12	139	16 : 0/18 : 2	19.0±0.8	15.5±1.6	16.4±0.4	13.8±0.4
13	145	16 : 0/16 : 1	10.5±1.0	4.9±0.5	0.1±0.1	tr
14	152	U. I.	tr	4.8±0.7	0.4±0.1	1.2±0.4
15	160	18 : 0/20 : 4	2.5±0.6	3.7±0.4	21.9±0.5	22.7±0.7
16	169	U. I.	1.4±0.3	0.7±0.2	tr	tr
17	183	18 : 1/18 : 1	1.1±0.4	0.9±0.4	0.3±0.1	0.5±0.3
18	191	16 : 0/18 : 1	13.4±0.4	13.6±1.5	13.3±0.4	12.0±0.4
19	196	16 : 0/16 : 0	33.1±0.4	28.6±1.1	1.8±0.3	0.7±0.1
20	220	U. I.	0.2±0.1	0.1±0.1	0.1±0.1	tr
21	240	U. I.	0.1±0.1	0.1±0.1	0.2±0.1	0.1±0.1
22	261	18 : 0/18 : 1	1.7±0.3	2.8±0.7	0.8±0.1	0.8±0.3
23	269	16 : 0/18 : 0	1.6±0.2	2.1±0.5	0.3±0.1	0.2±0.1
24	284	U. I.	0.3	0.7±0.4	tr	tr

a : Peak numbers correspond to those shown in Fig. 2.

b : RRT, relative retention time. That of Peak 5 is regarded as 100.

U. I. : unidentified

tr : less than 0.05%

Values are averages±S. D. based on triplicate analyses of the identical samples.

を合計した値(Table 1)であった。すなわち、DNB-DG法は肺 PC の主分子種 16 : 0/16 : 0 (PN19) 及び肝 PC の主分子種 16 : 0/20 : 4 (PN9), 18 : 0/20 : 4 (PN15) を定量的に検出し、二重結合数の異なる種々の分子種間において定量性があることが認められた。

DG-acetate 法で分離されたラット肺 PC 由来 DG-acetate 各ピークの主分子種は、ガスクロマトグラフィーによる脂肪酸及び DG-acetate 炭素数の解析から Itoh *et al.*<sup>14)</sup> によって同定された。DNB-DG と DG-acetate は、同一カラム、同一溶媒を用いて分離され、

検出法が異なっているのみであるが、ラット肺 PC の両法による分離パターンはよく一致した。従って DNB-DG 法で分離した各ピークは、DG-acetate 法で同定された各ピークの主分子種と同一の分子種を含むと考えられる。各ピークに含まれる主分子種\* は Table 1 に示される。

\* 分子種を脂肪酸の組合せで表記した。脂肪酸は炭素数 : 二重結合数で表記し、脂肪酸の位置の違いは区別していない。

### 3.3 DNB-DG 法によるヒト気管支肺胞洗浄液の酸性リン脂質分子種の分析例

生体内に微量存在するリン脂質の分子種分析に DNB-DG 法は有用と思われるが、本研究ではその例として、ヒト BALF における酸性リン脂質の分子量を分析した。Table 2 にみるように正常成人 BALF の主リン脂質は PC であるが、PG は約 10% 存在し、PI は約 1% にすぎない。しかし、肺胞蛋白症患者 BALF では PI が増加し、PG の割合は低下していることが認められた。すなわち PG/PI 比は 1 以下となった。正常成熟動物の肺胞腔へ出現する酸性リン脂質は PG が主であるが、家兎胎生期(この場合はラメラ封入体)<sup>22)</sup>あるいはラットに実験的に作製した珪肺症<sup>23)</sup>では、PG ではなく PI が主であることが示されている。つまりこのような状態の時、肺胞へリン脂質を供給する肺胞 II 型細胞において PG と PI 合成の switch-over が起ると考えられる<sup>24,25)</sup>。しかし、PG と PI は同一の CDP-DG プールを基質として合成されるのか否かは明らかではなく、これを解明するアプローチとして、PG、PI 分子種の解析が必要と思われる。本研究では以上の理由から、BALF に微量存在する PG、PI の分子量を DNB-DG 法を用いて分析した。

Table 3 にヒト BALF の PG、PI 分子種組成を示す。正常成人、肺胞蛋白症患者 BALF の PG 分子種組成

は、どちらも主分子種は PN18 (16:0/18:1) であった。しかし正常成人ではついで PN17 (18:1/18:1)、PN22 (18:0/18:1) が多いが、肺胞蛋白症患者では PN19 (16:0/16:0) が多くジパルミトイル分子種の増加が認められた。正常成人 BALF の PI 含量は極めて微量のため、分子種は分析できなかったが、肺胞蛋白症患者 BALF の PI の主分子種は PN18 で 29-30%、ついで PN22 (18:0/18:1) 14-19% であり、PN19 (16:0/16:0) は約 4-9% であった。アラキドニル分子種は PG では 1% 以上であったが、PI では PN9 (16:0/20:4) が 2-3%、PN15 (18:0/20:4) が 4-6% であった。すなわち、肺胞蛋白症患者 BALF の PG、PI 分子種組成は明らかに異なっていることが示された。

## 4 考 察

リン脂質分子種の分析に HPLC が用いられてきたが<sup>10-13)</sup>、微量試料の定量分析には難点があった。種々の割合で存在する二重結合を含む分子種を定量的に検出しなければ、分子種組成は測定できない。Nakagawa and Horrock<sup>12)</sup> は、HPLC で分離、溶出する DG-acetate を 203 nm で測定したが、この方法は二重結合数の違いを検出し、飽和分子種はほとんど検出しないので分子種間の割合(組成)を求めることはできないと思

Table 2 Phospholipid composition of bronchoalveolar lavage fluids of normal volunteers and patients with alveolar proteinosis

	Phospholipid composition (mole %)								
	Normal volunteers			Alveolar proteinosis					
	(1)	(2)	(3)	Supernatant			Precipitate		
(1)				(2)	(3)	(1)	(2)	(3)	
Phosphatidylcholine	75.3	78.7	74.9	60.8	64.9	52.8	69.2	77.6	66.2
Phosphatidylglycerol (PG)	11.0	10.6	12.5	3.3	3.5	5.4	5.0	4.4	5.4
Phosphatidylinositol (PI)	2.7	2.3	2.6	6.2	10.1	6.9	9.2	10.8	6.4
Phosphatidylethanolamine	2.9	2.4	3.0	5.7	3.1	3.8	1.4	0.2	0.9
Phosphatidylserine	1.8	0.7	1.6	0.3	1.1	3.7	2.3	0.6	1.8
Sphingomyelin	1.6	2.9	2.0	11.4	7.4	14.1	5.0	2.5	7.1
Lyso-phosphatidylcholine	0.6	0.7	0.5	6.6	4.5	3.8	2.1	1.2	3.0
Lyso-phosphatidylinositol	N.D	N.D	N.D	0.2	0.7	N.D	0.9	N.D	N.D
Lyso-phosphatidylethanolamine	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	1.4	N.D	N.D
Bis (monoacylglyceryl) phosphate	4.1	1.7	2.9	4.3	4.7	8.5	3.4	2.8	9.0
Ratio of PG/PI	4.07	4.61	4.81	0.53	0.35	0.78	0.54	0.41	0.84

N. D: not detected

Numbers in parenthesis are same numbers. In alveolar proteinosis, bronchoalveolar lavage fluids of (1) and (2) are from case 1, and that of (3) is from case 2.

**Table 3** Molecular species composition of acidic phospholipids of bronchoalveolar lavage fluids from normal volunteers and a patient with alveolar proteinosis determined by high-performance liquid chromatography using DNB-diacylglycerols.

Peak No. <sup>a)</sup>	Main molecular species	Molecular species composition (%)											
		Normal volunteers			Alveolar proteinosis								
		Phosphatidylglycerol			Phosphatidylglycerol						Phosphatidylinositol		
		(1)	(2)	(3)	Supernatant		Precipitate		Supernatant		Precipitate		
5	16:0/22:6	tr	tr	tr	0.7	tr	0.5	0.4	0.8	0.8	0.6	0.2	
8	18:1/18:3	0.5	0.2	0.3	1.6	2.6	3.1	1.7	6.7	5.9	9.3	5.7	
9	16:0/20:4	0.8	0.7	0.9	0.7	tr	0.6	0.3	2.8	2.6	2.8	2.1	
11	18:1/18:2	3.9	7.3	4.4	1.7	tr	0.5	2.2	2.7	1.3	0.4	tr	
12	16:0/18:2	5.4	8.5	6.9	11.5	5.0	3.1	5.1	6.8	8.9	6.8	7.8	
13	16:0/16:1	3.9	3.1	1.6	4.3	13.2	14.0	14.9	9.5	8.3	9.4	8.7	
15	18:0/20:4	tr	0.8	1.5	tr	tr	0.7	0.3	3.5	5.8	5.6	4.0	
17	18:1/18:1	16.4	16.3	14.4	5.5	9.1	6.2	8.8	6.0	11.1	8.4	10.3	
18	16:0/18:1	38.3	31.2	36.3	33.9	39.8	38.2	36.5	29.4	28.7	30.0	31.3	
19	16:0/16:0	6.9	8.9	8.9	17.6	16.1	16.5	14.5	8.9	3.6	4.4	4.2	
22	18:0/18:1	16.4	14.1	14.7	8.9	11.6	10.8	9.8	13.9	18.0	16.8	18.7	
23	16:0/18:0	2.0	2.8	2.2	2.7	2.1	2.9	2.5	2.7	0.9	2.2	2.5	

a : Peak numbers correspond to those shown in Fig. 2.

tr : less than 0.05%

Numbers in parenthesis represent sample numbers. In alveolar proteinosis, bronchoalveolar lavage fluids of (1) and (2) were taken February 15, 1984 and January 8, 1985, respectively.

われる。Itoh *et al.*<sup>14)</sup>は、飽和分子種を含むラット肺PCの分子種組成を求めるために、DG-acetateをRIで検出した。この方法は確かに飽和、不飽和分子種を区別なく検出し、分子種組成を測定しようが、検出感度が低く、微量リン脂質には適用されないという欠点があった。Kito *et al.*<sup>15)</sup>の報告したDNB-DGを254 nmで検出する方法は、高感度であり、微量リン脂質分子種組成の測定に用いられることが期待されたので、本研究ではこの方法による飽和分子種と不飽和分子種の定量性、及び飽和分子種含量の高い肺リン脂質の定量分析について検討した。

DNB-DGを254 nmで検出する方法は、16:0/16:0、18:1/18:1分子種を区別なく測定し、ラット肺、肝PC由来DNB-DGのHPLCによる分離、254 nm検出パターンは、DG-acetateのRI検出パターンとよく一致した。すなわち、DNB-DG法では、分子種のもつ遊離二重結合による紫外線吸収は無視されうと思われた。検出感度は100 pmoleであり、DNB-DG法は微量リン脂質分子種の分析に有用であると考えられた。

本研究ではDNB-DG法とDG-acetate法を同一カラム、同一溶媒で比較したが、両法の分離パターンは

よく一致した。逆相カラムによる分子種の分離は、脂肪酸の二重結合数及び炭素数に基づくと考えられるが、3位に結合するジニトロベンゾイル基、あるいはアセチル基は、逆相カラムによる分子種の分離には影響しないと思われた。またDNB-DGはDNB-1、2-DGの直前に溶出されることがKito *et al.*<sup>15)</sup>により報告されたが、本研究では、それに相当すると思われるピークは認められなかった。

DNB-DGをHPLCで分離する方法は、微量リン脂質分子種の定量分析に有用と思われたが、その例として、本研究ではBALF中の酸性リン脂質分子種の分析を行った。従来、BALFリン脂質の分析は、主なるサーファクタント・リン脂質であるPCを中心になされている。種々の動物BALF中のPG分子種の分析はOkano and Akino<sup>26)</sup>によって報告されており、16:0/16:0分子種が約20%含まれることが明らかにされている。しかし、PI含量は極めて微量のため、その分子量を分析した報告はない。肺胞蛋白症患者BALF中の全リン脂質に対するPGの比率は、正常に比べて激減し、代わって、PI比率が増加した。つまり、この病態の時、肺胞腔へリン脂質を供給する細胞の肺胞II型細

胞において PG, PI 合成の switch-over が起こるために, PG/PI 比が低下する可能性も考えられる. 従って, BALF 中の PG, PI 分子種の分析は, この病態におけるサーファクタント・リン脂質代謝を解明するために必要とされる. 本研究の結果, 肺胞蛋白症患者と正常成人 BALF の PG 分子種において主分子種はどちらも 16:0/18:1 分子種であることが示された. さらに肺胞蛋白症患者では 16:0/16:0 分子種の増加が認められた. しかし, 肺胞蛋白症患者 BALF の PI 分子種は, PG 分子種とは明らかに異なった組成であった. この患者 BALF の沈渣画分は細胞成分(主としてマクロファージ)をかなり含むが, 蓄積サーファクタントが主成分と考えられるので, サーファクタントに存在する PG, PI は異なった分子種からなると考えてよいと思われる. DNB-DG-HPLC 法の使用により, この事実は明らかにされた. 本研究で示された高感度 HPLC 法によって, 各種細胞リン脂質など, 生体微量リン脂質の分子種の分析が広く行われることが期待される.

## 5 結 論

リン脂質分子種を高感度かつ定量的に分析するための HPLC 法が検討された. リン脂質をホスホリパーゼ C で 1, 2-DG へ変換, これをジニトロベンゾイル誘導体(DNB-DG)へ導いた後, 逆相カラムを用いた HPLC によって分離し, 254 nm で検出した. この方法で DNB-ジバルミトイル・DG 及び DNB-ジオレオイル・DG は mole 当たり同一のピーク面積を示し, それぞれの量と 254 nm で検出されるピーク面積は, 同一直線上に認められた. その検出感度は pmole レベルであった.

この DNB-DG を用いた HPLC で測定されたラット肺及び肝 PC の分子種組成はよく一致した. 以上の結果は, DNB-DG を 254 nm で検出する方法は, 遊離二重結合の違いなど分子種構造の違いを区別なく検出し, 飽和, 不飽和分子種を定量的に測定することを示す.

上記により定量性の確認された DNB-DG の HPLC 法により, 肺胞蛋白症患者 BALF における PG, PI 両酸性リン脂質の分子種が微量分析された. その結果, ヒト BALF 中の PG, PI の分子種組成は明らかに異なることが示された.

肺胞蛋白症患者 BALF を御提供いただいた岩手県立中央病院呼吸器内科吉田司博士に感謝申し上げます.

## 文 献

1. Holub, B. J. and Kuksis, A.: Metabolism of

- molecular species of diacylglycerophospholipids. *Adv. Lipid Res.* **16**, 1-125 (1978).
2. Ohno, K., Akino, T. and Fujiwara, T.: Phospholipid metabolism in perinatal lung. In: *Reviews in Perinatal Medicine*. Vol. 2, edited by E. M. Scarpelli and E. V. Cosmi., 227-318, Raven press. New York (1978).
3. Kuksis, A., Marai, L., Breckenridge, W. C., Gornall, D. A. and Stachnyk, O.: Molecular species of lecithins of some functionally distinct rat tissues. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **46**, 511-524 (1968).
4. Arvidson, G. A. E.: Structural and metabolic heterogeneity of rat liver glycerophosphatides. *Eur. J. Biochem.* **4**, 478-486 (1968).
5. Okano, G., Kawamoto, T. and Akino, T.: Comparison of molecular structure of glycerolipids in rat lung. *Biochim. Biophys. Acta* **528**, 385-393 (1978).
6. Myher, J. J. and Kuksis, A.: Resolution of diacylglycerol moieties of natural glycerophospholipids by gas-liquid chromatography on polar capillary columns. *Can. J. Biochem.* **60**, 638-650 (1982).
7. Curstedt, T.: Analysis of molecular species of ether analogues of phosphatidylcholines from biological samples. *Biochim. Biophys. Acta* **489**, 79-88 (1977).
8. Saito, K., Ogino, H. and Satouchi, K.: Determination of molecular species of glycerophospholipids by a GC-MS selected ion monitoring technique. In: *Membrane fluidity: Biophysical techniques and cellular regulation*. edited by Kate, M. and Kuksis, A., p. 33-41, The Human Press, Clifton, New Jersey (1980).
9. Pind, S., Kuksis, A., Myher, J. J. and Marai, L.: Resolution and quantitation of diacylglycerol moieties of natural glycerophospholipids by reversed-phase liquid chromatography with direct liquid inlet mass spectrometry. *Can. J. Biochem. Cell Biol.* **62**, 301-309 (1984).
10. Smith, M. and Jungalwala, F. B.: Reversed-phase high performance liquid chromatography of phosphatidylcholine: a simple method for determining relative hydrophobic interaction of various molecular species. *J. Lipid Res.* **22**, 697-704 (1981).
11. Patton, G. M., Fasulo, J. M. and Rovins, S. J.: Separation of phospholipids and individual molecular species of phospholipids by high-performance liquid chromatography. *J. Lipid Res.* **23**, 190-196 (1982).



12. Nakagawa, Y. and Horrocks, L. A.: Separation of alkenylacyl, alkylacyl, and diacyl analogues and their molecular species by high performance liquid chromatography. *J. Lipid Res.* **24**, 1268-1275 (1983).
13. Jungalwala, F. B., Evans, J. E. and McCluer, R. H.: Compositional and molecular species analysis of phospholipids by high performance liquid chromatography coupled with chemical ionization mass spectrometry. *J. Lipid Res.* **25**, 738-749 (1984).
14. Itoh, K., Suzuki, A., Kuroki, Y. and Akino, T.: High-performance liquid chromatographic separation of diacylglycerol acetates to quantitate disaturated species of lung phosphatidylcholine. *Lipids* **20**, 611-616 (1985).
15. Kito, M., Takamura, H., Narita, H. and Urade, R.: A sensitive method for quantitative analysis of phospholipid molecular species by high-performance liquid chromatography. *J. Biochem.* **98**, 327-331 (1985).
16. Kruger, J., Rabe, H., Reichmann, G. and Rustow, B.: Separation and determination of diacylglycerols as their naphthylurethanes by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.* **307**, 387-392 (1984).
17. Bligh, E. G. and Dyer, W. J.: A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* **37**, 911-917 (1959).
18. Poorthuis, B. J. H., Yazaki P. J. and Hostetler K.: An improved two dimensional thin layer chromatography system for the separation of phosphatidylglycerol and its derivatives. *J. Lipid Res.* **17**, 433-437 (1976).
19. 長尾正人: 関節軟骨の脂質代謝に関する研究。第3報 関節軟骨細胞におけるプロスタグランジンの産生と起源。札幌医誌 **55**, 421-431 (1986)。
20. Bartlett, G. R.: Phosphorus assay in column chromatography. *J. Biol. Chem.* **234**, 466-468 (1959)。
21. Snyder, F.: Radioassay of thin-layer chromatograms: A high-resolution zonal scraper for quantitative  $^{14}\text{C}$  and  $^3\text{H}$  scanning of thin-layer chromatograms. *Anal. Biochem.* **9**, 183-196 (1964)。
22. 林 秀紀: 家兎肺サーファクタントにおける酸性リン脂質の分子種。札幌医誌 投稿中。
23. 足立英明, 林 秀紀: 気道内 Silica 投与ラット肺における肺サーファクタントの変動に関する研究, 第1報 サーファクタント・リン脂質代謝の変動。札幌医誌 **56**, 707-715(1987)。
24. Batenburg, J. J., Klazinga, W. and van Golde, L. M. G.: Regulation of phosphatidylglycerol and phosphatidylinositol synthesis in alveolar type II cells isolated from adult lung. *FEBS Lett.* **147**, 71-74 (1982)。
25. Hallman, M. and Epstein, B. L.: Role of myoinositol in the synthesis of phosphatidylglycerol and phosphatidylinositol in the lung. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **92**, 1151-1159 (1980)。
26. Okano, G. and Akino, T.: Variations in the molecular species of lung phosphatidylglycerol. *Lipids* **14**, 541-546 (1979)。

---

別刷請求先:

(〒060) 札幌市中央区南1条西17丁目

札幌医科大学大学生化学第1講座 林 秀紀

## 訂正のお願い

札幌医学雑誌 56 巻 6 号 (昭和 62 年 12 月) の 715 頁, 文献 No. 22 及び 23 に間違いがありました。御手数ですが下記の訂正文を御手許の該当箇所へ貼付訂正をお願いいたしますと共に, お詫び申しあげます。

22. 林 秀紀: 家兎肺サーファクタントにおける酸性リン脂質の分子種. 札幌医誌 56, 717-729 (1987).
23. 足立英明, 林 秀紀: 気道内 Silica 投与ラット肺における肺サーファクタントの変動に関する研究. 第 1 報 サーファクタント・リン脂質代謝の変動. 札幌医誌 57, 123-135 (1988).