

エキシマー蛍光誘導体化法によるヒスタミンの高感度及び高選択的 HPLC 法の開発とその生体試料への応用

一瀬文雄

財団法人 化学物質評価研究機構, 877-0061 大分県日田市石井町3-822

Sensitive and selective determination of histamine by high performance liquid chromatography following excimer-forming fluorescence derivatization and its application on the biological samples

Fumio Ichinose

Chemicals Evaluation and Research Institute, Japan, Ishii-machi 3-822, Hita 877-0061, Japan

Abstract

Histamine is well known as a chemical mediator of allergy and gastric secretion, and neurotransmitter in mammalian brain. We have developed a fluorometric HPLC method for the determination of histamine based on intramolecular excimer-forming fluorescence derivatization. Histamine, which has two amino moieties in a molecule, was converted to the dipyrrene-labeled derivative by reaction with 4-(1-pyrene)butyric acid *N*-hydroxysuccinimide ester (PSE), and the derivative afforded intramolecular excimer fluorescence (450-540 nm), which can clearly be discriminated from the monomer fluorescence (370-420 nm) emitted from PSE. The PSE derivative of histamine could be separated by reversed-phase ODS column with isocratic elution. The detection limit ($S/N=3$) for histamine was 0.3-0.5 fmol per injection, and the calibration curve for histamine derivative was linear up to 300 fmol per injection ($r=0.997$). The method allowed the determination of histamine at trace level in biological samples (human urine, rat plasma and tissues, rat brain microdialysate). The proposed HPLC method based on the intramolecular excimer-forming derivatization with pyrene-label is extremely sensitive, selective and simple for the determination of histamine.

Keywords: histamine, 4-(1-pyrene)butyric acid *N*-hydroxysuccinimide ester (PSE), excimer fluorescence, HPLC.

緒言

ヒスタミン(Fig. 1)は、20世紀初頭に麦角中での存在¹⁾が明らかにされた。その代表的な生理機能の一つである平滑筋収縮作用²⁾が見いだされて以来、今日に至るまで非常に長い研究の歴史をもっている。今日では、ヒスタミンは生体組織中に広く分布し、末梢において血管透過性亢進、平滑筋収縮、胃酸分泌の三大薬理作用をはじめ、血管拡張、心臓への作用、かゆみ、痛みなどに関与するとともにアレルギー疾患³⁾、潰瘍⁴⁾などの発症にケミカルメディエーターとして作用していることが知られている。また、最近になって哺乳類の脳にヒスタミン作動神経系が存在することが明らかになり、ヒスタミンとアルツハイマー病⁵⁾、ダウン症候群⁶⁾、ストレス⁷⁾、てんかん⁸⁾などの病態との関わりについても報告がなされてきている。また、今日ではヒスタミンとアレルギー・神経機能のメカニズムの解明や有効な治療薬(抗ヒスタミン薬など)の開発が進められている。

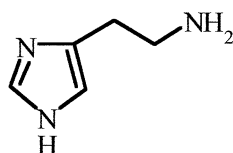


Fig. 1 Structure of histamine

これまで、ヒスタミンを測定する方法として、ガスクロマトグラフィー(GC)法⁹⁾、GC-質量分析(GC-MS)法^{4),10)}、酵素アイソトープ法¹¹⁾⁻¹³⁾、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)法¹⁴⁾⁻²⁰⁾、ラジオイムノアッセイ法²¹⁾などが開発されてきた。これらの分析法の中で*o*-フタルアルデヒド(OPA)を蛍光試薬として用いたHPLC蛍光検出法^{14),15)}が比較的高感度であることから日常分析に用いられるようになった。しかしながら、OPAは、アミノ酸をはじめとする全ての1級アミン類を蛍光誘導体化し、ヒスタミンに選択的ではない。そのため、生体試料中のヒスタミンを測定する場合、この方法は、上記に述べた医療の場での診断分析、メカニズムの解明及び新薬の開発をする上では高感度及び測定の簡便さの面で決して満足いく分析法であるとはいえないものであった。

そこで本研究において、従来のヒスタミン分析法における問題点を解消するため、ヒスタミンが1分子内に2個のアミノ基を有するという構造的特徴に着目し、4-(1-pyrene)butyric acid *N*-hydroxysuccinimide ester (PSE)によるエキシマー蛍光誘導体化HPLC法(Fig. 2)に基づくヒスタミンの高感度、高選択的かつ簡便な分析法を開発した。さらに本法を種々の生体試料中におけるヒスタミン測定に適用し、本法の有用性を実証した。

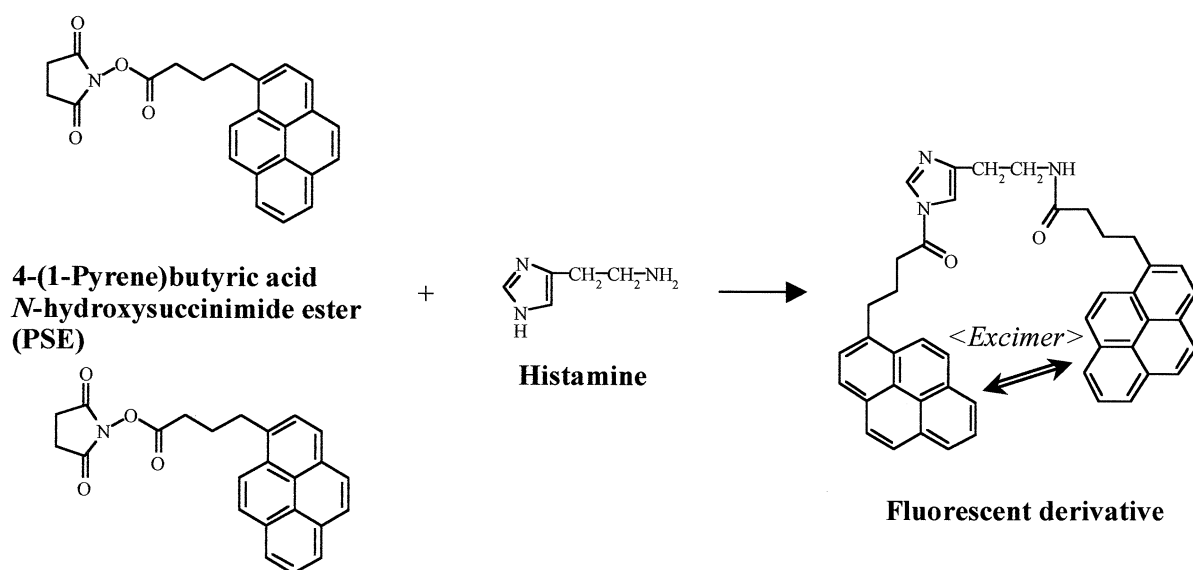


Fig. 2 Intramolecular excimer-forming fluorescence derivatization of histamine with 4-(1-pyrene)butyric acid N-hydroxysuccinimide ester.

ヒスタミンのHPLC・蛍光検出法の開発

ピレンなどの多環芳香族蛍光分子が互いに近接するとき、基底状態では安定な二量体を作らないが、1つの分子が励起光を吸収して励起状態になると、他の基底状態の分子と会合して励起二量体(excited dimer, エキシマー)を形成する。このエキシマーからの発光をエキシマー蛍光という(Fig. 3)。エキシマー蛍光は、2個の蛍光分子間で生じる分子間エキシマー蛍光と同一分子内に存在する2カ所の蛍光団の間で生じる分子内エキシマー蛍光があり、前者が高濃度でしか観測されないのに対し、後者は低濃度でも観測される。すなわち、反応性官能基を複数有する化合物を、ピレン蛍光試薬で誘導体化することにより同一分子内に複数のピレン構造が導入され、励起光の照射により分子内エキシマー蛍光を発する。一方、反応性官能基を1つしか持たない化合物や過剰に存在する試薬は、ピレンモノマー蛍光を発する。ピレンの場合、モノマーからの通常蛍光は375 nm付近に蛍光極大波長があるが、エキシマー蛍光の極大波長は500 nm付近へ長波長シフトする。したがって、エキシマー蛍光検出を行うことにより、複数の反応性官能基を有する化合物のみを選択的に定量することが可能となる。また、このエキシマー蛍光にみられるように、蛍光のストークスシフトが大きいことは、蛍光検出に際して高選択的だけでなく、高感度化が容易に達成され得る要因の一つとも考え

られる。このエキシマー蛍光誘導体化法の概念に基づき、ヒスタミンが1分子内に2個のアミノ基(反応性官能基)を有するという特徴に着目し、ヒスタミンの新規分析法を開発した。なお、エキシマー蛍光誘導体化試薬として4-(1-pyrene)butyric acid *N*-hydroxysuccinimide ester (PSE)を用いた。

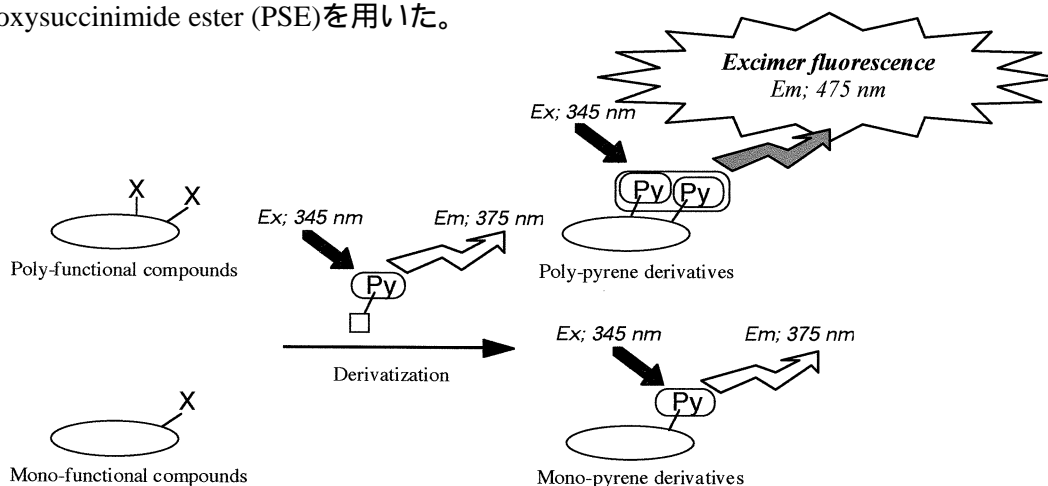


Fig. 3 Intramolecular excimer fluorescence derivatization

ヒスタミン分子の1及び2級アミノ基がPSEにより誘導体化され、ヒスタミン1分子とPSE2分子が結合した反応生成物が得られることをHPLC・質量分析法により確認し、この反応生成物が強いエキシマー蛍光を発することを見出した(Fig. 4)。ヒスタミンは、逆相分配系のカラムを用い(Chart 1)、30分以内に単一のピークとして分離・検出された(Fig. 5)。検出限界は、注入量あたり0.5 fmolと極めて高感度である。エキシマー蛍光誘導体化-HPLC法はヒスタミンに対して高感度、高選択的且つ簡便な測定法であった²²⁾。

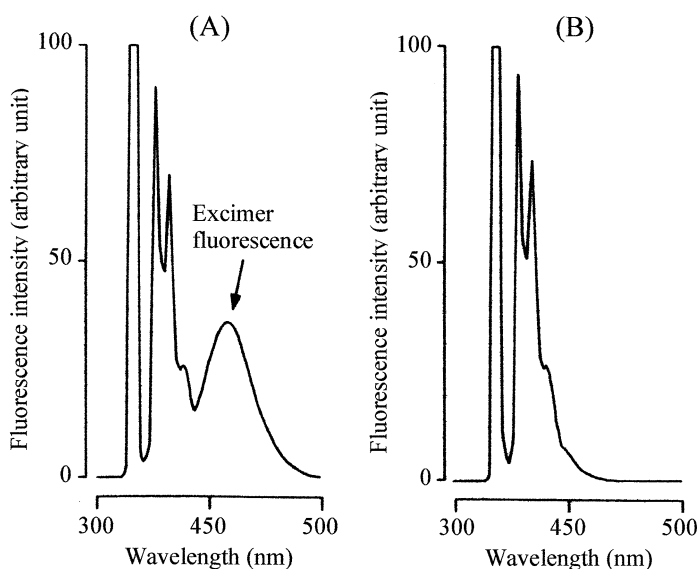


Fig. 4 Fluorescence emission spectra (excitation 345 nm) of (A) histamine and (B) regent blank.

Chart 1 Procedure for the fluorescence derivatization of histamine with PSE

Histamine standard solution 10 μ L
↓ 0.5 mM K_2CO_3 20 μ L
↓ 0.5 mM PSE 80 μ L
↓ Heat at 100 °C, 90 min
Reaction mixture
Inject into HPLC (30 μ L)

HPLC conditions

Column: Wakosil II 5C18-100 (150 \times 2.0 mm i.d.)

Mobile phase: $CH_3CN - H_2O - triethylamine$
(82 : 18 : 0.03, v/v)

Flow rate: 0.2 mL/min

Fluorescence detection: Ex. 345 nm, Em. 480 nm

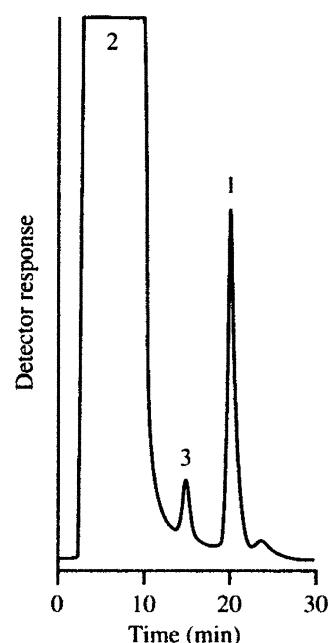


Fig. 5 Chromatogram obtained with a standard solution containing 50 fmol histamine. Peaks: 1, histamine; 2 and 3, reagent blank components.

HPLC・エキシマー蛍光検出によるヒト尿中ヒスタミンの定量

ヒト尿中のヒスタミンを測定することは、生体内での肥満細胞や好塩基球からのヒスタミン遊離を調べる目的で行われ、気管支ぜんそく²³⁾、過敏症²⁴⁾など、様々な疾病の病態解析に有意義である。しかしながら、尿中における未変化体のヒスタミンは、極微量であることから²⁵⁾、尿中のヒスタミンを測定するためには、高感度かつ高選択的なヒスタミン分析法が必須である。従来のOPA誘導体化HPLC法では、OPAがヒスタミンに対し高感度、高選択的でないために、煩雑な前処理が必要である¹⁶⁾など、問題点が多い。そこで、PSEを用いたHPLC・エキシマー蛍光検出法に基づくヒト尿中ヒスタミンの高感度、高選択的な分析法の開発を試みた。

エキシマー蛍光誘導体化法は、尿に適用した場合、尿を水で10倍希釈し、フィルター濾過するのみという簡便な前処理のみでヒスタミンが測定可能であった(Fig. 6)。今回測定した健常人(9名)の尿中ヒスタミン値は 145.4 ± 90 nmol/day (平均値 \pm S.D.)で(Table 1)、この値は従来の測定値^{17),26)}とほぼ同等であり、本法は尿中ヒスタミンの定量に極めて有効であった²²⁾。

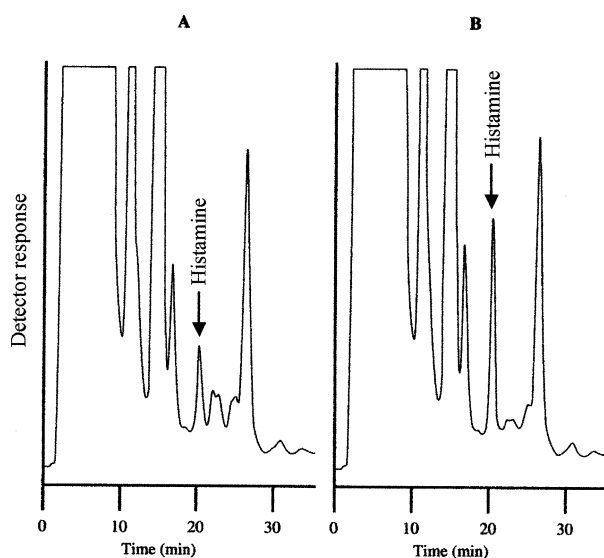


Fig. 6 Chromatograms obtained with (A) a healthy human urine sample (histamine concentration: 289.4 pmol/mL urine) and (B) the urine spiked with histamine (500 pmol/mL)

Table 1 Urinary excretion of histamine from 9 healthy volunteers.

Age	Sex ^{a)}	Histamine (nmol/day)
19	M	118.4
29	M	136.3
34	M	212.5
35	M	85.2
38	M	50.5
42	M	112.5
49	M	51.1
29	F	322.3
30	F	219.8
Mean		145.4
S.D.		90.0

a) M, Male; F, Female

HPLC・エキシマー蛍光検出によるラット組織及び血漿中ヒスタミンの定量

生体内のヒスタミンは、その大部分が組織の肥満細胞および流血中の好塩基球に貯蔵されており、アレルギー反応や組織傷害時に放出され、心血管系をはじめ、生体に強力な生理活性を示す^{25),27)}。特に血漿中のヒスタミンを測定することは、ヒスタミンの薬理作用に関連した病態の診断及びメカニズムの解明に非常に有効である。そこで、HPLCエキシマー蛍光検出法を用いて、ラット組織(皮膚、肺、胃、心臓及び肝臓)及び血漿中のヒスタミンの測定を試みた(Chart 2)。

ラット組織については水による希釈及

Chart 2 Procedure for the fluorescence derivatization of tissue or plasma sample

Tissue or plasma sample 10 μ L
 ↓
 0.5 mM K₂CO₃ 20 μ L
 0.5 mM PSE 80 μ L
 ↓
 Heat at 100 °C, 90 min
 Reaction mixture
 Inject into HPLC (30 μ L)

HPLC conditions

Column: Wakosil II 5C18-100 (250 \times 4.6 mm i.d.)
 Mobile phase: CH₃CN - H₂O - triethylamine
 (82 : 18 : 0.03, v/v)
 Flow rate: 0.7 mL/min
 Fluorescence detection: Ex. 345 nm, Em. 500 nm

び限外濾過，ラット血漿についてはアセトニトリルによる除タンパク操作のみからなる非常に簡便な前処理でのヒスタミンの定量が可能であった(Chart 3)。本法により得られたラット皮膚，肺，胃，心臓及び肝臓におけるヒスタミン定量値(平均値 ± S.D.)は，それぞれ 39.0 ± 12.5 ， 2.69 ± 0.69 ， 10.2 ± 1.5 ， 2.83 ± 0.40 及び 1.22 ± 0.45 $\mu\text{g/g}$ (湿重量) ($n=3$)であり，いずれもこれまでの報告値とよく一致した^{11),12),27)-29)}(Fig. 7)。また，ラット血漿中ヒスタミン定量値(平均値 ± S.D.)についても雄及び雌でそれぞれ 38.9 ± 7.8 及び 23.5 ± 15.0 ng/mL ($n=4$)で，これまでの報告値^{12),27),30)}とよく一致した。さらに血漿中ヒスタミン測定においては，ジアミンオキシダーゼを適用し，クロマトグラム上のヒスタミンピークの同定を行ったほか，ヒスタミンの遊離促進因子である compound 48/80 をラットに静脈内及び皮下投与することで血漿中ヒスタミンが顕著に増加することを確認した(Fig. 8)。本法は，非常に簡便な前処理のみで高感度かつ高選択的に生体試料中のヒスタミンを測定できる方法であることが証明された。

Chart 3 Preparation of rat tissue or plasma sample

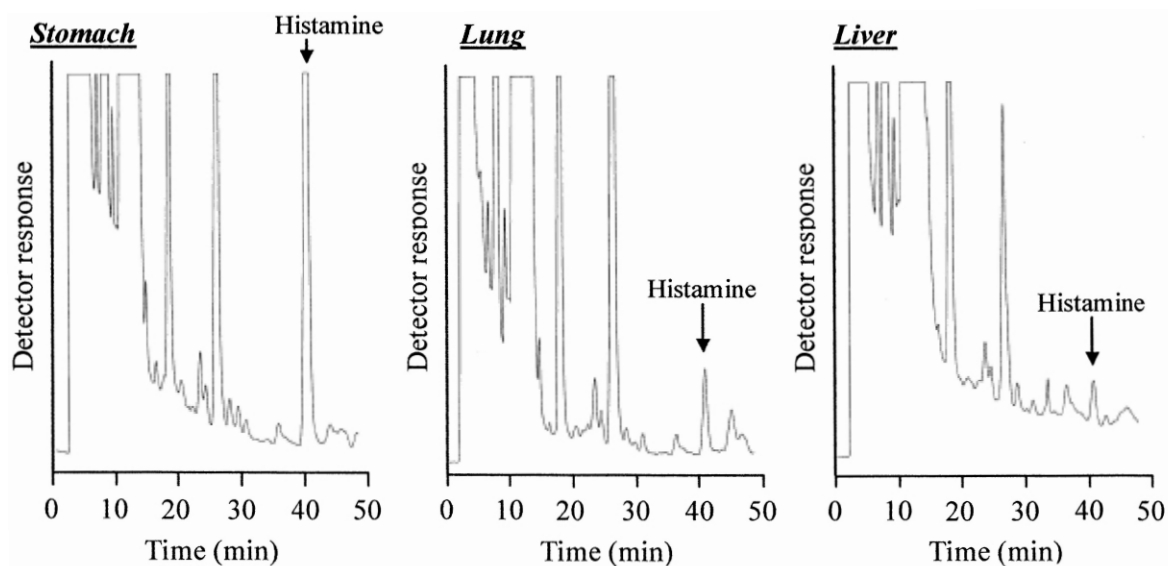
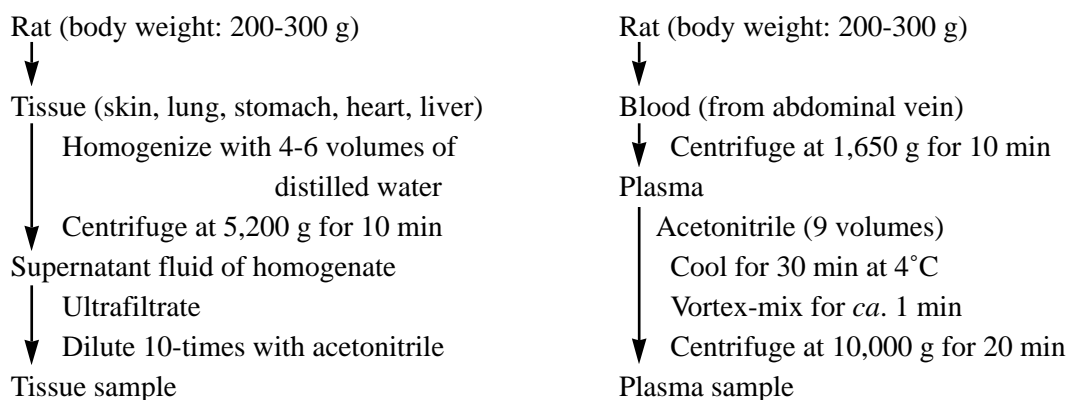


Fig. 7 Chromatograms obtained with stomach ($11.2 \mu\text{g/g}$), lung ($2.01 \mu\text{g/g}$) or liver ($0.696 \mu\text{g/g}$) of rat.

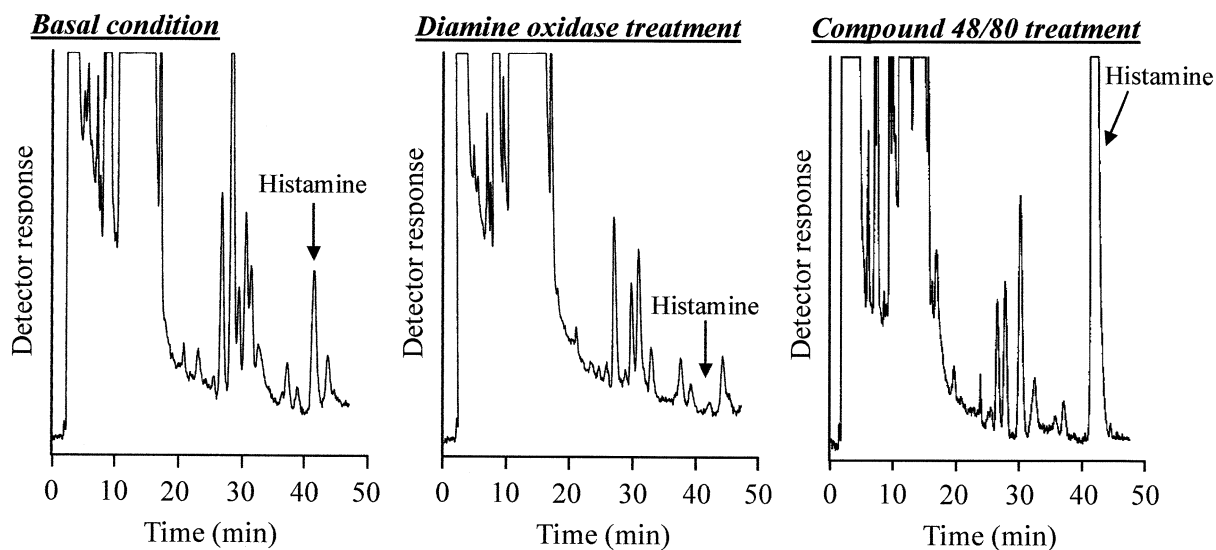


Fig. 8 Chromatograms obtained with basal condition (40.5 ng/mL), diamine oxidase treatment (degradation: 93.6%) or compound 48/80 treatment (4,850 ng/mL) of rat plasma.

HPLC・エキシマー蛍光検出によるラット脳内微小透析液中ヒスタミンの定量

脳内のヒスタミンは、神経伝達物質として、サーカディアンリズム³¹⁾、睡眠³²⁾及び摂食³³⁾などの重要な神経生理学的機能に関与しているだけでなく、アルツハイマー病⁵⁾などの脳疾患に関係がある。現在、脳内の*in vivo*モニタリング解析において、微小透析(マイクロダイアリシス)法^{34),35)}が主流な手法となっている。高感度な分析法と組み合わせた微小透析法は、神経伝達物質、神経修飾物質及び代謝化合物の*in vivo*モニタリングに広く利用されている^{34),36),37)}。今回、ヒスタミンのHPLCエキシマー蛍光検出法をmicrobore HPLCに改良し、ラット脳の視床下部、前頭葉、海馬及び線条体における微小透析液中のヒスタミン測定を試みた(Chapter 4)。その結果、ヒスタミンは、30分以内に単一のピークとして分離・検出され(Fig. 9)、検出限界は、注入量あたり0.3 fmolと極めて高感度であった。本定量操作による無処置ラットの10分毎の微小透析サンプル(10 μ L)中ヒスタミン定量値の平均値 \pm S.D. ($n=10$)は、視床下部、前頭葉、海馬及び線条体でそれぞれ 35.45 ± 4.56 , 9.05 ± 1.56 , 7.83 ± 0.86 及び 6.54 ± 0.66 fmolであった(Fig. 10)。また、高カリウム灌流液による脳内ヒスタミンの増加、無カルシウム灌流液及びテトロドトキシンによる脳内ヒスタミンの減少を確認できたほか、強制水泳におけるストレス負荷により、ラット脳の各部位におけるヒスタミン量が有意に増加することを確認できた³⁸⁾(Figs. 11-14)。

Chart 4 Procedure for the fluorescence derivatization
of brain microdialysis sample

Sample solution* 10 μ L
 ↓ 3 mM PSE - 3 mM K₂CO₃ - CH₃CN 20 μ L
 (1 : 1 : 18, v/v)
 ↓ Heat at 100 °C, 90 min
 Reaction mixture
 Inject into HPLC (20 μ L)

* Histamine standard solution or
brain microdialysis sample

HPLC conditions

Column: L-column (150 × 1.0 mm i.d.)
 Mobile phase: CH₃CN - H₂O (75 : 25, v/v)
 Flow rate: 50 μ L/min
 Fluorescence detection: Ex. 345 nm, Em. 500 nm

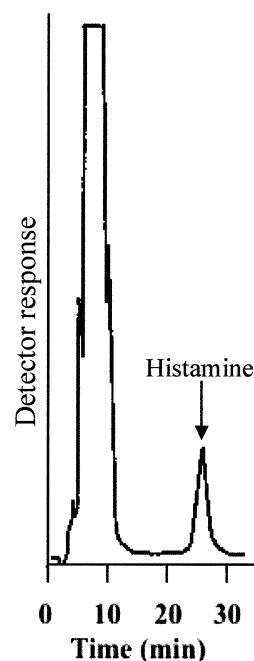


Fig. 9 Chromatogram obtained with a standard solution containing 15 fmol histamine.

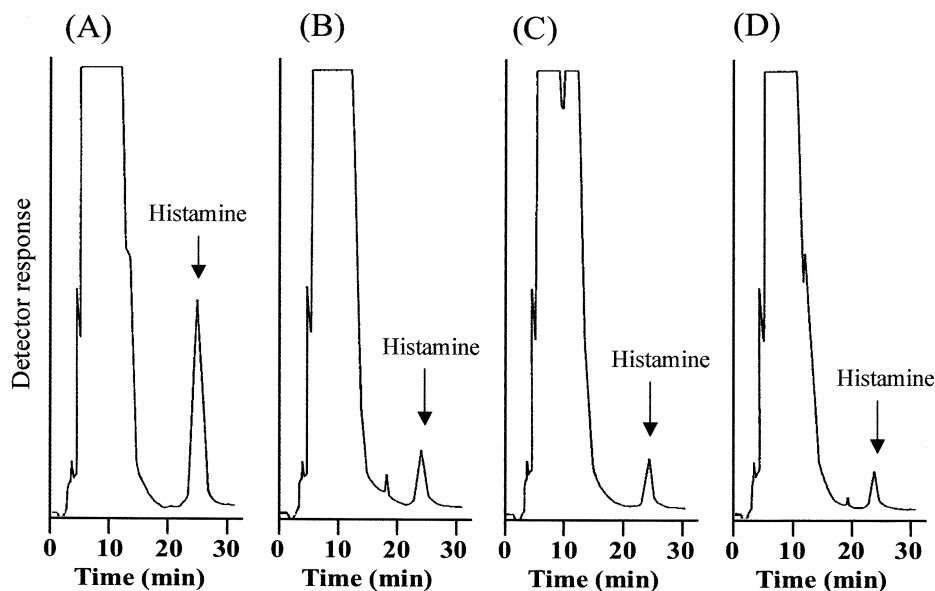


Fig. 10 Chromatograms of 10 μ L microdialysis samples collected at basal conditions from (A) hypothalamus (35.5 fmol/10 μ L), (B) prefrontal cortex (9.1 fmol/10 μ L), (C) hippocampus (7.8 fmol/10 μ L) and (D) striatum (6.5 fmol/10 μ L).

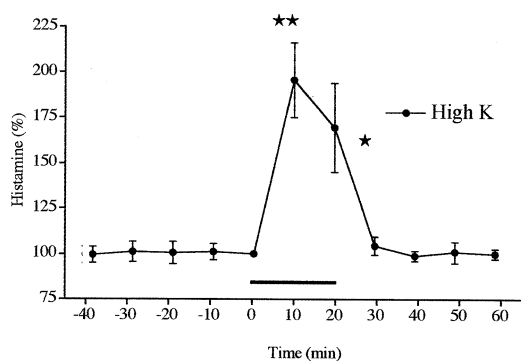


Fig. 11
Effect of local perfusion, through the microdialysis probe, of 100 mM potassium ions in the Ringer solution on histamine levels in the hypothalamus (n=5 rats).
The bar indicates the duration of high K⁺ perfusion (20 min).
() P<0.05, () P<0.01 paired t-test.

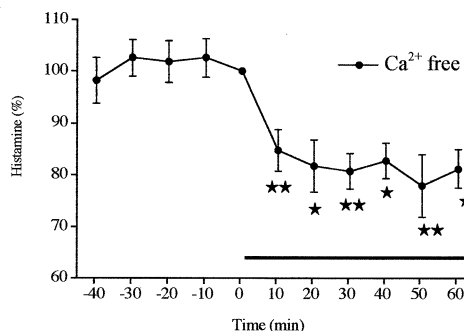


Fig. 12
Effect of removal of calcium ions from the perfusion medium on basal release of histamine in the hypothalamus (n = 5 rats).
The bar indicates the perfusion of calcium-free Ringer solution during 60 min.
() P<0.05, () P<0.01 paired t-test.

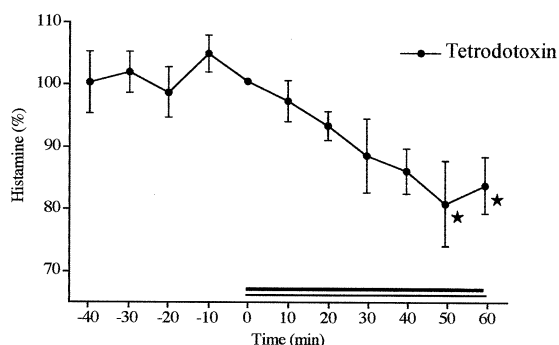


Fig. 13
Effect of sodium channel inhibitor tetrodotoxin (1 μM) in Ringer solution perfused locally (60 min) through the microdialysis probe implanted into the striatum (n=5 rats).
The bar indicates the perfusion of the modified Ringer solution during 60 min.
() P<0.05 paired t-test.

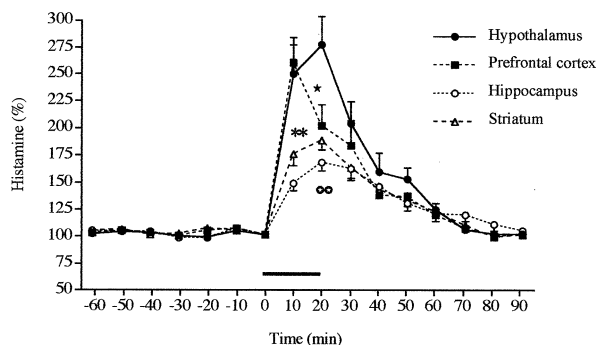


Fig. 14
The effect of the forced swimming (20 min) on release of histamine in the hypothalamus, prefrontal cortex, hippocampus and striatum (means ± S.E.M., n = 5 rats).
() P<0.05, (**)() P<0.01, compared to hypothalamus group; ANOVA, Fischer's PLSD-test.

結論

PSEを用いた分子内エキシマー蛍光誘導体化法に基づくヒスタミンの高感度かつ高選択的なHPLC定量法を開発し、ヒト尿、ラット組織及び血漿、ラット脳内微小透析液中における生体試料中ヒスタミン分析法の構築を行った。今回開発したHPLCエキシマー蛍光検出法は、従来のOPAを用いた蛍光検出法より高感度、高選択的かつ簡便

なヒスタミン分析法であり，生体試料中のヒスタミン検出に極めて有用であることが示された。本法は，今後，薬理，神経科学などの研究や臨床研究に十分活用できるものとする。

謝辞

本研究は，福岡大学薬学部薬品分析学教室山口政俊教授の終始変わらざる暖かい御指導と御鞭撻のもと行われました。謹んで感謝の意を表します。数々の御助言を賜り，討論に御参加いただきました福岡大学薬学部薬品分析学教室の皆様に深謝いたします。また，本研究の実施にあたり多大なる御理解と御協力を賜りました財団法人 化学物質評価研究機構の皆様に深謝いたします。

参考文献

- 1) G. Barger, H.H. Dale, *J. Physiol.*, **40** (1910) xxxviii.
- 2) G. Barger, H.H. Dale, *J. Physiol.*, **41** (1911) 499.
- 3) M. Yamada, T. Watanabe, S. Hirano, H. Fukui, H. Wada, *Biochim. Biophys. Acta.*, **615** (1980) 458.
- 4) N.A. Payne, J.A. Zirrolli, J.G. Gerber, *Anal. Biochem.*, **178** (1989) 414.
- 5) P. Panula, J. Rinne, K. Kuokkanen, K.S. Eriksson, T. Sallmen, H. Kalimo, M. Relja, *Neuroscience*, **82** (1998) 993.
- 6) R. Seidl, E. Hauser, G. Bernert, M. Marx, M. Freilinger, G. Lubec, *Brain Res. Cogn. Brain Res.*, **5** (1997) 301.
- 7) C. Lamberti, A. Ipponi, A. Bartolini, W. Schunack, P. Malmberg-Aiello, *Br. J. Pharmacol.*, **123** (1998) 1331.
- 8) D. Vohora, S.N. Pal, K.K. Pillai, *Pharmacol. Biochem. Behav.*, **68** (2001) 735.
- 9) H. Navert, R. Berube, A. Wollin, *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, **63** (1985) 766.
- 10) K. Pittertschatscher, R. Hochreiter, J. Thalhamer, P. Hammerl, *Anal. Biochem.*, **308** (2002) 300.
- 11) S.H. Snyder, R.J. Baldessarini, J. Axelrod, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **153** (1966) 544.
- 12) M.A. Beaven, S. Jacobsen, Z. Horakova, *Clin. Chim. Acta.*, **37** (1972) 91.

- 13) T. Hibi, M. Senda, *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, **64** (2000) 1963.
- 14) P.A. Shore, A. Burkhalter, V.H. Cohn, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **127** (1959) 182.
- 15) Y. Tsuruta, K. Kohashi, Y. Ohkura, *J. Chromatogr.*, **146** (1978) 490.
- 16) Y. Tsuruta, K. Kohashi, Y. Ohkura, *J. Chromatogr.*, **224** (1981) 105.
- 17) K. Saito, M. Horie, H. Nakazawa, *J. Chromatogr. B*, **654** (1994) 270.
- 18) J. Lange, K. Thomas, C. Wittmann, *J. Chromatogr. B*, **779** (2002) 229.
- 19) A. Yamatodani, H. Fukuda, H. Wada, T. Iwaeda, T. Watanabe, *J. Chromatogr.*, **344** (1985) 115.
- 20) A. Yamatodani, T. Seki, M. Taneda, H. Wada, *J. Chromatogr.*, **144** (1997) 141.
- 21) D.E. Withington, J.V. Aranda, *Inflamm. Res.*, Suppl 1 (1997) S77.
- 22) T. Yoshitake, F. Ichinose, H. Yoshida, K. Todoroki, J. Kehr, O. Inoue, H. Nohta, M. Yamaguchi, *Biomed. Chromatogr.*, **17** (2003) 509.
- 23) P. Wichert, C.O. Feddersen, *Internist*, **35** (1994) 376.
- 24) C.J. Shishoo, V.S. Shirsath, I.S. Rathod, M.J. Patil, S.S. Bhargava, *Arzneimittel Forschung*, **51** (2001) 221.
- 25) A. Yamatodani, *Nippon Rinsho*, **53** (1995) 732.
- 26) I. Imamura, T. Watanabe, K. Maeyama, A. Kubota, A. Okada, H. Wada, *J. Chromatogr.*, **96** (1984) 1931.
- 27) K.B. Johnson, R.V. Charya, W.P. Wiesmann, F.J. Peaece, *Shock*, **3** (1995) 343.
- 28) G. Skofitsh, A. Saria, P. Holzer, F. Lembeck, *J. Chromatogr.*, **226** (1981) 53.
- 29) Y. Kobayashi, D.V. Maudsley, *Anal. Biochem.*, **46** (1972) 85.
- 30) Y. Arakawa, S. Tachibana, *Anal. Biochem.*, **158** (1986) 20.
- 31) L. Tuomisto, V. Lozeva, A. Valjakka, A. Lecklin, *Behav. Brain Res.*, **124** (2001) 129.
- 32) C. Gottesmann, *Prog. Neurobiol.*, **59** (1999) 469.
- 33) S. Attoub, L. Moizo, I. Sobhani, J.P. Laigneau, M.J. Lewin, A. Bado, *Life Sci.*, **69** (2001) 469.
- 34) U. Ungerstedt, *Meth. Neurosci.*, **6** (1984) 81.
- 35) U. Ungerstedt, A. Hallstrom, *Life Sci.*, **41** (1987) 861.
- 36) T. Sharp, T. Zetterstrom, T. Ljungberg, U. Ungerstedt, *Brain Res.*, **401** (1987) 322.
- 37) J. Kehr, In U. Windhorst, H. Johansson (Ed.), *Modern Techniques in Neuroscience Research*, Springer, Berlin, p. 1149 (1999).
- 38) T. Yoshitake, M. Yamaguchi, H. Nohta, F. Ichinose, H. Yoshida, S. Yoshitake, K. Fuxe, J. Kehr, *J. Neurosci. Method*, **127** (2003) 11.