

研究区分:若手研究

唾液を用いた非侵襲的なアラキドン酸測定方法の検討

村迫 萌生

柔道整復学講座 柔道整復学ユニット

【目的】

アラキドン酸 (Arachidonic Acid) は炎症や高血圧の原因であるプロスタグランジンやロイコトリエンの前駆体であることから, 炎症反応や酸化ストレス等の指標として用いられてきた¹.

一方で, 1993 年に乳幼児の成長におけるアラキドン酸の重要性が示され², さらに近年ではアラキドン酸は高齢者の脳機能の低下を防ぐこと³や, 社会的引きこもりなどの精神的ストレスに対する改善効果があること⁴が明らかとなり, アラキドン酸の必須性に注目した研究も行われるようになった.

柔道整復領域においては, 骨折や脱臼などの様々な外傷による患部の炎症のためアラキドン酸消費量が増加することにより, 身体内のアラキドン酸量が減少することが考えられ, また, 長期間の固定や侵襲に伴った精神的ストレスは増加することが考えられる. したがって, 我々は外傷と身体内のアラキドン酸との関係, および, アラキドン酸と精神的ストレスの関係を明らかにすることができれば, 外傷による精神的ストレスに対して食事によるアプローチも可能となるのではないかと考えた. さらに, 柔道整復師は薬を用いたアプローチができないため, 柔道整復師が可能な食事指導という方法で患者の苦痛の軽減を図ることができれば, 柔道整復領域の発展に参画できる可能性があると考えた.

アラキドン酸と外傷, および, 精神的ストレスとの関係を明らかにするためには, まず, アラキドン酸の検出方法を確立する必要がある. 現在行われているアラキドン酸の検出方法についての多くが, ガスクロマトグラフィーを用いた手法であり, 高速液体クロマトグラフィーを用いた手法についての報告は少ない. 高速液体クロマトグラフィーに用いる装置はガスクロマトグラフィーに用いる装置比べ, 比較的

安価であり, また, 不揮発性の試料や高温環境に耐えられない試料に対しても検出が可能であるというメリットがある.

さらに, 高速液体クロマトグラフィーを用いた数少ないアラキドン酸検出手法のほとんどが, 採取時に侵襲刺激の伴う血清をサンプルとして検出しているものであり, 非侵襲的に採取できる唾液をサンプルとして高速液体クロマトグラフィーで検出している手法は散見されない.

以上のことから, 本研究は非侵襲的に採取できる唾液をサンプルとして, 高速液体クロマトグラフィーでアラキドン酸の検出を可能にすることで, 採血時の侵襲によるアラキドン酸検出量への影響を排除し, アラキドン酸と外傷, および, 精神的ストレスとの関係を明らかにするための, 手法を確立することを目的とした.

【方法】

I. 対象

明治国際医療大学に所属する健康成人女性 7 名とした.

II. 使用機器

唾液中アラキドン酸測定には Waters 社製 HPLC システム (ポンプ 1525, カラムオーブン, 蛍光検出器 2475) を用いた. HPLC 用カラムは ZORBAX OD-8 (Agilent 社製 15 cm × 4.6 mm I. D) と LiChrosorb RP-8 (メルク社製 25 cm × 4 mm I. D) の 2 本を直列につないで使用した.

III. 実験プロトコル

1. 唾液の採取

採取前日の 21:00 以降の食事およびアルコールの

摂取を禁止した。また、2 日前からのシジミおよび、シジミのサプリ、豆類の摂取を禁止した。

唾液の採取は午前 8:00～10:00 の間に 400 μ L 程度の唾液を 7 cm のストローと、マイクロチューブを用いて 15 分以内に行い、速やかに -80°C で冷凍保存した。

事前にアンケートを行い、常時服薬しているものがある場合は研究対象者から除外した。

2. 唾液中総脂質の抽出

まず初めに下処理として、冷凍保存されたサンプルを 4°C で解凍し、100 μ L のサンプルを 3 kD のフィルター付きチューブ（ナノセツプ, PALL 社製）に移した後、9, 100 $\times g$, 4°C で 3 時間遠心分離した。

【手順 1】

次に唾液の総脂質の抽出のため、手順 1 で得た 75 μ L の試料に対しクロロホルム：メタノール（2:1, v/v）を 1.5 ml 加え、ボルテックスにより攪拌した後、さらに 0.2 ml の超純水を加えて攪拌した。これを 1,500 $\times g$ で 10 分間遠心分離し、2 層に分離されたものの内、上層を回収しないように十分に注意しながら、パスツールピペットを用いて下層を回収した。【手順 2】

3. 蛍光誘導体化

さらに、アラキドン酸の検出感度を上げるため、アラキドン酸を蛍光誘導体化させた。蛍光誘導体化のために脂肪酸分析用蛍光試薬（ADAM, フナコシ）を用いた。手順としては、脂肪酸分析用蛍光試薬を 0.1 w/v% メタノール溶液とし、手順 2 で得た試料の内 50 μ L と、脂肪酸分析用蛍光試薬溶液 50 μ L をマイクロチューブ内で、常温のまま 1 時間反応させることで蛍光誘導体化を行った。【手順 3】

4. HPLC の条件

手順 3 の方法で蛍光誘導体化したアラキドン酸の標準物質（ケイマンケミカル社製）を用いて、あらかじめピークの位置を確認した後、同様に手順 3 で誘導体化したサンプルを注入し、アラキドン酸を検出

した。

条件としては佐藤ら⁵⁾の方法に従い、移動相にアセトニトリルと超純水を用いて、アセトニトリル 85%, 超純水 15% からアセトニトリル 95%, 超純水 5% まで 1 分間に 0.5% の割合でグラジエントをかけた。流速は 1.0 mL/min, 注入量は 20 μ L, 温度は 35°C に設定し、検出波長は Ex: 365 nm, Em: 412 nm で行った。HPLC の所要時間は 70 分であった。

本研究は明治国際医療大学のヒト研究倫理審査委員会の承認を得て実施した（承認番号 2022-059）。

【結果】

アラキドン酸の標準溶液（0.1 mM）を、HPLC にて検出した結果、44 分～45 分付近にピークがみられた（図 1）。

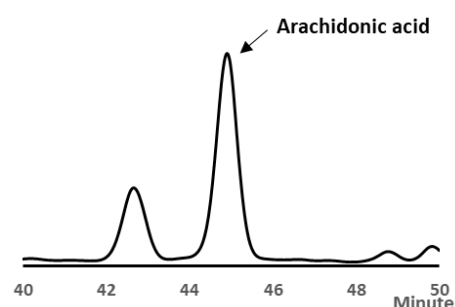


図 1 アラキドン酸標準溶液のピーク波形

各サンプルの検出結果を表 1 に示す。ピークの検出時間は各サンプルごとに誤差は標準溶液と同様に 1 分以内であった。

表 1 各サンプルの検出濃度

Number (Sex, Age)	Sampling Time (min)	Detection concentration (mmol)
1 (Female, 21)	45.0	0.028
2 (Female, 22)	44.9	0.015
3 (Female, 22)	45.0	0.017
4 (Female, 22)	44.2	0.010
5 (Female, 22)	44.3	0.007
6 (Female, 22)	44.7	0.008
7 (Female, 22)	44.3	0.015

【考察】

本研究では, 研究対象者 7 名全員でアラキドン酸を検出することができた. ヒト血漿中のアラキドン酸濃度は 135~335 $\mu\text{g/mL}$ とされている⁶ため, 本研究で得られた唾液中のアラキドン酸は血漿中に比べると微量であった. 今後の課題として, アラキドン酸は運動によって血漿中濃度が増加することが報告されている⁷ため, 血漿中と唾液中での運動の前後のアラキドン酸の変化を調べることにより, 唾液中のアラキドン酸量が血漿中アラキドン酸量を反映しているかどうかを調べていく必要がある.

【謝辞】

本研究は明治国際医療大学学内研究助成を受けたものです.

【文 献】

1. 木曾 良信: アラキドン酸の必須性, ビタミン, 81 (12): 611-615, 2007.
2. Carlson SE, Werkman SH, Peeples JM ら: Arachidonic acid status correlates with first year growth in preterm infants. *Proc Natl Acad Sci USA*, 90:1073-1077, 1993.
3. Fukaya T, Gondaira T, Kashiya Y ら: Arachidonic acid preserves hippocampal neuron membrane fluidity in senescent rats, *Neurobiol Aging*, 28(8):1179-86, 2007.
4. 油井 邦雄, 小柴 満美子, 中村 俊ら: 社会性障害とアラキドン酸の作用機序, 日本生物学的精神医学会誌, 22(1):29-34, 2011.
5. Sato T.: A new double column HPLC method for rapid separation of fatty acids, *Nihon Geka Hokan*, 53(1):33-46, 1984.
6. 小沢 昭夫, 高柳 香都子, 藤田 孝夫: ガスクロマトグラフィーを用いたヒト血しょう総脂質の高級脂肪酸の定量法について, 分析化学, 31(2):87-91, 1982.
7. Laustiola K, Seppälä E, Nikkari T ら: Exercise-induced increase in plasma arachidonic acid

and thromboxane B2 in healthy men: effect of beta-adrenergic blockade. *J Cardiovasc Pharmacol*. 6(3):449-54, 1984.