

氏名(本籍) 三 浦 裕 也

学位の種類 薬 学 博 士

学位記番号 薬博第 186 号

学位授与年月日 平成2年 3月28日

学位授与の要件 学位規則第5条第1項該当

研究科専門課程 東北大学大学院薬学研究科
(博士課程) 薬学専攻

学位論文題目 負イオン検出ガスクロマトグラフィー
—マススペクトロメトリーによる胆汁酸の分析
化学的研究

論文審査委員 (主 査)
教授 南 原 利 夫 教授 長 哲 郎
教授 野 副 重 男

論文内容要旨

胆汁酸は、肝でコレステロールより生合成された後グリシンあるいはタウリン抱合型として胆管を経て腸管に排泄される。ついでその一部は脱抱合あるいは二次胆汁酸への変換を受けた後、腸壁より再吸収され肝に戻る、いわゆる腸肝循環が行われる。このように胆汁酸は腸肝系に局在しており、通常血中、尿中にはごくわずかしかな存在しない。しかし、各種肝胆道疾患時にそれらは体液中レベルが増大するばかりか、組成、抱合形式など質的にも変化することが近年明らかにされてきている。胆汁酸の生合成、代謝は主に肝を中心として営まれており、このため病因、病態を明らかにする上で肝組織中胆汁酸の質的、量的変動を正確に把握することが重要となる。

ガスクロマトグラフィー (GC) /マズスペクトロメトリー (MS) は、煩雑な操作を必要とするものの、分離能、特異性に優れるため、夾雑物質の妨害を受けやすい肝組織中胆汁酸のプロファイル分析に好適な手段といえる。しかし、従来用いられている電子衝撃イオン化 (EI) 法は、高感度化に必須とされる測定対象物に特徴的な高質量領域の正イオン (PI) を生成しにくく、肝組織中微量胆汁酸の測定には十分とはいえない。一方、負イオン (NI) 化学イオン化 (CI) MSは、特異性のみならずバックグラウンドが低いため、attomoleレベルの超高感度分析が可能とされ、近年バイオメディカルの領域において多大の注目を浴びている。

このような観点から、今回各種肝胆道疾患時における病因、病態の解析、さらには胆汁酸の生合成、代謝機構の解明を目的とし、NI検出GC/MSによる胆汁酸およびその関連化合物の分析化学的研究に着手した。

1. NI検出GC/MSにおける誘導体化法

NICI法は、CI条件下イオン源において生成する低エネルギーの熱電子と測定対象物とが衝突することにより生じるNIを検出に利用する方法であり、比較的分子イオンの開裂が生じにくく、しかもバックグラウンドが低いため超高感度分析の可能なことが特徴とされる。しかし通常、このCI条件下有機化合物は同時に存在するリアクタントイオンと反応し、PIをより強く生成するため、本法の適用にあたってはNIを効率よく生成する誘導体化法の工夫が重要となる。そこでステアリン酸をモデル化合物に取り上げ、これをアルキルエステル、活性エステルおよびベンジル型エステルに導き、カルボキシル基の誘導体化法とNIの生成との関係について考察した。まずEIモードにおける各エステルの開裂様式を検討したところ、アルキルエステルは末端メチルからの開裂によるイオンを、また活性エステルは脂肪酸部カルボニウムカチオンを主として生成するのに対し、ベンジル型エステルではアルコール部のベンジルカチオンが強いイオンとして観測されることが判明した。反応ガスにイソブタンを用いるCI条件では、アルキルエステルは擬分子イオン

$[M+H]^+$ および $[M-H]^-$ を生成し、活性エステルではカルボニウムカチオンおよびアルコキシアニオンがそれぞれ強いPI, NIとしてみられた。一方、ベンジル型エステルではアルコール部ベンジルカチオンがPICIで、カルボキシレートアニオンがNICIでベースピークとして観察され、活性エステルとは好対照を示した。以上の結果、EIおよびPICIとNICIは相補的關係にあることが判明した。ついでCI条件下における各エステルのNIとPIの生成比 (N/P) を比較したところ、アルキルおよび活性エステルではこの比が0.01~1であるのに対し、ベンジル型エステルでは30以上であり、特にペンタフルオロベンジル (PFB) エステルでは1000とNIの生成能にきわめて優れることが明らかとなった。

引き続き、無極性のメチルシリコン系キャピラリーカラムを用い、胆汁酸PFBエステルのGC分離に検討を加えた。その結果、トリメチルシリル (TMS) 基のメチル基1つをエチル基に置き換えたジメチルエチルシリル (DMES) エーテル誘導体が胆汁酸相互の分離にきわめて優れ、しかもNI検出MSにおいてPFB基の脱離した $[M-181]^-$ をきわめて強いイオンとして生成することが判明した。さらにselected ion monitoring (SIM) における胆汁酸の検出限界を検討し、S/N=10で4 attomoleという超高感度を得ることに成功した。

2. 肝組織中胆汁酸の超高感度分析

生成内微量成分のGC/MSでは、信頼度の高い測定結果を得る上に安定同位元素標識内部標準物質 (IS) が不可欠とされる。そこでNI検出GC/MSにおいて胆汁酸のステロイド核上酸素官能基の脱離しにくいことに着目し、カルボニル酸素の交換反応を利用して ^{18}O 標識胆汁酸の調製を行った。すなわち遊離型、グリシンならびにタウリン抱合型胆汁酸をクロム酸酸化により、対応するオキソ体とした後、交換反応が酸性または塩基性条件下でより容易に進行することからK塩に導いた。ついでこれらを $H_2^{18}O$ 中 $90^\circ C$ 、50時間加温した後、反応液に NaB^2H_4 を加えてカルボニル基を還元し、目的とする $[^{18}O-^2H]$ 二重標識胆汁酸を調製した。本反応条件下における安定同位元素の導入率はほぼ定量的であり、標識体中に含まれる非標識体の割合は、最も多いLCAで0.2%、ジヒドロキシ体のCDCA、DCAで0.05%、トリヒドロキシ体のCAで0.01%以下ときわめてわずかであった。また後述するアルカリ水解などの条件下においても標識元素の脱離は認められなかった。本標識法は、簡便でかつ標識純度のきわめて高いものが得られるばかりか、従来困難とされていた抱合型胆汁酸にも容易に適用することができ、今後広く利用されるものと考えられる。

つぎに肝組織中胆汁酸の前処理法を検討し、測定手順を以下のように設定した。肝組織 (1~5 mg) をアルカリ溶液に溶解後、ISを添加し、Sep-Pak C_{18} カートリッジにて胆汁酸を抽出した。ついで疎水性イオン交換ゲルPHP-LH-20にて遊離型、グリシンおよびタウリン抱合型画分に

分画し、遊離型はそのまま、抱合型は酵素水解後、PFBエステル-DMESエーテルに誘導し、GC/SIM分析に付した。このときモニタリングイオンにはそれぞれ $[M-PFB]^-$ を用いた。本法における回収率は96~101%ときわめて良好であり、標準偏差も十分満足し得るものであった。本法は感度、特異性に優れ肝組織1mg程度でも胆汁酸の測定が十分可能であり、今後肝における胆汁酸代謝と疾病との関係を明らかにする上に大きく役立つものと期待される。

3. 尿中5 β -コレスタン酸の超高感度分析

先天性代謝異常症であるZellweger症候群では、肝ペルオキシゾームの β 酸化系酵素が欠損しているため、胆汁酸合成の中間体である C_{27} 胆汁酸：3 α , 7 α -dihydroxy-ならびに3 α , 7 α , 12 α -trihydroxy-5 β -cholestanoic acid(DHCAならびにTHCA)が体液中に蓄積される。しかし、それらは微量であるばかりか、新生児という特異な時期のため得られる試料量にも制約があり、信頼度の高い測定の困難なことが本疾病の原因、病態を解明する上に大きな障害となっている。そこでNI検出GC/MSによる C_{27} 胆汁酸の高感度測定法の開発を試みた。

まず、ISとして前述と同様の方法に従い、遊離型、グリシンおよびタウリン抱合型の $[^{18}O-^2H]$ 二重標識DHCAならびにTHCAの調製を行った。ついで C_{27} 胆汁酸のGC分離を検討した結果、PFBエステル-DMESエーテルに導くとき、両者は明確に分離するばかりか、 $[M-PFB]^-$ をモニタリングイオンとするNICI GC/SIMで100attomoleという高感度の得られることが判明した。

ひき続き生体試料中 C_{27} 胆汁酸の前処理法を吟味した。まず、グリシンおよびタウリン抱合型の水解について検討したところ、コリルグリシンヒドロレーズを用いる酵素水解ではほとんど脱抱合を受けないばかりか、4N NaOH中、120°Cに加熱するアルカリ水解においても定量的な脱抱合に10時間以上を要するなど、 C_{27} 胆汁酸の場合とは著しく異なることが判明した。これらの結果にもとづき測定手順を以下のように設定した。

尿試料(0.1ml)をリン酸緩衝液で希釈後、ISを添加し、Sep-Pak C_{18} カートリッジ、ついでPHP-LH-20カラムに通導し、胆汁酸の抽出ならびに遊離型、グリシンおよびタウリン抱合型への分画を行った。遊離型はそのまま、グリシンおよびタウリン抱合型画分はそれぞれ先の条件に従いアルカリ水解後、PFBエステル-DMESエーテルに導き、GC/SIM分析に付した。本法は、感度、特異性に優れ、Zellweger症候群患者尿10 μ lで C_{27} 胆汁酸を容易に測定することが可能である。それゆえ今後本症の確定診断に、さらには病因、病態の解明に大きく役立つものと思われる。因みに、本法を健常人尿に適用し、THCAの存在することが初めて立証された。

4. 血中3-オキシ胆汁酸還元酵素活性の検索

従来、胆汁酸の代謝は、腸および肝を中心として営まれるとされてきた。しかし、最近、血中に3位カルボニル基の還元酵素活性の存在することが示唆され多大の注目をあびている。そこで ^{18}O 標識胆汁酸を用いるトレーサー法と、NI検出GC/MSを組み合わせ血中における3位カルボニル基の酵素的還元について検討した。

まず、基質として $[7, 12-^{18}\text{O}_2]$ 7 α , 12 α -dihydroxy-3-oxo-5 β -cholanoic acid (3-デヒドロコール酸)を前述のカルボニル酸素の交換反応を利用して調製した。これをヘパリン処理した血液と37°C, 1時間インキュベートした後、ISとして $[3, 7, 12-^{18}\text{O}_3, ^2\text{H}_3]$ CAを添加し、胆汁酸を抽出した。ついでPHP-LH-20で精製後、PFBエステル-TMSエーテルに誘導し、NI検出GC/MS分析に付した。その結果、3 β -ヒドロキシ体に還元された3 β , 7 α , 12 α -tri-hydroxy-5 β -cholanoic acidの生成が認められた。薬物の代謝研究では、内因性夾雑物の影響をさけるため標識体と非標識体を一定の割合に混合した基質を用いるイオンクラスター法がしばしば利用される。そこで非標識3-デヒドロコール酸と ^{18}O 標識体の1:1混合物を同様インキュベートしたところ、生成物の両者の比は基質のそれと何ら変化がなく、3 β -ヒドロキシ体が3-デヒドロコール酸に由来することが証明された。一方、70°C, 2分間加熱処理した血液では同一の生成物がみられず、本還元が酵素反応であることも明らかとなった。ひき続き血液の各画分について、同様の検討を試みたところ、本活性は赤血球画分に局在することが判明した。

審査結果の要旨

近年、各種肝胆道疾患との関連から胆汁酸の動態に多大の関心が寄せられている。これらの生合成および代謝は、肝を中心に営まれており、このため肝組織中胆汁酸の量的・質的変動を正確に把握することが病態を解析するうえに重要とされる。本論文は、負イオン (NI) 検出ガスクロマトグラフィ (GC) /マススペクトロメトリー (MS) による生体内胆汁酸の超高感度測定法の開発を試みたものである。

まず、ステリアン酸を各種エステルに導き、化学イオン化条件下におけるNIの生成能について検討した。その結果、ペンタフルオロベジル (PFB) エステルがきわめて効率よくNIを生成することが判明した。さらに、胆汁酸PFBエステルのGC分離に検討を加え、ジメチルエチルシリル (DMES) エーテルがトリメチルシリルエーテルに比べ分離にすぐれることを見いだした。そこで胆汁酸をPFBエステル-DMESエーテルに導き、カルボキシレートアニオン $[M-PFB]^-$ でモニターするselected ion monitoringを行い、検出限界4 attomoleという超高感度測定を達成した。

つぎに、信頼度の高い測定結果を得るうえに不可欠な内部標準物質 (IS) として安定同位元素標識体の調製を行った。NI検出GC/MSでは、ステロイド核上の水酸基が脱離しない点に着目し、カルボニル酸素の交換反応を利用して、その位置に ^{18}O を導入する方法を考案した。遊離型、グリシンならびにタウリン抱合型 $[^{18}O-^2H]$ 二重標識胆汁酸12種を調製し、これらを用いて肝組織中胆汁酸の超高感度測定法を確立することに成功した。本法では、湿重量1 mgの試料で胆汁酸を測定することが十分可能である。

先天性代謝異常症のZellweger症候群では、ペルオキシゾームが欠損するため胆汁酸の生合成が阻害され、中間体の C_{27} 胆汁酸が出現する。そこで、これらの尿中レベルを高感度に測定する方法を考案した。本法を健常人尿に適用し、3 α , 7 α , 12 α -trihydroxy-5 β -cholestanoic acidが排泄されている事実を初めて見い出した。

胆汁酸の代謝は、腸および肝を中心に行われるとされてきたが、最近、血中に3位カルボニル基の還元酵素活性の存在することが示唆されている。そこで、 ^{18}O 標識胆汁酸を用いるトレーサ法とNI検出GC/MSを駆使し、赤血球画分に3 β -オキシソ体を3 β -ヒドロキシソ体に変換する酵素活性の存在を明らかにした。

以上、本研究は、巧みな誘導体化を組み合わせたNI検出GC/MS、安定同位元素標識体のISを用いて生体内胆汁酸の超高感度測定法を開発すると共に、疾病時における胆汁酸の動態に関して数々の新知見を加えたものであり、学位を授与するに十分値する内容と認める。