

氏名(本籍)	やま 山	だ 田	こう 浩	じ 司
学位の種類	薬	学	博	士
学位記番号	薬	第	277	号
学位授与年月日	昭和63年 3月10日			
学位授与の要件	学位規則第5条第2項該当			

学位論文題目	生体内ドリコール類の微量分析法とその応用に関する研究
--------	----------------------------

論文審査委員	(主 査) 教授 南 原 利 夫	教授 野 副 重 男
		教授 橋 本 嘉 幸

論文内容要旨

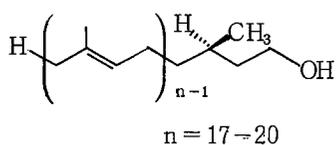
ドリコールは、イソプレン単位が重合し、かつ α 位の飽和したポリプレノールの総称であり、生体内で遊離アルコール、リン酸エステルまたは脂肪酸エステルとして広く分布している。これらのうち、ドリコールリン酸エステルは、真核細胞のアスパラギン結合型糖蛋白生成の過程で糖-脂質中間体を形成し、糖の担体として重要な役割を果たしている。ドリコールおよびドリコールリン酸エステルの生合成や糖鎖生合成の機構に関する研究は、現在までに精力的に行われてきている。しかしながら、これら化合物の疾患あるいは病態モデルにおける消長については、その微量分析の困難さから報告の数は少ない。このためドリコールおよびドリコールリン酸エステルの生理学的意義を究明するうえで、信頼度の高い微量分析法が必要とされている。

ドリコールの分析法としては、UV検出-HPLC法(HPLC/UV)がすでに報告されているが、これらの方法は、適切な内部標準物質に欠けるため分析精度が低いばかりか、血漿中濃度の測定にも感度が不十分である。一方、ドリコールリン酸エステルの分析法に関しては、臓器中濃度をその鎖長の組成比を含めて測定する方法は、現在までに報告されていない。

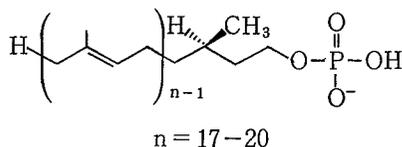
以上のような観点から、ドリコールとドリコールリン酸エステルの微量分析法の開発に着手した。

まず、臓器中ドリコール濃度を測定するため、新規に合成した2,2-didecaprenylethanolを内部標準物質とするHPLC/UV法を確立した。つぎに血漿中濃度を測定するため、anthracene-9-carboxylic acidを用いるプレラベル化法でドリコールを誘導体化する、蛍光検出-HPLC法(HPLC/FL)を開発した。また、ドリコールリン酸エステルの微量分析には、リン酸基に対する新規蛍光プレラベル化剤3-(9-anthryl)-diazo-2-propeneを合成し、それを用いHPLC/FL法を確立した。

本研究では、これらの分析法を駆使して、ドリコールおよびドリコールリン酸エステルの再生肝および化学発癌における経時的推移を考察し、その生理的意義についても考察を行った。



Dolichol



Dolichyl phosphate

ドリコールの微量分析法の確立と生体試料中ドリコール濃度の測定

ドリコールは、臓器中にかなり高濃度に存在しており、その測定は従来より報告されている

HPLC/UV法で、検出感度は十分である。しかしながら、鎖長の異なるドリコールをHPLCによる分離分析に付すとき、適切な内部標準物質の選択が難しく、そのため分析法の精度不足が問題とされてきた。そこで、内部標準物質として、2,2-didecaprenylethanolを合成した。本化合物をドリコールとともにHPLC分析に付したところ良好な分離が見られ、内部標準物質として適切であることが確認された。この内部標準物質を使用したドリコールのHPLC/UV法は、臓器中ドリコール濃度を測定するのに十分な感度であり、その検出感度は100ng/tube (S/N=10)であった。また検量線も200-2000ngの範囲で良好な直線性を示した。そこで、本HPLC/UV法を用い、ラットの臓器中ドリコール濃度をその鎖長の組成比も含めて測定した。

つぎに血漿中ドリコール濃度の測定法を検討した。血漿中にドリコールは極微量にしか存在しておらず、このため前述のHPLC/UV法より少なくとも10倍以上高感度な分析法の開発が必要であった。そこでドリコールをanthracene-9-carboxylic acidで蛍光誘導体化するHPLC/FL法を検討した。ドリコールは、anthracene-9-carboxylic acidと、triphenylphosphinおよびazodicarboxylic acid diethyl esterの存在下瞬時に反応し、強い蛍光を示すことが確認された。この誘導体化反応を利用したドリコールのHPLC/FL法の検出感度は、2 ng/ml (S/N=5)とHPLC/UV法に比して50倍高感度であり、血漿中濃度を測定するのに十分であった。

つぎに本法を用いてヒトの血漿中ドリコール濃度を測定した。健康人25歳から60歳の血漿中濃度は、加齢とともに低下しており、この関係は相関係数 $r=0.648$ 、1%の危険率で有意であった。

ドリコールリン酸エステルの微量分析法の確立と生体試料中ドリコールリン酸エステル濃度の測定

ドリコールリン酸エステルの分析法は、それを脱リン酸化してドリコールに変えHPLC/UV法で測定する方法が従来より行われている。しかしながら、臓器中ドリコールリン酸エステルは、ドリコールに比して低濃度であるため、この方法では多量の試料を必要とし、また分析精度の点でも問題がある。そこで、臓器中ドリコールリン酸エステル濃度を精度よく、かつ少量の試料で測定できるHPLC/FL法を検討した。

まずドリコールリン酸エステルのリン酸基に対する蛍光プレラベル化剤3-(9-anthryl)-diazopropaneを新規に合成した。この試薬を用いてドリコールリン酸エステルの誘導体化を検討したところ、リン酸基に2個のanthroyl基が導入され、その蛍光強度は、かえって弱まることが判明した。そこで、ドリコールリン酸エステルのmonoanthroyl誘導体化の条件を検討した。まずドリコールリン酸エステルをジアゾメタンでジメチル体とし、これを*tert*-butylamineと70°Cで10時間加熱すると、選択的脱メチル化が進行してドリコールリン酸エステルのモノメチル体が定量的に生成した。ついでこのモノメチル体に、蛍光プレラベル化剤3-(9-anthryl)-diazopropaneを反応させると、定量的に目的とする蛍光誘導体が生成することが確認された。

この反応を用いたドリコールリン酸エステルのHPLC/FL法は、検出感度20ng/tube(S/N = 5)と、臓器中濃度を測定するのに十分であった。検量線も50-1000ngの範囲で良好な直線性を示し、精度も満足できるものであった。そこで本法を用いてラット臓器中ドリコールリン酸エステル濃度を、その鎖長の組成比も含めて測定した。

ラット再生肝モデルにおけるドリコールおよびドリコールリン酸エステルの経時的推移

肝臓は他の臓器と異なりきわめて旺盛な再生能力を持つ臓器である。このためラットの再生肝モデルは、短期間に細胞の増殖機構および種々の生理的機能獲得を調べる系として、しばしば試験に供せられる。本研究では、このラット再生肝モデルにおけるドリコールおよびドリコールリン酸エステル濃度の経時的推移を追跡し、再生肝におけるこれらの生理的意義について考察を加えた。

再生肝モデルは、エーテル麻酔下肝臓を70%切除して以後20日間観察した。肝臓の再生は初めの5日間に速やかに行われ、11日目には約90%が再生した。再生肝中ドリコール濃度は、肝臓部分切除後3日目までに減少し、その後増加して11日目には最大値を示した。この時、コントロールとしたSham operation群では有意な変動が見られなかったことより、ドリコールの経時的変動は肝臓の再生に基づくものであることが確認された。一方、再生肝中ドリコールリン酸エステル濃度は、肝臓部分切除後1日目に有意に低値を示したのち、5日目まで急激に増大することが判明した。この時も、コントロール群には大きな変動は見られなかった。また、ドリコール、ユビキノン、およびコレステロールの生合成を調節する酵素HMG CoA reductaseの活性は、肝臓部分切除後1日目から上昇し、5日目まで有意に高値を示した。この酵素活性の経時的推移は、再生肝中コレステロール濃度のそれと極めて良い一致を示した。

以上のことより、再生肝においては、まず細胞増殖に必須なコレステロールの生合成が上昇し、ついでドリコールリン酸エステル、そしてドリコールの生合成が上昇するものと考えられた。

ラット化学発癌における肝臓中ドリコールおよびドリコールリン酸エステルの経時的推移

癌とドリコールおよびドリコールリン酸エステルの関係については、種々の癌細胞を用いた*in vitro*の実験でその量的な変化が報告されている。しかしながら、*in vivo*において、癌形成に至るまでのドリコールおよびドリコールリン酸エステルの経時的推移に関する報告はいまだ見られない。

本研究では、ラットの再生肝を利用した化学発癌モデルを設定し、前癌病変 (hyperplastic nodules) の発現に至るまでの、肝臓中ドリコールおよびドリコールリン酸エステルの経時的推移について観察した。化学発癌モデルとしては、イニシエーター単独、プロモーター単独およびイニシエーターとプロモーター両者投与の3群を設定した。またコントロール群は肝臓部分切除のみを実施した。このモデルにおけるhyperplastic nodulesの発現率は、イニシエーターとプ

ロモーター両者投与の群のみが極めて高く、イニシエーター単独投与群では、かなり低いものの若干その形成が確認された。一方、プロモーター単独投与群とコントロール群ではhyperplastic nodulesの発現は全く観察されなかった。肝臓中ドリコール濃度は、イニシエーター投与の2群において、コントロール群およびプロモーター単独投与群と比して約1.5倍高値を示したが、その経時的推移はすべての群において差が見られなかった。一方、肝臓中ドリコールリン酸エステル濃度は、イニシエーターとプロモーター両者投与の群のみが、他の群と異なった経時的推移をとり、かつその鎖長の組成にも変化が見られた。

これらの結果から、ラットの化学発癌モデルにおいて肝臓中ドリコール量の増加が、化学発癌におけるイニシエーションの過程となんらかの関係があり、また肝臓中ドリコールリン酸エステルの経時的推移の違いとその鎖長組成の変化が、癌化における異常な糖鎖生成と大きく関わっている可能性が示唆された。

審査結果の要旨

本論文は、ドリコールおよびドリコールリン酸エステルの信頼度の高い微量分析法を開発し、これら分析法を駆使して、ドリコールおよびドリコールリン酸エステルの再生肝および化学発癌における動態を明らかにすると共に、その生理的意義について考察を行ったものである。

ドリコールの分析には、内部標準物質を用いるHPLC/UV法並びにanthroyl誘導体とするプレカラムHPLC/FL法を開発した。HPLC/UV法の検出感度は、100ng/tubeであり、臓器中ドリコール濃度をその鎖長の組成比をも含めて測定するのに十分であった。また、HPLC/FL法の検出感度は2ng/mlと、HPLC/UV法に比して50倍高感度であり、血漿中ドリコール濃度を測定することができた。本HPLC/FL法を用いて、ヒト血漿中ドリコール濃度の加齢に伴う推移を追跡したところ、血漿中濃度は加齢と共に低下することが判明した。

ドリコールリン酸エステルの分析には、新規蛍光プレラベル化剤でmonoanthroyl誘導体とするHPLC/FL法を開発した。その検出感度は20ng/tubeであり、臓器中ドリコールリン酸エステル濃度を、その鎖長の組成比をも含めて測定するのに十分であった。本法を用いてラット臓器中のドリコールリン酸エステル濃度を測定したところ、一部臓器でドリコールとドリコールリン酸エステルの鎖長の組成比が異なるという事実が判明した。

つぎに、ラット再生肝モデルにおけるドリコールおよびドリコールリン酸エステル濃度の経時的推移を追跡した。再生肝中ドリコール濃度は、肝臓部分切除後3日目までに減少し、その後増加して11日目には最大値を示した。一方ドリコールリン酸エステル濃度は、肝臓部分切除後1日目に有意に低値を示した後、5日目まで急激に増大した。これらの結果より、再生肝においてはまず細胞増殖に必須なコレステロールが増量し、ついでドリコールリン酸エステル、そしてドリコールの生合成が上昇するものと考えられた。

さらに、ラット再生肝を利用した化学発癌モデルを設定し、前癌病変の発現に至るまでの、肝臓中ドリコールおよびドリコールリン酸エステルの経時的変化について観察した。その結果、肝臓中ドリコール量の増加が化学発癌におけるイニシエーションの過程となんらかの関係があり、また臓器中ドリコールリン酸エステルの経時的推移と鎖長の組成の変化が、癌化における異常な糖鎖合成と大きく関わっている可能性が示唆された。

以上、本研究はドリコール類の優れた微量分析法を開発し、それによって従来不明の点が多かった再生肝におけるその動態を明らかにしたものであり、学位論文として十分価値ある内容と認める。