

氏 名 (本籍)	かた 片	おか 岡	ひろ 洋	ゆき 行
学 位 の 種 類	薬	学	博	士
学 位 記 番 号	薬	第	260	号
学位授与年月日	昭和61年12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	ガスクロマトグラフィーによるタウリンおよび代謝関連化合物の分析法に関する研究
--------	--

	(主 査)			
論文審査委員	教授 曳 野	宏	教授 南 原 利 夫	
			教授 橋 本 嘉 幸	

論 文 内 容 要 旨

含硫アミノ酸の最終代謝産物であるタウリン (2-aminoethanesulfonic acid) は、動物の各組織に豊富に含まれ、神経伝達あるいは神経調節作用、抗けいれん作用、浸透圧調節作用、降圧作用、抗不整脈作用、胆汁分泌促進作用などさまざまな生理・薬理作用を有し、てんかん、心筋梗塞症、本態性高血圧症などの疾患との関連が示唆されている。しかし、これらの作用がどのような機構で働き、どのように調節されているかについてはほとんど解明されていない。一方、ヒポタウリン、システイン酸 (CA) およびシステノスルフィン酸 (CSA) は、Fig.1に示

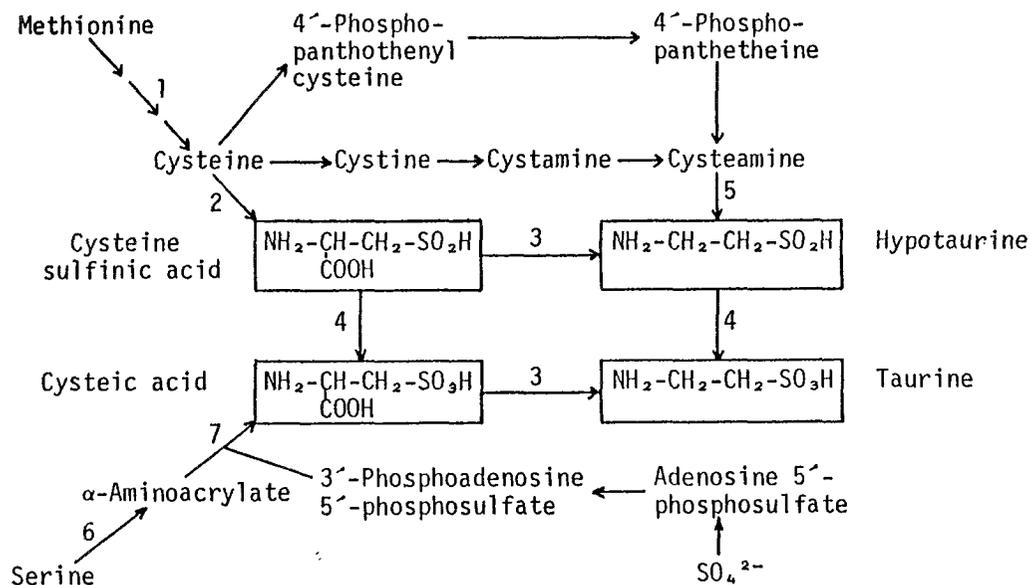


Fig.1. Pathways of Taurine Synthesis

1. Enzyme of the transsulfuration pathway
2. Cysteine dioxygenase
3. Cysteine sulfinic acid decarboxylase
4. Enzymology unknown
5. Cysteamine dioxygenase
6. Serine dehydrase
7. Sulfotransferase enzyme

すようにタウリン生成系の重要な代謝中間体であるが、それらの生体内分布や生理作用に関してはほとんど報告がない。タウリンおよびこれらの代謝関連化合物の生体内含量や諸疾患におけるそれらの変動およびタウリン代謝系の変化を正確に把握することは、これらの化合物の生理的意義を解明する上にきわめて重要である。そのため、これらの化合物の簡便でしかも高感度な特異的微量定量法の確立が緊急の課題となっている。

従来、これらの化合物の定量法としては、比色法、蛍光法、アミノ酸分析計や高速液体クロマトグラフを用いる方法などが用いられてきた。しかし、それらのほとんどがこれらの化合物の分子内アミノ基の検出に基づくものであり、生体内に共存する多くのアミンやアミノ酸による妨害を受け、これらの影響を除くために複雑な前処理を必要とするなど多くの問題点が指摘されている。

そこで筆者は、これらの化合物のもう1つの官能基であるスルホン酸基やスルフィン酸基を持つ化合物が生体内に限られていることに着目して、これらの官能基を特異的に誘導体化する方法を考案し、測定機器としては比較的廉価で分離能や簡便性に優れたガスクロマトグラフィー(GC)法を用いて定量する方法を検討した。

(1) N-Isobutoxycarbonyl (N-isoBOC) dibutylamide誘導体としてのタウリンの水素炎イオン検出(FID)-GC分析

Fig.2に考案、確立したタウリンの誘導体化法の概要を示した。まずタウリンは、蒔田らの方法[J. Chromatogr.,120, 129 (1976)]に従いアルカリ性水溶液下クロロギ酸イソブチルと反応させ、N-isoBOCタウリンへ変換した。つぎに、スルホン酸基のクロル化は無水条件を必要とするので、四級アンモニウムイオンを対イオンとしてN-isoBOCタウリンを塩化メチレン相へイオン対抽出した。抽出されたN-isoBOCタウリンの塩化チオニルによるクロル化は、80℃、15分間と緩和な条件下容易に行え、さらにジブチルアミンと反応させて安定な揮発性誘導体である2-(isobutoxycarbonylamino)-N, N-dibutylethanesulfonamide 1とした。この誘導体化法の特長としては、つぎの5点が挙げられる。

1. 反応の第1段階を水溶液中で簡単に行えること。
2. N-isoBOC化後、酸性エーテル抽出することにより共存するアミン、アミノ酸、カルボン酸類を抽出除去でき、スルホン酸化合物に特異的であること。
3. イオン対抽出により簡便、迅速かつ選択的にN-isoBOCタウリンを抽出濃縮できること。
4. 得られた誘導体1は、十分な揮発性を有し、熱や水分に対してきわめて安定であること。
5. 操作が簡便で、誘導体化に要する時間は約30分と比較的短時間に行え、多数の検体も同時に処理できること。

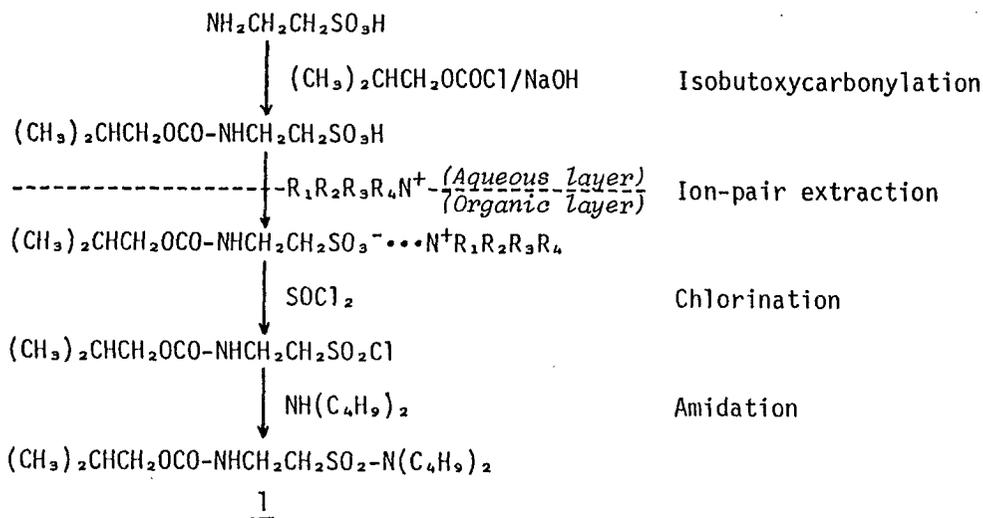


Fig.2. Derivatization Process of Taurine

R₁-R₄ : alkyl group

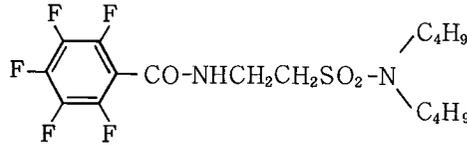
また、合成した誘導体標品との比較により求めたタウリンの誘導体化収率は、97.3%であり、定量的に反応が進行していることが判明した。得られた誘導体は、OV-17あるいはSE-54カラムを用いるFID-GCにより、単一对称性の良好なピークとして溶出した。タウリンの同族体である3-アミノプロパンスルホン酸（APS）を内部標準として作成した検量線は、5-1000 nmolの範囲で原点を通る直線性を示し、再現性も良好であった。本法におけるタウリンの検出限界は、GC注入量として約8 pmol（1 ng）であった。本法を用いれば、生体試料を除蛋白操作以外何ら前処理を行うことなく誘導体化でき、また共存物質の妨害を受けることなく高精度の分析が可能であった。本法を用いて正常人尿および血液中タウリン濃度と14種の系統の異なる動物の組織中タウリン濃度を定量した。

(2) N-Pentafluorobenzoyl (N-PFB) dibutylamide 誘導体としてのタウリンの電子捕獲検出 (ECD)-GC分析

(1)で確立した方法は、特異性、簡便性および精度の点で優れ、生体試料の分析にも十分適用できた。しかし、組織の微小部位や細胞レベルに応用するには感度が不十分である。

そこで筆者は、タウリンのアミノ基に isoBOC基の代りに電子捕獲能の高いPFB基を導入することにより、超高感度なECD-GC定量法の確立を企てた。アルカリ性水溶液下、タウリンはPFB-Clと容易に反応し、以下(1)と同様に処理して安定な揮発性誘導体である2-(pentafluorobenzoylamino)-N, N-dibutylethanesulfonamide 2とした。本法における誘導体化

収率は73.1%であり、APSを内部標準として作成した検量線は10-500pmolの範囲で原点を通る直線性を示し、再現性も良好であった。またタウリンの検出限界は、GC注入量として約10 fmol (1.25pg)であった。本法を用いれば、数 μ gの動物試料にも十分適用できた。また、従来ほとんど報告のない植物試料の分析に適用したところ、動物組織に比べ1/100以下と微量ではあるが、タウリンが存在することが判明した。



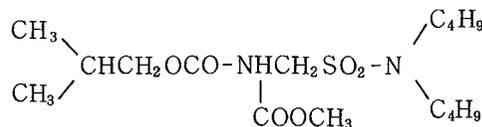
2

(3) タウリン代謝関連化合物のFID-GC分析

(1)で確立したタウリンのN-isoBOC dibutylamide誘導体調製法に基づいて、ヒポタウリン、CAおよびCSAの特異的な誘導体化法を考案、確立し、FID-GCで定量する方法を検討した。

ヒポタウリンは、N-isoBOC化後、食塩飽和酸性エーテル抽出により容易にエーテル相へ移行し、水相に残存するN-isoBOCタウリンから分離された。抽出されたN-isoBOCヒポタウリンは、さらにメチレンブルーを増感剤として光照射するとき、簡単にN-isoBOCタウリンへ酸化された。以下(1)と同様にイオン対抽出、クロル化、アミド化を行い、誘導体1としてGC定量できた。本法における誘導体化収率は86.9%と良好で、5-100nmolの範囲で作成した検量線は原点を通る直線性を示し、再現性も良好であった。本法を動物組織試料の分析に適用したところ、精度よく定量することができ、また各組織中のヒポタウリン濃度はタウリンに比べてごく少ないが、生体内に広く分布していることが判明した。

CAは、N-isoBOC化、イオン対抽出後、カルボキシル基を塩酸-メタノールでエステル化して以下(1)と同様にクロル化およびアミド化を行い、安定な揮発性誘導体であるmethyl- β -dibutylsulfamoyl- α -(isobutoxycarbonylamino)-propionate 3として定量できた。本法における誘導体化収率は97.1%と定量的に誘導体化でき、2-50nmolの範囲で作成した検量線は原点を通る直線性を示し、再現性も良好であった。またCAの検出限界は、GC注入量として約



3

16pmol (3 ng) であった。本法を用いれば、タウリンも同時に定量可能であった。本法を動物組織試料の分析に適用したところ、精度よく定量でき、各組織中のCA濃度はタウリンに比べてごく少ないが、生体内に広く分布していることが判明した。

CSAの定量は、ヒポタウリンとCAの方法を組み合わせることにより容易に行えた。すなわち、N-isoBOC化以後、食塩飽和酸性エーテル（5%イソプロパノール含有）抽出してN-isoBOC CAから分離し、さらに光酸化してN-isoBOC CAへ変換し、以下CAの場合と同様に処理して誘導体3とした。本法におけるCSAの誘導体化収率は80.2%であり、2-100nmolの範囲で作成した検量線は原点を通る直線性を示し、再現性も良好であった。本法を用いれば、ヒポタウリンも同時に定量可能であった。本法を動物組織試料の分析に適用したところ、精度よく定量可能であったが、使用したいずれの組織においてもCSAは検出されなかった。

以上、本研究により確立した分析法は、タウリンおよびその代謝関連化合物を特異的かつ精度よくGC定量することができ、従来法に比べ優れた方法であると考えられる。またさまざまな生体試料の分析にも十分適用できることから、これらの化合物の生理的意義を解明するための有用な手段になると考えられる。

審査結果の要旨

本研究はタウリンおよび代謝関連化合物のガスクロマトグラフィーによる微量かつ簡便な分析法の開発を目的として行われたものである。

タウリンは、動物の各組織に豊富に含まれ、さまざまな重要な役割を演じているが、その作用機構や代謝系については充分解明されていない。一方、タウリン生合成系の重要な代謝中間体であるヒポタウリン、システイン酸 (CA) およびシステインスルフィン酸 (CSA) に関しては、それらの生体内分布さえも明らかではない。タウリンおよびこれらの代謝関連化合物の生体内含量やタウリン代謝系の変化を正確に把握することは、これらの化合物の生理的意義を解明する上にきわめて重要である。そのため、これらの化合物の簡便かつ特異的な微量定量法の確立が緊急の課題となっている。従来、これらの化合物は分子内アミノ基の検出に基づき定量されてきたが、生体内に共存する多くのアミンやアミノ酸による妨害を受けるなどの問題点が指摘されている。そこで本研究では、スルホン酸基やスルフィン酸基を持つ化合物が生体内に限られていることに着目して、これらの官能基を持異的に誘導体化する方法を考案し、ガスクロマトグラフィー (GC) 法を用いて定量する方法を検討した。

まずタウリンは、アルカリ性水溶液下 N-iso-butoxycarbonyl (N-isoBOC) 化し、アルキルアンモニウム塩を用いイオン対抽出、さらにスルホン酸基と塩化チオニルでクロル化後、ジブチルアミンと反応させて安定な揮発性誘導体 2-(isobutoxycarbonylamino)-N, N-dibutylethanesulfonamide として GC 定量した。本法を用いれば、簡便、迅速かつ精度よくタウリンを定量でき、生体試料を除蛋白操作以外何ら前処理を行うことなく分析できた。またタウリンのアミノ基に isoBOC 基の代わりに電子捕獲能の高い pentafluorobenzoyl 基を導入することにより、pmol レベルの超高感度な GC 定量法を確立し、動植物試料の分析に応用した。一方、タウリン代謝関連化合物は、タウリンの誘導体化法に一部反応を追加、改良することにより特異的に分析できた。ヒポタウリンは N-isoBOC 化後溶媒抽出、光酸化して N-isoBOC タウリンへ変換し、以下タウリンと同様に誘導体化した。また CA は、タウリンの誘導体化にカルボキシル基のエステル化を追加して methyl β -dibutylsulfamoyl- α -(isobutoxycarbonylamino)-propionate とした。一方 CSA は、N-isoBOC 化後溶媒抽出、光酸化して N-isoBOC CA に変換し、以下 CA と同様に誘導体化した。

以上、本研究により確立した分析法は、タウリンおよびその代謝関連化合物を特異的かつ精度よく GC 定量でき、またさまざまな生体試料の分析にも十分適用できることから、これらの化合物の生理的意義を解明するための有用な手段になると考えられ、博士の学位を与えるに値するものと認める。