

氏 名 (本籍) 加 藤 博 明

学位の種類 薬 学 博 士

学位記番号 薬博第 119 号

学位授与年月日 昭和57年 3月 25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 胆汁酸サルフェートの合成とその分析法
に関する研究

(主 査)

論文審査委員 教授 南 原 利 夫 教授 野 副 重 男

教授 長 哲 郎

論文内容要旨

近年、各種肝胆道疾患において硫酸抱合型胆汁酸の増量することが見いだされ、生理的意義、病態との関連から注目をあびている。しかしながら、これら胆汁酸sulfateの分離定量には、硫酸エステルをsolvolysis後グリシンおよびタウリン抱合体を脱抱合させ、得られる遊離型胆汁酸をGC、GC-MSにより測定するという煩雑かつ間接的な方法が広く用いられる。このため測定値は信頼性に乏しいばかりか、抱合の形式並びに位置に関する生体の情報を喪失するなど分析法として不満な点が少なくない。一方、硫酸抱合は従来胆汁酸の3位水酸基のみとされてきたが、最近7位水酸基にも見られることが示唆されている。さらにsulfotransferaseの基質特異性、多様性の問題とも関連して抱合の生理的意義に新たな注目がよせられるにいたっている。これらのことから胆汁酸sulfateを脱抱合することなく直接定量する方法の確立がよく望まれる。

これらsulfateの直接分析法の確立を目的とし、まず標品として必要な遊離型、グリシン及びタウリン抱合型cholic acid (C), chenodeoxycholic acid (CDC), deoxycholic acid (DC), ursodeoxycholic acid (UDC), lithocholic acid (LC)の3-, 7-および12-monosulfate 30種、さらにcholic acidのdehydro. (DHC)およびacetyl (AC)誘導体の3-, 7-および12-monosulfate 18種の合成を行なった (Chart 1.2)。

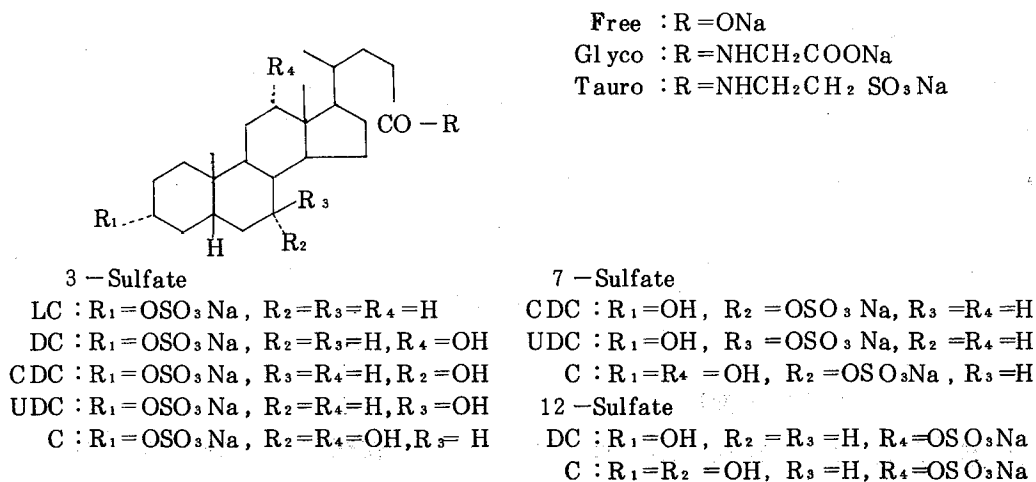
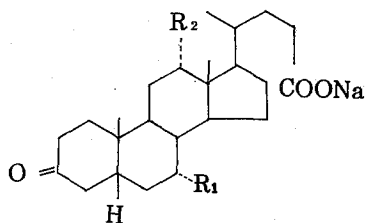
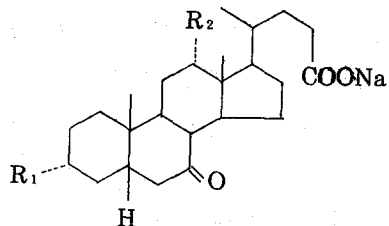


Chart 1



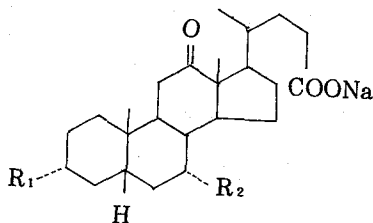
3-Dehydrocholate

- 7-S : $R_1 = \text{OSO}_3\text{Na}, R_2 = \text{OH}$
 7-S, 12-OAc : $R_1 = \text{OSO}_3\text{Na}, R_2 = \text{OAc}$
 12-S : $R_1 = \text{OH}, R_2 = \text{OSO}_3\text{Na}$
 12-S, 7-OAc : $R_1 = \text{OAc}, R_2 = \text{OSO}_3\text{Na}$



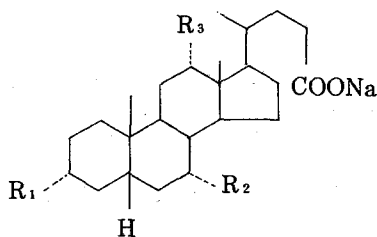
7-Dehydrocholate

- 3-S : $R_1 = \text{OSO}_3\text{Na}, R_2 = \text{OH}$
 3-S, 12-OAc : $R_1 = \text{OSO}_3\text{Na}, R_2 = \text{OAc}$
 12-S : $R_1 = \text{OH}, R_2 = \text{OSO}_3\text{Na}$
 12-S, 3-OAc : $R_1 = \text{OAc}, R_2 = \text{OSO}_3\text{Na}$



12-Dehydrocholate

- 3-S : $R_1 = \text{OSO}_3\text{Na}, R_2 = \text{OH}$
 3-S, 7-OAc : $R_1 = \text{OSO}_3\text{Na}, R_2 = \text{OAc}$
 7-S : $R_1 = \text{OH}, R_2 = \text{OSO}_3\text{Na}$
 7-S, 3-OAc : $R_1 = \text{OAc}, R_2 = \text{OSO}_3\text{Na}$



- 3-S, 7-OAc : $R_1 = \text{OSO}_3\text{Na}, R_2 = \text{OAc}, R_3 = \text{OH}$
 3-S, 12-OAc : $R_1 = \text{OSO}_3\text{Na}, R_2 = \text{OH}, R_3 = \text{OAc}$
 7-S, 3-OAc : $R_1 = \text{OAc}, R_2 = \text{OSO}_3\text{Na}, R_3 = \text{OH}$
 7-S, 12-OAc : $R_1 = \text{OH}, R_2 = \text{OSO}_3\text{Na}, R_3 = \text{OAc}$
 12-S, 3-OAc : $R_1 = \text{OAc}, R_2 = \text{OH}, R_3 = \text{OSO}_3\text{Na}$
 12-S, 7-OAc : $R_1 = \text{OH}, R_2 = \text{OAc}, R_3 = \text{OSO}_3\text{Na}$

Chart 2

ついでこれらの合成標品を用い、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) による分離条件を検討するとともに、分離に影響をおよぼす種々の因子について考察を加えた。さらに生体試料への応用を企て、新しい前処理法を開発し、胆汁中胆汁酸sulfate を分離定量するとともに、HPLCにおけるクロマトグラフ的挙動にもとづいてそれらの同定を行なった。

1 胆汁酸Sulfate の合成

1.1 3-Sulfate の合成

まず、中間体として必要な3-monohydroxy 体の合成を行なった。すなわち、C, CDC 並びにDC をベンゼン中 p-トルエンスルホン酸の触媒下ギ酸と反応させホルミル化したのち、含水アセトン中NaOHを用い3位ホルミル基のみを選択的に除去した。UDC についてはtert-ブチルジメチルシリルクロリドと反応させて3-monosilyl etherとし、7位水酸基をアセチル化したのちアセトン中HCl で脱シリル化して3-monohydroxy 体を得た。これら中間体およびLC のグリシン、タウリン抱合型への誘導はp-ニトロフェニルエステルを用いる活性エステル法によった。これらをピリジン中クロルスルホン酸と反応させて3-sulfate に導き、アルカリ水解にて保護基を一挙に除去後Amberlite XAD-2カラムを通して精製し、目的とする3-sulfate を得た。

1.2 7-Sulfate の合成

まず、中間体として必要な7-monohydroxy 体の合成を行なった。すなわち、CDC, UDC, およびそのグリシン、タウリン抱合体をさきと同様3-tert-butyl dimethylsilyl ether とした。ついでこれらの7位を硫酸エステルに変え、酸水解により3位保護基を除去し、目的とする7-sulfate を得た。C についてはN-ブロムコハク酸イミド (NBS) 酸化により得られる7-oxo 体をアセチル化後NaBH₄還元で付して7-monohydroxy 体に導き、さきと同様硫酸エステル化、脱アセチル化を経て7-sulfate を合成した。

1.3 12-Sulfate の合成

まず、DC, C をベンゼン中ピリジン-無水酢酸で3位および7位を部分アセチル化し、12-monohydroxy 体を得た。これらとそのグリシン、タウリン抱合体の12位を硫酸エステル化後、脱アセチル化し、目的とする12-sulfate を製した。

2 Cholate Sulfate の Dehydro およびAcetyl 誘導体の合成

2.1 Cholate 3-Sulfate 誘導体の合成

まず、7-DHC 3-sulfate の合成は、NBS 酸化により得られるmethyl 7-DHC 3,12-diacetate を部分水解して3-monohydroxy 体として、ついでさきと同様クロルスルホン酸にて3-monosulfate に導いた。12-DHC 3-sulfate は、methyl cholate 3,7-diacetate

のクロム酸酸化により 12-oxo 体に、ついでアルカリ水解により 3-monohydroxy 体に変え、同様にして 3-monosulfate に誘導した。また、C 3-sulfate の acetyl 誘導体は得られた 7-および 12-DHC acetate 3-sulfate の NaBH_4 還元により製した。

2.2 Cholate 7-Sulfate 誘導体の合成

3-DHC 7-sulfate は、出発物質に methyl cholate 3, 12-diacetate 7-sulfate を用い、3位アセチル基の選択的除去、さらにクロム酸酸化により合成した。また、12-DHC 7-sulfate は cholate 7-sulfate の部分アセチル化により、cholate 3-acetate 7-sulfate とし、ついでクロム酸酸化により得た。

2.3 Cholate 12-Sulfate 誘導体の合成

7-DHC 12-sulfate は、7-DHC の3位水酸基を部分アセチル化後ピリジン中クロルスルホン酸で 12-sulfate に導き、ついでアルカリ処理により製した。つぎに 3-DHC 12-sulfate は methyl cholate 3, 7-diacetate 12-sulfate を出発物質に用い、さきと同様部分水解により cholate 7-acetate 12-sulfate とし、ついでクロム酸酸化により生ずる 3-dehydro 体をアルカリで処理し、目的物を得た。また、cholate 3-acetate 12-sulfate は cholate 12-sulfate の3位を部分アセチル化して製した。

3 胆汁酸 Monosulfate の HPLC

胆汁酸 monosulfate の標品を用い、HPLC におけるクロマトグラフの挙動、分離におよぼす置換基の影響を考察し、さらに一斉分離の条件を検討した。すなわち、まず capacity ratio (k' 値) におよぼす移動相 pH の影響を吟味した。その結果胆汁酸 sulfate は pH 7.5 付近で遊離型、グリシン、タウリン抱合型の順に溶出し、3-, 7-および 12-sulfate はほぼ同じ k' 値を示した。一方、pH の低下とともに k' 値は増大し、抱合型の溶出順序は逆転した。3-, 7-および 12-sulfate は DC sulfate を例外として同様なクロマトグラフ的挙動を示し、酸性側においては k' 値に差が見られ、7-, 12-, 3-sulfate の順に溶出された。また胆汁酸 sulfate (とりわけ CDC および DC の 3-sulfate) の分離は移動相の塩濃度につよく影響された。以上の結果から、胆汁酸 3-mono-sulfate の一斉分離には 0.5%炭酸アンモニウム/アセトニトリルが移動相として最適であることが判明した (Fig. 1)。

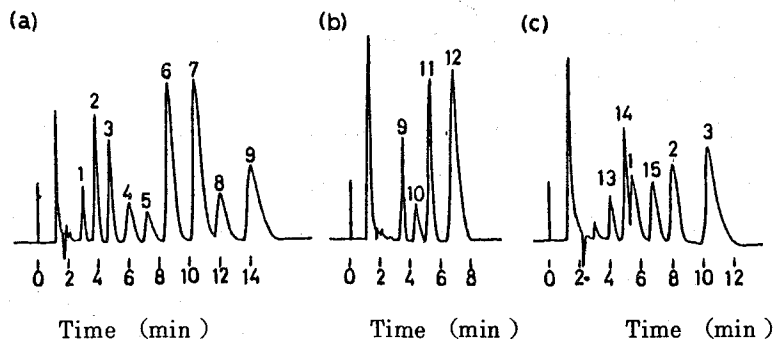


Fig. 1 Separation of a Mixture of 3-Sulfated Bile Acids

1=Cholate, 2=glycocholate, 3=taurocholate, 4=chenodeoxycholate, 5=deoxycholate, 6=glycochenodeoxycholate, 7=glycodeoxycholate, 8=taurochenodeoxycholate, 9=taurodeoxycholate, 10=lithocholate, 11=glycolithocholate, 12=tauroolithocholate, 13=ursodeoxycholate, 14=glycoursodeoxycholate, 15=taoursodeoxycholate. Conditions: mobile phase (a) 0.5% ammonium carbonate/acetonitrile (26:8), 2.1 ml/min; (b) 0.5% ammonium carbonate/acetonitrile (20:8), 2.0 ml/min; (c) 0.04% ammonium carbonate/acetonitrile (36:8), 1.6 ml/min.

4 胆汁酸Monosulfate の Dehydro および Acetyl 誘導体のHPLC

最近, oxo 基を持つ胆汁酸sulfate が体液中に見い出され, またHPLCにおいてDC sulfate が他と異なるクロマトグラフの挙動を示すことから, 胆汁酸sulfate の dehydro およびacetyl 誘導体について精査することを試みた。まず, DC 12-sulfate, DHC 12-sulfate およびそれらの acetate をとりあげ, 同様pHの影響について考察した。その結果これら誘導体はDC 12-sulfate と同様の溶出挙動を示し, それは12-sulfate に特有の性質であることが判明した。この現象は胆汁酸sulfate の側鎖カルボン酸がpHの上昇に伴って解離し, 12位スルホン酸エステルとの間に相互作用が生起するためと考えられる。つぎにDHC sulfate の分離を検討した。これらはいずれのpHにおいても k' 値が近似し, 分離困難であったが, acetyl 誘導体では k' 値が増大し, これら異性体の相互分離が可能なが判明した。

5 生体試料中胆汁酸Sulfate のHPLC

尿, 胆汁, 血液などの生体試料からの胆汁酸sulfate の分離には有機溶媒による抽出法, Amberlite XAD 樹脂による固相抽出法が広く用いられる。胆汁酸sulfate は極性がきわめてつよく, 定量

的な回収が困難なため、まず抽出条件について検討した。Amberlite XAD-2, XAD-4 を用いたところ、吸着時のpH, 溶出剤のアルコール含量およびpHによって回収率が変動するばかりか、胆汁酸 sulfate の種類によって溶出パターンが異なり、定量的な回収が困難であった。そこでSep-pak C₁₈カートリッジの使用を試みた。ヒト胆汁を0.5 Mリン酸緩衝液 (pH 7.0) で希釈し、これに通導、水洗後90%エタノールで溶出したところ優れた成績が得られ、本法の有用性が実証された。つぎに疎水性イオン交換ゲルPHP-LH-20を用い胆汁酸 sulfateの分画法を検討した。試料をPHP-LH-20に吸着させ、遊離型、グリシンおよびタウリン抱合型胆汁酸を順次溶出分画したのち、1%炭酸アンモニウム/70%エタノールで溶出するとき胆汁酸 sulfate が定量的に回収された。ヒト胆汁に各種胆汁酸 sulfate を添加し、以上の前処理を行なったのちHPLCに付したところ、クロマトグラム上妨害ピークは見られず、再現性、回収率ともに良好な結果を与えた。ついで閉塞性黄疸減黄処置胆汁について、胆汁酸 sulfate をHPLCで分離定量するとともにクロマトグラフ的挙動にもとづいてピークの同定を行なった。その結果胆汁中胆汁酸 sulfate はほとんどがグリシン並びにタウリン抱合型胆汁酸 3-sulfate であることが判明した。

審査結果の要旨

胆汁酸は、肝胆道疾患において著明に変動し、体液中レベルは肝機能を鋭敏に反映することから、病態の解析上信頼度の高い分析法の確立がもとめられている。これらのうち、最も重要視されるサルフェートについては、後来標品の得難いことが研究の進展上大きな隘路となってきた。一般にサルフェートの分離定量には *solvolysis* 後、グリシン並びにタウリン抱合型を脱抱合させ、得られる遊離型胆汁酸を測定する間接的な方法がとられる。そのため定量性に問題があるばかりか、抱合形式に関する生体の情報を喪失することが難点とされる。本研究は、胆汁酸サルフェートの標品を合成し、これらを用いて高速液体クロマトグラフィー (HPLC) における溶出挙動を系統的に考察すると共に、疎水性イオン交換ゲルによる分画法と組み合わせた直接一斉分析法を開発し、ヒト胆汁への応用を試みたものである。

まず、3-、7-および12-モノサルフェート30種の合成を企て、ホルミル化、アセチル化、*tert*-ブチルジメチルシリル化などを駆使して水酸基を適切に保護したのち、ピリジン中クロルスホン酸を働かせて目的物を得た。また、側鎖のグリシン、タウリン抱合型への誘導は、*p*-ニトロフェニルエステルを用いる活性エステル法によった。さらに溶出挙動を比較するためコール酸3-サルフェートのデヒドロ体およびアセチル体18種を調製した。

ついで、これらの標品を用い、HPLCにおける挙動、分離度におよぼす置換基の効果を考察し、一斉分析の条件を確立した。すなわち、 k' 値におよぼす移動相のpH、塩濃度の効果を系統的に吟味し、カラムに逆相型のSC-O2を、移動相に炭酸アンモニウム/アセトニトリルを用いるのが最適条件であることを見出した。また、胆汁酸12-サルフェートが異常なクロマトグラフ的挙動を示すことに着目し、それが側鎖酸性基の解離状態によって生起する相互作用に起因するものと結論した。

最後に、ヒト胆汁への適用を試み、生体試料のクリーンアップ法を検討した。Sep-pakC₁₈カートリッジに通導し、PHP-LH-20によって得られるサルフェート画分をHPLCに付したが、閉そく性黄だん滅黄処置胆汁について、本法を適用したところ、胆汁酸サルフェートは、ほとんどがグリシン並びにタウリン抱合型であることが判明した。

本論文は、後来未開拓の分野であった胆汁酸サルフェートを取りあげ、新たに合成した標品を用いて逆相モードHPLCによる一斉分析法を開発し、生体試料への応用を試みたものであり、病態解析の方法論として役立つところ甚だ大きく、学位論文として十分価値ある内容と認める。