

氏名	三田村 邦子
生年月日	
本籍	滋賀県
学位の種類	博士(薬学)
学位記番号	博乙第145号
学位授与の日付	平成9年9月30日
学位授与の要件	論文博士(学位規則第4条第2項)
学位授与の題目	抱合型25-ヒドロキシビタミンD分析法の開発研究 (Studies on Development of Analysis of Conjugated 25-Hydroxyvitamin D)
論文審査委員	(主査) 島田 和武 (副査) 馬渡 一浩, 木津 良一, 早川 和一, 藤井 洋一

学位論文要旨

Summary

The analysis of conjugated 25-hydroxyvitamin D [25(OH)D] and its free form, the major metabolite of vitamin D in human plasma, has been developed.

First, a convenient and reliable determination method of 25(OH)D₃ using a non-radioactive internal standard (IS) and reversed-phase UV/HPLC was developed. Next, its sulfate [25(OH)D₃S] in human plasma was isolated and identified by comparison with an authentic sample, whose existence had been reported with some ambiguity. The quantitative determination method of the sulfate was also developed using reversed-phase UV/HPLC, which does not require solvolysis and a radioactive compound as an IS. These methods were applied to the determination of both compounds in plasma from healthy subjects and from patients with chronic renal failure. The study shows that nearly equal amounts of both compounds were detected in the former plasma, but the free form was predominant in the latter one. 25(OH)D₃ (D₂) 3- and 25-monoglucuronides (G) were synthesized from the corresponding 25-hydroxyprovitamin D or its derivatives using the Koenigs-Knorr reaction followed by a photochemical reaction, thermal isomerization and then alkali hydrolysis. The compounds were applied to the separation and characterization of 25(OH)D-monoglucuronides, biliary metabolites obtained from rats dosed with 25(OH)D *per os*, as an authentic sample. Both 25(OH)D-3G and -25G were identified by comparison of their chromatographic behavior with the authentic samples during HPLC or LC/atmospheric pressure chemical ionization-MS. It is interesting that the glucuronidation occurred not only at the 3-position but also at the highly hindered 25-position of the secosteroid, that is, the *tert*-hydroxy group.

1. はじめに

ビタミンD (D; D₃及びD₂) は肝で25-ヒドロキシビタミンD [25(OH)D] に、次いで腎で活性型ビタミンDに代謝され生体内カルシウムの恒常性、骨代謝平衡の維持などに重要な役割を果たしている。これらDの第I相反応生成物の体液中レベルを的確に把握することは臨床・栄養診断上極めて重要であり、各種結合タンパクを用いる方法、各種クロマトグラフィーにより測定されている。しかしいずれも満

足し得るものではなく、現在も積極的に分析法の開発が進められている。一方、Dの第Ⅱ相反応生成物に関する検討は十分になされていない。例えば近年、各種抱合型D代謝物(サルフェート、グルクロニド)の存在が報告されているものの、その同定は脱抱合に基づく間接的証明であり、抱合形式、抱合位置など構造に少なからず疑問が残されている。このように体液中の各種Dの第Ⅱ相反応生成物はその存否すら明らかでなく、生理作用及び測定意義など解明されるべき多くの問題を有している。

以上の知見を踏まえ著者は、D代謝物、特に第Ⅱ相反応生成物の分析法を開発し、臨床診断に寄与することを究極の目的として以下の研究を行った (Fig. 1)。

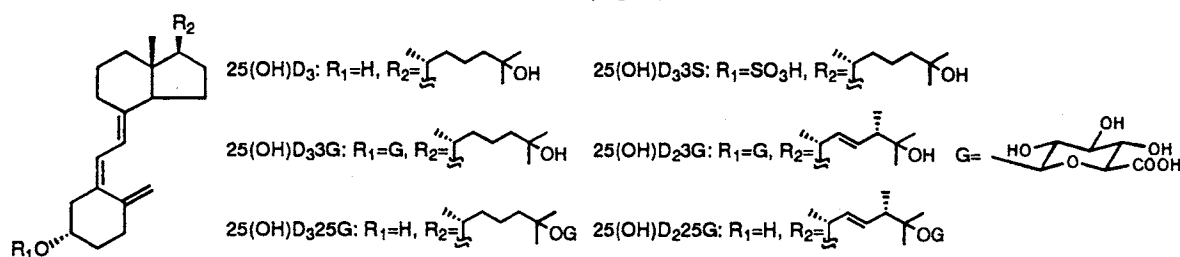


Fig. 1. Structures of 25(OH)D and Its Conjugates

2. 血漿中25-ヒドロキシビタミンD₃及びその3-サルフェートの分析

25(OH)D₃はヒトにおけるD₃の主要代謝物の一つであり、その血漿中濃度はD₃の供給状態の指標となることから、HPLCを始めとする種々の定量法が報告されている。しかしこれらは標識化合物あるいは内標準物質 (IS) として放射性同位体を使用しているものや順相系HPLCによるものであり、ルーチン分析には必ずしも汎用的ではない。一方、Axelsonは25(OH)D₃ 3-sulfate [25(OH)D₃3S] が25(OH)D₃とほぼ同レベルでヒト血中に存在すると報告し注目を集めた。しかしその同定はソルボリシス後に得られた25(OH)D₃をHPLC及びGC/MSにより検出したものであり、また定量には放射性ISを使用するなど簡便性に欠ける。さらに最近、その存在を疑問視する報告もなされるなど、存否すら明らかではない。そこで、これら代謝物のより汎用性及び信頼性に富む分析法の開発を企てた。

まず、25-hydroxyergosterol [25-hydroxyprovitamin D₂, 25(OH)proD₂ (IS₁)] をISとして用い、UV検出逆相系HPLCによる血漿中25(OH)D₃定量法を開発した。すなわち血漿 (0.5 ml) をEtOHにより除タンパク、IS₁を添加、Et₂O抽出、シリカゲルミニカラムクロマトグラフィーにより順次精製後逆相系HPLCに付した。その結果、25(OH)D₃及びIS₁のピークは血漿中内因性物質による妨害を受けておらず、回収率も満足し得るものであった。また、プール血漿を用いる標準添加法 (5-40 ng/ml plasma) により得られた回帰直線は良好な直線性 ($r > 0.995$) を示し、その傾きの再現性 [相対標準偏差 (R.S.D.)=7.5%] も良好なことから本直線を検量線として用いることとした。なお、本法における検出限界及び定量限界は各々2 ng/ml及び5 ng/mlであった。異なる4種の血漿に標品 (0, 10及び20 ng/ml plasma) を添加し、上述の方法による添加回収率を求めたところ、90.5-106.5%であり、アッセイ内、アッセイ間変動のR.S.D.は各々9.0%, 8.2%以下 (n=5) であった。以上のように本法は精度、正確度に優れ、かつ従来法の問題点を克服する汎用性に富むものであった。

次いで、これまで疑問視する考えもあったヒト血漿中25(OH)D₃3Sの存在に検討を加えた。健康人血漿 (n=3) から除タンパク、固相抽出、疎水性陰イオン交換ゲル [piperidinohydroxypropyl Sephadex LH-20 (PHP-LH-20)] を用いるカラムクロマトグラフィーによりサルフェート画分を得、UV検出HPLCに付したところ、25(OH)D₃3Sに対応するピークが検出された。ピークの同定はHPLCによる分取後、UV又は電気化学検出HPLC、Dの*s-cis*-diene構造と選択的に反応するプレラベル化試薬4-[4-(6-methoxy-2-benzoxazolyl)phenyl]-1,2,4-triazoline-3,5-dione (MBOTAD) による誘導体化反応後の蛍光検出HPLC及びソルボリシス後のゲニン部の確認に基づいた。

以上のようにヒト血漿中における25(OH)D₃3Sの存在が明らかとなったことを踏まえて、その定量法を開発した。血漿 (0.5 ml) にISとして25-hydroxy-7-dehydrocholesterol [25(OH)proD₃] 3SのMBOTAD付加

体を添加後、除タンパク、ISOLUTE C18 (EC) カートリッジによる固相抽出、PHP-LH-20カラムによるサルフェートの分画、次いで脱塩操作に順次付したのち、UV検出逆相系HPLCにより分析した。その結果、ピークはいずれも血漿中内因性物質による妨害を受けておらず、回収率も満足し得るものであった。プール血漿への標準添加法により得られた回帰直線を検量線に用い、精度、正確度を吟味した結果、標品 (10, 20 ng/ml plasma) の添加回収率は91.2-102.9%, アッセイ内, アッセイ間変動のR.S.D.は各々14.2%, 6.0% (n=7) 以下と満足し得るものであった。なお、本法における検出限界及び定量限界は各々2 ng/ml及び5 ng/mlであった。本法はソルボリシス操作を伴わずサルフェートを直接定量するものであるうえ非放射性ISを使用しており、信頼性及び簡便性に優れたものであった。

開発した以上の定量法を駆使し、健康人 (n=25) 及び慢性腎不全患者 (n=12) 血漿中25(OH)D₃と25(OH)D₃Sの相関について検討した。その結果、健康人血漿では両者はほぼ同レベル (各々14.0±4.3, 15.0±3.8 ng/ml, mean ± S.D.) で存在しているものの、慢性腎不全患者のそれではサルフェートが遊離型よりも低値を示すものが多く、検出されない例が1/3にも及んだ (Fig. 2)。このように25(OH)D₃Sと病態との関連を示す報告がなされたのは今回が初めてであり、このことはいまだ不明とされている本代謝物の生理的意義などの解明上有用な知見になると期待される。

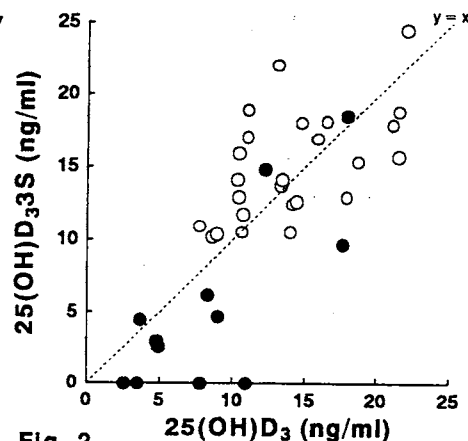


Fig. 2. Correlation between Concentration of 25(OH)D₃ and 25(OH)D₃S in Plasma from Healthy Subjects (O) and from Patients with Chronic Renal Failure (●)

3. 25-ヒドロキシビタミンDモノグルクロニドの合成と生体成分分析への応用

近年グルクロン酸抱合型D代謝物の存在が示唆されるに至った。しかしこれらの報告の多くは、標品が得られていないことなどから抱合体を加水分解後の間接的証明に基づくものである。そこで、生体内におけるDグルクロニドの存在を明らかとし、分析法を確立するうえ標品として不可欠な25(OH)Dのグルクロン酸抱合体 [25(OH)D₃-3G, -25G; 25(OH)D₂-3G, -25G] 計4種を合成し (Fig. 1), 次いで25(OH)D投与胆管ろうラット胆汁中における25(OH)DGを検索した。

各位置異性体の合成を種々検討の結果、25(OH)proD₃又はその3-acetateをmethyl (2,3,4-tri-O-acetyl- α -D-glucopyranosyl)uronate bromide及びAg₂CO₃を用いるKoenigs-Knorr反応に付し3-glucuronide acetate methyl ester (G') 又は25G'へ導き、各々を光開裂、熱異性化反応によるD骨格への変換、加水分解反応に付し、目的とする25(OH)D₃-3G又は-25Gを合成した。一方、25(OH)D₂Gの合成には25(OH)proD₂の25-tetrahydropyranyl ether又は3-acetateを基質とし、Koenigs-Knorr反応によるグルクロニド化、光開裂、熱異性化反応、加水分解反応に順次付し、目的とする25(OH)D₂-3G又は-25Gを合成した。

次いで、これら標品を指標とし、ラット胆汁中25(OH)DGの検索を行った。まず、25(OH)D₃を経口投与した胆管ろうラットより採取した胆汁を固相抽出後、PHP-LH-20カラムに付しグルクロニド画分を得た。本画分をUV検出HPLCに付したところ25(OH)D₃-3G及び-25Gに対応するピークが検出された。各ピークの同定は、HPLC分取によりさらに精製後、photodiode array UV検出HPLC, MBOTADによる誘導体化反応後の蛍光検出HPLC及び β -glucuronidase水解反応後のゲンニン部の確認に基づいた。また25(OH)D₂投与胆管ろうラット胆汁を同様に処理し、25(OH)D₂-3G及び-25Gに対応するHPLCの分取画分を得た。これらの同定には、熱に不安定で高極性を有するDの第II相反応生成物の有力な分析手段として期待されているLC/MSを用いた。まず標品とAcONH₄含有移動相を用い、フローインジェクション分析により検出条件を検討したところ、大気圧化学イオン化法 (APCI) の負イオン検出モードにおいて擬分子イオン ([M-H]⁻) がm/z: 587に明瞭に観察された。一方、正イオン検出モードでは特徴的なイオンの生成がみられなかったが、グルクロニドをメチルエステルに誘導することにより相対強度の

強いクラスターイオン ($[M+NH_4]^+$, m/z : 620) が観察された。そこで先のグルクロニド画分を負イオン検出LC/APCI-MSに、またメチルエステル化後、正イオン検出LC/APCI-MSに付したところ、いずれも対応するピークが検出された。このようにLC/MSによる同定は簡便で確実でありその有用性が明らかとなった。

ところで25(OH)Dの3位のみならず、立体障害の大きい25位の3級水酸基へもグルクロニデーションの起こることが判明したが、ステロイドの3級水酸基へのそれは数多くみられるものではなく、注目される知見である。

4. 結論及び考察

今回開発した25(OH)D₃及び25(OH)D₃3Sの定量法は、非放射性ISを用い、後者は脱抱合反応を伴わず、従来法に比し、簡便性及び信頼性に優れるものである。また、合成標品との比較による直接的な証明で、新たな第II相反応生成物である25(OH)D₃3S、25(OH)DGを各々ヒト血漿、ラット胆汁より単離、同定した。それに伴い、LC/MSがDの第II相反応生成物分析上有用であることを明らかとしたが、本分析法によりヒト体液中のグルクロニドを始め、未知とされている各種抱合型D代謝物とその生理的意義を含めて解明されることが期待される。

学位論文審査結果の要旨

本論文の審査は、各審査委員による提出論文内容の検討と平成9年7月23日開催の論文提出者による口頭発表、質疑応答の結果、及び早川審査員による語学（英語）試験成績の報告を基に同日開催の審査委員会で行われた。

本研究は、ビタミンD（D）代謝物、特に第II相反応生成物のより簡便で信頼性の高い分析法を開発し、臨床診断に寄与することを究極の目的として行われた。まず、ヒト血漿中におけるD₃の主代謝物である25-ヒドロキシビタミンD₃ [25(OH)D₃] のUV検出HPLCによる定量法を確立した。次いで標品を指標としてヒト血漿中25(OH)D₃3-サルフェートの存在を明らかとし、さらにUV検出HPLCによる定量法を開発した。これら定量法は、内標準物質として非放射性物質を、HPLCとして汎用性の高い逆相系を使用しており、またサルフェートの脱抱合操作を伴わないなど、従来法に比し簡便性及び信頼性に優れるものである。開発した方法により健常人と慢性腎不全患者血漿中における両代謝物の相関を求めたところ、後者では抱合体が著しい低値を示すなどの興味ある知見が得られた。続いて、体液中Dモノグルクロニド（G）分析法の開発上必要不可欠な標品である25(OH)D-3G、-25G計4種を合成した。これらを指標として25(OH)D投与胆管ろうラット胆汁中に25(OH)D3Gのみならず3級水酸基への抱合体である25Gが存在することを明らかとした。なおこの際、LC/MSがこの種の化合物の分析に有用なことを明らかとした。

以上の研究成果は、ビタミンD研究の歴史に新たな足跡を残すものとして高く評価される。よって本論文を博士（薬学）論文に値するものと判定する。