ステロイドの選択的捕捉と検出及び光触媒分解に関する研究

氏　　　　名	水口　竜人
学位の種類	博士(薬学)
学位記番号	博甲第９１８号
学位授与の日付	平成１９年３月２２日
学位授与の要件	課程博士（学位規則第４条第１項)
学位授与の題目	ステロイドの選択的捕捉と検出及び光触媒分解に関する研究
論文審査委員（主査)	島田　和武（自然科学研究科・教授)
論文審査委員（副主査)	中垣　良一（自然科学研究科・教授)，德村　邦弘（自然科学研究科・助教授)，山田　文夫（自然科学研究科・助教授)，東　達也（自然科学研究科・助教授)

Summary

The following two experiments concerning steroid analyses have been done. The first one is the development of the highly sensitive reagent to trap endogenous vitamin D related compounds selectively and the second one is the photocatalytic degradation of estrogen.

A sensitive and stable Cookson type reagent, 4-substituted 1,2,4-triazoline-3,5-dione, having 6-methoxy-2-phenylbenzoxazole as a fluorophore, was prepared for HPLC/fluorescence (FL) measurements of vitamin D metabolites. The reagent was purified by sublimation to give stable purple crystals. The reagent quantitatively produced the stable Diels-Alder adduct in 5 min at room temperature, which was highly responsive to fluorescence detection [model compound (provitamin D_3); detection limit; 2 fmol per injection (signal/noise=5)]. The reagent has been proved to be useful for the determination of vitamin D metabolites in biological fluids using not only HPLC/FL but also LC/MS.

Investigation of the functional group responsible for the photocatalytic degradation of estrogen, one of the endocrine disrupting chemicals, has been accomplished. Estrogens were subjected to photocatalytic degradation using titanium dioxide immobilized on glass beads as a catalyst, whose time courses were measured by HPLC or LC/MS. The monolithic silica column was mainly used for the separation of estrogens, which provided a satisfactory separation with a smaller retention factor than those obtained from the conventional columns.

Estradiol and estrone, which have a phenolic hydroxy group at the C-3 position, were gradually degraded by UV irradiation and nearly disappeared within 6 hr. The corresponding 17- or 3-glucuronide was degraded faster than the respective genin, estradiol or estrone. The double conjugate, estriol 3-sulfate 16-glucuronide, was also easily degraded within 3 hr. On the other hand, the degradation of estrogen 3-sulfate did not start within 2.5 hr but the reaction was completed within 6 hr. Unexpectedly, 3-desoxyestradiol, which does not have a phenolic hydroxy group at the C-3 position, was degraded like estradiol. These data did not agree with the previously proposed hypothesis that the photocatalytic degradation of estrogens is initiated at the phenolic hydroxy group, but showed that the glucuronic acid moiety plays an important role for the initiation in this degradation reaction.

All the obtained data are helpful in the development of clinical- and environmental-analytical chemistry.

はじめに

ステロイドはパーヒドロ-1,2-シクロペンテノフェナントレンを母核とする有機化合物であり，広く生物界に分布し，強い生理作用を発現するものが多い．このようなステロイド，特に生体内におけるそれの消長を的確に把握することは臨床診断や生命科学研究上極めて重要である．

ステロイドの定量法には種々のものが知られているが，大別すると従来からの化学的手法に基づく比色法，HPLC や GC に代表されるクロマトグラフ法，RIA や EIA に代表される各種結合タンパク質を用いる分析法になる．長い歴史を有する比色法は，その簡便性ゆえに臨床化学分析上一次スクリーニングなどで汎用されている．プロフィール分析可能なクロマトグラフ法，特に HPLC は GC では不可能なグルクロニド (G)，サルフェート (S) のような高極性化合物である抱合体などを水解することなく直接定量することを可能にし，その汎用性，高感度，高選択性よりステロイド定量法選択のファーストチョイスと考えられる．また GC/MS, LC/MS に代表されるハイファネイテッドテクニックは，クロマトグラフ法の高分離能と MS の豊富な情報量，高感度性を合わせ有する信頼性に優れる

分析法である．GC/MS はすでに完成されたものであるのに対し，LC/MS も実用化の段階から完成のそれに入り，特に優れたイオン化法の開発は，本法を現在最も信頼できる超高感度分析法にまで成長させた．各種結合タンパク質を用いる分析法では，用いる結合タンパク質の諸性質が方法論開発上で重要な役割を果たす．これらの方法はプロフィール分析には適さないが，高感度，高選択性を有し,多数の検体処理能力に優れることから臨床化学分析上マススクリーニングなどに汎用されている．以上紹介したいずれの方法も，ヒト体液（血液，尿，唾液）などの複雑なマトリックス中に超微量（ng－fg/mL レベル）で存在する測定対象ステロイドの選択的捕捉，続く検出が必須であることは言うまでもなく，特に科学の進歩した近年では益々その選択性と高感度化が要求されている．

一方 1990 年代以降，ヒトや動物から排泄されるエストロゲンが，いわゆる内分泌かく乱化学物質として大きな社会問題とされている．これらを除去あるいは分解して無害なものとするには種々の方法があるが，光触媒分解法もその一つであり，クリーンな方法として実用化に向けた研究が鋭意なされている．

以上のような近年のステロイド研究の動向を踏まえ，著者は以下のような研究を展開した．

1．ステロイドの選択的捕捉と検出に関する研究

現在我が国では超高齢化社会を迎え，骨粗しょう症が急増しているが，それと深く関係する生体内ビタミン D (D) 代謝物の選択的捕捉，続く検出を目的として蛍光 (FL) 検出 HPLC 用新規 Cookson 型試薬の開発を行った．すなわち，Cookson 型プレラベル化剤である 4-[4-(6-methoxy-2-benzoxazolyl) phenyl]-1,2,4-triazoline-3,5-dione (1; MBOTAD) を合成し，その諸性質の解明を行った (Chart 1)．本試薬は D の*s*-シスジエンと選択的に室温下容易に反応し安定な Diels-Alder 付加体を形成すると共に超高感度な応答 [model compound (provitamin D_3); 検出限界, signal/noise=5, 2 fmol] を示した．本試薬は合成が容易な上に，これまでの Cookson 型試薬と異なり，昇華精製が可能であり，長期間の保存にも耐え得る上，S などの抱合体に適用しても脱抱合を起こさず，安定な付加体を与えることが明らかとなった (Fig. 1)．このように本試薬は抱合型 D 代謝物などの分析法を開発する際の必要条件を満たす画期的なものであり，多くの分析法の開発に寄与した．例えば本試薬を用いた研究により 25-hydroxyvitamin $D_3$3S [25(OH)$D_3$3S] がヒト血中に 25(OH)D_3 と同程度存在することが明らかとなり，本抱合体が D の貯蔵型と考えられるに至った．

最近のビタミン D 代謝物分析は LC/MS によるが，本試薬は高い選択性と超高感度をもたらす LC/MS 用誘導体化試薬としても有用であり，その果たした役割は大きい．このような経緯を踏まえ，本試薬の前駆体であるウラゾール体 (10) が市販されるに至っている．

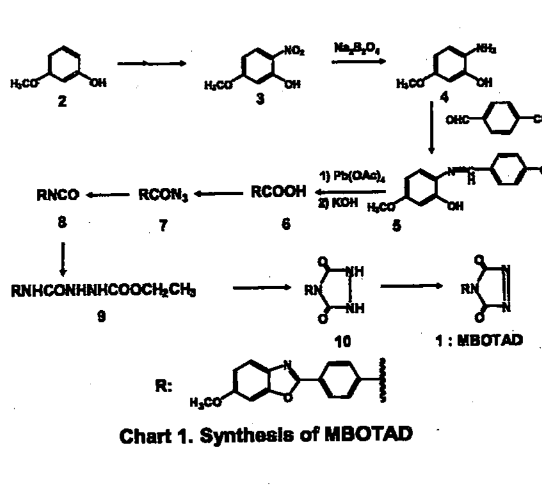


Chart 1. Synthesis of MBOTAD

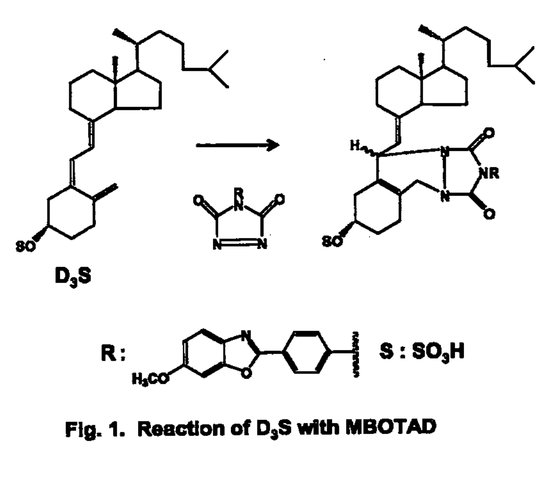


Fig. 1. Reaction of D_3S with MBOTAD

2．ステロイドの光触媒分解に関する研究

ヒトや動物からのエストロゲンが G や S などの抱合体として排泄されることに着目し，その光触媒分解における問題点を化合物の側から検討した．

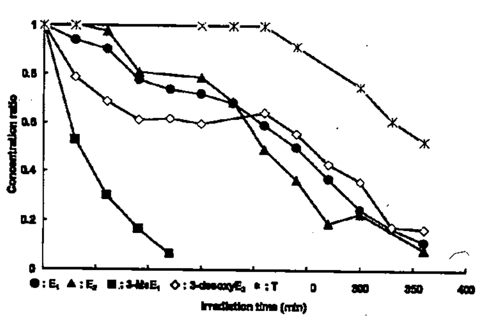
Estradiol (E_2) やestrone (E_1) は内分泌かく乱作用が懸念される環境中エストロゲンの代表的物質であるが，光触媒 (TiO_2 など) によりフェノール性水酸基を起源とするラジカル反応に基づいて分解されることが報告されている．このことから TiO_2 が E_2 や E_1 の分解に有用であることが示され，光

触媒の下水処理への応用が期待されている. しかし, 今回種々のエストロゲンの光触媒分解反応を精査したところ, 3 位の水酸基を持たない 3-desoxy 体 (3-desoxyE_2) は遊離型と同等, 3-methyl 体 (3-MeE_1) では遊離型より速く容易に光触媒分解が進行することが明らかとなった. その一方で 3-oxo-4-ene 構造を有する testosterone (T) では分解速度が遅く, やはり芳香環が反応に重要な役割を果たしていると考えられた (Fig. 2).

また, 3G 体 ($E_2$3G, E_1G), 17G 体 ($E_2$17G) では反応は早く進行し, 3S 体の中でもヒトの重要な抱合型エストロゲン代謝物である estriol 3S16G ($E_3$3S16G) は容易に分解されることからステロイド骨格に結合したグルクロン酸も反応のイニシエーションに重要な役割を果たしていると考えられた. 一方, 他の 3S 体 [ethynyl$E_2$3S (E$E_2$3S) など] の分解反応の開始が遅いという結果も得た (Fig. 3). さらに, 反応液への H_2O_2 の添加は E_2 などフェノール性水酸基を持つ遊離型エストロゲンの光触媒分解反応において有効であるが, フェノール性水酸基が硫酸抱合された E_1S や E$E_2$3S の分解には全く効果はみられなかった. このことは, 3S 体の分解のメカニズムが遊離型のそれとは異なることを示唆しているとも考えられる. また, E_1, E_2, digitoxin (Dt) の光触媒分解における中間体を精査し, 標品との比較により同定した. 前 2 者では以前からの報告通り, 中間体の一つとされる 9,11-dehydro 体が確認され, Dt からは digitoxigenin bis-digitoxoside (Dt-bis) の存在が初めて明らかとなった (Figs. 4 及び 5). このことは光触媒分解における糖部分の関与を示唆するものである.

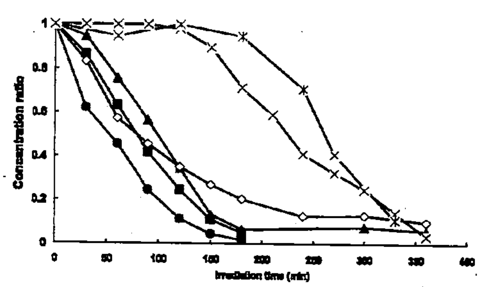
このように, エストロゲンの光触媒分解反応は抱合により促進される場合と阻害される場合があることを明らかとしたが, 実用化に際してはこの点にも配慮すべきである.

上記の研究は主にモノリス型シリカカラムを用いて遂行したが, 従来からのシリカ粒子充填型のそれに比して短時間での分離が可能であった. これにより organic modifier の使用量を少なくでき環境に優しい分析法として有用であった. しかし, 従来からの充填カラムの方が高理論段数を有し分離に優れる場合も見られたことから, 本カラムは比較的単純なマトリックス中における特定物質の経時変化を追跡する研究などに汎用されるものと思われる.



●: E_1 ▲: E_2 ■: 3-MeE_1 ◇: 3-desoxyE_2 *: T

Fig. 2. Photocatalytic Degradation of Unconjugated Steroids



●: $E_3$3S16G ▲: E_1G ■: $E_2$3G ◇: $E_2$17G ×: $E_1$3S *: E$E_2$3S

Fig. 3. Photocatalytic Degradation of Conjugated Estrogens

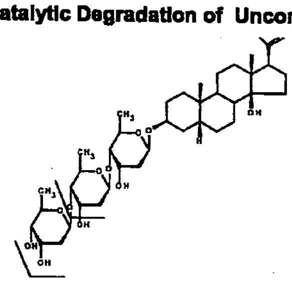


Fig. 4. Dt and Dt-bis

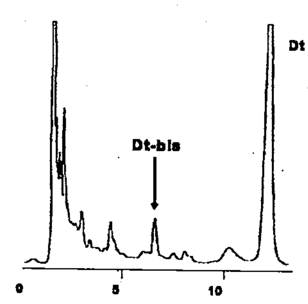


Fig. 5. Intermediate of Photocatalytic Degradation of Dt

HPLC conditions: Chromolith Performance RP-18e, MeOH-H_2O (3:2), 1 mL/min; 230 nm; Irradiation time 360 min

まとめ

以上のように生体内ビタミン D 代謝物の選択的捕捉, 続く検出を目的として新規 Cookson 型試薬を開発したが, 報告されている Cookson 型試薬で精製可能なものは数例しかなく, LC/MS 用のそれとしても有用であることから, 今後の益々の発展が期待される. また, エストロゲンが G や S などの抱合体として排泄されることに着目し, エストロゲンの光触媒分解反応では抱合により促進され

る場合と阻害される場合があることを明らかとしたが，実用化に際してはこの点にも留意すべきである．

以上のようにして得られた知見は，今後臨床化学分析及び環境分析化学上有用と期待される．

学位論文審査結果の要旨

1．ステロイドの選択的捕捉と検出用 Cookson 型試薬，MBOTAD の開発

現在我が国では骨粗しょう症が急増しているが，それと深く関係する生体内ビタミン D (D) 代謝物の選択的捕捉，続く検出を目的として，D の *s*- シスジエンと反応すると共に，蛍光検出 (FL) HPLC に高感度な応答を示す新規 Cookson 型試薬の開発を行った．すなわち，4-[4-(6-methoxy-2-benzoxazolyl)phenyl]-1,2,4-triazoline-3,5-dione (MBOTAD) を合成し，その諸性質を解明した．本試薬は合成が容易な上に，これまでの Cookson 型試薬と異なり，昇華精製が可能であり，長期間の保存にも耐え得るものであった．また，抱合体に適用しても脱抱合を起こさず，反応性にも優れ，容易に安定な Diels-Alder 付加体を与え，付加体は高感度な応答［検出限界：2 fmol (signal/noise=5)］を示した．このように本試薬は抱合型 D 代謝物などの分析法を開発する際の必要条件を満たす画期的なものであり，HPLC/FL による多くの D 代謝物分析法の開発に寄与した．また，LC/MS 用誘導体化試薬としても有用であった．

2．ステロイドの光触媒分解に関する研究

ヒトや動物からのエストロゲンがグルクロニド (G) やサルフェート (S) などの抱合体として排泄されることに着目し，その光触媒分解における問題点を化合物の側から検討した．Estradiol (E_2) は内分泌かく乱作用が懸念される環境中エストロゲンの代表的物質であるが，光触媒 (TiO_2 など) によりフェノール性水酸基を起源とするラジカル反応に基づいて分解されることが報告されている．しかし，今回種々のエストロゲンを用いて本分解反応を精査したところ，3 位の水酸基を持たない 3-desoxy 体が遊離型と同等，3-methyl 体では遊離型より速く容易に分解することが明らかとなった．また，3G 体、17G 体では反応は早く進行し，3S 体でもヒトの重要な抱合型エストロゲン代謝物である estriol 3S16G は容易に分解されることから，ステロイド骨格に結合したグルクロン酸も反応のイニシエーションに重要な役割を果たしていると考えられた．一方，他の 3S 体［estroneS, $E_2$3S など］の分解反応の開始が著しく遅いという知見も得た．このように，エストロゲンの光触媒分解反応は抱合により促進される場合と阻害される場合のあることを明らかとしたが，実用化に際してはこの点にも配慮すべきである．

以上の知見は，今後臨床化学分析及び環境分析化学上有用と期待され，博士(薬学)に相当するものと認める．