ヒト血中の活性型ビタミンD[3]分析法の開発

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-05 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 北堀, 淳一 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/16266

氏　　名	北　堀　淳　一
生　年　月　日	
本　　籍	石川県
学 位 の 種 類	博士(薬学)
学 位 記 番 号	博甲第327号
学位授与の日付	平成12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	ヒト血中の活性型ビタミンD3分析法の開発
論文審査委員(主査)	島田　和武(研究科・教授)
論文審査委員(副査)	太田　富久(薬学部・教授)　石橋　弘行(薬学部・教授) 鈴木　永雄(研究科・教授)　木津　良一(研究科・助教授)

学 位 論 文 要 旨

Abstract

The measurement of active form of vitamin D_3 [1α,25-dihydroxyvitamin D_3; $1,25(OH)_2D_3$] in human serum/plasma is important for the diagnosis of diseases influencing vitamin D metabolism. Although radioreceptor assay (RRA) using vitamin D receptor (VDR) is usually used for this purpose, the ambiguity is remained in its reliability. In order to obtain highly specific antibody to $1,25(OH)_2D_3$ which is useful for development of the simple/reliable analytical method, a novel haptenic derivative, 11α-(4-carboxybutanoyloxy)-$1,25(OH)_2D_3$ was synthesized in 21 steps from 11α,25-dihydroxycholesterol with a total yield of 0.36%.

Hapten-carrier conjugate was prepared by coupling with bovine serum albumin using active ester method. The specificity of anti-$1,25(OH)_2D_3$ antibodies elicited in rabbits was tested by a cross-reaction study with closely related vitamin D metabolites and the sensitivity was tested by means of [^{3}H]-RIA. The results indicated that the specificity of the antibodies obtained was higher than that of calf thymus VDR, but the sensitivity of the antibodies was lower than that of the VDR. Therefore, we utilized these antibodies for the immunoaffinity chromatography (IAC) as the pretreatment for the RRA.

The antibodies obtained were immobilized on Sepharose 4B to produce an immunosorbent. A plasma extract was applied to the IAC and the adsorbed $1,25(OH)_2D_3$ was eluted selectively with a satisfactory recovery rate. This IAC enabled a reliable RRA for $1,25(OH)_2D_3$ in human plasma,

which was confirmed by several experiments for validation.

1. はじめに

活性型ビタミンD_3である1α,25-ジヒドロキシビタミンD_3 [1,25$(OH)_2D_3$] は血清カルシウム濃度の恒常性維持に必須であり，各種骨疾患の診断指標，治療薬として重要である．さらに近年，各種細胞の分化誘導作用，免疫調節作用を有することが示され，ポテンシャルの高い医薬品として注目を集めている．このため，迅速かつ信頼性に優れる1,25$(OH)_2D_3$分析法の開発が切望されている．現在，1,25$(OH)_2D_3$の定量にはビタミンDレセプター (VDR) を用いるラジオレセプターアッセイ (RRA) が汎用されているが，本法はビタミンD_2系との識別に分取HPLCを要する上，再現性，信頼性等十分ではない．一方，特異抗体を用いるイムノアッセイは迅速かつ信頼性の高い測定値を得ることが可能である上，抗体は極めて安定で種々の化学修飾に耐え得ることから，イムノアフィニティークロマトグラフィー (IAC) 等への幅広い応用も可能である．この観点から，これまで抗1,25$(OH)_2D_3$抗体の産生が種々試みられてきた．しかし，従来の抗体のほとんどは1,25$(OH)_2D_3$の3位あるいは側鎖上をキャリア結合部位とするハプテンにより調製されているため十分な特異性を示すものは未だ得られておらず，実用化されるには至っていない．一方，11α位は妨害代謝物との識別上重要なA環及び側鎖から十分離れているため，この位置をキャリア結合部位に用いるとき，従来のそれに比べ特異性に優れる抗体の産生が期待される．そこで，11α位にブリッジを有する新規 [C-11α] ハプテン，11α-ヘミグルタリルオキシ-1,25$(OH)_2D_3$を合成した．次いで，そのウシ血清アルブミン (BSA) 結合体でウサギを免疫して [C-11α] 抗体を調製し，その諸性質を詳細に吟味してヒト血中1,25$(OH)_2D_3$分析における有用性について検討した．

2. 1,25$(OH)_2D_3$ [C-11α] ハプテンの合成

天然ステロイドの11α位へ化学的に水酸基を導入することは，一般に困難である．そこで本研究では，デヒドロエピアンドロステロンの微生物変換により大量に得られる11α-ヒドロキシ体に着目し，本化合物から10工程で合成できる11α, 25-ジヒドロキシコレステロール (1) を出発物質，Windaus法を基本として目的ハプテンの合成を行った．まず，1の3β位及び11α

位水酸基をそれぞれ選択的にTBS化，アセチル化した後，脱シリル化を行い11-アセチル体 (2) へ導いた．次に，2をDDQ酸化し，得られた1,4,6-トリエン-3-オン体を酢酸イソプロペニルを用いるエノールアセチル化及び$Ca(BH_4)_2$還元に順次付して1,5,7-トリエン体 (3) へ変換した．その5,7-ジエン構造をPTADとの付加体として保護した後，3β位水酸基をTBS化し，アセチル基を除去した (4)．引き続き，*m*-クロロ過安息香酸を作用させ1位二重結合をエポキシ化し，脱保護した後，$NaBH_4$によりエポキシ基を開裂して1α位に水酸基を導入した (5)．さらに，その3β位及び11α位水酸基をそれぞれ選択的に保護した後 (6)，光照射，熱異性化反応に付してビタミンD骨格へ変換した (7)．次いで，1位水酸基をTBS化した後，11α位を脱保護して，11α-ヒドロキシ体 (8) へ導いた．最後に無水グルタル酸との反応により11α位へブリッジを導入後，脱シリル化を行い，従来その合成が困難視されていた$1,25(OH)_2D_3$ [C-11α] ハプテン (9) を計21工程，通算収率0.36%で得ることに成功した (Chart 1)．

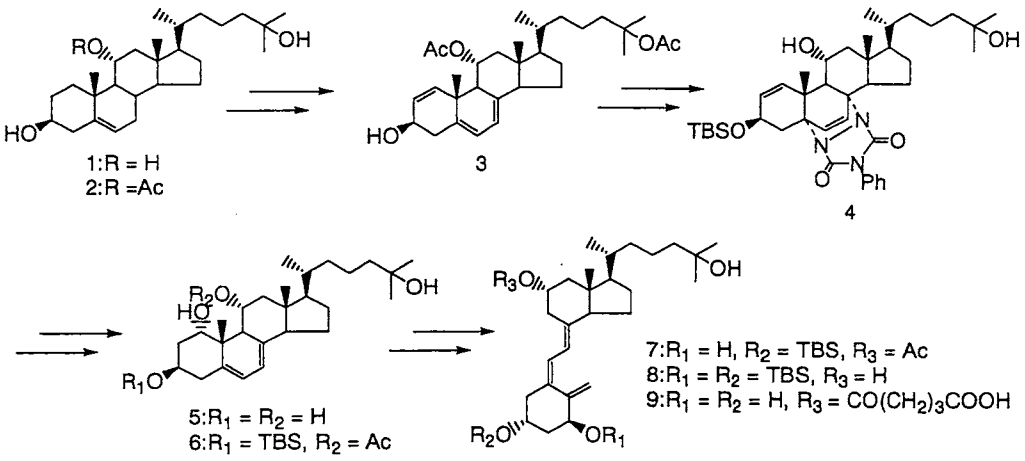

Chart 1

3. [C-11α] 抗体の諸性質

ハプテン (9) を*N*-ヒドロキシスクシンイミド法によりBSAと結合させて免疫原を調製した (ハプテン/BSA結合モル比 17)．本結合体でウサギ4羽を免疫し，得られた抗血清をプロテインAカラムに付し，ポリクローナル抗$1,25(OH)_2D_3$抗体4種 (Ab-1, 2, 3及び4) を得た．引き続き，これら抗体の諸性質をトリチウム標識抗原を用いるRIA ([^{3}H]-RIA) で吟味したところ，前3者は実用上十分な力価を示し，親和力も良好であった．次いで各種近縁化合物13種

との交差反応性を検討したところ，これら抗体はA環，側鎖，あるいは両者の構造を異にする化合物をいずれも良好に識別し，$1,25(OH)_2D_3$に極めて特異的であることが判明した．特に，同時に比較したウシ胸腺VDRでは大きく交差反応する$1,25(OH)_2D_2$，$1,24,25(OH)_3D_3$及び$1,24(OH)_2D_3$を良好に識別することは注目に値する．さらに，プロ体との交差反応性も極めて小さく，これら抗体がビタミンD骨格に特異的なことが示された (Table 1)．以上，今回得られた [C-11α] 抗体は$1,25(OH)_2D_3$のA環，側鎖のいずれをも良好に識別し，従来のそれ及びVDRを上回る極めて優れた特異性を有することが明らかとなった．しかし，本抗体を用いる[^{3}H]-RIAの感度がRRAのそれに及ばないことから，イムノアッセイの開発は見合わせ，この優れた抗体をIACに応用して有効に活かすこととした．

Table 1. Percent Cross-reactions of Anti-$1,25(OH)_2D_3$ Antibodies and Calf Thymus VDR (50% Displacement)

Compound	Antibody (IgG fraction)			Thymus VDR
	Ab-1	Ab-2	Ab-3	
$1,25(OH)_2D_3$	100	100	100	100
$1,25(OH)_2D_2$	< 0.02	0.28	< 0.03	78
D_3	< 0.005	< 0.01	< 0.01	< 0.001
D_2	< 0.01	< 0.01	< 0.01	< 0.001
$25(OH)D_3$	1.5	0.87	0.69	0.61
D_3 S	< 0.01	< 0.01	< 0.01	-
$25(OH)D_3$ 3S	5.3	1.5	0.48	0.002
$24,25(OH)_2D_3$	0.16	< 0.05	< 0.05	0.07
$25R,26(OH)_2D_3$	0.09	0.01	0.02	0.02
$25S,26(OH)_2D_3$	0.02	0.05	0.12	0.03
$1,24,25(OH)_3D_3$	1.9	0.30	0.51	27
1,25-lactone	0.45	0.44	< 0.08	1.1
$1,24(OH)_2D_3$	< 0.04	< 0.09	0.14	87
pro-$1,25(OH)_2D_3$	0.31	0.52	0.18	0.003

4. IAC/RRAによるヒト血中$1,25(OH)_2D_3$の測定

特に良好な特異性を示したAb-2及びAb-3の混合物 (1:1) を臭化シアンで活性化したSepharose 4Bに固定化し，抗体カラムを調製した．ヒト血漿をChem Elutカラムに付し脂質画分を抽出後，これを抗体カラムにアプライし，夾雑物をH_2O及び22.5% MeCNで順次洗浄，吸着画分を95% MeOHで溶出した．本IACによるヒト血漿からの$1,25(OH)_2D_3$の回収率は満足し得るものであったが，これ以外の生体内ビタミンD類のそれはいずれも十分に低く，本IACにより目的の$1,25(OH)_2D_3$を優れた選択性で抽出可能なことが示された (Table 2)．そこで，本

IACのウシ胸腺VDRを用いるRRAへの適用について検討した．なお，RRAの測定可能範囲は0.5-10 pg/アッセイであった．まず，本IAC/RRA法で得られた健常人22例の血漿中1,25$(OH)_2D_3$レベルをタンデムIAC/RRA法で得られたそれと比較したところ，良好な相関関係が認められた．なお，タンデムIAC/RRA法は先に当研究室で開発したもので，2種の抗体カラムを用いるため煩雑であるが，様々なバリデーション試験よりその信頼性が確認されている．また，添加回収試験及び骨代謝改善薬である1α-ヒドロキシビタミンD_3の経口負荷試験の結果も良好で，本システムが正確性に優れることが明らかとなった．日内及び日間変動係数は，各々7.4%，11.8%であり，本システムが優れた精度を有することが示された．本システムで測定した健常人30例の血漿中1,25$(OH)_2D_3$レベルは36.0±10.2 pg/ml (mean±S.D.) であり，従来の報告と符合する結果であった．一方，慢性腎不全患者8例については13.1±2.1 pg/mlと有意な低値が得られ，本システムが慢性腎不全の鑑別診断に十分適用可能なことが明らかとなった．

Table 2. Recovery of 1,25$(OH)_2D_3$ and Related Compounds through the Pretreatment Based on IAC

Compound	Recovery (%)[a)]
1,25$(OH)_2D_3$	60.3±6.7[b)]
1,25$(OH)_2D_2$	2.2
D_3	0.62
25$(OH)D_3$	2.0
25$(OH)D_3$ 3S	<1
24,25$(OH)_2D_3$	0.09
25*R*,26$(OH)_2D_3$	<1
25*S*,26$(OH)_2D_3$	<1
1,24,25$(OH)_3D_3$	<1
1,25-lactone	<1

a) Mean, n = 2
b) Mean±S.D., n = 30

5. 結語

今回，21工程を経て合成した1,25$(OH)_2D_3$ [C-11α] ハプテンを用いて極めて特異的な抗1,25$(OH)_2D_3$抗体の産生に成功した．本抗体を駆使して開発したIACは精製効率に優れており，分取HPLCを用いることなく，1,25$(OH)_2D_3$の分別定量が可能であった．また，イムノソルベントの複数回使用も可能であるなど，これまでに試みられた各種前処理カラムにはない優れた利点を有しており，RRAのみならず，RIA，酵素イムノアッセイあるいはLC-MSに

よる1,25$(OH)_2D_3$分析法の開発に際しても有用と期待される.

学位論文審査結果の要旨

本研究は，ヒト血中の活性型ビタミンD_3分析法の開発に関するものである。活性型ビタミンD_3は生体内カルシウムの恒常性の維持に必須であり，その消長(血中濃度40pg/mL程度)を把握することは骨粗鬆症の確定診断などに重要である。現在この定量には，固相カートリッジを用いる前処理法を組み合わせてradioreceptor assayが汎用されているが，その信頼性は疑問視されている。

そこで，新しい前処理法の導入を目指して全21工程を経てハプテンを合成し，それを基に優れた特異性を有する抗活性型ビタミンD_3抗体の調製に成功した。ついで，本抗体を用いてimmunoaffinity chromatography(IAC)を開発し，特異性の高い前処理法として多大な注目を集めた。ハプテンの合成は約2年を要し，これだけでも大変な研究であるが，それにより得られた抗体の特異性は，今までに報告されているものを凌駕する世界の最高水準を行くものである。また，IACの導入はビタミンD_3研究に新しい道を拓いたものとして十分な価値がある。

これとは別に，新規分析法として注目されているLC/MSを抱合型ビタミンD_3の分析に適用して，本分析法における誘導体化の有用性をも明らかとした。

本研究に関しては，すでに平成11年1月の事前審査において，特に優れた研究と認定され後期課程2年間での修了が認められている。さらに，口頭発表における試問などにも合格している。

以上を鑑み，本研究は博士(薬学)に相応するものと判断する。