

# 誘導体化 - LC/MSを基盤とする加齢性疾患関連ステロイドの高感度・精密分析法の開発

## Development of Highly Sensitive and Selective Analytical Procedures for Steroids Causing Age-related Diseases Using LC/MS Combined with Derivatization

東 達也

金沢大学大学院自然科学研究科薬学系

Tatsuya HIGASHI, Division of Pharmaceutical Sciences, Graduate School of Natural Science and Technology,  
Kanazawa University

わが国では急速な高齢化社会の訪れとともに、骨疾患や認知症そして癌などいわゆる加齢性疾患が急増している。このような疾患の中にはステロイドが関与しているものも多く、その生体内レベルの的確な把握は診断、病態解析あるいは薬物療法上不可欠である。この点に関して、現在LC/MSがその方法論として最有力視されているが、今日の医学・薬学分野における研究対象に対し、LC/MSの有する感度が不十分な場合も多い。また、未知成分の同定に際して、LC/MSでは得られる構造情報が少ないという欠点も有している。そこで、加齢性疾患と深く関係するステロイドに対し、検出あるいは構造情報指向誘導体化を組み合わせたLC/MSを基盤として、その診断や治療、そして最終的には新薬開発にも貢献できる高感度、高精密かつ実用的な分析法の開発を目的として以下の研究を展開した。

### 1. 検出指向誘導体化による超微量ステロイドの精密定量

LC/MSにおいて超高感度検出を達成するには、ESIやAPCIの原理に基づき、測定対象を各々に適した構造へと変換することが第一の課題である。例えば、ESI-MSでは常時荷電している構造の導入 (charged derivatization) により高感度な応答が得られる。そこで、微量アンドロゲン分析用に2-hydrazino-1-methylpyridineを開発したが、これを用いると約10 mgの前立腺癌組織 (針生検用に採取される組織量) で原因ステロイドであるジヒドロテストステロンの消長、つまり抗アンドロゲン剤の効果を明瞭に確認することが可能であった。さらに高感度化を目指すにはシグナル/ノイズ比の向上が重要な鍵を握る。すなわち、バックグラウンドノイズの低減が第2の課題となるが、電子捕獲APCIは電子親和性化合物のみが応答し、それが分子アニオンを生じることに基づいており、大きな利点を有している。そこで、認知症やストレス性障害と関連する神経活性ステロイドに対し、ニトロ基の高い電子親和力や得られる誘導体の気相イオンへの効率的な移行を考慮して2-nitro-4-trifluoromethylphenylhydrazineを開発した。これを用いるLC/電子捕獲APCI-MSを活用して拘束ストレス負荷実験を行ったところ、生体のストレス防御機構の一つである一連のプレグナン系ステロイドの急速な脳内生合成が観察された。

### 2. 構造情報指向誘導体化による抱合位置決定法

骨形成促進作用を有する24,25-ジヒドロキシビタミンD<sub>3</sub>由来の抱合型代謝物の構造解析に際し、charge mediated fragmentationを効果的に利用したプロダクトイオン生成法を考案した。すなわち、通常のESI-MS/MSでは脱水イオンなどしか観察されないのに対し、4-phenyl-1,2,4-triazoline-3,5-dioneを用いてビタミンD骨格の中心付近にプロトン付加 (荷電) の起こり易い窒素原子を導入すると、その近傍で開裂が起こり、抱合位置情報 (A環あるいは側鎖) を示すプロダクトイオンが得られることを見出した。本法や包接HPLCを駆使して代謝物を解析し、ビタミンD<sub>3</sub>の生理作用を減弱させる新規代謝経路、すなわち3位異性を発見したが、本知見は高持続性ビタミンD製剤開発への展開がなされている。

【謝辞】本研究を遂行するにあたり、終始ご指導を賜りました金沢大学大学院自然科学研究科薬学系教授 島田和武先生に心より深謝いたします。また、共同研究者の皆様にも厚くお礼申し上げます。