

氏名（本籍）	<small>まちだ こういち</small> 町田 晃一（東京都）
学位の種類	博士（薬学）
学位記番号	論博第 384 号
学位授与の日付	令和 5 年 7 月 12 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 2 項該当
学位論文題目	液体クロマトグラフィータンデム質量分析による脳卒中易発性高血圧ラットの血中エルゴステロールの定量と ISO11843-7 に基づく精度評価
論文審査委員	（主査）教授 袴田 秀樹 教授 柳田 顕郎 教授 三浦 剛 教授 井上 勝央

論文内容の要旨

エルゴステロールは、菌類の細胞膜を構成する主要なステロールであり、抗炎症作用、抗がん作用などが注目されている。一方、エルゴステロールの構造は植物ステロールと類似しており、その吸収、代謝経路は植物ステロールと同様と予想される。そのため、食事由来の植物ステロールの血中濃度が顕著に上昇するシトステロール血症では、増悪因子として作用する可能性がある。しかし、シトステロール血症におけるエルゴステロールの吸収、代謝挙動については、未解明の点が多い。

脳卒中易発性高血圧ラット（SHRSP）は、シトステロール血症の原因遺伝子の ABC（ATP-binding cassette）トランスポーターG5 と G8 に変異を有し、シトステロール血症のモデル動物として利用される。SHRSP に高エルゴステロール食を二週間負荷し、高エルゴステロール血症の誘導を試みた研究では、当初の予想に反し、エルゴステロール自身ではなく、ブラジカステロールの血中濃度が上昇することが報告された。この結果は、エルゴステロールがブラジカステロールに変換されることを示唆しているが、両ステロールの血中濃度の経時変化を追跡した報告はない。

そこで本研究では、この仮説を検証するために、内因性化合物との分別定量が可能な重水素標識エルゴステロール（ergosterol-*d*₁）と重水素標識ブラジカステロール（brassicasterol-*d*₁）を合成し、エレクトロスプレーイオン化（ESI）をイオン源とする超高速液体クロマトグラフィー質量分析（UHPLC-MS/MS）による高感度分析法の開発を行った。続いて、本法を SHRSP の血中の重水素標識エルゴステロールの定量に応用した。更に、研究の過程で、UHPLC-MS/MS による分析法開発の効率化の必要性を実感したことから、ケモメトリクスを活用する精度の評価法に注目し、その UHPLC-MS/MS への適用の可否を実験的に明らかにすることにした。

第1章 Ergosterol-*d*₁ 及び brassicasterol-*d*₁ の合成

第1章では、SHRSPへの投与実験及び分析法開発に用いるため、エルゴステロールとブラジカステロールの安定同位体標識を行った。合成した安定同位体標識化合物の構造を Figure 1 に示す。Ergosterol-*d*₁ は、エルゴステロールを原料として 3 α 位の水素を重水素に置換して調製した。まず、エルゴステロールの 5,7-ジエン構造の保護のため、4-フェニル-1,2,4-トリアズリン-3,5-ジオン (PTAD) を反応させ、PTAD 保護エルゴステロールを合成した。次に、クロロクロム酸ピリジニウム (PCC) を用い、3 位のヒドロキシ基をカルボニル基とした後、重水素化ホウ素ナトリウムを反応させ、3 α 位に重水素を導入した PTAD 保護 ergosterol-*d*₁ を合成した。次に、1,8-ジアザビシクロ[5.4.0]ウンデカ-7-エン (DBU) を用いて PTAD を脱保護し、ergosterol-*d*₁ を得た。反応スキームを 2 工程短縮したところ、エルゴステロール 10.8 g を出発物質として ergosterol-*d*₁ 1.74 g が得られ、重量収率を従来法の 9.5% から 16.1% に改善できた。Brassicasterol-*d*₁ は、ブラジカステロール 200 mg を出発物質として brassicasterol-*d*₁ を 62.8 mg (重量収率 31.3%) 合成できた。

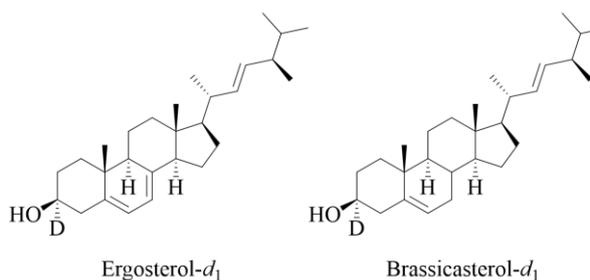


Figure 1 Structure of target compounds.

第2章 SHRSPにおける重水素標識エルゴステロールの血中動態の解析

第2章では、SHRSPにおけるエルゴステロールの血中動態と、その代謝物と想定したブラジカステロールの血中濃度推移を求めた。はじめに、UHPLC-MS/MSによるSHRSP血中 ergosterol-*d*₁ 及び brassicasterol-*d*₁ の高感度定量法を開発した。定量に際しては、6-ketcholestanol を内標準物質 (IS) として用い、測定対象のステロールと IS をピコリン酸エステル体へと誘導体化した。UHPLC 条件は、移動相に 0.1% 酢酸含有メタノール/0.1% 酢酸含有水溶液 (95/5, v/v)、固定相に ODS カラムを用い、カラム温度 50°C、流速 0.4 mL/min とした。MS/MS は、イオン源に ESI、測定モードを MRM (多重反応モニタリング) とした。添加回収試験の結果、SHRSP 血清へ高濃度 (4 μ g/mL)、中濃度 (2 μ g/mL) 及び低濃度 (0.4 μ g/mL) の ergosterol-*d*₁ と brassicasterol-*d*₁ をスパイクしたときの回収率は 95.6~119% の範囲にあった。また、RSD ($n=6$) は 7.5% 未満であり、高精度な測定が可能であった。本法は、少量の血清試料 (10 μ L) から ergosterol-*d*₁ 及び

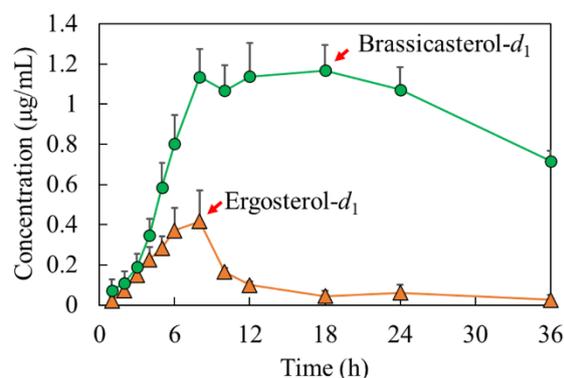


Figure 2 A mean (\pm standard error, SE) serum concentration-time profile of ergosterol-*d*₁ (closed triangle) and brassicasterol-*d*₁ (closed circle) in the serum of SHRSP that were administered a single oral dose of 100 mg/kg of ergosterol-*d*₁.

brassicasterol- d_1 をそれぞれ 0.02~8 $\mu\text{g/mL}$, 0.04~8 $\mu\text{g/mL}$ の範囲で定量可能であり, SHRSP における血中動態の実験に適用可能と考えられた. 次に, SHRSP に ergosterol- d_1 を 100 mg/kg の用量で経口投与し, 経時的に尾静脈から採血し, 血清を調製した. 血清を前処理してピコリン酸エステル化した後, ergosterol- d_1 及び brassicasterol- d_1 を定量した. Ergosterol- d_1 を経口投与した SHRSP における ergosterol- d_1 及び brassicasterol- d_1 の血中濃度-時間曲線を Figure 2 に示す. 本曲線から, 1-コンパートメントモデルに基づく ergosterol- d_1 の薬物動態 (PK) パラメータ求めた. Sprague-Dawley (SD) ラットに 100 mg/kg のエルゴステロールを経口投与した研究と比較すると, SHRSP の最高血中濃度到達時間 (t_{max}) は 7.0 時間, SD ラットは 8.0 時間であった. 血中濃度半減期 ($t_{1/2}$) は, SHRSP では 2.26 時間, SD ラットでは 5.9 時間であった. 最高血中濃度 (C_{max}) は SHRSP で 0.552 mg/mL であり, SD ラットの 2.27 mg/mL と比較して約 4 分の 1 であった Brassicasterol- d_1 濃度は, ergosterol- d_1 経口投与直後から ergosterol- d_1 の血中濃度よりも高くなり, 18 時間まで時間依存的に上昇し, その後徐々に減少した. Brassicasterol- d_1 の C_{max} は ergosterol- d_1 の C_{max} の 3 倍であった. SHRSP では, ergosterol- d_1 は速やかに血中から消失するのに対し, brassicasterol- d_1 の消失は緩やかであり, 両ステロールの血中濃度の経時変化は明瞭に異なることが示された.

第 3 章 ISO 11843-7 の活用による超高速液体クロマトグラフィー-タンデム質量分析の精度評価の省力化

UHPLC-MS/MS は, 高感度な定量分析に利用できるが, 装置構成が複雑であるため設定すべき測定条件が多く, 最適化に要するリソースの削減が求められている. 従来, UHPLC-MS/MS の最適化は, 同一サンプルについて繰り返し測定を行って統計学的に求めたピーク面積の相対標準偏差 (RSD) を指標にして検討される. 近年, ケモメトリクスを活用した精度の評価法が提案されており, その 1 つである Function of Mutual Information (FUMI) 理論は, 1 回の測定で得られるクロマトグラムのベースラインノイズの確率論的性質を利用し, RSD を推定する関数を取り扱う. FUMI 理論は国際標準化機構の ISO 11843-7 に採用されており, UHPLC-MS/MS の精度評価に ISO 11843-7 が適用できれば, 最適化に要するリソースの削減と省力化が期待できる. そこで第 3 章では, ISO 11843-7 による精度評価の UHPLC-MS/MS への適用の可否について, 実験的に明らかにした.

精度評価のための測定対象は, 第 2 章で重水素標識体を取り扱ったエルゴステロールのピコリン酸エステル誘導体 (Erg-PE) とした. まず, MRM クロマトグラムのベースラインノイズのパワースペクトル解析を行い, UHPLC-MS/MS のノイズが ISO 11843-7 で扱う確率過程で近似できることを実証した. Figure 3 には, ISO-11843-7 によって求めた Erg-PE の精度プロファイル (実線の曲線) と繰り返し測定 ($n=6$) によって求めた Erg-PE の RSD をプロットした. ISO 11843-7 で求めた精度プロファイルは, 繰り返し測定で求めた RSD の 95%信頼区間内にあり, UHPLC-MS/MS の精度評価に ISO 11843-7 が適用可能であることが示された. 次に, MRM クロマトグラム測定において重要な設定条件となるが, ISO 11843-7 において表記されていないデ

ータのサンプリング速度やデジタル処理などが精度評価に及ぼす影響を検討した。サンプリング速度については 2, 5, 10, 20, 40 points/s を設定できる UHPLC-UV で検討した。いずれの条件においても ISO 11843-7 で求めた RSD は繰り返し測定で求めた RSD の 95%信頼区間内であり、サンプリング速度の影響を受けずに精度評価を行えることが示された。さらに、クロマトグラムの S/N 比向上のために汎用されるデジタル処理であるノイズフィルタについては UHPLC-UV を、移動平均については UHPLC-MS/MS を用い、ISO 11843-7 による精度評価が適用可能か検討した。その結果、ノイズフィルタや移動平均などの生データを後処理したクロマトグラムからも適切な RSD が得られることが示された。本研究で明らかにした精度評価におけるサンプリング速度やデジタル処理に関する知見は、ISO 11843-7 の実用性の向上に大きく寄与するものである。

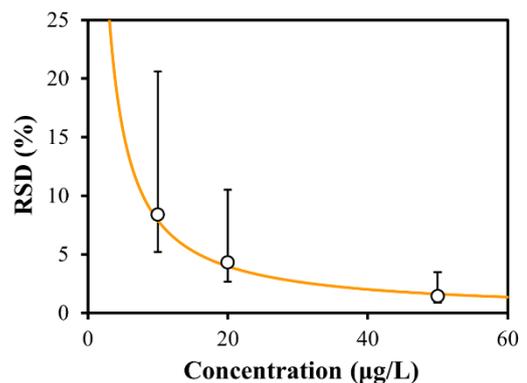


Figure 3 Precision profiles of Erg-PE obtained from multiple reaction monitoring chromatograms. Open circles indicate the relative standard deviations (RSDs) of peak areas that have been estimated by repetitive measurements ($n=6$ each). Error bars indicate the 95% confidence bands of the RSDs by repetitive measurements. The solid line denotes the RSDs of the peak area estimated by ISO 11843-7 ($n=1$).

総括

本研究では、エルゴステロール及びその代謝物のブラジカステロールの血中濃度推移を観察することを目的とし、両ステロールの重水素標識体を合成した。次に、6-ketocholestanol を IS とし、UHPLC-MS/MS によるピコリン酸エステル誘導体化した ergosterol- d_1 と brassicasterol- d_1 の高感度定量法を開発した。SHRSP の実験では、ergosterol- d_1 を単回経口投与し、UHPLC-MS/MS によって血中の ergosterol- d_1 と brassicasterol- d_1 を同時定量し、両者の経時変化を明らかにした。更に ergosterol- d_1 の血中濃度-時間曲線から、SHRSP におけるエルゴステロールの PK パラメータを求めることができた。また、ISO 11843-7 は UHPLC-MS/MS の精度評価に適用可能なことを実証し、精度評価に必要なリソースが削減できることを示した。

【研究結果の掲載誌】

- 1) K. Machida, Y. Koseki, A. Kotani, K. Yamamoto, T. Miura and H. Hakamata, *Anal. Methods*, **14**, 4879-4885 (2022).
- 2) K. Machida, R. Watanabe, A. Kotani, Y. Hayashi and H. Hakamata, *Anal. Sci.*, **38**, 183-189 (2022).
- 3) K. Machida, A. Kotani, Y. Hayashi and H. Hakamata, *J. Mass Spectrom.*, **57**, e4877 (2022).

【論文審査の結果の要旨】

本論文は、脳卒中易発性高血圧ラット (SHRSP) におけるエルゴステロールの血中動態の解析のための安定同位体標識化合物の合成、それらを測定対象とする新規分析法の開発、並びに分析法の性能評価を取り扱ったものである。SHRSP は、ABC トランスポーターG5 及び G8 に遺伝子変異を有し、シトステロール血症のモデル動物として利用される。しかし、シトステロール血症におけるエルゴステロール代謝に関する研究は乏しく、情報が不足していた。本研究では、エルゴステロールの重水素標識体を合成し、エレクトロスプレーイオン化 (ESI) をイオン源とする超高速液体クロマトグラフィータンデム質量分析 (UHPLC-ESI-MS/MS) による高感度分析法を開発し、経口投与後のエルゴステロールの血中動態の解析へと応用した。結果として、SHRSP におけるエルゴステロールの血中濃度の経時変化と、その代謝物であるブラジカステロールの血中濃度の経時変化に関して、新規知見が得られている。加えて、ケモメトリクス的手法によって UHPLC-ESI-MS/MS の精度が求められることを示した。

第 1 章では、SHRSP への経口投与実験並びに分析法の開発のための使用を目的として、エルゴステロール及びその代謝物と想定したブラジカステロールの安定同位体標識を行った。まず、エルゴステロールを出発物質とし、従来法を改良し、6 工程を 4 工程 (4-フェニル-1,2,4-トリアゾリン-3,5-ジオン (PTAD) による 5,7-ジエンの保護、3 位のヒドロキシ基のクロロクロム酸ピリジニウム (PCC) による酸化、NaBD₄ によるカルボニル基の還元、PTAD の脱保護) に短縮し、ergosterol-*d*₁ を合成した。次に、ブラジカステロールを出発物質とし、3 位のヒドロキシ基の PCC 酸化、NaBD₄ による還元によって、brassicasterol-*d*₁ を合成した。以上から、目的とする質と量の ergosterol-*d*₁ と brassicasterol-*d*₁ を調製できた。

第 2 章では、第 1 章で合成した ergosterol-*d*₁ と brassicasterol-*d*₁ を測定対象、6-ketocholestanol を内標準物質とし、それらをピコリン酸エステルへと誘導体化してから UHPLC-ESI-MS/MS によって分離定量する高感度分析法を開発した。SHRSP の血清の前処理法を検討し、10 µL の血清から ergosterol-*d*₁ 及び brassicasterol-*d*₁ をそれぞれ 0.02~8 µg/mL、0.04~8 µg/mL の範囲で定量可能であることを示した。SHRSP に ergosterol-*d*₁ を 100 mg/kg の用量で経口投与し、経時的に尾静脈から採血し、血清中の ergosterol-*d*₁ 及び brassicasterol-*d*₁ を定量した。得られた血中濃度-時間曲線から、1-コンパートメントモデルに基づく ergosterol-*d*₁ の薬物動態 (PK) パラメータを求めた。更に、ergosterol-*d*₁ 経口投与後の SHRSP の brassicasterol-*d*₁ の血中濃度-時間曲線を描くことができた。

第 3 章では、UHPLC-ESI-MS/MS の分析能パラメータの内、精度の評価に要するリソースの削減を目的として、ISO 11843-7 の適用について検討した。ISO 11843-7 に基づき、ピコリン酸エステル化したエルゴステロールの多重反応モニタリング (MRM) クロマトグラムのベースラインノイズから精度プロファイルを求めたところ、ノイズパラメータから算出した精度は、実際の繰り返し測定のパーク面積の RSD の 95%信頼区間内であることを示した。したがって、ISO 11843-7 は UHPLC-ESI-MS/MS の精度評価に適用でき、1 回のクロマトグラム測定から精度を求められることが分かった。加えて、UHPLC-ESI-MS/MS 測定におけるデータのサンプリング速度や、データのデジタル処理が ISO 11843-7 による精度評価に与える影響について検討し、ISO

11843-7 の適用可能な測定条件を明らかにした。

脂質は、タンパク質や核酸などの他の生体構成物質と比較し、分子の多様性を特徴としており、且つ、生体試料中のダイナミックレンジが広いことから、定量分析法の開発は分析化学的にチャレンジングである。更に、ステロール脂質は ESI によるイオン化効率が低いため、高感度検出には様々なアプローチを採らざるをえない。本研究では、UHPLC-ESI-MS/MS の特長を十分に活用し、ピコリン酸エステル誘導体化を行って、血清中のエルゴステロールとブラジカステロールの高感度分析法の開発に成功している。更に、UHPLC-ESI-MS/MS の精度の評価にケモメトリクス的手法が適用できることを示し、精度評価に要するリソースの削減の道筋を示している。これらの情報は、脂質分析を行う研究者や技術者にとって、非常に有用であると考えられる。以上のように本論文は、複数のアプローチを巧妙に組み合わせて、高感度分析法を開発し、目的の血中動態の解析へと応用できている。よって、本論文は、博士（薬学）の学位論文として十分な価値を有するものであると判断する。