

## 論文の内容の要旨

論文題目 ドーパミン酸性代謝物の高感度分析法の開発ならびに  
腎におけるドーパミン代謝への COMT 及び MAO の  
寄与評価系への応用

氏名 三橋 和人

### 【序論】

ドーパミンはノルアドレナリンやアドレナリンの生合成中間体としてだけでなく、それ自身も脳や腎などにおいて、生体機能の調節に重要な役割を果たしていることが知られている。腎においては、腎皮質の近位尿細管細胞で生成され、D<sub>1</sub>レセプターを介したNa<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATP ase 活性の阻害により、Na<sup>+</sup>利尿作用を示すと言われている。また腎は、ドーパミン代謝酵素である catechol-O-methyltransferase (COMT) 及び monoamine oxidase (MAO) の活性が全身の中で最も高い臓器の一つである。私はドーパミンの代謝過程が、尿量調節に寄与しているのではないかと考え、既知の2つの代謝経路を評価できる分析系を確立することを目的とした。ドーパミンの代謝経路は、MAOによる代謝を受け3,4-dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC)を生成し、その後 COMTによる代謝を受けて homovanillic acid (HVA)を生成する経路と、COMTによる代謝を受けて 3-methoxytyramine (3-MT)を生成し、その後 MAOによる代謝を受けて HVAを生成する経路の2つがある(図1)。ドーパミン代謝過程を把握するためには、これらの4種の分子を分析する必要がある。ドーパミン、3-MTの2種については既に当研究室で開発した高感度分析法を用い、残る2種の酸性代謝物 DOPAC 及び HVA の高感度分析法の開発を試みた。測定対象試料として、腎局所での代謝を反映すると考えられるマイクロダイアリゼイトと、腎局所と共に全身の代謝を反映すると考えられる尿試料を選択した。

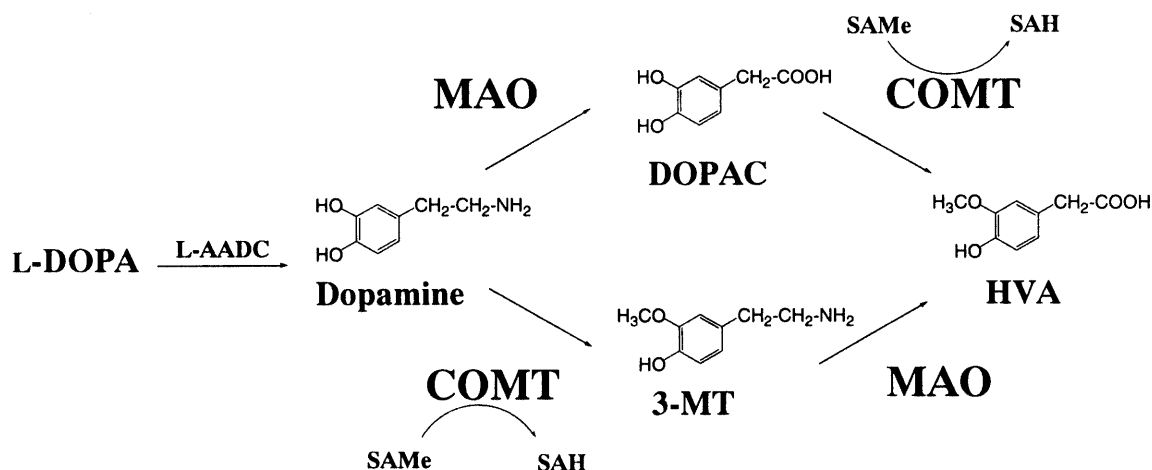


図 1. ドーパミンの代謝経路

## 【実験方法・結果・考察】

### 1. ラット尿中 DOPAC 及び HVA の DBD-PZ 誘導体化による高感度分析方法の開発

従来、酸性代謝物の HPLC の検出には電気化学検出が用いられてきた。しかし、高感度である反面、耐久性に乏しく多数の検体を連続測定する場合問題が生じる。そこで、DOPAC、HVA をカルボン酸用標識試薬 4-(*N,N*-dimethylaminosulfonyl)-7-piperazino-2,1,3-benzoxiazole (DBD-PZ) により誘導体化後、HPLC-蛍光検出する高感度分析法の開発を試みた。しかし、尿は多数の夾雑物質を含むため、そのままでは誘導体化に適さない。そこで、尿試料の DBD-PZ 誘導体化前処理方法、誘導体化後処理方法、HPLC 条件の 3 項目について検討を行った。

#### 1-1) 誘導体化前処理方法の検討

尿試料から、DOPAC 及び HVA を同時に固相抽出する方法を検討した。各種固相について抽出条件を検討した結果、DOPAC、HVA の有するフェノール性水酸基に注目し、フェノール類やカルボン酸の保持に選択的な Shodex SPEC EDS-1 (100mg) を用いたところ、目的物質の保持とメタノールによる回収に優れていた (>90%)。

#### 1-2) 誘導体化後処理方法の検討

DBD-PZ 蛍光誘導体化後の固相抽出による精製方法として、逆相固相、順相固相、イオン交換相と逆相固相との混合相による精製の 3 通りを検討した。その結果、オクチル基とトリメチルアミノプロピル基の混合相である Bond Elut certify II が 40%メタノールでの洗浄効果が高く、1%酢酸含有 60%メタノールで DOPAC、HVA を高い回収率で回収 (>90%) できることが判明した。

#### 1-3) HPLC 条件の検討

移動相としてメタノール/水系を基本としてグラディエント溶離を適用し分離条件を詳細に検討した結果、DOPAC と HVA のピークの分離検出の可能性が出てきた。

### 2. 腎マイクロダイアリゼイト中の DOPAC 及び HVA のエチレンジアミン蛍光誘導体化による高感度分析法の開発

腎マイクロダイアリゼイト中 DOPAC 及び HVA は、低濃度のため、更に高感度な分析法が必要

である。そこで、カテコール環がエチレンジアミンと選択的に反応し蛍光を有することに着目し、当研究室でこれまでに開発されたカテコールアミン-エチレンジアミン蛍光誘導体化法を改良し、これに適用することを考え、ドーパミン酸性代謝物の高感度自動分析計の開発の検討を行った。

#### 2-1) 誘導体化条件の検討

DOPAC を指標として誘導体化反応温度、反応コイル長さ(反応時間)について検討した結果、誘導体化反応は 30 m(内径 0.5 mm)の反応コイル中 120°C、約 7 分間とすることに決定した。

#### 2-2) 電気化学的酸化条件の検討

DOPAC 及び HVA を同時分析するために、3 位が *O*-メチル化された HVA を電気化学的に酸化し、*O*-キノン体とした。酸化電圧 0.4V で HVA は最大蛍光強度を示し、DOPAC は酸化による影響を受けなかった。

#### 2-3) オンラインでの DOPAC 及び HVA の抽出条件の検討

移動相 10 mM リン酸緩衝液 (pH 3.2) で、注入した DOPAC 及び HVA を強陰イオン交換前処理カラムに保持させることができた。DOPAC 及び HVA は 8 分から 12 分に溶出し、この画分を ODS カラムへ供し両者の分離を行った。

#### 2-4) 高感度自動分析計の開発

以上の検討より、図 2 に示す高感度自動分析計を開発した。これを 3 での実験で得られた試料に適用したところ、DOPAC 及び HVA 濃度は、それぞれ 5 nM、13 nM 程度であることが判明した。直線性、検出感度、真度、精度ともに良好であり、本方法がラット腎マイクロダイアリゼイト中 DOPAC 及び HVA 定量に適用可能な方法であることが示された。

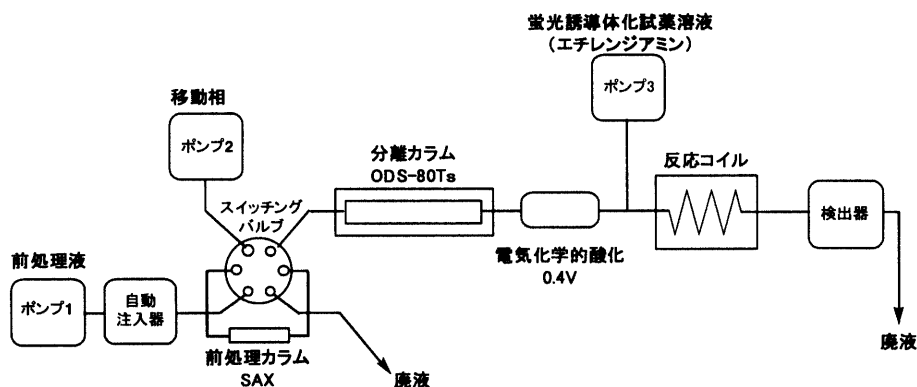


図 2. 高感度自動分析計

### 3. ドーパミン灌流法による腎でのドーパミン代謝への COMT 及び MAO の寄与評価

まず、ラット腎皮質に BAS 社製リニアプローブ LM-5 を装着し、リングル液を氷冷下流速 2 μL/min で灌流した。安定化後回収されたマイクロダイアリゼイト中の各代謝物 (DOPAC, 3-MT, HVA) 濃度を 2 で開発した方法、及びカテコールアミンとそれらの 3-*O*-メチル代謝物分析計で定量した。また、透析膜の回収率から、透析膜周辺の間質液中各代謝物濃度を算出すると、DOPAC 130 nM, 3-MT 6 nM, HVA 390 nM であった (DOPAC / 3-MT / HVA=22 / 1.0 / 65)。算出した濃

度には、細胞間質液中に漏出する原尿中の各代謝物の影響も含まれると考えられ、腎のみの COMT 及び MAO によるドーパミン代謝を直接反映しないと考えた。そこで、透析膜周辺の間質液中に内在性のドーパミンに比べて過剰量のドーパミンを段階的に灌流し、透析膜周辺間質液中の各代謝物濃度の変化率を比較すれば、腎での COMT 及び MAO 代謝の寄与を反映することが出来ると考えた。安定化後リンゲル液に溶解したドーパミン溶液 (0.5, 1, 2.5, 5, 10  $\mu$ M) を氷冷下流速 2  $\mu$ L/min で灌流した。灌流液のドーパミン濃度を上昇させると、濃度依存的に 3-MT、DOPAC 濃度は上昇した (図 3)。直線性が見られたドーパミン灌流濃度 0.5–2.5  $\mu$ M の範囲で、DOPAC、3-MT、HVA それぞれについて、濃度変化率を算出した。その結果、DOPAC / 3-MT / HVA = 2.2 / 1.0 / 9.8 であった。リンゲル液灌流時の値と比較すると、ドーパミン代謝への COMT の寄与 (3-MT, HVA 生成) が高く評価されている。

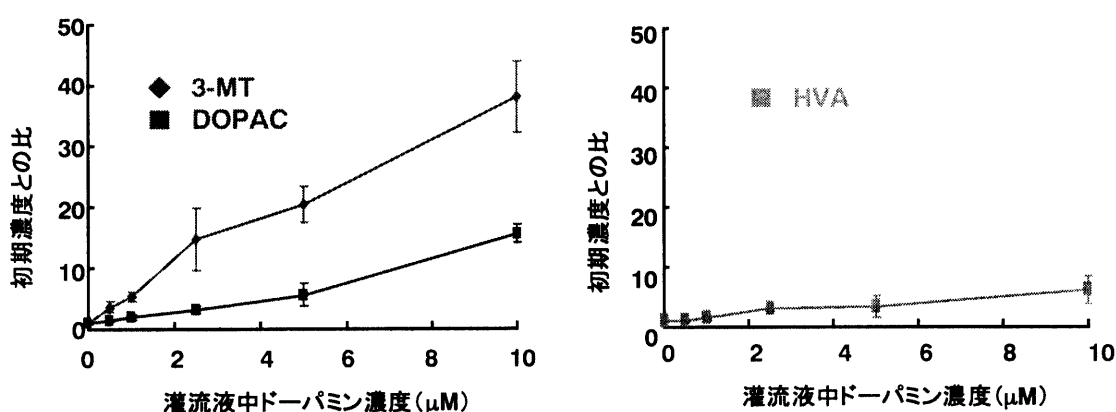


図 3. ドーパミン灌流時の各代謝物の初期濃度からの変化

#### 【総括】

本研究において、DBD-PZ 誘導体化前後でのラット尿試料中 DOPAC 及び HVA の精製方法を検討し、今後それらの精製に最適な固相を開発する上での基礎となる情報を得た。また、HPLC 条件を検討し、DOPAC 及び HVA の分離検出の可能性について示唆を与えた。

次に、エチレンジアミン蛍光誘導体化法を用いてラット腎マイクロダイアリゼイト中 DOPAC 及び HVA の高感度自動分析法を開発した。オンラインでの前処理カラムの選択性を高める工夫によって、腎マイクロダイアリゼイト以外の試料にも適用可能になると考えられる。

また、ドーパミンの灌流によってプローブ周辺組織のドーパミン濃度を一定にし、その濃度を変化させた時の COMT 及び MAO 代謝物濃度の変化率を算出することで、COMT 及び MAO によるドーパミン代謝状態の評価を試みた。その結果、ドーパミン代謝は速やかに COMT 及び MAO による代謝を受けること、また、リンゲル液灌流の結果から見積もられるよりもドーパミン代謝への COMT 代謝の寄与が大きいことが示唆された。今後 COMT 及び MAO 阻害剤投与をドーパミン灌流法と組み合わせることによって、2 つの代謝過程の優先順位についても示唆が得られると考えられる。ドーパミン灌流法は、灌流するドーパミンの総量も少なく、毛細血管への透過が生じても全身に与える影響は少ないと考えられ、局所の COMT 及び MAO 代謝の状態を議論する方法として今後の応用が期待される。