

審査の結果の要旨

氏名 三橋和人

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同時に、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、D₁レセプターを介した Na⁺-K⁺-ATP ase 活性の阻害により、Na⁺利尿作用を示すと言われている。ドーパミンは、monoamine oxidase (MAO) による代謝を受け 3,4-dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC) を生成し、その後 catechol-O-methyltransferase (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。本研究はドーパミンの代謝過程の尿量調節への寄与を調べるため、まず尿中ならびに腎マイクロダイアリゼート中のこれら代謝物の定量法を確立し、ついで代謝経路を評価することを試みた。ドーパミンおよび 3-MT は既に報告した高感度分析法を用いて定量し、本研究では酸性代謝物 DOPAC および HVA の高感度分析法の開発を試みた。

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が、高感度ではあるが、耐久性に乏しく多数の検体を連続測定することは困難であった。そこで、申請者は DOPAC、HVA をカルボン酸用標識試薬 4-(N,N-dimethylaminosulfonyl)-7-piperazino-2,1,3-benzoxadiazole (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。ところで、尿は多数の夾雑物質を含むため、直接誘導体化することは困難である。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

各種固相を用いて、尿試料から DOPAC および HVA の同時抽出について検討した。フェノール類やカルボン酸の保持に選択的な Shodex SPEC EDS-1 が、DOPAC、HVA の保持とメタノールによる回収に優れていた。

1-2) 誘導体化後処理方法の検討

DBD-PZ 蛍光誘導体化後の試料について、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 3 通りの精製法を検討した。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/水系を基本として勾配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が可能となったが、尿試料中の夾雑物からの完全分離は困難であった。

2. 腎マイクロダイアリゼート中の DOPAC および 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ート中 DOPAC および HVA は、低濃度のためさらに高感度な分析法が必要である。そこで、当研究室で既に開発されているカテコールアミン-エチレンジアミン蛍光誘導体化法を改良・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を試みた。

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℃、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 および 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-キノン体とする条件を検討した。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緩やか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

以上の検討を基に高感度自動分析計を開発した。これを後述の腎マイクロダイアリゼート試料に適用したところ、DOPAC および HVA 濃度は、それぞれ 5 nM および 13 nM であることが判明した。本法の直線性、検出感度、真度、精度はともに良好であり、本方法がラット腎マイクロダイアリゼート中 DOPAC および HVA 定量に適用可能な方法であることが示された。

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

ラット腎皮質にリニアプローブ LM-5（BAS 社製）を装着し、安定化後リングル液に溶解したドーパミン溶液（0.5、1、2.5、5、10 μ M）を氷冷下流速 2 μ L/min で灌流した。回収した試料を 2 で開発した方法、およ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。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 および DOPAC 濃度は上昇した。両者の初期濃度からの上昇の程度は COMT 代謝物（3-MT）が MAO 代謝物（DOPAC）を上回っていた。

以上、本研究は、ラット尿中および腎マイクロダイアリゼート中の DOPAC および HVA の精製法の検討ならびに高感度定量法の開発を行い、これを用いて、ドーパミン灌流による腎マイクロダイアリシスプローブ周辺組織の COMT および MAO 代謝物濃度の変動を検討し、ドーパミン代謝経路の評価を試みている。本研究は緒についたばかりであり、薬

学に於ける分析化学への寄与度は大きいとは言えないが、今後、本法を利用したドーパミン代謝の尿量調節への寄与検討への一つの道を示したものと考えられ、博士（薬学）に適合するものと認められた。