



Title	高感度，特異性に優れたGC/MS法によるポリオール経路活性の測定
Author(s)	岸本，通彦
Citation	大阪大学，1996，博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/39455
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏 名	岸 本 通 彦
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	第 1 2 2 4 8 号
学 位 授 与 年 月 日	平 成 8 年 2 月 2 2 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第4条第2項該当
学 位 論 文 名	高感度, 特異性に優れた GC/MS 法によるポリオール経路活性の測定
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 鎌 田 武 信 (副査) 教 授 松 沢 佑 次 教 授 荻 原 俊 男

論 文 内 容 の 要 旨

【目 的】

糖尿病患者の細小血管合併症や大血管障害は、患者の予後を規定する重要な因子である。これらを引き起こす高血糖による障害、いわゆる glucotoxicity の一つとしてポリオール経路の亢進があげられるが、その機序は必ずしも解明されているとは言い難い。最近では、ポリオール経路活性化に伴う NADH/NAD 比増加による還元ストレス、NADP/NADPH 増加による酸化ストレスを含めてポリオール経路全体の流れが、糖尿病合併症の原因に関与すると考えられている。従って、高血糖に伴う細胞障害の解明には、各細胞におけるポリオール経路活性を測定することが重要である。ポリオール経路は、アルドース、アルデハイド還元酵素をはじめとするアルドーケト還元酵素群に属する数種の酵素が担っており、この代謝経路の活性測定には、各組織細胞中のこれら酵素全ての活性を測定することが必要であるが、従来のソルビトール測定法では、特異性や感度の問題のため詳細な検討は不可能であった。

そこで、著者は、単糖類の誘導体に、従来の方法に比し簡便で、誘導体物質が安定なトリフルオロアセチル（以下 TFA と略す）化誘導体法を採用し、さらに、内部標準物質に6個の炭素すべてが安定同位体¹³Cである U- [¹³C] ソルビトール (¹³C₆H₁₄O₆) を用いた GC/MS 法によるソルビトール定量法を導入して、本方法に対するグルコース、NADPH の影響を検索し、特異性に優れ、高感度なソルビトール測定法の確立を試みた。加えて、赤血球、および、肝の検体を用いて本方法によるポリオール経路の活性測定への応用の可能性を検討した。

【対象ならびに成績】

1. TFA 誘導体化 GC/MS 法のソルビトール特異性、感度、再現性の検討

① ソルビトールの誘導体化

本方法のソルビトール特異性を検討するために、ソルビトール、グルコース、マンノース、キシリトール、ガラクトール、リビトール、ミオイノシトール、ガラクトース、フルクトース、アラビトール、マニトール (Sigma Chemical Company) 2mg に、N-methyl bis [tri-fluoroacetamide] (MBTFA[®], Pierce) 20 μl, Pyridine 20 μl を加え、40℃で60分間加熱して TFA 誘導体化し、GC/MS にて検出される mass/charge (以下 m/z と略す) 比とその

溶出時間を調べた。GC/MS 装置は G-3000/M-2000 (日立製作所) を使用した。ガスクロマトグラフィーカラムは、SE-30 キャピラリーカラム (30m X 0.25mm I.D.) を用いた。ポリオールと糖類は、GC/MS で m/z547, 613, 643, 645 と比較的大きなフラグメントイオンが検出され、これらフラグメントイオンの溶出パターンを測定することで、良好に分離可能であった。この TFA 誘導体化 GC/MS 法では、ソルビトールを m/z645 で検出し、他のポリオールとの分離も良好で、特異的に測定できた。内部標準物質である U- ^{13}C ソルビトールは、非標識ソルビトールと同じ溶出時間に、非標識ソルビトールで m/z645 相当のフラグメントイオンを m/z651 に検出した。以上より、この U- ^{13}C ソルビトールを内部標準物質として用いた TFA 誘導体化 GC/MS 法によるソルビトール測定法では、未知量の非標識ソルビトールと内部標準物質の U- ^{13}C ソルビトールとの比を、m/z645 と m/z651 の強度比で測定することとした。

② ソルビトール濃度の測定

ソルビトール量測定における定量性を評価するために、5mmol/L のグルコースと、0 から 0.04mmol/L までの濃度のソルビトールを加えた溶液、および、さらに溶血赤血球液を加えた溶液を作成し、TFA 誘導体化後、内部標準物質に U- ^{13}C ソルビトールを使用した GC/MS 法にて溶液中のソルビトールを測定し、感度と再現性を調べた。ソルビトールだけの溶液、溶血赤血球を加えた混合液とも、加えたソルビトール量と本方法にて検出したソルビトール量との間に、相関係数 0.999 ($n = 36$), 0.997 ($n = 36$) と良好な相関および直線性を示した。本方法によるソルビトール定量は、最小 100pmol まで可能であった。また、4 $\mu\text{mol/L}$ のソルビトールに、1mmol/L の NADPH, 5, または 15mmol/L のグルコース、赤血球抽出液を加え、測定系に与えるこれら影響を検討した。グルコース、NADPH の存在下においてもソルビトールの定量性に変化はなかった。また、その測定値の変動、CV 値は 4.3% ($n = 24$) であり、感度、再現性とも優れていた。

2. 赤血球、肝の検体中のアルドーケト還元酵素活性の測定

① 赤血球の酵素活性測定

健常者 (平均年齢 27.8 ± 2.3 歳) より採血した赤血球を、洗浄後溶血させ、1mmol/L の NADPH と 5, または、15mmol/L のグルコースとを加え、その赤血球中の還元酵素により生成されるソルビトール量を経時的に測定した。赤血球混合液からソルビトールの抽出は、エタノール除蛋白法を用いた。上清を遠心濃縮器にて乾燥後、TFA 誘導体化を行ない、この GC/MS 法を用いてソルビトール量を測定した。5mM Glucose 時のポリオール経路の活性は、 $0.34 \pm 0.04\text{nmol/min/gHb}$ で、15mM Glucose 時は、 $0.71 \pm 0.05\text{nmol/min/gHb}$ であった。次に、種々の濃度のグルコースと反応させ、酵素特性を検討したところ、赤血球中のアルドーケト還元酵素の V_{max} は、 $4.42 \pm 0.26\text{nmol/min/gHb}$, K_m は $115 \pm 19\text{mM}$ であった。

② 肝の酵素活性測定

ヒト移植用肝臓 5 例 (平均年齢: 29.4 ± 13.9 歳) を用い、ホモジェナイズ後、その細胞質分画とグルコース、NADPH をリン酸緩衝液中で反応させ、生成されるソルビトールを TFA 誘導体化 GC/MS 法により定量、赤血球と同様に酵素特性を検討した。肝においても、還元酵素活性を認め、その V_{max} は $0.773 \pm 0.090\text{nmol/min/mg protein}$, K_m は $755 \pm 132\text{mM}$ であった。本方法は微量なソルビトール量の測定が可能であり、アルドース還元酵素が存在しないと思われていた肝においてアルデハイド還元酵素によるポリオール経路の活性を検出した。

【総括】

本報告は、グルコースや他のポリオール含有の影響を全く受けず、特異性が高く、高感度なソルビトール測定法として、内部標準物質に U- ^{13}C ソルビトールを用いた TFA 誘導体化 GC/MS 法を示した。本方法を用いることで、肝組織中にアルデハイド還元酵素によるポリオール経路の活性を検出し得た。本測定法は、組織中、培養細胞中の還元酵素によりグルコースから生成されるソルビトール量を定量可能で、ポリオール経路の活性の測定に適していると考えられた。

論文審査の結果の要旨

糖尿病患者にとける glucose toxicity の機序として、ポリオール経路代謝活性の亢進が推定されているが、これまで、その測定は不可能であった。

本研究では、GC/MS 法に、内部標準物質として U- ^{13}C ソルビトールを用いる事、誘導体化法としてトリフルオロアセチル化法を導入する事により、特異性が高く、高感度なソルビトール測定法を開発した。本測定法は、グルコースや他のポリオールの影響を受けないため、生体中の還元酵素が生成するソルビトール量を定量することを可能とし、赤血球や肝組織におけるポリオール経路の代謝活性の測定に応用可能であった。

本研究は、特異性が高く、高感度なソルビトール測定法を開発したことで、学位の授与に値するものと考えられる。