

平成 21 年 6 月 23 日現在

研究種目：基盤研究 (C)	
研究期間：2007～2008	
課題番号：19590047	
研究課題名 (和文)	副腎皮質培養細胞系を用いる抗ストレス薬評価を目的としたステロイド類定量法の開発
研究課題名 (英文)	Development of analytical method for the determination of adrenal steroids with the aim of evaluating anti-stress drugs by bovine adrenal cortical cell culture system.
研究代表者	
大和 進 (YAMATO SUSUMU)	
新潟薬科大学・薬学部・教授	
研究者番号：60057370	

研究成果の概要：ヒトはストレスによってコルチゾールをはじめとするストレスホルモンを過剰分泌するため、これらを適度に抑制することは生体機能維持に重要と考える。本研究では、ステロイドホルモン合成の律速段階となるプレグネノロンおよび17-ヒドロキシプレグネノロンの簡便で再現性のよいセミマイクロ HPLC 定量法を開発した。この定量法をウシ副腎皮質培養細胞系を用いて、抗ストレス薬（薬用人蔘サポニン代謝物）の評価法として応用した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2008 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・物理系薬学

キーワード：抗ストレス薬評価法、プレグネノロン、セミマイクロ HPLC

1. 研究開始当初の背景

長期間の過剰なストレスは、副腎皮質からのコルチゾール等の過分泌を引き起こし (Fig. 1)、消化器症状、高血圧、糖新生の亢進、免疫機能の低下などが引き起こされる。この過剰のコルチゾール産生に対して適度な抑制を行い、ステロイドホルモンの濃度を調節し、生体機能を維持することは重要である。コルチゾールの分泌機構は、コレステロールより側鎖切断酵素チトクローム P450_{scc} を介してプレグネノロンが産生され、これが律速段階となってコルチゾールなどのホルモンが分泌される。プレグネノロンは、P450_{scc} による最初の生成物であり、ステロイドホルモンの生

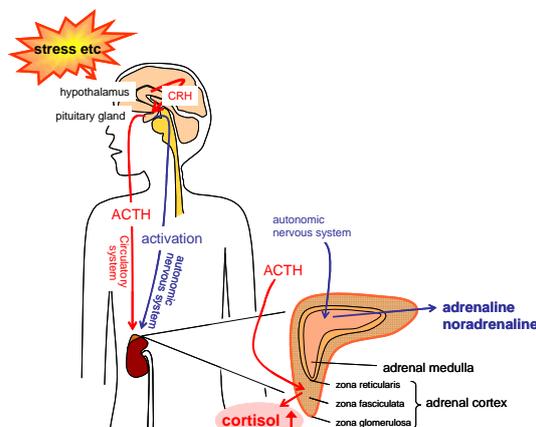


Fig. 1 Stress and secretion of adrenal hormones.

成過程の律速段階となることから(Fig. 2)、ステロイドホルモンの中でも特に重要な化合物であり、定量の必要性がある。しかしながら、プレグネノロンを分離、定量するには、紫外部に特徴的な吸収を持たないため、UV 検出 HPLC での測定が困難で、GC-MS などを用いて測定を行うのが一般的であるが、生体試料、細胞培養液からの抽出においては、濃縮乾固などの操作で時間を要し、煩雑である。そのため、汎用されている HPLC を用いて、簡便で再現性のよい定量法の開発が必要であると考えた。

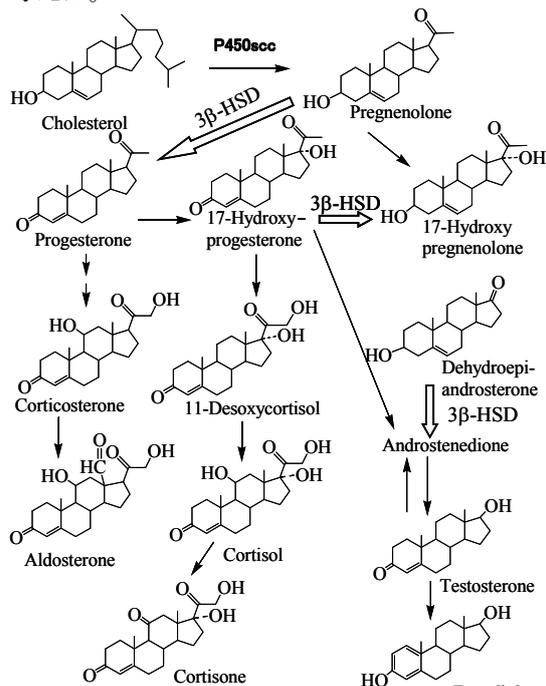


Fig. 2 Synthetic pathway of adrenal steroid hormones.

2. 研究の目的

プレグネノロンおよび 17-ヒドロキシプレグネノロンについて、コレステロールオキシダーゼを用いてオンラインで酵素変換を行い、プレグネノロンは UV 吸収のあるプロゲステロンに、17-ヒドロキシプレグネノロンは 17-ヒドロキシプロゲステロンに変換し、カラムで分離後、240 nm で検出するシステムを構築する。さらに、この開発した定量システムを応用して、薬用人参サポニン代謝物におけるステロイドホルモン分泌の抑制効果について検討を行い、抗ストレス薬としての評価を行う。

3. 研究の方法

(1) 固定化コレステロールオキシダーゼリアクター/セミマイクロ HPLC システムの構築

① 固定化コレステロールオキシダーゼリ

アクターの作成

これまでに当研究室で行っている方法 (Yamato S *et al*, *Anal. Chimi. Acta*, 406,191-199, 2000) を用いて、以下のように IMER を作成した。Aminopropyl-CPG を 0.5 g 量り取り、2.5% glutaraldehyde/0.1 M phosphate buffer(pH 7.0)10 ml を加え、減圧下で 1 時間攪拌した。ガラスフィルターでろ過し、精製水で洗浄後、0.1 M phosphate buffer(pH 6.0)に溶解したコレステロールオキシダーゼ(1.0 mg/ml)を 10 ml 加え、氷冷下で 2 時間攪拌し、その後室温で 2 時間攪拌した。ガラスフィルターでろ過し、0.1 M phosphate buffer(pH 7.0)で洗浄後、さらに精製水で洗浄した。1% sodium tetrahydroborate/0.1 M phosphate buffer(pH 6.0)10 ml を加え室温で 1 時間攪拌後、ガラスフィルターでろ過し、精製水で洗浄した。ゲルを 0.1 M phosphate buffer(pH 7.0)に懸濁し、ステンレス-スチールカラム(10×4 mm I.D.)内に充填して Immobilized enzyme reactor (IMER) を得た(Fig. 3)

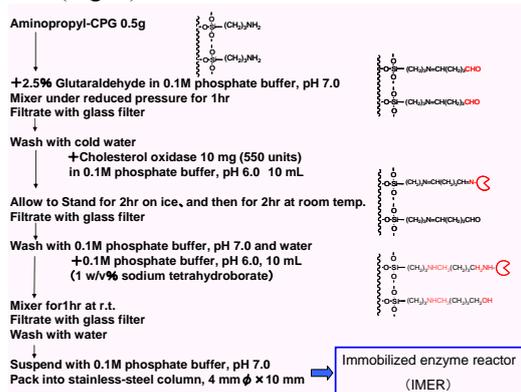


Fig. 3 Preparation of immobilized enzyme reactor.

② セミマイクロ HPLC システムの構築

トラップカラムに Shiseido Guard Cartridge Capcell MF Ph-1 (2.0 mmφ×10 mm)、分析カラムに Shiseido Capcell PAK C1 (150 mm×2.0 mm I.D, Type UG 120) を用いた。送液ポンプ A、B は共に Shimadzu LC-10ADvp を使い、ポンプ A からは 0.05 M phosphate buffer(pH 7.0)を流速 0.3 ml/min で送液し、固定化酵素リアクターを平衡化させた。ポンプ B は IMER の洗浄用として水を用いた。ポンプ A より送液される buffer で平衡化された固定化酵素リアクター中へサンプルインジェクターより試料を注入し、酵素変換を行わせた後、生成物をトラップカラムで捕集した。システムバルブ 2 を切り替え、ポンプ C より送液される移動相により生成物をバックエリユートして分析カラムへ送り込んだ。ポンプ C は Shimadzu LC-10Ai を使い、移動相にアセトニトリル/水 = 50 : 50、流速 0.15 ml/min で分離カラムから

目的物質を溶出させた。カラム温度は 40°C、検出器は Shimadzu SPD-M10Avp 型紫外可視吸光度計を用いて測定波長 240 nm でモニターした(Fig. 4)。また、試料注入量は 5 μ l とした。

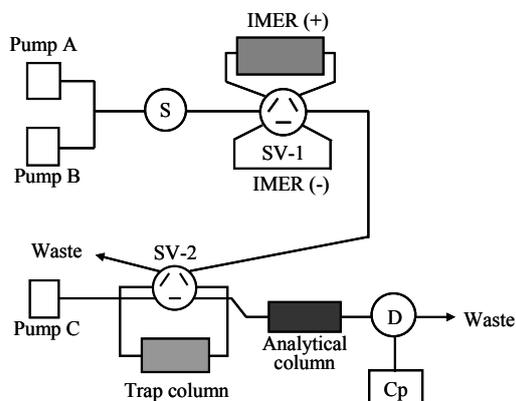


Fig. 4 Schematic diagram of immobilized cholesterol oxidation enzyme reactor/ semi-micro HPLC.

(2) 標品を用いた試料調整法

プレグネノロンおよび 17-ヒドロキシプレグネノロンそれぞれを 2-propanol に溶かしたものを原液として用いた(1 mg/ml)。このプレグネノロン溶液及び 17-ヒドロキシプレグネノロン溶液の一定量を量り取り、20% 胆汁酸塩(終濃度 1%)、80%アセトニトリルを添加して試料溶液とした。

(3) 細胞培養液の前処理法

ウシ副腎皮質培養細胞から得られた反応液(1.8 mL)は、C8 カートリッジ(BOND ELUT-C8, 50 mg, 1 ml, VARIAN)を用いて、プレグネノロンおよび 17-ヒドロキシプレグネノロンを保持させた後、精製水 2 ml で洗浄した。さらに、80%アセトニトリル 300 μ l で溶出し、濃縮、精製した。その溶離液に可溶化剤として胆汁酸塩(終濃度 1%)を添加し、遠心分離後、その上清を試料溶液とした。

(4) ウシ副腎皮質培養細胞の調製法

ウシ副腎皮質の束状帯-網状帯をスライスし、2 mg/ml Type I コラゲナーゼ(200 units/ml)、0.2 mg/ml デオキシリボヌクレアーゼ、100 units/ml ペニシリン、0.1 mg/ml ストレプトマイシンを添加して 45 分間 37°C で反応後、ろ過した。さらに、遠心(100 \times g, 5 分)後、得られた細胞を KRP で洗浄、遠心し、DMEM/Ham's F-12(1:1)、10%FBS、ペニシリン、ストレプトマイシンを添加し、dish(35 mm)に植えた。CO₂ の存在下、4 日間培養して ウシ副腎皮質培養細胞を得た。

(5) ウシ副腎皮質培養細胞を用いた抗ストレス薬の評価

ウシ副腎皮質培養細胞は、1 ウェル当たり、

2 \times 10⁶ 個の細胞を用い、ACTH および 3 β -HSD 酵素阻害薬であるトリロスタンの存在下あるいは非存在下で、37°C 1 時間培養しその上清(細胞外液)および細胞の超音波破碎液(細胞内液)を定量用の試料とした。この培養細胞実験系に薬用朝鮮人蔘のサポニン代謝物である 20(s)-protopanaxatriol (M4) を添加あるいは無添加で定量し、抗ストレス薬としての評価を行った。なお、この M4 はこの培養細胞系で蛍光法によるコルチゾール定量を行って、ACTH 刺激によって産生されるコルチゾールを、M4 が抑えていることを別途確認して、抗ストレス薬の候補とした。

(6) 開発したセミマイクロ HPLC 法と GC-MS 法との定量性の確認

プレグネノロンおよび 17-ヒドロキシプレグネノロンの水酸基をトリメチルシリル誘導体化(60°C、30 分)し、GC-MS 測定した。5 α -cholestane を内標準物質として SIM モードで定量し、開発した固定化コレステロールオキシダーゼリアクター/セミマイクロ HPLC システムとの定量の相関性を確認した。

4. 研究成果

(1) 固定化コレステロールオキシダーゼリアクター/セミマイクロ HPLC システムの開発

オンラインで固定化酵素リアクターのコレステロールオキシダーゼと反応させることにより、プレグネノロンはプロゲステロンに、17-ヒドロキシプレグネノロンは 17-ヒドロキシプロゲステロンにそれぞれ酵素変換され、240 nm に吸収を持つ物質に変換されて、ピークとして確認された。変換された 17-ヒドロキシプロゲステロンは 11.6 min に、プロゲステロンは 13.8 min に、ピークが認められた(Fig. 5)。

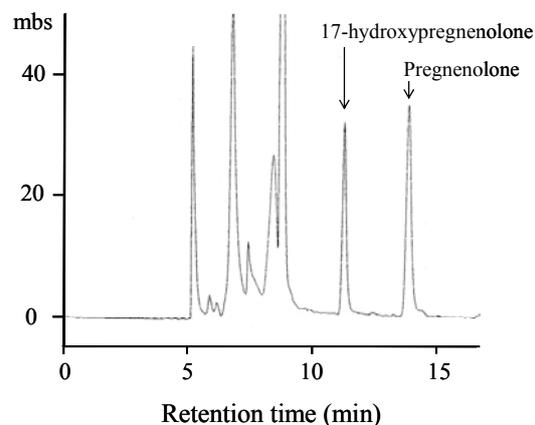


Fig. 5 Typical chromatogram of pregnenolone and 17-hydroxypregnenolone obtained by cholesterol oxidation enzyme reactor/semi-micro HPLC system.

プレグネノロンからプロゲステロンへの変換率は90.3%、17-ヒドロキシプレグネノロンから17-ドロキシプロゲステロンへの変換率は99.6%と良好な値が得られた。さらに、プレグネノロンの定量範囲は、0.3~10 µg/ml で相関係数は0.9996、17-ヒドロキシプレグネノロンの定量範囲は0.4~10 µg/ml で相関係数は0.9989 と良い直線性が得られた。今回開発した HPLC 法と GC-MS 法の間には、良好な相関性 (プレグネノロン $R^2=0.995$ 、17-ヒドロキシプレグネノロン $R^2=0.974$) が認められ、開発した HPLC 法の信頼性が確認された。

(2) ウシ副腎皮質培養細胞系への応用

①ウシ副腎皮質培養細胞からのステロイドホルモンの産生条件の検討

細胞のみのコントロールでは、検出されず、ACTH 刺激のみの場合でも、ステロイドホルモンのカスケードが進行し、プレグネノロンおよび17-ヒドロキシプレグネノロンは、定量下限未満であった。ACTH 刺激条件下で、3β-HSD 酵素阻害薬のトリロスタンを加えた

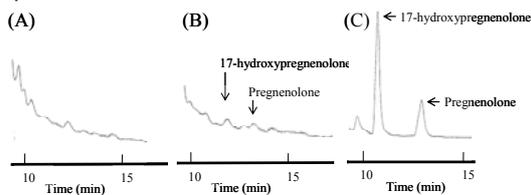


Fig. 6 Chromatograms of pregnenolone and 17-hydroxypregnenolone secreted by bovine adrenal cortex cells.

(A) control (no ACTH stimulation in the absence of trilostane), (B) ACTH stimulation in the absence of trilostane, (C) ACTH stimulation in the presence of torilostane.

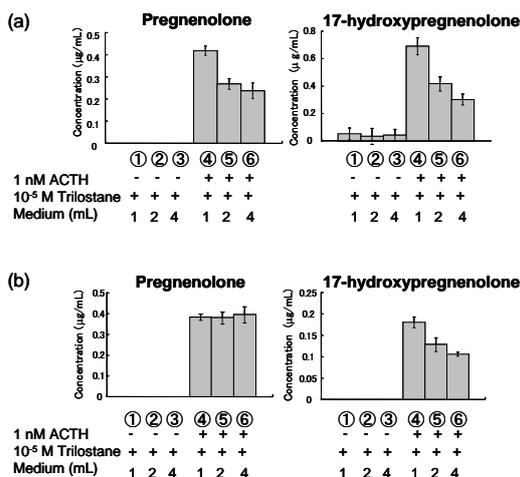


Fig. 7 Effect of medium volume on the extracellular and intracellular production of pregnenolone and 17-hydroxypregnenolone with or without ACTH stimulation in the presence of trilostane. (a) extracellular, (b) intracellular.

ところ、ステロイドホルモンのカスケードが抑えられ、プレグネノロンおよび17-ヒドロキシプレグネノロンが蓄積された(Fig. 6)。

この細胞培養系を用いて細胞培養液の量を変化させたところ、細胞内外の濃度変化が認められた。細胞外/内の濃度比は、プレグネノロンで0.6~1.1、17-ヒドロキシプレグネノロンで3~4として得られ、プレグネノロンは細胞内に、17-ヒドロキシプレグネノロンは細胞外に多く分布していた。また、プレグネノロンは細胞内の濃度が一定であり、過量に産生されたプレグネノロンが細胞外へ単純拡散されていると思われ、17-ヒドロキシプレグネノロンとは異なる分泌挙動を示した(Fig. 7)。また、上記の結果から、抗ストレス薬の評価系には、培養液量2 mLを用いることとした。

②ウシ副腎皮質培養細胞を用いた抗ストレス薬の評価

抗ストレス薬としての効果を評価するために、トリロスタン存在下でM4をウシ副腎皮質培養細胞に添加し、ACTH 刺激によって産生される細胞内外のプレグネノロンおよび17-ヒドロキシプレグネノロンの定量を行った。その結果、細胞外液においてM4は有意な抑制効果を示し、M4の抗ストレス薬としての有効性が確認された(Fig 8)。さらに、細胞内外ともに同様の抑制効果を示したことから、

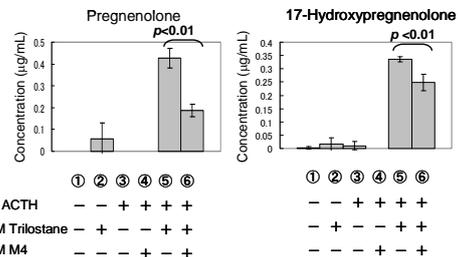


Fig. 8 Inhibitory effect of M4 on the extracellular production of pregnenolone and 17-hydroxypregnenolone with or without ACTH stimulation in the presence or absence of trilostane.

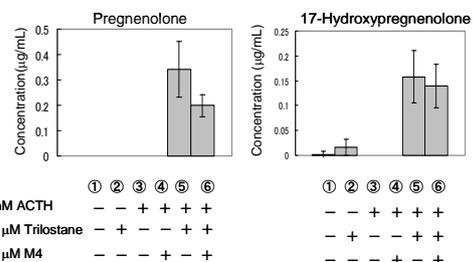


Fig. 9 Inhibitory effect of M4 on the intracellular production of pregnenolone and 17-hydroxypregnenolone with or without ACTH stimulation in the presence or absence of trilostane.

9. 山崎怜子、中川沙織、田辺顕子、池内健、三井田孝、大和進：アルツハイマー病マーカーとしての意義解明を指向した 24S-ヒドロキシコレステロールの高感度 GC/MS 定量。日本薬学会第 128 年会(横浜)、2008 年 3 月
10. 大和進、中川沙織、田辺顕子、小野真樹、明戸孝夫、立川英一：抗ストレス薬の作用評価を目的とするステロイド類定量法の開発と応用。日本薬学会第 128 年会(横浜)、2008 年 3 月
11. 篠原久美子、中川沙織、田辺顕子、稲村勝志、渡邊彦、平山哲、三井田孝、大和進：糖代謝異常の指標としての血漿中ケトン体 HPLC 定量法の開発と臨床応用。日本薬学会第 128 年会(横浜)、2008 年 3 月
12. 田辺顕子、山崎怜子、中川沙織、平山哲、三井田孝、大和進：GC/MS を用いる高コレステロール血症患者の血漿中植物ステロールの定量。日本薬学会第 128 年会(横浜)、2008 年 3 月
13. 中川沙織、大和進、三井田孝：アルツハイマー病マーカーとしての 24S-ヒドロキシコレステロールの定量法の開発。第 4 回若手脂質研究者の集い(大阪)、2007 年 11 月
14. 篠原久美子、中川沙織、田辺顕子、平山哲、三井田孝、大和進：糖代謝異常の早期発見につながる血中 3-ヒドロキシ酪酸の定量。第 51 回日本薬学会関東支部総会(東京)、2007 年 10 月
15. 山崎怜子、中川沙織、田辺顕子、三井田孝、大和進：アルツハイマー病バイオマーカーとしての 24S-ヒドロキシコレステロールの GC/MS 定量。第 51 回日本薬学会関東支部総会(東京)、2007 年 10 月
16. 中川沙織、斉藤直美、清水章野、田辺顕子、立川英一、大和進：副腎皮質培養細胞系を用いる抗ストレス薬評価を目的としたプレグネノロンおよび 17-ヒドロキシプレグネノロン定量法の開発。日本分析化学会第 56 年会、(徳島)、2007 年 9 月
17. 篠原久美子、佐々木優子、百瀬瑠美、中川沙織、田辺顕子、大和進：メタボリックシンドローム予防の指標となりうる血中ケトン体の定量法。第 4 回 新潟食品科学・バイオフィオーラム (新潟)、2007 年 7 月
18. 山崎怜子、小林恭子、木樽恵里、中川沙織、田辺顕子、三井田孝、大和進：生体試料中のヒドロキシコレステロール類の GC/MS 定量に必要な前処理法の検討。第 20 回バイオメディカル分析科学シンポジウム(東京)、2007 年 7 月

〔図書〕 (計 2 件)

1. 大和進、田辺顕子、中川沙織：治療薬などによる食餌由来コレステロールの吸収抑制効果を評価する研究に有用なガスクロマトグラフィー/質量分析法。日本薬学会物理系薬学部会・分析化学担当教員会議(編)：薬学分析科学の最前線、じほう、120-121、2009.
2. 立川英一：抗炎症薬。渡邊康裕編：集中講義 薬理学、メジカルビュー社、61-71、2009.

〔その他〕

新潟薬科大学薬学部薬品分析化学研究室
ホームページ

(<http://www.nupals.ac.jp/~analchem/>)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大和 進 (YAMATO SUSUMU)

新潟薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：60057370

(2) 研究分担者

立川 英一 (TACHIKAWA EIICHI)

岩手医科大学・薬学部・教授

研究者番号：50146031

中川 沙織 (NAKAGAWA SAORI)

新潟薬科大学・薬学部・助教

研究者番号：30410228