

# 学位（博士）論文要旨

(Doctoral thesis abstract)

論文提出者 (Ph.D. candidate)	工学府博士後期課程 生命工学 専攻 (major) 2024 年度入学 (Admission year) 学籍番号 24841004 氏名 高橋 康司 (student ID No.) (Name)
主指導教員氏名 (Name of supervisor)	黒田 裕
論文題目 (Title)	誘導体化を用いたステロイド類の精密定量質量分析法の開発 Development of a Quantitative Steroid Analysis by Mass Spectrometry Using a Derivatization Approach
論文要旨	<p>本博士論文は全 5 章で構成され、1 章は医学検査におけるステロイドホルモン分析についての基本的な情報及び研究背景について記載している。抗原抗体反応を利用した免疫アッセイ法が広く普及しているが、ステロイドホルモンは生体内で様々な代謝反応を受け、わずかな構造の違いで生理活性が大きく変わる多様な代謝物が存在し、免疫アッセイ法では交差反応等に起因する特異性の不足や定量感度に課題が存在する。近年、この欠点を克服する手段として質量分析法が注目され、ゴールドスタンダード法として普及しつつある。しかしながら、ビタミン D (VD) 及びエストロゲンの一部代謝物は生体試料中の濃度が極めて低く、かつイオン化効率も低いことから誘導体化による定量感度向上の必要性と、夾雑する異性体の分離の問題がある。これら代謝物の中で、医学検査需要の見地からヒト血清中の <math>1\alpha, 25\text{-dihydroxyvitamin D}_3</math> (<math>1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3</math>) 並びに 2-methoxyestradiol (2ME) に着目し、液体タンデムクロマトグラフタンデム質量分析計 (LC-MS/MS) を用いた精密定量分析法を開発しヒト血清中での定量性能を実証した。</p> <p>2 章では実用的な VD 代謝物誘導体化試薬の開発を目的としてクックソン型試薬である 4-(4'-dimethylaminophenyl)-1,2,4-triazoline-3,5-dione (DAPTAD) を 9-フェニルアントラセンで保護した 14-(4-dimethylaminophenyl)-9-phenyl-9,10-dihydro-9,10-[1,2]epitriazoloanthracene-13,15-dione (DAP-PA) を合成し、溶液状態での安定性向上に成功した。DAP-PA は加熱することで脱保護と同時に VD 代謝物のジエン部と反応し簡便に誘導体化できることを示した。これにより、医学検査現場での操作性および測定データ再現性を改善することができた。</p> <p>3 章では DAP-PA を用いて骨代謝マーカーとして最も重要な VD 代謝物である <math>1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3</math> の精密定量法の構築を試みた。<math>1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3</math> は循環血液中に非常に微量かつ、夾雑する他のジヒドロキシビタミン <math>\text{D}_3</math> 異性体が LC-MS/MS による分離を困難にしていた。そこで前処理でタンパク沈殿と固相抽出 (PP-SPE) を組み合わせ、ペンタフルオロフェニル-オクタデシルシリル (PFP-C18) 混合固定相を持つ分析カラムを用いることでこの問題を解決できることを見出し、<math>4\beta, 25\text{-dihydroxyvitamin D}_3</math> (<math>4\beta, 25(\text{OH})_2\text{D}_3</math>) との分離に成功した。また理論上夾雑しうる <math>1\beta, 25\text{-dihydroxyvitamin D}_3</math> (<math>1\beta, 25(\text{OH})_2\text{D}_3</math>)、<math>3\text{-epi-}1\alpha, 25\text{-dihydroxyvitamin D}_3</math> (<math>3\text{-epi-}1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3</math>)、<math>2\alpha, 25\text{-dihydroxyvitamin D}_3</math> (<math>2\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3</math>)、<math>2\beta, 25\text{-dihydroxyvitamin D}_3</math> (<math>2\beta, 25(\text{OH})_2\text{D}_3</math>)、<math>4\alpha, 25\text{-dihydroxyvitamin D}_3</math> (<math>4\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3</math>) と分離可能なことも実験的に示し、ヒト血清で分離の再現及び最小定量下限 (LLOQ: 2.5 pg/mL) を達成し医学検査に応用できうる性能を示した。</p>

4章ではエストロゲン代謝物の一つである2MEを対象に $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ の分析で確立した方法論を応用した。2MEは3位フェノールを1-(2,4-dinitro-5-fluorophenyl)-4,4-dimethylpiperazinium iodide (MPDNP-F)で誘導体化し、位置異性体である3-O-methyl 2-hydroxyestradiol (3M2OH), 3-O-methyl 4-hydroxyestradiol (3M4OH)をクロマトグラフ分離した上でヒト血清中の2MEの精密定量が可能なことを示した。

5章では本論の結論を記載している。VD代謝物に対して実用性に富む誘導体化試薬として用事調製が不要なDAP-PAを開発し、 $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ の精密定量質量分析法を提案した。標準試料を用いて位置および立体異性体の分離を証明し、既存の免疫抽出法との相関がとれていることから、十分信頼できる定量分析法であることを示した。本方法論はヒト血清中の2MEについても精密定量可能なことを示した。本論で記載した通り誘導体化は一部のステロイド代謝物では検出強度の向上に必須の技術であり、かつクロマトグラフ上の分離選択性を改善する為、適切な条件を設定することで生体試料中からの精密定量分析を可能にし、医学検査のみならず様々な研究に活用されることが期待できる。

This doctoral dissertation comprises five chapters. Chapter 1 outlines the principles and background of steroid hormone analysis in clinical laboratory testing. Immunoassay techniques based on antigen-antibody reactions are widely used, but cross-reactivity can reduce diagnostic accuracy, revealing limitations in specificity and sensitivity. Mass spectrometry has emerged as a promising alternative and is increasingly recognized as a gold standard. However, some vitamin D (VD) and estrogen metabolites exist at very low concentrations and show poor ionization efficiency, while the separation of structurally similar isomers remains challenging. This study focuses on two metabolites— $1\alpha, 25$ -dihydroxyvitamin  $\text{D}_3$  ( $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ) and 2-methoxyestradiol (2ME)—and describes the development and validation of a precise LC-MS/MS quantification method.

Chapter 2 describes the synthesis of a practical derivatization reagent for VD. A Cookson-type reagent, 4-(4'-dimethylaminophenyl)-1,2,4-triazoline-3,5-dione (DAPTAD), was caged with 9-phenylanthracene to afford 14-(4-dimethylaminophenyl)-9-phenyl-9,10-dihydro-9,10-[1,2]epitriazolanthracene-13,15-dione (DAP-PA), resulting in improvement of its solution-phase stability. Upon thermal activation, DAP-PA undergoes deprotection and reacts simultaneously with the diene moiety of VD metabolites, enabling simple operation and excellent reproducibility in clinical laboratory settings.

Chapter 3 details the development of a highly sensitive LC-MS/MS method for quantifying  $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ , a key biomarker of bone metabolism. Its trace-level presence in serum and interference from other structurally similar dihydroxyvitamin  $\text{D}_3$  isomers pose challenges for conventional methods. By combining protein precipitation and solid-phase extraction (PP-SPE) with a PFP-C18 mixed-mode column,  $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$  was successfully separated from  $4\beta, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ . Experimental validation also confirmed separation of other potentially interfering isomers,  $1\beta$ , 3-*epi*- $1\alpha$ ,  $2\alpha$ ,  $2\beta$ , and  $4\alpha$  forms. The resultant method achieved a lower limit of quantification of 2.5 pg/mL in human serum, demonstrating its

suitability for clinical diagnostics.

Chapter 4 extends the established methodology to the analysis of 2ME, an estrogen metabolite. Derivatization with 1-(2,4-dinitro-5-fluorophenyl)-4,4-dimethylpiperazinium iodide (MPDNP-F) enabled chromatographic separation of its regioisomers, 3-O-methyl-2-hydroxyestradiol (3M2OH) and 3-O-methyl-4-hydroxyestradiol (3M4OH). This facilitated accurate quantification of 2ME in human serum.

Chapter 5 presents the conclusions of this study. I developed DAP-PA as a stable derivatization reagent, enabling a robust LC-MS/MS method for the accurate quantification of  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  in human serum. The method reliably separated other dihydroxyvitamin  $\text{D}_3$  isomers and showed strong correlation with conventional immunoaffinity extraction pretreatment. This analytical methodology was also successfully applied to the quantification of 2ME. Overall, the study demonstrates that derivatization significantly enhances sensitivity and selectivity in steroid metabolites analysis, allowing their precise quantification from biological samples and offering broad utility in both clinical diagnostics and biomedical research.