

第 30 回日本プテリジン研究会 研究発表要旨

2016 年 11 月 11 日

名古屋大学環境総合館

カンファレンスホール

世話人 村田 静昭 (名古屋大学大学院環境学研究科)

池本 和久 (藤田保健衛生大学)

第30回 日本プテリジン研究会 プログラム						
				2016/11/11 名古屋大学環境総合館カンファレンスホール		
No.	時刻	座長	発表者	タイトル	演者	所属
	11:45 ～ 12:35	世話人会		レストラン花ノ木和室		
	12:20	会場オープン		環境総合館カンファレンスホール		
	12:45 ～ 12:50	会長挨拶	新宅 治夫			
基調講演	12:50 ～ 13:30	新宅 治夫	永津 俊治	第30回Japan Pteridine 研究会をお祝いして：歴史の回顧と展望		藤田保健衛生大学 医学部 医学部アドバイザー 名古屋大学環境医学研究所脳機能分野
1	13:30 ～ 14:00	一瀬 宏	村田 静昭	プテリジンの化学研究の難しさ—(6R)-テトラヒドロピオプテリン、キノノイドジヒドロピオプテリン、セピアプテリンの化学合成		名古屋大学環境学研究科
2	14:00 ～ 14:20	村田 静昭	花谷 正	1-及び3-メチルルマジン誘導体の合成研究	○花谷 正、小延靖史	岡山大学大学院自然科学研究科
3	14:20 ～ 14:40	花谷 正	大橋 晶子	2'-deoxysepiapterin (isosepiapterin) の in vitro生成について	大橋晶子(1)、原田智紀(2)、内藤昌子(1)、高橋富久(1)、相澤信(2)、長谷川宏幸(1) *1) 日本大学・歯学部・解剖(1) 2) 日本大学・医学部・機能形態	日本大学・歯学部・解剖(1)
	14:40 ～ 14:55	ブ レ イ ク				
4	14:55 ～ 15:15	池本 和久	原 怜	ビルボイルテトラヒドロプテリン合成酵素は酸化的修飾によって活性を制御されるタンパク質である	原怜、安岡達矢、一瀬宏	東京工業大学 生命理工学院
5	15:15～ 15:35	大橋 晶子	一瀬 千穂	セピアプテリン還元酵素遺伝子ノックアウトマウスは変動の大きい高血圧、徐脈とpriapism(持続勃起症)を生じる	一瀬(鷺見)千穂1、菅沼由唯1、狩野泰輝1、井平典子1、野村裕子2、池本和久1、畑 忠善2、加藤節子3、一瀬宏4、近藤一直1	藤田保健大・医・薬理
6	15:35～ 15:55	原 怜	池本 和久	培養血管内皮細胞におけるBH4の蓄積・放出および無細胞系における還元型ピオプテリンの酸化反応	○池本和久、菅沼由唯、狩野泰輝、一瀬千穂、近藤一直	藤田保健大・医・薬理
7	15:55～ 16:15	川上 康彦	春日 彩季	小児気管支喘息と血中プテリジン濃度に関する検討		大阪市立大学小児科
8	16:15～ 16:35	藤田 義人	匹田 典克	急性脳炎、脳症診断における髄液ネオプテリン測定の有用性について	匹田 典克、山下 加奈子、藤田 賢司、濱崎 考史、新宅 治夫、瀬戸 俊之	大阪市立大学大学院医学研究科発達小児医学
9	16:35～ 16:55	近藤 一直	小栗 靖生	テトラヒドロピオプテリンの糖尿病腎症発症機序への関与の解明	小栗靖生 ^{1,2} 、藤田義人 ¹ 、古谷太志 ¹ 、松尾奈緒美 ¹ 、屋山勝俊 ³ 、小原章央 ¹ 、Abulizi Abdulkadier ¹ 、大橋晶子 ⁴ 、長谷川宏幸 ⁴ 、鶴山竜昭 ⁵ 、細川雅也 ⁶ 、稲垣暢也 ¹	¹ 京都大学大学院医学研究科 糖尿病・内分泌・栄養内科学
	16:55	クロージング	一瀬 宏			
	17:15 ～ 19:30	懇親会		レストラン花ノ木		

プテリジンの化学研究の難しさ
—(6R)-テトラヒドロビオプテリン, キノノイドジヒドロビオプテリン,
セピアプテリンの化学合成

名古屋大学大学院環境学研究科
村田静昭

プテリジンは有機化学の黎明期に発見され 150 年以上にわたる歴史がある。最盛期であった 1960～1990 年代には、化学的手法はプテリジン研究を推進し現在に至る生化学・医学に関する目覚ましい功績を支えていた。しかし 1990 年代以降、プテリジンの化学的研究に伴う様々な制約のために、有機構造化学や有機合成化学の急激な発展から取り残されてしまった。今回、私たちが報告した BH4、QBH2、セピアプテリンの化学合成を基に、プテリジンの化学的研究における問題点と、今後化学的方法がプテリジンに関する研究をサポートするために求められるものなどについて考察する。

溶媒に対する不溶性

芳香属性、還元型を問わずプテリジンは、ほとんどの有機溶媒または水に不溶である。このことは化学合成を行う際の最大の問題点となり、数多くの保護基で修飾する必要がある。化学合成におけるコストの増大に結び付く。

還元型プテリジンの不安定性

生物活性を示す還元型プテリジンは中性条件下では極めて不安定で、芳香族プテリジンへの酸化のみならず側鎖の解離など様々なタイプの分解反応が素早く起こる。

光学活性側鎖の大量入手

BH4 の原料に用いた L-ラムノースからプテリジン環の構築に必要な原料の調製には数段階のステップを要し、ここでのロスおよび元来 5 個あった不斉炭素のうち 3 個を捨てるロスも含まれている。

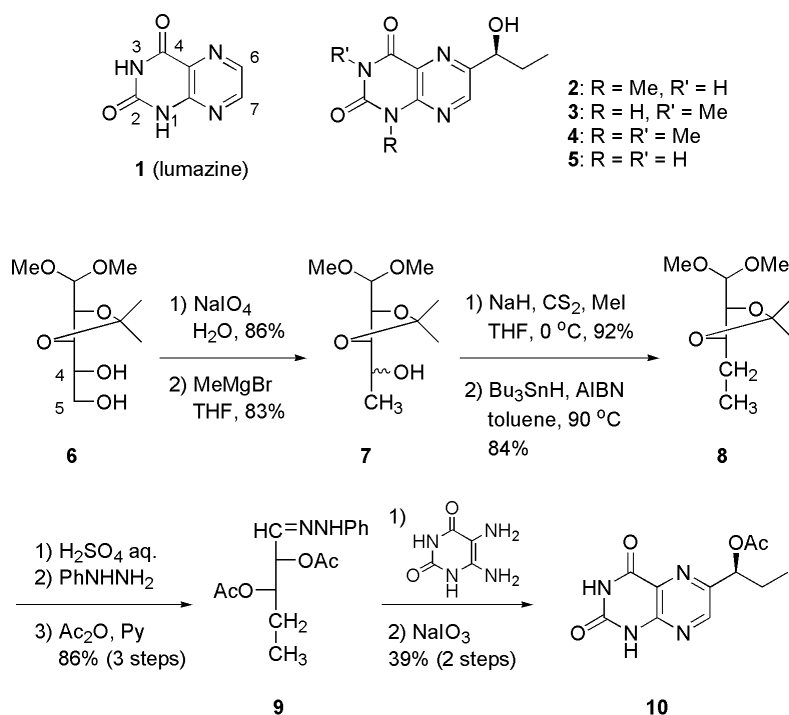
2) 1-及び 3-メチルルマジン誘導体の合成研究

○花谷 正、小延靖史

(岡山大学大学院自然科学研究科)

【緒言】

ルマジン (**1**) の骨格を有する天然物にはN(1)位やN(3)位がメチル化された誘導体が知られている。例えば、海綿 *Leucetta microraphis* からは1-メチル体の leucettidine (**2**) が [1]、ゴカイ類からは3-メチル誘導体 (**3**) や1,3-ジメチル誘導体 (**4**) が見つかった [2]。ルマジンの選択的メチル化が可能になれば、**2**—**4** は共通のルマジン前駆体 (**5**) あるいは**10** から合成できると考えられる。本研究では、鍵中間体となる**10**の合成を行い、**10**の選択的メチル化条件を検討して**2**—**4**の合成へ応用できる手法の開発を目指した。

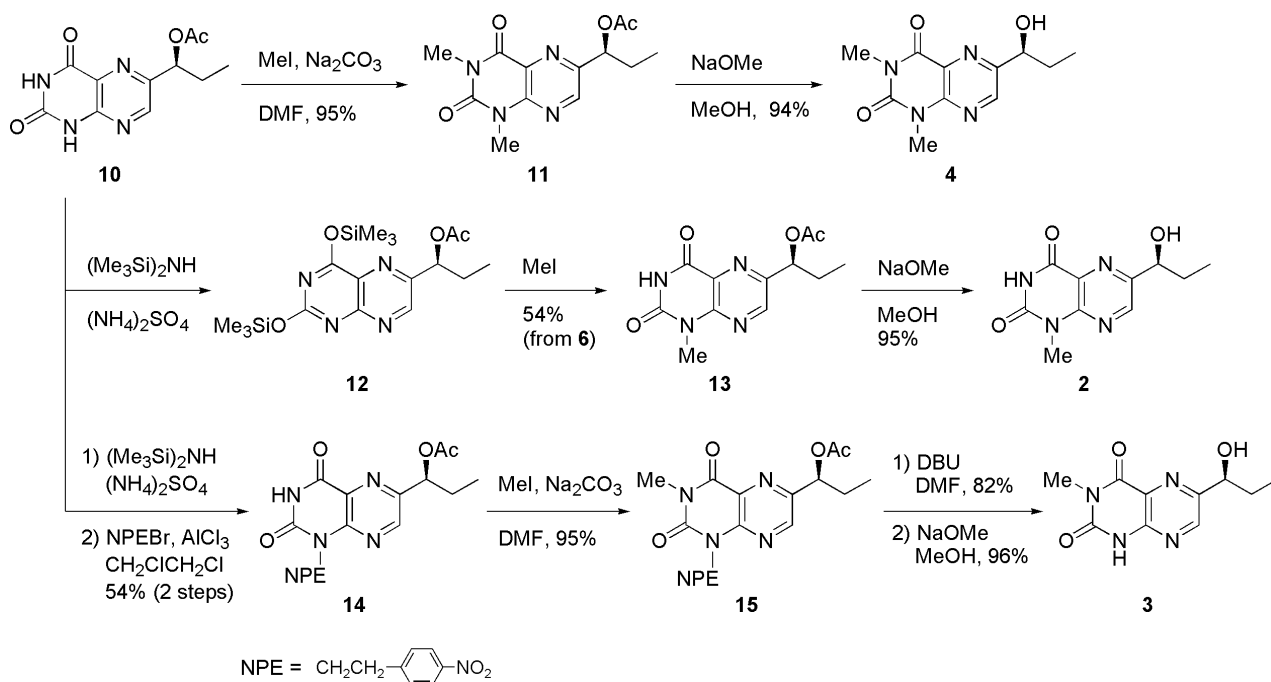


【結果】

出発原料のD-キシロースから2段階で得られるジオール (**6**) のC⁴—C⁵ 間を酸化的に切断して得られるアルデヒドに対し、Grignard試薬を用いて5-デオキシ誘導体 (**7**) にした後、**7**の4位のデオキシ化によって4,5-ジデオキシ体 (**8**) に変換した。続いて**8**の脱アセタール化によって得られるアルデヒドをヒドラゾンとし、さらにアセチル化を行って**9**にした。次に**9**とウラシル誘導体との縮合および酸化によって目的の**10**を合成した。

モデル化合物を使って選択的メチル化の条件検討を行った後、**10** のメチル化に応用した。すなわち、**10** を炭酸ナトリウム存在下、ヨードメタンで処理して**11**にした後、脱アセチル化を行って1,3-ジメチル誘導体 (**4**) を得た。一方、**10** の2,4位を hexamethyldisilazane でトリメチルシリル化して**12**にした後、ヨードメタンで処理すると選択的に1-メチル化が進行し**13** が得られた。続いてこれを脱アセチル化することによって1-メチル誘導体 (**2**) が得られた。

3-メチル体の合成に関しては、**10** を直接メチル化して得るのは無理と判断し、上述と類似の方法で選択的に1位に *p*-nitrophenylethyl (NPE) 基の導入を試み、**14** を得た。次にヨードメタンを用いて N(3)位をメチル化して**15**にした後、DBUを用いて NPE 基の開裂、さらに脱アセチル化を行って目的の 3-メチル誘導体 (**3**) の合成に成功した。



本研究により、共通のルマジン前駆体から対応する 1-メチル誘導体、3-メチル誘導体、1,3-ジメチル誘導体へ変換する合成法が見出された。本結果は類似の天然物合成への応用にも可能と考えられる。

References

- [1] J. H. Cardellina II and J. Meiwald, *J. Org. Chem.*, 1981, **46**, 4782-4784.
- [2] H. Tanino, H. Takakura, H. Kakoi, K. Okada, and S. Inoue, *Heterocycles*, 1994, **38**, 971-974.

3) 2'-deoxysepiapterin (isosepiapterin) の in vivo 生成について

大橋 晶子¹⁾, 原田 智紀²⁾, 内藤 昌子¹⁾, 高橋 富久¹⁾, 相澤 信²⁾, 長谷川 宏幸¹⁾

1) 日本大学・歯学部・解剖(I)

2) 日本大学・医学部・生体構造医学

【はじめに】イソセピアプテリン(isosepiapterin, 2'-deoxysepiapterin, DSP)は、シヨウジョウバエの頭部の黄色蛍光色素として、セピアプテリン(SP)とともに古くから知られている。シヨウジョウバエの遺伝子変異 *sepia* は 6-pyruvoyltetrahydropterin (6PTP)を基質とする PDA synthase の欠損とされている。この変異体ではドロソプテリンとビオプテリンが蓄積せず、SP と DSP が蓄積するという。セピアプテリン還元酵素反応液において SP から生成したジヒドロビオプテリン(BH₂)を粗精製し、この BH₂ 標品を硫酸酸性下に置くことで、DSP が生成したとの報告がある(Katoh and Akino, Experientia 1966)。

一方、哺乳動物の組織抽出液では微量の DSP が検出されているが、イヌの血液にテトラヒドロビオプテリン(BH₄)を加え、弱酸性条件で好氣的に加熱(120°C)することによって DSP 量が生成(2~3%)することが報告されている(Andondonskaya-renz and Zeitler, Anal Biochem 1983)。これらのことから、BH₂あるいは BH₄の非特異的な化学反応によって微量の DSP が生成すると考えられている。

最近、私たちは、細胞内 BH₄ レベル上昇を目的とした培養細胞、およびマウスへの SP 投与において、BH₄とともに、かなりな量の DSP を検出したのでこれを報告する。

【材料・方法】DSP は白鳥製薬(株)から提供された。SP は Schirchs Laboratory のものと白鳥製薬(株)のものを用いて比較した。培養細胞：RBL2H3 細胞の培養液に SP あるいは DSP(それぞれ 50 μM)を与えて、60 分培養した後に培養液を洗浄除去し、0.1N HCl/2M HClO₄を用いて細胞からプテリン類を抽出した。この上清を HPLC にて分析した。マウス臓器：マウス(C57BL/6J)に SP を腹腔投与(40 mg/kg)した後、経時的に臓器を摘出し、秤量後に液体窒素で凍結、-80°C 保存した。この保存臓器を解凍後、速やかに、0.1N HCl (10 倍量)中で破碎し、HClO₄を加えて(6%)除タンパクした後に HPLC 分析に供した。なお、未処置マウスの臓器抽出

液(0.1N HCl)に 既知量の SP, あるいは BH₄を加えて, 凍結保存した後に, HPLC 分析に供した場合には, DSP 量の増加は認められないため, 抽出操作中に SP あるいは BH₄ (BH₂を含む)の非特異的な化学反応によって, DSP の有意な量生成はないと考える。

【結果・考察】 RBL2H3 細胞に SP を与えたとき, 60 分で約 120 pmol/1x10⁵cells のビオプテリン(BH₂ + BH₄)が生成し, 約 50 pmol/1x10⁵cells の DSP が生成した。一方, マウスに SP を投与した時, 腎臓では 30~60 分をピークとして約 1200 nmol/g のビオプテリンが検出されたが, このとき, 約 300 nmol/g の DSP が検出された。また, 肝臓でも同様の傾向を示した。これらの実験結果から, DSP が速やかに生成することを確認した。

培養細胞およびマウスに SP を与えたとき, SP は細胞または臓器に比較的速やかに取り込まれ, BH₄サルベージ経路によって BH₂および BH₄に転換されるが, 同時に DSP が生成することが明らかとなった。DSP がどのような経路で生成されるかは今後の課題である。

4) ピルボイルテトラヒドロプテリン合成酵素は酸化的修飾によって

活性を制御されるタンパク質である

原 怜¹、安岡達矢¹、一瀬宏¹

1: 東京工業大学 生命理工学院

テトラヒドロビオプテリン (BH4) は、モノアミン神経伝達物質や一酸化窒素を合成する際の補酵素であり、その新規合成は3つの酵素による一連の反応で行われている。まず、GTP から GTP シクロヒドロラーゼ I (GCH) によってジヒドロネオプテリン3リン酸 (H₂NTP) が合成

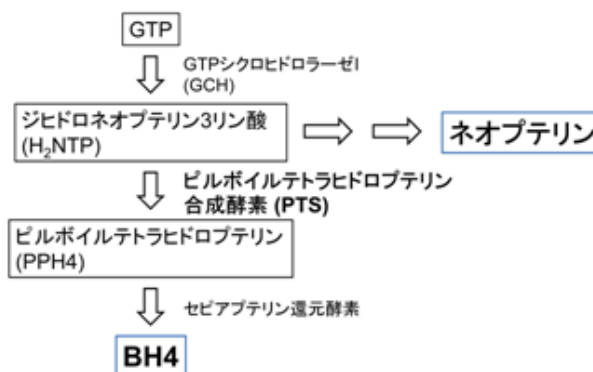


図1 BH4 とネオプテリンの合成経路

される。H₂NTP は、ピルボイルテトラヒドロプテリン合成酵素 (PTS) とセピアプテリン還元酵素の作用で BH4 へと変換される (図 1)。BH4 新規合成量は、初発酵素であり、通常は一連の反応の律速段階である GCH 活性によって主に制御されていると考えられている。

ネオプテリンは、その生理機能について未だ十分に明らかでないが、炎症などによって主にマクロファージにおいて合成されて血中・尿中の濃度が顕著に上昇することから、細胞性免疫の活性化マーカーとして知られている。PTS 欠損マウスや欠損症患者において BH4 の減少とともにネオプテリンの蓄積が報告されている。また、ヒトを含む霊長類では、H₂NTP の一部は PTS による触媒を受けずにネオプテリンへと変換され、BH4 とほぼ同量のネオプテリンが体液中に検出される。これらのことから、細胞内 PTS 活性により BH4 が合成されるか、ネオプテリンとなるかの制御が行なわれていると考えられる。しかし、これまでに PTS 活性の調節機構についてはほとんど明らかとなっていない。本研究では、免疫系細胞におけるネオプテリン産生の生理的意義を明らかにすることを目指し、PTS 活性調節機構を明らかにすることを目的とした。

PTS 活性がジチオスレイトールの添加により増加することが知られていたため、システインの酸化的修飾に着目した。ヒト PTS には、活性部位に位置するよく保存された 43 番目のシステイン (Cys43) に加え、マウス PTS などにはない 10 番目のシステイン (Cys10) がある。そこで、野生型ヒト PTS に加えて、これらシステインをそれぞれアラニンに置換した変異型組換えタンパク質について

解析した。その結果、Cys43 の過酸化・グルタチオン化によって活性が低下することが分かった。また、グルタチオン化は再還元することで活性が回復する可逆的な修飾であることを明らかにした。一方、Cys10 はニトロソ化による可逆的な活性制御の可能性が示唆された。これらのことは、PTS における酸化的修飾が細胞内で翻訳後修飾として PTS の活性制御を行っていることを示唆している。

5) セピアプテリン還元酵素遺伝子ノックアウトマウスは変動の大きい高血圧、徐脈と priapism (持続勃起症) を生じる

○一瀬 (鷺見) 千穂¹、菅沼由唯¹、狩野泰輝¹、井平典子¹、野村裕子²、池本和久¹、
畑 忠善²、加藤節子³、一瀬 宏⁴、近藤一直¹

¹ 藤田保衛大・医・薬理、² 藤田保衛大・医療・臨床検査、³ 明海大・歯、⁴ 東工大・院・生命理工

【目的】 (6R)-L-erythro-5, 6, 7, 8-Tetrahydrobiopterin (BH4) はモノアミンおよび一酸化窒素 (NO) 合成に必須のコファクターであり、セピアプテリン還元酵素 (SPR) は BH4 生合成の最終段階を触媒する。SPR 遺伝子ノックアウトマウス (*Spr*^{-/-}) は多くが 1-2 ヶ月以内に死亡するため、これまでの研究は幼若マウスでの知見に限られていた。当研究室では C57BL/6 と BALB/c の雑種 (F1) が長期生存できることを見出し、Adult stage での *Spr*^{-/-} マウスの循環器系機能について初めて解析を行った。

【方法】 *Spr*^{-/-} マウス (0YC32) は Lexicon Pharmaceuticals Inc で作製された。マウス血圧は Tail-Cuff 法で測定した。BH4 および Dihydrobiopterin (BH2) は Tani-Ohno の方法によりカラムで分離後 HPLC-蛍光検出器で、モノアミンは HPLC-電気化学検出器で測定した。ペントバルビタール麻酔下に心電図を記録し、Heart rate variability (HRV) を測定した。血管弛緩反応の測定は、マウス胸部大動脈から 2 mm 長のリング標本作製し、オーガンバス中で Phenylephrine (Phe) によって前収縮を行わせ、Acetylcholine (ACh)、および一酸化窒素合成酵素阻害薬存在下で Sodium Nitroprusside を累積投与しておこなった。

【結果】 *Spr*^{-/-} マウスは中枢および末梢神経系と組織中の BH4、モノアミンが減少しているにもかかわらず、野生型マウスに比べ収縮期・拡張期とも有意に高い血圧と、徐脈を示した。*Spr*^{-/-} マウスの収縮期血圧の変動幅は、野生型に比較して有意に大きかった。HRV の解析では交感神経系入力が増大を示す LF/HF が高値であった。*Spr*^{-/-} マウス大動脈リング標本の Phe に対する収縮反応は野生型マウスに比べて有意に増強し、ACh に対する内皮依存性弛緩反応は減弱していた。*Spr*^{-/-} マウスの高血圧と徐脈は離乳期以降著明になり、4 ヶ月齢以降は高頻度に Priapism (持続勃起症) を示した。

【考察】 *Spr*^{-/-} マウスでは、交感神経系の伝達物質であるノルアドレナリンが枯渇し、その代償としてシナプス前後での hypersensitivity が生じると考えられる。同時に血管内皮細胞では NO 産生の低下により血管の弛緩性が低下し、これらが変動の大きい高血圧の原因であろうと推測される。ヒトの

Parkinson 病を含む神経疾患および脊髄損傷では反射性の血圧変動など循環器系の不安定性が報告されており、*Spr^{-/-}*マウスはこれらの疾患の自律神経症状のモデルになることが期待できる。

6) 培養血管内皮細胞における BH4 の蓄積・放出および無細胞系に

における還元型ビオプテリンの酸化反応

藤田保健衛生大学 医学部 薬理学

○池本和久、菅沼由唯、狩野泰輝、一瀬千穂、近藤一直

【目的】

テトラヒドロビオプテリン (BH4) は一酸化窒素合成酵素のコファクターとしての機能などから、血管機能の維持・改善に有効であると考えられる。BH4 はヒトに投与可能な薬物として認可されている。しかし、BH4 は溶液中では酸化反応を受けやすく、コファクターなどの生物機能を担う上で鍵となるテトラヒドロ構造を容易に失ってしまう。そこで、ヒト培養血管内皮細胞 (human umbilical vein endothelial cell; HUVEC) を用い、BH4 およびその関連化合物 (7,8-dihydrobiopterin; BH2 および sepiapterin; SP) による細胞内での BH4 の蓄積と、一度蓄積された BH4 の細胞からの消失について検討した。あわせて、これらの化合物の無細胞系 (培地中) での酸化反応についても検討したので報告する。

【方法】

HUVEC は藤田保健衛生大学の疫学・臨床研究倫理審査委員会で承認された方法に則り、臍帯からコラゲナーゼ法により採取・継代したものを使用した。BH4 (2 塩酸塩、和光純薬)、BH2 (ENZO) および SP (sigma) は市販品を DMSO に溶解して使用した。細胞内の BH4 の定量は Fukushima-Nixon の方法に従い、蛍光検出 HPLC より分析した。データは細胞内のタンパク量で補正して表記した。無細胞系での BH4 関連化合物の酸化反応性は、酸性条件下でのヨウ素酸化により酸化型のビオプテリンに変換し、HPLC で分析して検討した。

【結果】

・ HUVEC における細胞内 BH4 の蓄積

100 μ M の BH4, BH2 および SP とともに培養した HUVEC の 1 時間後の細胞内 BH4 量はそれぞれ 8.0, 56.3, 176.9 (pmoles/mg protein) (n=4) であった。その後 24 時間まで培養を続けたところ、BH2 および SP との共培養ではそれぞれ 538.0, 2411.8 (pmoles/mg protein)まで増加した。それに対し BH4 と共培養した HUVEC では 24 時間後も 8.1 (pmoles/mg protein)と 1 時間後の時から細胞内 BH4 量の増加は認められなかった。

・ HUVEC にいて蓄積された細胞内 BH4 の放出

100 μ M の BH2 または SP との共培養により増加した細胞内 BH4（それぞれ 2747.1, 452.0 pmoles/mg protein, n=4）は、培地中の BH2 と SP を取り除くことにより 24 時間後にはそれぞれ 33.5, 1.5 (pmoles/mg protein)まで低下した。

・培地中での BH4 の酸化

標準的な培養細胞の生育条件（5% CO₂, 37°C, 大気圧下）において、BH4 は半減期 20.4 分（n=9）の速度で消失した。その過程で全ての BH4 が側鎖を失うわけではなく、一部（6.3%, n=3）の BH4 は BH2 に酸化されていると考えられた。また、この無細胞系の条件では、BH2 から酸化型のビオプテリンへの反応は生じず、BH4 からセピアプテリンへの変換も生じないと考えられた。

7) 小児喘息の長期コントロールと血中プテリジン濃度に関する検討

春日 彩季¹⁾, 比嘉 勇介¹⁾, 藤川 詩織¹⁾, 濱崎 考史¹⁾, 藤谷 宏子¹⁾, 新宅 治夫¹⁾
新平 鎮博²⁾

大阪市立大学大学院医学研究科発達小児医学¹⁾
国立特別支援教育総合研究所²⁾

【目的】喘息の気道慢性炎症の指標として汎用される呼気 NO について、NO の生成には、NO 合成酵素(NOS)の補酵素としてビオプテリンが関与していることが知られている。当研究室では以前 65 名の小児喘息患者において FeNO 高値の場合、ビオプテリンが低下する傾向が見られ、その関連性を示した。また昨年度は 96 名の喘息の重症度とプテリジン濃度の関連性を示した。その知見を臨床に生かすため、小児喘息の長期コントロールと FeNO、血中プテリジン濃度との検討を行った。

【対象/方法】対象はかかりつけ医により喘息と診断され、独立行政法人環境再生保全機構の第 10 期環境保健調査研究として、当科が行う喘息ドックに参加する同意を得られた 131 名の児童とした。うち 3 年以上発作がなかった 36 名を「寛解群」とし、残り 95 名を「喘息群」とした。また、同年齢で喘息の既往のない 61 名を「正常コントロール群」としてそれぞれの群を比較した。FeNO は、Aerocrine 社製 NIOX MINO/VERO にて測定した。プテリジンは、血液中のネオプテリンとビオプテリン量を HPLC(島津 LC-10)にて測定した。

【結果】ネオプテリンではコントロール群、寛解群、喘息群全ての群間に有意差を認め、寛解群と喘息群はコントロール群よりも低値を示した。ビオプテリンではコントロール群と寛解群、コントロール群と喘息群の群間に有意差は認めたが、寛解群と喘息群間には有意差は認めなかった。

【考察】喘息の長期コントロールにおいてプテリジンは一つの有用な指標となる可能性が示唆された。今後、アルギニンの負荷試験結果をもとに FeNO とプテリジンの関係の解明に向け、検討を継続していく。

8) 急性脳炎、脳症診断における髄液ネオプテリン測定の有用性について

大阪市立大学大学院医学研究科発達小児医学

匹田 典克, 山下 加奈子, 藤田 賢司, 濱崎 考史, 新宅 治夫, 瀬戸 俊之

【目的】急性脳炎・脳症は比較的稀な疾患ではあるが神経学的後遺症を残しうる小児では注意を要する疾患である。診断には髄液検査、頭部MRI検査などが施行されるが、検査異常を認めず、診断に苦慮することも少なくない。我々は、急性脳炎脳症例自験例16例について後方視的検討を行い、同疾患の診断におけるサイトカイン、ネオプテリン濃度測定の有用性を検討する。

【対象/方法】対象は2010年から2016年までに大阪市立大学医学部附属病院もしくは関連病院へ入院し、急性脳炎または脳症と診断された16例（EN群、急性脳炎8例、急性脳症8例）、熱性痙攣と診断された8例（FS群）、対照例9例（CO群）の全33例。髄液中のプテリジン解析およびサイトカイン解析を行い、臨床症状との関連、神経学的後遺症の有無について検討を行った。Mann WhitneyのU検定を施行し、 $p<0.05$ を統計学的有意とした。

【結果】EN群では全例で意識障害を認め、11例で痙攣を合併した。5例で髄液細胞数の増多、11例でMRI異常信号を認めた。EN群、FS群で、IL-8, G-CSF, GM-CSF, MIP-1 β , TNF- α がCO群よりも有意に高値で、EN群で、FS群よりも有意に高値であったのは髄液細胞数、ネオプテリン濃度のみであった。ROC解析では、髄液細胞数、IL-6, ネオプテリンのAUCがそれぞれ0.825, 0.834, 0.855であった。また神経学的後遺症を認めた症例では、髄液ネオプテリン値が有意に高値であった。（ $p=0.004$ ）

【考察】急性脳炎・脳症例16例中14例で髄液ネオプテリン高値を認めるとともに、髄液細胞数、MRIの異常を認めなかった4例全例においてもネオプテリン値が上昇していることからネオプテリンは小児の脳炎・脳症診断において有用であると考えられた。また、神経学的後遺症を認めた症例でネオプテリンは高値であり、神経学的後遺症の指標となる可能性が考えられた。

9)「テトラヒドロビオプテリンの糖尿病腎症発症機序への関与の解明」

小栗靖生^{1,2}、藤田義人¹、古谷太志¹、松尾奈緒美¹、屋山勝俊³、小原章央¹、Abulizi Abdukadier¹、大橋晶子⁴、長谷川宏幸⁴、鶴山竜昭⁵、細川雅也⁶、稲垣暢也¹

¹ 京都大学大学院 医学研究科 糖尿病・内分泌・栄養内科学

² 日本学術振興会 特別研究員 (DC2)

³ 神戸学院大学 薬学部 生命薬学部門

⁴ 日本大学 歯学部 解剖学第 I 講座

⁵ 京都大学医学研究科附属総合解剖センター

⁶ 帝塚山学院大学 人間科学部 食物栄養学科

【背景・目的】

糖尿病腎症の発症には eNOS 作用不足が関与することが eNOS 欠損マウスに高血糖を負荷したマウスモデルの解析により報告されている。糖尿病状態では eNOS 機能が障害されており、この障害には eNOS の補酵素であり共因子として作用するテトラヒドロビオプテリン(BH4)の作用不足が関与することを我々は報告した。今回、BH4 合成律速酵素である GTP cyclohydrolase I (GTPCH I) の発現が減損し BH4 産生量が減少している hph-1 mutant マウスを用いて BH4 の糖尿病腎症発症機序への関与について検討した。

【方法】

hph-1 mutant マウス、およびそのバックグラウンドマウス(C57BL/6×CBA)にストレプトゾトシン(STZ)を 50mg/kg の容量で 5 日間連続投与することにより高血糖を惹起し、初回投与日から 2 週間後に、随時血糖値が 250-300mg/dl 以上のマウスを高血糖モデルマウスと定義した。高血糖モデルマウスを用いて、腎組織の糸球体ならびに尿細管を光学および電子顕微鏡で観察し、免疫組織染色を行った。また 24 時間蓄尿法により、アルブミン尿の評価を行った。

【結果】

高血糖負荷を行っていないマウスを用いた検討では、hph-1 mutant マウスにおいて podocyte(足細胞)の足突起の癒合が認められた。一方、hph-1 mutant マウスに高血糖負荷を行うと、著明な足突起の脱落、空胞変性を認め、電子顕微鏡レベルだけではなく光学顕微鏡レベルにおいても糸球体全体の形態変化が観察された。しかしながら、これらの変化はバックグラウンドマウスでは観察されなかった。いずれの群においても内皮細胞およびメサングウム領域には明らかな変化は見られず、糖尿病早期腎症にしばしば見られる組織所見を呈していた。

次に、両マウス群における、尿細管の所見を、電子顕微鏡を用いて評価した。高血糖負荷を行っていないマウス群では、顕著な差異は観察されなかったが、高血糖負荷を行った **hph-1** マウスでは、主に近位尿細管においてミトコンドリアのクリスタ構造の消失等の形態学的異常ならびにミトコンドリア密度の低下を認めた。

高血糖負荷マウスを用いて、アルブミン尿の評価を行ったところ、**STZ** 投与後 1 カ月目から **hph-1 mutant** マウスではバックグラウンドマウスと比較して有意な尿アルブミンの増大を観察した。

【結論】

高血糖、および **BH4** の作用不足による **eNOS** 機能障害が相互的に糖尿病腎症、特に早期腎症の病態形成に関与する可能性が考えられた。**BH4** の補充が糖尿病腎症の発症・進展予防効果を有する可能性が示唆された。