

5-FUの代謝異常に伴う副作用リスクの検査法

群馬大学大学院保健学研究科 生体情報検査科学講座

柴田 孝之

【背景】

5-フルオロウラシル (5-FU) に代表されるフッ化ピリミジンは、消化器系がんをはじめとする様々ながんに対して世界中で頻用されている。しかし、5-FUの血中濃度が上昇すると、骨髄抑制などの致死的な副作用を誘発する。投与された5-FUの約85%は、肝臓においてジヒドロピリミジンデヒドロゲナーゼ (DPD) によって代謝される (図1)。そのため、DPD活性を先天的に欠損した患者にフッ化ピリミジンを投与すると、5-FUの血中濃度が異常に上昇して死に至る可能性がある。フッ化ピリミジン投与の際は、副作用に注意しながら少量ずつ増量するという対策が世界的に取られている。そのため、副作用が出現して投与を中断したにも関わらず、回復せずに死の転帰をたどる例が後を絶たない。このような背景から、全てのフッ化ピリミジン投与対象者に対して事前にDPD活性を測定すべきであり、そのように主張する医師も多い。

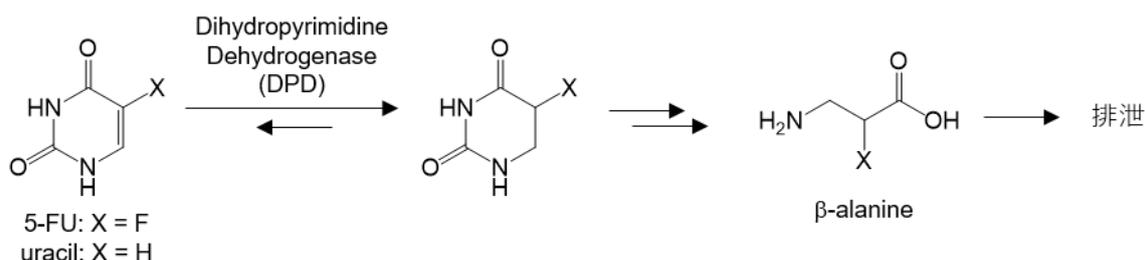


図1 核酸塩基の異化代謝の概要。

肝臓のDPD活性は、末梢血単核球 (PBMC) のDPD活性と強い相関を示すことが知られており、PBMCのDPD活性測定は最も信頼性の高いDPD欠損症の診断法であると言える。DPDは、生体内ではウラシルからジヒドロウラシル (DHU) への還元反応を触媒する、核酸代謝を担う酵素である。従って、PBMC溶解液にウラシルを添加し生成するDHUを定量すれば、DPD活性は測定できると考えられる。しかし、DHUはUV吸収の強い骨格を持たず、分子量がウラシルと近くかつ非常に小さいため、一般的な吸光度法や質量分析法を利用した定量は容易でない。従来は、放射標識したウラシルを基質として使用し生成する標識DHUをラジオ高速液体クロマトグラフィー (HPLC) にて追跡する、という放射化学的な手法が採用されていた。しかし、放射性物質を使用すること、特殊施設が必要であること、等の理由により、現在はこの放射化学的手法は使用されていない。PBMCを用いずにDPD欠損症の診断する手法も報告されているが、いずれも部分欠損症を完全に把握できないという欠点を有している。このような背景から、放射性物質を使用せず正確にDPD欠損症を診断できる技術の開発は、長年に渡り望まれ続けている。

本研究では、DPDがDHUからウラシルへの「逆反応」も触媒するという情報に基づき、DPD逆反応によるウラシルの生成を追跡することによる、新しいDPD活性測定法の開発研究を行った。DPD逆反応の反応速度は順反応より遅いと報告されているため、逆反応によるウラシル生成量はごく微量であると予想される。そこで、微量のウラシルを高感度に検出する技術として、研究代表者が独自に開発したウラシル特異的な蛍光誘導体化反応を応用した。この反応は、3-メチルベンズアミドオキシム (3-MBAO) を発蛍光試薬として使用し、強塩基性水溶液中でフェリシアン化カリウムの存在下で数分間加熱するの

みで、ウラシルに対してのみ強い蛍光を与える（図2）。すなわち、PBMC溶解液にDHUを添加してインキュベーションし、任意のタイムポイントにおける反応液を蛍光誘導体化反応に付し、その反応液に含まれるウラシル蛍光体をHPLCで分離検出できれば、DPD逆反応の活性を算出できると考えた。

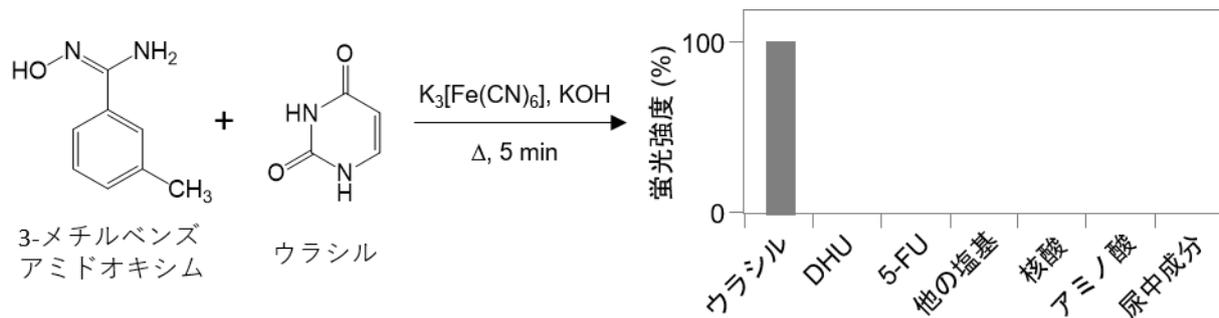


図2 ウラシル特異的な蛍光誘導体化反応と基質特異性。

【結果・考察】

逆反応の解析に先立ち、まずウラシルの減少を吸光度にて追跡することによる順反応の解析を試みた。まず、放射化学的なDPD活性測定法の条件に従い、総タンパク質量100 μg に相当するPBMC溶解液を使用し、基質であるウラシルの濃度を10 μM 、補酵素であるNADPHの濃度を200 μM 、反応液量を1 mLに設定して反応を行ったが、ウラシルの減少は確認できなかった。そこで、使用するPBMC溶解液の量を総タンパク質量200 μg に増やし、反応液量を500 μL に減じたところ、反応時間30 minにおいて微量ではあるがウラシルの減少を確認できた（図3）。また、この結果から算出されたDPD活性は、正常値として報告されている範囲内であった（健常人27人のDPD活性：80~275 pmol/min/mg protein）。この実験の反応条件は、放射化学的な手法と比較してPBMC量が2倍、反応液量が1/2になっている。この実験で使用したPBMCは正常なDPD活性値を持つと考えられることから、活性値が正常値の25%である部分欠損者のDPD活性は、この方法では測定不可能であると予測される。DPD欠損症の診断基準は、平均活性値の30%以下とされている。従って、このHPLC-UV検出法では、DPD活性が正常である場合は測定できるが、DPD活性を部分欠損する患者の判別ができない、と推察される。

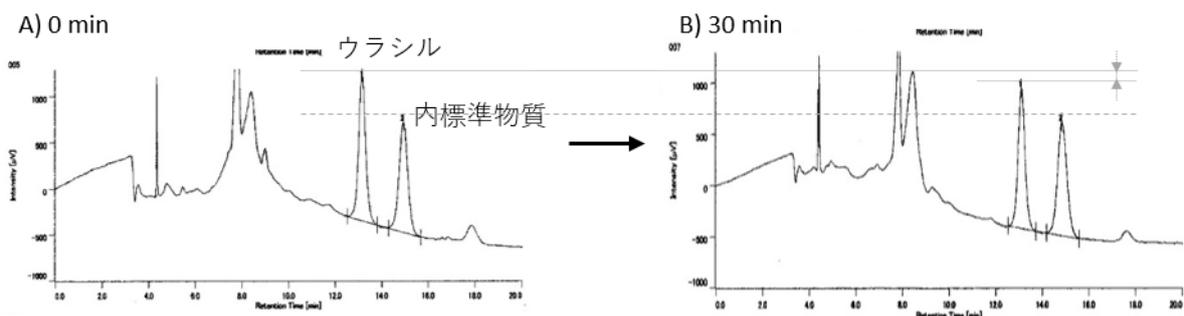


図3 DPD 順反応におけるウラシルの減少を HPLC にて追跡したクロマトグラム。A) 反応開始直後の反応液、B) 反応開始後 30 分の反応液。

次に、ウラシル特異的な蛍光誘導体化反応を応用したDPD逆反応の解析を行った。前述のDPD順反応の反応条件を基準として、総タンパク質量400 μg に相当するPBMC溶解液を使用し、基質であるDHUの濃度を10 μM 、逆反応の補酵素であるNADP⁺の濃度を750 μM 、反応液量を500 μL に設定した。一定時間経過後、反応液を濃KOH溶液に添加することで、蛍光誘導体化反応の条件を設定しつつ同時に除タンパク質操作を行い、次いで3-メチルベンズアミドオキシムおよびフェリシアン化カリウムを添加して蛍光誘導体化反応に付した。この蛍光反応液の一部を、蛍光検出器を備えたHPLCにて分析しウラシル量を測定した。順反応では反応開始後30分の時点で活性値を求めるところを、反応開始後90分まで継続してウラシル増加量を追跡した。その結果、時間経過に伴うウラシル由来の蛍光ピークが増大することを

確認された（図4）。反応時間と生成したウラシル量の間には良好な直線関係が認められ、その傾きからDPD逆反応の活性を算出することができた。得られた活性値は、順反応の活性値と比較して数倍低い値であり、この結果は逆反応の速度が遅いという既報の情報と一致するものである。本技術では蛍光検出していることもありクロマトグラムが非常に安定しているため、ベースラインのシグナルノイズ比（S/N比）を基準として検出限界を算出したところ、90分後の反応液に含まれるウラシル量の1/10以下でも十分に定量可能であると判明した。すなわち、DPD活性が通常の1/10以下の検体でも活性値を測定できることから、本研究結果は新しいDPD欠損症診断法としての可能性を示唆するものであると言える。

【結論・今後の展望】

以上、本研究では、ウラシル特異的な蛍光誘導体化反応を応用して、DPD逆反応によるウラシルの生成を追跡する技術を開発した。血液から単離したPBMCを、簡便なDPD逆反応および蛍光誘導体化反応の2段階の反応に供した後、その反応液をHPLCにて分離・蛍光検出したところ、容易にウラシルを定量できることが明らかになった。得られた活性値はDPD順反応よりもかなり低い値であったが、論文の報告と矛盾しないものであった。今後は、同一検体を使用して、本技術によるDPD逆反応の活性測定および従来の放射化学的手法によるDPD順反応の活性測定を行う。DPD逆反応とDPD順反応の活性相関を明らかにできれば、DPD逆反応の活性測定によってDPD順反応の活性を予測できるため、DPD欠損症の診断が可能になると考えられる。また、HPLCを使用しない分光光度計での活性測定法を試み、よりハイスループットなDPD欠損症診断法の開発に展開する予定である。

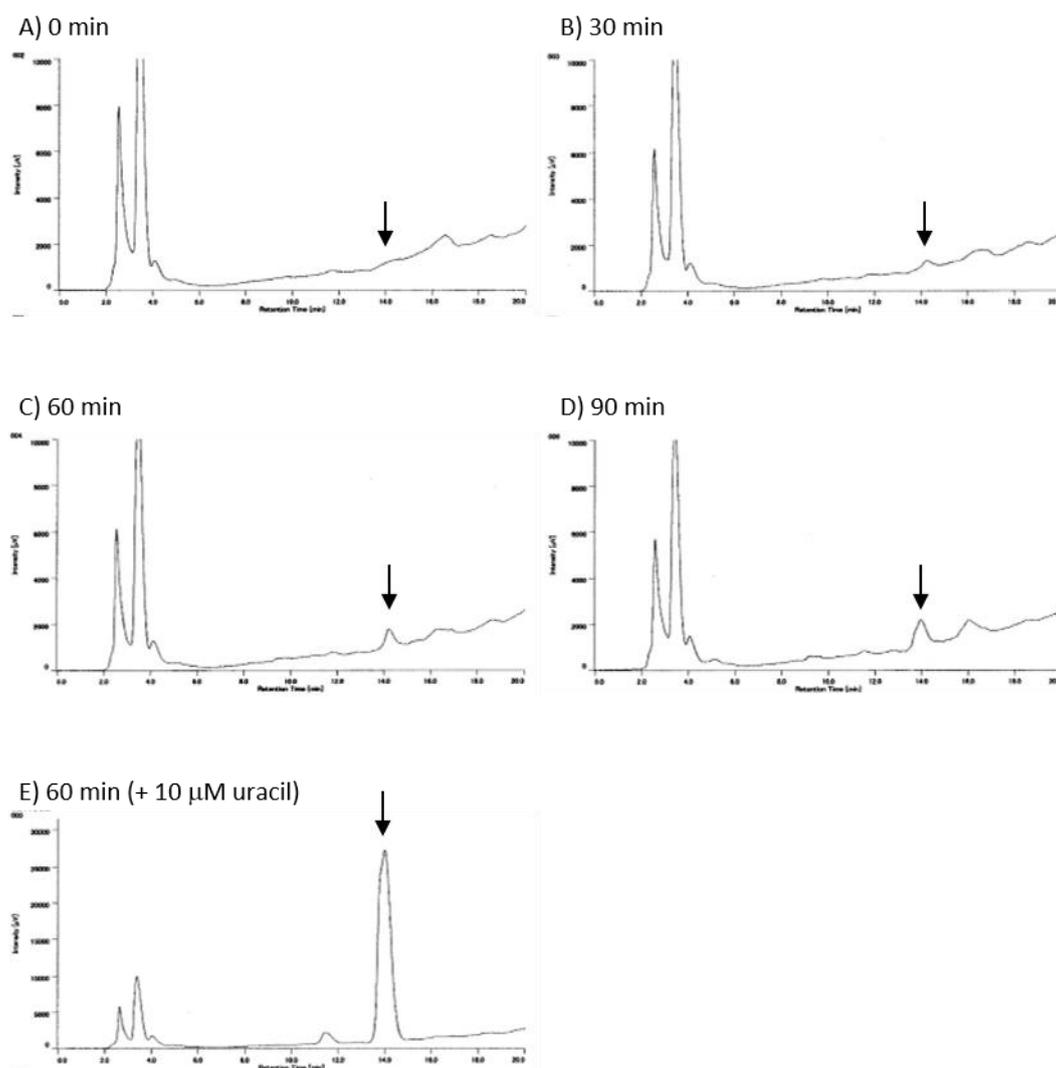


図4 DPD逆反応の反応液をウラシル特異的蛍光誘導体化反応に付した後にHPLCによって分析したクロマトグラム（矢印はウラシル蛍光体のピーク）。A) 反応開始直後の反応液、B) 反応開始後30分の反応液、C) 反応開始後60分の反応液、D) 反応開始後90分の反応液、E) 反応開始後60分の反応液に10 μ Mウラシル標品を添加したクロマトグラム。