審査の結果の要旨

論文提出者氏名　沖本　優子

活性酸素種により生成する脂質過酸化物は脂質酸化の一次生成物であり、生体内の酸化ストレスの指標として測定されている。特に、動脈硬化において低比重リポタンパク(LDL)由来の脂質過酸化物は初期病変の指標であると同時に病巣の進展にも大きく関与することが示唆されており、注目を集めている。従来の生体試料の脂質過酸化物の測定法として使用されてきた TBARS 法や紫外吸収、化学発光法は検出特異性が低く、細胞や個体などに添加して直接脂質過酸化を検出することはできず、HPLC を用いての分離検出が行われていた。一方、蛍光を用いて生きた細胞での酸化ストレスを測定する試薬が開発されていたものの、反応特異性に問題があった。本論文では蛍光法により脂質の過酸化物を特異的に検出する新規の方法を開発し、生物学的な系における酸化を追跡することに成功した。

本論文では過酸化物と特異的に反応することにより蛍光性となる化合物を脂質過酸化物の検出に用いた。ジフェニル-1-ピレニルフォスフィン(DPPP)は無蛍光であるが、ヒドロペルオキシドと反応し、ジフェニル-1-ピレニルフォスフィンオキシド(DPPP=O)となることで蛍光性を持つ。DPPP は化学式から想像できるように脂溶性が高いので、これを細胞や LDL に添加した場合、膜成分に取り込まれ、保持される上、膜内の過酸化物と反応して蛍光を発することが予想されたため、本論文の目的には理想的な条件を備えていた。

第二章では DPPP の溶解性や DPPP=O の蛍光強度の検量線作製に関する基礎的なデータおよび従来の紫外吸収・化学発光法との比較実験により、DPPP=O による過酸化物の検出が充分定量的・高感度であり、生物学的酸化で起こりうる酸化を検出できることを示した。さらに第三、四、五章の前半で均一溶液とリポソーム溶液、マウス白血球膜、LDL での DPPP の過酸化物との反応性を調べた結果から、細胞や LDL 中では DPPP が予想通り疎水性部位に局在し、脂質過酸化物と高選択的に反応していることを示した。

本論文で確立した分析法の具体的応用例として第三章ではマウス腹腔内白血球およびヒト好中球の細胞膜中に DPPP を取り込ませ、白血球の活性化に伴う細胞膜内脂質過酸化反応の追跡を試みた。その結果活性化した白血球膜の脂質過酸化という生理的な酸化を本法

により高感度・特異的に定量し、可視化できることが明らかとなった。さらに第四章ではLDL に DPPP を取り込ませ、LDL 内脂質過酸化反応を活性化した好中球で行った。この場合も経時的に脂質過酸化を検出できることが明らかとなった。さらに LDL のマウス腹腔マクロファージ内での酸化も本法により可視化することができた。

本論文で意義として、開発した新規の生物学的酸化反応の分析法が高反応特異性かつ高検出特異性という従来法にない利点を持つことが挙げられる。両者を兼ね備えたプローブはこれまでなかったため、生物学的酸化を検出した既往研究は測定物を同定することができず、酸化物ではなく酸化ストレスを測定するのにとどまっていた。それに対して本法は過酸化脂質を特異的に検出することに成功した。また、検出物質に脂質過酸化物という蓄積型のものを選択したため、蛍光が蓄積されるのも大きな利点である。生理的な酸化反応は刺激に応答して一過性に起こり、酸化物も微量にしか発生しないので、微分型のプローブは扱いにくく、長時間の測定には適さない。DPPP で標識した試料の蛍光を測定することで蓄積する過酸化脂質を定量的に検出できる本分析法は、現在最も簡便・迅速で明快な測定法であることは明らかである。さらに、標識による検出は、HPLC で分離分析する方法と比較すると格段に操作が少ないため、操作中の酸化を最低限に抑えることができる。もっとも特筆すべきは、蛍光を画像的に解析することで脂質過酸化を可視化できる点である。このような試みは今まで例が無く、この方法を用いることで、マクロファージの内部で LDL の酸化が進行している可能性があることを初めて示すことに成功した。本論文で示された生物学的酸化の追跡応用例に加え、混合培養系・組織・個体など対象物を単離することが困難であることが予想される試料における脂質過酸化を測定するという要請に本分析法が広く対応できると考えられる。

本審査委員一同は，本論文がきわめて独創的なものであり、新規法の開発が生化学的、臨床学的に意義があることを認めた。さらに提出者の経歴・実績についても検討を行い、学位を取得するのに充分妥当であると判断した。

よって本論文は博士（工学）の学位請求論文として合格と認められる。