

論文の内容の要旨

論文題目 脂質クラス別脂肪酸組成解析法の開発と生体試料への応用

氏 名 等々力 徹

【はじめに】

脂肪酸は脂肪酸そのものとして存在するほか、すべてのクラスの脂質に脂肪酸エステルとして存在しており、脂質の主要な構成成分となっている。それらの脂肪酸の種類は多く、肝臓内の糖・脂質代謝や、酸化還元平衡などが脂肪酸の組成に影響を与え、肝臓内の脂肪酸組成比を変化させることが推察される。さらに、肝臓内で合成された脂質は、その一部がリポ蛋白を構成し血中へ放出されることから、肝臓内の脂肪酸組成の変化は、血清中脂質の脂肪酸組成にも反映し、種々の疾患と対応させる事が可能であると考えられる。従って生体試料中のエステル型脂肪酸および遊離脂肪酸の組成を解析することは意義あることと思われる。

エステル型脂肪酸および遊離脂肪酸の組成を解析するには、脂質の抽出ー脂質のクラス分画ーメタノリシスによる脂肪酸メチルエステルの生成ー脂肪酸メチルエステルの分離定量の行程が想定される。しかし個々の行程については検討はされているものの、各脂質クラスの脂肪酸組成をクラス別に解析する方法としては組み立てられてはいなかった。そこで本研究では、クラス別脂肪酸組成を解析するための一斉分析法の確立を目的とし、各行程につき、手法を選択して組み合わせ、その条件設定を行った。また本研究で確立された脂質クラス別脂肪酸組成解析法を用いて、脂肪酸組成に変化を与える因子の検索を行った。

【本論】

【1】脂質クラス別脂肪酸組成解析法の確立

種々の検討の結果、Folch法による脂質抽出、フロリジルカラムクロマトグラフィーによる脂質クラス分画、BF₃-メタノールによるメタノリシス、およびキャピラリーガスクロマトグラフィー(GC)による脂肪酸メチルエステルの分離定量の4行程につき、最適条件を検討して定量的解析法を確立した。

(1) GCによる脂肪酸メチルエステルの分離定量

脂肪酸のメチルエステルのGCによる分析には、内径0.3 mm、長さ30 mのキャピラリーカラムを使用した。定量はヘプタデカン酸を内標準として用いる面積強度法により行った。本法による保持時間や相対面積強度の再現性はすべて、CVで5%以内と良好であった。

(2) 脂肪酸メチルエステルの調製

ジムロートを取り付けたナシ型フラスコで加熱する還流法で、試薬の組成や反応時間の検討を行った。メタノリシス試薬としてグリセリド(GL)についてはメタノール中20%ベンゼン-4.3% BF₃、コレステロールエステル(CE)についてはメタノール中30%ベンゼン-5.9% BF₃、他のクラスの脂質についてはメタノール中17% BF₃を用いた。各々の反応時間で生成した脂肪酸メチルエステルをヘキサン抽出し、GCにて定量し収率を算出した。その結果、GLとCEは2時間の反応で、他の脂質クラスでは30分の反応で100%近いメタノリシスの収率が得られた。さらにこれらの条件で各脂質クラスについて、異なる脂肪酸組成の試料を検討した結果、各脂質クラスともに脂肪酸の種類による収率の差はみられなかった。

(3) フロリジルカラムクロマトグラフィーによる脂質クラス分画

本法では試料量や脂質の空気酸化が少ない点からカラムクロマトグラフィーを採用した。また充填剤として、再現性や回収率の難点を回避するために、脂質に対する吸着力を適度に低下させた50%メタノール処理フロリジルを用いた。この50%メタノール処理フロリジルのヘキサン溶液を充填したカラムに、溶離液としてn-ヘキサン(H)-ジクロルメタン(D)-メタノール(M)系を用いて、最適の溶離条件を検討した結果、30%D/HでCE、10%M/DでGL、100%Mで遊離脂肪酸(FFA)、そしてクロロホルム:メタノール:ピリジン:酢酸(3:2:3:3)のCM:PA液でリン脂質(PL)を溶出させることにより、各脂質クラス画分において高い回収率で標準試料が再現よく分画された。以上の結果、確立された解析法を図に示した。

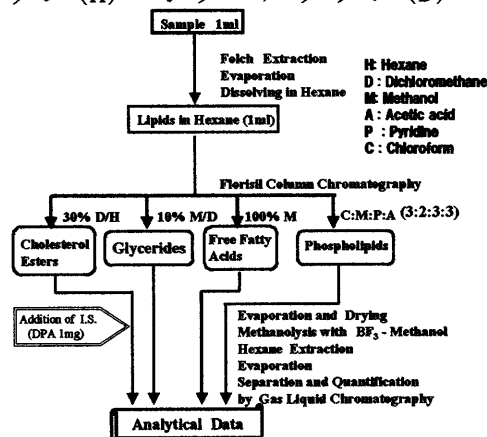


図. 脂質クラス別脂肪酸組成解析法

【2】本解析法の生体試料への応用－脂肪酸組成変動因子の検索－

(1) 高脂血症における血清リポ蛋白中脂質のクラス別脂肪酸組成の解析

各高脂血症型と各リポ蛋白中脂質の脂肪酸組成との関連について、平衡密度勾配遠心法で分離した各リポ蛋白を試料として検討を行った。その結果、従来の報告と同様に、同一脂質クラスの脂肪酸組成は、リポ蛋白種や高脂血症型によらずほぼ同じであることが確認された。

(2) CESD患者の肝臓内脂質の脂肪酸組成変化

CESD患者の肝臓について、脂質の組成やその脂肪酸組成の検討を行った。患者肝臓内に多量のCEの蓄積が観察されたが、他のクラスの脂質は軽度の蓄積であった。患者の肝臓中のCEの脂肪酸組成はリノール酸が最も多く、ついでオレイン酸であった。これに対して、対照の肝臓中のCEの脂肪酸組成はオレイン酸が最も多く、ついでリノール酸であった。一方、健常人の血清LDL中のCEの脂肪酸組成は、リノール酸が最も多く、ついでオレイン酸と報告されている。したがって、患者のCEの脂肪酸組成は対照の肝臓中のCEではなく、血清中のLDLのCEの脂肪酸組成に類似している結果となった。GLについては、患者肝臓中、対照肝臓中および血清LDLでほぼ類似した脂肪酸組成であった。これらの相違を理解するために、酸性および中性コレステロールエステラゼ(ACEH、NCEH)活性について検討した。ACEH活性は対照肝に比べ患者肝では1/20に低下していたが、NCEH活性では対照肝と差は認められなかった。細胞に取り込まれたLDLはファゴソーム中に移行し、ライソソームと融合して二次ライソソームとなり、このときACEHにより加水分解をうけることが知られている。本症例の場合、このACEH活性が低下しているためにCEが加水分解できずに蓄積した結果、CEの脂肪酸組成が血清LDLと類似したと考えられる。したがって、本症における肝臓に蓄積したCEの由来は血清LDLであり、ACEHの欠損に基づく蓄積であることが示唆された。

(3) 肝臓内酸化還元平衡と2型糖尿病患者、急性アルコール中毒患者及びC型肝炎患者の血清脂質の脂肪酸組成

肝臓内での脂肪酸の炭素鎖の延長と不飽和化は、肝臓内のRedoxと密接に関連している。そこで、グルコース負荷による肝臓内Redoxの変動による血清脂質中の脂肪酸組成の変化と、肝臓内Redoxが還元方向へ変移していると報告されている2型糖尿病患者の血清脂質中の脂肪酸組成の変化との関連を検討するために、糖尿病患者および健常者についてグルコース経口負荷後の血清脂質中脂肪酸組成の変動をクラス別に分析した。その結果、肝臓内Redoxの臨床的指標の一つである肝動脈ケトン体比(AKBR)の逆数が健常人に対して高値で還元状態にある2型糖尿病においては、血清中のGLやPLの脂肪酸の不飽和脂肪酸の総和(US)が増大していることが確認された。更に、肝臓内のグルコース負荷によるRedoxの酸化方向への変動にともない、血清中GLのUSが健常者および2型糖尿病患者ともに減少していた。こ

これらの結果から肝内のRedoxの短期的な変動では血清中GLのUS、長期的な変動ではGLだけではなくPLのUSも変化することが明らかとなり、Redoxの変化が2型糖尿病における血清脂質の脂肪酸組成の変化の原因の一つである可能性が示唆された。一方、アルコールは、アルコール脱水素酵素およびアルデヒド脱水素酵素の作用により肝臓内Redoxを還元方向に変動させる。そこで急性アルコール中毒患者について解析したところ、血清GLとPL中の脂肪酸組成は、USやオレイン酸/ステアリン酸(O/S)の上昇、アラキドン酸/リノール酸(A/L)比の減少が認められた。アルコール投与による肝臓内Redoxの還元方向への変動も、血清脂質の脂肪酸組成を変化させることが確認された。

東大消化器病内科との共同研究により、C型肝炎の病態モデルであるHCVコア蛋白遺伝子導入トランスジェニックマウス(TgM)の肝臓では脂質の蓄積(ステアトシス)が認められた。そこで、このTgMの脂質解析の結果に基づき、HCV感染患者の肝臓および血清中の脂質の分析を行ったところ、肝臓に蓄積している脂質は主にGLであり、対照に比べて上昇が認められた。肝臓及び血清中の脂質クラス別脂肪酸組成では、O/Sの上昇が肝臓中と血清中のPLで認められたが、GLにおいては食餌や感染の進行度などの個体差のために、有意な差は認められなかった。またUSについては肝臓でGL、PLとも上昇が認められたが、血清では有意の差は認められなかった。またA/Lは血清のPLで有意に下降していたがGLでは下降傾向は認められるものの有意な差は認められなかった。一方、炭素鎖長(MNC)や不飽和脂肪酸1分子あたりの二重結合数(MNUSB)では、肝臓および血清中脂質で対照と差は殆どみられなかった。以上の結果から、マウスで認められたようなHCVコア蛋白発現に伴う脂肪酸組成の変化はヒトでは顕著ではなかったが、Redoxの変化に伴う脂肪酸組成の変化と類似したものであった。

【総括】

Folch法による脂質抽出、フロリジルカラムクロマトグラフィーによる脂質クラス分離、BF₃-メタノールによるメタノリシス、およびキャピラリーガスクロマトグラフィーによる脂肪酸の分離定量を組み合わせ、クラス別脂肪酸組成を解析するための一斉分析法を確立した。本法を用いて、コレステロールエステル蓄積症患者の肝臓内の脂質の脂肪酸組成を解析した結果、蓄積脂質の由来は血清リポ蛋白であり、脂質の加水分解酵素の活性変動が脂肪酸組成変動因子の一つであることが明らかとなった。さらに、糖尿病患者や急性アルコール中毒患者の血清、Redoxの変動を起こすグルコース負荷後の血清脂質の脂肪酸組成解析から、肝臓内Redoxの変動が、脂肪酸組成を変化させる因子の一つであることを明らかにした。加えてHCV感染患者の肝臓と血清中脂質の脂肪酸組成の解析結果から、HCV感染が肝臓内のRedoxを還元方向に変移させて、脂肪酸組成を変化させている可能性が示唆された。