

論文の内容の要旨

論文題目 リゾホスファチジルコリンおよびリゾホスファチジン酸の自動化
測定法の開発とその応用

氏名 岸本達也

リゾホスファチジルコリン(LPC)は血液中に最も多く含まれるリゾリン脂質であり、健常者における血漿中LPC量は約130-280 $\mu\text{mol/L}$ とされる。一方でリゾホスファチジン酸(LPA)は最も単純な構造を有するリゾリン脂質であり、その血漿中濃度は0.1-1 $\mu\text{mol/L}$ 程度とLPCに比べて極めて少ない。近年、動脈硬化との関係が示されている酸化LDLの主成分の一つがLPCであることが報告され、さらにLPC自身も単球の化学遊走性を促進したり、内皮細胞において接着因子の発現を誘導したりすることが発表されるなど、その生理活性に注目が集まっている。一方でLPAも細胞増殖の制御や血小板凝集、癌細胞の浸潤促進など様々な生理作用をもつことが知られている。さらに卵巣癌患者の血漿中LPAが健常者に比べて有意に高値であることが報告され、血漿中LPA量と癌との関係が一躍注目されるようになった。これらのことから血液中のLPC量やLPA量を測定することが、ある種の疾患を診断する上で有用である可能性が示唆された。しかしLPC, LPAの定量法としてこれまでに知られている、ガスクロマトグラフィーにより脂肪酸量を指標に定量する方法やLC/ESI-MS法などは操作が煩雑で時間がかかり、また特別な器械を必要とするものも多く、汎用的に用いることは不可能であった。そこで臨床検査においてルーチンに使用できる、LPCおよびLPAの自動化測定法の開発を目指した。

LPC測定法としては、リゾホスホリパーゼとグリセロホスホリルコリンホスホジエステラーゼ(GPCP)を作用させ、生じたグリセロール-3-リン酸(G3P)もしくはコリン

をそれぞれ特異的なオキシダーゼで酸化させて生じた過酸化水素をパーオキシダーゼ存在下で比色定量する方法を考案した。しかしリゾホスホリパーゼには、ホスホリパーゼ A 活性を同時に有するものも多い。そこで幾らかのリゾホスホリパーゼをスクリーニングした結果、ホスファチジルコリンに全く反応を示さなかった Bacillus 由来のものを使用することにした。また LPC を測定する方法としては、前述したように G3P を測定する方法とコリンを測定する方法の 2 種類が考えられる。そこで G3P を測定する方法とコリンを測定する方法とで基質特異性を確認したところ、コリンを測定する方法では LPC のみが反応したが、G3P を測定する方法では LPC のみでなく、LPE など他のリゾリン脂質も同程度の反応を示した。さらに特異性のみでなく、コリンを測定する方法の方が 2 倍高感度であることからコリンを指標に LPC 測定を行うことにした。次に脂肪酸分子種に対する基質特異性を調べたところ、ほぼ同等の反応性を示した。このことから、この酵素反応系では脂肪酸分子種の認識はほとんどしておらず、その測定値は総 LPC 量を表すことが示された。このようにして特異的な LPC 測定法の開発に成功し、さらに酵素濃度等種々の条件検討を行った結果、二つの構成試薬からなる LPC 測定試薬の条件を決定した。ここで試薬を二つに分けたのは試料中に含まれるコリンや過酸化水素などの反応中間代謝産物の影響を除去して LPC を特異的に測定するためであり、試料と第一試薬を添加後 5 分間の前反応によって中間代謝産物を完全に無色消去し、その後第二試薬を加えて LPC 由来の過酸化水素のみを反応させ、その際の第二試薬添加前と添加 5 分後の吸光度差を指標として LPC 量の測定を行った。この LPC 酵素学的測定法では LPC 純品濃度と吸光度変化量との間には良好な直線関係がえられ、また血清を希釈した場合にも希釈率と LPC 濃度との間には良好な直線関係がえられた。なお高濃度の血清を希釈した結果から、約 1,500 mol/L まで定量可能であることがわかったが、通常ヒト血清では 1,000mol/L を超えるものはなく、ヒト血清を測定するには十分な定量限界であった。さらに血清試料に既知濃度の LPC を添加してその回収率を調べたところ 99.5-102.1 %と良好であり、また従来法の一つである脂肪酸分析法との相関関係も良好であったことから、本測定法が血清中の LPC を正確に測定できることが示唆された。LPC 測定法と同様に Bacillus 由来のリゾホスホリパーゼを用いて、LPA 測定法の開発を行った。ただし血液中の LPA 量は LPC 量に比べて極めて低く、通常の比色系では感度不足のために測定することが困難であった。そこで酵素的サイクリング法を導入することによって最終的に LPA 由来の過酸化水素を増幅させる方法を開発した。具体的には LPA をリゾホスホリパーゼによって加水分解し、生じた G3P を G3PO で酸化させる。この際一分子の過酸化水素とジヒドロキシアセトンリン酸を生じる。ここでジヒドロキシアセトンリン酸をグリセロール-3-リン酸デヒドロゲナーゼによって再度 G3P に変換する。再生した G3P を新た

に G3PO で酸化し、一分子の過酸化水素とジヒドロキシアセトンリン酸を産生させる。このサイクルを繰り返すことによって最終的に過酸化水素を増幅することができる。LPA 測定法では、酵素的サイクリング法を導入したため、反応にともなう吸光度変化は時間に依存して上昇する。よってこの時の単位時間当たりの吸光度増加率を指標として LPA 濃度を測定した。LPA 測定法では、リゾホスホリパーゼを添加しない試薬を別に用意し、リゾホスホリパーゼを添加した試薬によって得られた値から差し引くことで、反応中間代謝産物の影響を受けることなく、LPA 量を特異的に測定することができた。次に血漿試料での直線性を調べたところ、低中濃度では良好な直線関係が得られ、高濃度レベルでは約 15 $\mu\text{mol/L}$ まで直線関係が得られた。さらに LPC と同様に添加回収率を調べたところ、実測値は理論値の 100.3-101.6%であり、良好であったことから LPA 測定法においても血漿中の LPA を測定できることが確認された。LPC および LPA とともに保存血清あるいは血漿において値が上昇することが知られている。この LPC の増加は血中に含まれる LCAT やホスホリパーゼ A 活性によって、LPA の増加はリゾホスホリパーゼ D 活性によって起こると考えられるが、リゾホスホリパーゼ D は金属イオンを要求するとの報告があることから EDTA によって上昇が抑えられることが予測された。まず LPC について同一のボランティアから同時に採取した血清あるいは血漿を 25°C で加温した際の経時的な LPC 値の変動を調べたところ、血清、血漿ともに保存時間に依存して LPC 値が大きく上昇した。さらに LCAT 欠損マウスの血清を使用して同様の検討をしたところ、野生型およびヘテロのマウスではヒトの場合と同様に 25°C、24 時間保存後に LPC が増加したが、ホモ欠損マウスではむしろやや減少した。しかしながらホモ欠損マウスにおいても血清中 LPC 値はゼロではなく、野生型の約半分程度存在した。これらのことは、マウスの場合、保存血清あるいは血漿における顕著な LPC 増加反応のほとんどは LCAT 反応に依存しているが、生体内での血中 LPC 産生には LCAT 以外の因子もかなり関与していることを示唆している。一方で LPA は血清とヘパリン血漿では保存時間とともに値が大きく増加したが、EDTA 処理した血漿では大きな増加は見られなかった。しかし EDTA やヘパリンが本測定法に影響しないことは事前に確認している。よって今回の結果は、ヒトの血中 LPA 量を知るためには、血清やヘパリン血漿では難しく、EDTA 処理した血漿を用いることが重要であることを示している。さらにこれらの測定法が臨床的に応用可能かどうかを調べた。以前から LPA に腫瘍細胞浸潤促進作用があることが知られ、卵巣癌患者で血漿 LPA 量が有意に高いことも報告されていることから、今回開発した LPA 測定法を用いて卵巣癌患者の血漿 LPA 量を調べたが、良性疾患に対して有意差は認められなかった。最近になって卵巣癌患者の血中 LPA 値は健常者に比べて高いということはないという報告もされているため、これらにはいまだ議論の余地

があるところである。LPC については急性心筋梗塞患者の血清 LPC 濃度が低いと報告されているため、動脈硬化性疾患である不安定狭心症や冠攣縮患者における血漿中 LPC 濃度を調べたところ、報告と同様に両疾患群ともに低値であった。このことは、血中 LPC 量の測定が動脈硬化発症の予測や治療後の病態把握に有用である可能性を示している。

今回開発した LPC および LPA 測定法は、血清や血漿を測定する際にも前処理を必要とせず、約 10 分で定量でき、また臨床検査分野で汎用的に使用されている生化学自動分析装置へも適用できる。今後この方法によって血中 LPC あるいは LPA と様々な疾患との関係が研究され、病気の早期発見や予後判定などに利用されることが期待される。