

審査の結果の要旨

氏名 岸本達也

リゾホスファチジルコリン(LPC)及びリゾホスファチジン酸(LPA)は、ともに血中に存在する代表的なリゾリン脂質である。LPCは酸化LDLの主成分の一つであり、LPC自身も動脈硬化性作用を有することが報告されている。一方でLPAも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も報告された。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るが、従来知られるそれらの測定法は操作が煩雑であるなど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、試料中のLPCにリゾホスホリパーゼ、グリセロホスホリルコリンホスホジエステラーゼ、コリンオキシダーゼを作用させ、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。リゾホスホリパーゼにはホスファチジルコリンに全く反応を示さないものを使用し、より特異性を高めた。脂肪酸分子種に対する反応性を調べたところ、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LPC酵素法と従来法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量を正確に測定できることが示唆された。

一方で血中LPA濃度はLPCよりもかなり低いため、試料中のLPAにリゾホスホリパーゼを作用させ、生じたグリセロール-3-リン酸をグリセロール-3-リン酸オキシダーゼとデヒドロゲナーゼを用いて酵素サイクリングさせ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。このLPA酵素法の添加回収試験を行ったところ、その添加回収率は良好であり血漿LPA量を正確に測定できることが確認された。

LPCとLPAは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。このうち LPC の増加は血中に含まれる LCAT 活性等によって起こることが考えられるため、LCAT 欠損マウスの血清を測定したところ、野生型及びヘテロのマウスではヒトの場合と同様に 25℃、24 時間保存後に LPC 量が増加したが、ホモ欠損マウスではむしろやや減少した。しかしホモ欠損マウスでも血清 LPC 量はゼロではなく、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、保存血清での顕著な LPC 増加反応の大部分は 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 の増加は、EDTA 処理した血漿においては血清やヘパリン血漿ほど大きくはなかった。ただし 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。よってこの増加反応は血中に存在する金属イオン要求性のリゾホスホリパーゼ D の作用によることが示唆される。今回の結果からヒトの血中 LPA 量を測定する際には、EDTA 処理した血漿を用いることが重要であることがわかった。

さらに今回開発した LPA 酵素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。一方で LPC 酵素法を用いて不安定狭心症患者の血漿中 LPC 濃度を調べたところ、健常者に比して低値であった。このことから血中 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が示唆された。

今回開発した LPC 酵素法及び LPA 酵素法は、ともに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。今後これら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。以上の研究成果より、博士（薬学）の学位を授与するに値するものと認めた。