九州大学学術情報リポジトリ
Kyushu University Institutional Repository

A novel assay for triglycerides using glycerol dehydrogenase and a water-soluble formazan dye, WST-8

河野, 弥季

https://hdl.handle.net/2324/2534382

出版情報：Kyushu University, 2019, 博士（保健学）, 課程博士
バージョン：
権利関係：Public access to the fulltext file is restricted for unavoidable reason (2)

KYUSHU UNIVERSITY

氏　　名：箕輪　弥季　（河野　弥季）

論 文 名：A novel assay for triglycerides using glycerol dehydrogenase and a water-soluble formazan dye, WST-8
（グリセロール脱水素酵素と水溶性ホルマザン色素 WST-8 を用いた中性脂肪測定法の開発）

区　　分：甲

論 文 内 容 の 要 旨

血清中性脂肪値が冠動脈疾患の独立したリスク因子であることが報告されてから久しい．近年ではさらに研究が進み，中性脂肪リッチなレムナントリポタンパクの存在が冠動脈疾患の発生に関わっていることが判り従来の血清中性脂肪のみならず，超低比重リポタンパク中性脂肪（very low-density lipoprotein triglyceride; VLDL TG）やレムナント様リポタンパク粒子中性脂肪（remnant-like lipoprotein triglyceride; RLP-TG）等，より細かい分画中の中性脂肪を測定する意義も高まってきている．また，中性脂肪を低下させる物質や様々な種類の検体に含まれる中性脂肪の臨床的意義を検索する研究も進んでいることから中性脂肪測定を取り巻く環境は様々に変化してきていると言える．

これまでに多くの中性脂肪測定法が報告されてきた．その中で現在最も広く普及しているのは酵素法であり，glycerol-3-phosphate oxidase (GPO; EC 1.3.3.21)-peroxidase (POD; EC 1.11.1.7)法が主流である．この測定法では高濃度までの測定が可能であるが，発色に関わる POD の基質特異性が低いことや反応に使用する酵素の数が多いことから試料に含まれる成分と非特異的反応を起こす可能性が高い．さらに VLDL TG や RLP-TG などは血清中性脂肪に比較し低濃度であるため，従来の GPO-POD 法では感度が足りず測定が困難な場合がある．以上の背景より今回我々は，POD を用いない簡易な中性脂肪測定法を開発することを目的とし研究を開始した．この測定法には glycerol dehydrogenase (GDH; EC 1.1.1.6)と水溶性ホルマザン色素である 2-(2-methoxy-4-nitrophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulphophenyl)-2*H*-tetrazolium monosodium salt (WST-8)を用いる．

GDH は補酵素 NAD^+の存在下でグリセロールに作用し，ジヒドロキシアセトンと NADH へと分解する酵素である．本酵素のグリセロールに対する *Km* 値は 1.1×10^{-2} mol/L と親和性が低く，また反応の平衡がグリセロールからジヒドロキシアセトン生成の反応よりもむしろ反対の反応が優位であることから中性脂肪測定法には使用が難しい酵素であると言える．過去にはジヒドロキシアセトンを捕捉する方法や不溶性ホルマザン色素，蛍光色素を使用する方法が考案されたがそれぞれに難点があり広く普及することはなかった． WST-8 は電子キャリアーである 1-methoxy-5-methylphenazinium methylsulphate (1-methoxy PMS)の存在下で NADH によって還元され発色し，460 nm に極大吸収を示す．我々は WST-8 を NADH と作用させ，反応系から NADH を取り除くことで反応の平衡をグリセロールからジヒドロキシアセトンを生成する正反応優位に傾けることを試み，成功した．また WST-8 のモル吸光係数は NADH に比較し高いことから測定感度を上げることも出来た．

本測定法は内因性グリセロール消去反応，本反応の二つの反応系から成る．初めに内因性のグリセロールをGKの作用によりグリセロール-3-リン酸へと変換する．GKの活性はその後Mg^{2+}をマスクすることで停止させる．本反応では中性脂肪にLPLを作用させることで加水分解し，グリセロールと脂肪酸へと変換する．生成したグリセロールに補酵素NAD^{+}の存在下でGDHを作用させ，ジヒドロキシアセトンとNADHへと変換する．最終的に1-methoxy PMSの存在下でNADHとWST-8を反応させることでWST-8を還元し，黄色のホルマザンを生成させる．このホルマザンの生成量と中性脂肪の濃度が比例することを利用し，間接的に中性脂肪の濃度を求めることが出来る．

本測定法の性能を調べるために直線性，定量限界，干渉物質の影響，内因性グリセロールの消去能，同時・日差再現性，GPO-POD法との相関を検討した．その結果，直線性は6.4 mmol/Lまで，定量限界は0.027 mmol/L，2.5 g/L以上のヘモグロビン，65 μmol/Lの遊離ビリルビンによって正誤差の影響を受けること，10 mmol/Lまでのグリセロールを消去可能であること，同時再現性における変動係数1.1-2.3%，日差再現性における変動係数1.1-1.5%，GPO-POD法との相関係数r=0.999，回帰式はy=1.0002x+0.0395であることが判明した．

本測定法が直線性を示す濃度は6.4 mmol/Lまでであり，これはGPO-POD法と比較すると低い値である．しかしながら空腹時中性脂肪値の目安（4.6 mmol/L以上を高値とする）を十分評価できる濃度であるためこれ以上の直線性は必要ないという結論に至った．我々の測定法における定量限界は0.027 mmol/Lであり，これはVLDL TGやRLP-TGの最頻値である0.1 mmol/L以下を十分評価できる値であると考える．

本測定法はヘモグロビン，遊離ビリルビンにより正誤差となることが判明した．ヘモグロビンは1-methoxy PMSやWST-8と反応しメトヘモグロビンとなり，さらにWST-8との反応ではこれを発色させることが検討の結果判明した．ヘモグロビンによるこの影響は無視できないものの，この濃度が2.5 g/Lを超える検体は稀であることから大きな問題であるとは言い難い．ビリルビンは4つのピロール環が2つずつ，メチレン基を介して繋がった構造を示す．我々はこのメチレン基が還元力を持つためにWST-8が非特異的発色を起こしたのではないかと考えた．このメチレン基は本測定法に影響を与えなかった抱合型ビリルビンも持つが，遊離ビリルビンとは側鎖が大きく異なっている．この違いが本測定法に与える影響の違いとなったのではないかと推測している．

本測定法は10 mmol/Lまでのグリセロールを消去可能であることが判明した．現在グリセロール消去の必要性を問う議論が活発であるが，この代謝については未だ不明な点が多い．そのため今回我々は内因性グリセロールを消去する測定法を構築した．報告されている内因性グリセロールの濃度は0.28 mmol/Lであり，本測定法で十分消去可能な濃度である．

GPO-POD法との回帰式はy=1.0002x+0.0395と良好な相関を示した．GPO-POD法が若干低い値を示すのはPODの基質特異性が低く，試料に含まれる還元性物質と反応したからではないかと推測している．両者の差は冠動脈疾患のリスク評価の際には問題にならないが，低濃度の中性脂肪を評価する際には注意が必要である．

われわれがここに報告した中性脂肪測定法は感度・性能に優れた簡便な測定法であり中性脂肪測定法として他の測定法に十分比肩できると考える．本測定法を用いて冠動脈疾患リスクを評価するだけでなくVLDL TGやRLP-TGなどを測定することも可能である．さらに本測定法は単純な系を使用しているため未知の試料を測定する際に非特異的反応を起こす可能性は低い．以上の理由により我々は本測定法が十分信頼に足る中性脂肪測定法であると考える．