

## Development of an enzymatic assay for ethanolamine in plasma

太田, 英里

<https://doi.org/10.15017/2534383>

---

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 :

氏 名：太田 英里

論 文 名：Development of an enzymatic assay for ethanolamine in plasma

(血漿エタノールアミンの酵素的測定法の開発)

区 分：甲

### 論 文 内 容 の 要 旨

エタノールアミン (Etn) は生体中でホスファチジルエタノールアミン (PE) やエタノールアミンリン酸(P-Etn)の一部を構成している。乳児の尿中や成人の唾液中で疾患との関連は報告されている。健常者におけるEtn濃度は $11.84 \pm 4.15 \mu\text{mol/L}$ であると報告されている。また、別の報告によると、マウスにおいて肝細胞の増殖期および再生期に血清Etnが上昇し、生体内で肝細胞の増殖を促進する作用を持つと言われている。肝臓でのPE合成経路でEtnはエタノールアミンキナーゼ(EK)によりリン酸化されてP-Etnを生成し、その後CDP-エタノールアミンに変換される。最後に、PEは、エタノールアミンホスホトランスフェラーゼ (EPT) によってCDP-エタノールアミンから産生される。PEは合成DNAの促進に関与するため、Etnは細胞増殖において重要な役割を果たしていると考えられる。しかしながら、成人の血中でのEtnの疾患関連性はまだ明確ではない。

従来の測定法は薄層クロマトグラフィー法やガスクロマトグラフィー・質量分析法、キャピラリー電気泳動・質量分析法といった方法であった。しかし、これらの方法は前処理操作が煩雑で多検体を短時間で処理するには不向きでかつ、導入コストや維持コストが高いといった欠点があった。

そこで今回、我々は*Arthrobacter* sp.由来のアミノオキシダーゼ (AAO, EC 1.4.3.6) に着目した。この酵素はEtnを酸素の存在下で分解し、過酸化水素 ( $\text{H}_2\text{O}_2$ )、アンモニア、グリコールアルデヒドを生成する。ここで生じた $\text{H}_2\text{O}_2$ がペルオキシダーゼ(POD, EC 1.11.1.7)の存在下で、トリンダー試薬(TOOS)と水素供与体(4-アミノアンチピリン)を酸化縮合反応することを利用して、Etnの定量法の構築を目指した。

本法の測定機器には日立7600形自動分析装置を用いた。試薬構成は3試薬系とした。第一試薬には塩化コリンを、第二試薬にはPOD、コリンオキシダーゼ(COD, EC 1.1.3.17)、TOOSを、第三試薬には4-アミノアンチピリン、AAOを使用することを特徴とする。標準液は $30 \mu\text{mol/L}$  Etn水溶液を用いた。第一試薬 $90 \mu\text{L}$ と試料 $30 \mu\text{L}$ が混ざって1.5分後に第二試薬 $90 \mu\text{L}$ が加わり、更に3.5分後に第三試薬が $30 \mu\text{L}$ 加わる。主波長 $546 \text{ nm}$ 、副波長 $800 \text{ nm}$ で第三試薬が入る直前と混ざって5分後の吸光度を測定する2ポイントエンド法にて測定した。

基礎的性能評価は概ね良好であった。同時再現性は2種のサンプルでCV5%以下、日差再現性はCV6%以下となった。直線性は $0 \sim 50 \mu\text{mol/L}$ 、最小検出感度は $1.5 \mu\text{mol/L}$ 、回収試験は2種のサンプルで91.1%、92.2%であった。また、干渉試験は $36.4 \mu\text{mol/L}$ の抱合型ビリルビンで13.1%、 $32.3 \mu\text{mol/L}$ の非抱合型ビリルビンで8.2%の不誤差を生じ、 $0.5 \text{ g/L}$ の溶血ヘモグロビンで15.2%の正誤差を、 $1,410 \text{ FTU}$ の乳びで4.8%の不誤差を生じた。

レファレンス法には高速液体クロマトグラフィー法 (HPLC法) を用いた。使用したカラムはマ

ルチモードカラムで、直接的にEtnを測定するためにポストラベル法を応用した。今回、ラベル化剤にはSH基還元剤、アルカリ性下でアミノ基と結合するo-フタルアルデヒドを用い、蛍光検出器で測定した。

学生の健常者ボランティア50人で本法とHPLC法との相関関係を調べたところ、相関係数 $r=0.89$ と強い正の相関関係が見られた。しかし、HPLC法に対して本法が $6\ \mu\text{mol/L}$ の高値を示す傾向が生じた。

PODの存在下での4-AA, TOOS,  $\text{H}_2\text{O}_2$ の酸化縮合反応はPODの基質特異性が十分ではないため還元物質の影響を受けやすいことが指摘されている。生体中には様々な還元物質があるが、その一つであるアスコルビン酸はアスコルビン酸オキシダーゼによって消去することができる。しかし、同じく還元性を示すビリルビンを消去するビリルビンオキシダーゼはトリンダー試薬とも反応してしまうため、本法に使用することが難しい。本法では試薬中にCODと塩化コリンを加えることにより $\text{H}_2\text{O}_2$ を発生させ、酸化還元反応でビリルビンのような還元物質の影響を小さくする組成となっている。影響回避に使用されなかった $\text{H}_2\text{O}_2$ を消去するために第二試薬にカタラーゼが含まれているので、Etnの本反応に影響はない。試薬中にCODと塩化コリンを加えていない場合に対してビリルビンからの影響をかなり回避することが可能となった。本法はスクリーニング検査として応用することを目的とするため、健常者におけるビリルビン濃度 ( $0.2\sim 1.2\ \text{mg/dL}$ ) では5~7%ほどの負の影響を受けると予想される。従って、問題ないと判断した。

本法とHPLC法に差が見られた理由として、本法に用いたAAOがEtnだけでなくチラミンやドーパミン、ヒスタミンにも反応する性質があり、微量のそれらを測りこんでいる可能性があると考えられた。ドーパミンやヒスタミンはEtnの100分の1未満であり、このため、これら物質が本測定系において影響を与えるとは考えにくく、無視することが可能である。しかし、チラミンは一般的には腸管から吸収されることは少ないものの、食物由来の可能性を否定できず、またHPLC法でもチラミンを検出することはできない。したがって、チラミンの存在の可能性は否定できないが、この傾向についてさらに検討する必要がある。

以上より、本研究ではEtnの迅速かつ簡便な酵素的測定法を構築することができた。今後はさらに正確な方法となるために、より生体中の干渉物質の少ない方法を構築する必要がある。また、血中のEtnの疾患との関連性を検討したい。