

学 位 論 文 題 名

新しいリゾ糖脂質の定量法：病脳での分析

学位論文内容の要旨

I 緒 言

糖脂質はスフィンゴシン塩基に脂肪酸が酸アミド結合したセラミドに種々の単糖やオリゴ糖が結合した物質群であり、リゾ糖脂質は糖脂質から脂肪酸が解離したものである。

リゾ糖脂質は微量で細胞毒性をもち、溶血や組織の壊死を引き起こす。これらの物質は特定の先天性糖脂質蓄積症の組織で増加し、それが原因でこれら疾患は、細胞障害を引き起こすとみられている。

リゾ糖脂質を分離するにはシリカゲルの順相吸着クロマト法が用いられてきたが、インタクトの糖脂質や夾雑物との分離が完全でない。

本研究はリゾ糖脂質と糖脂質の疎水性の違いに着目して逆相クロマトおよび陰イオン交換クロマトを用い、リゾ糖脂質の新しい分離、定量法を確立し、それによって脳組織におけるリゾ糖脂質を定量した。

II 実験材料および方法

試薬はすべて特級の製品を用いた。標準リゾ糖脂質の調製に用いた糖脂質は、ブタ脳の GalCer とスルファチド、ウマ赤血球膜の LacCer およびブタ赤血球膜の Gb₃Cer である。正常ヒト脳、脳に病変のない脂児脳、異染性脳白質変性症（MLD）脳は剖検により、脳腫瘍組織は手術摘出によって得られた。

標準リゾ糖脂質を得るため GalCer, LacCer, Gb₃Cer およびスルファチドをヒドラジン分解し、SEP-PAKC₁₈にてヒドラジンと塩を除去した。スルファチド以外のリゾ糖脂質と未反応の糖脂質は逆相カラムを装填した高速液体クロマトグラフィー（HPLC）でメタノールと水の濃度勾配法による新たな分離法を確立した。リゾスルファチドは逆相クロマトの代わりに陰イオン交換クロマトでの分離法を確立した。

リゾ糖脂質の微量定量法を確立するために、上記の方法で精製したリゾ糖脂質をダンシルクロリドで蛍光誘導体化を行い、UnisilQ60のHPLCのカラムにかけ、分光蛍光検出器によってダンシル化リゾ糖脂質を検出した。

それぞれの脳組織（湿重量：30mg～2 g）はクロロホルム-メタノール中でホモジェナイズレ、室温で2 h 静置し、ホモジェネートを濾過した後、残渣を再びクロロホルム-メタノールで抽出し、各種カラムクロマトグラフィーによりリゾ糖脂質を溶出した。溶出液を蒸発乾固した後、上記のようにダンシル化を行い、HPLCにて分離し、標準のダンシル化リゾ糖脂質を用いて定量した。

脳組織より分離したリゾ糖脂質のダンシル誘導体をFAB/MSで分析した。

Ⅲ 結 果

1. おおのの糖脂質のヒドラジン分解では未反応の糖脂質が残ったが、リゾ糖脂質以外の反応副産物の生成は認められなかった。

リゾスルファチド以外の中性糖脂質のリゾ体と未反応の糖脂質を分離するために逆相カラムのHPLCを用いた。最も効果的な分離は、メタノール-水（6：4）から（10：0）まで直線濃度勾配による溶出であった。この方法によって得られた標準リゾ糖脂質の収量は、リゾ GalCer 72%，リゾ LacCer 68%，リゾ Gb₃Cer 65%であった。

リゾスルファチドの分離にはDEAE セファデックスA-25カラムを使用した。その結果、リゾスルファチドは未吸着画分に、未反応のスルファチドは吸着画分に回収された。この方法によるリゾスルファチドの収率は76%であった。この収率は逆相カラムを使用した場合に比べ20～30%高かった。

2. リゾ GalCer, リゾ LacCer, リゾ Gb₃Cer, リゾスルファチドのダンシル誘導体を順相カラム（UnisilQ60）によるHPLCでそれぞれ分離し、蛍光によって検出した。溶出溶媒としてn-ヘキサン-2-プロパノール-水の比率を（58：39：3）から（52：45：3）までの直線濃度勾配を設定することにより、約30分間でリゾスルファチドからリゾ Gb₃Cer までのリゾ糖脂質を分離、検出することができた。本法によるリゾ糖脂質の定量性をダンシル化リゾ GalCer について調べたところ、1～200pmol まで蛍光強度が直線関係を示し、この範囲での定量性が確認された。

3. 上記の方法によって正常および疾病脳のリゾ糖脂質を定量した。その結果、MLD 以外の全ての脳組織で検出されたリゾ糖脂質はリゾ GalCer の retention time を示し、陽イオン FAB/

MSによっても同定された。

2例の正常脳のリゾ GalCer は8.7, 7.4pmol/mg蛋白であるのに対し, 4例の胎児脳のうち2例は検出限界以下であり, 他の2例は2.2と2.5pmol/mg蛋白と低いレベルであった。

他方脳腫瘍では, 星膠芽腫19.6pmol/mg蛋白, 髄芽腫14.5pmol/mg蛋白および星細胞腫10.5蛋白では対照脳に比べて高値を示したが, 神経鞘腫2.4pmol/mg蛋白, 髄膜腫3.9pmol/mg蛋白と6.7pmol/mg蛋白で低い傾向を示した。

MLD ではリゾ GalCer は検出されず, リゾスルファチドが検出された (2.2pmol/mg蛋白)。

IV 考 察

リゾ糖脂質は細胞膜の成分である糖脂質の分解産物であり, 組織に極く微量にしか存在しないため, 収率が高く, より簡便な測定法が望まれていた。従来のリゾ糖脂質の分離, 精製には, シリカゲルの順相吸着クロマト法および調整用シリカゲル TLC プレートからのかき取り法などが報告されていた。しかし, 前者はリゾ糖脂質のアミノ基が硅酸と相互作用を起こす結果, クロマト上でテーリングをきたし, 良好な分離とはいえず, また後者は, シリカゲル標品に由来する夾雑物が混入するため, その精製にゲル濾過などのカラムを通すことが必要となり, いずれも効率のよい回収が困難であった。

本研究において, リゾ糖脂質と糖脂質の疎水性の差に着目して逆相カラムおよび陰イオン交換クロマトを用いてリゾ糖脂質の分離, 精製を行った。それによって上記の短所は大幅に改善され, リゾ糖脂質の簡便でしかも, 在来法に比べて高収率で得ることが可能となった。

生体組織に存在するリゾ糖脂質は, 先天性糖脂質蓄積症病脳におけるマイナーな蓄積物質として同定され, その細胞毒性の故に注目されてきた。脳腫瘍に関しては, 脳腫瘍関連糖脂質の分析により, 脳腫瘍の悪性度を分類しようとする試みがみられる。しかしながら, 癌においてリゾ糖脂質にふれた研究が皆無であるのは, 量的に僅かな成分であるため, 分離, 同定が困難であったことによると思われる。

本研究において, 正常脳と比較して脳腫瘍組織に微量成分としてのリゾ GalCer が増加傾向を示すことが認められた。現在のところ, 生体内におけるリゾ GalCer 形成についてスフィンゴシンのガラクトシル化の系は報告されているが, ガラクトシルセラミドの脱アシル化の系は存在しないとされている。今後, リゾ GalCer の代謝経路についてはさらに検討を重ねる必要があると考えられる。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 小 口 春 久
副 査 教 授 久保木 芳 徳
副 査 教 授 松 本 章
副 査 教 授 牧 田 章（医学部）

審査は主査および副査の口頭試問により、研究目的ならびに、内容について詳細に実施された。リゾ糖脂質は、糖脂質から脂肪酸が解離したものであり、微量で細胞毒性をもち、溶血や組織の壊死を引き起こす。それゆえ、リゾ糖脂質を蓄積する先天性糖脂質蓄積症では、リゾ糖脂質がこれら病態と直接関連することが示唆されている。しかしながら、組織中のリゾ糖脂質の含量は極めて少ないうえ、単離が困難なため、脂肪酸を結合した糖脂質に比べ研究が遅れていた。本研究は、この観点に立ち、リゾ糖脂質と糖脂質の疎水性の違いに着目して逆相クロマトグラフィーおよび陰イオン交換クロマトグラフィーを用い、リゾ糖脂質の新しい分離、定量法を確立し、それによって脳組織におけるリゾ糖脂質の定量を行った。

実験結果は次のようであった。

1. 逆相カラムを装着した高速液体クロマトグラフィー法により、個々のリゾ糖脂質を高収率で得ることができた。
2. リゾスルファチドは逆相クロマトグラフィーの代わりに DEAE セファデックスクロマトグラフィーで効率よく分離された。
3. ダンシル化リゾ糖脂質は 1 ～200pmol の範囲で dose-dependency を示し、高感度に定量ができた。
4. 正常ヒト脳、胎児脳、脳腫瘍組織についてリゾ糖脂質を検索した結果、リゾ GalCer が検出された。

2 例の正常脳のリゾ GalCer は 8.7, 7.4pmol/mg 蛋白であるのに対し、4 例の胎児脳のうち 2 例は検出限界以下であり、他の 2 例は 2.2 と 2.5pmol/mg 蛋白と低いレベルであった。

他方、脳腫瘍では、星膠芽腫 19.6pmol/mg 蛋白、髄芽腫 14.5pmol/mg 蛋白および星細胞腫 10.5pmol/mg 蛋白では対照脳に比べて高値を示したが、神経鞘腫 2.4pmol/mg 蛋白、髄膜腫 3.9pmol/mg 蛋白と 6.7pmol/mg 蛋白で低い傾向を示した。

異染性脳白質変性症ではリゾ GalCer は検出されずリゾスルファチドが検出された (2.2pmol/

mg蛋白)。

生体組織に存在するリゾ糖脂質は、先天性糖脂質蓄積症病脳におけるマイナーな蓄積物質として同定され、その細胞毒性の故に注目されてきた。脳腫瘍に関しては、脳腫瘍関連糖脂質の分析により、脳腫瘍の悪性度を分類しようとする試みがみられる。しかしながら、癌においてリゾ糖脂質にふれた研究が皆無であるのは、量的に僅かな成分であるため、分離、同定が困難であったことによると思われる。

本研究において、正常脳と比較して脳腫瘍組織に微量成分としてのリゾ GalCer が増加傾向を示すことが認められた。現在のところ、生体内におけるリゾ GalCer 形成についてスフィンゴシンのガラクトシル化の系は報告されているが、ガラクトシルセラミドの脱アシル化の系は存在しないとされている。今後、リゾ GalCer の代謝経路についてはさらに検討を重ねる必要があると考えられる。

以上のような学位申請者からの説明にもとづいて、主査および副査から詳細な質問がなされたが、明解な解答が得られた。また、審査員から指摘された数多くの示唆に対しても申請者は十分に理解した上で、端的に賛同し、将来における本研究の展望についても明確な説明を行なった。

本研究は、歯科医学において未開発のリゾ糖脂質の研究に道をひらき、歯科医学における基礎的研究としてその発展に十分貢献するものであり、審査の結果、審査担当者全員によって、本研究の論文は博士（歯学）の学位授与に値するものと認められた。