

ホモシステイン及び関連化合物の 臨床分析化学的研究

長崎大学大学院 医歯薬学総合研究科 生命薬科学専攻 中村 沙織

[目的]

ホモシステイン (HCY) はメチオニン (MET) の中間代謝物として生成されるチオール基を持つアミノ酸である。HCY には、血管内皮細胞障害、血管平滑筋細胞増殖、血小板活性化及び血栓形成などの作用があり、血漿中 HCY 値の増加は冠血管疾患の独立危険因子といわれている¹⁾。生体内における HCY の代謝にはシスタチオニンを経てシステイン (CYS) に変換される硫黄転移経路 (1) や MET に再メチル化されるメチル基転移経路 (2) 等がある (Fig. 1)。このうち、メチル基転移回路は葉酸 (FA) の代謝経路 (3) と密接に関係しており、5,10-メチレンテトラヒドロ葉酸還元酵素 (MTHFR) やメチオニン合成酵素 (MetS) 等の遺伝子変異により HCY の代謝障害が起こることが知られている。これらの酵素活性や HCY の代謝状況と疾患との関連性をより詳細に調べるためには、HCY だけではなく HCY の代謝に関連する化合物の定量も同時に行うことが重要かつ有用であると考えられる。

本研究では、冠血管疾患のリスク解明の手掛かりとするため、硫黄転移経路に関わるチオール化合物 (第 1 章) 並びに FA 代謝経路に関わる FA 関連化合物 (第 2 章) の定量法を構築し、ヒト血液中の濃度測定とその評価に適用することを目的とした。

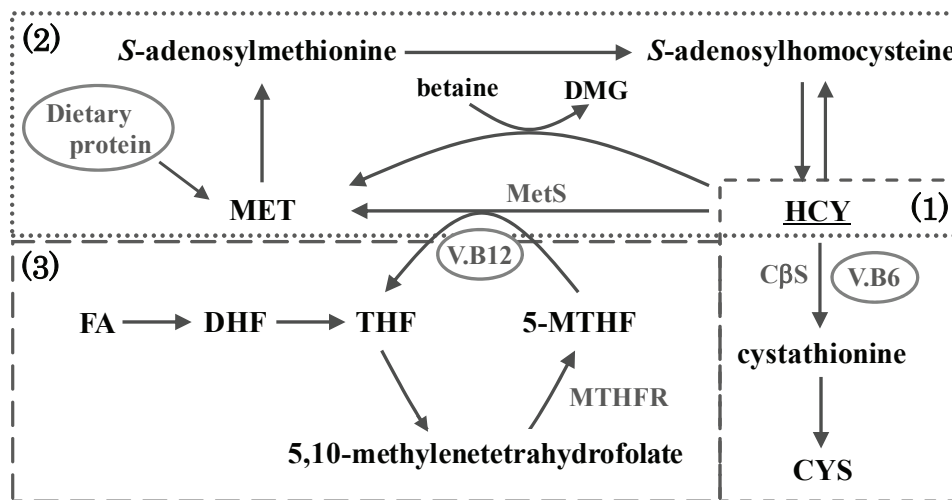


Fig. 1 Metabolic pathway of HCY and folates.

[結果及び考察]

1. ホモシステイン関連化合物の HPLC-蛍光定量²⁾

近年 HCY の代謝物であり化学構造が類似している CYS も HCY と同様に自己酸化の過程で活性酸素種を生成するため、冠血管疾患の危険因子となりえると考えられている。そこで、HCY 及び CYS、更に同じ生体チオール化合物であるシステアミン (CA) の同時定量を目的としたセミマイクロカラム HPLC-FL 法を検討し、詳細なバリデーションを試みた。その結果、本法は各化合物を 12 分以内に分離できた。また、バリデーションから高感度、高選択的かつ精度良く血漿中のこれら化合物を定量することが可能であり、多検体のルーチン分析に耐えうる頑健性を有することが示された。更に、本法を用いて健常人血漿中のチオール化合物を定量し、化合物間での濃度の相関について評価を行った (n=550, Fig. 2)。健常人血漿中の CYS は HCY と正の相関が見られ、HCY 高値群において CYS 値は有意に高値を示し、従来の報告と同様の結果が得られた。一方、CA と HCY の相関に関してはこれまで報告がなく、今回も両者の濃度に有意な差は見られなかったが、CA も CYS をはじめとしたチオール化合物の酸化還元状態に影響していると考えられることから、今後さらなる検討によりチオール化合物と疾病との関連性を明らかにすることができるものと期待される。

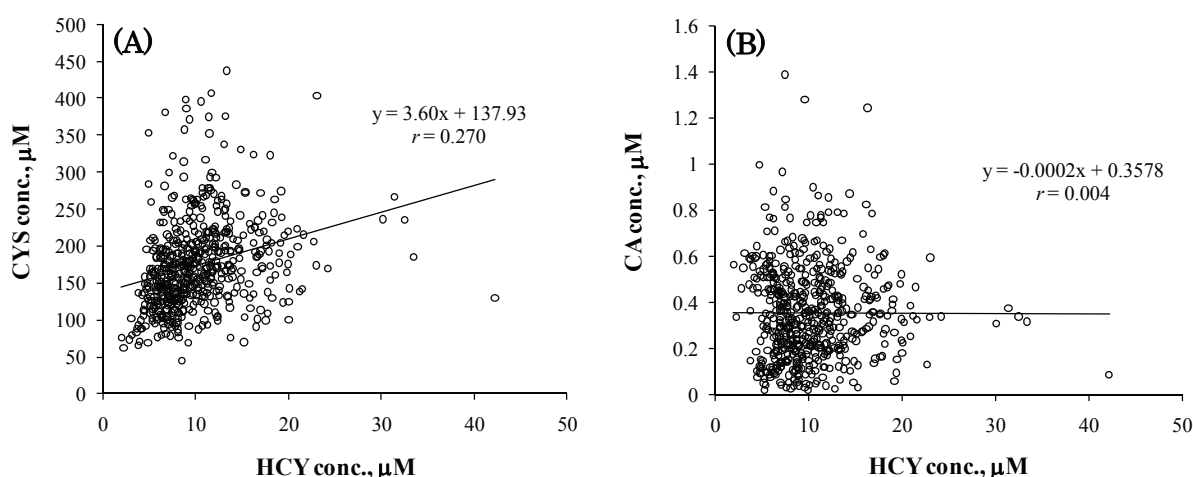


Fig. 2 Correlations of (A) CYS or (B) CA concentrations with HCY concentration in normal human plasma samples.

2. 葉酸類の LC-MS 定量の基礎的検討

FA 代謝経路中の FA、ジヒドロ葉酸 (DHF)、テトラヒドロ葉酸 (THF) 及び 5-メチルテトラヒドロ葉酸 (5-MTHF) の簡便かつ高感度な定量を目的に、LC-MS 法による分析法の開発を試みた。内標準物質としてメソトレキサート (MTX) を用い分離条件、MS 測定条件及びヒト血漿試料の前処理条件を検討したところ、12 分以内で高選択的かつ精度良く分離することができた (Fig. 3)。これら化合物の中でヒト血漿試料中の THF、5-MTHF 及び FA の 3 種が定量可能であり、検出下限はそれぞれ 6.31 nM (THF)、1.08 nM (5-MTHF) 及び 3.26 nM (FA) であった。また、健常人の血漿試料中の 5-MTHF 値は 24.8 ± 9.3 nM (n=8) であったが、THF 及び FA は定量下限以下の濃度であった。本法は従来よりも少ない試料量で血漿中の 5-MTHF を定量することができ、前処理法などを更に検討することで 5-MTHF 以外の化合物あるいは赤血球等の他の生体試料への応用も可能になるものとする。

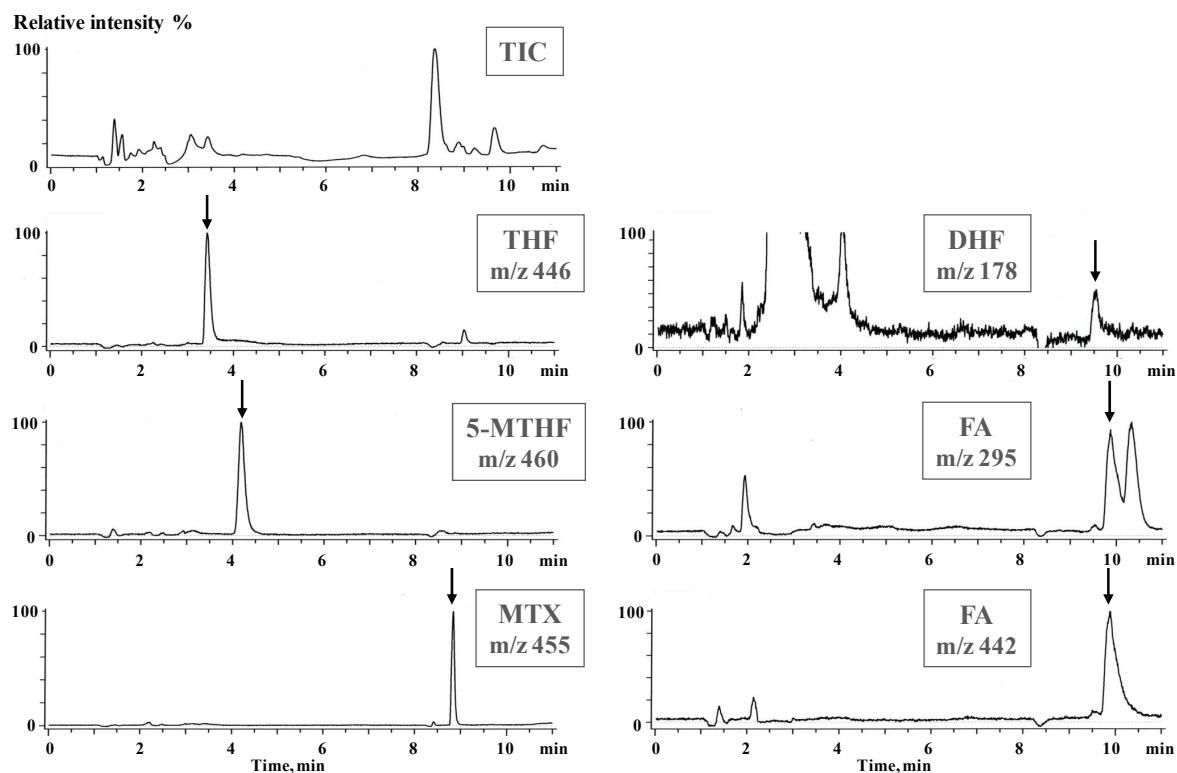


Fig. 3 TIC and SIM chromatograms of normal human plasma samples. Spiked concentrations: 400 nM (THF, 5-MTHF and FA), 4000 nM (DHF) and 100 nM (MTX).

[結論]

本研究では、HCY の代謝に関わるチオール化合物並びに FA 関連化合物の定量法を構築し、ヒト血漿試料の分析に適用した。その結果、3 種のチオール化合物を高感度かつ選択的に測定することができ、HCY と CYS あるいは CA との相関性を明らかにすることができた。更に、開発した LC-MS 法により健常人血漿中の 5-MTHF の定量に適用することができた。本法は従来よりも少ない試料量で測定が可能なることから、被験者の負担を最小限に抑えることができる。今後、本研究成果を応用して HCY を含むチオール化合物及び FA 代謝経路中の各化合物を詳細に定量し、HCY の代謝状況や MTHFR 等の酵素活性に関する情報を得ることで、冠血管疾患との関連性を理解するための重要な情報を提供することができるものと期待する。

[文献]

- 1) Boushey C. J., Beresford S. A., Omenn G. S., Motulsky A. G., *JAMA*, **274**, 1049-1057 (1995).
- 2) Ichinose S., Nakamura M., Maeda M., Ikeda R., Wada M., Nakazato M., Ohba Y., Takamura N., Maeda T., Aoyagi K., Nakashima K., *Biomed. Chromatogr.*, **23**, 935-939 (2009).