

血管病リスク診断のための新規診断薬の開発

育成研究：ＪＳＴイノベーションプラザ広島 平成１７年度採択課題
「血管病を原因とする生活習慣病新規診断薬の開発」

代表研究者：山口大学大学院 医学系研究科 応用医工学系専攻
器官制御医科学講座 生体機能分子制御学
教授 小林 誠



■ 研究概要

血管の異常収縮の原因物質と考えられるスフィンゴシルフォスホリルコリン（SPC）を発見し、この物質の体内濃度が血管病発症前から高くなることを見出した。即ち、SPC 量の測定によって突然死に繋がる血管病の発生が予測できる可能性がある。本研究では、血管病のリスク診断のために、SPC 測定の臨床的意義を確立すると共に、既存の検査機器に搭載可能な SPC 測定薬を開発することを目指した（図 1）。

■ 研究内容、研究成果

SPC 濃度測定の臨床的意義の確立のためには、血清 SPC 濃度測定法の確立が必須であった。そこで、タンデム型質量分析計による測定法を確立し、固相抽出法により精製・濃縮した血清中の微量 SPC を高感度に測定することに成功した。次に、確立した測定法に基づき、多検体からの SPC 濃度測定を行い、健康診断データとの相関関係を解析した。132 検体の SPC 濃度を測定した結果、重篤な血管病を発症していない状態での SPC 濃度の平均値は 8.02 nM であり、濃度範囲は 2.76～13.25 nM と比較的狭い範囲に分布していることが判明した（図 2）。また、健康診断データを用いた統計学的な解析により、性別、BMI、収縮期血圧、LDL コレステロール、血糖値では相関（もしくは有意差）が認められず、年齢、GPT、総コレステロール、白血球数とは相関係数はかなり低いながらも統計学的に有意差が認められるということを示した。

抗 SPC 抗体を取得するため、5 種類の免疫原、即ち、SPC-BSA、SPC-KLH、ビオチン化 SPC-ストレプトアビジンコンジュゲート、SPC 吸着人工粒子、SPC 含有リボソームをマウスに免疫し、低分子脂質の検出に最適化した ELISA 法による抗体スクリーニングを行った。その結果、SPC-KLH、SPC 吸着人工粒子、SPC 含有リボソームを免疫原としたマウスから、SPC 固相抗原に反応するハイブリドーマクローンが樹立された。さらに、得られた抗 SPC 抗体候補の反応性と交差性を検証した結果、SPC に対する感度は 2～20 μg/mL (= 4.3～43 μM に相当) 程度で、フォスホリルコリンやスフィンゴシンに対する交差性が確認された。加えて、表面プラズモン共鳴（SPR）測定装置による検証では、感度は 10 μM 程度で、スフィンゴシン 1 リン酸やスフィンゴミエリンに対する非特異的結合が確認された。今回樹立した抗体は、単独で SPC を特異的に認識できなかったため、2 種類の抗体を用いたサンドイッチ ELISA 法を試みたが、SPC の特異的な検出には至らなかった。また、抗体作製と並行して、抗体の最終的な機能評価方法として、捕捉した SPC が生理活性を有するかどうかを評価するアッセイ法を検討し、多面的に検証できるバイオアッセイシステムを確立した（図 3）。

■ 今後の展開、将来の展望

本育成研究プロジェクトを事業化に展開するためには、さらなる臨床的意義の確立（血管病リスク閾値の解明）、および SPC 濃度測定試薬の開発とキット化が必要不可欠である。そのためには、今回確立した“血清 SPC 濃度測定法”による血管病疾患検体の大規模解析、および“抗 SPC 抗体作製法”、“抗体機能評価法”、“バイオアッセイ法”を駆使した、より感度・特異性の高い抗 SPC 抗体取得に向けた取り組みが期待される（図 4）。

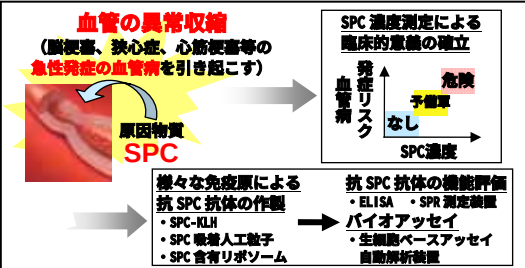


図 1 血管病の新規診断薬の開発を目指した本育成研究の研究概要

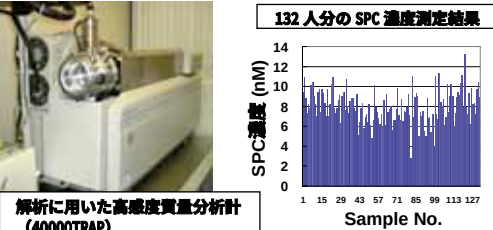


図 2 高感度質量分析計により測定した 132 人分の血清 SPC 濃度

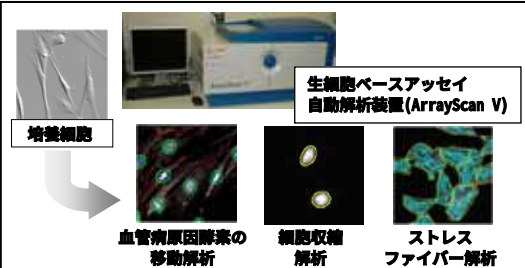


図 3 生細胞ベースアッセイ自動解析装置によるバイオアッセイ法の確立

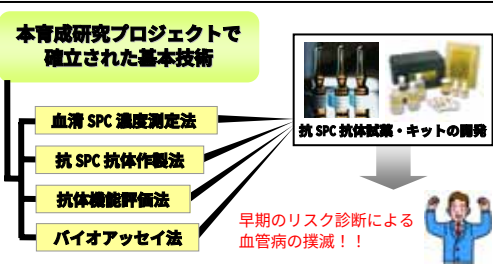


図 4 本育成研究プロジェクトで確立された技術による今後の展開、将来の展望

■ 研究体制

- ◆ 代表研究者
山口大学大学院 医学系研究科 応用医工学系専攻 器官制御医科学講座 生体機能分子制御学
教授 小林 誠
- ◆ 研究者
高田 雄一（科学技術振興機構）、徳森 大輔（科学技術振興機構）、岸 博子（山口大学）、
川道 穂津美（山口大学）、加治屋 勝子（山口大学）、内田 好昭（富士レビオ株式会社）、
宮川 英二（富士レビオ株式会社）、小見 和也（富士レビオ株式会社）
- ◆ 共同研究機関
富士レビオ株式会社

■ 研究期間

平成 18 年 4 月 ～ 平成 21 年 3 月