

演題名 酵素的測定法による血液中ホスファチジルエタノールアミン測定系の確立

氏名 ○為實 秀人<sup>1)</sup>、外園栄作<sup>2)</sup>、大澤 進<sup>2)</sup>

所属 1) 九州大学大学院医学系学府 保健学専攻 検査技術科学分野

2) 九州大学大学院医学研究院保健学部門検査技術科学分野

### 【目的】

ホスファチジルエタノールアミン(PE)は、リン脂質の一種であり、その生理的機能として細胞膜の構築成分としての機能があり、それ以外にグルコース-6-ホスファターゼなどの膜結合性酵素を活性化させることが挙げられる。また、血液凝固因子の活性・不活性化に関与していることも報告されている。

現在、PEを分離・定量する方法としては薄層クロマトグラフィーやHPLCによる方法があるが、これらの方法は測定試料の有機溶媒による前処理や測定操作が煩雑であるため、非常に多くの時間を要し、多数の試料の測定には不向きである。酵素的測定法によるPEの測定法が確立できれば、多数の臨床材料を測定することが可能である。

そこで今回我々は、*Arthrobacter sp.*由来銅含有アミンオキシダーゼ(AAO; EC 1.4.3.6)がエタノールアミン(EA)に作用し過酸化水素(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)を生成することを利用して、ホスホリパーゼD(PLD; EC 3.1.4.4)と共役させたPEの酵素的測定法を確立したので報告する。

### 【測定原理】

グリセロリン酸と塩基を加水分解する酵素であるPLDの作用によりPEからEAを遊離させる。AAOは遊離したEAに作用し、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>を生成する。これをペルオキシダーゼ(POD)とトリンダー発色試薬に導いて、生成するキノニン色素の吸光度を測定することにより、PEを定量する。内因性EAについては試料と第一試薬混合時に消去する。

### 【検討方法】

1) 測定試薬：第一試薬(R-1) 100mmol/l HEPES 緩衝液 (pH7.5), 41.25kU/l AAO,

5.00kU/l POD, 17.25kU/l アスコルビン酸オキシダーゼ, 2.97mmol/l TOS, 0.25%(w/v) TritonX-100, 1.15mmol/l N-エチルマレイミド, 7.69mmol/l NaN<sub>3</sub>. 第二試薬(R-2) 100mmol/l HEPES 緩衝液 (pH7.5), 66.00kU/l PLD, 2.64mmol/l 4-アミノアンチピリン, 6.60mmol/l 塩化カルシウム, 0.25%(w/v) TritonX-100, 7.69mmol/l NaN<sub>3</sub>.

2) 標準液：L-α-ホスファチジルエタノールアミン,ジパルミトイル(MW:691.97)(和光純薬)を5%(w/v) TritonX-100水溶液に溶解させたものを用いた。

3) 測定機器：日立7170形自動分析装置

4) 測定条件：血清あるいは血漿；30μl、R-1；200μl、R-2；100μl、主波長；546nm、副波長；700nm、終点分析法（測光ポイント16-34）にて標準液（58および289μmol/l）で2点検量し、試料を測定した。

### 【検討結果】

自動分析装置での定量特性評価：精密さの指標である同時再現性(n=20)および日差再現性(20日)を求めた結果、ともに変動係数が1%以下と良好であった。直線性は少なくとも58-400μmol/lの範囲で得られ、添加回収試験では、100±2%の良好な回収率が得られた。本法(y)とHPLC法(x)との相関性(n=21)は、相関係数0.97、y=0.93x+9.5であり良好な結果が得られた。

### 【結語】

本法により、自動分析装置を用いて血液中PE濃度を特異的に、かつ簡便・迅速に測定することが可能となった。現在、本法を用いて多くの症例で測定を行い、血液中PE濃度測定の臨床的有用性の評価を行っている。