





学位論文審査結果報告書

報告番号	北里大 乙 第1437号	氏 名	野 中 聖 子
論文審査担当者	(主査) 北里大学教授	伊藤 智夫	
	(副査) 北里大学教授	本間 浩	
	(副査) 北里大学教授	松原 肇	
	(副査) 北里大学准教授	福本 真理子	
〔論文題目〕			
「HPLC-蛍光検出法を用いたメチルアルギニン類高感度定量法の開発および統合失調症患者血漿への応用」			
〔論文審査結果の要旨〕			
<p>生体内に存在するメチルアルギニン類として、N^G-Monomethyl-L-arginine (L-NMMA)、N^G, N^G-Dimethyl-L-arginine (ADMA)およびN^G, N^G-Dimethyl-L-arginine (SDMA) の3種類の存在が知られている。これらのメチルアルギニン類は、蛋白質のL-Arginine 残基が protein arginine N-methyltransferase (PRMT) によりメチル化され、その後加水分解されることにより遊離型として生成し、生体内循環系に放出される。L-NMMA およびADMA は、全ての一酸化窒素合成酵素 (NOS) アイソフォームを阻害し、特にADMA はL-NMMA と比べ存在量が多く、その濃度変動がNOS 活性に大きな影響を与えることが明らかにされている。また、SDMA はNOS 阻害作用を有していないが、NOS の基質であるL-Arginine の細胞内取り込み機構を阻害するため、間接的に一酸化窒素 (NO) 産生を阻害する可能性が示唆されている。</p> <p>血漿中メチルアルギニン類の濃度は、心臓、肝臓および腎臓などの循環器疾患や糖尿病などで上昇することが報告されており、疾患のバイオマーカーとしての利用が期待されている。これまで多くの定量法が報告されているが、煩雑な前処理過程や1サンプルあたりの測定時間が長いこと、また検出感度が低く3種のメチルアルギニン類を同時測定できない等の問題があった。そこで野中氏は、蛍光誘導体化試薬として4-fluoro-7-nitro-2,1,3-benzoxadiazole (NBD-F) を用い、3種のメチルアルギニン類を同時に測定可能な高感度HPLC 蛍光検出法の開発を行ってきた。</p> <p>本研究では、遠心チューブ Monospin SCX (GL Sciences Inc.) を用いた簡便な前処理操作の導入および高い理論段数が期待されるモノリスカラム MonoClad C18-HS (150mm×3mm I.D., GL Sciences Inc.) を新規に採用し、これまでに野中氏が確立した定量法における前処理の簡略化および測定時間の短縮を実現した。また、内標準物質として生体外物質である N^0-Propyl-L-arginine (N-PLA) を用いることで、より精度の高い分析法を確立した。</p>			

近年、統合失調症において、重要な神経伝達物質であるグルタミン酸およびD-セリンの関与が報告されており、これらが作用するNMDA型グルタミン酸受容体の機能低下が統合失調症の発症にかかわっていることが示唆されている。神経系においてはNMDA-NO-cGMP経路がグルタミン酸やドパミンなどの神経伝達物質の放出を制御しており、メチルアルギニン類はNOS阻害作用を有していることから、統合失調症の病態発現に関連しているのではないかと考えられる。そこで野中氏は、新たに開発した分析法を用いて、薬物治療を受けている統合失調症患者血漿を試料として、ADMA、L-NMMA、SDMAおよびNO供与体であるL-Arginine濃度を測定し、これまでの報告よりも広範な解析を試みた。獨協医科大学より提供された、薬物治療中の統合失調症患者101名および健常者63名の血漿を用いて、今回確立されたHPLC分析法にて測定を行った。

統合失調症患者および健常者の血漿サンプルを測定した結果、統合失調症患者血漿中のL-NMMA、ADMAおよびSDMA濃度は、健常者と比べて有意な増加が認められた。年代別に比較したところ、60代以上の患者で同年代の対照群と比べてL-NMMAとADMA濃度の有意な増加が認められ、年代が上昇するにつれて血漿中メチルアルギニン類濃度の増加傾向がみられた。また、対照群の濃度範囲を超える濃度増加が認められた患者についてその背景を調べたところ、身体症状は深刻な状態ではなく良くコントロールされているものの、糖尿病や高血圧、高脂血症などの疾患に罹病している患者が数名いたことが明らかになった。従来の報告でも、薬物未治療の統合失調症患者または最後の投薬から3ヵ月以上経過している統合失調症患者においてADMA濃度の上昇が認められており、患者のメチルアルギニン類濃度の増加傾向は、統合失調症とともに、糖尿病や高血圧、高脂血症などの疾患の罹病歴が関係している可能性が考えられた。一方、薬物治療によって統合失調症患者のADMA濃度が減少傾向になるとの報告もあり、本研究で60代以上の患者以外では患者血漿中メチルアルギニン類濃度に有意差がみられなかったことから、薬剤投与により血漿中メチルアルギニン類濃度が減少する可能性が考えられた。一方、統合失調症患者の血漿中L-Arginine濃度はいずれの年代においても対照群と比べて高い傾向が認められ、NOのバイオアベイラビリティを示唆するL-Arginine濃度とADMA+L-NMMA濃度の比であるL-Arginine/(ADMA+L-NMMA)も同様に、対照群と比べて統合失調症患者で高い傾向がみられた。

本研究内容の一部は、既に英文雑誌に掲載されており(Nonaka S. et al., J. Sep. Sci. 2014)、今回新たに確立したメチルアルギニン類の高感度定量法は、統合失調症以外の疾患へも適用可能である。以上の成果は、疾患バイオマーカーとして期待されているメチルアルギニン類の定量法として、今後臨床の場で広く利用されることが期待され、博士(臨床薬学)の学位授与に値すると判断し、学位審査を合格と判定した。

以上