

氏名	しみず ひろゆき 清水 洋行
学位の種類	博士 (生命科学)
学位記番号	乙第9号
学位授与年月日	平成15年11月 4日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学位論文題目	Characterization of molecular forms of probrain natriuretic peptide in human plasma (ヒト血漿中におけるプロ脳性ナトリウム利尿ペプチドの分子形態の解析)
学位論文審査委員	(主査) 山田 一夫 (副査) 佐藤 建三 西連寺 剛

学位論文の内容の要旨

血中脳性ナトリウム利尿ペプチド (BNP) の測定は、心不全の診断や予後予測に有用である。しかしBNP、特にプロBNPの血中分子形態についてはほとんど明らかにされていない。著者らは以前、心不全患者の血漿中の低分子量BNP画分に成熟型BNP (BNP 1-32) はほとんど含まれておらず、BNP 1-32は分泌後速やかに血流から消失することを明らかにした。血中のプロBNPの存在様式を明らかにすることは、分泌後のプロBNPの代謝分解機序やプロBNPの存在意義を解明するのに重要であると考えられる。本研究ではプロBNPが分泌後血中に存在するプロテアーゼにより分解されているかどうかを解析するために、プロBNPのアミノ酸配列の一部からなるペプチド断片に特異的な抗体を調製し、それらの抗体を用いて構築したプロBNPの免疫測定系を用いて心不全患者血中に存在するプロBNPの存在様式を解析した。

方法

日本白ウサギに4種類のプロBNPアミノ酸配列に含まれる合成ペプチド[**pf-1(1-13)**、**pf-2(22-27)**、**pf-3(28-40)**、**pf-4(47-54)**]を免疫し、抗プロBNP抗血清 (**anti-pf-1**~**anti-pf-4**) を調製した。

プロBNPの免疫測定はまず、BNPのカルボキシ末端部分を認識するモノクローナル抗体を固相したポリスチレンビーズとサンプルを混合し、4℃で20時間反応させた。洗浄後、希釈した抗プロBNP血清を加え、4℃で20時間反応させた。洗浄後、¹²⁵Iで標識した抗ウサギイムノグロブリン抗体を加え4℃で20時間反応させた。さらに洗浄後、¹²⁵I放射活性をガンマカウンターで測定した。プロBNPのポジティブコントロールとして大腸菌の遺伝子組換えにて作製したプロBNPを用いた。

4名の心不全患者より得られた血漿サンプルをSepPakC18カートリッジを通して固相抽出し、ゲルろ過HPLCにて分画した。各画分中のプロBNP濃度を上記の方法で測定した。同画分中のBNP濃度は放射性免疫測定キット (シオノリアBNP) で測定した。

結 果

ウサギを免疫して得られた 4 種類の抗血清のうち 2 種類 (anti-pf-1 および anti-pf-3) は、遺伝子組替えプロBNPと反応したが、他の 2 種類 (anti-pf-2 および anti-pf-4) とは反応しなかった。心不全患者血漿中のBNP代謝物の存在様式を解析するために、血漿をゲルろ過 HPLC で分画して各画分中のBNP濃度を測定すると、BNPの免疫活性を有する 2 つのピーク (高分子量BNP、低分子量BNP) が観察された。同画分をプロBNPの免疫測定法で測定したところ高分子量BNPのみにプロBNPが検出された。遺伝子組換え体と同様、血漿中のBNPは anti-pf-1 および anti-pf-3 とは反応したが、anti-pf-2 および anti-pf-4 とは反応しなかった。またプロBNPは通常三量体で存在するといわれているが、心不全 4 患者のうち 1 患者の血漿中からは単量体と考えられるプロBNPが検出された。

考 察

BNPは心室にて合成された後、プロBNPの一部が成熟型 (BNP 1-32) に変換され、プロBNPとBNP 1-32の両方が血中に分泌される。しかしながら、分泌後のBNPの代謝分解過程については不明な点が多かった。今回、心不全患者より採取した血漿中のプロBNPの存在様式を解析した結果、プロBNPは全長に近い形で安定に存在することが初めて示された。BNP 1-32は分泌後早期に血流から消失するとの著者の以前の報告と今回の結果より、血中でより安定性の高いプロBNPの測定することの方が、臨床有用性はより高いことが示唆された。

結 論

心不全患者血中のプロBNPの構造が明らかになった。プロBNPは血中で安定であるため心不全診断的有用性が高い可能性が示唆された。また、今回の結果は今後の血中BNPの存在意義についての解明の一助になると考えられる。

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

本研究は心不全患者から採取した血中のプロ脳性ナトリウム利尿ペプチド (プロBNP) の構造を HPLC と放射性免疫測定法を組み合わせ解析したものである。その結果、心不全患者血中のプロBNPはほぼ全長に近い構造を有することが初めて示され、プロBNPはその成熟型 (BNP 1-32) よりも血中では安定であることが判明した。本研究はプロBNPの血中存在様式やその血中での安定性から臨床診断上において有用性を示唆するものであり、明らかに学術水準を高めたものと認める。