

論文の内容の要旨

論文題目 疾患マーカー・アクロレインの 新規蛍光検出法の開発

氏名 富樫 将高

【序論】

高齢社会を迎えている今日、国民が健康で穏やかな老後を迎えるためには、癌や成人病など難治性の疾患を早期に発見し、予防的に対処する事が求められている。このためには疾患のマーカーを高感度、かつ特異的に検出出来る方法が必要であり、国民医療の観点からこれらの検出法の開発は喫緊の課題である。現在用いられている検出法の多くは抗体反応を利用し検出を行うものである。しかしながら、抗体の作成に多大な手間・費用がかかる、測定費用が高価等の理由から疾患の早期発見のための検出法としては欠点も多い。そこで、筆者は安価・高感度・高選択的な疾患マーカー検出法の開発を行う研究に着手した。

対象として、近年注目を集める疾患マーカーの一つであるアクロレインを選択した。アクロレインは、動脈硬化・慢性的腎不全・脳卒中・癌等、多くの疾患との関連が報告されている脂質過酸化による生成物である。また、核酸やタンパク質等の生体成分と高い反応性を示し、それ故に強力な毒性を有している。このアクロレインの検出に関して、後述の *m*-aminophenol を用いた方法の報告はあるが、高感度かつ簡便な実用的測定法はない。本研究では高感度(検出限界 1 μ M 以下を目標とする)と同時に、HPLC での分離を必要としない簡便な測定法を開発することを目的に研究を行った。これは、アクロレイン検出による疾患の早期診断を目指すものであり、人々の健康に大きく貢献することが期待出来るものである。

【本論】

既存のアクロレインの測定法として *m*-aminophenol による蛍光法の報告がある。アクロレインとの反応によって生成した 7-hydroxyquinoline の蛍光を測定することで定量を行う方法である。しかし、血液中のアクロレイン量を測定する場合、短波長励起のためにタンパク質からの自家蛍光の影響を強く受け、測定時 HPLC での分離が不可欠である。また、反応を塩酸中 100 °C で行う必要があるために生体の状態を反映しているとは言い難く、これらの理由のため汎用されるには至っていないのが現状である。

筆者は蛍光法による検出手法として選択した。その理由は蛍光プローブによる検出は、本研究の目的である「高感度、安価」という点を達成するにあたり適切であると考えたからである。さて、血漿等の生体成分には非常に多くの夾雑物が存在する。HPLC での分離無しにその中からアクロレインを検出するためには、アクロレインによってのみ蛍光を発する戦略を構築する必要がある。筆者は不飽和カルボニル化合物の特徴的な反応性を利用することで高選択的な検出を実現出来ると考えた。その反応性とは、二段階に反応させることで二つの化合物のリンカーとなることが出来る、という性質である。手法としては、まずアクロレインにチオール基を持つ蛍光団をマイケル付加させ、カルボニル化合物に変化させる(Figure 1)。この 1 step 目では蛍光団と反応する他の夾雑物も存在する。次にこのカルボニル基と反応するヒドラジン基を有する microbeads を加える(2 step 目)。結果、アクロレインがリンカーとなり蛍光団と microbeads を結合させることが出来る。カルボニル基を持たない化合物は 2 step 目では反応しない。そして最後に microbeads を洗浄することで microbeads に結合していない夾雑物を洗い流すことが出来る(洗浄)。2 step 目で microbeads と反応した夾雑物は洗浄後も残るが、これらは蛍光を発しないため、HPLC で分離精製をしなくともアクロレイン高選択的な検出を実現出来ると予測した。このようなチオール基とヒドラジン基による二段階の認識は、夾雑物が多い中で不飽和カルボニル化合物を検出するのに非常に有効な手法であると考えた。

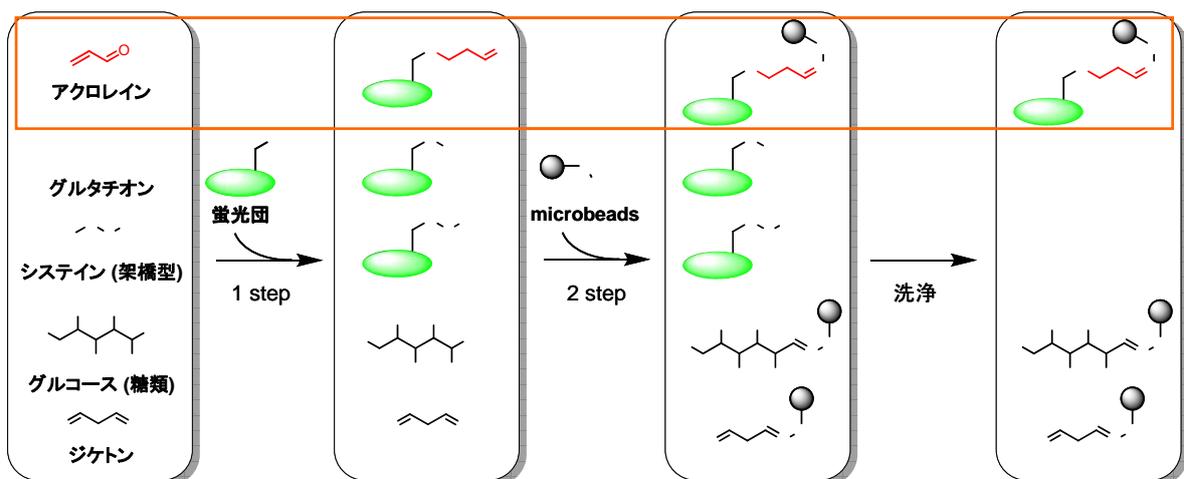


Figure 1. Our novel strategy for detection of acrolein.

まず、チオール基を有するプローブとして 7-hydroxy-4-mercaptomethylcoumarin (HMC)を合成した(Figure 2 (A))。アクロレインをリンカーとして HMC と microbeads とを結合させたところ、microbeads の表面でプローブが強蛍光を発することが確かめられた(Figure 2 (B))。また、調製したアクロレイン溶液に対してアッセイしたところ、アクロレイン濃度依存的に蛍光強度が増大した。しかしながら、微量のアクロレインに対しては、十分な S/N 比を得ることが出来なかった。主な原因として、microbeads 自体の蛍光が挙げられる。HMC の極大吸収波長(380nm)で microbeads を励起すると微弱ながら蛍光を発し、測定におけるノイズとなり感度を低下させることがわかった。

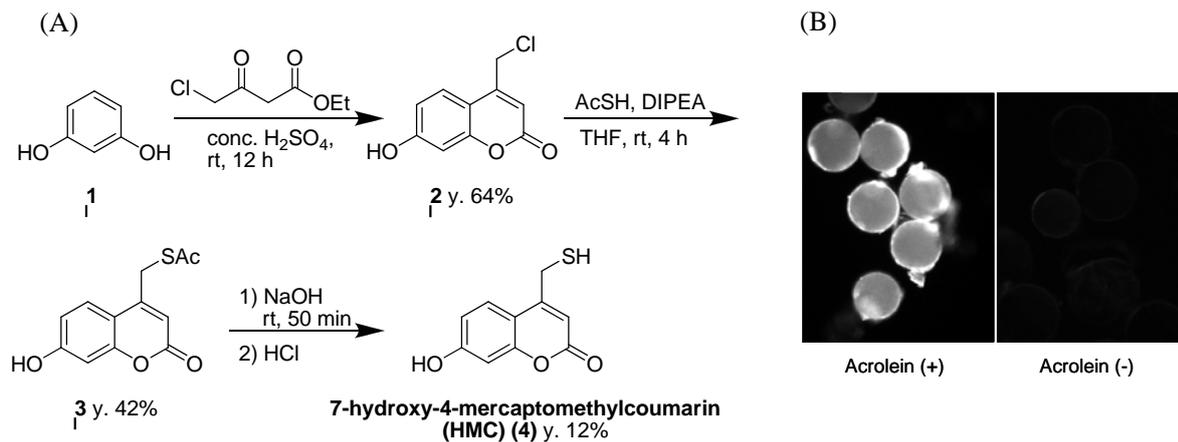


Figure 2. (A) Synthesis of 7-hydroxy-4-mercaptomethylcoumarin (HMC).

(B) Confocal fluorescence microscopic images of microbeads with or without acrolein.

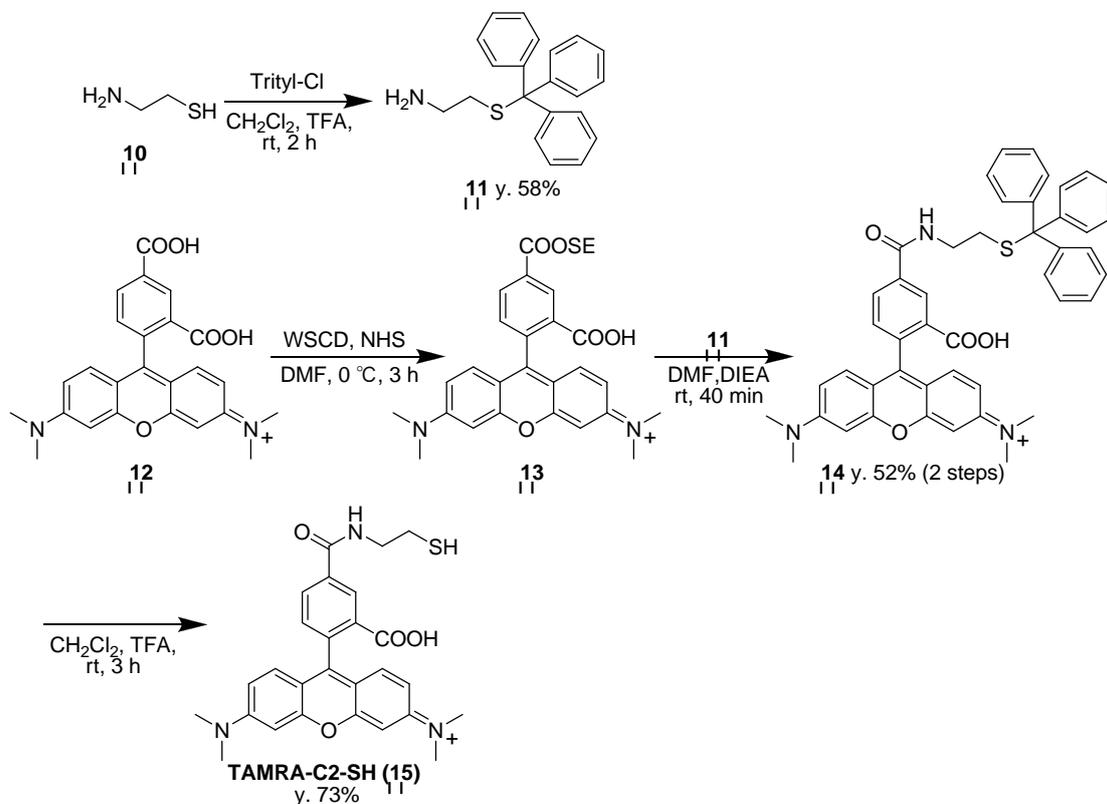


Figure 3. Synthesis of TAMRA-C2-SH.

microbeads のバックグラウンド蛍光を除去するためには、蛍光団の長波長化、および microbeads に対する蛍光団の非特異的な吸着の軽減が重要である。様々な蛍光団を検討した結果、tetramethylcarboxyrhodamine (TAMRA) が最適であることがわかった。そこで Figure 3 に従って TAMRA を蛍光団としたプローブである TAMRA-C2-SH を合成した。

水系溶媒中でカルボニル基に対して高い反応性を有する TentaGel-NHNH₂ microbeads を用いてアクロレインの検出を行った。反応条件を詳細に最適化した結果、最終的に血漿中において非常に高感度にアクロレインを測定出来る系の開発に成功した(Figure 4 (A))。検出限界を算出したところ 0.49 μM となり、目標としていた感度を達成することが出来た。submicromolar の検出限界を達成出来たのは、設計通り microbeads のバックグラウンド蛍光を抑えられたことに因る。また特異性についても検討し、アクロレインに対して高い選択性を有していることを明らかにした(Figure 5 (B))。これらの結果より、*m*-aminophenol を用いた既存の方法に比べ、血漿中でより高感度な測定を実現したと言える。さらに、開発した手法における反応は温和な条件で進行するため生体の状態を反映した測定が期待出来る。

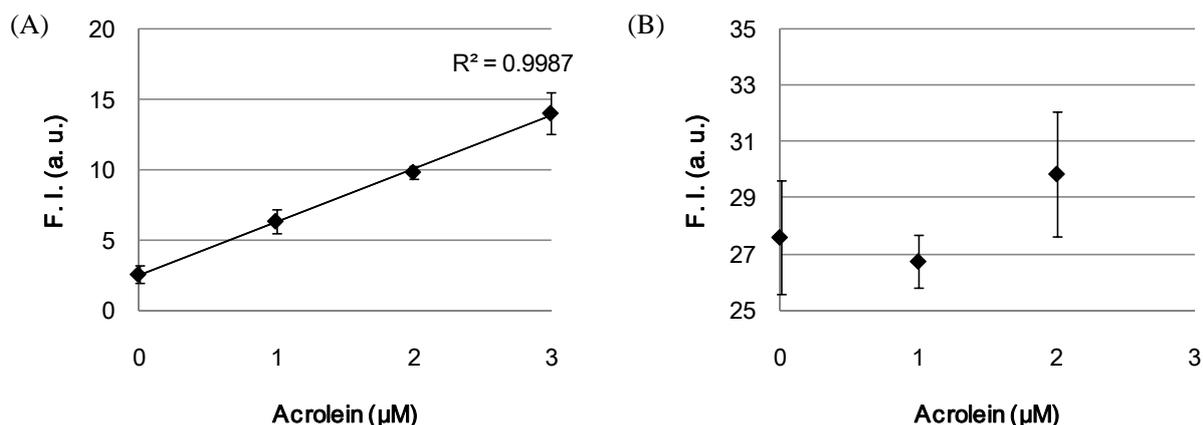


Figure 4. Fluorescence assay of acrolein with our method (A) and the conventional method (B).

Data are shown as mean \pm SD (n = 3).

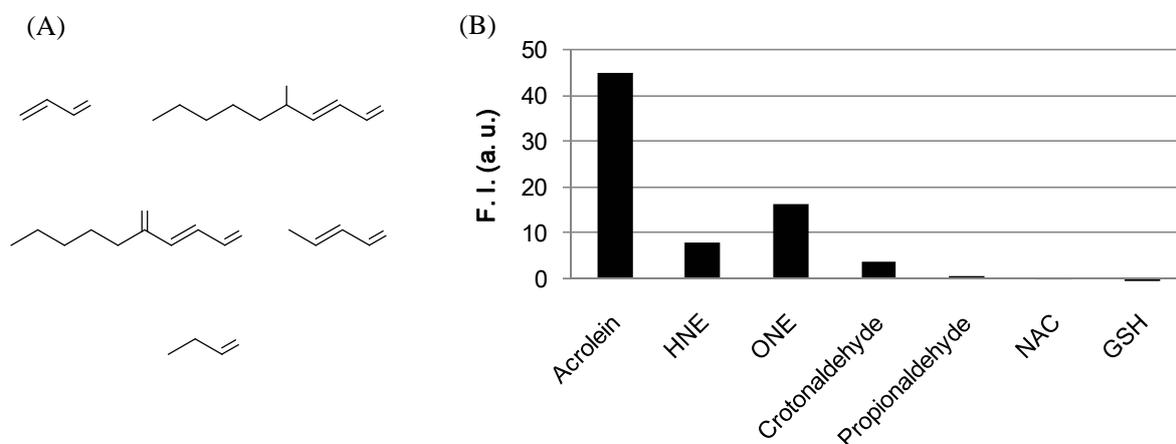


Figure 5. (A) Structures of various carbonyl compounds. (B) Selectivity of our method.

開発した手法を用いたアッセイ系として、cyclophosphamide (CPA)を投与したマウスの血漿中アクロレイン測定を行った。CPA はアルキル化剤に分類される抗悪性腫瘍剤(抗癌剤)、免疫抑制剤であり、臨床で多く使用されている。しかしながら CPA 投与による重大な副作用として、出血性膀胱炎が問題になっており、頻繁に臨床検査(血液検査、尿検査等)を行うなど、状態を十分に観察することが必要になる。その原因物質とされているのがアクロレインである。実際に CPA を静脈注射したマウスの血漿を採取し、開発した方法でアクロレイン測定を行ったところ、生理食塩水を投与したマウスと比較して有意にアクロレイン濃度が増大していることが確かめられた(Figure 6)。

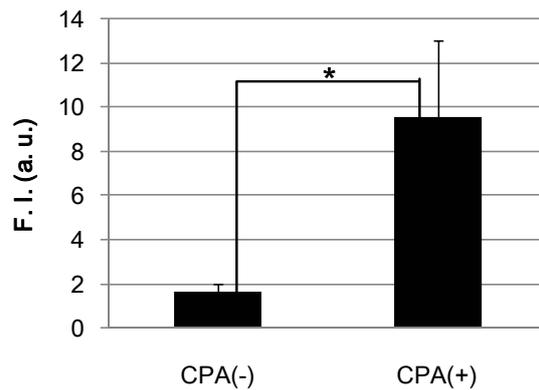


Figure 6. CPA mouse assays
(* indicates $P < 0.05$.)

【結論】

筆者は、TAMRA-C2-SH と microbeads を利用しアクロレインに対して高選択的な新規検出戦略を確立した。この手法によって、血漿中のアクロレイン濃度を簡便かつ高感度に分析することが可能となった。実際に、血液中のアクロレイン濃度を増大させることが知られている抗癌剤である CPA をマウスに投与し、開発した手法で血漿中アクロレイン濃度の増大を観察することに成功した。CPA によって頻繁に引き起こされる出血性膀胱炎はアクロレインが原因物質であることが報告されている。患者のアクロレイン濃度をモニターすることで予防的措置を行うことが可能になり、QOL の向上に貢献出来ると考えている。