

審査の結果の要旨

氏 名 富樫 将高

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おり、このためには疾患のマーカーを高感度、かつ特異的に検出できる方法が重要である。しかしながら、現在用いられている検出法の多くは抗体反応を利用するものであり、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が多い。富樫君は安価・高感度・高選択的な疾患マーカー検出法の開発を行うことを目的に、近年注目を集める疾患関連分子であるアクロレインを取り上げた。アクロレインは、動脈硬化・慢性的腎不全・脳卒中・癌など、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。アクロレインの検出に関して、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。

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。

富樫君は HPLC での分離に代わる簡便な手法として、アクロレインの特徴的な反応性を活用することで高選択的に固相(microbeads)に結合させる戦略を選択した。microbeads は洗浄が容易で、生体成分に含まれる夾雑物を除去することが可能である。そのため、タンパク質等に由来する自家蛍光を除くことが出来、高感度検出に繋がると考えた。具体的には、まずチオール基を有する蛍光団を生体試料(血漿、血清、尿等)に入れ、アクロレインを捕捉する。その後カルボニル炭素に対する反応性を有するヒドラジン基を持つ microbeads に結合させ、それ以外の夾雑成分を microbeads の洗浄により取り除く。生体内には、チオール基を有する蛍光団に結合する物質がアクロレイン以外にも多く存在する。同様に、カルボニル基を有する生体物質も存在する。しかしながら、その両方と反応した場合に限り microbeads の表面に蛍光団が結合する。つまり、アクロレインがリンカーとなり蛍光団と microbeads が結合し、HPLC による分離操作を行わずとも簡便・高選択的な検出が実現出来ると考えた。

まず、チオール基を有するプローブとして 7-Hydroxy-4-mercapthomethylcoumarin (HMC)を合成した。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。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。その主な原因として、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生し、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。

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 **TAMRA** を蛍光団としたプローブである **TAMRA-C2-SH** を合成し、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-NH₂ micobeads** 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。**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たことによる。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。これらの結果より、**m-aminophenol** を用いた既存の方法に比べ、より高感度な測定を実現した。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。

続いて、**Cyclophosphamide (CPA)** を投与したマウスの血漿中アクロレイン濃度測定を行った。**CPA** はアルキル化剤に分類される抗悪性腫瘍剤（抗がん剤）、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增大していることが確かめられた。

以上、富樫君は **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。

この新規バイオマーカー検出法は有用であり、その検出原理は他のマーカーにも適用でき、薬学において価値の高い成果であると判断できる。よって富樫君の業績は博士（薬学）に値すると評価した。