

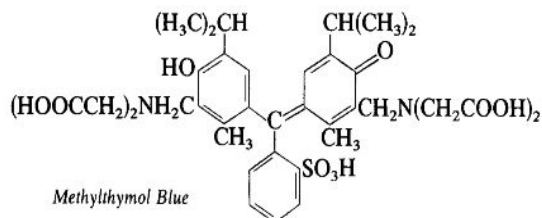
メチルチモールブルーと鉄(II)を用いる過酸化脂質及び関連化合物の 吸光光度定量法について

○山下好彦¹, 山口敬子¹, 大村真美¹, 虎谷有加¹, 涌田 綾¹,
宮地加奈子², 森山健三², 藤田芳一¹

(¹大阪薬科大学臨床化学研究室, ²近畿大学医学部附属病院薬剤部)

【目的】生体における様々な病態・疾患・老化などと深い関連性をもつ酸化ストレスには種々の化学種の関与が知られている。その中でも過酸化脂質は、病態への酸化ストレスの関与の有無を調べるのに有用であり、また動脈硬化症、アルツハイマー病、非アルコール性脂肪肝炎、糖尿病、関節リウマチあるいは血液透析など多くの病態・疾患や老化などと深く関わっている大変興味深い化合物群である。過酸化脂質の測定法として、共役ジエン法、チオバルビツール酸(TBA)法、ヘモグロビン-メチレンブルー法、高速液体クロマトグラフ法、高速液体クロマトグラフ-質量分析法など種々の方法が報告されているが、比較的簡便な測定法が少ないのが現況である。一方、当研究室ではこれまで、色素と金属イオンを併用することによる簡便で高感度な数多くの生体関連化合物の実用的な分析法¹⁾を開発しているため、今回の過酸化脂質の新規、簡便な測定法の開発に際し、本色素と金属イオンを用いる方法の有用性について探査することにした。

【実験方法】過酸化脂質として比較的安定な *tert*-butyl hydroperoxide(TBH)を取り上げ、色素と金属イオンの組み合わせを検討したところ、色素としてトリフェニルメタン系のメチルチモールブルー(MTB, 図), 金属イオンとして鉄(II)を用いる時、良好な結果が得られたので、以下常法に従って、その基礎的定量条件(pH と緩衝液, 界面活性剤の種類と濃度, MTB と鉄(II)の濃度など)について種々検討した。設定した標準定量操作は以下の通りである。すなわち、10 mL のメスフラスコに、 2.5×10^{-3} M 硫酸アンモニウム鉄(II)液 1.0 mL, 塩酸-酢酸ナトリウム緩衝液(pH 1.5) 3.0 mL, 1.0%ラウリル硫酸ナトリウム液 0.5 mL, 5.0×10^{-4} M MTB 液 1.0 mL および TBH を含む溶液を加え、全量を水で 10 mL とし 5 分間室温静置後、同様に処理して得た空試験を対照として 620 nm の吸光度を測定する。本操作法において、 $0.5 \sim 80 \mu\text{g/mL}$ ($R = 0.997$) の TBH 濃度範囲において、また H_2O_2 においても同様の操作によって、 $0.15 \sim 15 \mu\text{g/mL}$ ($R = 0.994$) の H_2O_2 濃度範囲において良好な検量線が得られた。



【結果および考察】標準定量操作に基づき種々の共存物質の検討を行ったところ、同濃度程度の Cu^{2+} , F^- , クエン酸, アスコルビン酸などの共存は影響を与えるが、その他の共存物質については殆んど妨害を示さないため、本法が実用的な過酸化脂質測定法として十分有用であることが示唆される。今後、実試料への適用に向けての詳細な検討、さらには本法の反応機構について精査する予定である。

【参考文献】

1) 藤田芳一, *ぶんせき*, 2008(11), 596-602 (2008).

細胞直接導入/ICP-MS による酵母細胞の多元素分析

○稲垣和三¹、藤井紳一郎¹、大畑昌輝¹、高崎裕加²、梅村知也²、
高津章子¹、千葉光一¹

¹産業技術総合研究所 計測標準研究部門

²名古屋大学 エコトピア科学研究所

【目的】近年の計測技術の高感度化により、生体内における微量元素の輸送メカニズム及び機能解明に関する研究は、実験動物等を用いた実験系から培養細胞を用いた細胞レベルでの輸送メカニズム解明へと進展している。これらの研究の多くは、単一元素を解析対象としているが、生体内では拮抗作用等の元素間相互作用が働くことが知られており、細胞内の機能解析には、対象元素を含めた多元素（究極的には全元素）同時計測結果に基づいた網羅的解析が理想である。しかしながら、現段階においては細胞レベルでの高感度多元素同時計測技術が確立されていないため、細胞内外での多元素動態及び相互作用の網羅的な解析が実現できないのが現状である。そこで演者らは、細胞レベルでの高感度多元素同時計測を実現すべく、細胞直接導入/ICP 質量分析装置による細胞中微量元素の高感度多元素同時計測手法の開発に着手した。本発表では、①高感度かつ多元素同時計測が可能な ICP 飛行時間型質量分析装置（ICP-TOFMS）の適用、②細胞直接導入デバイスの開発、③高速スキャン計測の適用により、発芽酵母中多元素分析を試みた結果について報告する。

【実験方法】本研究では、産総研とエス・ティ・ジャパン社の共同開発した高効率試料導入インターフェース AIF01 を細胞導入用に改良したものを各 ICP-MS の試料導入系として用いた。各測定は細胞中に含まれる元素を局在化した状態で高感度測定するため、高速スキャンモード（1000 Hz）で行なった。モデル試料液は発芽酵母（白神こだまパン酵母）をミリ Q 水に分散させた液を用い、シリンジポンプを用いて流量 2 $\mu\text{L}/\text{min}$ で各装置に試料液導入した。

【結果および考察】酵母細胞を ICP-TOFMS に直接導入し、高速スキャン計測した結果、Mg, P, Ca, Fe, Fe, Cu, Zn の高感度計測が可能であり、Mg, P, Zn のプロファイルには有意な相関関係(0.69)があった。本計測手法では同位体比計測も可能であることから、濃縮安定同位体を用いた元素取り込み挙動解析実験等への応用展開が可能であり、現在それらの実験を進めている。

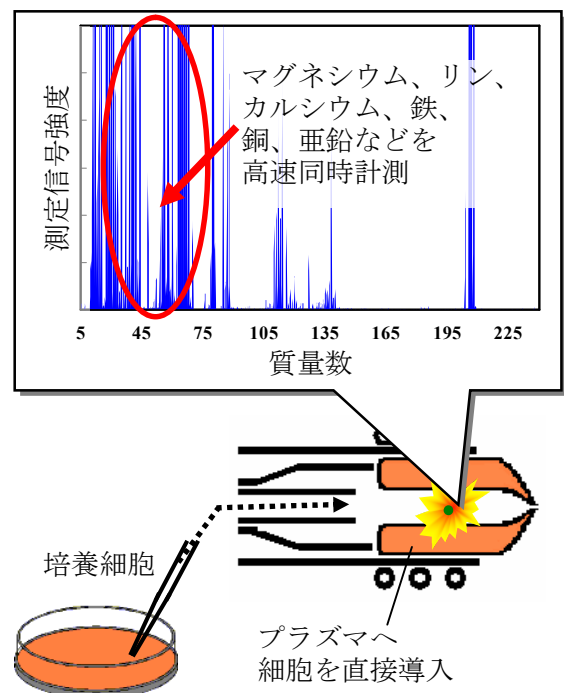


図 細胞直接導入/ICP-TOFMS イメージ

微量試料導入系を用いたマイクロ LC/ICP-MS による生物中の水溶性及び脂溶性

ひ素化合物の化学形態別分析

○黒岩貴芳¹、稲垣和三¹、成川知弘¹、高津章子¹、宮下振一²、千葉光一¹

1) (独) 産業技術総合研究所 計測標準研究部門

2) 東京薬科大学 大学院 生命科学研究科

【目的】水生生物、特に海洋生態系では、水中の微量ひ素を生体内に取り込み、食物連鎖を経由する過程で毒性が低い化合物に変換されることや、多くの生物中に陸上生物に比べ高濃度のひ素が蓄積されていることが知られている。しかし、未だ生体内でのひ素代謝のメカニズム、存在形態、その生理的な役割などは未知の部分が多い。近年、広く HPLC/ICP-MS などの手法が用いられるようになってきているが、分析対象のほとんどは水溶性ひ素化合物である。一方で脂溶性ひ素化合物が海洋生物中に存在することも明らかになっているが、標品がないことや分析の難しさから研究例や情報ははるかに少ない。本研究では、水生生物中に含まれる水溶性ひ素化合物だけでなく、脂溶性ひ素化合物についても化学形態別分析を行うことを目的として、全量消費型微量試料導入系を用いたマイクロ LC/ICP-MS について検討した。

【実験方法】海洋魚の眼組織と肝臓およびひじきを試料とした。また、単細胞緑藻に無機ひ素を暴露させて培養したものも試料とした。それぞれの組織からメタノール/クロロホルム、水/メタノールの混合溶媒を用い、超音波を用いてひ素化合物を抽出し、水溶性化合物、脂溶性化合物に分画し、それぞれの全ひ素量および化学形態を分析した。化学形態分析には、全量消費型微量試料導入系を用いた ICP-MS と、0.2×150 mm の ODS カラムまたはシリカカラムを用いたマイクロ LC を接続して行った。また、脂溶性ひ素化合物については、その抽出液の一部を加水分解し、同様に化学形態別分析を行った。

【結果および考察】海洋魚の眼組織と肝臓では筋肉部に比べ多くの脂溶性ひ素化合物の存在が確認された。また、ひじきにも水溶性ひ素と脂溶性ひ素が見られ、水溶性はアルセノ糖類と無機ひ素であった。暴露試験を行った単細胞緑藻中には代謝生成された脂溶性ひ素化合物の存在が確認された。抽出された脂溶性ひ素化合物を加水分解し、形態分析した結果、眼組織の視神経束では、アルセノコリン、ジメチルアルシン酸を残基として含むリン脂質、肝臓ではアルセノコリンを残基として含むリン脂質、藻類ではアルセノシュガーを含むリン脂質の存在の可能性が確認された。リン脂質の分析を LC/ICP-MS で行うためには有機溶媒に対応可能な導入系の適用検討が必要である。当研究室の稲垣らによって開発された全量消費型微量試料導入系を用いた ICP-MS とマイクロ LC とを接続し、上記の試料から抽出した脂溶性ひ素化合物を分析した結果、肝臓ではアルセノコリンを残基として含むホスファチジルアルセノコリン、藻類ではアルセノシュガーを含むホスファチジルアルセノシュガーの存在の可能性が確認された。

陰イオン交換 HPLC/ICP-MS システムの構築とメチル化 DNA 探索への応用

○高崎裕加¹、遠藤 朗¹、朱 沁¹、Akhmad SABARUDIN¹、
藤井紳一郎²、稲垣和三²、梅村知也¹
名古屋大学エコトピア科学研究所¹、産業技術総合研究所²

【目的】

エピジェネティック修飾のうち最もよく知られている DNA メチル化は、シトシンとグアニンが隣り合う CpG 部位で多く見られ、遺伝子発現の制御や腫瘍の形成などに深く関与している。哺乳類がもつ CpG のうち約 80% (シトシン全体の約 3%) がメチル化されているといわれるが、通常塩基配列決定法ではメチル化は検出できないため、メチル化に敏感な制限酵素などを用いて検出する必要がある。そこで本研究では、生体分子の迅速分離に適した有機ポリマー製モノリスカラムを作製し、陰イオン交換 HPLC により DNA の迅速分離を目指した。さらに、DNA 骨格中に含まれるリン酸基に着目し、ICP-MS によるリン元素の選択的検出を組み合わせることで、DNA の分離と定量をオンラインで行うことのできる分析システムの構築を目指した。

【実験方法】

内壁処理を施したセミマイクロサイズのシリコスチールチューブ内にメタクリル酸系有機ポリマー製モノリスを *in situ* 重合し、陰イオン交換モノリスカラムを作製した。ICP-MS のインターフェース部には、内径 0.075 mm のキャピラリー管を挿入した自作の高効率マイクロネブライザーを用いた。試料には、20 bp 毎の DNA を含むラダーマーカ、12~18 mer のチミジン鎖を含むヌクレオチド混合試料、メチル化 DNA を用いた。

【結果および考察】

作製した陰イオン交換モノリスカラムを用い、塩濃度のグラジエント溶離により DNA ラダーマーカとヌクレオチド混合試料の分離を試みた。陰イオン交換分離で一般に用いられるナトリウム塩を高濃度を含む移動相は、インターフェース部での目詰まりやプラズマの不安定化の原因となるため、揮発性のアンモニウム塩の適用を検討し、塩化アンモニウムにより再現性よく DNA やオリゴヌクレオチドを分離する条件を見出した。ICP-MS への直接導入に際しては、自作した微量噴霧マイクロネブライザーを用いることで、試料を含む溶媒の液滴サイズを小さくしてプラズマへの負荷を減らし、数時間にわたる連続測定を可能とした。DNA ラダーマーカおよびヌクレオチド混合試料の分析により、本システムの有用性を評価したところ、両者の高性能な分離と精度のよい定量が可能であった。さらに、メチル化 DNA の分析に応用したところ、十分な分離を達成し、リンの選択的検出による定量も可能であることが分かった。

Nano HPLC-ICPMS をもちいたペプチド中イオウ測定による タンパク質の定量

○鈴木美成、信澤 歩、古田直紀

中央大学 理工学部

【目的】プロテオミクス分野では ESIMS を用いたタンパク質の同定が行われているが、多価イオンの生成やマトリックスによるイオン化効率の変化などの理由から定量は困難である。しかしながら、生体内のタンパク質濃度と疾患にはしばしば関係性があるので、定量を行うことも重要である。イオウ (S) はシステインおよびメチオニンに含まれおり、これらのアミノ酸は、ヒトのタンパク質の 96.6、98.8% にそれぞれ存在する。トリプシン分解を行い、S の測定からペプチド濃度とトリプシン分解効率を考慮することで、元のタンパク質を定量することが期待される。本研究では、モデルタンパク質としてヒト血漿中アルブミン (Alb) を対象とし、トリプシン分解したサンプルのペプチド中の S を Nano HPLC-ICPMS を用いて $^{32}\text{S}^{16}\text{O}$ として定量し、遡って Alb の定量を試みた。

【実験方法】標準 Alb としてヒト血清由来の市販品 (Sigma Aldrich, Japan) を、未知試料としてヒト血漿サンプルを用い、ヒト血漿中 Alb を定量した。これら 2 つの試料を電気泳動試料として、Native-PAGE により Alb を分離した。クーマシーブルー染色後、Alb 含有バンドを回収した後に脱色を行い、バンドをトリプシン分解用とマイクロ波分解用の 2 つに分けた。トリプシン分解用のバンド試料は、還元処理とアルキル化処理を順に行い脱水処理をした後にトリプシン分解を行った。分解後に得られた抽出液を凍結乾燥し、トリプシン分解物を得た。トリプシン分解物中の各ペプチドに含まれる S を Nano HPLC-ICPMS にて定量した。さらに、マイクロ波分解用のバンド試料を酸分解して、この酸分解物およびトリプシン分解物試料 2 μL を FIA-ICPMS で全 S を定量し、トリプシン分解効率を算出した。

【結果および考察】理論上、ヒト血漿中 Alb のトリプシン分解物には 26 個の S を含むペプチドが存在すると考えられる¹⁾。本研究では 26 個のペプチド中 S 個数比が理論値と一致した。トリプシン分解効率は 40% となった。希釈倍率を考慮すると、電気泳動試料中の標準 Alb の濃度は $1.3 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ となり、理論値の $1.4 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ と良い一致を示した。最終的に得られたヒト血漿中 Alb の濃度は $1.7 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ であった。この値は報告値の範囲内に収まっていた²⁾。また、Native-PAGE とクーマシーブルー染色を用いて標準 Alb より求められた濃度とも良く一致した。

【参考文献】

- 1) The Universe Protein Resource : “ Human Serum Albumin in UniProtKB ”, available from
< <http://www.uniprot.org/uniprot/P02768> > (accessed 2002 - 2010).
- 2) 中井利昭, 尾崎由基男, 小室一成, 小田原雅人, 野村文夫 : “検査値のみかた -付 パニック値・警戒値-”, p. 51 (2006), (中外医学社).

Positron Emission Tomography を用いた非侵襲的炎症性腸疾患評価系の探索

発表者氏名：○ 東川 桂¹, 赤田 直輝¹, 八木 克治¹, 渡辺 恵子², 神野 伸一郎²,
加来田 博貴¹, 金山 洋介², 廣村 信², 榎本 秀一^{1,2}
(¹岡山大院医歯薬,²理研 CMIS)

【目的】炎症性腸疾患 (Inflammatory Bowel Disease, IBD) は、消化管に慢性持続性の炎症をおこす難病であり、潰瘍性大腸炎とクローン病の二疾患からなる病因不明の疾患群である。近年、わが国における IBD 患者数は、増加傾向にあり、その治療薬の開発は急務となっている。IBD 治療のための様々な創薬探索が進められているが、創薬候補物質の前臨床研究における実験モデル動物の薬効評価には、IBD モデル動物から採取した腸管の mRNA やタンパク質の発現量解析など、侵襲的な評価法が一般的である。しかし、比較的長期にわたる継時的な薬効評価を必要とする場合、非侵襲的かつ炎症状態を特異的に検出可能な評価法の構築が望まれる。そこで演者らは、IBD 治療薬の創薬研究に資するため、非侵襲的な病態診断が可能な Positron Emission Tomography (PET) を用いる炎症状態評価系の確立を試みた。

【実験方法】小腸炎症モデル動物は、BALB/c マウス (雌性, 13 週齢) にインドメタシン (IND) を 10 mg/kg の投与量で皮下投与し、小腸炎を誘導して作製した。一方、大腸炎症モデル動物は、5.0% デキストラン硫酸ナトリウム (DSS) 溶液を 7 日間自由飲水させ、大腸炎を誘導して作製した。これらの動物を用い、炎症組織視覚化のため、fluorine-18-fluorodeoxyglucose (¹⁸F-FDG) を用いて腸炎モデルマウスの PET イメージングを行った。¹⁸F-FDG は、それぞれ約 5 MBq 尾静脈投与し、投与 40 分後に PET 撮像を行った。

さらに、これらの動物モデルにおける炎症病態への生化学的評価を行うために、正常および IBD モデルマウス腸管における炎症性サイトカイン発現量を RT-PCR 法により比較した。

【結果および考察】¹⁸F-FDG-PET 撮像の結果、演者らは、IND および DSS 投与マウスにおいて、それぞれ小腸炎、大腸炎が誘導され、IBD モデル動物の作製に成功した。また ¹⁸F-FDG-PET 撮像により、それぞれの IBD モデルマウスの炎症部位イメージングに成功した。このことから、¹⁸F-FDG-PET 法は IBD 治療における創薬候補物質の薬効評価系として有効であることがわかった。

さらに演者らは、¹⁸F-FDG-PET 法では困難な、発症機序情報を含めたより詳細な炎症状態の評価法を確立することを着想した。そこで炎症に特異的な分子の発現を確認するため、RT-PCR 法を行った。その結果、IBD モデルマウスは正常マウスより、Interleukin(IL)-1 β および IL-6 などの炎症性サイトカインの発現量が著しく増大することを見出した。このことは、腸炎の誘導には IL-1 β および IL-6 などの炎症性サイトカインが大きく関与し、その発現量を比較すれば、発症機序の情報を含めた詳細な炎症状態を特異的にモニタリングが可能であることが示唆された。また、これらの炎症性サイトカインを標的としたプローブは、種々の炎症性疾患の機能的診断に役立つと考えられる。

本講演では、これら炎症性サイトカインをターゲットとしたイメージングプローブの創薬研究に関しても併せて報告する。

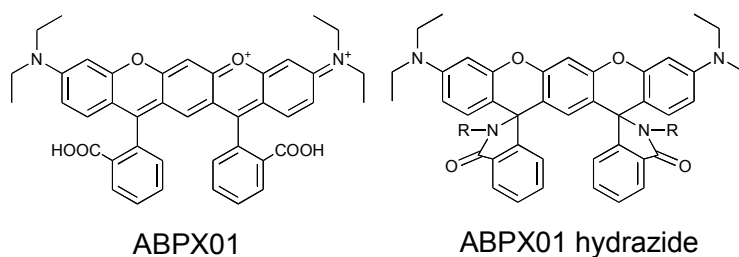
凝集誘起発光特性(AIEE)を光スイッチとする蛍光プローブの開発

○神野 伸一郎¹⁾, 巽 朝菜²⁾, 米田 誠治³⁾, 渡辺 恵子¹⁾, 藤田 芳一⁴⁾,廣村 信¹⁾, 廣田 俊⁵⁾, 榎本秀一^{1,2)}理研 CMIS¹⁾, 岡山大院医歯薬²⁾鈴鹿医療大薬³⁾, 大阪薬大薬⁴⁾, 奈良先端大院物質創成⁵⁾

[緒言] 蛍光分析法は簡便で迅速性や経済性も優れており、多くの有機系蛍光色素が蛍光プローブとして応用されている。一方、蛍光プローブの開発において、長波長特性や水中で高いモル吸光係数や蛍光量子収率を示すことは勿論であるが、蛍光の on-off を制御できる光スイッチング機能を蛍光団に持たせることが必須であり、ターゲットへのプローブの集積に応じて蛍光シグナルが定量的に増加するような蛍光団を創製することが理想である。しかしながら有機系蛍光色素は集積に従い色素分子同士が凝集するため、蛍光が著しく減弱する問題点を有している。今回演者らは色素の凝集が蛍光制御のキーファクターになると考えた。即ち、凝集に伴い蛍光強度が増加する凝集誘起発光特性(Aggregation-Induced Emission Enhancement; AIEE)分子を新たに創製し、AIEE を光スイッチング原理とすることで、ターゲットへの集積の度合いを分析できる蛍光団を新たに創製すると同時に、それを各種金属イオン分析用蛍光プローブに応用することを目指し本研究に着手した。

[実験] Friedel-Crafts Acyl 化反応より得られたベンゾフェノン誘導体とレゾルシノール(2:1)をメタンスルホン酸中 95°C で溶融縮合反応を行い、得られたロイコ型色素を塩化ホスホリル中で酸化することで、新規のアミノベンゾピロキサテン系色素(ABPX01)の合成に成功した。またそのスピロラクトン型構造を X 線結晶構造解析により明らかにした。続いて得られた化合物の AIEE について各種分光機器を評価し、動的光散乱法(DLS)等を利用して凝集体のキャラクタリゼーションを行った。

[結果と考察] 今回得られた ABPX01 の蛍光スペクトルを各種溶媒中で測定することで AIEE 評価を行った。まずメタノール及びクロロホルム中で ABPX01 の濃度に伴う蛍光スペクトル変化を測定したところ、高濃度になるに従い蛍光強度が定量的に上昇し、その蛍光波長は長波長(590~900 nm)であった。続いて ABPX01 の水/THF 混合溶液中での蛍光スペクトルを測定したところ、THF 単独、10%、20%では無蛍光であったが、30%以上より水の割合に依存して蛍光が増加し、これより AIEE による蛍光の”on-off 制御”が可能であることが示された。また同様の条件でそれぞれ吸収スペクトルを測定したところ、30%以上より Mie 散乱体の生成を示唆する level-off tails が確認された。続いて 90% 水/THF 混合液中での凝集体の粒子径を DLS に測定したところ、経時的に粒子サイズが増大する(500 nm~1200 nm)結果を得た。また溶媒の種類に伴い粒子径が異なることを確認した。以上の結果より ABPX01 は AIEE を示すことが明らかになった。現在 ABPX を母核構造とし、各種金属イオンと安定な配位能を有するスピロラクタム環を導入した ABPX01 hydrazide の合成を行い、金属イオン分析用蛍光プローブとして応用を検討中であり、その成果についても併せて報告する。



N 末アミノ酸を置換した放射能標識 DOTA 結合 octreotide 誘導体の

体内動態に関する検討

○竹中 文章¹、北村 陽二²、神野 伸一郎³、秋澤 宏行⁴、荒野 泰⁵、金山 洋介³、榎本 秀一^{1, 3}

¹岡山大院医歯薬、²金沢大学際科学セ、³理研 CMIS、⁴北医療大薬、⁵千葉大院薬

【目的】ソマトスタチンアナログである octreotide (oct) の N 末端アミノ基に ¹¹¹In-DTPA や ⁹⁰Y-DOTA を結合した化合物は、ソマトスタチンレセプターを高密度に発現する神経内分泌腫瘍に対する診断薬やアイソトープ治療薬剤として有用性が認められている一方、これらの化合物の正常な腎臓への集積が問題となっている。これまでに演者らは、¹¹¹In-DTPA-D-Phe¹-oct の N 末 D-Phe 部位へ負電荷を有するアミノ酸を導入した DTPA 結合 oct 誘導体が、腎臓への集積を低減化することを報告してきた。本研究では、より腎集積の低減化した、アイソトープ治療薬剤および PET イメージングプローブの開発を目的として、β⁻線放出核種である ⁹⁰Y や、PET 核種である ⁶⁸Ga と安定なキレートを形成する DOTA をキレーターとして用い、放射標識 DOTA 結合 oct 誘導体 N 末端に対して、負電荷アミノ酸導入を行った場合の腎臓や腫瘍集積への影響について検討した。

【方法】oct 誘導体の N 末 D-Phe 部位に負電荷アミノ酸として D-Asp 1 個または 2 個を導入した DOTA-D-Asp¹-oct、DOTA-D-Asp- D-Asp¹-oct、またコントロールとして従来の oct 誘導体である DOTA-D-Phe¹-oct を Fmoc 固相合成法により合成した。得られた化合物を、⁹⁰Y の代替核種として、測定しやすい γ 線放出核種である ¹¹¹In で標識し、それらの化合物の電気的性質をセルロースアセテート膜電気泳動法により検討し、マウスに各化合物投与後の各種臓器放射能を γ カウンタにより測定した。また、DOTA-D-Phe¹-oct と DOTA-D-Asp-D-Asp¹-oct の ⁶⁸Ga 標識化合物を作成し、担癌マウスに投与し、経時的 PET 撮像と前述と同様の各種臓器放射能測定を行った。担癌マウスは、AR42J 細胞株（ラット膵臓癌由来）を BALB/c nu/nu マウスに移植して作製した。

【結果と考察】セルロースアセテート膜電気泳動の結果、導入した D-Asp の数が、化合物全体の電気的性質に反映されることを確認した。¹¹¹In-DOTA-D-Asp-D-Asp¹-oct の腎集積はコントロールに比べ、有意に低減したが、¹¹¹In-DOTA-D-Asp¹-oct ではわずかな腎集積の低減しか認められなかった。このことより、¹¹¹In-DOTA-D-Asp-D-Asp¹-oct の腎集積低減が分子全体の負電荷に大きく依存することが示唆された。また ¹¹¹In-DOTA-D-Asp-D-Asp¹-oct とコントロールを用いて担癌マウスでの放射能分布を検討した結果、コントロールに比べ ¹¹¹In-DOTA-D-Asp-D-Asp¹-oct の放射能集積の腫瘍/腎臓比の改善がみられた。一方、⁶⁸Ga を用いた PET イメージング及び放射能分布の結果においても、担癌マウスに対する ⁶⁸Ga-DOTA-D-Asp-D-Asp¹-oct 投与後の腎集積はコントロールに比べ、有意に低減された。以上の結果から、DOTA 結合 oct の N 末端 D-Phe 部位に対して、負電荷アミノ酸を導入すると腎集積低減化できることを示唆し、oct を用いたアイソトープ治療薬剤および PET イメージングプローブの開発にも有効な手法であることがわかった。

CTLA-4 を標的とした新規腫瘍イメージングプローブの開発と評価

○八木 克治¹, 東川 桂¹, 山本 達也¹, 渡辺 恵子², 廣村 信², 金山 洋介², 榎本 秀一^{1,2}¹岡山大学院医歯薬, ²理研 CMIS

【目的】 Fluorine-18-fluorodeoxyglucose を分子イメージングプローブとした positron emission tomography (¹⁸F-FDG PET)は糖代謝の亢進に基づく、現在最も汎用される腫瘍イメージング法であるが、¹⁸F-FDG PET では、浸潤性、薬物感受性など腫瘍個々の性質の把握が困難であるため、それらを可能とする新たな分子イメージングプローブの開発が望まれている。そこで今回、我々は Cytotoxic T-lymphocyte associated antigen-4 (CTLA-4、CD152) を腫瘍分子イメージングの標的分子とした。CTLA-4 は活性化 T 細胞表面に発現し、抗原提示細胞表面に発現する CD80 又は CD86 と結合することにより、T 細胞活性を抑制する。また近年、CTLA-4 が腫瘍細胞表面にも発現することが報告された。CTLA-4 は乳癌、大腸癌など様々な腫瘍細胞表面に高発現し、腫瘍が増殖、浸潤する上で重要な分子の一つである。この CTLA-4 を標的としたモノクローナル抗体、ipilimumab、tremelimumab は抗悪性腫瘍薬としての臨床応用へ向けて治験段階にある。さらに、CTLA-4 は大腸癌などの発癌に関与する Wnt シグナルの指標となることも知られており、CTLA-4 タンパク質を標的とした腫瘍イメージングを行うことは、CTLA-4 を標的とした抗悪性腫瘍薬による治療の感受性の評価や腫瘍そのものの検出にも有用であると考えられる。そこで本研究では、腫瘍分子イメージングプローブとして、⁶⁴Cu-1,4,7,10-tetraazacyclododecane-*N*, *N'*, *N''*, *N'''*-tetraacetic acid (DOTA) -抗 CTLA-4 抗体を作製し、その生体内動態を捉えることを目的とし、PET イメージングを行った。

【方法】 マウス大腸癌細胞は Colon26、CT26 を用い、CTLA-4 タンパク質の発現および細胞内局在部位をウエスタンブロット法と蛍光免疫染色法により検討した。また、Colon26、CT26 移植マウスを作製し、その組織を凍結切片として免疫組織染色を行い、CTLA-4 の発現を確認した。同時に炎症部位における CTLA-4 の発現状態を観察するため、dextran sulfate sodium 誘発大腸炎モデルマウス、正常マウス大腸組織の免疫組織学的検討を行い、大腸癌組織と炎症部位の CTLA-4 タンパク質の発現状態を比較した。さらに、⁶⁴Cu-DOTA-抗 CTLA-4 抗体を作製し、これを Colon26、CT26 移植担癌マウスに尾静脈投与し、投与 20 時間後、35 時間後に PET イメージングを行い、腫瘍集積性を観察した。さらに、投与 35 時間後に PET イメージングを行った後、直ちに解剖を行い、各臓器に集積したプローブから放射される放射線を γ 線カウンターを用いて測定し、プローブの生体内分布を確認した。同様に、⁶⁴Cu-DOTA-コントロール IgG を作製し、結果を比較した。

【結果・考察】 免疫組織学的検討より、Colon26 および CT26 のいずれの細胞とも CTLA-4 タンパク質が細胞表面に発現することが確認できた。また、大腸癌組織における CTLA-4 タンパク質発現量は、正常大腸組織、大腸炎大腸組織におけるそれと比較して、有意に高かった。また、PET イメージングおよび生体内分布の結果から、コントロール IgG と比較して、抗 CTLA-4 抗体は、有意に腫瘍集積性が見られた。以上の結果より、CTLA-4 は有望な腫瘍イメージングの標的分子であることが示唆された。

Wilson 病モデルラットにおける肝障害に関する検討

○藤澤千恵、Wattanaporn Bhadhprasit、泉陽一、加賀文彩、志賀勝秋、小川栄伸、児玉浩子
帝京大学医学部小児科

【目的】

Wilson 病における肝障害のタイプは症例により異なり、急性劇症型肝炎、慢性肝炎、肝硬変など様々な病態を示すことが知られている。このような様々な病態を示す理由は明らかとされていない。近年、肝癌や肝障害発症の 1 機序として、細胞内の活性酸素種産生に伴う酸化ストレスとその消化機構であるレドックス制御の不均衡が報告されている。我々は Wilson 病モデルラットの LEC ラットを用いて肝臓内銅濃度測定と酸化ストレスマーカー、抗酸化物質、アポトーシスマーカーの検出を試みた。

【実験方法】

Wilson 病モデルラットである LEC ラット及びそのコントロールとして LEA ラットについて検討を行った。各ラットともに経時的に血清、肝臓を採取、実験に使用した。アポトーシス関連タンパク質の検出には Western blotting を用いた。さらに、免疫染色により肝臓組織における cleaved caspase-3 の検出を行った。

【結果および考察】

LEA ラットに比べ LEC ラットの肝臓内銅濃度は生後早期から有意に高い値を示した。アポトーシス関連蛋白として肝臓中 cleaved Caspase-3、cytochrome c の検出を行ったところ LEC ラットで発現が認められた。また、組織染色においても cleaved caspase-3 の発現が認められた。DNA の酸化損傷により生じる 8-OHdG の測定の測定を行ったところ LEC ラットで高い傾向が認められたが有意差は無かった。血清中 Vitamin C 濃度は LEC ラットにおいて 8 週齢から LEA ラットより低値を示した。これらの結果より、LEC ラットは LEA ラットに比べ生後早期から酸化ストレスを受けている可能性が示唆された。しかしながら、Wilson 病患者同様 LEC ラットにおいても固体、週齢などによる症状の違いが認められることから更なる検討が必要であると考えられる。

海馬シナプス亜鉛の一時的な減少による認知記憶形成の障害

○高田俊介、武田厚司、安藤正樹、奥直人
静岡県立大学大学院・薬学研究科・Global COE

【目的】大脳皮質の内側にある海馬は記憶と関係し、海馬が損傷すると記憶が形成されない重度の前行性の健忘に陥る。海馬での学習・記憶に関する情報処理は、主にグルタミン酸作動性神経によって行われ、その神経終末のシナプス小胞には亜鉛が存在する。亜鉛は脱分極刺激によりグルタミン酸と共に放出され、神経伝達を調節する。ラットに低亜鉛食を与えると、認知機能が障害されることをこれまで報告してきた。しかし、学習・記憶に対する海馬シナプス亜鉛の作用に関する知見は乏しい。そこで、膜透過型の亜鉛キレート試薬である clioquinol を用いて、認知行動や記憶の分子基盤の一つと考えられる長期増強 (LTP: long-term potentiation) 発現におけるシナプス小胞亜鉛の役割を検討した。

【実験方法】ラットに clioquinol (30 mg/kg) を腹腔内投与し、海馬シナプス亜鉛を Timm's 染色法により測定した。また clioquinol 投与後、海馬スライスを作成し、細胞外 (シナプス間隙) 亜鉛を膜非透過型亜鉛蛍光プローブである ZnAF-2 を用いて共焦点レーザー顕微鏡で測定した。次に、clioquinol 投与後、麻酔下で貫通線維束と海馬歯状回領域に電極を挿入し、歯状回 LTP を高頻度刺激により誘導した。また、clioquinol 投与 2 時間後に物体認識法によりラットを学習させ、学習 1-24 時間後にテストを行った。

【結果および考察】 clioquinol 投与 2-6 時間後、海馬における Timm's 染色強度は減少し、その後回復した。clioquinol による海馬シナプス亜鉛の減少は、投与 6 時間後に最も顕著であり、歯状回分子層での減少が海馬において顕著であった。clioquinol 投与 6 時間後、ZnAF-2 の蛍光強度も同様に最も減少し、歯状回分子層、CA1 放線層では ZnAF-2 蛍光はほとんど検出されなかった。これらの領域では神経終末から放出される亜鉛量が clioquinol 投与により不十分になることが示唆された。そこで、ラットに clioquinol を投与し、歯状回 LTP を誘導した。LTP は投与 2 時間後では対象群と比べて減弱しなかったが、投与 6-24 時間後で減弱した。また、clioquinol 投与 2 時間後、物体認識法によりラットを学習させたところ、対照群と同様に学習行動が観察された。次に、学習 1 時間後にテストを行ったところ、学習した物体は認識されたが、24 時間後のテストでは対照群と異なり、学習した物体は認識されなかった。以上、海馬シナプス亜鉛の一時的な減少により、歯状回 LTP が減弱すること、この減弱が認知記憶の障害と関係すること示唆された。海馬シナプス亜鉛は記憶の保持・想起の過程に必要であると考えられる。

【参考文献】

- 1) Takeda A, Takada S, et al., Impairment of recognition memory and hippocampal long-term potentiation after acute exposure to clioquinol. *Neuroscience*, in press.

Demonstration and characterization of the heterodimerization of ZnT5 and ZnT6 in the early secretory pathway

- ^{1,2}Ayako FUKUNAKA, ²Yayoi KUROKAWA, ¹Makoto HIROMURA,
^{1,3}Shuichi ENOMOTO, ²Taiho KAMBE
1 RIKEN CMIS, 2 Graduate school of biostudies, Kyoto university,
3 Graduate school of medicine, dentistry and pharmaceutical sciences,
Okayama university

【Object】

The mammalian zinc transporters are classified into two families, ZnT and ZIP families, which control zinc homeostasis, and the most of ZnT transporters are known to form homo-oligomers to perform their function. We have previously reported that ZnT5 and ZnT6 formed hetero-oligomeric complexes to transport zinc into the secretory pathway, however, the mechanism of complex formation between them remained elucidated. To investigate this point, we focused on two remarkable characteristics of ZnT5 (the long N-terminal sequence) and ZnT6 (the loss of zinc binding residues in the transmembrane domain) that are different from other ZnT transporters and examined whether these characteristics are important for the formation of hetero-oligomer.

【Experimental procedures】

To perform this study, we used chicken DT40 cell system that allowed us to carry out combined approaches including gene disruption, re-expression and co-immunoprecipitation to detect physical interaction.

【Results and Discussion】

Our studies revealed that 1) ZnT5 and ZnT6 form heterodimers to transport zinc into the early secretory pathway. 2) ZnT6 is unlikely to be involved in zinc transport as a donor for zinc-binding sites embedded within the transmembrane domains. 3) The long N-terminal region of ZnT5 is not necessary for the interaction with ZnT6, while the cytosolic C-terminal tail of ZnT5 is important for the recognition of ZnT6 as a partner molecule for heterodimer formation. These results show the unique properties of ZnT5/ZnT6 heterodimer formation, and would provide novel information for understanding the characteristics of other ZnT proteins.

【Reference】

- 1) Ayako Fukunaka, Tomoyuki Suzuki, et al., *J.Biol.Chem.* **284**: 30798-30806 (2009)

亜鉛の体内動態と **Transporter (ZIP)** との機能的関連

- 山本 貴紀¹、安野 徹¹、岡元 裕己¹、永井 美帆¹、杉下 靖宜¹、妹尾 彩香¹
安井 裕之²、吉川 豊²、勝見 英正¹、坂根 稔康¹、山本 昌¹
京都薬科大学¹ 薬剤学² 代謝分析学

【目的】近年、亜鉛が生体のホメオスタシスの維持に重要な役割を果たしていることが明らかとなりつつある。亜鉛は 100 種類を超える酵素の活性に関与し、酵素や DNA 構造の形成・維持に必須であり、その欠乏症においては、味蕾の減少による味覚障害、免疫・消化管・生殖機能の減衰、皮膚炎などの様々な障害が惹起される。このような状況を背景に、現在、胃潰瘍治療薬であるプロマック（ポラプレジンク製剤）やウィルソン病治療薬であるノベルジン（酢酸亜鉛水和物製剤）といった亜鉛含有医薬品や、様々な亜鉛サプリメントの開発・販売が行われているが、亜鉛の経口吸収率や体内動態に関する情報は乏しいのが現状である。また、近年、亜鉛ホメオスタシスの維持に機能するトランスポーターとして、ZIP と ZnT が同定された。これらのなかでも、ZIP4 はヒトで唯一認められる遺伝性亜鉛欠乏症（Acrodermatitis Enteropathica）の病因で、小腸上皮細胞の apical 側膜に発現し、体内への亜鉛取り込みに必須の役割を果たしている。一方、ZIP5 は basolateral 側膜に発現し、ZIP4 と逆向きの発現制御を受けることが明らかとなっている。本研究では、亜鉛に関する薬物動態学的な情報を得ることを目的に、健常ラットにおける亜鉛の体内動態とトランスポーター（ZIP4、ZIP5）との関連について、詳細な検討を行った。

【実験方法】Wistar 系雄性ラットの各種臓器および脳を採取し、臓器内亜鉛濃度を測定した。また、亜鉛安定同位体を用い、静脈内投与後の血中動態・臓器分布、さらに経口投与後の吸収動態を検討した。タンパク結合率は平衡透析法により算出した。一方、Caco-2 細胞およびラット摘出小腸粘膜を用いて、これらモデル膜に対する亜鉛の透過性を詳細に検討するとともに、亜鉛トランスポーターの発現を RT-PCR 法により評価した。

【結果および考察】生理的条件下、内因性亜鉛は肝臓、腎臓などの血流量の多い臓器と精巣に高濃度に分布していた。また、脳内分布を検討した結果、記憶を司る海馬の濃度が高く、記憶を初めとする脳機能との関係が示唆された。亜鉛の臓器分布と ZIP4 及び ZIP5 mRNA の発現量との間には相関性が認められなかったが、金属結合タンパク質であるメタロチオネイン mRNA の臓器発現量との間には有意な相関関係が認められた。亜鉛の急速静脈内投与後の体内動態は 2-Compartment model に従い、経口投与後の生物学的利用率は約 10%であった。血漿タンパクおよびウシ血清アルブミンと結合率は血中亜鉛濃度域で約 99.5 %と非常に高く、Scatchard plot の結果、亜鉛は 2 種類の結合サイトでウシ血清アルブミンと結合している可能性が示唆された。次に、亜鉛の Caco-2 細胞層透過性を測定したところ、透過に飽和現象が観察された。Michaelis-Menten 式を仮定して、透過データを解析したところ、飽和成分の Michaelis 定数 (Km) は 11.7 (μM)、最大輸送速度 (V_{max}) は 31.6 ($\text{pmol}/\text{min}/\text{cm}^2$) であった。RT-PCR により ZIP mRNA の発現を確認したところ、ZIP4 と ZIP5 の発現が確認された。しかしながら、Caco-2 細胞における輸送担体、代謝酵素の発現は生理的条件下の小腸上皮細胞とは異なっていることが知られている。亜鉛トランスポーターについてもその可能性が高いと考えられたため、動物種は異なるが、ラットの摘出消化管粘膜に対する透過性を *In vitro* diffusion chamber 法により測定した。その結果、十二指腸、空腸、回腸いずれにおいても、Km は約 11 (μM) で、部位差は観察されなかった。一方、 V_{max} は空腸で約 30 ($\text{pmol}/\text{min}/\text{cm}^2$) であったのに対し、十二指腸、回腸では約 40 ($\text{pmol}/\text{min}/\text{cm}^2$) であった。受動輸送の透過係数 (Kd) は小腸上部から順に 3.47、1.98、2.53 ($\times 10^{-6}$ cm/sec) であり、亜鉛の消化管吸収性は十二指腸で高く、生理的条件下では主として十二指腸から吸収される可能性が示唆された。

トランスポータを介した亜鉛取り込みによるミクログリアの活性化

○ 西田 健太郎、西浦 武志、瀬川 将平、大里 侑希、谷 美咲、吉川 由希子、中村 庄吾、
安田 江里、東 洋一郎、長澤 一樹
京都薬科大学・衛生化学分野

【目的】亜鉛はグルタミン酸神経細胞の前シナプス小胞内にグルタミン酸と共に蓄積され、神経伝達物質の一つとして機能している。一方、脳虚血などの重篤な脳障害時には、グルタミン酸とともに亜鉛がシナプス間隙に過剰に放出され、脳内免疫担当細胞であるミクログリアの過剰活性化や神経細胞死を引き起こす。我々はこれまでに、ミクログリアに亜鉛を作用することにより、ATP が放出され、それに続くプリン (P2) 受容体の活性化がミクログリアの活性化に重要であることを明らかにした。しかしながら、このミクログリア活性化機序において亜鉛が細胞内に取り込まれるか否かについては不明である。近年、亜鉛に選択的な輸送体である *Zrt-and Irt-like proteins (ZIP)* ファミリーが見出され、細胞外から細胞内への亜鉛流入に関与する分子として注目されている。本研究は、ミクログリア内への亜鉛の取り込みに関与する輸送系を明確にすることを目的として、以下の検討を行った。

【方法】マウス大脳皮質ミクログリアは定法に従って単離・培養した。ミクログリアの活性化は、その形態変化、NADPH oxidase 活性化、そして PAR 蓄積を指標にした PARP-1 活性化に基づき評価した。亜鉛の取り込み実験は、 ^{65}Zn と細胞を一定時間反応させた後、その細胞内量をガンマカウンタにより測定することにより行った。Superoxide anion 産生は dihydroethidium を用いた蛍光検出法により評価した。また、細胞外 ATP 濃度は酵素基質反応により生成される NADPH の蛍光強度に基づき測定した。P2 受容体及び ZIP アイソフォームの mRNA 発現は半定量 RT-PCR 法及び real-time PCR 法により調べた。

【結果および考察】ミクログリアによる ^{65}Zn の取り込みは、時間、温度及び基質濃度依存的であった。また、ミクログリアにおいて細胞膜型の ZIP1 及びゴルジ体型の ZIP7 が高発現していた。 ^{65}Zn 取り込みは ZIP ファミリーの基質/阻害剤である二価の金属カチオンの存在下において濃度依存的に減少し、さらに比較的 ZIP1 に選択性が高いとされるニッケルは、 ^{65}Zn 取り込みに対して *cis-*及び *trans-inhibition* 効果を示した。また、細胞内亜鉛キレート剤である TPEN を細胞内に前負荷したとき、亜鉛によるミクログリアの形態変化、superoxide anion 産生、PAR 蓄積および細胞外 ATP 放出がほぼ完全に抑制された。これらの結果から、亜鉛は細胞内に取り込まれることでミクログリアの活性化が引き起こされ、それは ZIP1 を介したものであることが示唆された。

メタロチオネイン遺伝子の転写に伴うクロマチン内

ヒストン H3 減少の機序解析

○古田雄三、木村朋紀、奥村文香、磯部正和
撰南大学 薬学部 毒性学研究室

【目的】メタロチオネイン(MT)はシステインを豊富に含む重金属結合性タンパク質として知られており、種々の重金属により誘導され、亜鉛や銅などの恒常性維持や、カドミウムや水銀など有害重金属の毒性軽減、活性酸素種に対する生体防御に関与している。また、この重金属による MT 誘導には、重金属応答性転写因子 metal response element-binding transcription factor-1 (MTF-1)が必須であり、亜鉛処理後、MT プロモーター上にリクルートすることが知られている。しかし、MTF-1 による MT の転写活性化機構の詳細はいまだ明らかにされていない。それゆえ、我々は MT-I 遺伝子の転写活性化に伴うクロマチン変化に着目した解析を行い、亜鉛によりプロモーター領域のヒストン H3 量が減少することを示してきた。転写が盛んなプロモーターにおけるエピジェネティックな変化として、ヒストン H3 が H3.3 に置換することがよく知られていることから、今回、このヒストン H3 量の減少が H3.3 への置換によるものであるか検証した。

【実験方法】実験にはマウス由来線維芽細胞 (MEF)、MTF-1 欠損細胞 (MTF-KO MEF)、酸性領域を欠失した MTF-1 を安定発現した MTF-KO MEF (MTF- Δ AD MEF) 及びマウス肝がん由来細胞 (Hepa) を用いた。MT-I mRNA 量は TaqMan プローブ法を用いたリアルタイム PCR 法により評価した。MT-I プロモーター上のヒストン H3 及び H3.3 量は、抗ヒストン H3 抗体及び H3.3 に付加した HA タグに対する抗体を用いたクロマチン免疫沈降法により解析した。

【結果および考察】MEF 及び Hepa の MT-I プロモーター領域において亜鉛処理によりヒストン H3 量が減少することが確認された。転写の盛んな遺伝子プロモーターにおけるヒストン H3 量の減少は、ヒストン H3 バリエーションであるヒストン H3.3 への置換や、ヒストン・コア粒子が取り除かれることによって引き起こると報告されている。そこで、MT-I プロモーター領域でみられるヒストン H3 量の減少がヒストン H3.3 への置換である可能性を考え、HA タグを付加したヒストン H3.3 (H3.3-HA) を安定発現する MEF を樹立し、MT-I プロモーター領域の H3.3-HA 量の増加を観察した。しかし、亜鉛処理による H3.3-HA の増加は認められなかったため、ヒストン H3 量の減少はヒストン・コア粒子が取り除かれた結果であると考えられる。以上より、亜鉛はヒストン・コア粒子の除去というダイナミックなクロマチン構造の変化を引き起こし、MT-I の転写を活性化すると考えられる。

【参考文献】

- 1) Yong Li, Tomoki Kimura, Ryan W. Huyck, John H. Laity, and Glen K. Andrews, *Mol Cell Biol*, **28**, 4275-4284 (2008).

有機亜鉛錯体によるメタロチオネイン誘導と細胞内亜鉛動態変化

○宇野朋子¹、鈴木美菜子¹、古田雄三¹、磯部正和¹、
佐藤雅彦²、内山真伸³、鍛冶利幸⁴、木村朋紀¹

¹ 摂南大薬、² 愛知学院大薬、³ 東大院薬/理研基幹研、⁴ 東京理科大薬

【目的】亜鉛は様々な生理的役割を担っており、その役割を発揮するためには、種々タンパク質と亜鉛との結合が必要であると考えられる。一方、重金属が重金属結合タンパク質であるメタロチオネイン(MT)の遺伝子発現を活性化する過程において、転写因子 MTF-1 への亜鉛結合やその他のタンパク質への亜鉛の授受など、多くのステップで亜鉛が関わっていることが明らかとなってきた。これらの知見から、我々は、特定のタンパク質に対してのみ亜鉛を授受する化合物・錯体を見出すことが出来れば、特定の細胞機能を変化させることが可能になると考えた。このような化合物・錯体を見出すため、有機亜鉛錯体ライブラリーの中から、MT-I を特異的に誘導する錯体のスクリーニングを行い、その結果、細胞のストレス応答を意味するヘムオキシゲナーゼ-1 (HO-1) 誘導を起こさず MT-I 誘導を起こす有機亜鉛錯体を見出した。そこで本研究では、この有機亜鉛錯体の MTF-1 への亜鉛供給能力を、硫酸亜鉛および、以前からよく知られている有機亜鉛錯体である亜鉛ピリチオン(ZnPy)と比較した。また、MTF-1 以外のタンパク質に亜鉛を供与している可能性を、亜鉛応答性細胞内シグナル伝達系である ERK カスケードに対する有機亜鉛錯体の影響から推察した。

【実験方法】培養細胞として、mouse embryonic fibroblast (MEF)、培地には DMEM-10%FBS を用いた。スクリーニングにより見出した有機亜鉛錯体の MTF-1 への亜鉛供給能力を知るためには、TnT[®] T7 Quick Coupled Transcription/Translation System (Promega 社)により合成した亜鉛非結合型 MTF-1 を用い、MTF-1 結合配列である MRE をプローブとした EMSA 法を行った。有機亜鉛錯体の亜鉛供給能は、*in vitro* で有機亜鉛錯体と亜鉛蛍光プローブ Zinquin (同仁)を混合し、その後の亜鉛結合型 Zinquin への変化に伴う蛍光強度の増加から調べた。また、有機亜鉛錯体の ERK カスケードへの影響は、リン酸化型 ERK の増加をウエスタンブロット法により検出することで調べた。

【結果および考察】スクリーニングにより見出した有機亜鉛錯体の亜鉛供給能を知るために行った蛍光強度測定において、有機亜鉛錯体は硫酸亜鉛に比べ、蛍光強度曲線の急激な立ち上がりが低濃度において認められた。したがって、この有機亜鉛錯体は硫酸亜鉛よりも高い亜鉛供給能を持つと考えられる。また、MTF-1 への亜鉛供給能(MTF-1 活性化能)を調べたところ、ZnPy と同程度の亜鉛供給能力を示した。一方、この有機亜鉛錯体は、培養細胞系においてリン酸化型 ERK を増加する作用も有していたことから、MTF-1 に対してのみ亜鉛を供給するわけではないと考えられた。これらのことから、この有機亜鉛錯体は、細胞にストレスを与えることなく細胞内亜鉛プールを増加していると考えられた。

The role of intracellular zinc in the B-cell receptor signaling pathway

○谷口将济¹、渡辺恵子²、福中彩子²、神野伸一郎²、廣村信²、神戸大朋³、榎本秀一^{1,2}

¹ 岡山大学 大学院医歯薬学総合研究科 (薬学)

² 理研CMI S 複数分子イメージング研究チーム

³ 京都大学 大学院生命科学研究科

Zinc is an essential trace element for the living organisms and contained in many proteins, such as transcriptional factors and enzymes¹⁾. Thus, zinc has a variety function in the cells.

Recently, it was elucidated that intracellular zinc has important function as a signaling factor in dendritic cells. The reduction of the intracellular free zinc concentration is critical for the surface expression of MHC class II of the dendritic cells²⁾. However, it is not understood well about the functions of zinc of B-cell or T-cell, As far as B-cell is concerned, B-cell receptor (BCR) signaling is an essential for the biological outcomes of cell-fate decision that are proliferation, survival and apoptosis. Therefore, the role of intracellular zinc as a signaling factor in the BCR signaling pathway is great significant for the investigation of the participation of zinc to the survival and death of cells. Furthermore, it is expected that development of this study leads to the elucidation of the relationship between zinc and carcinogenesis which is occurred by erratic regulation of the signal transduction.

In this study, we focused on the role of zinc in the BCR signaling pathway. To elucidate zinc function in the BCR signaling, we used DT40 chicken B-lymphocytes (DT40 cells) as a model cells.

First, we evaluated the total tyrosine phosphorylation (p-Tyr) level of wild-type (WT) DT40 cells by zinc stimuli. Cells were starved with RPMI 1640 including 1% chicken serum (without FBS) for 15 hr. After stimulation by zinc, the p-Tyr level of DT40 cells was analyzed by anti-pTyr antibody.

Second, we evaluated phosphorylation of ERK and Akt in the same manner. They belong to MAPK/ERK pathway and PI3K/Akt pathway in the downstream of BCR signaling respectively, and regulate transcription of the protein relating with cell proliferation and apoptosis. From these experiments, it was demonstrated that zinc effects on the phosphorylation levels in BCR signaling.

Finally, we analyzed phosphorylation level of zinc transporters-deficient DT40 cells whether this vicissitude of phosphorylation levels was caused by the changes of intracellular zinc concentration.

From recently reports, zinc transporters, ZnT5, ZnT6, and ZnT7, supply zinc into the lumens of the Golgi apparatus^{3), 4)}, and ZIP9 functions to regulate zinc homeostasis in the secretory pathway by mobilizing zinc out of it⁵⁾. These zinc transporters play an important role of the zinc influx from cytosol to Golgi apparatus, and efflux from Golgi apparatus to cytosol. Thus, we evaluated phosphorylation levels of ZnT5, ZnT6, ZnT7 triple knockout and ZIP9 knockout DT40 cells. In this presentation, we will also deliver about the research for the relationship between phosphorylation and intracellular zinc using zinc transporters-deficient DT40 cells.

Reference

- 1) Vallee B. L., Falck K. H. *Physiol. Rev.* **73**, 79-118 (1993).
- 2) Murakami M., Hirano T. *Cancer Sci.* **99**, 1515-1522 (2008).
- 3) Suzuki T., Ishihara K., Migaki H., and Kambe T., et al. *J. Biol. Chem.* **280**, 637-643 (2005).
- 4) Suzuki T., Ishihara K., Migaki H., and Kambe T., et al. *J. Biol. Chem.* **280**, 30956-30962 (2005).
- 5) Matsuura, W., Yamazaki, T., and Kambe, T., et al. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **73**, 1142-1148 (2009).

肥満・糖尿病モデル動物のメタロミクス研究

○廣村 信¹、金山 洋介¹、本村 信治¹、五十嵐 香織¹、羽場 宏光²、榎本 秀一^{1,3}

¹理研神戸研究所 CMIS 複数分子イメージング研究チーム

²理研和光研究所 仁科加速器研究センター

³岡山大院医歯薬 (薬) 医薬品機能分析学分野

【目的】生体微量元素は生命活動に不可欠なものであるが、疾患発症等において生体微量元素の代謝調節不全が関与していると言われている。肥満・糖尿病は世界中で罹患者数が急増する生活習慣病の一つである。昨今、生活習慣病において生体微量元素の恒常性破綻が知られており、元素の代謝調節に関わる遺伝子・タンパク質等の生体因子同定や、これら代謝調節因子による細胞機能（遺伝子発現、シグナル伝達など）の解明が活発に研究されている。しかしながら、生活習慣病における統合的な生体微量元素の代謝吸収過程については未だ検討されていない。そこで、肥満・糖尿病モデルマウスにおける生体微量元素の変化について、マルチトレーサー法¹および複数分子同時イメージング装置 GREI^{2,3}を用いて研究を行った。

【実験方法】

肥満・糖尿病モデル動物として、高脂肪食を与えた C57B/6J マウスを用いた。コントロールマウスには通常食を用いた。飼育期間中、体重測定、血糖値の測定によるモニタリングを行った。高脂肪食負荷後、20 週目において糖負荷試験を行った。このモデルマウスに、理研・仁科加速器研究センターが所有するリングサイクロトロンを用い、Au 箔ターゲットを使用して製造したマルチトレーサーを尾静脈から投与した。投与後、6 時間、12 時間の組織を摘出し、高純度 Ge 半導体検出器を用いて、組織への RI の取り込みを測定した。また、複数分子同時イメージング装置 GREI を用いて、⁵⁴Mn, ⁶⁵Zn, ⁸⁵Sr の体内動態を 12 時間撮像し、3 核種の *in vivo* イメージングを行った。

【結果および考察】

マルチトレーサー実験による組織中の RI 取り込み実験から、コントロールマウスの脾臓、脂肪組織では、Zn, Mn などの生体微量元素の時間依存的な取り込みが見られたが、肥満・糖尿病モデルマウスでは時間依存的な取り込みは見られなかった。一方、肥満・糖尿病モデルマウスの心臓における RI の取り込みについて、Sr がコントロールマウスよりも顕著に取り込まれており、この代謝過程は GREI による *in vivo* イメージングによっても追跡できた。

本フォーラムでは、各組織における RI 取り込みや GREI を使ったイメージングについても報告する。

【参考文献】

- 1) Enomoto S. Biomed. Res. Trace Elements **16**, 233-240 (2005).
- 2) Motomura S, Enomoto S, Haba H, Igarashi K, Gono Y, Yano Y. *IEEE Trans. Nucl. Sci.* **54**, 710-717 (2007).
- 3) Motomura S, Kanayama Y, Haba H, Watanabe Y, Enomoto S. *J. Anal. At. Spectrom.* **23**, 1089-1092 (2008).

四塩化炭素によるマウス肝障害に対する亜鉛錯体の防御効果と

3'-AMP 産生酵素活性の変動

○宮本晃洋、竹下実耶子、青野奈保美、久保尚子、藤森廣幸
摂南大学薬学部 毒性学研究室

【目的】四塩化炭素は、チトクロム P450 酵素 CYP2E1 により代謝され肝障害を引き起こすが、亜鉛によりその障害が減弱されることが知られている。我々は、ミトコンドリア画分に多量に含まれるリボヌクレアーゼの一種であり、亜鉛イオンに感受性のある adenosine 3'-monophosphate (3'-AMP) 産生酵素活性が四塩化炭素により変動することを見いだした¹⁾。3'-AMP およびその産生酵素の生体内意義解明の一端として本研究では、四塩化炭素誘発性急性肝炎マウスを用いて、糖尿病治療薬として研究が進んでいる亜鉛錯体 Bis(picolinate)zinc の肝障害防御効果および 3'-AMP 産生酵素の活性変動について報告する。

【実験方法】4 週齢の ICR 系雄マウスに、亜鉛錯体 (5 mg Zn²⁺/kg) を 3 日間腹腔内投与した。最後の亜鉛投与から 24 時間後に四塩化炭素 (400 μL/kg) を腹腔内投与し、その 24 時間後に肝臓を摘出し、遠心分画法によりミトコンドリア画分、細胞質画分及びミクロソーム画分を得た。肝障害の指標は肝細胞より漏出した血清 ALT 活性をトランスアミナーゼ CII テストワコーを用いて測定した。ミクロソーム画分の CYP2E1 活性は、*p*-nitrophenol 水酸化活性によって測定した。3'-AMP 産生酵素活性は、基質 poly(A) を用い、生じた 3'-AMP をクロロアセトアルデヒドで標識し、蛍光 HPLC で分離定量した。

【結果および考察】四塩化炭素 4、40、400 μL/kg を投与すると、投与後 24 時間後において、用量依存的に ALT 活性が上昇した。四塩化炭素 400 μL/kg 投与で経時変化をみると、24 時間後に ALT 活性の上昇がピークに達し、1 週間後には対照群と同程度の活性であった。四塩化炭素による CYP2E1 活性の減少および TBARS 値 (脂質過酸化の指標) の上昇も 24 時間でピークを示した。24 時間後のミトコンドリア画分の 3'-AMP 産生酵素活性は減少し、サイトゾル画分の同活性は上昇した。次に、亜鉛錯体で前処理した場合、四塩化炭素 400 μL/kg 投与後 24 時間の ALT 活性は、四塩化炭素群に比べて約 50% に減少し、同時に HE 染色により組織変化をみると小葉中心性の壊死面積が約 70% に減少した。亜鉛錯体の肝毒性抑制効果 (ALT 活性の上昇抑制) は、亜鉛キレート剤 TPEN 前処理によって相殺された。四塩化炭素によるミトコンドリア画分の 3'-AMP 産生酵素活性減少は、亜鉛錯体により抑制されたが、TPEN により相殺される傾向が認められた。

以上の結果より、亜鉛錯体は四塩化炭素誘発性肝障害防御効果を有すること及び肝障害の程度とミトコンドリアの 3'-AMP 産生酵素活性の変動に関連がある可能性が示唆された。

【参考文献】

- 1) Hiroyuki Fujimori and Hidemitsu Pan-Hou, *J. Health. Sci.*, **48**, 204-207 (2002).

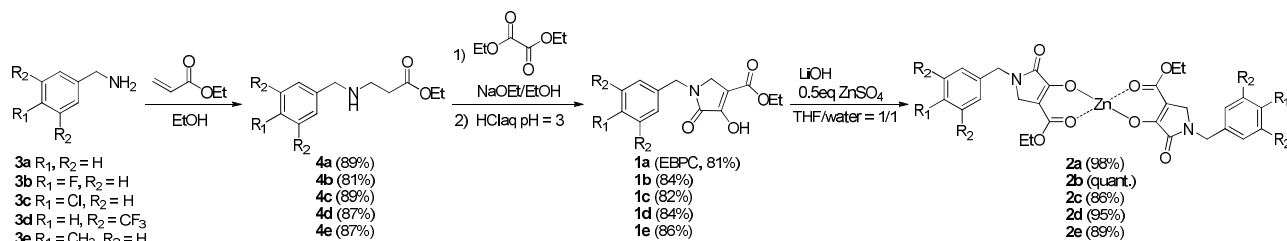
糖尿病合併症治療薬候補化合物を配位子とした 亜鉛錯体の合成とインスリン様活性評価

齋藤良太,^{1,2} 河原田光,¹ 吉川豊,³ 安井裕之³

¹東邦大理、²東邦大複合物性研究セ、³京都薬科大

【目的】近年、インスリン注射に代わる経口投与可能な糖尿病治療薬候補として、複素環化合物を配位子に用いた亜鉛錯体が注目されている。一方、糖尿病合併症は、ポリオール代謝経路にあるアルドース還元酵素 (AR) の活性化により、細胞内のソルビトールの濃度上昇や NADPH の過剰消費によって引き起こされる。そのため、AR の活性を阻害することは合併症の抑制につながると考えられている。1991年に、AR阻害剤の候補として Ethyl 1-benzyl-2,5-dihydro-4-hydroxy-5-oxo-1*H*-pyrrole-3-carboxylate (EBPC, **1a**) が報告された。¹⁾ EBPC は、金属と配位可能な酸素原子を有しており、その亜鉛錯体は糖尿病と糖尿病合併症の同時治療薬となることが期待されるが、そのような検討例はない。そこで、本研究では EBPC を配位子に用いた亜鉛錯体の合成とそれらの *in vitro* インスリン様活性評価を行った。

【合成】合成は、以下の Scheme に従って行った。



Scheme

【結果】亜鉛錯体 **2a-e** は容易に合成でき、高収率で得ることが出来た。**2a** の X 線結晶構造解析により、亜鉛錯体は、歪んだ八面体型で、配位子は 4 位の水酸基と 3 位のエステルカルボニルの酸素で配位し、互いにエクアトリアル平面上にありトランス型で配位していることが分かった (Fig. 1)。**2a-e** の *in vitro* インスリン様活性は、エピネフリンで刺激したラット脂肪細胞からの遊離脂肪酸 (FFA) の放出を 50% 阻害する濃度 (IC₅₀) で評価した (Table1)。**2a-c, e** はいずれもインスリン様活性を示し、ZnSO₄ よりも高い活性を示した。

【参考文献】

1) Banavara, L. M.; Thomas, A. B.; Todd, W. S. *J. Med. Chem.* **1991**, *34*, 1011-1018.

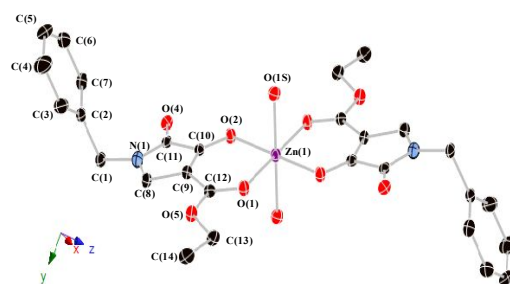


Fig. 1 ORTEP diagram of complex **2a**

Table1 IC₅₀ values (mM) of **2a-e**

Complex	IC ₅₀ value (mM)
2a	0.27
2b	0.46
2c	0.51
2d	0.82 ^a
2e	0.26
ZnSO ₄	0.7-1.0

^a: a precipitates formed during the assay

アミノ酸の亜鉛錯体の糖尿病病態改善効果に関する研究

○藤井嵩子¹、松本衣代²、小坂晃代¹、金山幸子¹、谷口洋^{2,4}、吉川豊³、安井裕之³、梶原苗美^{1,2}

¹神戸女子大学大学院家政学研究科食物栄養学専攻、

²神戸女子大学健康福祉学部、³京都薬科大学代謝分析学、⁴大和生活習慣病研究所

【目的】

亜鉛錯体は、配位子独自の生理活性の付加により更なる栄養生理学的有効性が期待される。そこで、アミノ酸 (Ser、Thr、Arg、Gly、Pro、Val、Gln、Tyr、Met、Ala、Cys、Lys、Trp、Leu、Phe、Ile、His) を配位子とした亜鉛錯体を合成し、ラットの脂肪細胞を用いてインスリン作用を評価した。さらに、比較的高いインスリン作用が認められた Zn(Ser)₂、Zn(Thr)₂、については 2 型糖尿病モデルマウス (KK-A^y) を用いて糖尿病病態改善効果について検討した。

【実験方法】

<Exp.1>7 週齢の Wistar 系雄性ラットの副睾丸周囲脂肪組織から分離した脂肪細胞液に、Glu/Zn (ポジティブコントロール) 又は各種アミノ酸の亜鉛(II)錯体を添加し、エピネフリンとともにインキュベーション後、放出される FFA 量を測定した。FFA 放出抑制の評価は、脂肪細胞からの脂肪酸の遊離を 50%抑制する化合物の濃度 (IC₅₀) で評価し、Glu/Zn と比較した。

<Exp.2>FFA 放出抑制効果によるインスリン様作用評価試験が Glu/Zn と同程度であった Zn(Ser)₂ と Zn(Thr)₂ を KK-A^y マウスに 9 週齢より 14 日間経口ゾンデ投与し、Glu/Zn 及び亜鉛錯体非投与群 (control 群) と比較した。投与期間中これらの動物の体重、摂食量、午前 10 時血糖値を 1 日 1 回測定した。投与後、経口糖負荷試験を実施した後、剖検し一般血液性状などの測定を行った。

【結果および考察】

<Exp.1>ラット脂肪細胞を用いたインスリン様活性評価では、Glu/Zn と比べ、Zn(Ser)₂ では 129%、Zn(Thr)₂ では 95%と高い活性が認められ、次いで Zn(Gly)₂、Zn(Arg)₂ で各々約 70%の有効性が認められた。<Exp.2>腹腔内脂肪蓄積 (腎周囲脂肪、生殖器周囲脂肪、後腹壁脂肪および腸間膜周囲脂肪) の分布状況を比較したところ体重に差は見られなかったにも関わらず、いずれの部位でも control 群に比べて、亜鉛錯体投与群で減少または減少傾向を示した。また、投与期間中の血糖値の推移および投与終了時の経口糖負荷試験から、亜鉛錯体投与群は control 群と比較して血糖値の上昇が抑制される傾向が認められた。血清 TG 濃度は control 群に比べ亜鉛錯体投与群において低下傾向を示した。

以上、アミノ酸の亜鉛錯体の糖尿病病態改善効果を調べたところ、*in vitro* の試験でインスリン様作用が認められたセリン (Ser) 及びスレオニン (Thr) の亜鉛錯体は、2 型糖尿病モデルマウスに対する投与実験において耐糖能改善効果及び内臓脂肪蓄積予防効果を有することが示唆された。

【参考文献】

- 1) Yoshikawa Y., Kojima Y.: Anti-Diabetic Effect of Zn(II) complexes(1); From basic research to practical application. *FFIJ*. 209, 94-102(2004).

ビタミン類の亜鉛錯体の
抗メタボリックシンドローム作用に関する研究

○松本衣代¹⁾、本保奈緒²⁾、世良享子²⁾、藤井嵩子²⁾、吉川豊³⁾、
安井裕之³⁾、谷口洋¹⁾⁴⁾、梶原苗美¹⁾²⁾

¹⁾ 神戸女子大学健康福祉学部健康スポーツ栄養学科、

²⁾ 神戸女子大学大学院家政学研究科食物栄養学専攻、³⁾ 京都薬科大学代謝分析学教室

⁴⁾ 大和生活習慣病研究所

【目的】亜鉛錯体は、亜鉛イオンより低容量で高活性な亜鉛化合物であり、リガンドの選択により糖尿病を始めとする生活習慣病の更なる病態改善効果が期待されている¹⁾。そこで、本実験では、生理的に重要なビタミン類としてビタミンC、カルニチン、ビタミンUをリガンドとした亜鉛錯体を作成し、これら亜鉛錯体の栄養生理学的機能特性について検討した。

【方法】Exp.1 ラット副睾丸周囲の脂肪細胞を用いた、インスリン様作用の評価を行った。即ち、エピネフリン刺激による遊離脂肪酸(FFA)の放出を50%抑制する亜鉛錯体の濃度(IC₅₀値)で評価した。Exp.2 Wistar系雄性ラットの高果糖食飼育によりメタボリックシンドローム病態モデル動物を作製し、各ビタミン類の亜鉛錯体混合食を5週間自由摂取させ(40mg Zn/kg b.w./日)、体重、腹腔内脂肪量、血液生化学的指標ならびに血液流動性(微小循環モデル装置 MC-FAN 法：日立原町電子工業(株)、東京)について比較検討した。Exp.3 高血圧自然発症ラット(SHR)にこれらの錯体を7週間投与し(40mg Zn/kg b.w./日)、血圧への影響を調べた。

【結果および考察】Exp.1 ラット脂肪細胞を用いた *in vitro* の実験系でいずれのビタミン類の亜鉛錯体群においてもポジティブコントロールであるグルコン酸亜鉛(Glu/Zn)の IC₅₀ を1とした相対値 (Relative IC₅₀ 値)は有意に低値を示し、インスリン様活性が認められた。

Exp.2 Vu/Zn、Car/Zn 群の体重増加抑制あるいは抑制傾向観察され、腸間膜脂肪重量においても Car/Zn 群は抑制傾向、Vu/Zn 群は有意な低値を示した。血液流動性試験では、いずれの実験群においてもコントロール群に比較して血液流動性亢進傾向が観察され、特に Vc/Zn 群で、その傾向は顕著であった。

Exp.3 各ビタミン類の亜鉛錯体で統計学的有意差は見られなかったが、SHR の血圧上昇抑制傾向が観察された。

以上の結果より、ビタミンC、ビタミンU、カルニチンの各ビタミン類をリガンドとした亜鉛錯体 (Vc/Zn、Vu/Zn、Car/Zn) は、インスリン様作用を示し、内臓脂肪蓄積を抑制し、血液流動性を改善する事でメタボリックシンドロームの病態を改善する可能性が示唆された。

【参考文献】

1) K.Matsumoto, H.Hashimoto, et.al.; *J Hemoreology and Related Research*, 7 3-14, (2005)

新規亜鉛高含有食品としてのパパイア粉末／亜鉛(Ⅱ)錯体の抗糖尿病効果

○世良享子¹⁾、本保奈緒¹⁾、松本衣代²⁾、藤井嵩子¹⁾、吉川豊³⁾、
安井裕之³⁾、谷口洋²⁾⁴⁾、小嶋良種⁵⁾、梶原苗美¹⁾²⁾

¹⁾神戸女子大学大学院家政学研究科食物栄養学専攻、²⁾神戸女子大学健康福祉学部、
³⁾京都薬科大学代謝分析学教室、⁴⁾大和生生活習慣病研究所、⁵⁾株式会社アガベ

【目的】

我々はこれまで種々の食品成分の亜鉛錯体の栄養生理学的効果について報告している。高亜鉛含有食品である中国産パパイア粉末の亜鉛錯体(C-Pa/Zn)が、動物実験で高い抗糖尿病効果を示すことを認めた¹⁾。最近、C-Pa/Znよりも水溶性の高いメキシコ産パパイア粉末の亜鉛錯体(M-pa/Zn)が開発された²⁾。そこで、M-pa/Znのインスリン様作用測定(*in vitro*)及び2型糖尿病モデルマウス(KK-A^y)への投与試験(*in vivo*)を行った。

【実験方法】

Exp. 1: インスリン様作用の評価は Nakai らの方法に基づいて行った³⁾。即ち、ラット副睾丸周辺の脂肪細胞をエピネフリンで刺激し、放出される遊離脂肪酸(FFA)を50%抑制する亜鉛錯体の濃度をIC₅₀値で表し、グルコン酸亜鉛(Glu/Zn)のIC₅₀値を1とした相対値(Relative IC₅₀値)で示した。

Exp. 2: 5週齢のKK-A^yマウスに、M-pa/Zn、Glu/Zn、錯体リガンドとしてメキシコ産パパイア粉末(M-pa)を経口投与した(第1~3週目は隔日投与、第4~6週目は連日投与)。実験期間中、これら動物の体重、摂食・摂水量、午前血糖値測定及び尿検査を行い、実験第5週目に糖負荷試験(OGTT)を行った。第6週目、糖化ヘモグロビン(HbA_{1c})濃度測定後、剖検、一般血液性状、血液生化学性状の分析を行った。

【結果および考察】

インスリン様作用測定試験では、M-pa/Znは、Glu/Zn、C-pa/Znいずれよりも高い活性を示した(Exp. 1)。また、KK-A^yへの投与試験では、体重増加、血糖値上昇、腹腔内脂肪量、血清TG値は、亜鉛非投与群(control、M-pa)と比較し、亜鉛投与群(M-pa/Zn、Glu/Zn)で有意に低値を示した。さらに、HbA_{1c}濃度においても、亜鉛非投与群と比較し、亜鉛投与群で有意に低値を示し、長期にわたり血糖値コントロールが維持されていた可能性が示唆された。OGTT、インスリン抵抗性と関連する内臓脂肪量(腸間膜周囲脂肪量)は、M-pa/Zn群のみ、control群と比較し、有意に低値であった(Exp. 2)。

以上の結果より、メキシコ産パパイア粉末の亜鉛錯体(M-pa/Zn)が抗糖尿病作用を有することが確認された。

【参考文献】

- 1) Matsumoto K. *et al.*: *Biomed. Res. Trace Elements*, **17**(1), 25-29 (2006).
- 2) Kojima Y. *et al.*: *Research on gluconate*, 2-15 (2008).
- 3) Nakai M. *et al.*: *Biol. Pharm. Bull.*, **18**(5), 719-725 (1995).

血糖降下作用を有する亜鉛錯体の体内動態解析

○邑上裕紀、吉川 豊、安井裕之
京都薬科大学 代謝分析学分野

【目的】近年、亜鉛錯体が高い血糖降下作用を有する化合物として、糖尿病治療薬の創製を目標とした応用研究が盛んに行われている。本研究室では、亜鉛錯体の配位子を構造変換し、活性評価を行うことにより高活性亜鉛錯体の探索研究を行ってきた。しかし、亜鉛イオンが錯体化することによって、あるいは、配位子の違いによって活性が変化する原因は十分には理解されていない。本研究では、血糖降下作用を有するピストロポロナートジンク ($\text{Zn}(\text{trp})_2$) の消化管吸収性、組織移行性および血中滞留性等に着目し、亜鉛錯体の体内動態と薬効との関連性を ^{65}Zn トレーサー法を用いた血中動態解析を行うことにより検討した。

【実験方法】市販の $^{65}\text{ZnCl}_2$ と非標識の $\text{Zn}(\text{trp})_2$ を混合することにより、標識した $^{65}\text{Zn}(\text{trp})_2$ を調製した。8~12 時間以上絶食した雄性 Wistar 系ラットに、 $^{65}\text{Zn}(\text{trp})_2$ および $^{65}\text{ZnCl}_2$ をそれぞれ静脈内投与 ($10 \mu\text{Ci}/1 \text{ mg Zn}/0.2 \text{ mL/kg}$) および単回経口投与 ($10 \mu\text{Ci}/10 \text{ mg Zn}/2 \text{ mL/kg}$) し、頸静脈から経時的に採血した。さらに、経口投与 24 時間後に脱血死させ、肝臓、腎臓、筋肉 (大腿部)、脂肪組織 (副睾丸周辺部)、膵臓、骨 (大腿部)、および脳を採取した。採取した血液および各種臓器から放出される γ 線 (0~2000 keV) の強度を NaI (TI) シンチレーションカウンターにより定量した。

【結果】1 mg Zn/kg の用量で放射性標識した ZnCl_2 および $\text{Zn}(\text{trp})_2$ を静脈内投与すると、いずれの場合も血中亜鉛濃度は二相性の減少を示した。定常状態における分布容積 $V_{d_{ss}}$ は、 ZnCl_2 において 0.63 L/kg 、 $\text{Zn}(\text{trp})_2$ において 0.35 L/kg であり、錯体化することにより分布容積は減少した。また、錯体化することにより CL_{tot} は有意に低下し、平均滞留時間 MRT は有意に増加した。

10 mg Zn/kg の用量で放射性標識した ZnCl_2 および $\text{Zn}(\text{trp})_2$ を経口投与すると、血中亜鉛濃度は錯体化することにより C_{max} の増加と t_{max} の延長が認められた。また、Zn の吸収率は ZnCl_2 において 62 %、 $\text{Zn}(\text{trp})_2$ において 72 %であった。経口投与後 24 時間における組織中亜鉛濃度の増加は ZnCl_2 投与時に比べて $\text{Zn}(\text{trp})_2$ 投与時に筋肉中で有意に増加していた。その他の臓器中亜鉛濃度も増加傾向であったが、有意差 ($p < 0.05$) は認められなかった。

【考察】組織中亜鉛濃度は筋組織中においてのみ、 $\text{Zn}(\text{trp})_2$ 投与によって ZnCl_2 より有意に増加しており、本錯体の標的臓器は筋組織であることが示唆された。また、 $\text{Zn}(\text{trp})_2$ は ZnCl_2 に比べて分布容積が減少していたことより、全身的な組織移行性は ZnCl_2 の方が高いことが示唆された。一方、経口投与での吸収率は $\text{Zn}(\text{trp})_2$ の方が優位であった。以上の結果から、 $\text{Zn}(\text{trp})_2$ は全身的な組織移行性が低下する一方で、血中亜鉛濃度をより高く、かつより長く維持することが見いだされた。この動態特性に基づいて、結果的に $\text{Zn}(\text{trp})_2$ 投与後の筋組織中亜鉛濃度の増加量が高値を示し、作用発現に至ることが示唆された。

2-メルカプトピリジン-*N*-オキシドを配位子にもつ金属錯体の抗糖尿病作用○吉川豊¹、村山彰人¹、安達祐介¹、桜井弘²、安井裕之¹¹京都薬科大学 代謝分析学分野²鈴鹿医療科学大学 薬学部

【目的】生活習慣病として位置づけられている糖尿病の患者数は増加の一途をたどっており、副作用の少ない医薬品の開発が急務である。また、現在の日本において、医療費削減が大きな課題であり、予防医学の重要性もまた、注目を浴びている。そこで、糖尿病の予防薬としても期待でき、更に経口投与で血糖降下作用を併せ持つ、金属錯体の開発を試みることにした。これまでに、亜鉛イオンやバナジウムイオンが血糖降下作用を有することが知られているが、その作用発現には高用量が必要であった。そこで我々は、金属を効率的に輸送できる事が知られている、2-メルカプトピリジン-*N*-オキシド (mpno) を配位子に用い、より低用量で薬理作用を発揮できる金属錯体を合成し、ラット脂肪細胞を用いた *in vitro* 実験や2型糖尿病モデル動物の KK-A^y マウスを用いた *in vivo* 実験を行い、その評価を行った。

【実験方法】 mpno を配位子にもつ各種金属錯体は、文献の方法に基づき合成し¹⁾、インスリン様作用および血糖降下作用への影響を検討するため、以下の実験を行った。

1. 脂肪細胞におけるインスリン様作用²⁾: Wistar 系雄性ラットの脂肪細胞をエピネフリンで刺激し、放出される遊離脂肪酸 (FFA) を 50% 抑制する濃度を IC₅₀ 値として評価した。
2. 血糖降下作用: 1 の結果から、高いインスリン様作用を示す金属錯体を選び、KK-A^y マウスに 17 日間連続経口投与した。投与期間中は血糖値・体重・摂食量・摂水量をモニターし、投与終了後には経口糖負荷試験ならびに採血により得られた血清から、各種生化学パラメータの測定を行い、抗糖尿病作用の評価を行った。

【結果および考察】 合成した錯体は、mpno : 金属 = 2 : 1 で結合している事が、元素分析や質量分析の結果から推測された。mpno を配位子とし、バナジウム、マンガン、鉄、コバルト、ニッケル、銅、および亜鉛を含有する錯体のインスリン様作用を評価したところ亜鉛錯体が最も強い効果を有する事が分かった。そこで、Zn(mpno)₂ を KK-A^y マウスに 17 日間連続経口投与し、血糖値、体重、および各種血液パラメータを測定したところ、本錯体は血糖降下作用のみならず、高インスリン血症、高レプチン血症および低アディポネクチン血症を改善させた。さらに本錯体の経口投与は、糖尿病状態で減少していた組織中の亜鉛レベルを正常域にまで回復させ、血清中の総過酸化脂質量の上昇傾向を抑制したため、Zn(mpno)₂ は糖尿病合併症予防効果も有することが示唆された。本錯体は、経口投与可能な2型糖尿病治療薬の候補になると期待される。

【参考文献】

- 1) Basuki W., Hiromura M., Sakurai H., *J. Inorg. Biochem.*, **101**, 692 (2007).
- 2) Nakai M., Watanabe H., Fujisawa C., *et al.*, *Biol. Pharm. Bull.*, **27**, 789 (1995).

レアメタル資源回収システムの開発を目指した新奇金属代謝微生物の研究

○谷 泰史¹、道本麻衣²、斎藤茂樹¹、三原久明²

¹立命館大学グローバルイノベーション研究機構、²立命館大学生命科学部生物工学科

【目的】

ニッケル、クロム、マンガン、インジウム、ストロンチウムおよびバナジウムなどのレアメタルは、電子機器や医療などの分野で利用され、日本の産業を支えるハイテクノロジー機器の基盤となる不可欠な資源である。日本はレアメタルを世界の中で最も多く使用している。しかし、近年では世界におけるレアメタルの急激な需要拡大によって、この5年ほどで価格が2倍～8倍にまで高騰したレアメタルもあり、レアメタルの確保と安定供給が国策の急務となっている。日本では、廃棄電子基板など、いわゆる都市鉱山に大量のレアメタルが埋もれており、化学処理によるレアメタル資源回収が行われている。しかし、化学処理では対処できない多種多様なレアメタル含有廃材も多いことから、微生物を用いたレアメタルの効率的回収技術の開発が望まれている。本研究では、レアメタルを含む種々の金属による汚染地域などに棲息する金属代謝微生物を採集し、それらが有する金属代謝能を活用して、レアメタル汚染の浄化およびレアメタル資源回収のシステムを開発することを目指す。

【実験方法】

金属代謝微生物のスクリーニングでは、足尾銅山、日本海溝および内モンゴル地域から採取した土壌サンプルから微生物を分離し、得られた微生物を各々20 mM 酸化インジウム、酸化鉄、炭酸ストロンチウム、酸化バナジウムおよび酸化スズ含有 YPG 培地のプレート上にて30°Cで培養した。金属含有プレートにて単離した細菌およびカビは、ビーズ・フェノール法を用いたゲノム抽出およびシーケンシング解析を経て、16S rDNA または 18S rDNA の配列解析による系統解析を行った。さらに、目新しい特徴を示す微生物は、その分子機構を解明するために生化学的手法を用いて解析を行った。

【結果および考察】

土壌から分離した菌株の中には、培地の金属種に依存して異なる表現型を示すものが認められた。ある特定の金属が特定の微生物の生育にとって重要な役割を担っている可能性が考えられた。また、菌株のリボソーム RNA 遺伝子配列解析の結果、*Pseudomonas species*、*Halomonas species* および *Thalassospira species* などの微生物が分離菌として得られたことが明らかとなった。これらの微生物種には、既に重金属浄化作用を持つことが示されている菌株もある。さらに、炭酸ストロンチウム含有プレートにて、炭酸ストロンチウムを可溶化する新奇な特徴をもつ菌株を単離することに成功した。

紫外線による皮膚障害を抑制するサリチル酸誘導体-Mn(II) 錯体の開発

○重村文音、吉川 豊、安井裕之
京都薬科大学 代謝分析学分野

【緒言】紫外線により皮膚で誘導される活性酸素種 (ROS : 一重項酸素 $^1\text{O}_2$ 、スーパーオキシドアニオンラジカル $\cdot\text{O}_2^-$ 、過酸化水素 H_2O_2 、ヒドロキシラジカル $\cdot\text{OH}$ 、過酸化脂質ラジカル $\text{LOO}\cdot$ など) により細胞膜の脂質が過酸化を受け、光老化や皮膚障害の原因となることが明らかとなり、それらに対抗する抗酸化物質が注目を集めている。そこで新規の抗酸化剤としてサリチル酸誘導体-Mn(II) 錯体を合成し、*in vitro* における ROS 消去活性を評価した。さらに、皮膚障害の抑制作用や美白効果への応用を目指して、今回はチロシナーゼの阻害活性を評価した。

【実験方法】

1) 錯体合成 ; サリチル酸誘導体と MnSO_4 をアルカリ条件下で配位子 : 金属 = 2 : 1 のモル比で混合させ、窒素気流下で数時間攪拌した。析出した BaSO_4 を濾過後、濾液を完全濃縮した。得られた錯体の化学構造は赤外吸収スペクトルと元素分析から推定した (Fig. 1)。

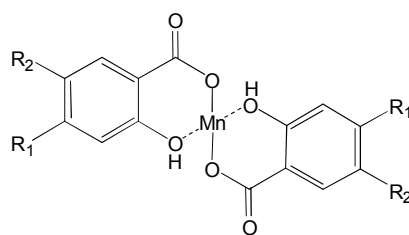
2) In vitro ROS 消去活性 ; Cytochrome c 還元法、Trinder 法、ESR スピントラップ法および ORAC 法により $\cdot\text{O}_2^-$ 、 H_2O_2 、 $\cdot\text{OH}$ および $\text{ROO}\cdot$ に対する Mn(II) 錯体の消去活性をそれぞれ測定した。

3) チロシナーゼ阻害活性 ; 各濃度のサンプル溶液にチロシナーゼを添加し、予備加温後、L-DOPA を添加し反応させた。反応終了後、492 nm におけるドーパクロムの吸光度を測定した。

【結果・考察】

- 錯体はすべて配位子と金属が 2 : 1 で結合し、中心金属の Mn は 2 価であると推定した。
- $\cdot\text{O}_2^-$ と $\cdot\text{OH}$ に対する消去活性は Mn(II) イオンと Mn(II) 錯体の間で差が見られなかった。また、すべての錯体は XOD に対する阻害活性を示さなかったため、錯体による消去活性は $\cdot\text{O}_2^-$ の捕捉によるものと示唆された。 H_2O_2 に対する消去活性は $\text{Mn}(\text{5asa})_2$ が最も高く、これは配位子である 5asa の効果によるものと考えられた。 $\text{ROO}\cdot$ に対しては $\text{Mn}(\text{5asa})_2$ 、 $\text{Mn}(\text{4asa})_2$ および $\text{Mn}(\text{5msa})_2$ が Mn(II) イオンより高い消去活性を示した。
- 対照として用いたコウジ酸の活性には及ばないものの、 $\text{Mn}(\text{4asa})_2$ 、 $\text{Mn}(\text{4msa})_2$ および $\text{Mn}(\text{sal})_2$ にチロシナーゼ阻害活性が見出された。

本研究で用いたサリチル酸誘導体-Mn(II) 錯体は全ての ROS に対する消去効果を持つことが見出された。特に $\text{ROO}\cdot$ に関して、錯体化による促進効果が確認されたため、皮膚への応用は有望であると考えられる。今後は、他の皮膚老化関連酵素に対する活性を測定するほか、*in vivo* での効果を検討していく予定である。



	R ₁	R ₂
Mn(sal) ₂	H	H
Mn(4msa) ₂	OCH ₃	H
Mn(5msa) ₂	H	OCH ₃
Mn(4asa) ₂	NH ₂	H
Mn(5asa) ₂	H	NH ₂

Fig. 1 Chemical structures of salicylic acid derivatives-Mn complexes

生体模倣不斉触媒を目指したピロリジン含有配位子の開発

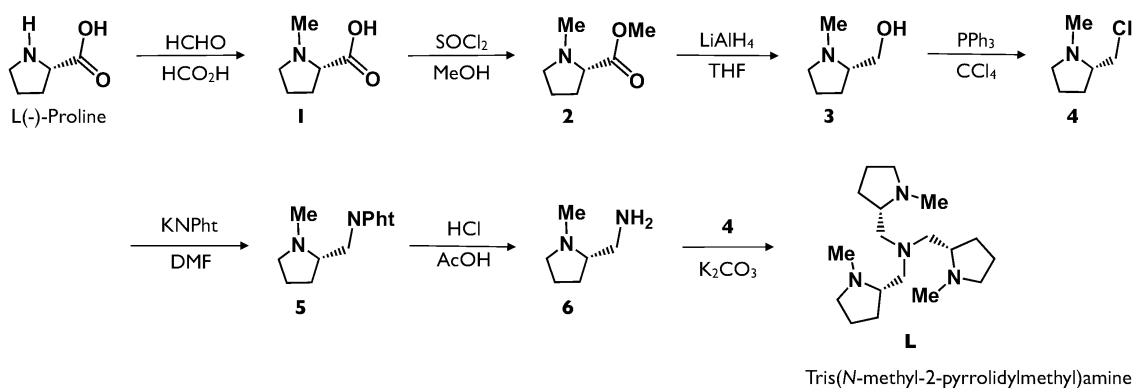
○大野 雄己、森本 善樹、舘 祥光*

大阪市立大学大学院理学研究科

【目的】生物無機化学の分野では酵素の構造と機能を解明するために、これまでに数多くの金属錯体が合成され、この金属錯体と酸素分子を反応させて得られる酸素錯体に関して分光学的、構造的な研究が精力的に展開されてきた¹⁾⁻³⁾。我々は特に興味深い酵素反応を行う、鉄または銅含有酵素の反応とそのモデル錯体¹⁾⁻³⁾に注目した。さらに工業的な応用を目指し、不斉源を導入した配位子を用いて金属錯体を合成し、付加価値の高い化合物を合成するための不斉合成触媒への応用を目的とした。本研究では、第一段階として、配位子の設計と不斉源の導入法から配位子の合成経路を確立すること、及び金属錯体を調製し、錯体の構造と反応性の確認を目的として研究を行っている。

【実験方法】配位子の合成を検討した。L(-)-プロリンを出発物質とした合成経路を検討中である。N-アルキル化(1)に続き、SOCl₂/MeOHでエステル化した(2)、LiAlH₄を用いて還元後(3)、ハロゲン化(4)を行った。この後、2-ピロリジルメチルアミン(6)と2-ピロリジルメチルクロライド(4)をカップリングすることで、目的のピロリジン含有配位子(L)を合成することが出来る。合成中間体は各種分光法を用いて構造を確認した。

合成スキーム



【結果および考察】配位子合成では、比較的簡便で比較的良好な収率で合成できる経路で合成を行った。配位子の合成中間体の¹H NMRにより構造を確認することができた。次の段階として鉄または銅の金属錯体を調製し、酸素分子との反応、基質との酸化反応を検討していく計画である。

【参考文献】

- 1) M. Costas, K. Chen, L. Que, Jr., *Coord. Chem. Rev.* **2000**, *200*, 517-54.
- 2) M. Costas, A. Tipton, K. Chen, D. Jo, L. Que, Jr., *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 6722-23.
- 3) K. Chen, L. Que, Jr., *Chem. Commun.* **1999**, 1375-76.

マルチ ROS スカベンジャーである Mn(III)サレン錯体 EUK-134 のインビボ紫外線障害抑制作用

○安井裕之、石井哉好、吉川 豊
京都薬科大学 代謝分析学分野

【緒言】オゾンホールが発生によってもたらされた地球上に降り注ぐ紫外線照射量の増加は、皮膚障害、若年の皮膚光老化、および皮膚ガンなどの発症原因となっている。皮膚に対する紫外線の毒性は、活性酸素種 (ROS) の生成と密接に関係することが明らかとなっている。紫外線により惹起される皮膚障害や光老化から皮膚を保護するため、ラジカルスカベンジャーや抗酸化剤が多くの研究者らによって見出されてきた。皮膚障害に有効な化合物には、Mn イオン、Cu²⁺、もしくは Zn²⁺ を活性中心に含んだ金属錯体も存在する。それらの中で、Mn³⁺ とサレン誘導体による錯体である EUK-134 (chloro[[2,2'-(1,2-ethanediylbis[(nitriilo-κN)methylidyne]]bis[6-methoxyphenolato-κO]](2⁻))] は、代表的な ROS であるスーパーオキシドアニオンラジカル・O₂⁻ や過酸化水素 H₂O₂ を触媒的に消去する SOD ミミックおよび catalase ミミックとしての有効性が広く知られている¹⁾。そこで、・O₂⁻ や H₂O₂ に加えて、他の酸素ラジカル (・OH、ROO・) や脂質過酸化 (LPO) に関する EUK-134 の消去活性を化学系で検討した。さらに、EUK-134 を予め皮膚に塗布し、UVA を照射したヘアレスマウスの皮膚で生成する ROS に対する消去効果、および炎症に対する抑制効果をインビボ系で調べた。

【実験方法】1) in vitro ROS 消去活性: Cytochrome c 還元法、Trinder 法、ESR spin-trapping 法、ORAC 法およびラット肝ミクロソームを用いた TBARS 法により、・O₂⁻、H₂O₂、・OH、ROO・および LPO に対する EUK-134 の消去活性をそれぞれ測定し、その活性を標準化合物と比較した。

2) in vivo ROS 消去活性: ROS 検出用の化学発光プローブである CLA を麻酔下のヘアレスマウスの腹部皮膚に塗布した後に UVA を照射し、微弱光検出装置 NightOWL を用いて ROS 由来の化学発光強度をリアルタイムで二次元画像として観測した²⁾。また、UVA 照射後のマウス皮膚で発生する炎症を経日的に観測し、紅斑部分の面積値で評価した。EUK-134 を予め塗布したマウスの皮膚を同様に観測し、インビボ系における ROS 消去効果および炎症に対する抑制効果を定量的に評価した。

【結果】1) EUK-134 は LPO 抑制活性を含め、全ての酸素ラジカルに対する消去活性を示した。誘導体と活性を比較した結果、EUK-134 は・OH に対する消去活性が特に高いことが新たに見出され、・OH との反応速度はアスコルビン酸と匹敵する数値 ($\approx 1 \times 10^{10} \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$) であった。

2) EUK-134 を予め塗布したヘアレスマウスの皮膚において、UVA 照射によって誘導される ROS 生成、およびその後惹起される炎症は共に、塗布された EUK-134 の濃度依存的に抑制されることが見出された。

これらの結果は、EUK-134 がインビトロ系における触媒的な ROS 消去反応を示すのみならず、インビボ系においても ROS を消去し、皮膚における防御作用を発揮することを示唆している。

【参考文献】

- 1) S.R. Doctrow, K. Huffman, C.B. Marcus, G. Tocco, *et al.*, *J. Med. Chem.*, 2002, **45**, 4549.
- 2) H. Yasui, H. Sakurai, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2000, **269**, 131.

海棲生物に存在するセレン化合物と水銀の関係

○阿南弥寿美¹、鈴木紀行²、田辺信介³、小椋康光^{1,4}¹昭和薬科大学衛生化学研究室、²千葉大学大学院薬学研究院、³愛媛大学沿岸環境科学研究センター、⁴昭和薬科大学ハイテクリサーチセンター

【目的】 必須微量元素の一つであるセレン (Se) は生体内で様々なセレンタンパク質として機能する他、毒性金属、特に水銀 (Hg) の解毒に関与している。食物連鎖を介して Hg を高蓄積する海棲高等動物では、Hg と Se が等モルで複合体を形成することで Hg を解毒していると考えられており、そのため同時に Se を高蓄積する。最近我々は、ある種の海棲生物は Hg を蓄積せずに Se を高濃度に蓄積しており、その化学形は主にセレノネインであることを報告した[1]。セレノネインはマグロの血中で同定された新規セレン化合物であるが[2]、その生物学的意義や海棲生物における Hg 解毒への関与は不明である。そこで本研究では、セレノネインを高蓄積しているウミガメ類の肝臓を用い、セレノネインと無機 Hg および有機 Hg 化合物との反応性を亜セレン酸 (selenite) と比較した。

【試料と方法】 試料には愛媛大学生物環境試料バンク (es-Bank) に -80°C 保存されているタイマイ (*Eretmochelys imbricata*) の肝臓を供した。肝ホモジネートに ^{82}Se -selenite を加えプレインキュベートした後、無機 Hg (HgCl_2) またはメチル Hg (CH_3HgCl) を添加し、 37°C で 60 分間インキュベートした。超遠心分離により得られた上清をマルチモードカラム (GS-520HQ) を装着した HPLC で分離し、Se ($m/z=78, 82$)、Hg (202)、Zn (66)、Cd (111) の溶出プロファイルを重水素 (D_2) リアクションモードの ICP-MS で検出した。

【結果および考察】 タイマイの肝臓上清に内在する Se の 95% 以上がセレノネインであり、他にメチルセレン糖および複数のセレンタンパク質が検出された。内在性 Hg はメタロチオネインを含む複数のタンパク質に結合しており、セレノネインの溶出位置とは一致しなかった。無機 Hg またはメチル Hg のみを添加した試料において、無機 Hg はメタロチオネインに優先的に結合し、メチル Hg は複数のタンパク質へ非特異的に結合したが、いずれの Hg 化合物もセレノネインとは反応しなかった。一方 ^{82}Se -selenite と無機 Hg を同時に添加した試料では、selenite に由来する ^{82}Se と Hg がタンパク質溶出画分において同じ保持時間に溶出した。動物生体内で selenite は代謝経路の中間代謝物である selenosulfide (R-S-Se) に還元されると考えられている[3]。in vitro においても同様に selenosulfide が生成し、無機 Hg と複合体 (R-S-Se-Hg) を形成したと予想された。以上より、海棲生物肝臓における HgSe 複合体形成に対するセレノネインの直接的な寄与は少ないと示唆された。

【参考文献】

- [1] Anan, Y., Ishiwata, K., Suzuki, N., Tanabe, S. and Ogra, Y., *J. Anal. At. Spectrom.*, in press, DOI: 10.1039/C0JA00031K.
- [2] Yamashita, Y. and Yamashita, M., *J. Biol. Chem.*, **285**, 18134-8 (2010).
- [3] Suzuki, K. T., *J. Health Sci.*, **51**, 107-114 (2005).

カドミウムの細胞毒性に対するヘムオキシゲナーゼ-1 の関与

○松本 可南子、角 大悟、姫野 誠一郎
徳島文理大学 薬学部 衛生化学教室

【目的】 これまでにマウスを用いた実験で、CdCl₂による肝障害が CoCl₂の同時投与によって抑制されることを明らかにしてきた。また、CoCl₂はヘムオキシゲナーゼ (HO)-1 を誘導するが、CoCl₂による肝障害抑制作用に HO-1 がどのように関与しているのか不明である。そこで HO-1 高発現細胞及び、活性を持たない変異型 HO-1 高発現細胞を用いて CdCl₂の細胞毒性に対する HO-1 の関与について検討した。また CdCl₂の細胞毒性に対する CoCl₂の効果も検討した。

【実験方法】 ラット好塩基球白血病細胞 (RBL-2H3) に HO-1 を高発現させた細胞 (rHO-1)、変異型 H25A HO-1 を高発現させた細胞 (mHO-1)、及び vector のみを導入した mock 細胞を用いた。rHO-1 と mHO-1 細胞は慶応大学医学部末松誠教授より供与された。これらの細胞に CdCl₂ (0.1~250μM)、CoCl₂ (100μM)を添加した時の細胞毒性の変化を alamar Blue 法を用いて測定した。HO-1 の蛋白量は Western blot 法で測定した。HO 活性は生じたビリルビンの量を測定することで測定した。

【結果および考察】 rHO-1 細胞に CdCl₂を添加した場合、CdCl₂の IC₅₀は mock 細胞の 10 倍であり、CdCl₂に対して耐性をもつことがわかった。しかし mHO-1 高発現細胞では CdCl₂の感受性が mock 細胞と変わらなかった。このことから CdCl₂の毒性抑制には HO-1 の酵素活性が重要であることが示唆された。そこで HO 活性を測定したところ、rHO-1 細胞では mock 細胞に比べて約 6 倍、mHO-1 細胞に比べて約 23 倍の HO 活性を示した。この結果より、rHO-1 細胞と mHO-1 細胞で見られた CdCl₂の感受性の違いは HO 活性に起因していることがわかり、やはり CdCl₂の細胞毒性には HO 活性が重要であると考えられる。また、mHO-1 細胞では HO 活性が mock 細胞のコントロールレベルよりも低かった。これについては、mutant HO-1 蛋白が過剰に発現していることによって、内因性の HO-1 蛋白が誘導されにくくなっているのかもしれない。一方、mock 細胞、あるいは mHO-1 細胞に CdCl₂と CoCl₂を同時添加すると CdCl₂の毒性が抑制された。mock 細胞、あるいは mHO-1 細胞に CoCl₂を単独添加することにより、HO-1 の蛋白レベル、酵素活性がともに上昇した。mHO-1 細胞においても、CoCl₂の添加によって内因性の HO-1 遺伝子の活性化によって HO 活性が上昇したと考えられる。また、CdCl₂の添加によっても HO 活性が上昇したが、CoCl₂単独添加よりも活性は低かった。以上のように、rHO-1 細胞と mHO-1 細胞の比較、および HO 活性の測定を行うことにより、HO-1 の酵素活性が CdCl₂毒性抑制作用に重要な役割を果たしていることが示唆された。

優れた抗酸化効果を有するプラチナナノ粒子の創製と

その腹膜播種治療への応用

○勝見英正¹、水山朋美¹、圓山翔子¹、上中麻規子¹、佐野昌隆²、小山宗孝³、
西川元也⁴、坂根稔康¹、山本 昌¹

1, 京都薬科大学 薬剤学分野、2, セラフト (株)、
3, 京都大学大学院工学研究科、4, 京都大学大学院薬学研究科

【目的】活性酸素による生体分子の酸化は、癌や炎症など多くの病態の発症および進行に関与していることから、生体分子のレドックス制御は生体機能を制御する上で重要である。これまでに、各種抗酸化剤を利用した各種疾患治療が試みられているが、既存の抗酸化剤は特定の活性酸素種のみを消去するものが多く、その効果も一過性である。一方、溶液中にプラチナを安定に分散させたプラチナナノ粒子は、触媒反応を利用して様々な種類の活性酸素種を持続的に消去可能な抗酸化剤であることから、プラチナナノ粒子を体外から投与することによる効率的な疾患治療が期待される。そこで本研究では、活性酸素が関与する腹膜播種をモデル疾患として取り上げ、その効率的抑制を目的として、活性酸素種消去効果に優れたプラチナナノ粒子を創製するとともに、腹腔内投与後のプラチナナノ粒子の体内動態ならびに治療効果に関して系統的に評価した。

【実験方法】プラチナナノ粒子の調製：プラチナイオンに対して還元剤を水中で反応させることにより粒子径約 100 nm のプラチナナノ粒子を作製した。活性酸素種消去能：NBT 還元法または蛍光プローブ法により評価した。体内動態評価：プラチナナノ粒子腹腔内投与後の各臓器・組織中白金濃度を ICP-MS を用いて測定した。腹膜播種実験：Balb/c マウスの腹腔内に、colon26/Luc 細胞を投与することにより腹膜播種モデルを作製した。colon26/Luc 細胞投与直前及び 3 日後あるいは 7 日後にプラチナナノ粒子を腹腔内投与し、*in vivo* 微弱光イメージングシステムを用いた観察から、転移抑制効果を判定した。腎臓障害性評価：プラチナナノ粒子またはシスプラチン投与後の血清中クレアチニン濃度を測定することにより評価した。

【結果および考察】プラチナナノ粒子は、スーパーオキシド、過酸化水素及びヒドロキシラジカルなどの各種活性酸素種に対して高い消去能を示した。また、腹腔内投与後のプラチナナノ粒子は腹腔内に長期滞留し、腹膜播種治療に有利な体内動態を示した。さらに、腹腔内投与されたプラチナナノ粒子は、白金錯体であるシスプラチンと比較して、癌細胞の腹膜への接着・浸潤過程ならびに増殖過程を顕著に抑制した。シスプラチン投与時には、腎臓障害の指標である血清中クレアチニン濃度が上昇したが、プラチナナノ粒子投与時には血清中クレアチニン濃度の上昇は認められなかった。以上のことから、腹膜播種治療におけるプラチナナノ粒子の有用性が示された。