

2007 No.  
**125**  
ISSN 0385-1516

## CONTENTS

### Review

$\beta$ -シクロデキストリンの包接現象を  
利用したスピナダクトの安定化  
未石 芳巳

### 連載

エイズから見た感染症研究の最前線  
その5 抗HIV剤開発  
吉村 和久

### Topics on Chemistry

イガイな万能表面修飾法  
渡辺 栄治

ドージンニュース

  
**DOJIN NEWS**

目次

Review

β シクロデキストリンの包接現象を利用したスピリアダクトの安定化

- 岡山大学大学院自然科学研究科 末石 芳巳 ..... 1  
 エイズから見た感染症研究の最前線  
 その5 抗 HIV 剤開発  
 熊本大学エイズ学研究センター 吉村 和久 ..... 8

Topics on Chemistry

- イガイな万能表面修飾法  
 同仁化学研究所 渡辺 栄治 ..... 12

Commercial

新製品

- 界面活性剤スクリーニングセット ..... 13  
 蛍光ラベル化キット ..... 14  
 Self Assembled Monolayer 研究用試薬 ..... 15

試作品

- 過酸化脂質蛍光検出試薬 ..... 16

お知らせ

- 学会展示のお知らせ ..... 11  
 九州大学 - 同仁化学組織対応型連携 ..... 11  
 販売中止 ..... 13  
 パンフレットのお知らせ ..... 17  
 17<sup>th</sup> フォーラム・イン・ドージン開催報告 ..... 18

新製品案内

製品詳細は掲載ページをご覧ください

界面活性剤スクリーニングセット

品名	容量	価格(¥)	メーカーコード
Detergent Screening Set (first choice- )	1 set	14,000	DS06

蛍光ラベル化キット

品名	容量	価格(¥)	メーカーコード
HiLyte Fluor™ 750 Labeling Kit - NH <sub>2</sub>	3 samples	28,000	LK16

Self Assembled Monolayer 研究用試薬

品名	容量	価格(¥)	メーカーコード
Amino-EG <sub>6</sub> -undecanethiol, hydrochloride	10 mg	38,000	A483



冬の阿蘇：古閑の滝  
 “フリーデスクトップ壁紙・熊本ふるさと百景”提供

## $\beta$ -シクロデキストリンの包接現象を利用したスピアダクトの安定化 Stabilization of Spin Adducts by Inclusion Complexation with $\beta$ -Cyclodextrins



末石 芳巳  
(Yoshimi Sueishi)  
岡山大学大学院自然科学研究科  
機能分子化学専攻

### [ Summary ]

Spin trapping involves trapping of reactive free radicals by an addition reaction to produce more stable radicals, detectable by electron spin resonance (ESR) spectroscopy, and has become a valuable tool in the study of transient free radicals in chemical and biological system. Many investigators have attempted to enhance spin-trapping efficiencies and/or stabilities of spin adducts, while further investigations seem to be necessary to obtain better results. In this review, we describe a method to increase the stability of spin adducts by using supramolecular cyclodextrins (CD). CDs are water-soluble oligosaccharides which form inclusion complexes with a large number of organic and inorganic molecules. We believe free radicals included by CD cavities may be defended from other reactants that shorten their lifetime. Using alkyl radicals and sulfite radical anion, we show the application of CD inclusion to the spin trapping chemistry, specifically, we have examined the stabilization effect of CD inclusion and the influence on the spin trapping rates.

キーワード：スピントラップ、短寿命ラジカル、ESR、シクロデキストリン、包接化合物

### 1. はじめに

短寿命のフリーラジカルを捕捉し、安定なニトロキシドラジカルに変換し、そのESRスペクトルから短寿命フリーラジカルの構造や濃度を決定する方法としてスピントラップ法がよく知られている(Fig. 1a)。1960年代後半、Janzen<sup>1)</sup>らによりこの方法が提案され、それ以後、化学をはじめ、医学、薬学、生物学の多くの分野で利用され、今日では日常的に短寿命ラジカルの検出方法として用いられるようになった<sup>2)</sup>。しかしながら、生成したスピアダクトは安定なものばかりではなく、多くの研究者が、より安定なスピアダクトを得るために様々な構造の新規トラップ試薬の開発に取り組んでいる。活性酸素(スーパーオキシド等)に関する研究もまたスピントラップ法を用いて、米国のBuettner<sup>3)</sup>や日本の牧野<sup>4)</sup>らをはじめ多くの研究者により、精力的におこなわれている。しかし、スーパーオキシドのスピアダクトの多くは不安定であり、問題を含んでいる。

最近、シクロデキストリン(CD)というナノテク材料を用いた超分子化学的研究が盛んにおこなわれている<sup>5)</sup>。CDは大環状化合物であり、中に空洞を持っている。CDの空洞内に分子を取り込む(包接)ことで、不安定化合物の安定化、不溶性化合物の可溶性など様々な利用法がある。KarouiとTordo<sup>6)</sup>はCDにスーパーオキシドのスピアダクトを包接させることでスピアダクトの安定化が可能であることを報告した(Fig. 1b)。CDは環境にも生体にも安全で適合性を持っており、取り扱いも容易であるから、CDの添加がスピアダクトの安定化をもたらすのであれば、今後の多くの研究への応用が期待される。

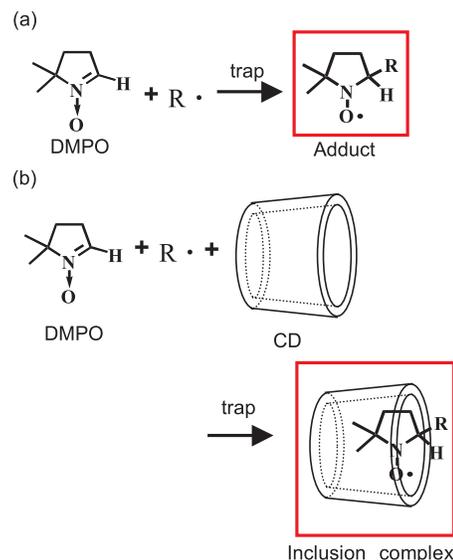


Fig.1 Reaction scheme of spin trapping.

本稿では、生物ラジカルの研究等で使用される代表的なニトロキシ系のスピントラップ試薬である5,5-dimethyl-1-pyrroline N-oxide (DMPO)およびその類似体に、典型的な短寿命ラジカルであるアルキルラジカル(メチルラジカル、エチルラジカル)およびイオン性ラジカル種の亜硫酸ラジカルアニオンをトラップさせ、

それらスピナダクト(Fig. 1a)の安定性とスピナダクトの包接による安定化効果(Fig. 1b)について紹介すると同時に、シクロデキストリンにより包接されたラジカル種 ( Fig. 1b ) の ESR スペクトルについて解説をする。

## 2. スピナダクトの寿命

### 2.1 アルキルラジカルスピナダクトの包接による安定化

アルキルラジカル (メチルラジカルおよびエチルラジカル) は鉛化合物の光分解により容易に発生させることができる。様々なラジカル種の発生方法およびスピナダクトの超微細結合定数 (hfcc) については、Buettnerの解説を参照されたい<sup>2)</sup>。水溶液中、DMPO存在下でエチルラジカルを発生させると、次の反応式に従い、エチルラジカルはDMPOにトラップされ、スピナダクトが生成される。得られた ESR スペクトルは Fig. 2a に示した。



スピナダクトの ESR スペクトルを解析することにより、発生したラジカル種に関する情報が得られる。Fig. 2a に示した ESR スペクトルは窒素および水素核による分裂の 1 種類のラジカル種であることがわかる。UV 照射 10 分後の ESR スペクトルにおい

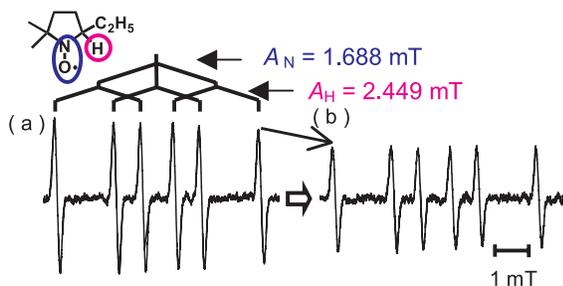


Fig. 2 (a) ESR spectrum obtained after UV-photolysis. (b) ESR spectrum after 10 min:  $[DMPO]_0 = 2.5 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ .

ては ( Fig. 2b ) 新たなラジカル種は観測されないけれども、スピナダクトの減衰が確認される。減衰の速度定数 (k) は簡易的ではあるが、ESR スペクトル強度 ( $I_t$ ) の時間変化を 1 次反応速度式 (式 3) に従って解析することにより決定した。また、式 4 よりスピナダクトの半減期 ( $t_{1/2}$ ) を見積もった ( Table 1 )。

$$\ln I_t = -kt + C \quad (3)$$

$$t_{1/2} = \ln 2/k \quad (4)$$

メチルおよびエチルラジカル DMPO アダクトの半減期は約 1200 秒である。アルキルラジカル DMPO スピナダクトは比較的安定であるが、CD の包接によるスピナダクトの安定化効果について検討するにあたっては、極端に短寿命のスピナダクトを取り扱うのは実験的に困難が伴うため、まずは比較的減衰が

Table 1 The rate constants and half-life for the decay of ethyl- and methyl-DMPO adducts

Adduct	CD	$10^4 k \text{ (s}^{-1}\text{)}$	$t_{1/2} \text{ (s)}$
DMPO-C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	—	5.68	1200
DMPO-C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	β-CD	2.36	3000
DMPO-C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	DM-β-CD	8.13	850
DMPO-C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	G-β-CD	3.77	1850
DMPO-CH <sub>3</sub>	—	6.09	1150
DMPO-CH <sub>3</sub>	β-CD	2.27	3050
DMPO-CH <sub>3</sub>	DM-β-CD	9.84	700
DMPO-CH <sub>3</sub>	G-β-CD	5.83	1200

遅いアルキルラジカルスピナダクトを取りあげ、その効果について検討した。

シクロデキストリン (CD) はグルコースの環状オリゴマーであり、グルコースの数によって α (6 量体)、β (7 量体)、γ (8 量体) シクロデキストリンと名づけられている。1-4 グリコシド結合した大環状化合物の構造をもち、中に空洞のある筒型の円錐台形をしている。水溶液中で有機分子が存在すると疎水性相互作用により空洞内に取り込まれる。この現象を“包接”といい、不安定物質の安定化、不溶性物質の可溶化など、CD の包接機能が食品や医薬品、化粧品など様々な分野で利用されている<sup>5)</sup>。ここでの研究においては、下図 (Fig. 3) に示した 3 種の β-シクロデキストリンを用いた。

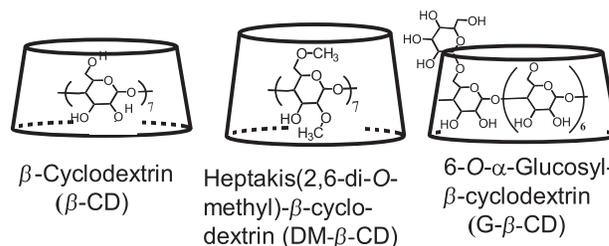


Fig. 3 Structures of β-cyclodextrins.

CD の化学修飾による機能の向上には目覚ましいものがある。空洞内の疎水性および水への溶解性を高めたふたつの修飾 CD に注目した。DM-β-CD は 2- および 6- 位の OH 基がメチル化されたもので、空洞の径の大きさは β-CD と同じであるが、メチル化により上下に疎水部分が伸びたシクロデキストリンである。また、G-β-CD は 6- 位にグルコシル基を導入したものである。この修飾 CD は、一般的な β-CD の低い水への溶解性 ( 1.85 g / 100 ml ) に比べて、水への大きな溶解性を示し ( 97 g / 100 ml )、薬物キャリアの研究などにおいて期待されている機能性物質である。Fig. 4 には β-CD 存在下での DMPO エチルアダクト ( DMPO-C<sub>2</sub>H<sub>5</sub> ) の ESR スペクトルを示した。Fig. 4b に示したように、β-CD の添加に伴い新たなラジカル種が現われ、2 種類のラジカル種からなる ESR スペクトルが観測されている。さらに β-CD を加えた大過剰の β-CD 存在下では、hfcc が変化した新たな 1 種類のラジカル種が観測されている (Fig. 4c)。

“ニトロキシドラジカルがCDの空洞内に包接されるとESRスペクトルはどのように変化するのであろうか？”通常、包接化合物についての研究はNMR法により広くおこなわれているが、最近、我々は新規ニトロキシドプローブを用いて、シクロデキストリンやカリックスアレーンの包接化合物の分離検出および包接挙動の解明にESR法が非常に有用であることを報告した<sup>7-9)</sup>。ここのDMPO-C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>アダクトがCDの空洞内に包接された際のESRスペクトルの変化は次のように解釈される。包接に伴うA<sub>N</sub>値の減少はニトロキシドラジカルのN-O基がCDの空洞内の極性の低い環境に移ったことを示しており、A<sub>H</sub>値の変化は包接化合物形成の際のC-H結合の角度変化を示している。Fig. 4cのESRスペクトルからわかるように、hfcc(A<sub>N</sub>およびA<sub>H</sub>値)の変化は、このラジカル種がCD空洞内にあるDMPO-C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>アダクトであることを示唆している。また、DMPO-C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>およびその包接化合物のESRスペクトル、つまりFig. 4aとFig. 4cを任意の割合で足し合わせると2種類のラジカルから成るESRスペクトル(Fig. 4b)が容易に再現され、その解釈が妥当であることがわかる。Fig. 4に示したように、ESR法によればNMR法のような平均スペクトルではなく、包接化合物が分離して検出され、包接に関する有用な微視的情報が得られるので、今後、この分野でのESRを用いた研究に期待が寄せられる。

スピニアダクトのESRスペクトルに及ぼすCDの添加効果より、トラップ剤(DMPO)の約10倍過剰のCDが存在すれば発生したスピニアダクトのすべてが包接化合物を形成することがわかった。大過剰のCD存在下で、ESRスペクトル強度の時間変化をFig. 5に示した。DMPO-C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>アダクトの3種類のCDによる

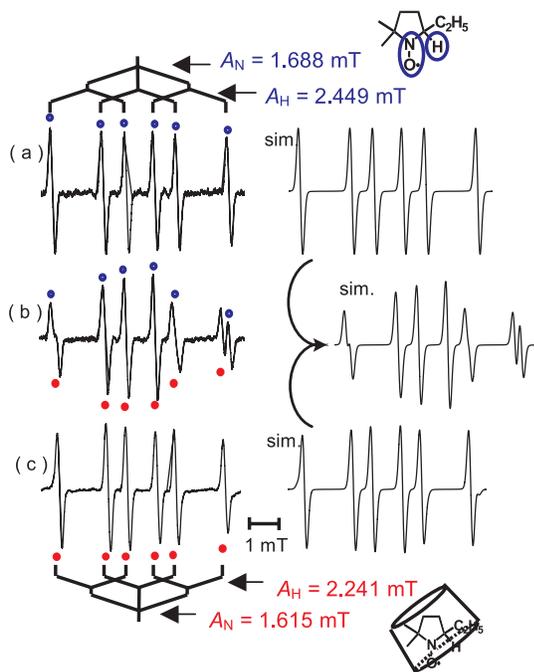


Fig. 4 ESR spectra of DMPO-C<sub>2</sub>H<sub>5</sub> adduct in the presence of  $\beta$ -CD and simulated spectra: [DMPO]<sub>0</sub> = 2.5 × 10<sup>-3</sup> mol dm<sup>-3</sup>. [ $\beta$ -CD]<sub>0</sub> = (a) 0, (b) 2.5 × 10<sup>-3</sup> mol dm<sup>-3</sup>, (c) 20 × 10<sup>-3</sup> mol dm<sup>-3</sup>.

包接安定化の違いに関する興味深い結果が得られた。DM- $\beta$ -CDの包接により、スピニアダクトの安定化はほとんど観測されないが、 $\beta$ -CDおよびG- $\beta$ -CDの添加により、スピニアダクトは著しく減衰速度が減少し、アダクトの安定化が伺える。この減衰カーブもまた式3の1次反応に従い、減衰速度定数および半減期を見積もった。Table 1にはメチルラジカルアダクトの減衰に関する結果とともに減衰に及ぼすCDの効果を示している。CDの包接によるDMPOアルキルラジカルアダクトの安定化については、 $\beta$ -CDまたはG- $\beta$ -CDを用いるのが効果的であり、半減期が約2.5倍大きくなるという顕著な安定化効果が実現した。

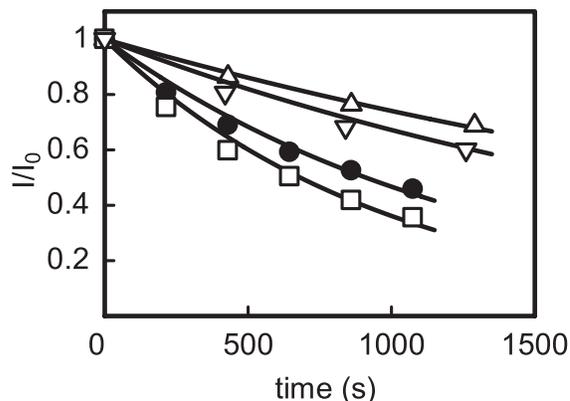


Fig. 5 Plots of ESR-spectral intensity against time for DMPO-C<sub>2</sub>H<sub>5</sub> in  $\beta$ -CDs: [DMPO]<sub>0</sub> = 3.0 × 10<sup>-3</sup> mol dm<sup>-3</sup>. (□): [CD]<sub>0</sub> = 0, (○): [ $\beta$ -CD]<sub>0</sub> = 15 × 10<sup>-3</sup> mol dm<sup>-3</sup>, (△): [DM- $\beta$ -CD]<sub>0</sub> = 20 × 10<sup>-3</sup> mol dm<sup>-3</sup>, (◇): [G- $\beta$ -CD]<sub>0</sub> = 20 × 10<sup>-3</sup> mol dm<sup>-3</sup>.

## 2.2 イオン性ラジカルスピニアダクトの包接による安定化

生体内または環境中で亜硫酸塩の酸化によって亜硫酸ラジカルアニオンが生成することはよく知られている。これまでスピントラップ法での亜硫酸ラジカルアニオンについての研究においては、亜硫酸ナトリウムの光分解により亜硫酸ラジカルアニオンを発生させた研究例が多い。最近、Potapenko<sup>10,11)</sup>らは亜硫酸イオンがDMPOの2重結合部分に求核付加反応を起こすことを報告した。彼らの報告に従うと、亜硫酸ラジカルアニオンの発生のために亜硫酸イオンを使用し、DMPOによるスピントラップの研究をおこなう場合、溶媒のpHおよび亜硫酸塩の濃度に伴いDMPOの濃度が変化することに注意しなければならない。これまでに報告されているスピニアダクトの安定性およびトラップ速度については、トラップ試薬と亜硫酸イオンとの反応を考慮した再検討が必要である。研究の詳細は省略するが、DMPOによる亜硫酸ラジカルアニオンのトラップ速度のpH依存性を調べた結果、pH > 9.0の塩基性条件下でおこなえば上記付加反応は無視できることがわかった。また、亜硫酸イオンの $\alpha$ -Phenyl-N-t-butyl-nitron (PBN)への付加反応はおきかないことをNMR測定により確認した。

亜硫酸ラジカルアニオンのDMPOによるスピニアダクト(DMPO-SO<sub>3</sub><sup>-</sup>)もまたイオン性のラジカル種である。一般に、CDは疎水性の化学種(又は官能基)と安定な包接化合物を形成するが、イオン性のものとは包接化合物を形成しにくい。従って、生

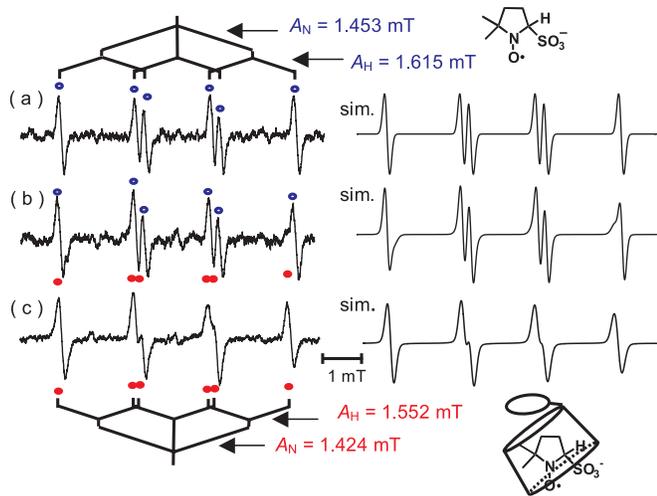


Fig. 6 ESR spectra of  $\text{DMPO-SO}_3^-$  adduct in the presence of  $\text{G-}\beta\text{-CD}$  and simulated spectra:  $[\text{DMPO}]_0 = 1.79 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ .  $[\text{G-}\beta\text{-CD}]_0 =$  (a) 0, (b)  $1.79 \times 10^{-3}$ , (c)  $100 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ .

成した $\text{DMPO-SO}_3^-$ アダクトをCD内に包接するためには大過剰のCDが必要である。 $\beta\text{-CD}$ は水への溶解性が低く、生成したすべてのイオン性スピナダクト $\text{DMPO-SO}_3^-$ を包接させることはできなかった。水への溶解性が高い $\text{G-}\beta\text{-CD}$ を用いたところ、イオン性アダクトも包接によって安定化することを見出した。Fig. 6には $\text{G-}\beta\text{-CD}$ 存在下での $\text{DMPO-SO}_3^-$ のESRスペクトルを示した。 $\text{G-}\beta\text{-CD}$ の添加に伴いESRスペクトルの様相が次第に変化し、hfccが変化したラジカル種が現れてくるのがわかる。Fig. 6aと6cのスペクトルを任意の割合で足し合わせることで、Fig. 6bのスペクトルが再現されている。Fig. 6cに示したラジカル種が $\text{DMPO-SO}_3^-$ アダクトの包接化合物であり、生成したすべてのラジカルアダクトを包接するにはトラップ試薬の約100倍過剰の $\text{G-}\beta\text{-CD}$ が必要であった。 $\text{DMPO}$ アルキルアダクトの包接化合物形成時の $A_N$ 値の変化量に比べて、 $\text{DMPO-SO}_3^-$ アダクトの場合の $A_N$ 値の減少量が小さいのは、包接化合物の構造に起因するものである。 $\text{DMPO-SO}_3^-$ アダクトの包接化合物においては、イオンである $-\text{SO}_3^-$ が包接されずCDの外に位置するため、N-O基のCD空洞内への挿入も浅いものと推測される。

$\text{DMPO-SO}_3^-$ アダクトのESRシグナル強度の時間変化はFig. 7に示した。 $\text{DMPO}$  (Fig. 7a)、 $\text{PBN}$  (Fig. 7b)のいずれのトラップ試薬においても、生成した $\text{SO}_3^-$ アダクトの減衰は速く、短寿命であることがわかる。Fig. 7には、大過剰の $\text{G-}\beta\text{-CD}$ を加え、アダクトの減衰に及ぼすCD包接の効果も同時に示している。 $\text{G-}\beta\text{-CD}$ の包接により、アダクトの減衰が明らかに抑制されることがわかる。その他、いくつかの $\text{DMPO}$ 類似体によるアダクトの減衰の半減期およびCD包接の及ぼす効果を調べ、Table 2にまとめた。 $\text{G-}\beta\text{-CD}$ の添加により、 $\text{DMPO}$ および $\text{DEPMPO}$ のアダクトの減衰の半減期は約4倍大きくなっている。また、 $\text{DPPMPO}$ によるアダクト $\text{DPPMPO-SO}_3^-$ の包接化合物形成に伴う $A_N$ 値の減少量

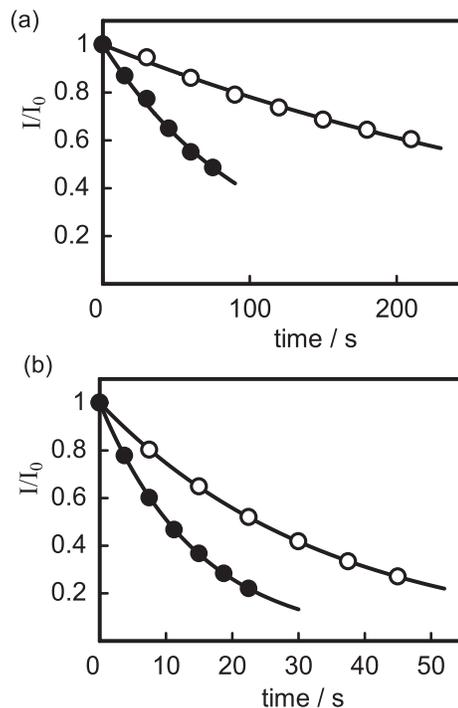


Fig. 7 Plots of ESR-spectral intensity against time for (a)  $\text{DMPO-SO}_3^-$  and (b)  $\text{PBN-SO}_3^-$ : (a)  $[\text{DMPO}]_0 = 1.0 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ .  $[\text{G-}\beta\text{-CD}]_0 =$  ( ) 0 and ( )  $101 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ . (b)  $[\text{PBN}]_0 = 2.0 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ .  $[\text{G-}\beta\text{-CD}]_0 =$  ( ) 0 and ( )  $195 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ .

は他のものに比べて小さく、CDによる安定化効果が2倍程度しか得られていない。これは $\text{DPPMPO-SO}_3^-$ の $\text{G-}\beta\text{-CD}$ による包接箇所の違いによるものであろう。詳細は次節で議論する。いずれにしても、亜硫酸ラジカルアニオンアダクトの $\text{G-}\beta\text{-CD}$ の包接による安定化は顕著であり、半減期が2～4倍程度大きくなるというアダクトの安定化効果が得られた。

### 3. トラップ速度に及ぼす包接の効果

#### 3.1 トラップ相対速度の見積もり

これまではCDの包接によるスピナダクトの安定化について紹介した。スピナダクトとトラップ試薬の構造は類似しており、スピナダクトがCDの空洞内に包接されるのであれば、トラップ試薬もまたCDに包接されるであろう。実際、 $\text{DMPO}$ および $\text{PBN}$ のCD包接化合物形成に際してのNMRプロトンシフトを測定すると、 $\text{DMPO}$ ではC(3)-HとC(5)- $\text{CH}_3$ 、 $\text{PBN}$ では $t\text{-butyl}$ 基のプロトンシフトが大きく、Fig. 8に示した包接化合物の形成が推測される。あらかじめ系内にCDを加えておいて、短寿命ラジカルをトラップする場合、Fig. 8に描いたように、CD内に包接されたトラップ試薬が短寿命ラジカルをトラップすることになる。トラップ試薬は発生した短寿命ラジカルを即座にトラップする必要があり、トラップ試薬がCDに包接されることにより、トラップ速度にはどのような影響があるかについて検討しておく必要がある。トラップ試薬によるラジカルトラップ速度は非常に速いが、

Table 2 Hfcc, rate constants and half-life times for the decay reaction of  $\text{SO}_3^{\cdot-}$ -adducts

Traps	CD	$A_N/\text{mT}$	$A_H/\text{mT}$	$A_P/\text{mT}$	$10^3 k (\text{s}^{-1})$	$t_{1/2} (\text{s})$
DMPO	—	1.453	1.615	—	9.5	70
DMPO	G- $\beta$ -CD	1.424	1.552	—	2.4	280
PBN	—	1.498	0.197	—	67.3	10
PBN	G- $\beta$ -CD	1.468	0.237	—	24.9	24
DEPMPO <sup>a)</sup>	—	1.358	1.521	5.002	1.89	370
DEPMPO <sup>a)</sup>	G- $\beta$ -CD	1.304	1.304	5.005	0.43	1620
DPPMPO <sup>a)</sup>	—	1.294	1.497	3.812	0.61	1130
DPPMPO <sup>a)</sup>	G- $\beta$ -CD	1.280	1.412	3.972	0.30	2310

a) DEPMPOおよびDPPMPOによるトラップにおいては、それぞれジアステレオマーが生成する可能性がある。上記の値は *trans* 体の hfcc である。*cis* 体の生成はわずかではあるが、DEPMPO においては  $A_P = 3.284 \text{ mT}$ ,  $A_N = 1.443 \text{ mT}$ ,  $A_H = 1.627 \text{ mT}$  と帰属された。DPPMPO については帰属できるほど十分に観測できなかった。

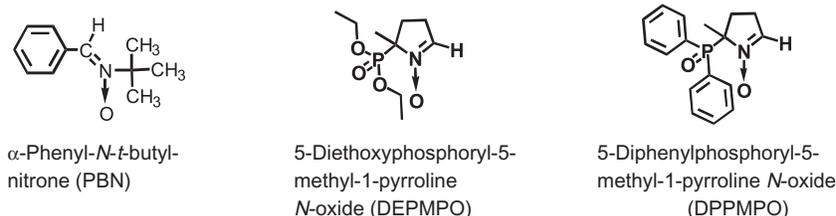


Fig.8 Inclusion complexes of (a) DMPO and (b) PBN with  $\beta$ -CD.

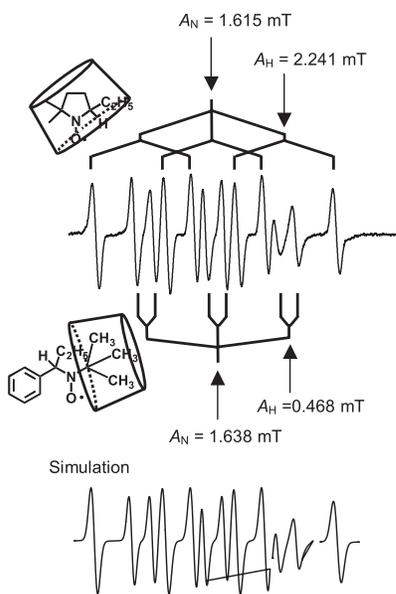


Fig. 9 ESR spectrum obtained after UV-photolysis in the aqueous solution of  $(\text{C}_2\text{H}_5)_3\text{PbOAc}$ , DMPO, PBN and  $\beta$ -CD:  $[(\text{C}_2\text{H}_5)_3\text{PbOAc}]_0 = 3.02 \times 10^{-3}$ ,  $[\text{DMPO}]_0 = 0.50 \times 10^{-3}$ ,  $[\text{PBN}]_0 = 1.03 \times 10^{-3}$  and  $[\beta\text{-CD}]_0 = 16.2 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ .

2種類のトラップ試薬による競争反応を利用し、容易に反応速度に関する有用な情報を得ることが出来る。我々はこれまでに、トラップ競争反応により、種々のニトロン系トラップ剤によるヒドロキシラジカルのトラップ速度に及ぼす置換基の効果等についての報告をしている<sup>12)</sup>。同様の方法を適用し、CDに包接された2種類のトラップ試薬によるラジカルトラップ速度比の決定の1例を紹介する。DMPOとPBNの2種のトラップ試薬の入った溶液に大過剰の $\beta$ -CDを加え、そこにエチルラジカルを発生させたとき生成するスピニアダクトのESRスペクトルをFig. 9に示した。そのESRスペクトルは、それぞれDMPOおよびPBN由来の窒素核と水素核による6本線の2組から成っている。

2種類のトラップ試薬がともにCD空洞内に包接され、それら2種類の包接化合物によるエチルラジカルのトラップ競争反応はFig. 10の反応式に従って進行する。従って、包接された2種のトラップ試薬によるトラップ相対速度比( $R_2/R_1$ )は式5のように表される。左辺の2つのラジカルアダクトの生成速度比は、Fig. 9のそれぞれのスピニアダクトのESRスペクトルよりラジカル生成比(2重積分比)を計算し、トラップ試薬の初濃度比に対してプロットするとFig. 11のようになる。Fig. 11には、CDを添加した場合と添加していない場合を示しているが、いずれも原点を通る直線が得られる。これは上の反応機構が妥当であることを示している。式5に従い、傾きより2つのトラップ試薬によるラジカルトラップ速度比を見積もることができる。種々のCD存在下でトラップ試薬を組み合わせ、それぞれのラジカルトラップ相対速度を求め、Table 3 (PBNのトラップ速度定数に対する相対値)にまとめた。Fig. 8に示したトラップ試薬の包接化合物のNMR法による推定構造からわかるように、DMPOではラジカル捕捉サイ

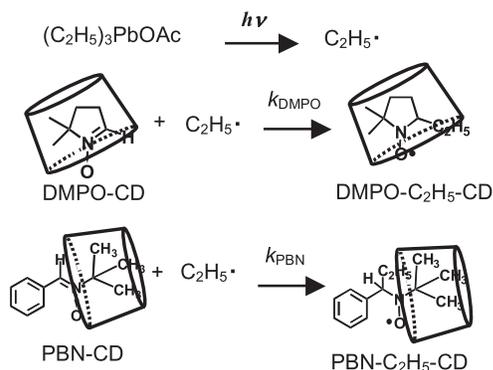


Fig. 10 Reaction scheme of competitive spin trapping.

$$\frac{R_2}{R_1} = \frac{d[\text{PBN} - \text{C}_2\text{H}_5 - \text{CD}]/dt}{d[\text{DMPO} - \text{C}_2\text{H}_5 - \text{CD}]/dt} = \frac{k_{\text{PBN}} [\text{PBN} - \text{CD}]_0}{k_{\text{DMPO}} [\text{DMPO} - \text{CD}]_0} = \frac{k_{\text{PBN}} [\text{PBN}]_0}{k_{\text{DMPO}} [\text{DMPO}]_0} \quad (5)$$

トは、CDの空洞内に入っているのに対し、PBNではCDの淵の近くではあるがCDの空洞の外にある。DMPOよりPBNでのトラップの方が、CDのトラップ速度への影響はより少ないことが予測できる。

同様の競争反応法(式5)を用いて、イオン性ラジカルであるSO<sub>3</sub><sup>-</sup>・のニトロン系トラップ試薬によるトラップ速度定数を決定し、また、トラップ相対速度のCD包接効果を調べた。ここでは、G-β-CDに包接された2種のスピアダクトのESRスペクトルの分離を容易にするために、5位にリン原子を有するDMPOの誘導体およびPBNを用いてイオン性ラジカルのトラップ速度について調べた。G-β-CDにより包接された2種類のトラップ試薬がSO<sub>3</sub><sup>-</sup>・ラジカルをトラップし、生成した2種のアダクトのESRスペクトルの1例をFig. 12に示した。Fig. 12は、DMPOとDPPMPOとの競争により生じたラジカル種のESRスペクトルである。DPPMPOアダクトの5位のリン原子の大きなhfccのために、2種のラジカル種が比較的良好な分離を示している。帰属は図中に示したとおりであり、2種のラジカル種の足し合わせにより、観測したESRスペクトルがうまく再現されている。種々のトラップ剤を用いて得られたイオン性ラジカルSO<sub>3</sub><sup>-</sup>・のPBNに対するトラップ相対速度定数およびそのG-β-CD包接効果はTable 4にまとめた。

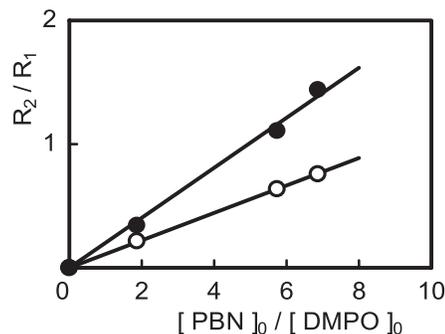


Fig. 11 Plots of relative rate  $R_2/R_1$  against the ratio of initial concentration of traps (PBN and DMPO): (○) [CD] = 0 and (●) [β-CD] = 15.0 × 10<sup>-3</sup> mol dm<sup>-3</sup>.

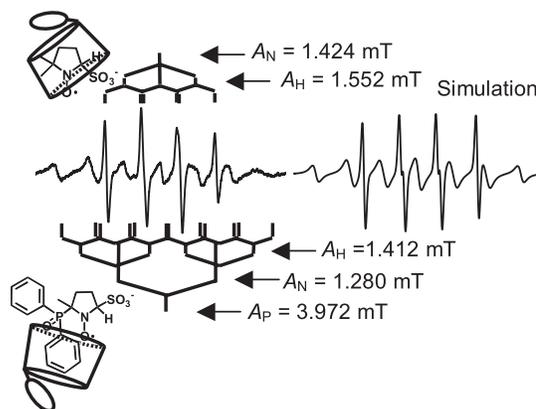


Fig. 12 ESR spectrum obtained after UV-photolysis in the presence of G-β-CD: [DMPO]<sub>0</sub> = 3.0 × 10<sup>-3</sup>, [DPPMPO]<sub>0</sub> = 3.17 × 10<sup>-3</sup> and [G-β-CD]<sub>0</sub> = 300 × 10<sup>-3</sup> mol dm<sup>-3</sup>.

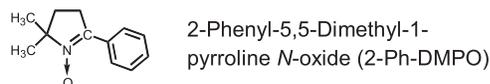
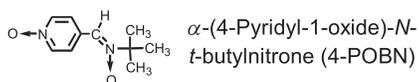
Table 4 Relative spin trapping rates ( $k/k_{\text{PBN}}$ ) for SO<sub>3</sub><sup>-</sup>· radical

Traps	$k/k_{\text{PBN}}$	10 <sup>-7</sup> k <sup>a</sup>	$k/k_{\text{PBN}}(\text{G-}\beta\text{-CD})^{\text{b}}$
PBN	1	0.035	1
DMPO	34	1.2 <sup>c</sup>	18
DEPMPO	50	1.8	25
DPPMPO	41	1.5	49

a) dm<sup>3</sup> mol<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup>. b) Spin trapping in the presence of G-β-CD. c) Cited from Ref. 14.

Table 3 Relative spin trapping rates ( $k/k_{\text{PBN}}$ ) for ethyl and methyl radicals in the presence of β-CDs

Traps	$k/k_{\text{PBN}}$ (Ethyl radical trapping)				$k/k_{\text{PBN}}$ (Methyl radical trapping)			
	-	β-CD	DM-β-CD	G-β-CD	-	β-CD	DM-β-CD	G-β-CD
DMPO	8.8	5.0	4.8	5.8	14.7	8.9	8.6	10
2-Ph-DMPO	0.12	0.36	0.42	0.47	0.26	0.48	0.48	0.49
PBN	1	1	1	1	1	1	1	1
4-POBN	4.9	3.3	3.7	4.1	2.9	2.8	3.2	3.8



### 3.2 ラジカルトラップ相対速度に及ぼす CD 包接の効果

アルキルラジカルのトラップにおいて(Table 3)、PBNの類似体である4-POBNでは、CDによる包接箇所の類似性のため、PBNとのトラップ相対速度に対する顕著な包接効果は観測されていないのに対し、DMPO/PBN系では明らかに包接に伴うトラップ相対速度比の顕著な減少が観測されている(約60%の相対速度比減少)(Table 3)。DMPOにおいてはラジカルトラップサイトがCDの空洞内あり、CDによりラジカルのトラップが阻害されていることを示唆している。一方、2-Ph-DMPO/PBN系では、逆に包接に伴い相対速度比は大きくなっている。2-Ph-DMPOの2位のかさ高いフェニル基のためにラジカルトラップサイトがCDの外に露出していると推測され、PBNよりもCDの影響が少ないと考えることができる。水溶液中でのDMPOおよびPBNによるエチルラジカルのトラップ速度定数はそれぞれ  $k_{\text{DMPO}} = 1.6 \times 10^7 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$  および  $k_{\text{PBN}} = 1.8 \times 10^6 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$  と報告されている<sup>13,14)</sup>。DMPOが $\beta$ -CDに包接され、短寿命エチルラジカルのトラップ速度定数が半減したとしても、 $k_{\text{DMPO}} = 9 \times 10^6 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$  という速い速度で短寿命ラジカルをトラップできることがわかる。

イオン性ラジカルである  $\text{SO}_3^{\cdot -}$  のトラップ相対速度については、Table 4に示したように、DMPO誘導体による  $\text{SO}_3^{\cdot -}$  のトラップ速度はPBNでのトラップに比べて34~50倍速いことがわかる。また、G- $\beta$ -CDを添加することにより、DMPO誘導体では興味深い結果が得られている。G- $\beta$ -CD存在下の包接されたDMPOおよびDEPMPOによるPBNに対するラジカルトラップ速度比( $k/k_{\text{PBN}}(\text{G-}\beta\text{-CD})$ )は、G- $\beta$ -CDを添加しない場合( $k/k_{\text{PBN}}$ )に比べてトラップ速度比が半減している。ところがDPPMPOではほとんどCDの影響を受けていない。前述のように、DMPOはピロリン環部分がCDの空洞内に深く包接されている。そのような構造の包接されたトラップ剤に親水性のイオン性ラジカルがトラップされるためには、疎水性であるCDの中に入りこまなければならない。そのためにトラップ速度の減速が起きているものと思われる。一方、DPPMPOにおいては、PBNとのトラップ速度比に対するCD添加効果が観測されていない。この挙動の違いについては、先に述べたようにCDによる包接箇所の違いに原因があると考えられる。DPPMPO- $\text{SO}_3^{\cdot -}$ の包接に伴う  $A_{\text{N}}$  値の減少量が小さいこと(Table 2)、また、相対速度比へのCD添加の影響が観測されないことから、DPPMPOはピロリン環側からよりむしろ、2位のリン原子上のフェニル環側から包接されていると考えれば、上の結果を容易に説明することができる(Fig. 12の包接化合物の構造を参照)。

DPPMPOは、CDの包接によりラジカルのトラップ速度に大きな影響を受けることがないにもかかわらず、包接によりスピニアダクトが安定化するという優れた特徴をもっているといえる。

## 4. おわりに

本稿では、いくつかのトラップ試薬による短寿命ラジカルのトラップを例に挙げ、ESR法による研究の有用性を示しながら、CDの包接によるスピニアダクトの安定化効果およびトラップ速度に及ぼす効果について紹介した。トラップ試薬やトラップされるラジカル種の違いにより、CDの包接挙動も変化するであろう。包接

現象の利用は容易にスピニアダクトの安定化が得られる方法のひとつであり、修飾CDのひとつの利用法として注目したい。修飾CDの応用は、医薬品、食品などの分野以外にも、今後、ますます盛んになると期待している。

なお、本研究はオクラホマ医学研究所研究員、Y. Kotake博士との共同研究から発展したものであり、研究を進めるにあたり多くの有益な助言を頂いた。ここに深く感謝いたします。また、研究を共にした学生の宮田敦士君に謝意を表する。

### 参考文献

- 1) E. G. Janzen, *Acc. Chem. Res.*, **1971**, *4*, 31.
- 2) G. R. Buettner, *Free Radic. Biol. Med.*, **1987**, *3*, 259.
- 3) G. R. Buettner and L. W. Oberley, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **1978**, *83*, 69.
- 4) K. Makino, H. Imaishi, S. Morinishi, T. Takeuchi and Y. Fujita, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **1986**, *141*, 381.
- 5) ナノマテリアル・シクロデキストリン、シクロデキストリン学会編、米田出版、2005.
- 6) H. Karoui and P. Tordo, *Tetrahedron Lett.*, **2004**, *45*, 1043.
- 7) Y. Kotake and E. G. Janzen, *J. Am. Chem. Soc.*, **1989**, *111*, 5138.
- 8) Y. Sueishi, H. Tobisako and Y. Kotake, *J. Phys. Chem. B*, **2004**, *108*, 12623.
- 9) Y. Sueishi, M. Negi and Y. Kotake, *Chem. Lett.*, **2006**, *35*, 772.
- 10) D. I. Potapenko, E. G. Bagryanskaya, V. V. Reznikov, T. L. Clanton and V. V. Khramtsov, *Magn. Reson. Chem.*, **2003**, *41*, 603.
- 11) D. I. Potapenko, T. L. Clanton, E. G. Bagryanskaya, N. P. Gristan, V. A. Reznikov and V. V. Khramtsov, *Free Radic. Biol. Med.*, **2003**, *34*, 196.
- 12) Y. Sueishi, C. Yoshioka, C. Olea-Azar, L. A. Reinke and Y. Kotake, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **2002**, *75*, 2043.
- 13) Y. Sueishi, D. Yoshioka, C. Yoshioka, S. Yamamoto and Y. Kotake, *Org. Biomol. Chem.*, **2006**, *4*, 896.
- 14) T. Taniguchi and K. P. Madden, *J. Am. Chem. Soc.*, **1999**, *121*, 11875.

### 筆者紹介

氏名：末石 芳巳 (Yoshimi Sueishi)

所属：岡山大学大学院自然科学研究科 機能分子化学専攻

連絡先：〒700-8530 岡山市津島中3-1-1

TEL: 086-251-7834 FAX: 086-251-7853

E-mail: ysueishi@cc.okayama-u.ac.jp

出身大学：岡山大学大学院理学研究科化学専攻

学位：理学博士(大阪大学)

専門分野：磁気共鳴(ESR)、高圧化学、超分子化学

主な著書：(1) 現代化学の基礎 (培風館)

(2) 高圧研究機器設計図集 (北斗プリント社)

# エイズから見た 感染症研究の最前線

## その5 抗 HIV 剤開発

熊本大学エイズ学研究センター・病態制御分野 吉村和久

### 1. はじめに

#### 1.1. エイズを取り巻く現状

今、皆さんは『エイズ』と聞いてどのような感想を抱くのでしょうか？十年前だと10人中10人が、「助からない死の病」というイメージを抱いていたのではないのでしょうか。ところが、現在少しでもこの病気に関心のある人は、「たくさん薬もあることだし、既に慢性疾患の一つで、薬飲んどけば大丈夫なんですよ？」という感想を持たれている方も多いかもしれません。実際、日本では合剤を含めると20を超える抗 HIV 薬が認可されており(Table 1)、今後も認可待ちの薬が門前市をなしています。そして、HAARTと呼ばれる多剤併用療法により、きちんと服薬を守りさえすれば、ほとんどの方のウイルス量は半年以内には測定感度以下に抑えられます。また、正常値の半分以下になっていたCD4の数も上昇し、カビで真っ白だった口の中もすっかりきれいになり、食欲も出てきます。そして、一年もたつと、感染を告知され一睡もできなかった夜のことなどすっかり忘れてしまっているのです。これは、治療薬の無い頃(といってもほんの15~6年前です)からすると夢のようなことで、薬剤開発に携わった多くの方々の努力の賜物であることは間違いありません。その一方で、日本が先進国中で唯一感染者数が増加の一途をたどっているということも、厳然とした事実として存在しています。

#### 1.2. 新規抗 HIV 薬のニーズの背景

「薬を飲まなかったら、命が無い。」これほど強いモチベーションを与える言葉はありません。その分、「もう大丈夫じゃないかな？」という気持ちが出てきたとき、あれほど一生懸命飲んでいた薬も、一回ぐらいなら飲み忘れを見逃すようになり、あっという間に服薬率が50~60%位に低下していきます。なぜなら、今の HIV 薬は、抗ウイルス効果に主眼がおかれ、「ある程度」の副作用は目をつぶっているため(「ある程度」とは、患者さん方が決めたのではなく、多分一回も飲んだことが無い、開発・販売・認可した側が決めたものと思われる) HIV 感染による諸症状がなくなると、差し引き薬の副作用だけが残ります。つまり、飲むたびに、お腹が緩くなるし、意味もなくイライラしたり、夜中に変な夢を見たりします。また、長い間飲み続けると体型が変わってきますし、糖尿病や心臓病になる人も増えてきます。人間とは弱いもので、そうなるとますます100%飲み続けることは困難になっていきます。もちろん、主治医や、スタッフが服薬の必要性や副作用の緩和の方法等を根気よく説明し続けることで、モチベーションを維持し良好なコントロールができていない患者さんも大勢

おられます。ただ、なかなか全ての施設で全ての患者さんに行うことは困難なのです。

一方、HIVの本当の恐ろしさは、そのしつこいまでの感染維持能力にあると言っても過言ではありません。少しでも薬剤の濃度が低下すると、すぐさまウイルスの増殖は再開されます。しかも、悪いことに中途半端に薬が血中に存在するために薬剤耐性変異を持ったウイルスが出てきたりします。実際、欧米では初回治療の半数以上が、副作用と耐性発現のために、一年以内に治療のレジメを変更しているというデータもあります。こうなると、20種類以上薬があるといっても、実は大きく分けて逆転写酵素阻害剤とプロテアーゼ阻害剤の2つしかないので、一度耐性が出ると、交叉耐性の関係で使える組み合わせが極端に減少してしまいます。すると現場の関係者は「耐性に効く薬が必要だ。」とか、「飲みやすくして、気分が悪くならないものはないのか。」と、勝手なことを言います。このように、HIVというウイルスの性質および人間の本质上、常に新しい薬剤の要求は続いていくのです。

今回、現在開発が進行中もしくは臨床使用に近い HIV-1 薬を中心に紹介していきたいと思います。

### 2. 新規 HIV 薬剤の開発

#### 2.1. 侵入阻害剤

このシリーズの1回目と2回目(News No.121,122)に、詳しく説明されていますように、HIVはCD4とケモカイン受容体(CXCR4またはCCR5)の2種類の分子と結合することでTリンパ球に侵入することが分かっています。つまり、この過程を阻止すると感染が成立しなくなりますので、薬剤のターゲットとしては格好の場所といえます。この結合阻害には、ウイルス側をターゲットにするものと、受容体側をターゲットとするものの2通りが考えられます。

前者の代表である『PRO-542』は、合成したCD4分子にIgGを付けたもので、本物の細胞表面のCD4分子に付着できないようにして、感染を阻害します。phase まで終了し、そこそこの効果もあり、安全性にも問題ないのですが、現在開発が中断しています。どうやら開発している会社が、他の薬剤の方を一押しにして開発しているためらしいです(後述する『PRO-140』)。(財)化学及血清療法研究所(化血研)と熊本大学エイズ学研究センター病態制御分野(松下修三教授)では、HIV-1のgp120の三番目の可変領域(V3 loop)に対する治療用中和単クローン抗体『KD-247』を開発中です。日本や米国で多いsubtype Bのウイルスで保存されている、V3 loopのtip部分の-GPGR-配列を認識し中和します。抗体のため、血中半減期が長く、月に1-2回の注射で十分効果が持続します。現在米国でphase Ibが進行中です。

一方、後者の宿主側の受容体をターゲットとする薬剤は、抗エイズ薬の中では異色の薬剤群です。なぜなら、これまで HIV 薬開発のコンセプトは、ウイルス特異的な酵素や構造蛋白を攻撃するものだったからです。逆転写酵素しかり、プロテアーゼしかり、インテグラーゼやエンペロープ蛋白(gp120, gp41)しかりです。ところが、CCR5やCXCR4, CD4というのは細胞側のもので、阻害剤の開発には二の足を踏んできました。宿主側の分子をブロックすることで、どのような副作用が発現するか分からなかつ

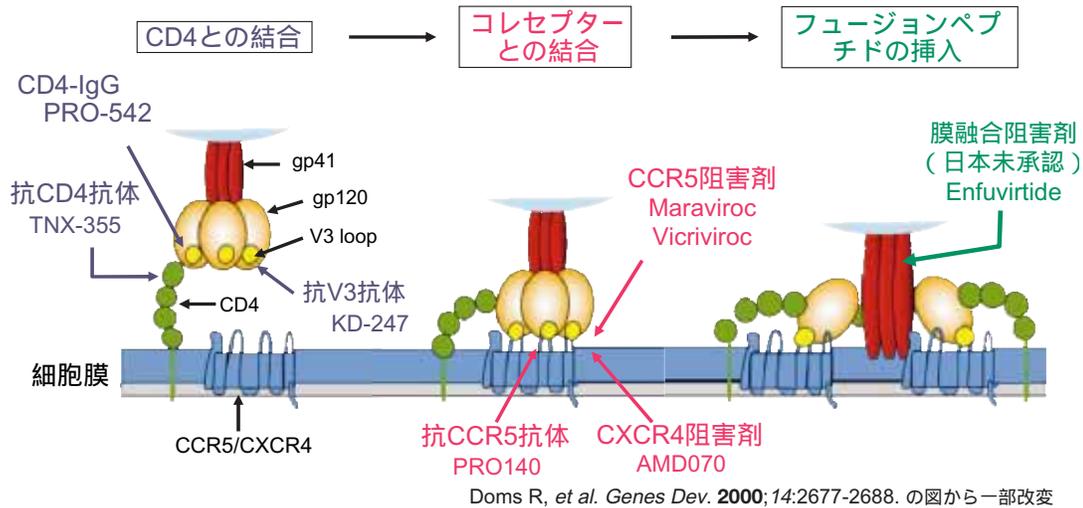


Fig. 1. HIV-1 侵入阻害剤の作用部位

たからです。それでも、現場の要請と圧倒的な抗ウイルス効果の強さや、作用点が違うことなどから、これらの阻害剤の開発が予想外に速いスピードで進んできました。CCR5 阻害剤の『**Celzentry® (Maraviroc; UK-427,857)**』は2007年の8月にアメリカFDAに認可され、近々日本でも使用可能になりますし、『**Vicriviroc (SCH-D)**』も phase が進行中です。CCR5 阻害剤は、R5ウイルスにしか効かないため、投与前にウイルスのフェノタイプ検査が必要であり、検査時に見つからなかったX4ウイルスが増えてくる危険性もありますが、少なくとも既存の薬剤に高度耐性になったウイルスに対してもR5ウイルスである限りにおいて、単剤でもウイルス量を1/100にまで減らすことができます。我々の研究室では、CCR5阻害剤と上述した中和単クローン抗体KD-247が強い相乗効果を示すことを試験管内実験で確認しています。このように、これらの薬剤とその他の抗ウイルス薬の組み合わせで、思わぬ相乗効果が生まれる可能性も期待されています。R5だけでなくX4ウイルスもカバーする必要があるため、CXCR4阻害剤である『**AMD070(AMD11070)**』も現在 phase I が行われています。その他、『**TNX-355**』というCD4分子に対する治療用単クローン抗体があります。静脈注射で投与する必要がありますが、一回打つと2-3週間もつので、月2回投与ですみます。アメリカで phase I 試験まで終了しています。CCR5に対しては直接結合する『**PRO140**』という単クローン抗体も、phase I が終了しています。半減期が2週間と長く、他の薬剤との相乗効果も見られており、FDAからファーストトラック(有望なので優先して審査するというお墨付き)の指名を受けており、予想より早く臨床の場にデビューするかもしれません。

## 2.2. インテグラーゼ阻害剤

インテグラーゼの主な働きは、逆転写後のプロウイルスDNAの3'末端に存在するGとTを切断するプロセッシング反応と、ウイルスゲノムに組み込む結合反応です。また、ヒトには存在しないHIV特異的な酵素で、逆転写酵素やプロテアーゼと同様にHIVの複製

において重要な酵素です。そのため、抗HIV薬の有望なターゲットとして以前より開発が続けられてきました。『**Isentress® (Raltegravir; MK-0518)**』は、つい最近(2007年10月)米国FDAに認可されたばかりのインテグラーゼ阻害剤です。HIV未治療の患者においてピリアード®(テノホビル)とエビビル®(ラミブジン)とRaltegravir、もしくはコントロール群としてストックリン®(エファピレンツ)を併用して24週間試験を行ったところ、Raltegravir投与群ではHIVウイルス量が50コピー/mlに減少した患者の割合が85%~95%で、コントロール群(92%)とほぼ同等の結果でした。ただ、HIVウイルス量の低下速度は、Raltegravir併用群の方が明らかに速かったです。この薬剤は、肝臓のCYP3A4の代謝を受けないため、CYP3A4阻害効果を持つノービア®(リトナビル)のブーストを必要としません。よって、併用薬剤を一剤減らせます。もう一つのインテグラーゼ阻害剤の『**Elvitegravir (GS9137/JTK-303)**』も phase I まで進んでいます。Elvitegravirはキノロン系抗菌剤を修飾した構造を持ち、マグネシウムイオンと結合することで、インテグラーゼの働きを抑えます。また、試験管内において多剤耐性HIV-1ウイルスに対しても抗ウイルス活性が示され、他の抗レトロウイルス薬との相乗効果も確認されています。ただし、Elvitegravirは、CYP3A4の代謝を受けるので、治療域に到達させるために低用量のノービア®をブーストとして用いる必要があります。インテグラーゼ阻害剤の不安な点は、長期使用による副作用が予測できないことと、一部交叉耐性が認められており、どちらか一方の使用で耐性が出たとき、他方は使えなくなる危険性があることです。それでも、切れ味鋭いウイルス抑制効果に大きな期待がかかっています。

## 2.3. 非ヌクレオチド系逆転写酵素阻害剤(NNRTI)

一日一回投与の中心的な薬剤として、プロテアーゼ阻害剤とともにHAARTの4番打者の地位を長らく務めてきました。しかし、近年耐性ウイルスが問題となってきており、初感染の患者からもその耐性変異が認められるケースが増えてきています。また、中

Table 1. 日本で承認されている抗HIV-1薬(2007年11月現在)

一般名	略号	商品名	承認時間(日本)
<b>核酸系逆転写酵素阻害剤(NRTI)</b>			
ジドブジン	AZTまたはZDV	レトロビル	1987年11月
ジダノシン	ddl	ヴァイデックス/ ヴァイデックスEC	1992年7月/ 2001年3月
ザルシタピン	ddc	ハイビット	1996年4月
ラミブジン	3TC	エビビル	1997年2月
サニルブジン	d4T	ゼリット	1997年7月
ジドブジンと ラミブジンの合剤	AZT/3TC またはCBV	コンビビル	1999年6月
アバカビル	ABC	ザイアジェン	1999年9月
テノホビル	TDF	ピリアード	2004年4月
アバカビルと ラミブジンの合剤	ABC/3TA またはEPZ	エブジコム	2005年1月
エムトリシタピン	FTC	エムトリバ	2005年4月
テノホビルと エムトリシタピンの合剤	TDF/FTC またはTVD	ツルバダ	2005年4月
<b>非核酸系逆転写酵素阻害剤(NNRTI)</b>			
ネビラビン	NVP	ピラミューン	1998年12月
エファビレンツ	EFV	ストックリン	1999年9月
デラビルジン	DLV	レスクリプター	2000年5月
<b>プロテアーゼ阻害剤(PI)</b>			
インジナビル	IDV	クリキシバン	1997年4月
サキナビル	SQV	インビラーゼ	1997年9月
ネルフィナビル	NFV	ピラセプト	1998年3月
リトナビル	RTV	ノービア	1999年9月
ロピナビルと リトナビルの合剤	LPV/r	カレトラ	2000年12月
アタザナビル	ATV	レイアタツ	2004年1月
ホスアンプリナビル	FPV	レクシヴァ	2005年1月
ダルナビル	DRV	ブリジスタ	2007年11月(予定)

中枢神経系の副作用により、中断を余儀なくされる症例も多いのです。そのため、このクラスの新規薬剤で求められることは、既存の薬剤と交叉耐性を示さないということと、中枢神経系の副作用の軽減です。言うのは簡単ですが、このハードルはなかなか高かったらしく、2000年にレスクリプター®(デラビルジン)が認可されて以来、『Etravirine (TMC125)』は、徐々に phase まで進んだ NNRTI で、FDA の認可も近いと考えられています。この薬剤の最も優れたところは、これまでの NNRTI に完全に耐性になったウイルスにも効果があるという点です。つまり、耐性のプロフィールがかなり違っているのです。ただし、このクラスの薬剤で以前から指摘されていたプロテアーゼ阻害剤との併用で血中濃度が低下するという問題点は引き継がれているようなので、両者の併用には注意が必要になりそうです。この Etravirine のすぐ後を追いかけるように『Rilpivirene (TMC278)』が現在 phase まで進んできています。この薬剤は、これまでの NNRTI がたった一つの耐性変異で効かなくなっていたのに比べ、これまでに知られている変異が 8 つ以上集まって初めて効かなくなります。具体的には、L100I/K103N や K103N/Y181C などを持った高度 NNRTI 耐性ウイルスにも充分効果があるということです。また、一日 25 mg と 75 mg と 150 mg 投与群で 48 週後の血中ウイルスの測定感度以下 (< 50 コピー/ml) になった人の割合を比較す

ると、驚いたことに全ての群で約 80% と、ほとんど変わらないぐらいの強い抗ウイルス効果を示しました。そして、これは同時に比べた一日 600 mg 投与のエファビレンツと同等の数字でした。CD4 数の上昇が 75 mg 群で最も良かったので、今後は 75 mg/日 で臨床治験がすすめられることになっています。投与濃度が非常に低いので、中枢神経症状がエファビレンツに比べると非常に少ないという利点があります。ただ、血中半減期が非常に長いので、蓄積効果による副作用発現がどうなるかを見守っていかなければいけません。Phase の結果が最も楽しい薬剤の一つです。

#### 2.4. ヌクレオチド系逆転写酵素阻害剤(NRTI)

HIV-1 の治療の歴史は、NRTI のレトロビル®(ジドブジン)から始まりました。それ以降、このクラスの薬剤は、HAART における洗いやパイプレーヤーとして、目立たないながらも重要な役割を担ってきました。歴史が長い分耐性の蓄積も多く、NNRTI と同様に耐性プロフィールの異なる新薬の登場が切望されています。『Apricitabine (AVX754/SPD754)』は、これまでの NNRTI に強い耐性を持つウイルスに対して活性を示す、新しいシチジンアナログです。現在 phase b に入っており、エビビル®(ラミブジン)で治療が失敗した M184V 変異を持つ HIV 感染患者に対して試験が行われています。本剤は、FDA からファーストトラック

として指定を受けています。『Racivir』は、HIV-1およびB型肝炎ウイルス(HBV)の両方に対する抗ウイルス活性を有しています。現在 HIV-1 の治療薬として phase / が行われています。『Elvucitabine (L-Fd4C)』もレトロビル®やエビビル®の耐性ウイルスにも効果があり、HBV にも有効です。現在 phase が進行中です。珍しい NRTI として『KP-1461 (KP-1212)』があります。この薬は、他の NRTI と違い、チェーンターミネーターとして抗ウイルス効果を発揮するのではなく、ウイルスのゲノムに変異を蓄積していった、ウイルスを増えられなくしていきます。現在 phase が行われています。

### 2.5. マイクロビサイド

マイクロビサイドとは、膣や肛門の中に入れておいて、HIV の感染を阻止するような物質（錠剤・ゼリー状・シート状・スポンジ状のもの）のことをいいます。現在、FDA の Investigational drugs に指定されるもので最も数が多いのはこのマイクロビサイドです。これらは、予防という側面から開発されている唯一の薬剤とっていいでしょう。要時使用という使い方が可能ということは、経済的にも副作用の面でも大きな利点があります。ただし、ハイリスク群と比較したとき、使用した方の感染率がかえって高かったという結果も出ており、今後より慎重な研究が必要です。

## 3. 終わりに

ここでご紹介できなかった開発中の薬剤は、まだまだたくさんあります。また、ワクチンの開発も道半ばではありますけれど、確実に前進して行っています(と信じています)。新規薬剤の開発と耐性ウイルスの出現は、一見イタチごっこのように見えます。でも、明らかに、イタチ(ウイルス)の足は目に見えて遅くなり、隠れたまま屋根裏から出てこなくなり、その時間も長くなっています。あと少しで、あきらめて出て行ってくれるかもしれません。そのためには、研究者はより効果的な薬剤を開発し、臨床医は服薬の重要性を説き、家主(患者さん)は巣穴からイタチ(ウイルス)が顔を出さないか辛抱強く見張っていなければならないのです。手負いのイタチ(耐性ウイルス)を逃がすと、次に捕まえるのが大変になりますので、くれぐれもご用心ください。

### 著者紹介



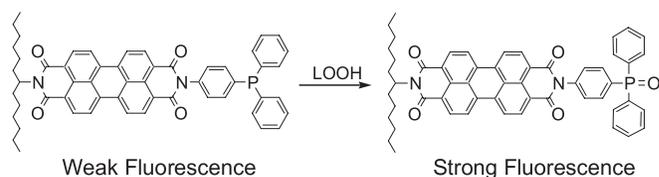
氏名：吉村 和久（よしむら かずひさ）  
 所属：熊本大学エイズ学研究センター 病態制御分野  
 住所：熊本市本荘 2-2-1 TEL：096-373-6536  
 研究テーマ：HIV の中和抗体からの逃避機構の解明

## 九州大学 - 同仁化学組織対応型連携に関するお知らせ

九州大学と小社は、九州大学での優れた研究成果を迅速に実用化することを目的に組織対応型(包括的)連携契約を締結しております。下記の技術に関して製品化を検討した結果、この度、試作品としてご紹介ができることとなりました。詳細は16ページをご参照ください。

### No.002 過酸化脂質計測用蛍光試薬

九州大学の宗らは、新規の過酸化脂質蛍光検出試薬として Spy-HP (swallow-tailed perylene derivative for hydroperoxide) を開発した。Spy-HP はトリフェニルホスフィンに蛍光基であるペリレン類を連結した構造であり、また脂質への親和性を向上するためアルキル鎖を有している。Spy-HP に脂溶性過酸化物である *m*-chloroperoxybenzoic acid (MCPBA) を添加すると、ホスフィンオキシド体の形成に伴い蛍光が大きく増強することが確認された。本化合物の蛍光波長は十分に長く ( $\lambda_{ex} = 524 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{em} = 535 \text{ nm}$  in methanol) DPPP のような短波長励起が必要な従来の過酸化脂質計測用蛍光試薬で問題となる生体試料由来の自家蛍光の影響や生細胞へのダメージを大きく軽減できる。また本化合物の反応体(ホスフィンオキシド体)の蛍光量子収率は極めて高くなっている (~1 in methanol)。このように本試薬は、過酸化脂質計測用蛍光試薬として非常に優れた特徴を有している。



N. Soh, T. Ariyoshi, T. Fukaminato, K. Nakano, M. Irie, T. Imato, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2006**, 16(11), 2943.

この他にも様々な技術を今後もご紹介し、製品化に繋げていければと考えております。関心のあるテーマがございましたら是非、ご連絡ください。

### 学会展示のお知らせ

日本農芸化学会 2008 年度大会  
 附設展示会  
 期日：2008 年 3 月 27 日(木) ~ 28 日(金)  
 会場：名城大学天白キャンパス  
 体育館 1 階・3 階  
 (名古屋市天白区塩釜口 1 丁目 501 番地)

皆様のお越しをお待ちいたしております。

# Topics on Chemistry

## イガイな万能表面修飾法

株式会社同仁化学研究所 渡辺 栄治

バルク材料表面の化学修飾は、化学、生物学、材料科学や工学技術など多くの分野で重要な役割を果たしている。従来はイオンビームを用いた表面特異的な化学反応や自己組織化膜等が使用されてきたが、汎用的なものではなく、広い領域の材料に用いることはできなかった。例えばクロロシランやアルコキシシラン化合物は容易に酸化物表面を修飾することができるが、金属やポリマーフィルムに用いることはできない。

様々な材質の材料に適応可能な万能な表面修飾法として、Russelらはランダム共重合体の薄膜のクロスリンクに基づいた表面相互作用の制御と修飾方法を報告している<sup>1)</sup>。スチレンとメタクリル酸メチル、及び反応性のベンゾシクロブテンのランダム共重合体をスピコート後、熱によりクロスリンクする。膜厚はスピコート時のポリマー濃度で、界面相互作用の強さはスチレンとメタクリル酸メチルの比でコントロールすることが可能である。本手法により、金、シリコン、アルミニウム、ポリイミド、PET基板表面を同様に修飾することに成功している。

最近、更に容易に且つ応用範囲の広い汎用表面修飾法がMessersmithらによって報告された<sup>2)</sup>。Messersmithらは貝の一種であるイガイが濡れた面やPTFE表面など吸着し難い表面に張り付くことができる点に着目した。イガイの吸着タンパク質は3,4-dihydroxy-L-phenylamine(DOPA)とリジン残基を多く含んでいる。DOPAや他のカテコール化合物は無機化合物のコーティング剤として良く用いられているが、有機物表面への適用は難しかった。そこで、Messersmithらはイガイのように様々な材質の表面に吸着するためには、カテコール(DOPA)とアミン(リジン)が必要であると考え、両方の官能基を有するドーパミンを利用した方法を開発した (Fig. 1)。

ドーパミン水溶液(2 mg/ml, pH8.5)に基板を浸漬すると、高分子薄膜の自発的な堆積が起こる。これは、ドーパミンの酸化により5,6-ジヒドロキシインドールが生成し、それが重合してポリドーパミンが形成しているためである (Fig. 2)。AFM観察の結果、膜厚は浸漬時間に依存し、24時間で50 nmまで増加した。XPSによる表面分析では、3時間以上浸漬した25種類の異なる材質の基板で基板特異的なシグナルが消失していることが確認され、窒素/炭素比はドーパミンと同様の値であった。ポリドーパミンの形成は、ゲル浸透クロマトグラフィーと飛行時間型2次イオン質量分析(TOF-SIMS)によって確認された。

本手法では、貴金属(Au, Ag, Pt, Pd)、金属の自然酸化膜(Cu, ステンレス、NiTi形状記憶合金)、酸化物(TiO<sub>2</sub>, SiO<sub>2</sub>, Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>、

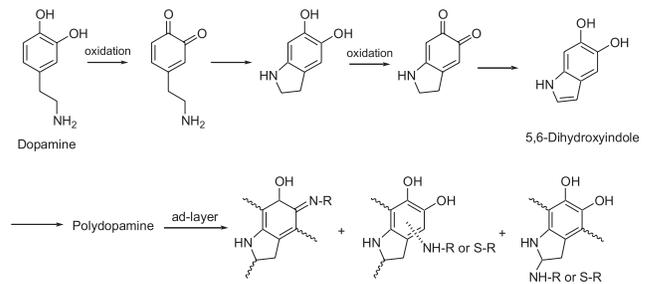


Fig. 2 ポリドーパミン及び2次反応の反応スキーム

Nb<sub>2</sub>O<sub>5</sub>、半導体(GaAs, Si<sub>3</sub>N<sub>4</sub>)、セラミックス、合成ポリマー(PS、PE、PC、PET、PTFE など)の全ての材質の表面にポリドーパミンをコーティングすることが可能であった。

また、ポリドーパミンは2次的な反応が可能であり、非常に用途の広いプラットフォームであることが明らかとなった。例えば、カテコール部の金属との結合能は、無電解メタライゼーションによって様々な材質(セラミック、ポリマー、金属)の均一な金属コーティングに利用できる。論文中ではニトロセルロースフィルム、コイン、プラスチック製サイコロの銅コーティングについて写真付きで紹介されている。

更に、ポリドーパミンは様々な有機物と反応し、機能性の有機膜を生成することが可能である。例えば、酸化条件下でカテコールはチオールやアミンとマイケル付加やシッフ塩基反応によって反応可能である。ポリドーパミン被覆基板をアルカンチオール溶液に浸漬すると、金基板上のそれと同様のアルカンチオール単分子膜が形成される。Messersmithらはこの単分子膜を「pseudo-SAM (pSAM)」と呼んでいる。オリゴエチレングリコールを有するアルカンチオールで作成されたpSAMは線維芽細胞を吸着し難く、これは金基板上のSAMの性質と同様のものではなかった。

このように、イガイから発想されたこの新しい基板修飾法は材質の如何に関わらず修飾可能な万能な方法である。また、金属やアルカンチオールSAMで更に被覆できることによりその応用性は更に広がる。今後、様々な分野で利用されるものと期待される。

- 1) D. Y. Ryu, K. Shin, E. Drockenmuller, C. J. Hawker, T. P. Russell, *Science*, **2005**, *308*, 236.
- 2) H. Lee, S. M. Dellatore, W. M. Miller, P. B. Messersmith, *Science*, **2007**, *318*, 426.

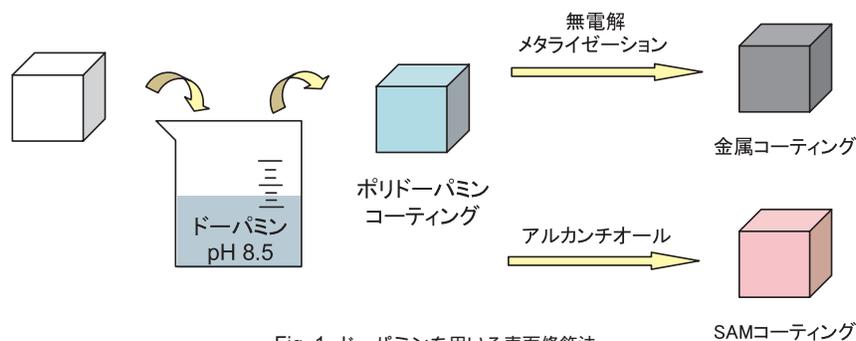


Fig. 1 ドーパミンを用いる表面修飾法

## 新製品

### 界面活性剤スクリーニングセット

#### Detergent Screening Set (first choice- )

界面活性剤は、膜タンパク質の可溶化や生化学試料溶液の安定化などに使用されています。しかし、どの界面活性剤が適しているのかは実際に使用してみないと分からないのが実情です。

そのため、いくつかの界面活性剤をまずは試し、試料に適した界面活性剤の種類を見つけ出すことが重要となります。

汎用の界面活性剤をセットにした製品 Detergent Screening Set (first choice)を一部変更し、Detergent Screening Set (first choice- )として発売いたします。

#### <製品内容>

CHAPS, *n*-Dodecyl- $\beta$ -D-maltoside, *n*-Octyl- $\beta$ -D-glucoside, Sodium cholate(purified), MEGA-8

以上5種類の各200mg包装

Detergent Screening Set (first choice)の Sucrose monolaurate を MEGA-8 に変更したタイプ

#### <応用例>

##### CHAPS

マス肝細胞：ミクロソーム（電気泳動）<sup>1)</sup>

哺乳類の培養細胞：繊維芽細胞成長因子（抽出・精製）<sup>2)</sup>

ウシ肝細胞：T3 結合性タンパク質（抽出・精製）<sup>3)</sup>

NG108-15, Hybrid cell：Opiate receptors（抽出・精製）<sup>4)</sup>

リンパ球：5'-ヌクレオチターゼ（抽出・精製）<sup>5)</sup>

anti-GST antibody, etc.（非特異的吸着防止[SPR]）<sup>6)</sup>

Hepatic RHE（単離）<sup>7)</sup>

bacteriorhodospin（抽出）<sup>8)</sup>

マウス肝細胞：プロラクチンレセプター（抽出）<sup>9)</sup>

##### *n*-Dodecyl- $\beta$ -D-maltoside

グラム陰性菌：tetracyclin cation/proton antiporter（抽出・精製）<sup>10)</sup>

ウシ心臓ミトコンドリア：ATP synthase（結晶化）<sup>11)</sup>

Paracoccus denitrificans：nitric oxide reductase BC complex（抽出・精製）<sup>12)</sup>

大腸菌：Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter（抽出・精製）<sup>13)</sup>

##### *n*-Octyl- $\beta$ -D-glucoside

Trypanosoma cruzi：Trypanothione reductase（結晶化）<sup>14)</sup>

Rhodobacter sphaeroids：reaction center（結晶化）<sup>15)</sup>

Thermus thermophilus HB8：DNA excision repair enzyme UvrB（結晶化）<sup>16)</sup>

ヒト：17 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase (17 $\beta$ -HSD1)（結晶化）<sup>17)</sup>

大腸菌：SecE（抽出・精製）<sup>18)</sup>

大腸菌：ラクトース輸送担体（抽出）<sup>19,20)</sup>

HL-60, HL-60R：PKC（抽出）<sup>21)</sup>

ラット肺胞：SP-A, SP-D（抽出）<sup>22)</sup>

#### MEGA-8

Trypanosoma cruzi：Trypanothione reductase（結晶化）<sup>14)</sup>

#### <参考文献>

- 1) G. H. Perdew, *et al.*, *Anal. Biochem.*, **1983**, 135, 453.
- 2) Y. Matuo, *et al.*, *Cytotechnology*, **1998**, 1, 309.
- 3) R. Horiuchi, *et al.*, *Eur. J. Biochem.*, **1989**, 183, 529.
- 4) W. F. Simonds, *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1980**, 77, 4623.
- 5) M. T. Lehto, *et al.*, *Biochem. J.*, **1998**, 332, 101.
- 6) K. Andersson, *et al.*, *Anal. Chem.*, **1999**, 71, 2475.
- 7) R. Scindler, *et al.*, *Eur. J. Biochem.*, **1998**, 251, 863.
- 8) J. Cladera, *et al.*, *Eur. J. Biochem.*, **1997**, 243, 798.
- 9) D. S. Liscia, *et al.*, *J. Biol. Chem.*, **1982**, 257, 9401.
- 10) C. Yin, *et al.*, *Molecular Microbiology*, **2000**, 38, 482.
- 11) R. Lutter, *et al.*, *Biochem. J.*, **1993**, 295, 799.
- 12) J. Hendriks, *et al.*, *Biochemistry*, **1998**, 37, 13102.
- 13) K. A. Williams, *et al.*, *EMBO J.*, **1999**, 18, 3558.
- 14) R. L. Krauth-Siegel, *et al.*, *FEBS Lett.*, **1993**, 317, 105.
- 15) J. P. Allen, *Proteins*, **1994**, 20, 283.
- 16) A. Shibata, *et al.*, *Acta Cryst.*, **1999**, D55, 704.
- 17) S. X. Lin, *et al.*, *J. Endocrinol.*, **1996**, 150, S13.
- 18) H. Tokuda, *et al.*, *Fed. Eur. Biochem. Soc.*, **1991**, 279, 233.
- 19) 土屋友房, “膜タンパク質の可溶化と界面活性剤”, 化学と生物実験ライン 5, 廣川書店 (1990).
- 20) M. J. Newman, *et al.*, *J. Biol. Chem.*, **1981**, 256, 11804.
- 21) M. Nishikawa, *et al.*, *Cancer Res.*, **1990**, 50, 621.
- 22) J. R. Wright, *et al.*, *Am. J. Physiol.*, **1999**, 276, 650.

品名	容量	価格(¥)	メーカーコード
Detergent Screening Set (first choice- )	1 set	14,000	DS06

#### 販売中止品のお知らせ

以下の製品を販売中止とさせていただきます。  
在庫等は小社マーケティングまでお問い合わせください。  
Detergent Screening Set (first choice)に関しては、今後は Detergent Screening Set (first choice- )をご使用ください。

メーカーコード	品名
S021	Sucrose monocaprante
S023	Sucrose monolaurate
DS04	Detergent Screening Set (first choice)

新製品

開発元 DOJINDO MOLECULAR TECHNOLOGIES, INC.

蛍光ラベル化キット

HiLyte Fluor™ 750 Labeling Kit – NH<sub>2</sub>

HiLyte Fluor™ 750 Labeling Kit – NH<sub>2</sub> は、抗体など分子量 50,000以上でアミノ基を有する少量のタンパク質を蛍光標識するためのキットです。本キットは、簡便な操作性、高い回収率、高い再現性などの特長を持っています。現在小社で販売しております 488 nm 励起の Fluorescein、より長波長の 550 nm、650 nm 付近で励起可能な HiLyte Fluor™ 色素と比較して、更に長波長の近赤外光で励起されるため、免疫染色などのアッセイにおいてバックグラウンドでの観察が可能となります (Fig.1)。

標識タンパク質量は 1 サンプルあたり 50-200 µg です。わずか 2 時間で HiLyte Fluor™ 750 標識タンパク質を得ることができ、得られた標識体はそのまま免疫染色などの様々な用途に利用することができます。

HiLyte Fluor™ 色素は米 AnaSpec 社が開発した蛍光色素です。HiLyte Fluor™ 750 は Alexa Fluor® 750 や Cy7 と類似した蛍光特性を示します。蛍光強度は Alexa Fluor® 750 や Cy7 より強く、トランスイルミネーターにて UV 照射し続けた場合の蛍光強度の減少 (退色) の程度は Alexa Fluor® 750 と同等です (Fig.2, 3)。

HiLyte Fluor™ は AnaSpec 社の商標です。  
Alexa Fluor® はインビトロジェン株式会社の登録商標です。

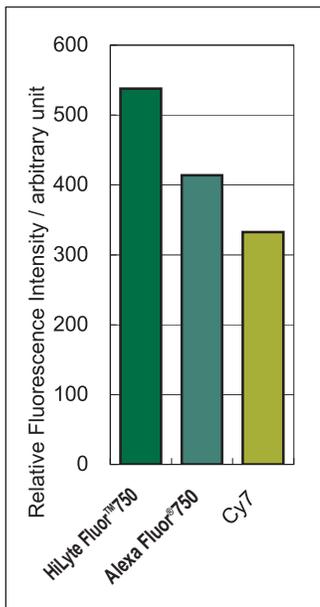


Fig. 2. 色素の蛍光強度比較

<キット内容>

- NH<sub>2</sub>-Reactive HiLyte Fluor™ 750 3 tubes
- WS Buffer 4 ml × 1
- Reaction Buffer 500 µl × 1
- Filtration Tube 3 tubes

<特長>

- 約 2 時間で標識体が調製できる。
- Filtration Tube を用いた分離操作により高い回収率で標識体が得られる。
- 付属の保存溶液で標識体の長期保存ができる。

<本キット以外に必要なもの>

- 10 µl, 200 µl マイクロピペッター
- インキュベーター(37 °C)
- マイクロチューブ (標識体保存用)
- 遠心機 (マイクロチューブ用)
- DMSO

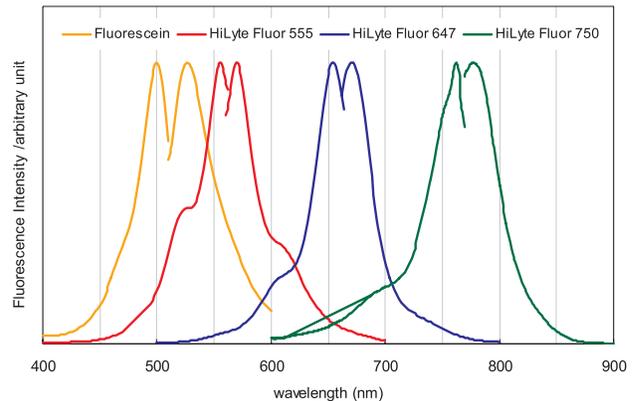


Fig. 1. HiLyte Fluor™ 750 標識抗体の励起・蛍光スペクトル

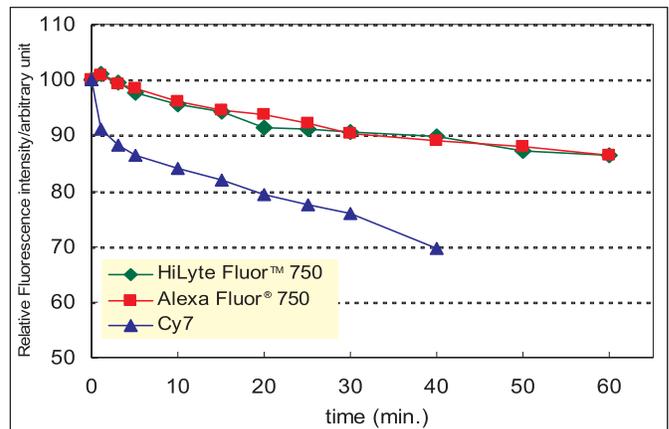
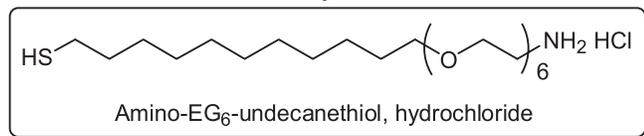


Fig. 3. 各色素をトランスイルミネーターにて UV 照射した場合の蛍光強度変化

品名	容量	価格(¥)	メーカーコード
HiLyte Fluor™ 750 Labeling Kit – NH <sub>2</sub>	3 samples	28,000	LK16

## 新製品

## Self Assembled Monolayer 研究用試薬

Amino-EG<sub>6</sub>-undecanethiol, hydrochloride

## &lt; 特長 &gt;

- 非特異的吸着の少ないSAMを形成できる
- 蛋白質、DNAなど様々な物質をSAM上に固定化できる

固体表面に種々の分子を配向・集積させる方法の一つである自己組織化法は、簡便に高密度・高配向な自己組織化単分子膜(Self Assembled Monolayers: SAMs)を構築することができるため、研究・応用が活発に行われています。特に、末端にチオールを有する化合物は金表面と反応してAu-S結合し、安定なSAMsを形成することから汎用されています。

SAMsの性質は、そのアルキル鎖長や末端の官能基、主鎖の親水性などにより変化し、多彩な機能を固体表面に導入することが可能であり、表面プラズモン共鳴(SPR)や水晶振動子マイクロバランス(QCM)など、金属板を利用するセンサーに広く用いられています。

SPRやQCMを用いた測定においては、特異的吸着と非特異的吸着を区別することが困難であるため、非特異的吸着を抑制することが重要となります。

近年、蛋白質等の表面固定化にオリゴエチレングリコールを導入したSAMs試薬が頻繁に用いられています。オリゴエチレングリコールには蛋白質や細胞をはじめとする生体分子の吸着を抑制する効果があるため、Whitesidesをはじめ様々な研究者により、その効果が実証されています<sup>1-3)</sup>。

上記のAmino-EG<sub>6</sub>-undecanethiol, hydrochlorideはエチレングリコール部位と末端にアミノ基を有しており、カルボキシル基を持つタンパク質、ペプチド、リガンド等を導入する際に有用です。

末端アミノ基を有するSAMsの使用例としては、二価性試薬であるSSMCCを用いて末端をマレイミド基に変換し、チオールを導入したDNAを固定化することによりDNA arrayを構築でき、SPRを用いたタンパク-DNA間相互作用のイメージングなどが可能となります<sup>4)</sup>。

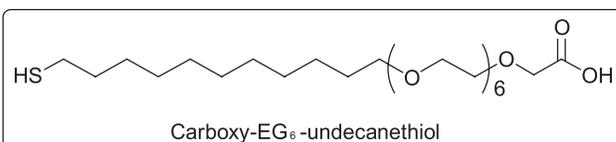
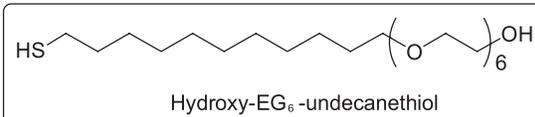
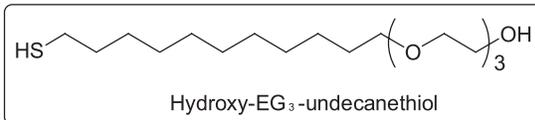
また、活性エステル化したBiotinを導入することで、Avidinとの親和性を利用した生体物質の固定化や、金ナノ粒子の表面修飾及びバイオセンシングへの応用が期待されます<sup>5)</sup>。

小社のSAM試薬は高純度であり、単分子膜形成を阻害する可能性が有る不純物をほとんど含んでいません。

## 参考文献

- 1) C. Pale-Grosdemange, E. S. Simon, K. L. Prime and G. M. Whitesides, *Anal. Chem.*, **1999**, 71, 777.
- 2) M. Kyo, K. Usui-Aoki, H. Koga, *Anal. Chem.*, **2005**, 77, 7115-7121.
- 3) G. B. Sigal, M. Mrksich and G. M. Whitesides, *J. Am. Chem. Soc.*, **1998**, 120, 3464.
- 4) Y. Li, H. J. Lee and R. M. Corn, *Nucl. Acids Res.* **2006**, 34, 6416.
- 5) 三浦 佳子, 米澤 徹, *Dojin News*, **2005**, 113, 1.

## 関連製品



品名	容量	価格(¥)	メーカーコード
Hydroxy-EG <sub>3</sub> -undecanethiol	10 mg	14,400	H354
	100 mg	36,000	H354
Hydroxy-EG <sub>6</sub> -undecanethiol	10 mg	18,000	H355
	100 mg	38,800	H355
Carboxy-EG <sub>6</sub> -undecanethiol	10 mg	24,000	C445
	100 mg	60,000	C445

上記以外にも、オリゴエチレングリコールを導入していないタイプとして

- Amine type
- Carboxyl type
- Carboxy disulfide type
- NHS ester type
- Ferrocenyl type
- N-Fmoc-Amino type
- Hydroxyl type
- NTA type

をご用意いたしております。

詳しくは、小社カタログ、HPにてご覧ください。

品名	容量	価格(¥)	メーカーコード
Amino-EG <sub>6</sub> -undecanethiol, hydrochloride	10 mg	38,000	A483

## 試作品

## 過酸化脂質蛍光検出試薬

## Spy-LHP

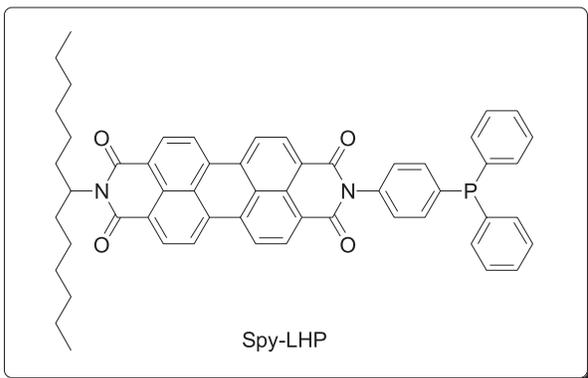


Fig. 2 Spy-LHP (左) 及びその酸化体 (右) の蛍光変化写真

## &lt;特長&gt;

- 長波長励起なので、生体試料への光ダメージが少なく自家蛍光物質の影響が軽減される
- 脂質への親和性が高く、過酸化脂質に特異的な反応をする

活性酸素種が脳梗塞や癌をはじめとした様々な疾患につながることは、すでに広く知られている。過酸化脂質は、高度不飽和脂肪酸や細胞膜リン脂質が活性酸素種により傷害を受けて生成した過酸化物であり、生体内過酸化脂質の挙動がこうした疾病や疾患に関連付けられ、非常に注目されている化合物である。

古くから不飽和脂肪酸の自動酸化は食品化学などの分野で研究されており、小社でも公定法である過酸化物価(POV)法用の専用製品(AV・POV)Diethyl etherを取り扱っている。

生化学分野では微量の過酸化脂質の高感度で特異的な定量法が望まれており、過酸化脂質の検出・定量法として、ヨウ素滴定法や比色定量法、TBA法、化学発光法などがよく知られている。小社製品であるDPPPは、これらの検出・定量法の問題点である感

度、選択性などの種々の問題点を克服した製品であったが、短波長励起による細胞へのダメージや細胞の自家蛍光による影響などの問題点もあった。

九州大学の宗らによって開発された、Spy-LHP (Swallow-tailed perylene derivative for Lipid hydroperoxide) は、新規の過酸化脂質の蛍光検出試薬である。トリフェニルホスフィン部で過酸化脂質と特異的に反応し、強い蛍光を発するペリレン環を蛍光基に持っている。また、脂質への親和性を向上させるために長鎖構造を持った構造になっている。蛍光波長は長波長励起 ( $\lambda_{exc}=524\text{ nm}$ ,  $\lambda_{em}=535\text{ nm}$ ) が可能であり、還元体はPeT(Photo-induced Electron Transfer)効果により消光されているが (Fig.1)、酸化体(ホスフィンオキシド体)は量子収率がきわめて高く ( $\Phi \sim 1$  in methanol)、強い蛍光を発する (Fig.2)。

## &lt;参考文献&gt;

N. Soh, T. Ariyoshi, T. Fukaminato, K. Nakano, M. Irie, T. Imato, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2006**, 16(11), 2943.

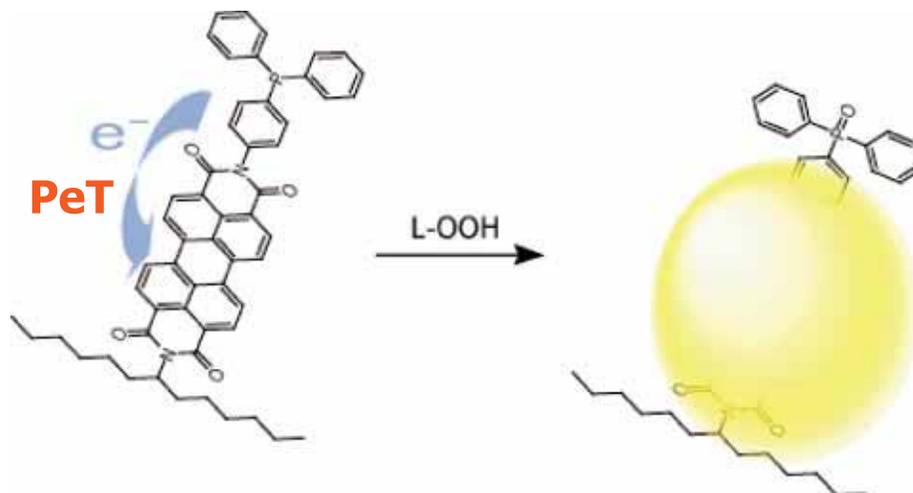
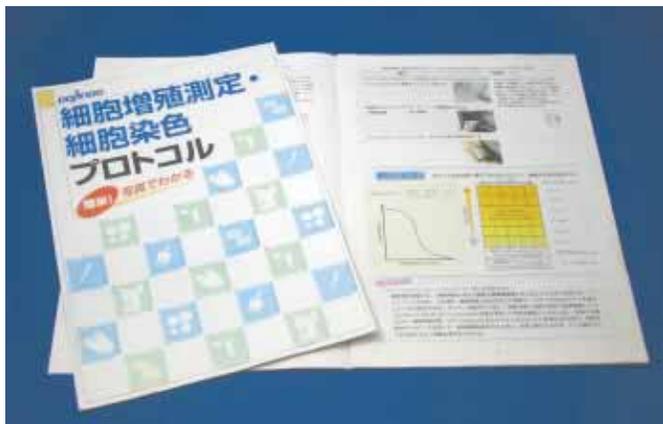


Fig. 1 Spy-LHP の過酸化脂質との反応

## お知らせ

## パンフレットのお知らせ

## 「細胞増殖測定・細胞染色 プロトコル」ができました！



この度、弊社製品を用いた細胞増殖および毒性測定、細胞染色用のプロトコルを作成いたしました。

各製品の特徴や写真入り操作方法を盛り込み、初心者の方にも分かりやすく工夫しております。

また、Q&Aやトラブルシューティングなどもまとめておりますので、是非ご覧下さい。

今後も、皆様のご研究により役立つ情報をご提供して参ります。ご意見・ご希望をお待ちしております。

カタログのご請求は、小社マーケティング部までご依頼ください。

URL: <http://www.dojindo.co.jp/catalog/index.html>

Tel:0120-489548

## 商品毎のパンフレットをご用意いたしております。

Labeling Kitにはどんなものがあるの？ SAMs 試薬ってどういう風に使い分けるの？

細胞が染まった写真を実際に見てみたいんだけど.....といったご要望に対応できるようにパンフレットをご用意いたしております。是非ご請求下さい。

- ・ Dojindo Labeling Kits データ集
- ・ -Cellstain-細胞染色用色素
- ・ 自己組織化単分子膜研究用試薬 (SAMs 試薬)
- ・ 膜タンパク質可溶化剤
- ・ Reagents for Cell Biology
- ・ 分子生物学関連試薬
- ・ タンパク質定量キット

ご請求は小社マーケティング部までご依頼下さい。

URL: <http://www.dojindo.co.jp/catalog/index.html>

Tel:0120-489548

商品に関するお問合せは、小社カスタマーサービス部にて承っております。お気軽にお問合せください。

E-mail:[info@dojindo.co.jp](mailto:info@dojindo.co.jp)

フリーダイヤル：0120-489548

フリーファックス：0120-021557



# 18th フォーラム・イン・ドージン開催報告

## 感染症をめぐる宿主の応答と微生物の戦略

さる11月30日、第18回のフォーラム・イン・ドージンが熊本で開催された。このフォーラムは、平成元年に(株)同仁化学研究所が現在の場所(熊本空港近くのテクノリサーチパーク内)に移転し、新社屋の柿落としとして企画されたのが始まりだが、年を重ねるごとに少しずつ発展してきた。熊本という一地方で開催するため遠方の参加者にとっては不便であるが、それはそれで、多少の意味も利点もあると考え、これまで地方での開催にこだわってきた。

今回のテーマは、「感染症をめぐる宿主の応答と微生物の戦略」ということで、計7演題の講演が行われた。もともとの発案は化血研顧問の岩永先生(九州大学名誉教授)であり、先生に紹介いただき、中西 義信 先生(金沢大学)と住本 英樹 先生(九州大学)に当番世話人をお願いした。感染を、微生物側からと宿主側からの両面から理解しようとする試みであり、前半は微生物側の生存戦略、後半は宿主側の応答という内容となった。しかし、これらの“攻撃”と“防御”とは表裏一体であり、しかもその区別は、ヒトにとってという視点を超えれば、かなり曖昧であることが講演を通して強く感じられた。

まず、全体の概要を中西先生が話された後、最初のセッションとして、三重大学(現 鈴鹿医療科学大学)の鎮西氏がマラリア感染症について、感染の各ステージでどのような分子が働くのかについて話され、次に東京大学薬学部の黒川氏が、黄色ブドウ球菌の増殖と病原性に必須の遺伝子の同定について紹介された。帯広畜産大学の嘉糠氏はショウジョウバエを感染症のモデルとしたサルモネラ菌感染の研究を紹介された。これらはいずれも感染症の制圧につながる重要な研究である。

後半は宿主側の応答、つまり自然免疫の仕組みに絞って、釜山大学のLee氏は細菌表層のペプチドグリカンや真菌の $\beta$ -1,3-グルカンの認識について、九州大学の福井氏はリンパ球におけるDOCK2の機能について最近の研究成果を紹介された。また、自然免疫を担う好中球による殺菌過程について、秋田大学の佐々木氏は好中球遊走におけるフォスファチジルイノシトール3,4,5-三リン酸の役割について、住本氏はファゴソーム内での殺菌機構について講演された。最後は、金沢大学の白土氏が黄色ブドウ球菌が宿主のTLR2経路を利用してマクロファージによる貪食殺菌を回避する例について話された。



参加者は延80人を超える程度であったが、最後の総合討論でも質の高い議論で盛り上がり、参加者も満足されたのではないかと思います。今後も活発な質疑を行える会として開催を行っていきたい。

今回の要旨集の残部がありますので、ご希望の方は小社・蒲野(かばの)、または、[info@dojindo.co.jp](mailto:info@dojindo.co.jp) までご連絡ください。

(佐々本 一美)



ホームページアドレス

□ URL : <http://www.dojindo.co.jp/>

□ E-mail : [info@dojindo.co.jp](mailto:info@dojindo.co.jp)

フリーファックス ☎ 0120-021557

フリーダイヤル ☎ 0120-489548