



2009 No.
130
ISSN 0385-1516

CONTENTS

Review

カルシウム濃度計測法を開発した頃
工藤 佳久

漢方診断・再発見

1. 漢方医学/医療の必要性
宇宿 功市郎

Topics on Chemistry

新規化合物を用いたROSの検出
園田 晋也
白石 賢央

ドージンニュース

**DOJIN NEWS**

目次

Review

- カルシウム濃度計測法を開発した頃
東京薬科大学 名誉教授 工藤 佳久 1
- 漢方診断・再発見
1. 漢方医学 / 医療の必要性
熊本大学医学部附属病院 宇宿 功市郎 6

Topics on Chemistry

- 新規化合物を用いた ROS の検出
株式会社同仁化学研究所 園田 晋也 8
白石 賢央

Commercial

- 新製品
カルシウムアッセイキット 11
アンジオテンシン変換酵素(ACE)阻害活性測定キット .. 14
- 試作品
微生物検出キット(蛍光) 13
- 開発中
長鎖アルキルチオール類 12
- お知らせ
G6PD 測定キット改良予定のお知らせ 10

新製品案内

カルシウムアッセイキット

品名	容量	価格(¥)	メーカーコード
Calcium Kit - Fluo 4	10 plates	39,000	CS22
Calcium Kit - Fura 2	10 plates	30,000	CS23
Calcium Kit - Fluo 4	10 plates	48,000	CS32
Calcium Kit - Fura 2	10 plates	38,000	CS33

アンジオテンシン変換酵素(ACE)阻害活性測定キット

品名	容量	価格(¥)	メーカーコード
ACE Kit - WST	100 tests	68,000	A502



霊台橋(れいだいきょう)の桜(熊本県美里町)
単一アーチの橋としては、日本一の大きさを誇ります。
1847年の架橋から今まで美しいアーチを描いています。
“フリーデスクトップ壁紙・熊本ふるさと百景”提供

カルシウムイオン濃度計測法を開発した頃



東京薬科大学 名誉教授
工藤 佳久

1. はじめに

何年ぶりかで、このニュースに寄稿するチャンスをいただいた。元来、おっちょこちょいである上に気が小さい私は何かを頼まれるといやとは言えない。たいていは二つ返事で引き受けてしまう。今回もそうだ。何を書いてもよいが、できれば、これまでの研究の苦労話をとのことであつたので、それなら簡単に書けると瞬時に引き受けたのだ。しかし、私の苦労話など、紙面の無駄だと思われる方も多いただろう。書き始めて、引き受けたことをかなり後悔している。

私の研究人生も40年を超えた。今年は古稀を迎える。この間は苦労の連続であつたが、同時に、喜びの連続でもあつた。要するに、40年分の記憶としては苦労話が成功話しか残っていないのである。そろそろ、怪しげになってきた記憶力も古いことだと驚くほど鮮明に思い出せる。ひょっとすると自らの記憶の中で適当な脚色をしているのかもしれないが、それなりにドラマチックな研究人生であつたと思う。

この機会を使って自己満足をそのまま文章にしまえ、同仁化学ニュースならばまさか、ボツにはなるまいと不埒な試みである。若干、冗漫ではあるが、おつきあい願いたい。

2. 背水の陣

出身大学の教授選に敗れた私はさっさと大学を辞して、三菱化学生命科学研究所に移籍した。ここは研究成果以外に自らの価値を示すことができない場所である。まさに背水の陣と言うべき状況であつた。楽天的では人後に落ちない私でもさすがに緊張の日々であつた。とはいえ、急に特別なことができるわけもなく、とりあえずは、それまで使ってきたカエルの抽出脊髄標本に電気生理学と薬理学的手法を応用して、当時はホットな話題であつた神経伝達物質同定研究を継続することにした。カエル脊髄というとなにやらあまりインパクトがなさそうに見えるが、当時は結構重要な研究対象の一つであり、有名な研究者達がこぞって使っていた標本である。私が使っていた抽出脊髄標本は大阪市立大学、松裏先生からの直伝の脊髄全体を用いる方法であり、世界では松裏先生のグループと私だけしか使っていなかった。大学を飛び出すまでに、すでに10年近くこの標本を用いて研究発表を続けていたこともあり、その成果を中心とした“The pharmacology of the amphibian spinal cord”と題する総説を発表していたので¹⁾、自分で言うのも口幅ったいが、Frogmanとしてその分野では結構有名と思っていた。自ら作り上げたカリウムイオン電極を武器にして、神経伝達物質候補分子の作用様式を解析していたことや脊髄に骨格筋を取り付けた標本を作り出すなど、まねごとではない独

自の研究を展開していたことが孤立無援の私にとって心の支えになってきた^{2,3)}。しかし、研究の世界は自己満足だけで渡りきれるほど甘くはない。移籍してから4年目を迎えたとき、脳神経科学部に脳神経薬理学研究室が発足し、薬理学研究室の室長から移動することになった。「脳神経薬理学」の看板を掲げるとカエルの脊髄では迫力がない。何とか、これを機会にもっと高等動物の脳研究に発展させたいとあせつた。しかし、すぐには方向を見つけることはできなかった。

3. 細胞内カルシウムイオン濃度の重要性

新しい研究への手がかりはイオン濃度計測法にあつた。当時は細胞外の主要なイオンを別のイオンで置きかえるなど、かなり強引に細胞外環境を変えることによって、伝達物質作用のメカニズムを類推するという方法がよく使われていた。私の場合は細胞外カリウムイオンを直接計測していたので、かなり、面白い考察が可能になっていたが、それだけに、ナトリウムイオン、カルシウムイオン、塩素イオンなどの他の重要なイオンの変動についての情報が曖昧で、非常に不満であつた。特に、興奮性伝達物質候補であつたグルタミン酸の作用が外液のカルシウムイオン濃度の変化や細胞内のカルシウム/カルモジュリン依存性リン酸化酵素の活性を阻害する薬物によって、特徴のある変化を示すことを見いだしていたので、細胞内のカルシウムイオン濃度の計測はいろいろな意味で大きなブレイクスルーになるとの確信はあつた。もちろん、カリウムイオン電極と同じ方法でカルシウムイオンを計測する電極を作成することはできないわけではない。しかし、細胞内に適用できるほど細い電極を作ることはきわめて困難である。そればかりではなく、細胞に刺入したときに細胞膜に傷ができるとそれだけで、カルシウムイオンは細胞内に流れ込むので、とても信じられない値になってしまうのである。

当時、電極に変わる細胞内カルシウム濃度の計測法がなかったわけではない。2008年度のノーベル化学賞受賞者である下村 脩先生がオワンクラゲから単離した発光タンパク質エクオリンはカルシウムに結合すると発光する性質を持っている。この分子を細胞内に打ち込んで、その発光を計測することで、カルシウム濃度の計測は可能であつた。また、アルゼナゾ²⁾を用いて、比色法で測定する方法もあつた。しかし、これらは細胞内に何らかの形で刺入しなければならない。この操作は細胞に大きなダメージを与える。従って、このダメージに耐えられるくらいの丈夫な細胞にしか適用できない。また、できたとしても、その微弱な光の変化を計測することは難しく、神経系に利用することは容易ではなかった。細胞内カルシウム濃度の変動は神経科学者のみではなく、多くの

生物科学分野でも重要性が認められていた。例えば、骨格筋の収縮、心筋の収縮、腺細胞からのホルモンの分泌、受精のシグナル、精子の運動、ほとんどダイナミックな細胞機能にはカルシウムイオンが関与していると予測され、生化学的に立証されていた頃である。また、当時はちょうど神戸大学の西塚泰美先生がプロテインキナーゼC (PKC) を発見し、G-タンパク質共役型受容体を介した活性化のメカニズムを解明された頃である⁴⁾。これは細胞生物学上画期的な発見である。ホスホリパーゼCの活性化による細胞膜成分フォスファチジルイノシトールのリン酸化分解の結果、

細胞内に遊離されたイノシトール三リン酸(IP3)が細胞内カルシウム貯蔵部に作用して細胞内カルシウム濃度を上昇させ、それがPKCの活性化につながることを解明したのだ。そのために、この方面からも細胞内カルシウムイオン濃度の変動には熱い注目が集まっていた。

4. 蛍光カルシウム指示薬の登場

ここに登場したのがQuin 2である。下村先生と共に2008年度のノーベル化学賞を受賞したR.Y.Tsienが合成したものである⁵⁾。あまりにも有名な試薬であり、その性質を説明する必要もないが、話の成り行きとしてここに若干の説明を加える。この試薬は細胞外に適用するだけで、細胞内に入り、細胞内カルシウムをキレートする試薬である。分子内の四つのカルボキシル基をすべてアセトキシメチルエステルにしたことで、高い疎水性を持たせて細胞膜透過を容易にした。細胞内に入るとエステラーゼ分解を受けて、細胞内に留まりキレーターとしての性質を発揮する。最初は、細胞に傷をつけることなく、キレーターを導入するための試薬として合成されたものであるが、入ったことを確認するために分子の中に組み込んでおいた蛍光ドメインの蛍光量がカルシウム濃度の変化によって変化することが認められ、一躍、注目を浴びることになる。彼らは多量に得られるクローン細胞や血球細胞などに適用した結果を報告した。1982年のことである。Tsienはこの研究で十分にノーベル賞受賞の資格があると思っていたので、GFPでの受賞は意外であった。

5. やっかいな励起波長

Tseinの論文を見たとき、これだと思った。すぐに試薬を手配したが、なかなか入手できない。やっと入手して、当時、三菱化学生命科学研究所ではルーチンに使われていたNG108-15とC6Bu-1の二種のクローン細胞を用いて彼らの実験を追試してみた。報告通り、蛍光分光光度計を用いれば容易に計測できる。しかし、これでは面白くない。やはりニューロンのカルシウム濃度を測定したい。実際に機は熟していた。この頃、記憶成立のモデル現象とされる長期増強現象が細胞内カルシウム上昇をきっかけとして生ずるのではないかとの報告があった⁶⁾。もちろん、細胞内カルシウム濃度を測っているわけではない。細胞レベルで計測するならば、顕微鏡だ。幸い、当時、研究所には神経細胞の初代培養が確立されており、すぐに海馬のニューロンが入手できた。そこで、Quin 2を負荷して、UV励起で見ると、見事に光っている。なんだこんなに簡単なのかと思った。

しかし、ここからが苦勞の始まりであった。この状態ではどんな刺激をしても蛍光の変化は見えないのだ。それもそのはず、この時に使っていた励起光源は水銀ランプであり、蛍光顕微鏡に用

いられるスタンダードの紫外励起用UVカセットには水銀ランプが最も大きな輝度を持つ365 nmを中心にしたものである。Quin 2の480 nmの蛍光は340 nm励起ではカルシウム濃度に依存した上昇が見られるが、380 nm励起では逆に減少する性質を持っている。

使っていた360 nmはまさに等吸収点(isosbesitic point)でありカルシウムイオン濃度が変わっても全く変化しない波長なのだ。

理由が分かれば簡単だ。340 nmを通せばよい。しかし、水銀ランプのスペクトルを見てがっかりする。出ていないわけではないが、360 nmのほんの裾野であり、バンドパスフィルターを用いてこれを得ることは至難の業である。またまた、幸いに研究所には生物物理学研究室があり、ここでは膜の流動性やアクチンの物性を光学的に計測しているグループがいた。そこに潜り込み、余っていた500 Wのキセノンランプを入手し、ついでにフィルター入手先のアドバイスも受けた。

励起光源を顕微鏡に導く光路にも様々なレンズ系が組み込まれている。これらが、340 nmを吸収してしまう可能性もある。そこで、光路のレンズは一切省いた筒の両端にスリットを取り付けたものを、鉄工所を営んでいる実家の父親に頼んで削りだしてもらった。もちろん、対物レンズも比色計で間違いなく340 nmが透過することを確認した。いよいよこれで完成と確信した。しかし、これでもまだ340 nm励起では細胞は全く光らない。途方に暮れた。することがなくなってしまった。顕微鏡メーカーには何度も問い合わせたが、そっけなく「通るはずですよ」とにべもない回答である。当時、博士研究員として私の片腕になってくれた尾崎君としばらくは放心状態であった。しかし、何か問題があるはずだと気を取り直して、顕微鏡の光路をすべてチェックした。そして、ついに対物レンズのレボルバーに取り付けられたレンズ(凹レンズ)がまったく340 nmを通さないことを発見した。そこで、このレンズを無理矢理外し、レンズメーカーに送りつけて同じレンズを石英で磨いてもらった。一週間ほどで完成したレンズをセットして、励起光をあてると、確かにQuin 2を負荷した細胞が見事に光った。しかも、脱分極刺激を与えると、目にも鮮やかに蛍光量が増大したのだ。感激だった。

6. 蛍光変化をどのように計測するか

Quin 2はカルシウムイオンを働かなくする目的で作られた試薬であり、そのキレート能($K_d = 60 - 80 \text{ nM}$)はほとんど静止レベルの細胞内カルシウムレベルにある。これでは細胞機能に伴うカルシウム変動を観察するための指示薬としてはキレート能が高すぎる。静止状態の細胞のカルシウムイオン濃度よりやや高いところに K_d 値を持つ試薬が望ましい。1985年にTsienは改良型の蛍光カルシウム指示薬としてFura 2とIndo 1を開発した⁷⁾。これらの試薬は論文発表前から入手できた。Fura 2はおおよそ200 nMに K_d があり、非常に使いやすい。装置が完成するとほぼ同時にこの試薬が使えたことも幸運であった。

装置の確立に半年以上の時間をかけてしまい、その年の成果らしい成果はない。その上、研究所内では「カルシウムを測定して何の意味がある」とクレームをつける者も出てきた。これ以上遅くなったら、立場はない。しかし、次の大問題が持ち上がってきた。細胞の蛍光をどのようにして計測するかということである。発見者のTsienらは顕微分光装置を用いて、計測した結果を発表している。これは細胞から発する蛍光を分光器で計測する方法で

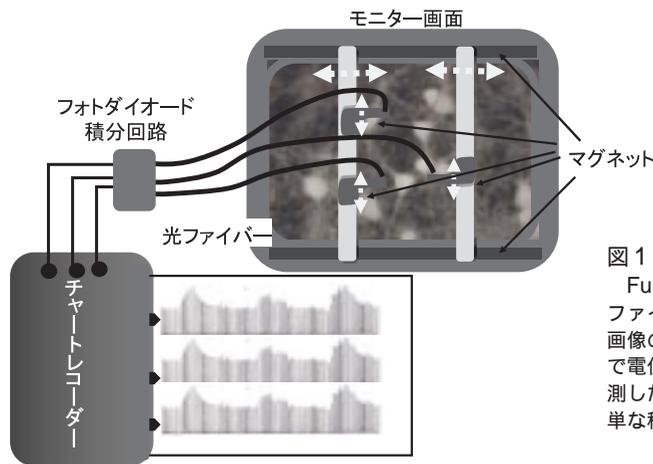


図1 最初の画像によるカルシウム計測法

Fura 2で染色した細胞の蛍光画像をイメージインテンシファイアを装着したカルニコカメラで捉えた。細胞の画像の輝度を光ファイバーで取り出し、フォトダイオードで電位に変換して3チャンネルのチャートレコーダーで計測した。ビデオ画像は30分の1秒のパルスになるので、簡単な積分回路を介して記録した。

わめて高価な装置であるが、画像として計測する方法ではない。幸い、装置の開発の途上で、細胞画像のモニターのためにビデオカメラを用いていたので、感度のよいビデオカメラを用いれば、蛍光画像も捉えることができるはずであるとの確信はあった。しかし、当時はビデオカメラについては全く無知な私としては、カタログをひっくり返し、最初は、カルニコカメラ（残像性はあるものの結構高感度なカメラ）にイメージインテンシファイアを取り付けた装置を入手した。しかし、すぐに当時としては最も感度が高いSITカメラがあることを知りこれに置き換えた。もちろん、これらのカメラの購入にもいろいろとクレームが来たが、ここまでできては後に引けない。そこまでの成果を針小棒大に説明して、予算をもぎ取った。

7. ついに完成、初代カルシウム計測装置

ともかくFura 2を負荷した神経細胞の蛍光画像をビデオ画像として捉えるところまでできた。20倍の対物レンズで見ると、画面一杯にたくさんの光る細胞が映し出される。脱分極刺激をすると、すべての神経細胞の輝度が一気に上昇する。これら細胞一つ一つの反応は個々のデータとして使えるはずである。電気生理学的方法ではたくさんある細胞のうち一つを選んで電極を差し込んで計測することしかできなかったが、この光りの変化を何らかの方法で捉えれば、一網打尽、百個近くの細胞の反応を捉えることができる。そこで、若干強引だとは思ったが、ビデオ画面の輝度を直接測定することにした。その方法は画像解析というには恥ずかしいものであるが、確かに画像からのデータを解析したのだから、画像解析と敢えて言いたい。方法はいかにも原始的だ。まず、プラスチック光ファイバーを入手した。ビデオモニターの画面の上下にシート状のマグネットを固定し、そこに厚さ1 mmほどで1 cmほどの幅の鉄板を二本くっつけた。この鉄板の上にシート磁石を貼り付けたプラスチック板を置き、それに光ファイバーの先端を固定した。つまり、画面上で光る細胞のある位置に光ファイバーの先端を任意に取り付けられるようにしたのである(図1)。こうして、引き出される輝度をフォトダイオードで計測した。ビデオ信号であるから、当然、30分の1秒のパルスの列として取り出される。蛍光が上昇すれば、パルスの幅は大きくなる。これを最も簡単に連続信号として捉えるには簡単な積分回路を作ればよい。積分回路などという大仰なものではない、パルスを大きなコン

ンサーにため込みその電位を測定するのである。時定数はコンデンサーの容量と貯まった電気を流し出すためにアースとのあいだにはさんだ抵抗の大きさで決まる。こうして、3チャンネルのチャートレコーダーにその出力を記録した。ここまでくれば、きわめて楽に計測できる。重要なことはこれがビデオ画像であるということだ。ビデオテープレコーダーに録画しておけば、残りの細胞からも記録がとれる。まさに今はやりのハイスループットアッセイが可能になったのだ。これは薬理学者としては画期的な方法であると大いに満足した。もっとも、光学の専門家には大いに笑われた。しかし、笑わば笑え、測定できるのだから文句はあるまいと開き直ったものである。

8. グルタミン酸による海馬ニューロンカルシウムイオン濃度の上昇

こうして最初に計測したのが、今から考えると不思議なことだが、グリア細胞のクローン細胞 C6Bu1 細胞であった⁸⁾(図2)。それまでの蛍光分光光度計による実験でセロトニンを適用するとカルシウムが上昇することを確かめていたからである。グリア細胞の活動はこの5年後からホットな話題になり、現在、重要な研究テーマになっている。

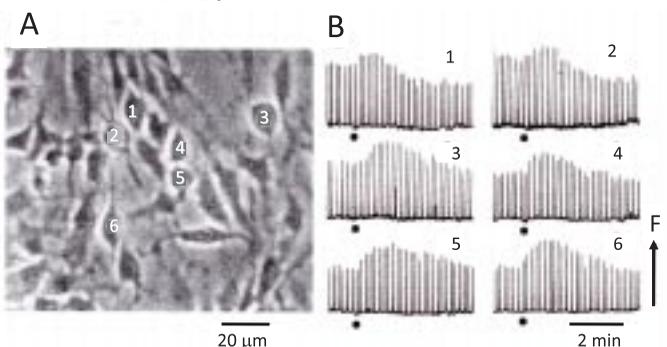


図2 最初に計測した C6Bu1 のカルシウム応答

アストロサイトマ由来のクローン細胞を Fura 2 で染色して、セロトニンを適用すると細胞内カルシウムイオン濃度が上昇する。3チャンネルのレコーダーでリアルタイムに測定した後、ビデオテープに録画した画像から別の細胞の反応を計測することができる。繰り返せば、全細胞の活動を記録できる⁸⁾。

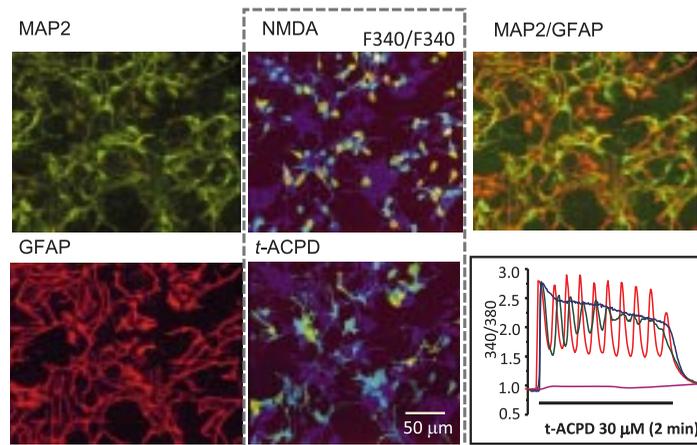


図3 グリア細胞に発現するグルタミン酸受容体の発見

Fura 2 で染色された海馬ニューロンとアストロサイト(グリア細胞)の共培養標本をグルタミン酸受容体作用薬の一つである NMDA(*N*-methyl-D-aspartate)で刺激して、反応を画像処理によって計測し、保存する。標本を正常液でよく洗浄した後、別のタイプのグルタミン酸受容体作用薬 *t*-ACPD (*trans*-1-aminocyclopentyl-1,3-dicarboxylate)を適用してその反応を画像処理により計測する。その後、細胞を固定処理して、神経細胞認識抗体 MAP-2 およびアストロサイト認識抗体 GFAP を反応させ、それぞれについて蛍光マーカーをつけた二次抗体を反応させた。こうして得られた細胞の像と、先に計測したカルシウムイオン濃度の画像とをつきあわせて、反応細胞の細胞種を同定した。その結果、NMDA に反応した細胞はすべてニューロンであり、*t*-ACPD に反応した細胞はすべてアストロサイトであったことを確認した¹³⁾。

そして、ついに海馬ニューロンがグルタミン酸に反応して細胞内カルシウムイオンを上昇させることを明らかにしたのだ。これは紛れもなく世界最初の快挙であった。この成果を1985年に *Nature* に投稿した。三人のレフリーのうち二人までは絶賛してくれた。しかし、一人のレフリーの執拗なクレーム(ほとんどはピントのずれたものであった)のために、むなしく、リジェクトを食らうことになる。その後、このレフリーの正体を知ることになり、激しい戦いを余儀なくされる。しかし、当時、ビデオカメラで計測する、すなわち、曲がりなりにも画像解析法で計測しようとしていたのは、その男と私たちだけであったから、論文を投稿すれば必ず彼のところにレフリーが回ってゆく。現在のように「この研究者はレフリーから外して欲しい」という要求などできない時代であった。最初の論文は仕方がないから、当時、薬理学者としては最もレベルが高いと考えていたイギリス薬理学会誌に投稿し、一発で受理された。1986年のことである⁹⁾。後に多くの研究者から何故 *Nature* か *Science* に出さなかったのかと問われた。いきさつを話すと、たいいてい皆、同じような経験があり、それでも *Nature* や *Science* に掲載されなければ一流の論文とは見なされない風潮のばかばかしさを嘆きあったものである。

その後、海馬スライス標本への応用¹⁰⁾、培養細胞におけるシナプス形成の検出¹¹⁾、グルタミン酸受容体チャンネルのカルシウム透過性の特徴¹²⁾、そして、現在、私のメインテーマとなっているグリア細胞の活動の検出¹³⁾(図3)、カルシウムイオン濃度の上昇をバイオセンサーとして使う方法¹⁴⁾、飛躍して、麻酔ラット脳に光ファイバーを差し込んで、虚血時のカルシウム上昇を測定する方法¹⁵⁾、そしてさらには新しい蛍光色素を考案して生細胞内でのリン酸化活性をイメージング計測する方法¹⁶⁾など、次々に発表する。ほとんど最初は *Nature* や *Science* に投稿して、激しい戦いの後、拒否された。このような場で愚痴をこぼすのも情けない話である

が、これらはすべて、紛れもなくオリジナルな研究であり、当時、これらの一流論文に発表されていた論文に何の遜色もないものであったと自負している。

9. 喜びの陰に

先にも述べたようにカルシウムイオン濃度は様々な生命現象に関わるので、現在では生物科学の分野の必須研究項目になっている。カルシウムイオン濃度解析が現在の画像処理による生命現象解析の先鞭をつけたものであることも間違いない。私の場合には浜松ホトニクスとの出会いがあったから、装置のレベルアップが一気に進んだ。現在、日本でのカルシウム計測法のスタンダードとなっている Aquacosmos システムは、初代の Argus100 から発展したものである。この Argus100 は、最初に共同研究をした山形大学医学部の加藤教授のグループとともに立ち上げたコンピュータによる計測法のために開発したソフトウェアをベースとしたものである。残念ながら、そのソフトウェアを立ち上げてくれた伊藤憲一先生はすでに故人になってしまった。また、私とともに培養細胞から始まり、海馬スライスの画像、そして光ファイバーによる深部脳細胞カルシウム計測をやってくれた順天堂大学医学部の中村 健先生も若くして亡くなられた。20年以上の歳月には喜びばかりではない事柄も刻み込まれている。また、私の研究を可能にしてくれた三菱化学生命科学研究所周平成21年度で閉鎖されることになっている。寂しい限りである。この研究所には日本各地から、共同研究や装置立ち上げのためのアドバイスを求めるために多くの研究者が集った。この研究者達が現在の私的人的財産となっている。この仕事は、研究費の豊富さと人的資源に恵まれた三菱化学生命科学研究所周でなければ成し得ない仕事であった。

10. おわりに

2008年のノーベル化学賞はGFPの重要性を認めた結果である。GFPがこれほどまでに広がったのは、それまでに積み上げられてきた画像処理技術に負うところが多い。いまでは画像解析技術は当たり前になっているが、二次元情報のデータ量は圧倒的に大きく、初期のコンピュータやメモリー装置のキャパシティーから考えると無謀と言うべき試みであった。しかし、この20年間のコンピュータと周辺機器、特にメモリー技術の発達は文字通り外れである。驚くべきスピードでレベルアップが進んだ。おそらく、細胞内カルシウムイオン計測法の開発は私が始めなくても、他の研究者が始めたことであろう。光技術やコンピュータ関連の知識のある人が始めればもっとスマートに成功したであろう。しかし、むしろ、私のような専門外の人間が始めたことが結果としてよかったのだと考えている。浜松ホトニクス、ニコン、オリンパスなどの光工学機器メーカーに素人の素朴な疑問と要求を突きつけたことが機器メーカーとユーザーの間にあった溝を狭める役割を果たすことになったと信じている。いち早く、Fura 2、Fluo 3、Rhod 2など、質の高い蛍光試薬を入手しやすくしてくれた同仁化学研究所の役割も極めて大きい。この回想文を書く機会を得たことを利用して、これらの関係者に心から感謝の意を表したい。

参考文献

- 1) Y. Kudo, The pharmacology of the amphibian spinal cord., *Prog Neurobiol.* **1978**, 11,1-76.
- 2) Y. Kudo, H. Fukuda, Alteration of extracellular K⁺-activity induced by amino acids in the frog spinal cord. *Jpn J Pharmacol.*, **1976**, 26, 385-387.
- 3) Y. Kudo, K. Kim, H. Fukuda, Dual effects of acetylcholine on the spontaneous activity in the isolated perfused spinal cord of the frog., *Neuropharmacol.*, **1978**, 17, 29-33.
- 4) Y. Nishizuka, Turnover of inositol phospholipids and signal transduction., *Science*, **1984**, 225,1365-1370.
- 5) R.Y. Tsien, T. Pozzan, T.J. Rink, Calcium homeostasis in intact lymphocytes: cytoplasmic free calcium monitored with a new, intracellularly trapped fluorescent indicator., *J. Cell. Biol.*, **1982**, 94, 325-334.
- 6) M. Baudry, D. Arst, M. Oliver, G. Lynch, Development of glutamate binding sites and their regulation by calcium in rat hippocampus., *Brain Res.*, **1981**, 227, 37-48.
- 7) G. Grynkiewicz, M. Poenie, R.Y. Tsien, A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties., *J. Biol. Chem.*, **1985**, 260, 3440-3450.
- 8) Y. Kudo, K. Ozaki, A. Miyakawa, T. Amano, A. Ogura, Monitoring of intracellular Ca²⁺ elevation in a single neural cell using a fluorescence microscope/video-camera system., *Jpn. J. Pharmacol.*, **1986**, 41, 345-351.
- 9) Y. Kudo, A. Ogura, Glutamate-induced increase in intracellular Ca²⁺ concentration in isolated hippocampal neurones., *Br. J. Pharmacol.*, **1986**, 89, 191-198.
- 10) Y. Kudo, K. Ito, H. Miyakawa, Y. Izumi, A. Ogura, H. Kato, Cytoplasmic calcium elevation in hippocampal granule cell induced by perforant path stimulation and L-glutamate application, *Brain Res.*, **1987**, 407, 168-172.

- 11) A. Ogura, T. Iijima, T. Amano, Y. Kudo, Optical monitoring of excitatory synaptic activity between cultured hippocampal neurons by a multi-site Ca²⁺ fluorometry, *Neurosci. Lett.*, **1987**, 78, 69-74.
- 12) A. Ogura, K. Akita, Y. Kudo, Non-NMDA receptor mediates cytoplasmic Ca²⁺ elevation in cultured hippocampal neurones, *Neurosci. Res.*, **1990**, 9, 103-113.
- 13) J. De Barry, A. Ogura, Y. Kudo, Ca²⁺ Mobilization in Cultured Rat Cerebellar Cells: Astrocytes are Activated by t-ACPD, *Eur. J. Neurosci.*, **1991**, 3, 1146-1154.
- 14) S. Uchino, T. Nakamura, K. Nakamura, S. Nakajima-Iijima, M. Mishina, S. Kohsaka, Y. Kudo, Real-time, two-dimensional visualization of ischaemia-induced glutamate release from hippocampal slices, *Eur J Neurosci.*, **2001**, 13, 670-678.
- 15) T. Nakamura, H. Minamisawa, Y. Katayama, M. Ueda, A. Terashi, K. Nakamura, Y. Kudo, Increased intracellular Ca²⁺ concentration in the hippocampal CA1 area during global ischemia and reperfusion in the rat: a possible cause of delayed neuronal death, *Neuroscience*, **1999**, 88, 57-67.
- 16) H. Higashi, K. Sato, A. Omori, M. Sekiguchi, A. Ohtake, Y. Kudo, Imaging of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II activity in hippocampal neurones, *Neuroreport.*, **1996**, 7, 2695-2700.

筆者紹介

氏名：工藤佳久

所属：東京薬科大学・名誉教授

経歴：1964 名古屋市立大学・薬学部卒

1964-1968 興和株式会社東京研究所勤務

(この間、名古屋市立大学、和歌山医科大学、大阪市立大学・医学部へ国内留学)

1968-1978 名古屋市立大学 薬学部 助手、講師、助教授

1978-1995 三菱化学(三菱化成)生命科学研究所

主任研究員、脳神経薬理学研究室・室長、脳神経科学部・部長

1995-2005 東京薬科大学・生命科学部 教授

2003-2007 特定領域研究「神経グリア回路網」総括班長

著書：「神経生物学入門」(朝倉書店、2001年)、「神経薬理学入門」(朝倉書店、2003年)、「生命学がわかる」工藤・都筑共著(技術評論社、2008年)など

「漢方診療・再発見」

1

漢方医学 / 医療の必要性

宇宿 功市郎
熊本大学医学部附属病院
医療情報経営企画部

1. はじめに

漢方医学を医療の現場に生かすことが必要であると認識され、かつ声高に言われるようになってかなりの年月が経っているように思われる。筆者が医学部を卒業し、医師になった頃からであるから、既に30年弱である。何故このようになっていくかと問われると判然とはしないが、漢方診療における診察方法にその理由を求められるかもしれない。筆者の経験からすると、低く抑えられた医師の技術料と検査技術の著しい進歩から、勢い検査に頼る医療が拡がり、その反面として、まず患者の訴えを聞き、腹診、脈診を中心とする診療形態が発達している漢方医療に期待が集まっているように感じられるのである。今回の連載では、日本で何故漢方医学・医療がこのような変遷してきたか、医学教育や実地診療の中で今後どのように取り扱われていくか、基礎・臨床研究の中でどのような課題があり、そして取り組まれているかを紹介できればと考えている。

2. 日本における漢方診療の歴史

日本での漢方診療は当然のことながら、明治期に西洋医学、特にドイツ医学の導入が決定される以前には、医療の中心であり、また江戸時代には日本独自の漢方診療として発達してきている歴史がある。日本での漢方診療の詳細な歴史については他書に譲り、ここではその衰退と再認識の時代背景だけを簡単に触れる。先にも述べたが、江戸時代まで盛んであった漢方診療は明治期に一度否定されている。これについては、1875年の医術開業試験通達と漢方医学の試験科目からの削除、1895年第8回帝国議会で漢方医学の免許剥奪が決定的に重要であった。その後は西洋医学を修めた医師が伝統の漢方医学を学び、広めていくという形になり、医学部で漢方医学が教えられることはほぼ100年近くなってきたわけである。この間も漢方診療、漢方医学研究は少なからず続けられてきており、戦後1950年の日本東洋医学会設立、1960~70年代に和漢薬研究所等の設置、同時期の漢方エキス製剤の保険適用と相俟って、今日のように漢方診療、漢方医学教育の重要性が盛んに唱えられるようになっていく。

また、海外からの影響も今日の漢方診療、研究が盛んになるきっかけとなっていることも否定できない。特に米国での代替医療の見直し、Chinese Herb Medicineへの関心は高く、日本国内の漢方診療を行う医師にとって大きな影響を及ぼしている。

3. 近年の医学教育の変遷と漢方医学教育

ここで日本での医師養成の仕組みに簡単に触れておく。日本国内で医療行為を行うためには医師免許が必要であり、この免許を得るためには医師国家試験に合格する必要がある。この医師国家試験の管轄は厚生労働省であり、受験資格に、学校教育法(昭和22年法律第26号)に基づく大学において、医学の正規の課程を修めて卒業した者との規定されており、6年制の各大学医学部、医科大学を卒業することが必要である。各大学医学部、医科大学は附属病院も含め文部科学省管轄で、独自のカリキュラムのもとに医師国家試験受験資格者を養成していたわけであるが、知識偏重で、卒業時の基本的臨床能力養成が不十分と長年指摘されていた。そこで当時の文部省では、「21世紀に向けた医師・歯科医師の育成体制の在り方について(21世紀医学・医療懇談会)」の議論を1996~1999年に行い、医学部医学科カリキュラムを大幅に見直し、2001年3月27日に「21世紀における医学・歯学教育の改善方法について 学部教育再構築のために」をまとめ、医学教育モデルコアカリキュラムが導入されることとなった。各大学医学部、医科大学では、全カリキュラムの約2/3はこのモデルコアカリキュラムに基づき、他は各大学の特色を出すカリキュラムを組むように求められている。このモデルコアカリキュラムの中に、E診療の基本 2 基本的診療知識 (1)薬物治療の基本原則 (17)和漢薬を概説できる という項目が設けられ、医学科6年の履修中に必ず和漢薬を中心とした漢方医学教育が求められるようになったわけである。加えて、このモデルコアカリキュラムに基づいた学習で、必要な医学知識、臨床技能が身についているかを確かめるために平成17年からは各大学においては臨床実習前に共用試験 CBT(computer based test)、OSCE(客観的臨床技能試験 objective structured clinical examination)の受験実施と学生指導が求められている。

表1 熊本大学における講義内容

医学科 4年生 対象				
詳細情報				
授業形態	講義ならびに演習。			
授業の目標	一般学習目標GIO(General Instruction Objective)			
	(1)漢方医学に興味を持ち、一つの医学体系として理解する。			
	(2)漢方医学に存在する病態と処方の方を学ぶ。			
授業の内容	個別学習目標SBO(Specific Behavored Objective)			
	(1)陰陽について説明できる。			
	(2)気血水を説明できる。			
	(3)五臓を説明できる。			
	(4)八綱を説明できる。			
キーワード	陰陽、気血水、五臓、八綱			
授業日程				
形態	開講回数	曜日 時間	項目 講義内容	
講義	1	水 2限	漢方医学概論	漢方医学という学問体系を概観し、現在での必要性、有用性、限界を述べる。
	2	水 2限	生薬を実感する	生薬の薬物学、処方学を学び、実際に生薬に触れ、体験する。
	3	水 2限	漢方診断の実際(1)	漢方の基本システムと気血津液について概説する。
	4	水 2限	漢方診断の実際(2)	臟腑弁証と肺脾肝の臨床について概説する。
	5	水 2限	漢方診断の実際(3)	臟腑弁証と肝心腎の臨床について概説する。
	6	水 2限	かぜの漢方治療	漢方治療の基本を、「かぜ」を中心に学ぶ。
	7	水 1限	基礎研究の成果	漢方生薬における基礎研究の成果について概説し、今後の漢方治療の可能性を探る。
	8	水 2限	鍼灸学 理論と実践	鍼灸の基本を学び、実際に使用してみる。
	9	水 2限	ワークショップ: 症例検討	実際の症例を提示し、講義で学んだことから診断、処方を考える。

以上のように日本の医学教育はここ10年ほどで大きく様変わりしてきており、そのなかで漢方医学教育も再度取り入れられるようになったわけであるが、では具体的にはどのような漢方医学教育が各大学で行われているのであろうか。言うまでもなく、日本の大学医学部、医科大学は現代医学を実践する医師の養成がその基本であり、漢方医養成が主眼ではないので、余り多くの時間を漢方医学教育のために使えないのは自明であるが、将来に亘って自学自習ができる基盤を作るための基本は学習すべきものと考えている。このため、現在日本で行われている漢方診療や日常診療での漢方の利用方法、現在の医学的観点からみた漢方製剤の効果解明を中心とした講義が各大学なりの工夫で行われているようである。熊本大学では、医学科4年に9コマの講義を行っている(表1)。

4 漢方への取り組み方、効果がみられる病態は何か

では、現在の日本で行われている漢方診療はどのようなものだろうか。大きく分けて3つの流れがあるように思われる。中国や韓国の伝統的な方法に近いと考えられる「弁証論治」を中心にした診療の流れ、江戸時代に日本で発達した腹診を軸とした「方証相対」に基づく診療の流れ、現代医学の病態の理解に基づく診療の流れである。

筆者は、自身の診療経験、漢方エキス製剤における最近の知見などから、末梢の循環血流改善、免疫抑制状態改善、ケミカルメディエーター産生・遊離抑制、炎症性もしくは抗炎症性サイトカインのバランス調整により効果が表れているものと考えているのであるが、漢方診療で重視される「瘀血」が静脈の鬱滞がその基本であることを考え併せると、漢方診療は、動脈血が臓器に流れ込んだ後の、「細静脈からあとの静脈系」を中心に診る医療体系のように思えてくるのである(図1)。このように考えて、漢方製剤が効果を持つ病態をあらためて見直してみると理解が進むことが少なからずある。

ただ、学生に将来の自学自習の基盤を身に付けてもらいたいと考えると、やはり伝統的な漢方の考え方や、日本で江戸時代に発達した診療形態である腹診、これらに加えて鍼灸を多少でも学んでもらいたく、表1のカリキュラムを組み、県内の漢方診療を行っている先生方の協力を得て講義を行っているのである。

5 漢方診療の経済効果

漢方診療では、ある特定の病名に対して製剤を処方することはなく、症状や病態に対して処方することが治療の中心であり、このために1つの漢方製剤が複数の疾患での同様の病態に効果をあらわす場合がみられること、日常で使用する漢方エキス製剤の薬価はさほど高くないことなどから、医療経済によい効果を及ぼすことが指摘されている。

6 最後に

漢方製剤を日常診療で使用する医師は約70%という統計もあり、また医学教育でも漢方医学教育が求められるようになってきている現在、製剤の使い方に習熟することはもちろん、基礎臨床的にその効果の機序を解明することが求められている。次回からは、日本における漢方医学、麦門冬湯と咳、エイズと漢方、五苓散と水分代謝、中医・韓医と日本漢方、外科と漢方などについて、各分野の専門の先生に連載をお願いすることにしていく。漢方診療や漢方医学研究を見直すきっかけとしていただければと考えている。



図1

筆者紹介



氏名：宇宿 功市郎
 所属：熊本大学医学部附属病院 医療情報経営企画部 教授
 連絡先：〒860-0811 熊本市本荘1-1-1

略歴：

- 1981年 鹿児島大学医学部医学科卒業 附属病院第3内科
- 1983年 宮崎県立宮崎病院神経内科
- 1985年 鹿児島大学医学部附属病院第3内科
- 1988年 国立精神神経センター神経研究所疾病研究第6部
- 1990年 ハーバード大学マサチューセッツ総合病院神経内科
カリフォルニア大学サンフランシスコ校医学部神経内科
- 1993年 鹿児島大学助手 医学部附属病院第3内科
- 1994年 鹿児島県立始良病院神経内科
- 1996年 鹿児島大学医学部助教授 医学部医療情報管理学、
附属病院医療情報部
- 1999年 鹿児島大学医学部医学教育計画室 室長代理
- 2000年 鹿児島大学医学部附属病院 卒後臨床研修部 副部長
- 2003年 鹿児島大学大学院歯学部総合研究科助教授
人間環境学講座医療システム情報学
- 2006年 熊本大学教授、医学部附属病院医療情報経営企画部長

Topics on Chemistry

新規化合物を用いた ROS の検出

株式会社同仁化学研究所 園田 晋也
白石 賢央

活性酸素種(reactive oxygen species : ROS)は多くの生理的過程のみならず、呼吸器疾患、神経疾患、老化、癌などの様々な疾患病態の発症・進展への関与が示唆されており、生命化学の幅広い研究領域で注目を集めている低分子群である。

これらの ROS の測定においては、比色法、蛍光法、化学発光法や、不対電子を直接検出する電子スピン共鳴(electron spin resonance : ESR)など様々な方法がある。今回はその中でも、蛍光法で用いる新規蛍光プローブと、ESR-スピントラッピング法で用いる新規スピントラップ剤を紹介する。

新規蛍光プローブを用いた生体内 H₂O₂ のイメージング ～ 蛍光プローブを用いた H₂O₂ の検出～

ROS の一種である過酸化水素(H₂O₂)はスーパーオキシド(O₂⁻)のスーパーオキシドジスムターゼ(superoxide dismutase : SOD)による反応産物として知られ、酸化ストレスの指標となっている。また、mitogen-activated protein(MAP) kinase のようなリン酸化酵素、nuclear factor κB(NF-κB)、activating protein 1(AP-1) のような転写因子、protein tyrosine phosphatases (PTPs)、ion channels、G proteins など細胞増殖や細胞死を制御するシグナルタンパク質へのセカンドメッセンジャーとしての役割を担っていることも知られている。このような重要なファクターであるにもかかわらず、その発生、伝達、作用のメカニズムは未だ不明な点が多い。

ROS の生体内での役割を明らかにするために ESR 法、吸光法、蛍光法、化学発光法など種々の検出法が開発されてきた。その中でも、蛍光プローブを導入した生細胞を蛍光顕微鏡下で観測する方法(蛍光イメージング法)は、生きている状態での生物応答を感度良く、リアルタイムで、空間分解能高く捉えることができる点で優れており、近年注目を受けている方法である。

蛍光イメージングを行う際、検出対象分子を可視化する蛍光プローブの存在が不可欠である。2,7-ジクロロジヒドロフルオレセイン(DCFH)、ジヒドロローダミン 123、ジヒドロエチジウムなどは、高い検出感度を持っているが、励起光をあてるだけで著しい蛍光強度の増大が以前から起こり、また全ての ROS と反応するという選択性の乏しさが問題となっていた。近年、これらの問題を克服した新規蛍光プローブの開発が進められており、報告例も数多い¹⁻³⁾。

その中から今回、J. Chang らが開発した 2 種類の H₂O₂ 選択性蛍光プローブを紹介する。

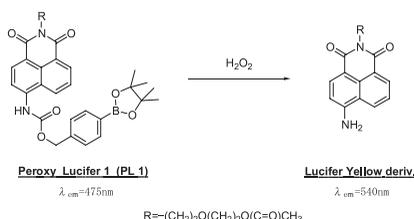


Fig. 1 PL1 の構造及び反応式

最初に紹介する例は、Fig.1 に示す Peroxy Lucifer 1 (PL1) である⁴⁾。

PL 1 は大きな二つの特性を持っている。まず第一に、高い H₂O₂ 選択性を持つことである。これは、boronate 骨格を有するカルバメート基の脱保護が H₂O₂ に対して選択的に起こるため、他の ROS (TBHP: *t*-butyl hydroperoxide, O₂⁻, NO⁺, •OH, •OtBu, -OCl, ¹O₂) では脱保護がほとんど起こらない。第二に、ratiometric probe という点である。PL 1 は、母核構造である Lucifer Yellow のアミノ基に電子吸引性のカルバメート誘導体が導入されているが、H₂O₂ との反応によりカルバメート基が脱保護され Lucifer Yellow 誘導体に戻ると、内部電荷移動遷移(internal charge transfer)効果により、蛍光極大波長が顕著に長波長シフトする(青色蛍光 475 nm 緑色蛍光 540 nm, Fig. 2)。この特性を利用すれば、適当な二波長を選択して励起し、その時の蛍光強度の比をとることで、細胞内の環境や導入した試薬濃度に左右されることなく、H₂O₂ 濃度と対応づけることができる。

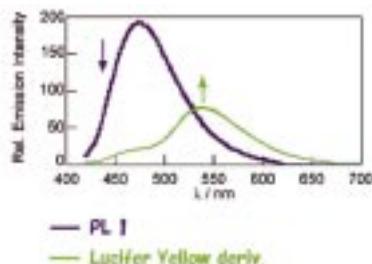


Fig. 2 H₂O₂ 反応後の蛍光スペクトル

また、J. Chang らは、RAW 264.7 マクロファージを phorbol myristate acetate (PMA) で刺激した後、PL1 を導入して、マクロファージ内の蛍光変化を二光子顕微鏡で観察した。

その結果、マクロファージ内の細胞質における緑色蛍光と青色蛍光の強度比率(F_{green} / F_{blue})が 0.6 であったのに対し、H₂O₂ が産生したマクロファージ内の小嚢では緑色蛍光の強度比率が増大した(F_{green} / F_{blue} = 1.0)。この実験より PL 1 が、細胞内で起こる免疫応答によって発生した H₂O₂ を検出するのに、十分な感度を持っていることが分かった。

次に紹介するのは、Fig.3 に示す MitoPY1 である⁵⁾。

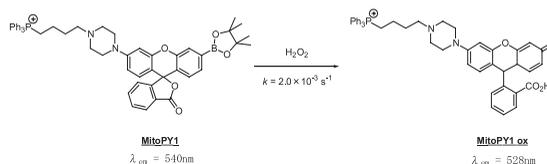


Fig. 3 MitoPY1 の構造及び反応式

MitoPY1 は二つの大きな特性を持っている。まず第一に、前述の PL 1 と同様に H₂O₂ に選択性を持つことである。これは boronate の H₂O₂ 特異性に基づくもので、他の ROS に対しては脱保護が起こらず、H₂O₂ に対してのみ脱保護が起こる。

第二の特性は、ミトコンドリアに選択性を持つことである。ミトコンドリアは生体内酸素の 90% 以上を消費して、生命活動に必要な

エネルギー ATP) を供給する細胞内小器官であるが、消費酸素のうち数%を活性酸素種とし産出するため活性酸素生成器官としても認識されている。近年は、アポトーシス制御にミトコンドリアが関与していることが判明し、ミトコンドリアの酸化ストレスを起因とする疾病が数多く報告されていることから更にミトコンドリアが注目を受けている。

J. Changらは、phosphonium head を導入することでミトコンドリアへの選択性を見出した。実際、彼らはHeLa細胞内にMitoPY1を導入して共焦点顕微鏡で観察すると、ミトコンドリアにMitoPY1が集積していることを確認している。

更にJ. Changらは、ミトコンドリア内で産生した H_2O_2 の検出にも成功している。HeLa細胞を除草剤の一種であるパラコート(酸化還元サイクルを形成し、スーパーオキシドを生成する薬剤)に曝した後、MitoPY1を導入して共焦点顕微鏡で観察した。その結果、パラコート処理をしない対照実験と比較して、明らかにMitoPY1による蛍光強度が増大していた。この結果よりMitoPY1はミトコンドリア内の H_2O_2 を検出するのに十分な感度を持つことが判明した。

今回紹介した2つの化合物は、 H_2O_2 選択性を持ち、低毒性、高感度であることから、細胞内イメージングに適しているという優れた性能を有している。今後、PL1, MitoPY1を用いた実験や、これら化合物を基にした、より優れた機能を持つプローブが開発されることにより、 H_2O_2 の生理学的、病理学的な役割の解明に繋がることが期待される。

- 1) Evan W. Miller, Aaron E. Albers, Arnd Pralle, Ehud Y. Isacoff, and Christopher J. Chang, *J. Am. Chem. Soc.*, **2005**, *127*, 16652-16659.
- 2) S. Kenmoku, Y. Urano, H. Kojima and T. Nagano, *J. Am. Chem. Soc.*, **2007**, *129*, 7313-7318.
- 3) D. Yang, H. L. Wang, Z. N. Sun, N. W. Chung and J. G. Shen *J. Am. Chem. Soc.*, **2006**, *128*, 6004-6005.
- 4) Duangkhae Srikun, Evan W. Miller, Dylan W. Domaille, and Christopher J. Chang, *J. Am. Chem. Soc.*, **2008**, *130*, 4596-4597.
- 5) Bryan C. Dickinson and J. Chang, *J. Am. Chem. Soc.*, **2008**, *130*, 9638-9639.

新規ラジカル補足剤の生物学的系における有用性 ～ ESRを用いたROSの検出～

スーパーオキシドラジカル($O_2^{\cdot-}$)は細胞内の代表的なROSの一つであり、化学的、生化学的、細胞生化学的な*in vitro*測定法や*in vivo*測定法など、様々な $O_2^{\cdot-}$ の測定法が開発されているが、その中でも、ESRを用いた分析方法はROSのさまざまな作用を直接的、かつ定量的に測定する方法の一つである。したがって、ESRを用いたROSの測定は化学系、生物系の様々な系におけるフリーラジカルの動態を研究する上で、非常に価値のある方法である。しかしながら、ESRを用いた測定方法は、 $O_2^{\cdot-}$ やヒドロキシルラジカル($\cdot OH$)のように不安定で半減期が非常に短いフリーラジカルを直接検出するには不十分であるため、スピントラップ剤を用いてフリーラジカルを安定なラジカルに変換する必要がある。

2,2-Dimethyl-3,4-dihydro-2H-pyrrole N-oxide (DMPO) は $O_2^{\cdot-}$ の検出で頻りに用いられているスピントラップ剤であるが、こ

れが $O_2^{\cdot-}$ をトラップして生成するスピニアダクト(DMPO-OOH)は半減期が1分以下で、スピニアダクトの分解や、金属イオンの存在下で $\cdot OH$ のスピニアダクトと同じDMPO-OHに変化してしまうという欠点がある。

それらの欠点を改善するため、近年、新規のスピントラップ剤として2-Diphenylphosphinoyl-2-methyl-3,4-dihydro-2H-pyrrole N-oxide (DPhPMPO)が開発された。

本稿ではT. Karakawaらによって検証されたDMPOとDPhPMPOの性能の比較と、その応用性を紹介する。

1. X/XO系におけるDMPOとDPhPMPOの比較

キサンチン(xanthine: X)/キサンチンオキシダーゼ(xanthine oxidase: XO)系により生成される $O_2^{\cdot-}$ をDMPOとDPhPMPOでトラップさせたスピニアダクト(それぞれ、DMPO-OOH、DPhPMPO-OOH)のESRスペクトルと、その信号強度の比較をFig. 1に示す。

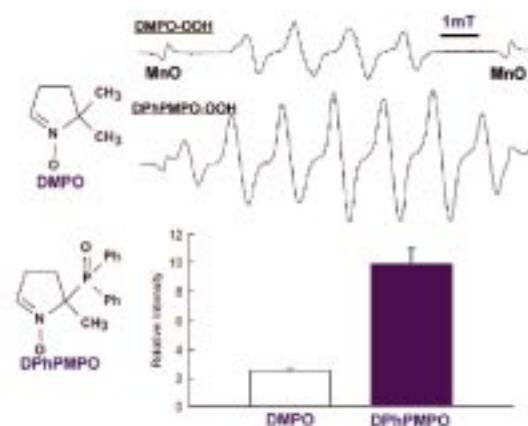


Fig. 1 各スピニアダクトのESRスペクトル及び信号強度

それぞれの超微細結合定数(hyperfine coupling constant)は、DMPO-OOHが $a_N = 1.43$ mT, $a_H^\beta = 1.15$ mT, $a_H^\gamma = 0.13$ mT、DPhPMPO-OOHが $a_N = 1.26$ mT, $a_H^\beta = 1.10$ mT, $a_P = 3.90$ mTとなり、得られたスペクトルは $O_2^{\cdot-}$ 由来であることが確認された。また、DPhPMPO-OOHの信号強度はDMPO-OOHのそれよりも高く、DPhPMPOの $O_2^{\cdot-}$ に対する検出能力は、DMPOと比較して優れていることが示されている。

DMPOとDPhPMPOの共存下にX/XO系を用いて $O_2^{\cdot-}$ を発生させると、ESRスペクトルにおいてDPhPMPO-OOHとDMPO-OOHをほぼ重ね合わせたスペクトルが確認された。(Fig.2)

次に、上記の $O_2^{\cdot-}$ 発生系でスピントラップ剤の濃度比を変えて実験を行い、スピントラップ剤の濃度比([DPhPMPO]/[DMPO])

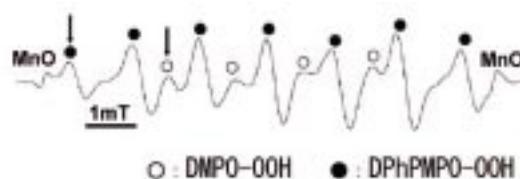


Fig. 2 DMPO-OOHとDPhPMPO-OOHのESRスペクトル

、横軸) に対するそれぞれのスピニアダクトの存在比 ($R_{DPhPMPO} / R_{DMPO}$, 縦軸) をプロットしたところ直線が得られ、その傾きから $O_2^{\cdot -}$ に対するそれぞれスピントラップ剤の反応速度定数を算出した。その結果、 $k_{DPhPMPO} = 48 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ 、 $k_{DMPO} = 15 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ が得られ、 $O_2^{\cdot -}$ に対する反応性は DMPO よりも DPhPMPO のほうが優れていることが確認された。

さらに、DMPO、DPhPMPO について、 $O_2^{\cdot -}$ とのスピニアダクトの半減期を確認するために以下の実験を行っている。X/XO の系で生成した DPhPMPO-OOH アダクトの信号強度の経時変化を確認した結果、DPhPMPO-OOH の半減期は $6.2 \pm 0.36 \text{ min.}$ となり、DMPO-OOH の $1.5 \pm 0.1 \text{ min.}$ よりも長く、DPhPMPO の方がより安定なスピニアダクトを形成していることが確認された (Fig.3)。

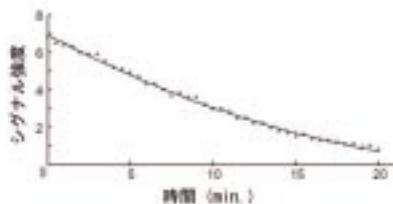


Fig. 3 DPhPMPO-OOH アダクトの信号強度の時間変化

2. 細胞内 $O_2^{\cdot -}$ 生成系における DMPO と DPhPMPO の比較

Phorbol myristate acetate (PMA) はプロテインキナーゼ C (PKC) や NADPH オキシダーゼを活性化し、好中球の ROS 生成を誘導する物質として知られている。PMA によって活性化された好中球が生成する $O_2^{\cdot -}$ を DMPO または DPhPMPO でトラップさせた結果、DMPO を用いた実験における ESR スペクトルからは DMPO-OOH と DMPO-OH の二種類のスピニアダクトの存在が確認されている。これは細胞に含まれるグルタチオン/グルタチオンペルオキシダーゼ等によって、DMPO-OOH が DMPO-OH へと変化しているものと考えられる。一方、DPhPMPO の ESR スペクトルでは、X/XO 系で得られるものと類似の超微細結合定数のみが確認されているため、スピニアダクト DPhPMPO-OOH は DPhPMPO-OH へと変化しないことが確認された。

$O_2^{\cdot -}$ のトラップ能力は、細胞内においても DPhPMPO のほうが DMPO よりも優れていたが、X/XO 生成系とは異なり、DPhPMPO-OOH のスペクトル強度が DMPO-OOH と比較して 2 倍程度しか高くなかった (Fig.4)。この原因は、DPhPMPO-OOH の疎水性によるものと考えられる。

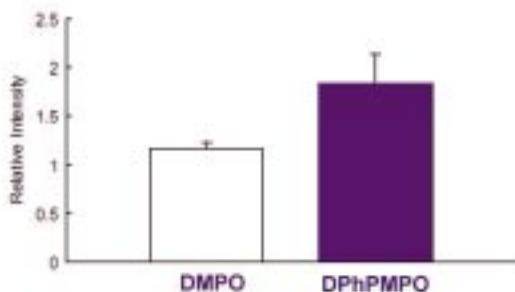


Fig. 4 細胞内における各スピニアダクトの信号強度

DPhPMPO と DMPO の 1-オクタノール/水に対する分配係数 (K_p) はそれぞれ 4.3, 0.1 であり、これは前者のほうが疎水性が高いことを示しており、細胞内に留まりやすいと推測される。たとえば、7.6 という高い K_p をもつ別のスピントラップ剤である DEPMPPO (5-diethoxyphosphoryl-5-methyl-1-pyrroline N-oxide) は、細胞内で生成した $O_2^{\cdot -}$ を検出することができない。高い疎水性が細胞内での分布を高めるということから、 K_p はスピントラップ剤にとって重要なパラメーターである。

まとめ

以上のように DPhPMPO の $O_2^{\cdot -}$ に対する反応性は、DMPO と比較して明らかに高く、生成したスピニアダクトの安定性も高いことが確認された。また、生成した $O_2^{\cdot -}$ アダクトが $\cdot OH$ アダクトに変化しない性質を持ち、細胞内生成系でも十分に測定が可能であることも確認されている。

さらに、DPhPMPO は室温において白色の固体で、保存が容易で扱い易いうえに水溶液中で数ヶ月間安定であるという利点を持つ。この点についても、DPhPMPO が DMPO に対して優れていることを示している。

結論として、DPhPMPO は細胞系・無細胞系におけるスピントラップ剤として DMPO よりも優れていると考えられる。今後、生体内で起こる様々な生理的過程で生じるフリーラジカルの動態を研究する上で、DPhPMPO の活躍が期待される。

参考文献

T. Karakawa, K. Sato, Y. Muramoto, Y. Mitani, M. Kitamado, *Biochem. Biophys. Commun.*, **2008**, 370, 93-97.

製品改良のお知らせ

G6PD Assay Kit 改良品発売のお知らせ
(5月初旬発売予定)

G6PD 異常症 (G6PD Deficiency) とは、グルコース 6リン酸脱水素酵素 (G6PD) の活性が著しく低いため、酸化作用を防御する還元型グルタチオン (GSH) の補充が不十分となり、ヘモグロビンの変性による Heinz 小体の形成、細胞膜の透過性異常の結果、主として血管内溶血をきたす疾患です。G6PD 異常症患者は、平素は無症状ですが、マラリア薬として使用されているプリマキンを服用すると、溶血性貧血を引き起こします。従って、マラリア流行地域における住民の G6PD 異常症診断は、大変重要な課題となっております。近年、日本国内においても薬剤投与などによる溶血性貧血を起こす原因として注目されてきております。

今回、ヘミ欠損、ヘテロ欠損がさらに容易に確認できるように改良を加えました。これまで以上に簡便にご使用いただけます。

*改良品の発売に伴い、旧製品 (G6PD Assay Kit) は販売中止とさせていただきます。ご了承ください。

パンフレットのお知らせ

酸化ストレス研究関連試薬のパンフレットを作成いたしました。

疾患と活性酸素 (由来) フリーラジカルの関わりを示すとともに、生体内の代謝とその機構解析のための製品を紹介しています。ご請求は、小社マーケティング部まで。



新製品

カルシウムアッセイキット

~ Wash タイプ ~

Calcium Kit - Fluo 4

Calcium Kit - Fura 2

~ Non Wash タイプ ~

Calcium Kit - Fluo 4

Calcium Kit - Fura 2

< 特長 >

- 細胞内 Ca 測定に必要な試薬が全て揃ったフルキット
- Ca プローブは1プレート毎に小分け済み [10 plates/kit]
- プローブ溶解補助剤・漏れ出し防止剤の濃度は任意に設定可能

< 説明 >

本キットは、細胞内カルシウム測定にて広く使用されている Fluo 4-AM または Fura 2-AM、各種試薬および Buffer を取り揃えたマイクロプレートリーダー測定に対応したキットになっております。また、各カルシウムプローブに対し、測定系に影響の少ない Wash タイプ[Calcium Kit]と洗浄操作が不要な Non Wash タイプ[Calcium Kit II]を取り揃え、測定系に応じて選択できるようになっております。

各キットには、カルシウムプローブの溶解補助剤である界面活性剤2種類とカルシウムプローブの細胞からの漏れ出しを防止する陰イオントランスポーター阻害剤1種類が入っており、細胞種や添加する薬剤に応じてそれぞれの試薬濃度を任意に設定することが出来ます。Bufferも添付しておりますので、別途、試薬を準備する必要がありません。

Calcium Kit には、バックグラウンド蛍光を消光する Quenching Buffer が入っており、洗浄操作を行わずに測定することが可能です。操作が簡単なため、大量スクリーニングにも応用可能です。ただし、細胞種や添加する薬剤によっては Quenching Buffer が測定結果に影響する可能性もあります。

アッセイ系に応じて Wash タイプ[Calcium Kit]または Non Wash タイプ[Calcium Kit II]をご選択ください。

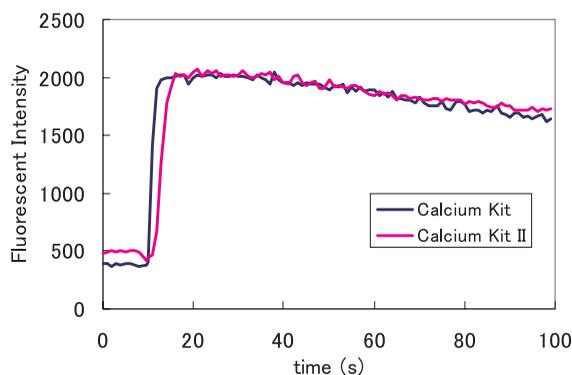


Fig. 1 Fluo. 4 type による測定例
CHO 細胞を 25 $\mu\text{mol/l}$ ATP で刺激した。
測定装置 : Infinit[®] M200(TECAN)

< キット内容 >

Calcium Kit (Fluo 4, Fura 2 共通) Wash タイプ

- Fluo 4-AM (Fura 2-AM) : 50 μg \times 10
- Dimethylsulfoxide : 2 ml \times 1
- 5% Pluronic F-127 : 2.5 ml \times 1
- 5% Cremophor EL : 2.5 ml \times 1
- 250 mmol/l Probenecid : 1.3 ml \times 1
- Recording Medium(2X) : 100 ml \times 1

Calcium Kit II (Fluo 4, Fura 2 共通) Non Wash タイプ

- Fluo 4-AM (Fura 2-AM) : 50 μg \times 10
- Dimethylsulfoxide : 2 ml \times 1
- 5% Pluronic F-127 : 2.5 ml \times 1
- 5% Cremophor EL : 2.5 ml \times 1
- 250 mmol/l Probenecid : 1.3 ml \times 1
- Hank's HEPES Buffer (10X) : 6 ml \times 1
- Quenching Buffer : 55 ml \times 1

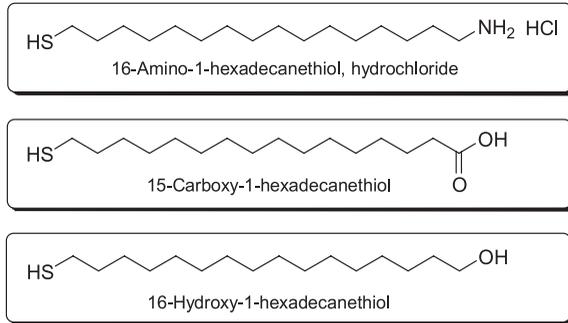
品名	容量	価格(¥)	メーカーコード
Calcium Kit - Fluo 4	10 plates	39,000	CS22
Calcium Kit - Fura 2	10 plates	30,000	CS23
Calcium Kit - Fluo 4	10 plates	48,000	CS32
Calcium Kit - Fura 2	10 plates	38,000	CS33

関連製品

品名	容量	価格(¥)	コード	メーカーコード
Calcium Kit - Fluo 3				
	2000 assays	65,000	-	CS21
Fluo 4-AM	1 mg	39,000	-	F311
Fluo 4-AM special packaging				
	50 μg \times 8	29,000	-	F312
Fluo 3	1 mg	25,000	345-05721	F019
Fluo 3-AM	1 mg	33,400	-	F023
Fluo 3-AM special packaging				
	50 μg \times 8	23,800	349-06961	F026
Fura 2	1 mg	24,200	347-05421	F014
Fura 2-AM	1 mg	28,800	-	F015
Fura 2-AM solution				
	1 ml	38,800	343-05401	F016
Fura 2-AM special packaging				
	50 μg \times 8	18,200	348-05831	F025

開発中

長鎖アルキルチオール類



アルカンチオールやアルコキシシラン化合物などが金属基板やガラス基板上で形成する自己組織化単分子膜 (Self-Assembled Monolayers : SAMs)は、基板を化合物溶液に浸漬するだけで欠陥の少ない単分子膜を容易に作製できるため、近年注目を集めている技術です。

その応用例は、光スイッチング・光電池などの薄膜光学材料、超微細フォトレジストなどのパターン化材料、つや出し・濡れ性などの表面改質といった機能性材料分野から、マイクロレイ、化学修飾電極、QCMやSPR等を用いた生体機能解析まで多岐にわたります。

小社ではこれまで、金属基板修飾用のアルキルチオール類として、末端官能基がアミノ基と水酸基のものについてはアルキル鎖が6、8、11、末端官能基がカルボキシル基のものについてはアルキル鎖が5、7、10のものを販売しておりましたが、この度、それぞれ16、15のアルキル鎖をもつ長鎖アルキルチオール類を製品ラインナップに加えることと致しました。

アルキル鎖長はSAMsの特性に大きく影響を与える因子の一つです。長いアルキル鎖はSAMsの配向の大きな駆動力となり、且つ熱的、化学的な安定性にも寄与します。n-アルカンチオールではアルキル鎖が12より短いSAMは、アルキル鎖が14より大きい長鎖SAMに比べ、金表面からのより早い脱着が起こるといわれています¹⁾。Fig.1は種々のアルキル鎖長のカルボキシルアルキルジスルフィドを用いて作成したSAMs電極のサイクリックボルタモグラムです。金表面からのチオレートアニオンの脱離に由来する不可逆なカソード電流が各電極で観測され、アルキル鎖長が長くなるにつれて、還元脱離の起こる電位が高くなっており、アルキル鎖長が長いほど形成されるSAMsが安定であることを示しています。

また、アルキル鎖のメチレン数の偶奇により同じ末端官能基であってもSAM表面の濡れ性などの特性が変わることが知られています²⁾。アルカンチオール系のSAMsは垂直軸から30度程度傾いており、その結果、メチレン数が偶数と奇数の場合で末端官能基の向きが変化し、表面特性に影響をあたえます(Fig. 2)。長鎖アルキルチオール類は、汎用されているアルキル鎖11のアミノ基、水酸基タイプや、アルキル鎖10のカルボキシル基タイプのアルキルチオール類に比べより安定なSAMを形成し、異なる表面特性を有することが期待されます。

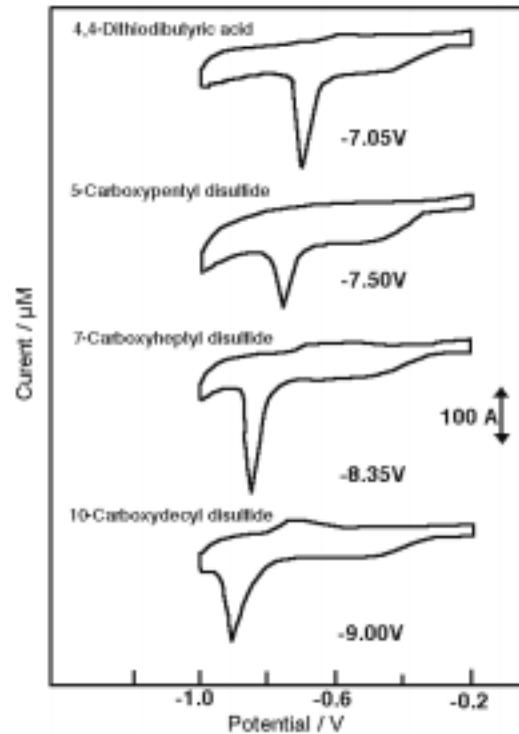


Fig. 1 種々のアルキル鎖長のカルボキシルアルキルジスルフィドを用いて作成したSAM電極のサイクリックボルタモグラム

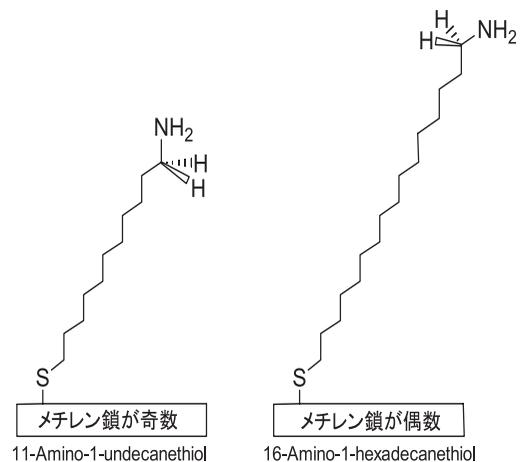


Fig. 2 SAMs のアルキル鎖の偶奇効果

参考文献

- 1) P. E. Laibinis, M. A. Fox, J. P. Folkers, G. M. Whitesides, *Langmuir* **1991**, *7*, 3167.
- 2) I. Wenzl, C. M. Yam, D. Barriet, T. R. Lee, *Langmuir* **2003**, *19*, 10217.

試作品

微生物検出キット（蛍光）

-Bacstain- CTC Rapid Staining Kit for Flow cytometry / for Microscopy

《特長》

- スピーディーで高感度な生菌の CTC 染色が可能です。
- 少量小分け品ですので使いやすくなっております。

細菌検出用の蛍光試薬として、AO, DAPI, SYBR Green などのような生・死全菌染色剤、Invitrogen 社の LIVE/DEAD®BacLight, Bacterial Viability Kit (以下、BacLight) に代表されるような、生・死二重染色キットが汎用されています¹⁻³⁾。BacLightは細胞膜透過性の異なる2つの核染色試薬(SYTO 9 及び PI)により同時染色することで、生細胞(膜損傷なし)及び死細胞(膜損傷あり)を見分けます。その他、細胞内酵素(エステラーゼ活性)を指標とした CFDA も汎用されます。

一方、CTCは呼吸活性による電子伝達系により還元され、蛍光性の formazan を生成するという特性をもちます。この菌の代謝に応じ蛍光を発する点で注目され、生菌に選択的な蛍光試薬として汎用されてきましたが、染色性が悪いという問題を抱えておりました。

この度、小社で開発しました **-Bacstain- CTC Rapid Staining Kit** は、CTC 染色時に enhancer を加えることで、CTC での染色をより迅速・高感度にできるキットです。CTC 単独では染色されなかった乳酸菌や真菌においても、同キットにて染色されることが確認できました。

《キット内容》 各 100 assays 用となります。
Flow cytometry用と蛍光顕微鏡用の2種類をご用意しておりますので、検出系にあったキットをお選び頂けます。

for Flow cytometry

- CTC 10 mg × 3 tubes
- Enhancing reagent A (DMSO solution) 0.1 ml

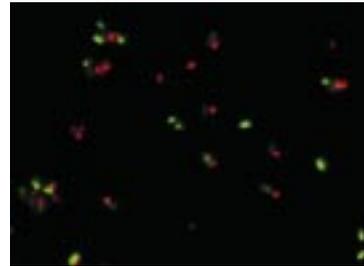
for Microscopy

- CTC 10 mg × 3 tubes
- Enhancing reagent B (aqueous solution) 0.5 ml

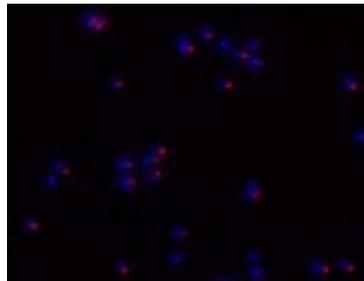
《本キット以外に必要なもの》

- マイクロピペット
- インキュベーター (25 ~ 37 °C)
- マイクロチューブ
- 遠心機 (マイクロチューブ用)

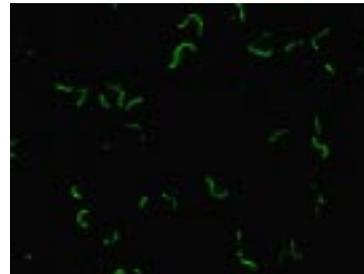
染色画像



CTC-SYBR Green による大腸菌の二重染色



CTC-DAPI による枯草菌の二重染色



AO による乳酸菌の染色

顕微鏡 : Axio Observer. Z1 (Carl Zeiss)

フィルター :

CTC	OMEGA XF21 (Ex 480DF60, Em 635DF55)
AO, SYBR® Green I	ZEISS Filter Set.38 (Ex BP470/40, Em BP525/50)
DAPI	ZEISS Filter Set.49 (Ex G365, Em BP445/50)

参考文献

- 1) 染谷 孝, “蛍光染色による土壌微生物の検出法”, 月刊 海洋 培養不能細菌 -VNC 研究の現状と課題-, **2003**, No.33, p.14.
- 2) 平石 明, 吉田 奈央子, “活性汚泥における培養不能な細菌の検出”, 月刊 海洋 培養不能細菌 -VNC 研究の現状と課題-, **2003**, No.33, p.48.
- 3) M.Kawai, N.Yamaguchi and M.Nasu, “Rapid Enumeration of Physiologically Active Bacteria in Purified Water Used in the Pharmaceutical Manufacturing Process”, J. Appl. Microbio., **1999**, 86, 496.

新製品

アンジオテンシン変換酵素 (ACE) 阻害活性測定キット

ACE Kit - WST

アンジオテンシン変換酵素(ACE)は、血圧調節メカニズムの一つであるレニン - アンジオテンシン系においてアンジオテンシンから昇圧作用を有するアンジオテンシン を生成します。また同時に降圧ペプチドであるブラジキニンを分解するなど、血圧上昇に大きく関与している酵素です。近年、高血圧予防を目的とした機能食品(特定保健用食品)が多く販売されるなど、ACE 阻害作用を有する食品成分が注目を集めています。

従来、ACE 阻害活性は合成基質Hippuryl-His-Leu から切り出されてくる馬尿酸を酢酸エチルで溶媒抽出後、濃縮乾固し、再溶解して228 nm の吸光度を測定することで算出されます。しかし、酢酸エチルのような有害な有機溶媒を用いることと、操作が煩雑であり測定誤差が生じやすい方法であるため改良が望まれています。

ACE Kit - WST は3-Hydroxybutyryl-Gly-Gly-Gly(3HB-GGG)から切り出されてくる3-Hydroxybutyric acid(3HB)を酵素法により検出します。96 穴マイクロプレート対応ですので、一度に多検体の測定が可能です。また、有害な有機溶媒は使用しませんので、安全で迅速・簡便であり再現性の高い測定方法です。

Fig.1, Fig. 2は代表的なACE阻害物質であるアラセプリルおよびバリルチロシンについて、Fig.3はサーデンペプチド含有製品について ACE 阻害活性を測定した例です。

<特長>

- 96 穴マイクロプレートアッセイ対応。
- 迅速、簡便に多検体を測定できる(分光光度計での測定も可能)。
- 再現性の高いデータを得ることができる。
- 有害な有機溶媒を使用しない。

<キット内容> 100 tests

- Substrate buffer × 2 vials
- Enzyme A × 2 vials
- Enzyme B × 2 vials
- Enzyme C × 2 vials
- Coenzyme × 2 vials
- Indicator solution × 2 vials

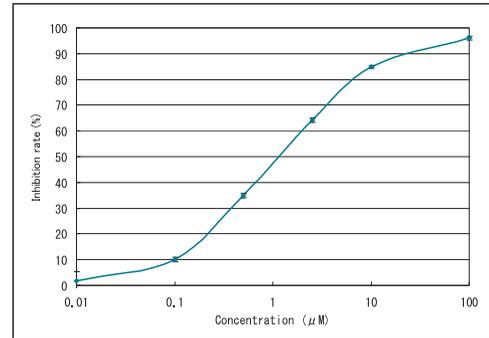


Fig.1 本キットを用いたアラセプリルによる阻害曲線

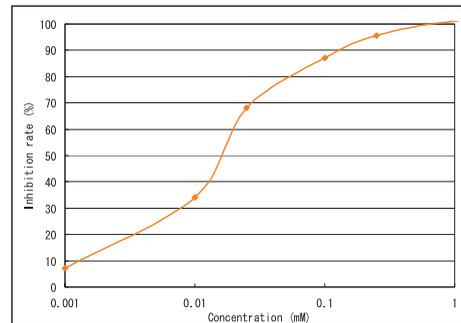


Fig.2 本キットを用いたバリルチロシンによる阻害曲線

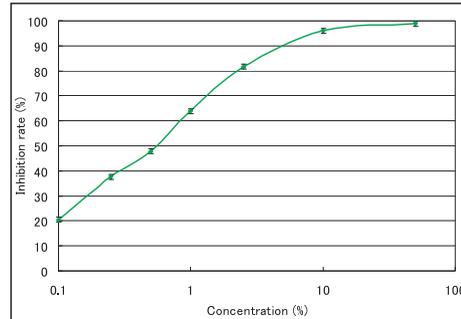


Fig.3 本キットを用いたサーデンペプチド含有製品による阻害曲線

品名	容量	価格(¥)	コード
ACE Kit - WST	100 tests	68,000	A502

ホームページアドレス
 URL : <http://www.dojindo.co.jp/>
 E-mail : info@dojindo.co.jp

フリーファックス 0120-021557
 フリーダイヤル 0120-489548