

CONTENTS

●Review

環境生物学と医学を結ぶストレス研究
徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部 六反 一仁

漢方診断／再発見 3 気道炎症と漢方薬
崇城大学薬学部 宮田 健

●Topics on Chemistry

光線力学治療への応用を目指した
新規光感受性物質の開発

株式会社同仁化学研究所 平島 義紀

グリセリンからグリコールへの選択的転換
株式会社同仁化学研究所 村井 雅樹

2009 No.132

ISSN 0385-1516

DOJIN NEWS

ドージンニュース

目次

Review

環境生物学と医学を結ぶストレス研究
徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部
六反 一仁…………… 1

漢方診断・再発見

3 気道炎症と漢方薬
崇城大学薬学部 宮田 健…………… 7

Topics on Chemistry

光線力学治療への応用を目指した新規光感受性物質の開発
株式会社同仁化学研究所 平島 義紀…………… 12
グリセリンからグリコールへの選択的転換
株式会社同仁化学研究所 村井 雅樹…………… 14

Commercial

開発品
自己組織化単分子膜研究用試薬…………… 16
新製品
細菌蛍光染色試薬…………… 17
お知らせ
フォーラム・イン・ドージン開催のお知らせ…………… 18

新製品案内

細菌蛍光染色試薬

品名	容量	価格(¥)	メーカーコード
-Bacstain- CTC Rapid Staining Kit (for Flow cytometry)	100 Assays	20,000	BS01
-Bacstain- CTC Rapid Staining Kit (for Microscopy)	100 Assays	20,000	BS02
-Bacstain- CFDA solution	100 Assays	15,000	BS03
-Bacstain- DAPI solution	100 Assays	7,800	BS04
-Bacstain- AO solution	100 Assays	7,800	BS05
-Bacstain- EB solution	100 Assays	7,800	BS06
-Bacstain- PI solution	100 Assays	7,800	BS07



昭和35年に初めて同仁化学研究所に導入された低温乾燥機。
社内にて装置設計を行ったもので、これまでキレート試薬を始めとする製品の生産に
長年、使用されてきた。現在は、その仕事を終え同仁化学研究所の歴史を支えてきた
ものとして、玄関ホールに展示されている。

環境生物学と医学を結ぶストレス研究 Stress Research in Environmental Biology and Medicine



六反 一仁
徳島大学大学院ヘルスバイオ
サイエンス研究部
ストレス制御医学分野

要約

The interplay between nature and nurture is complex and interesting. Genotype-environmental interaction refers to genetic sensitivity to environmental stressors and genotype-environmental interaction refers to genetic influence on exposure to environments. The response of individuals to stressful life events varies considerably and depends on a wide range of environmental experiences, together with cognitive and genetic factors. Genetic polymorphisms are considered to play an important role in human behaviors, personality dimension, and the development of specific patterns of illness. Recent studies have shown that common variants in the key molecules involved in serotonin metabolism (MAOA and SERT) can manifest antisocial behavior or depression when exposed to stressful life events. Gene expression profiling in blood cells is a potential approach to assess abnormal stress responses, which may be associated with development of stress-related disorders. This review will focus on the recent advance in genotype-environmental interaction in predicting behavioral outcomes.

キーワード：遺伝子と環境の相互作用、ストレス反応、遺伝子多型、うつ病、ストレス評価用DNAチップ

1. はじめに

熱ショックタンパク質や酸化ストレスの研究を続けてきたが、ひよんな事からヒトのストレス研究の世界に紛れ込んでしまった。なぜストレス研究をやるのかと聞かれれば必要に迫られたとしか言いようがない。幸いにもこれまで真面目で優秀な多くのすばらしい学生に恵まれてきた。同時に、真面目なヒトほどうつ病になり易いという不条理な面があり、ストレスに対する脆弱性を決めるのは何なのかを解明したいと強く思ったからである。生まれ (nature) と育ち (nurture) の生命科学はこの本質に迫る命題である。本項では、この本質に迫るような解説は到底出来ないが、最近の「遺伝子と環境」の研究の発展を紹介し、我々の新たな試みへと話を進めていきたい。

2. 遺伝子と環境

生まれ (nature) が大事か、育ち (nurture) が大切かの論争は過去のものとなった。環境がそろって初めて遺伝子が呼び起こされ、生まれもった遺伝的素因がまわりの環境を変えていく。経験的に理解されているこれらを実証する研究は、遺伝子と環境の相互作用並びに相関関係の研究である。遺伝子と環境の相互作用は環境に対する遺伝的な感受性を、その相関関係はある環境への暴露の機会を決める遺伝的な要因を指している。個人のストレスイベントに対する感受性や、その際の社会的な支援の形成などは個人の遺伝子型に依存するとされている。そのような相互作用を示す確かな証拠は乏しい。ある環境の測定値に対して遺伝子がどの

ような影響を及ぼしているかについては、双子研究や養子研究といった遺伝子の作用が極めて鋭敏に検出できる研究デザインを用いて調べられてきた。最近、特異的な遺伝型を調べる研究手法が確立し、その手法を組み合わせることにより遺伝子と環境の相互作用の解明が少しずつではあるが進んできている。

2.1. 環境と遺伝子の相互作用と相関関係

動物実験は、遺伝子と環境の両方を実験的に操作する事が可能であり、主要効果と相互作用を直接評価できる利点がある。遺伝的にストレスに高感受性あるいは低感受性を示す系統や純系動物を用いることができる。しかしながら、動物の心理・行動データをヒトの社会生活にそのまま適応することは難しい。とりわけ認知能などに関しては、遺伝子と環境の相互作用を動物実験で見つけることは困難である。また、双子研究は遺伝子と環境の相互作用の研究には向いていない。というのは、生来の素因の中から環境の影響を分離して検出することが難しいからである。

遺伝子と環境の相互作用についての関心は高い。しかし、遺伝子と環境の相関関係、つまり、環境に対する遺伝的影響の方がより重要かもしれない。我々がストレスと認知する過程にはこれまでの経験が反映されており、自分自身と無関係なものではない。また、病気やけがなどのライフイベントに遭遇する確率には遺伝性があり、たまたま起こることではないらしい。個人の裁量で回避可能なライフイベントに遭遇する頻度は、そうでないイベントに比べ、より遺伝的な要素がある。些細だが毎日続くストレス

サーの方が、重大なライフイベントより深刻な影響を身体に及ぼすことが示唆されている。日常苛立ち事と呼ばれるこの種のストレスに曝される危険性、社会支援ネットワークの形成、なども遺伝性を有しているように思われる。

2.2. KendlerとEvansの学説

KendlerとEvansは遺伝子と環境がどのように相互作用して精神疾患を発症させるかを説明するため、3つのモデルを提唱している¹⁾。彼らの学説は、最近の多くの経験論的研究を議論する上で有益な基盤となっている。最も単純なモデルは、不安やうつ症状は遺伝子と環境要因が付加的に加わった結果であるという説である。人々は遺伝子型に関係なく、ある環境ストレスに対しては同じように反応し、ストレスに遭遇する確率は遺伝的背景には無関係であるというものである。しかし、環境ストレスと遺伝子型が独立して働いているというこの仮説では、ライフイベントストレスに対してより感受性の高いヒトがいるという経験的な事実を説明できない。

2番目のモデルは、ある環境下においては、遺伝子が個人のストレスイベントに対する反応に影響するという説である。人生で遭遇する経験は個人により大きな違いがあり、さらに、自己評価、社会からの支援、気分、及び性格などの個人の特徴にも関連している。神経症的性格（一部分遺伝的に決められる特性）傾向が強いヒトはそうでないヒトに比べ、肉親の喪失や個人的な危機に対する反応が異なる、というのがこのモデルの一つにあたるかも知れない。環境による遺伝子のコントロールについては、生まれてまもなく母親から離して育てると、特定の脳の構造形成が影響を受け、大人になると異常行動を現わすという動物実験で説明されている。また、同じ動物でも系統が違えば幼少時のストレスに異なった反応を示すという事実は、ストレス反応には遺伝的背景があることも証明している。しかし、このモデルは、ストレスイベントに対する個人の反応は遺伝子に左右されると説明しているが、その個体がどれくらい環境ストレスに遭遇しやすいかについては遺伝子の影響を考慮していない。

最も興味深い第3のモデルでは、遺伝子型は個人がストレス環境に曝される確率を変化させると述べている。遺伝子と環境は独立して作用するのではなく、相互に関連して作用する。基本的に、ヒトは生涯を通じて遭遇する環境ストレスのレベルを自身で選択しているのである。遺伝子は、また、ライフイベントストレスをヒトがどのように思い出し、感じて、説明するかについても影響を与える。

3. 遺伝子と環境の分子遺伝学

遺伝子は個人の性格に強く影響することは明白であり、性格は多くの遺伝子によって決定されると考えられている。動物のブリーダーにはなじみ深いと思われるが、性格に影響を与える遺伝子の異なった変異体を代々受け継ぐことである決まった特性を生み出すことができる。しかし、この種の実験はヒトでは非現実的で、神経症的傾向の原因遺伝子や、他のどの性格傾向の原因遺伝子を見つけ出すことは出来ないのではないかと。

ヒトの性格のような複雑な表現系は、数多くの遺伝子が量的に付加的に作用して表現系を創り出すと考えられているため、しばしば量的特性と呼ばれる。付加的な影響を与える遺伝子座は量的特性遺伝子座 (QTL) と呼ばれる。多遺伝子型 (多数の付加的なあるいは相互作用する遺伝子が関与)、多因子型 (多数の遺伝子

と環境要因が加わるもの) という言葉も、同じく複雑な表現系が多数の遺伝子の影響下にあるような場合に用いられる。ヒトゲノムの完全解読と、それに引き続きHapmatプロジェクトにより、数百万のDNA配列の変異 (遺伝子多型性) がヒトゲノム全般に高密度存在することが分かり、ヒトの遺伝性疾患や複雑な行動特性に関連する遺伝子を検出するための革新的な手段が提供された。特定の家族のなかで代々受け継がれている特定の疾患や特性に関連するDNA領域を検出するため、多数の遺伝子マーカーを用いた連鎖解析が行われた。単一遺伝子疾患や多遺伝子疾患の原因遺伝子を同定するためのもう一つの方法は、大規模コホート集団と、同一集団から症例にマッチしたコントロールの間で、DNA多型の頻度を比べることで特定の量的特性を評価する関連解析である。関連解析は過去の家族連鎖解析によってあらかじめ同定された一つの染色体の候補遺伝子群や限局された領域を調べるために行われる。

遺伝子と環境の相互作用に関連して、複雑な行動学的特性に関与するいくつかの連鎖や関連性が繰り返し指摘されている^{2,3)}。しかしながら、これらの遺伝子を見つける作業は期待していたよりも進んでいない。複雑な特性はほとんどの場合、最も大きな影響を与えるQTLであっても、全体的な変化のたかだか1%も影響を及ぼさない。このような小さな効果を検出するためには非常にたくさんのサンプルが必要である。しかし、環境に対する遺伝的な感受性については、候補QTLの関連解析から、遺伝子と環境の相互作用を示すいくつかの証拠が見つかってきている。

3.1. ニューロトランスミッター関連遺伝子多型

セロトニン (5-HT) やドーパミンなどのニューロトランスミッターは、動物実験や臨床研究により、気分や衝動性、感覚刺激追求、依存症などのさまざまな行動の制御に重要な役割を果たすことが知られており、これらのニューロトランスミッター経路に関連する遺伝子群が特に注目され、研究されている。セロトニンは、脳の初期発達に重要な働きをしており、セロトニンニューロンは感情、認知、運動を調節している。セロトニン関連遺伝子群は、ヒトの性格にも関与する候補遺伝子である。セロトニントランスポーター遺伝子のプロモーターにある5HTT gene-linked polymorphic region (5HTTLPR) が短い型 (s型) は長い型 (l型) より転写活性が低く、よりうつ病に罹患しやすい。Caspiらは⁴⁾、ニュージーランドのコホート研究で、26歳のコホート集団のうつと不安の症状を評価し、過去5年間に起きたライフイベントを調査した。同じ程度のストレスイベントに遭遇してうつ病になったヒトとそうでないヒトの間で、セロトニントランスポーター遺伝子を比較して重要な違いを見いだした。うつ病になったヒトではそうならなかったヒトに比べてs型の5HTTLPRが多い事実を突き止めた。このことから、5HTTLPRは、ヒトが不幸な出来事にとどのように反応するのかを決定するのではないかという可能性を示した。Glatzらは、ストレスとセロトニン系の連結を初めて示唆した⁵⁾。彼らは組織培養を用いて、強力なグルココルチコイドホルモンであるデキサメタゾン、生理学的な濃度でSERT遺伝子の発現を刺激する事を証明した。デキサメタゾンのSERT遺伝子のプロモーターに対する作用は遺伝子型に依存しており、この相互作用の違いは、ライフイベントストレスに高い感受性を持つヒトはストレスに対して脆弱であることを説明する有力な証拠となっている。

ドーパミンは、セロトニンと同じく神経系に広く分布しており、気分の調節を含めた様々な機能と関連している。ドーパミン受容体ファミリーの一つ (DRD4) は、新規探求行動に関係する可能性が示唆されている。Nobleの研究では、DRD4受容体のある変異を受け継いだヒトの新規探求傾向は高い傾向を示す⁶⁾。同じ特性は、DRD2遺伝子のある特定の多型セットを持った男子にも多い。しかしながら、これら二つの変異体を個別に考慮した場合に比べて、DRD4とDRD2の多型の両方を持っている場合には新規探求傾向がさらに高くなる。

セロトニン系に関与するもう一つの遺伝子、A型モノアミンオキシダーゼの遺伝子 (MAOA)、にも同じような問題が持ち上がる。このA型モノアミンオキシダーゼはドーパミンなどの他のニューロトランスミッターの代謝にも働くが、この阻害薬は行動異常 (特にうつ病) の治療に長年使用されており、セロトニンのレベルを変えて作用すると考えられている。この遺伝子のプロモーター領域には、転写活性を高めるあるいは低下させるような2つの代表的な変異が知られている。この遺伝子はX染色体上にあり、男性では異なる2つ目の対立遺伝子座がないため、どちらか一方の遺伝子型が表現される。低活性型の遺伝子型を持つ男性は、悪い養育環境に感受性が高く、将来環境ストレスに曝されると反社会的行動や攻撃性を示す危険性が高まると一致して提唱されている⁷⁾。

4. ストレス反応調節遺伝子

ストレス反応に関与する遺伝子は、自律神経応答と神経内分泌のストレス反応に関与する遺伝子群の二つのカテゴリーに大別される。“闘争か逃走か” 反応として表現される急性反応は交感神経系を介した反応が主役であり、体内に広く分布する交感神経シナプスからのノルエピネフリンの放出と副腎髄質からのエピネフリンの放出による。急性期に続くストレス反応は、グルココルチコイド (ヒトの場合はコルチゾル) が介在する。この反応は認知されたストレスシグナルが視床下部に働きコルチコトロピン放出ホルモン (CRH) の放出を促すことから始まり、下垂体前葉から副腎皮質刺激ホルモン (ACTH) が放出され、ACTHは副腎皮質からのコルチゾルの分泌を刺激する。

セロトニンは、ニューロンの増殖、遊走、及び分化を調節し、発生初期の神経の形態形成を調節する重要な因子の一つでもある。急性ストレス反応は通常セロトニン神経系の乱れも伴う。

広範囲の遺伝子がストレス反応の様々な局面を制御するために、ストレスにより生じる生体の変化は、これらの遺伝子による影響を受け、個人によりさまざまである。ストレス反応に関与する遺伝子と身体的あるいは行動学的特性との関連性についての研究が行われている。しかし、この種の研究では、混在しているその他の重要な因子が結果を左右することがあるため、常に結果が再現されるとは限らない。紙面の関係から、個々の遺伝子型についての紹介は省略するが、ストレス反応経路を構成する遺伝子の変異と行動異常との関連について概略する。

4.1. 自律神経系を介したストレス反応経路における遺伝子多型

ストレスの急性反応においては、エピネフリンとノルエピネフリンの合成と分解を調節する遺伝子のなかで、重要な最終段階の2つの反応をそれぞれ触媒するドーパミンβ水酸化酵素 (DBH) とフェニルエタノールアミンN-メチル転移酵素 (PNMT) は重要であり研究が進んでいる。

ドーパミンβ水酸化酵素 (DBH) 遺伝子は第9番染色体に位置している。DBH遺伝子の転写調節領域と推定されている転写開始点の上流1021番目の塩基CがTに変わる1塩基多型 (SNP) は、血漿中のDBH酵素を50%まで変化させる。コーディング領域内にもいくつかのSNPが報告されており、エクソン11の1つのコドンがアルギニンからシステインへ変換する変異と機能変化が示唆されている。血漿中の酵素レベル並びにDBH遺伝子型の変化と、高血圧、精神病、偏頭痛、注意欠陥・多動性障害、及びアルコール依存症などの様々な生理的・行動学的な異常との関連が示唆されているが、ストレスに対する反応のなかで、この酵素自身の変化に基づく特徴的な行動学的及び生理学的な変化は報告されていない。

もう一つの鍵となる酵素であるフェニルエタノールアミンN-メチル転移酵素遺伝子 (PNMT) は第17番染色体に存在する。この遺伝子の転写制御に影響を与える可能性のある2つのSNPがプロモーター領域に同定されている。ケースコントロール研究によると、これらのSNPsと早発性アルツハイマー病との関連性やアフリカ系米国人の高血圧とこれらのSNPsとの関連性が報告されている。

エピネフリンとノルエピネフリンの受容体であるアドレナリン受容体は、α (α1とα2サブタイプ) とβ (β1, β2, 及びβ3サブタイプ) の二つのタイプに体別される。これらの受容体は、いわゆるβ遮断薬などの様々な薬剤の標的であり、これらの遺伝子の変異は薬物治療の面からも重要である。ノルエピネフリントランスポーター1タンパク質遺伝子 (NET1) は、NAT1あるいはSLC6A2としても知られている。この遺伝子は第16番染色体にある。神経終末のシナプス内のノルアドレナリンの約80%はノルエピネフリントランスポーターにより再吸収される。SLC6Aはイミプラミンやデスプラミンなどの三環系抗うつ剤やアンフェタミンやコカインなどの薬物の標的の一つである。自律神経のノルエピネフリン、エピネフリン経路に関与する遺伝子の研究が進み、これらの遺伝子多型は幅広い個人差を生み出すのに重要であることが証明された⁸⁾。この結果、これらの遺伝子の多型は、ストレス反応に直接あるいは間接的に連結するいくつかの病態を含め、幅広い疾患に重要であることが示唆されているが、ストレス反応の異常と直接結びつく遺伝子多型は未だ実証されていない。

4.2. 神経内分泌を介したストレス反応経路の遺伝子多型

視床下部・下垂体・副腎 (HPA) 軸を介した遅延反応に関与する遺伝子多型も個人のストレス反応の個人差に重要とされる。ストレスシグナルが視床下部に伝わることでHPA軸は活性化され、最終的に、副腎皮質からコルチゾルが放出される。ほとんどのコルチゾルはコルチコステロイド結合グロブリンに結合した状態で全身を循環している。古典的なコルチゾルの作用様式は、細胞内にある特異的受容体 (グルココルチコイド受容体) にグルココルチコイドが結合すると、グルココルチコイド・受容体複合体は核内に移行して特異的な転写発現装置と作用し、転写を調節する。

グルココルチコイド受容体には、グルココルチコイド受容体 (GR) とミネラルコルチコイド受容体 (MR) の2種類がある。しかしながら、後者のMRはアルドステロン及びグルココルチコイドに対して同じような高親和性を示し、両者とも結合させる。GRはグルココルチコイドに特異的な受容体である。ストレスにより上昇したグルココルチコイドを介した主な反応には1次的にGRが介在する。GR遺伝子についてはプロモーター領域を含めて

いくつかの遺伝子多型が報告され、精神疾患との関連が示唆されている⁹⁾。GR遺伝子は強い連鎖不平衡が存在するため、対立遺伝子座の組み合わせは比較的少なく、主な4つのハプロタイプが知られている。ハプロタイプの情報はグルココルチコイド治療に対する反応を知る上で有用である。コーティング領域の変異体には、タンパク質の第22と23番目のアミノ酸に隣接したコドンに2つの多型が存在する。コドン22の塩基変化はアミノ酸(グルタミン酸)の置換をもたらさない。一方、コドン23の多型はアミノ酸をアルギニンからリジンへと変化させる。プロモーター領域とコドン22-23の対立遺伝子のある特異的な組み合わせを持ったヒトは、グルココルチコイドに対して比較的耐性を示す。また、コドン363のアスパラギンをセリンに置換させる多型は、グルココルチコイドに対する高感受性と関連しているらしい。

膜結合型のGRsは、肝臓、リンパ球、副腎、及び下垂体を含めたある一定の臓器に発現している。これらの様々な受容体を区別する構造的な特徴についての情報は乏しい。さらに、遺伝子変異がどのように膜結合型GRsを変化させるかについては、情報が乏しい。しかし、GRの機能は、1つの大きな分子複合体を形成するいくつかの構成因子との相互作用に依存している。5つのGRコシャペロンが活性の調節に重要であることが認識されており、その5つのコシャペロンをコードする遺伝子は、BAG1 (BCL2-associated anthanogene 1)、STUB1 (STIP 1 homologous and U box-containing protein 1)、TEBP (Thyroid transcription factor 1)、FKBP4 (FK-506 binding protein 4)、FKBP5 (FK-506 binding protein 5)である。これら5つの遺伝子の最近のSNP解析によると、FKBP5遺伝子座に見られる3つのSNPsは、高頻度に再発を繰り返し、抗うつ剤の処方に良く反応するうつ病と有意に関連することが報告された。さらに、この遺伝子とその上流の遺伝子型を調べることでこの明確な関連性をさらに裏付ける証拠が見つかった。特に、GRとFKBP5の相互作用はグルココルチコイドシグナルの制御及びHPA軸の反応性を制御する事が報告され、心的外傷後ストレス障害 (PTSD) との関連が注目されている¹⁰⁾。

5. 慢性ストレスとテロメア

慢性ストレスと病気の関係性を説明できるような遺伝子、環境の相互作用に関与する可能性をもつ遺伝子は多く存在する。ニューロトランスミッター機能は、これら多くのゲノム領域の一つではない。Epelらは全く異なったアプローチを行い、慢性疾患をもつ子供をかかえた母親の集団を調査して、慢性心理的ストレスの細胞老化に対する影響を調べた¹¹⁾。彼らは、ストレスの程度と末梢血単核細胞のテロメアの短縮に有意な相関を認めた。テロメアは染色体の末端領域で、加齢とともに次第に短縮する。この研究では、最も強いストレスを訴えた女性は、子供が健康な母親に比べてテロメア平均長が短かった。このように、細胞の酸化ストレスの増加により生じた細胞寿命の決定因子であるテロメア短縮は心理的ストレスと関連していた。ストレスの低い母親と比べると、最も強いストレスを感じていると思われる母親では、テロメアの短縮は平均10歳年齢を重ねると同じ程度の短縮が認められたのは驚きである。

6. 発生初期の環境とストレス

最近のもう一つの興味深い研究領域は、胎児期と幼児期の遺伝・環境要因が、どのようにして大人になり、ストレスに遭遇した場合の反応に影響を及ぼすかである。WelbergとSecklは、ステロイドホルモンと視床下部-下垂体-副腎 (HPA) 軸が脳の胎

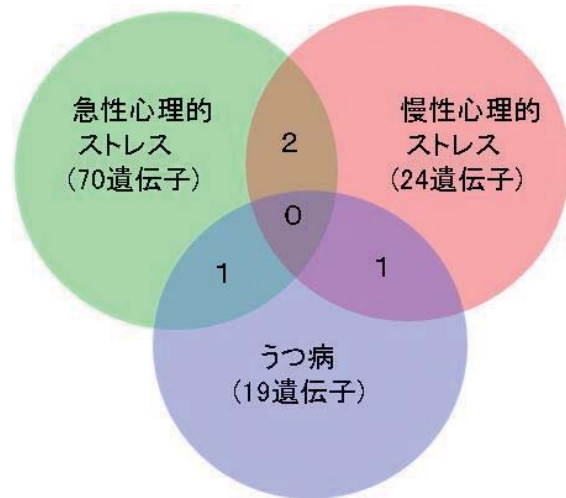


図1. うつ病特異的遺伝子と健康人の心理ストレス応答遺伝子
未治療のうつ病患者32名に共通して発現変化している19遺伝子と健康人の急性(13)及び慢性心理的ストレス(14)応答遺伝子のオーバーラップをベン図に示した。慢性心理的ストレスとうつ病には共通して1つの遺伝子が含まれるが、急性心理的ストレスとうつ病の双方のマーカー遺伝子に含まれる1つの遺伝子は、急性心理的ストレスでは発現が亢進し、うつ病では低下していた。

児期のプログラミングに重要な役割を持つと考え、これらの役割を精力的に調査した¹²⁾。動物実験では、胎児期のストレスは、HPA軸に長い間持続する影響を与え、成獣になってからもHPA軸の過剰反応と行動及びストレスに対する反応性を明確に変化させるようにプログラムされると報告している。胎児期にストレスに曝された成人ラットでは、ヒトの不安状態を再現するような行動を増加させる。動物実験の結果をそのままヒトに当てはめて説明するのは細心の注意が必要である。しかしながら、多くの臨床研究によって、妊娠時に母親が低栄養状態であったり、低出生体重で生まれると、後の心血管障害、肥満、精神疾患の発症に関連することが報告されている¹³⁾。このような胎児期に受けたストレスは、大人になってからの行動異常や精神病理的な変化と結びつく可能性については、いまだ興味深い推測の域を出ていない。ステロイドホルモンとHPA軸はそのような結びつきに関連するものとして多くの研究で注目されている。

7. 末梢血遺伝子発現プロファイリングによるストレス反応の評価

我々は、末梢血の遺伝子発現解析によるストレス・精神疾患の病態解析と診断技術の開発を行ってきた。「ここを映し出すDNAチップの開発」と命名したストレス評価用DNAチップを日立製作所と共同で開発し、健康人のストレス^{14, 15)}、うつ病及び慢性疲労症候群¹⁶⁾の解析を行ってきた。目的として、1) 健康人でみられるストレス反応の評価、2) ストレス関連疾患における病的ストレス反応の検出、3) 疾患発症を予測できる個人の遺伝子発現の特性の同定、及び、4) 環境応答性遺伝子の特定と遺伝子発現の個人差 (パーソナリティ) の形成を明らかにすることを

目指した。

うつ病はストレスが起因となって発症するが、未治療患者32名で共通して発現変化する19遺伝子を、大学院生の学位発表会と医師国家試験受験者でそれぞれ見いだした急性（70遺伝子）及び慢性心理的ストレスマーカー遺伝子（24遺伝子）と比較すると、うつ病患者は健常人のストレス反応では見られない特徴的な遺伝子発現変化を示すことを見いだした（図1）。その後、大学生の心の疾患の発症を調べるため、コホート研究を開始し、「末梢血の遺伝子発現は、環境と遺伝子の相互作用の研究、脳科学研究の有効なツールとなるか？」をテーマに、環境と遺伝子並びにパーソナリティ研究へと展開している。

これまでの研究成果をまとめると、末梢血遺伝子発現プロファイルリングは、

1. ストレス応答の質を解析できる。
 2. 白血球細胞の遺伝子発現は極めて安定、しかし大きな個人差がある。
 3. 環境応答遺伝子がStaticな個人差（パーソナリティ）の形成に関わる可能性がある。
 4. Staticな遺伝子発現と脳活動やストレス応答とリンクしている可能性がある。
 5. うつ病患者に特有のうつ病パターンがあり、健常人の約12%にも認められる。
- などを明らかにしている。

ストレス関連疾患の発症メカニズムを図2に示した。医学部新入生300名の協力を得て、健常大学生のコホート研究を行っている。

遺伝子発現の個人差に注目し、個人間で発現に差が大きい396遺伝子を用いると、5つの発現パターンに分かれること、それぞれのグループのシグナルパスウェイに特徴があることを見いだした（図3）。個人差を誘導する遺伝子は、質問紙により調べた睡

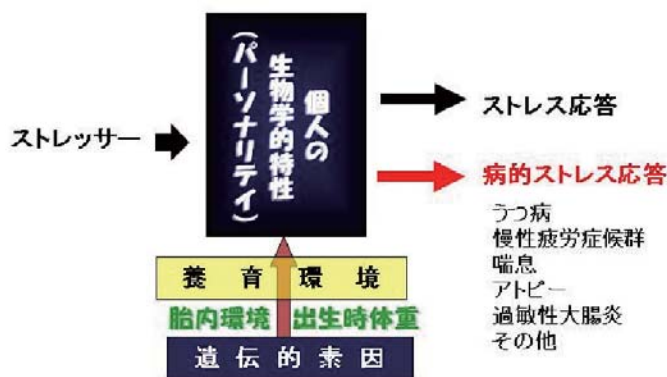


図2. ストレス起因する疾患の発症メカニズム
遺伝的素因、体内環境、出生時体重、養育環境などにより社会脳や性格特性などの個人の生物学的特性が形成させる。この過程に問題があると、ストレスに対して病的ストレス反応を引き起こし、個人の遺伝的特徴に応じた疾患を発症する。

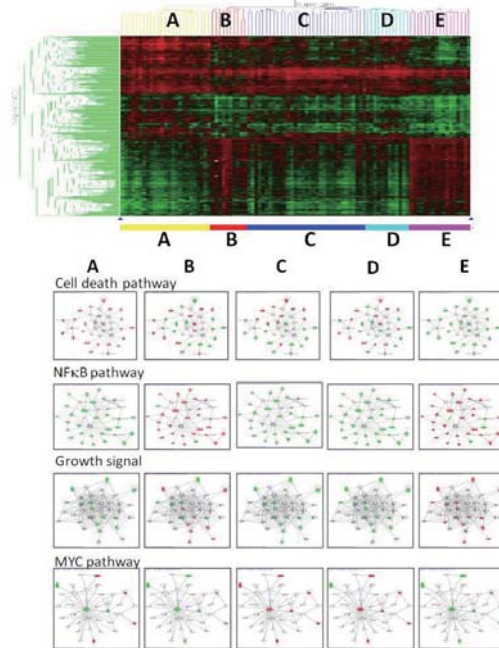


図3. 健常大学生97名の末梢血遺伝子発現パターンの分類
健常大学生97名の末梢血遺伝子発現をストレス評価用DNAチップで調べ、発現量に個人差の大きい396遺伝子を用いてクラスタリングを行い、5つのグループ(A-E)に分類した(上図)。Ingenuity Pathway Analysis Application (IPA)を用いて、それぞれのグループにおけるCell death pathway, NFκB pathway, Growth signal, 及びMYC pathway関連遺伝子の発現の違いを示した。

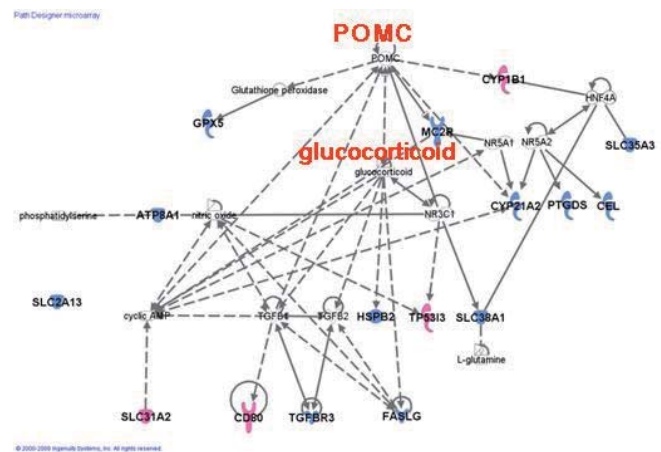


図4. 両親の養育態度を愛情不足と過干渉と感じている男子大学生に見られる遺伝子発現の変化
両親の養育態度を愛情不足と過干渉と感じている男子大学生は、愛情豊かで自由に育ててくれたと感じる男子大学生に比べ、有意にうつ傾向を示す。前者の学生には、グルココルチコイド関連遺伝子の発現が有意に変化している。青色は発現の低下を、桃色は発現の亢進をそれぞれ示す。

眠習慣、睡眠状態、生活習慣、食行動、養育環境のスコアと相関する遺伝子が含まれており、環境応答遺伝子群と考えられる。なかでも、養育環境は興味深い。新入生が15才までの両親の養育態度をどのように評価しているかをParental Bonding Instrument (PBI) で調査し、両親の愛情に不満をもち過度の干渉を受けたと感じている学生は、朝覚醒直後から30分までの唾液コルチゾルの分泌増加が悪く、血液細胞のグルココルチコイド関連遺伝子の発現異常が認められ (図4)、養育環境によるストレス反応経路が修飾される可能性を示唆している。本研究手法は、遺伝子と環境の相互作用、疾患の予知医学、あるいはパーソナリティー研究への応用が期待できる。

8. おわりに

末梢血の遺伝子発現を調べて行くと、個人差の大きさには驚かされる。遺伝的な素因に加えて、養育環境などの環境要因が個人差を生み出しているのであろうか。最近、non-coding functional RNAに加えて、選択的スプライシングなどのpost-transcriptional regulationが環境変化に対応する重要な調節機構として注目されている。遺伝子と環境の研究は今後益々重要なテーマとなると思う。本来、ヒトの遺伝子は行動を制約するものでなくその可能性を開くべきものである。そうだとすると、遺伝子と環境の命題を解き明かす事は可能なのであろうか？

謝辞

本総説で紹介した我々の研究成果は、科学技術振興調整費「ここを映し出すDNAチップの開発」事業、日本科学技術振興機構「脳科学と教育」事業、及び、日本科学技術振興機構育成研究事業の研究助成で行ったものであり、心から感謝している。

[参考文献]

1. K.S. Kendler, L. Karkowski-Shuman, Stressful life events and genetic liability to major depression: genetic control of exposure to the environment?, *Psychol. Med.*, **1997**, 27(3), 539-547.
2. P. Mormède, H. Courvoisier, A. Ramos, N. Marissal-Arvy, O. Ousova, C. Désautés, M. Duclos, F. Chaouloff, M.P. Moisan, Molecular genetic approaches to investigate individual variations in behavioral and neuroendocrine stress responses, *Psychoneuroendocrinology*, **2002**, 27(5), 563-583.
3. L.M. Butcher, E. Meaburn, L. Liu, C. Fernandes, L. Hill, A. Al-Chalabi, R. Plomin, L. Schalkwyk, I.W. Craig, Genotyping pooled DNA on microarrays: A systematic genome screen of thousands of SNPs in large samples to detect QTLs for complex traits, *Behav. Genet.*, **2004**, 34, 549-555.
4. A. Caspi, K. Sugden, T.E. Moffitt, A. Taylor, I.W. Craig, H. Harrington, J. McClay, J. Mill, J. Martin, A. Braithwaite, R. Poulton, Influence of life stress on depression: Moderation by a polymorphism in the 5-HTT gene, *Science*, **2003**, 301, 386-389.
5. K. Glatz, R. Mössner, A. Heils, K.P. Lesch, Glucocorticoid-regulated human serotonin transporter (5-HTT) expression is modulated by the 5-HTT gene-promotor-linked polymorphic region, *J. Neurochem.*, **2003**, 86(5), 1072-1078.
6. E.R. Noble, T.Z. Ozkaragoz, and T.L. Ritchie, D2 and D4 dopamine receptor polymorphisms and personality, *Am. J. Med. Genetics*, **1998**, 88(3), 257-267.
7. A. Caspi, J. McClay, T.E. Moffitt, J. Mill, J. Martin, I.W. Craig, A. Taylor, R. Poulton, Role of genotype in the cycle of violence in maltreated children, *Science*, **2002**, 297(5582), 851-854.
8. G. Stöber, M.M. Nöthen, P. Pörzgen, M. Brüss, H. Bönisch, M. Knapp, H. Beckmann, P. Propping, Systematic search for variation in the human norepinephrine transporter gene: identification of five naturally occurring missense mutations and a study of association

- with major psychiatric disorders, *Am. J. Med. Genet.*, **1996**, 67, 523-532.
9. S. Wüst, E.F. Van Rossum, I.S. Federenko, J.W. Koper, R. Kumsta, D.H. Hellhammer, Common polymorphisms in the glucocorticoid receptor gene are associated with adrenocortical responses to psychosocial stress, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **2004**, 89, 565-573.
 10. E.B. Binder, R.G. Bradley, W. Liu, M.P. Epstein, T.C. Deveau, K.B. Mercer, Y. Tang, C.F. Gillespie, C.M. Heim, C.B. Nemeroff, A.C. Schwartz, J.F. Cubells, K.J. Ressler, Association of FKBP5 polymorphisms and childhood abuse with risk of posttraumatic stress disorder symptoms in adults, *JAMA*, **2008**, 299(11), 1291-1305.
 11. E.S. Epel, E.H. Blackburn, J. Lin, F.S. Dhabhar, N.E. Adler, J.D. Morrow, R.M. Cawthon, Accelerated telomere shortening in response to life stress, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2004**, 101(49), 17312-17315.
 12. L.A. Welberg, J.R. Seckl, Prenatal stress, glucocorticoids and the programming of the brain, *J. Neuroendocrinol.*, **2001**, 13(2), 113-128.
 13. J.R. Seckl, M.C. Holmes, Mechanisms of disease: glucocorticoids, their placental metabolism and fetal 'programming' of adult pathophysiology, *Nat. Clin. Pract. Endocrinol. Metab.*, **2007**, 3(6), 479-88.
 14. K. Morita, T. Saito, M. Ohta, T. Ohmor, K. Kawai, S. Teshima-Kondo, K. Rokutan, Expression analysis of psychological stress-associated genes in peripheral blood leukocytes, *Neurosci. Lett.*, **2005**, 381(1-2), 57-62.
 15. T. Kawai, K. Morita, K. Masuda, K. Nishida, M. Shikishima, M. Ohta, T. Saito, K. Rokutan, Gene expression signature in peripheral blood cells from medical students exposed to chronic psychological stress, *Biol. Psychol.*, **2007**, 76(3), 147-155.
 16. T. Saiki, T. Kawai, K. Morita, M. Ohta, T. Saito, K. Rokutan, N. Ban, Identification of Marker Genes for Differential Diagnosis of Chronic Fatigue Syndrome, *Mol. Med.*, **2008**, 14(9-10), 599-607.

著者プロフィール

氏名：六反一仁 (ROKUTAN Kazuhito)、55才
所属：徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部
ストレス制御医学分野

住所：〒770 - 8503 徳島市蔵本町3-18-15

京都府立医科大学医学科卒、医学博士

現在の研究テーマ

ストレスゲノミクス、RNAプロセッシングとストレス応答

趣味：読書と庭木の剪定

漢方診療・再発見 3 気道炎症と漢方薬

宮田 健
崇城大学薬学部 未病薬学研究室

1. はじめに

漢方薬による喘息を始めとする炎症性気道疾患の治療は長い歴史があり、麻黄剤、柴胡剤を主にして一定の効果が認められている。近年、気道炎症・アレルギーの多様な病態像に対する漢方薬の多面的・総合的薬効評価や、さらに細胞・分子レベルでの作用機序解明が進んできている。漢方薬は今までの難治性症例の治療薬あるいは補助薬としてのみならず、次世代の治療原理とQOLを重視した新規治療法としての意義を持つと考えてよい¹⁾。

本稿では総合的気道クリアランス改善薬として臨床で繁用され、異常咳嗽、粘液過分泌に対する制御作用や粘液分子変換などについて、分子レベル・遺伝子レベルで基盤情報が集積されつつある麦門冬湯のマイルドステロイド様作用機序を中心に概説する。

2. 鎮咳作用

1) 作用特性

臨床的に問題になる咳は多種多様であり、特に気道炎症時の咳は多成分からなる複合反射と考えられる。咳は、本来、気道内異物排除を目的とする生体防御反射であるから、鎮咳薬の使用にあたってはその役割を損なわない程度に緩和することが大事であり、気道のクリーニングを促進させることに意を注ぐべきである。

コデインや合成鎮咳薬は延髄の咳中枢（孤束核、小細胞性網様体核、疑核など）よりなる統合性神経回路網を抑制して作用を現すが、中枢性鎮咳薬は気道炎症時のメディエーターにより誘発さ

れる咳に対する抑制作用は弱い。コデインの投与は気道炎症反応を増悪し、気道粘膜の被刺激性を反映する上喉頭神経自発放電の振幅を増大させる（図1）^{2,3)}

漢方鎮咳・去痰薬として分類されているものは20種類以上存在し、「証」に応じて処方される。構成生薬・成分の違いにより、それぞれ異なる作用態度を示すが、気管粘膜の器械的刺激により誘発した咳に対する抑制は小青竜湯合麻杏甘石湯を除けば非常に弱い。このことはirritant receptorの直接刺激によるA-線維を介する気道内異物排除（クリアランス）という防御反射としての咳を抑制する作用が弱いことを示唆する。炎症時にメディエーターがC-線維末端を刺激して起こす咳に対してはコデインではほとんど効果がないが、麦門冬湯はよく奏効する。このことは図1に示されるように気道炎症時の上喉頭神経自発放電の振幅増大を抑制することからも裏付けられる。

2) 作用発現機序——タキキニン制御作用

サブスタンスPやニューロキニンAなどのタキキニンは気道に存在するニューラルエンドペプチダーゼ（NEP）により分解不活化される。これらのメディエーターによる咳反射は、NEP阻害薬で増強されるのでNEP活性のレベルが咳反射を調節していることが推定される。NEP阻害薬ホスホラミドン自身が咳反射を誘発するという成績は、タキキニンが内因性咳誘発物質として重要な役割を果たしていることを強く示唆する。麦門冬湯とその主要な活性成分であるオフィオポゴニンはサブスタンスPによる気道炎症時の咳増強反応を著明に抑制する。気管支炎動物においては気管および気管支のNEP活性が1/9程度に低下するが、麦門冬湯を投与すると低下せず活性が維持される。サブスタンスPを始めとするC-線維末端からのタキキニンの遊離はカプサイシン受容体であるTRPV 1受容体の活性化によるが、最近の研究により麦門冬湯の鎮咳効果には気道炎症で増加したNO（Nitric Oxide）の消去作用が関係することも示唆されている。

以上の成績を総合すると、麦門冬湯は咳反射のトリガー部位におけるタキキニン受容体（NK₁およびNK₂レセプター）レベルでの拮抗作用に加え、タキキニンの生成、遊離、分解などの動態に対しても総合的に作用し、これらのタキキニン制御作用が鎮咳作用発現機序として重要であると考えられる^{3,4)}。また、これらの成績はアンギオテンシン変換酵素阻害薬（ACE阻害薬）による咳などの難治性咳嗽の発現機序としてタキキニン受容体、特にNK₂レセプターが関与している可能性が高いことを示唆する。事実、ACE阻害薬の連用により副作用として発現する乾性咳はコデインのような中枢性鎮咳薬では効果がなく麦門冬湯投与により完全に遮断される⁵⁾。

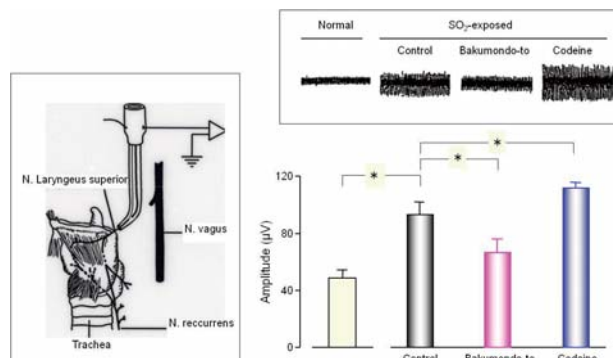


図1 亜硫酸ガス慢性暴露による気管支炎罹患モルモットの上喉頭神経自発放電に対する麦門冬湯とコデインの作用

これらの知見を基に、臨床でACE阻害薬による咳、或いは咳感受性が亢進している喘息患者、透析患者や間質性肺炎・肺線維症患者の乾性咳、或いは感冒後の遷延性咳の治療に麦門冬湯が用いられており、高い有効性と有用性が認められている。

3. 気道分泌と粘液線毛輸送に対する作用

多くの慢性肺疾患において、特徴的に気道粘液の異常形成と過剰分泌がみられる。それらの疾患における咳嗽は粘性の痰が除かれると止ることが多い。本来、鎮咳・去痰という場合にはあくまでも去痰に主眼がおかれなければならない。異常咳嗽は気道内異物排除という生体防御反射としての咳の役割を損なわない程度に緩和することが大事であり、気道のクリーニングを促進させることに意を注ぐべきである。従来の合成鎮咳・去痰薬にはこのような考えが充分採り入れられているとは言い難い。これらの薬理学的観点から我々は麦門冬湯の気道分泌と粘液線毛輸送に及ぼす効果を評価した⁶⁻⁸⁾。

1) 肺サーファクタント

肺サーファクタントは肺胞II型上皮細胞により合成・分泌され、肺胞上皮表面に単分子膜を形成する。それにより直径200 μm内外の大小の球形を呈するテニスコートの広さにも匹敵する肺胞表面をわずかに約20 mlで被い、肺胞自体の弾性と界面の表面張力による収縮作用、特に肺胞気-液界面の表面張力を低下させ、肺胞の虚脱による無気肺化を防ぎ、安定した換気能力を維持する。この役割に加えて、肺サーファクタントは粘液線毛クリアランスに重要であり、炎症性メディエーターは粘液線毛輸送を抑制するが、肺サーファクタントはこの粘液線毛輸送の抑制に対して保護効果があることを明らかにした¹⁾。

麦門冬湯のろ過液で肺胞II型上皮細胞を処理すると肺サーファクタントの基礎分泌率は有意に増強した。その作用は β_2 -アドレナリン受容体の刺激薬に似ている。分泌の増強効果はプロテインAキナーゼ阻害剤であるH-89の前処理によって阻害されたが、 β_2 -アドレナリン受容体のアンタゴニストであるプロプラノロールでは阻害されなかった。我々はまた、麦門冬湯が有意にまた連続的に細胞内の Ca^{2+} 濃度を増加させることを見出した。炎症状態を再現し、肺サーファクタントの過剰分泌における麦門冬湯とその主要活性成分の一つであるステロイドサポニンのオフィオポゴニンの効果を調べるために肺胞II型上皮細胞とサブスタンスPで活性化した多形核白血球の混合培養系を用いた。麦門冬湯とオフィオポゴニンは過酸化水素により増加した分泌を有意に阻害した。これらの結果は麦門冬湯が肺サーファクタントに対して特徴的な分泌増強効果をもち、炎症性の量的・質的過剰分泌を正常化することを示唆している。その機序について検討したところ、 β_2 -アドレナリン受容体遺伝子の発現が関与していることが分かった⁶⁾。

肺胞II型上皮細胞の β_2 -アドレナリン受容体mRNA発現量はデキサメタゾン処理により増加し、 β_1 -アドレナリン受容体mRNA発現量は有意な影響を受けない。麦門冬湯ではデキサメタゾンとは異なり、肺胞II型上皮細胞の β_2 -アドレナリン受容体mRNA発現量は影響を受けないが、 β_1 -アドレナリン受容体mRNA発現量は有意に増加する。麦門冬湯による β_1 -アドレナリン受容体遺伝子発現の選択的作用のメカニズムはまだ不明であるが、その効果は慢性気道疾患における麦門冬湯の有効性に寄与するであろう。なぜなら、 β_1 、 β_2 -アドレナリン受容体は共に肺サーファクタントの分泌を仲介するからである。

2) 気道粘液

健全な気道は高分子多糖体に富む粘液で覆われており、それはコアタンパクとしてセリン、スレオニンに富む反復配列ドメインをもち、O-グリコシド型でオリゴ糖が結合している。気道粘液多糖タンパクは気道粘膜の保湿・潤滑作用だけではなく、線毛輸送による異物の捕捉と除去を含む多様な防御機能をもつ。しかしながら、過剰な粘液産生は慢性気管支炎、喘息、嚢胞性線維症、気管支拡張症などの気道疾患の特徴である。これらの疾患において、気道への多形核白血球の浸潤と1次感覚神経終末からのサブスタンスPの遊離がみられる。サブスタンスPは多形核白血球の活性化を通して気道上皮細胞の粘液分泌に影響していると考えられる。この観点から我々は気道炎症の状態を再現するためにハムスター気管上皮細胞の培養系およびサブスタンスPまたは他の刺激剤により活性化した多形核白血球と気管上皮細胞の混合培養系を用いて麦門冬湯の粘液調節作用を評価した。麦門冬湯のろ過液、フラボノイドとサポニンを含む疎水性画分と糖とペプチドを含む親水性画分において、単独培養した気管上皮細胞の通常の高分子多糖体の分泌には影響しなかったが、気管上皮細胞と多形核白血球の混合培養系において麦門冬湯のろ過液はサブスタンスP誘導性の粘液（高分子多糖体）の分泌を有意に抑制した。粘液遺伝子発現についてNorthern blotおよびRT-PCR解析の結果、s-HTE細胞およびNCI-H292細胞にはMUC₂とMUC₅ mRNAの発現が認められた。麦門冬湯とデキサメタゾンはMUC₂およびMUC₅ mRNAの発現を濃度依存的に抑制した。

これらの成績は気道炎症に伴う杯細胞の過形成、粘液分泌異常の機序を解明する上での重要な基礎データになり得る⁶⁻⁸⁾。

3) 粘液線毛輸送に対する作用

粘液線毛系の測定方法について種々検討を行い、再現性、簡便性、そして薬効評価に際しての種々の受容体、あるいは細胞内でのシグナルトランスダクションの関係等について、ヒトとあまり大きな相違がみられないウズラを用いた粘液線毛輸送能測定装置を作成して実験系として用いた。

麦門冬湯とその活性成分であるオフィオポゴニンの投与により、用量依存的な粘液線毛クリアランスの促進が認められた。

粘液線毛クリアランスの阻害物質にはいろいろあるが、DNAは非常に強い阻害活性を示すことが知られている。DNA投与によって粘液線毛クリアランスは著しく阻害され、DNAの分解酵素であるDNaseの投与によって粘液線毛クリアランスは回復する。2 μlの溶媒に溶かしたDNA 15 μgを約1/30秒程度の瞬間的局所投与によって惹起された気道粘液線毛クリアランス低下は、麦門冬湯及びオフィオポゴニンによって著明に回復した⁹⁾。

次にヒト好中球エラスターゼ (HNE) による粘液線毛輸送の障害に対する麦門冬湯とオフィオポゴニンの作用についても検討した。ウズラ気管の線毛細胞にHNEを局所投与すると、細胞の配列の乱れとともに細胞の脱落が生じ、エラスターゼ阻害薬を投与すると傷害された線毛細胞は修復する。HNE投与によって粘液線毛輸送能は非常に強く、しかも持続的に阻害されるが、麦門冬湯の投与で、輸送能は80%近くまで回復する⁹⁾。

HNE投与による気管粘液中の成分、特にDNA、フコース、プロテインを測定し、麦門冬湯投与による変化について検討した。HNE投与によってDNA、フコース、プロテインは著明に増加するが、麦門冬湯投与でほぼ元の数値に回復した。HNE投与による粘液線毛輸送能の低下に対して、オフィオポゴニン単独投与でも麦門冬湯と同様、阻害された粘液線毛輸送の回復が認められた^{6, 9, 10)}。

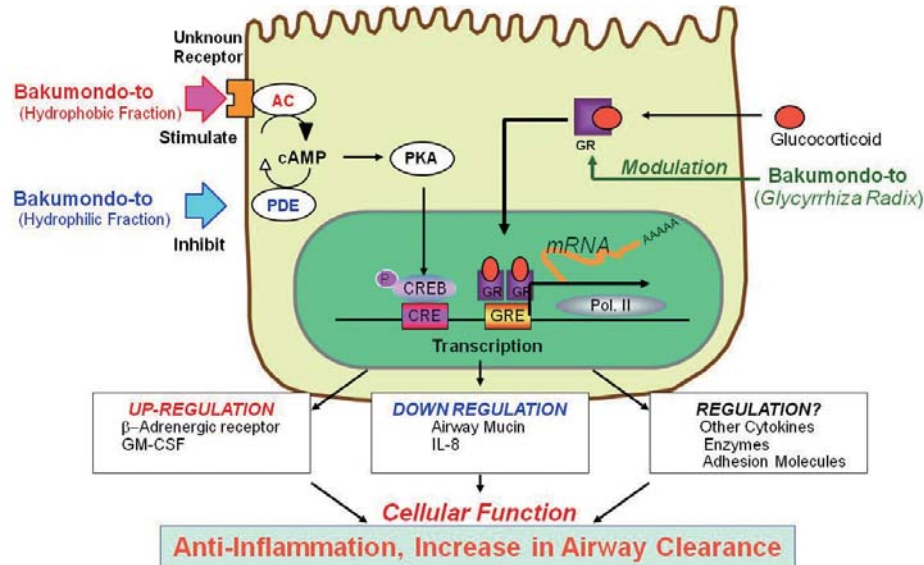


図2 気道上皮細胞における各種機能分子の遺伝子発現に対する麦門冬湯の作用

呼吸器作用薬で気道の閉塞を改善する薬剤はあまりない。β刺激薬、抗ヒスタミン薬、抗アレルギー薬、ロイコトリエン拮抗薬、あるいはエラスターゼ阻害薬などは、個々の実験系ではかなりの効果が認められるが、全体的な作用としての気道粘膜・粘液修復、気道クリアランス改善に対しては明確な実験的証明が得られ難い。気道の粘液線毛クリアランスを総合的に回復させることが必要であり、麦門冬湯はステロイド類似のmucoactive drugとして特徴的な作用を有する方剤であるため高い有効性が得られるのであろう (図2) ^{1,10)}。

4. マイルドステロイドとしての漢方薬と新規治療法への応用

気管支喘息や慢性閉塞性呼吸器疾患 (COPD) 等では気道に慢性的な炎症があることが共通の特徴であり、気道上皮傷害、気管支平滑筋の過敏症、気道粘膜の浮腫や粘膜下腺の過形成およびそれに伴う気道分泌物の充進と気道クリアランス障害などの多様な病態が原因となり、ほとんどが難治性である。グルココルチコイド製剤を用いると一定の効果は挙がるが、副作用が問題となる。漢方薬を併用すると、グルココルチコイド依存性の喘息患者でグルココルチコイドの減量あるいは離脱が可能であることが示唆されている。このような背景から、我々は、奏効確実で副作用の少ない新しい治療法の開発を目的として、漢方薬およびその成分のステロイド様抗炎症作用を病態モデル動物を用いて評価するとともに、転写調節作用をグルココルチコイド感受性のプロモーター遺伝子を導入した細胞を用いて分子薬理的に調べた^{1,11-16)}。

1) 病態モデル動物における作用

LPS及びIL-4により気道炎症モデルマウスを作製し、それら病態モデルの粘液細胞過形成に対するグリチルリチンの作用及びそのメカニズムについて検討した。LPSを気道内へ投与したマウスでは、投与直後から一過性の好中球性気道炎症が惹起され、その後粘液産生細胞数が徐々に増加し、7日後に最大値を示した。

又、IL-4を気管内へ投与したマウスでは好酸球性の炎症は誘導されなかったものの、投与後1日目に粘液産生細胞が過形成された。

これら病態の特徴から、それぞれのモデルを急性気道炎症様及びアレルギー性気道疾患様の病態モデルと見なし、以降これら2つの病態モデルマウスに対するグリチルリチンの作用について調べた。グリチルリチンは、LPSによって惹起された粘液産生細胞の過形成を、その用量依存的に抑制した。又、デキサメサゾンもグリチルリチンと同程度に粘液産生細胞の過形成を抑制したが、去痰薬S-カルボキシメチルシステインは抑制しなかった。更にグリチルリチン及びデキサメサゾンは、LPS惹起モデルに於ける一過性の好中球性気道炎症を顕著に抑制した。一方グリチルリチンは、IL-4によって惹起された粘液産生細胞の過形成を顕著に抑制した。又デキサメサゾン及びS-カルボキシメチルシステインも粘液産生細胞の過形成を著明に抑制したが、その作用はグリチルリチンよりも弱かった。これらからグリチルリチンは、既存の呼吸器疾患治療薬と同等、若しくはそれ以上に急性気道炎症及びアレルギー性気道疾患に於ける顕著に亢進した粘液産生を抑制することが分かった。又、グリチルリチンが気道内への炎症性細胞の浸潤を抑制するとともに気道上皮細胞に対して直接作用することにより粘液産生細胞の過形成を抑制することが示唆された¹⁶⁾。

2) ステロイド様転写調節作用

グルココルチコイド感受性MMTVプロモーターを含むルシフェラーゼレポータープラスミドをA549ヒト肺腺癌細胞にトランスフェクトした。この系においてデキサメタゾンは明らかにプロモーター転写を活性化した。その効果はグルココルチコイド受容体のアンタゴニストRU486の同時添加により完全に阻害された。この系において柴朴湯および麦門冬湯単独では転写を活性化しなかったが、デキサメタゾンを合せて処理することにより、転写活性はデキサメタゾン単独よりも有意に強くなった。同様な転写活性の増強が、柴朴湯と麦門冬湯に共通の構成生薬である甘草とその主成分であるグリチルリチンにみられた。これらの知見から麦門冬湯はグルココルチコイド依存性プロモーターの活性化によっ

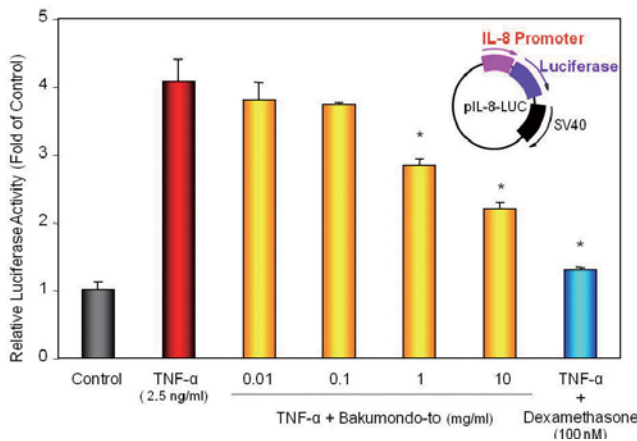


図3 A549細胞においてTNF- α で誘発したIL-8プロモーターの活性化に対する麦門冬湯の作用

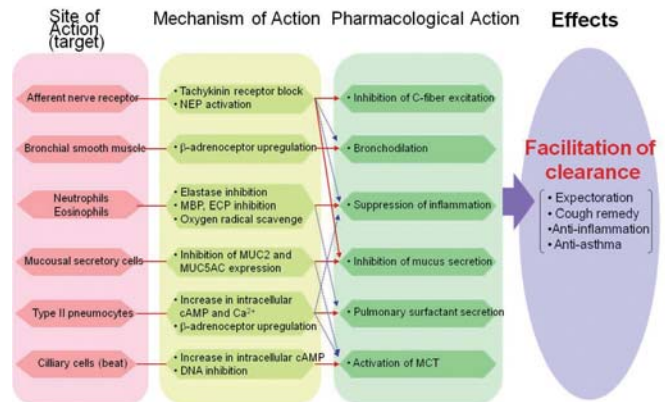


図4 気道炎症の多彩な病態に対する麦門冬湯の作用特性とその機序

てグルココルチコイドの効果を増強しており、またグリチルリチンの効果もグルココルチコイド依存性プロモーターの活性化によるものと推定される¹¹⁻¹⁶⁾。グリチルリチンはグルココルチコイドの不活化酵素であるタイプII 11 β -ヒドロキシステロイドデヒドロゲナーゼ (11 β -HSD₂) を阻害することが報告されている。11 β -HSD₂はグルココルチコイドをNAD依存的に不活性な11-ケト体に変換する。我々の検討の結果でも、グリチルリチンによる11- β HSD阻害作用が重要であることが確認された。11 β -HSD₂は肺の気管、気管支、肺胞の上皮細胞のみに発現している。この局所的発現は他のグルココルチコイド感受性細胞に影響せず上皮細胞のみに作用することを示唆している。さらにこれらの結果と相関して、グリチルリチンはデキサメサゾンによる粘液産生細胞 (NCI-H292cell) の粘液遺伝子MUC₂およびMUC_{5AC}のmRNAの抑制を著明に充進し、グリチルリチンによるグルココルチコイド依存性転写調節作用の充進が内因性の遺伝子でも生じることが分かった。

グルココルチコイドは、グルココルチコイド応答エレメント (GRE) との結合を介した直接の転写促進作用と、NF- κ BやAP-1などの炎症を惹起する転写因子の作用を核内で抑制する転写抑制作用を有している。そこで、麦門冬湯はグルココルチコイドと類似した転写調節作用機序をもつのではないかと考え、種々の検討を行った。

まず、NF- κ B依存的なIL-8プロモーター遺伝子をA549肺上皮細胞に導入し、TNF- α によるIL-8プロモーターの活性化に及ぼす影響を調べると、デキサメサゾンは活性化を抑制したが、麦門冬湯も用量依存的にIL-8プロモーターの活性化を抑制することが認められた(図3)。前述したように、麦門冬湯は単独ではGREモチーフを有するMMTVプロモーターのA549細胞における転写活性を促進しないが、デキサメサゾンに添加すると、デキサメサゾン単独のほぼ2倍の転写活性を示す。

これらの成績を総合すると、麦門冬湯はグルココルチコイドの転写促進作用を増強するとともに、直接的な転写抑制作用を示すという特性を有すると考えられる¹⁷⁾。

同様の特性は麦門冬湯の構成生薬である甘草の主成分グリチルリチンにも認められる。グリチルリチンは単独では転写促進作用を示さないが、デキサメサゾンの転写促進作用を用量依存的に増強することや、TNF- α で惹起したIL-8プロモーターの活性化を用

量依存的に抑制する転写抑制作用を示すことが確認されており、麦門冬湯の作用の一部がグリチルリチンによる可能性が示唆される。そこで、IL-8プロモーターの活性化抑制がNF- κ Bの抑制によるのかどうかを明らかにするために、NF- κ Bコンセンサスのモチーフのみを有するプロモーターの活性化に及ぼす影響を調べると、グリチルリチンはデキサメサゾンと同じように抑制することが認められた。Real time PCR法での検討では、グリチルリチンはTNF- α で惹起したIL-8 mRNAの発現をデキサメサゾンと同様に抑制することも確認された¹⁷⁾。

5. おわりに

我々は基礎薬理学の立場から、気道炎症の多彩な病態に対する漢方薬の医療学的利用価値について調べてきた。即ち、多分子機能制御物質としての機能をもつものと考え、その多様な作用と主要活性成分、作用機序を系統的・解析的に追及した。その結果、治療効果に共通する作用としてグルココルチコイド様の抗炎症・抗アレルギー作用、免疫調節作用、分泌調節作用、代謝調節作用などが関与しており、その基盤となるものは、シグナルトランスダクションにおけるクロストーク、及び、遺伝子の転写調節を介する細胞機能修復・活性化であることを明らかにした。我々が得た成績を纏めたものを図4に示す。これらの成績は、多彩な病態をもつ炎症性気道疾患の治療には、マイルドステロイド様の複合的な作用をもつ多成分型の漢方薬が、単一成分型の西洋薬より明らかに優れていることを示している。

漢方薬とその薬効を担う主成分の作用部位すなわち受容体を分子レベルで解明し、同定した受容体の分布や下流シグナルをもとに未病を特徴付けるための新規バイオマーカーを開発することはこれからの課題であろう。グリチルリチンの受容体については、既に核内のオーファン受容体を示唆する成績も得ており、従来、創薬のターゲットとならなかった新規受容体が見出される可能性が高い。更に、「抵抗力の弱った」と表現される高齢者の感染防御に関する未病では、病原微生物に対する易感染性が問題となる。我々は、基礎研究の中で見出した自然免疫系の調節因子MUC₁および抗MUC₁抗体が易感染の原因に関与していると推定している¹⁸⁻²⁰⁾。即ち、MUC₁/抗MUC₁抗体による自然免疫制御機構の破綻が、易感染や癌の増殖を生じる原因となっている可能性が高い。今後、特に抗MUC₁抗体の役割の詳細を解明し易感

染に関する新規未病マーカーの一つとして確立できれば、「未病」治療に関する科学基盤の構築に寄与するものと考えている。

[参考文献]

- 1) T. Miyata, Pharmacological basis of traditional medicines and health supplements as curatives, *J. Pharmacol. Sci.*, **2007**, *103*, 127-131.
- 2) J. Fuchikami, K. Takahama, H. Kai, T. Miyata, Comparative study of the antitussive activity of Mai-Meu-Dong-Tang and codeine in normal and bronchitic guinea-pigs, *Life Sci. Adv.*, **1990**, *9*, 37-43.
- 3) K. Takahama, I. Wakuda, H. Fukushima, Y. Isohama, H. Kai, T. Miyata, Differential effect of codeine on cough caused by mechanical stimulation of two different sites in the airway of guinea-pigs, *Eur. J. Pharmacol.*, **1997**, *329*, 93-97.
- 4) K. Takahama, J. Fuchikami, Y. Isoham, H. Kai, T. Miyata, Inhalation of phosphoramidon, a neutral endopeptidase inhibitor, induces coughs in awake guinea-pigs, *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.*, **1996**, *330*, 241-250.
- 5) K. Takahama, T. Araki, J. Fuchikami, Y. Kohjimoto, T. Miyata, Studies on the magnitude and the mechanism of cough potentiation by ACE inhibitors in guinea pigs. Involvement of bradykinin in potentiation, *J. Pharm. Pharmacol.*, **1996**, *48*, 1027-1033.
- 6) T. Miyata, Pharmacological characteristics of traditional medicine as curative 'Polypharmacy', *J. Trad. Med.*, **2004**, *21*, 155-165.
- 7) H. Kai, K. Yoshitake, A. Hisatsune, T. Kido, Y. Isohama, K. Takahama, et al., Dexamethasone suppresses the mucus production and MUC-2 and MUC-5 gene expression by NCI-H292 cells, *Am. J. Physiol.*, **1996**, *271*, L484-L488.
- 8) T. Miyata, Y. Isohama, K. Takahama, H. Kai, Current opinion of muco-active drug research: strategies and problems, *Eur. Respir. J.*, **1998**, *11*, 480-491.
- 9) S. Tai, H. Kai, Y. Isohama, H. Moriuchi, N. Hagino, T. Miyata, The effect of Maimendongtang on airway clearance and secretion, *Phytother. Res.*, **1999**, *13*, 124-127.
- 10) T. Miyata, Y. Isohama, S. Tai, H. Kai, K. Takahama, Pathopharmacological evaluation of Bakumondo-to (Maimengdongtang) as a curative for chronic inflammatory airway diseases. In: H. Watanabe, T. Shibuya, editors. *Pharmacological research on traditional herbal medicine*, Amsterdam: Harwood Academic Publishers, **1999**, 121-147.
- 11) H. Kai, Y. Isohama, K. Takaki, Y. Oda, K. Murahara, K. Takahama, et al., Both b1- and b2-adrenoceptors are involved in mediating phosphatidylcholine secretion in rat type II pneumocyte cultures, *Eur. J. Pharmacol.*, **1992**, *212*, 101-103.
- 12) Y. Isohama, T. Matsuo, H. Kai, K. Takahama, T. Miyata, Changes in b₁- and b₂-adrenoceptor mRNA levels in alveolar type II cells during cultivation, *Biochem. Mol. Biol. Int.*, **1995**, *36*, 561-568.
- 13) Y. Isohama, K. Kurita, H. Kai, K. Takahama, T. Miyata, Bakumondo-to (Mai-Men-Dong-Tang) increases b1-adrenergic receptor mRNA expression in rat alveolar type II cells, *J. Trad. Med.*, **2001**, *18*, 8-14.
- 14) Y. Isohama, K. Kurita, H. Kai, K. Takahama, T. Miyata, Bakumondo-to (Mai-Men-Dong-Tang) increases intracellular cAMP in alveolar type II cells: Bakumondo-to stimulated production and inhibits degradation of cAMP, *J. Trad. Med.*, **2001**, *18*, 15-19.
- 15) Y. Isohama, H. Moriuchi, H. Kai, T. Miyata, Glucocorticoid-like and glucocorticoid-unlike regulation of gene expression by Bakumondo-to (Mai-Men-Dong-Tang) in airway epithelial cells, *Jpn. J. Orient. Med.*, **2002**, *53*, 1-9.
- 16) Y. Isohama, Y. Kumanda, K. Tanaka, K. Kai, K. Takahama, T. Miyata, Dexamethasone increases b2-adrenoceptor-regulated phosphatidylcholine secretion in rat alveolar type II cells., *Jpn. J. Pharmacol.*, **1997**, *73*, 163-169.
- 17) H. Takei, Y. Baba, T. Hisatsune, H. Katsuki, T. Miyata, K. Yokomizo and Y. Isohama, Glycyrrhizin inhibits IL-8 production and NF-kB activity in lung epithelial cells, but not through glucocorticoid receptors, *J. Pharmacol. Sci.*, **2008**, *106*, 460-468.
- 18) I. Kuwahara, E.P. Lillehoj, W. Lu, I.S. Singh, Y. Isohama, T. Miyata, and K.C. Kim, Neutrophil elastase induces IL-8 gene transcription and protein release through p38/NF-κB activation

via EGFR transactivation in a lung epithelial cell line, *Am. J. Physiol. Lung. Cell. Mol. Physiol.*, **2006**, *291*, 407-416.

- 19) I. Kuwahara, E.P. Lillehoj, T. Koga, Y. Isohama, T. Miyata, and K.C. Kim, The Signaling Pathway Involved in Neutrophil Elastase-Stimulated MUC1 Transcription, *Am. J. Physiol. Lung. Cell. Mol. Physiol.*, **2005**, *289*, 355-362.
- 20) T. Koga, I. Kuwahara, E.P. Lillehoj, W. Lu, T. Miyata, Y. Isohama and K.C. Kim, TNF-α induces MUC1 gene transcription in lung epithelial cells: its signaling pathway and biological implication, *Am. J. Resp. Cell. Mol. Biol.*, **2007**, *37*, 691-698.



宮田 健

崇城大学薬学部未病薬学研究室

1964年 熊本大学薬学部卒

1974年 薬学博士(東京大学)

1975年 文部省在外研究員(スウェーデン・カロリンスカ研究所)

1981年 米国メリーランド大学客員教授

1982年 熊本大学薬学部教授

1997年 米国テキサス大学教授 (兼任)

1997年 中国南京中医薬大学名誉教授

1997年 中国哈爾濱医科大学名誉教授

1998年 エジプトカイロ大学大学院客員教授

2006年 熊本大学名誉教授, 崇城大学薬学部教授

所属学会 日本薬理学会(名誉会員)、和漢医薬学会(理事)

未病システム学会(評議員)

日本東洋医学会、日本薬学会

米国胸部疾患学会、ヨーロッパ呼吸器学会

受賞

日本東洋医学会学術賞

日本薬学会学術貢献賞

和漢医薬学会賞

中西結合医学会栄誉賞

Topics on Chemistry

光線力学的治療への応用を目指した新規光感受性物質の開発

株式会社 同仁化学研究所 平島 義紀

1. はじめに

日本における悪性腫瘍（癌）の死亡率・罹患率は増加の一途をたどり、2006年に癌で死亡した人は329,314例、2002年に新たに診断された癌（罹患全国推計値）は589,293例にのぼっている（国立がんセンター がん対策情報センター調べ）。これまでの癌の治療法は、外科手術による切除が約7割を占め、それには痛みが伴い、臓器の温存ができない。また、抗癌剤治療や放射線治療は副作用を起こすという欠点があり、患者は大きな負担を余儀なくされてきた。そこで、患者の負担を軽減する新しい治療法として注目されているのが光診断・治療である。

本稿では、光化学反応を利用して癌細胞を消滅させる治療法のひとつである、光線力学的治療（Photodynamic therapy: PDT）に焦点を当て、PDTの概略、ならびに問題点を述べるとともに、PDTにおける癌治療の向上を目指した新しい試みについて紹介する。

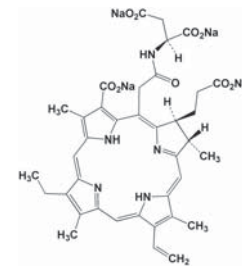


Fig.1 Laserphyrin®

2. 光線力学的治療

PDTは、腫瘍親和性光感受性物質が有する腫瘍組織、新生血管への特異的な集積性と光の励起によって発生する一重項酸素（活性酸素の一種）の強い細胞破壊効果を利用した治療法である。本法は、1979年にDoughertyらが、乳癌の皮膚転移に対して、ヘマトポルフィリン誘導体（Hematoporphyrin derivatives）を用いてPDTを初めて以来、数多くの研究がなされている^{1,2)}。

PDTは、正常組織に大きな障害を与えることがなく、低エネルギーで病変部を治療することができ、レーザー光照射によって様々な病変に対して治療可能である。そのため、近年、妊孕（にんよう）性の温存療法（治療後も子供を産める）を希望する若年患者の増加傾向がある中、そうしたニーズに答える治療法として、その有用性が注目されている。PDTは従来の方と異なり、子宮頸部をほぼ原形のまま残し、治癒率も高く、術後の妊娠分娩に支障がない。

腫瘍親和性光感受性物質が光線に暴露されると、光エネルギーを吸収して励起状態（一重項状態）に遷移する。これが基底状態に戻る際のエネルギー転換により生じる活性酸素が細胞を変性、壊死に陥らせると考えられている（実際には、腫瘍親和性光感受性物質は静脈投与後、腫瘍組織に集積し、赤色光線によって励起される）。

このように、光感受性物質はPDTで代表されるように、活性酸素種による酸化ストレスを負うことで、腫瘍細胞等の特定の細胞を殺傷する目的で用いられる。しかし現在、臨床で使用される薬剤には光線過敏症（投与した薬剤が太陽光のエネルギーを吸収して光増感反応を起し、発生した活性酸素種により紅斑、水疱、色素沈着等皮膚の異常反応を引き起こす）という合併症を生じるケースがある。

最近では、第2世代光感受性物質として、レザフィリン（Laserphyrin®, 明治製薬）（Fig. 1）が早期肺癌に対して、ビスダイン（Visudyne®, NOVARTIS）（Fig. 2）が加齢性黄斑変性症による脈絡膜新生血管に対して、新たに厚生労働省より認可を受け、急速に普及し、光感受性物質の副作用として問題だった光線過敏症は、軽度で済むようになってきている。

これらは、第1世代光感受性物質であるフォトフリン（Porfimer sodium, Photofrin®, 日本ワイスレダリー）（Fig. 3）よりも吸収帯

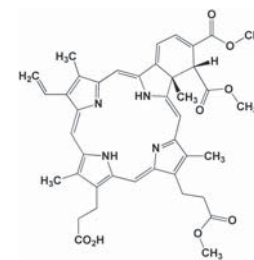


Fig. 2 Visudyne®

の波長が長波長側に存在し、励起効率が高く、また正常組織から早く排泄される特性をもつため、光線過敏症等の副作用が少ないとされる。フォトフリンは組織透過性の比較的高い630 nmの赤色光線で励起され光線力学反応が発生するが、ここで問題になるのは光感受性物質の吸収効率である。最も生体由来組織の影響が少ない励起波長は650 ~ 700 nm近辺とされており、より深部病巣の治療を目指す場合、長波長領域での吸収帯を有するレザフィリン（波長:664 nm）やビスダイン（波長:689 nm）が有力となってくる。

しかしながら、腫瘍への選択性が不十分である等の問題は未解決であり、脈絡膜新生血管は網膜にも存在することが示されているため、光活性化後に網膜色素上皮や網膜外顆粒層を含む網膜構造にも付带的に損傷が起こる可能性がある³⁾。

そこで、光感受性物質に“スイッチ”を持たせ、腫瘍が存在する部位でのみ光増感機能を発揮することが可能になれば腫瘍以外の損傷が防止できると考えられる。また、薬剤投与後の直射日光を避ける必要が解消され、合併症として懸念される光線過敏症を回避することができ、PDTにおける癌治療の向上が期待される。

3. Thiazole orangeの特性を利用した新規光感受性物質の開発

3-1. Thiazole orange (TO) の有用性

Thiazole orange (TO) (Fig. 4) は2種類の芳香環が結合して共役系を構成する非対称のシアニンである。この色素の水溶液中での蛍光強度は無視できる程度であるが、核酸と結合した時には極

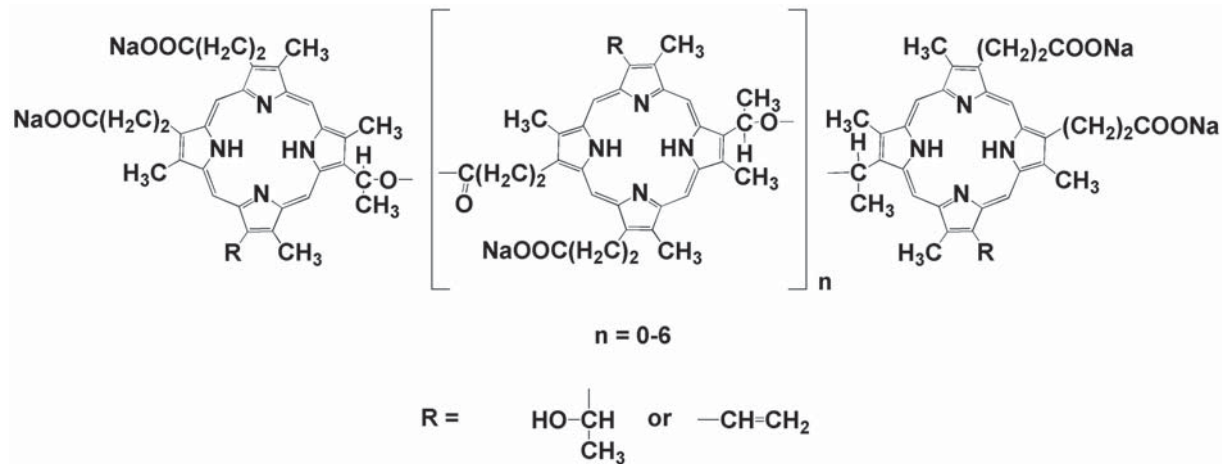


Fig. 3 Photofrin®

めて強い蛍光を出す。芳香環間の化学結合周りの回転が停止しての基底状態への無輻射遷移が排除されるため、蛍光強度の増加が起これと考えられている。その結果、TOの核酸へのインターカレーションが起これると量子収率が増大し、DNAやRNAを高感度に検出することが可能となる。このTOの特性を用いて、血液中の網状赤血球測定を行ない、赤血球内変形体を検出するなど、多くのアプリケーションがある。

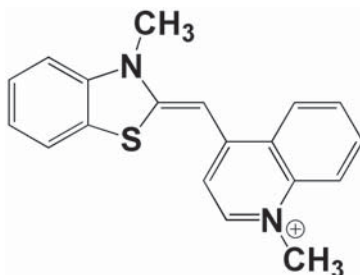


Fig.4 Thiazole orange

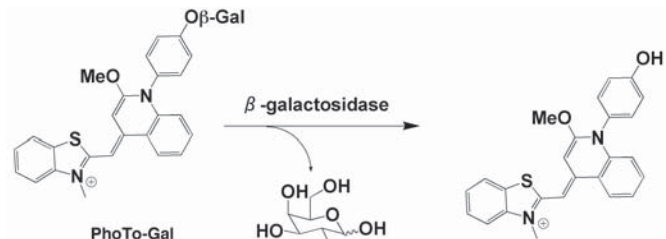
3-2. 新規光感受性物質 “PhoTO-Gal” の開発

そこで、小出らはTOに高水溶性のかさ高い構造を付加させることで、細胞中における生体分子への結合性を下げ、この構造が生体内の反応により切り出されると、その結合性が回復し、光増感能が増大するという手法を考え、光感受性機能の“オン”と“オフ”を制御できる光感受性物質の開発を試みた⁴⁾。

まず、TO誘導体に代表的なレポーター酵素であるβ-galactosidaseによって切り出されるβ-galactosyl基を付加させた化合物“PhoTO-Gal”を合成した。

そして、生細胞中での機能を評価するため、lacZ遺伝子が導入されたHEK293 lacZ (+)細胞と導入されていないHEK293 lacZ (-)細胞を用いて、1 μml/lのPhoTO-Galを添加した細胞における照射時の細胞殺傷能の検討を行なった。その結果、β-galactosidaseを発現するHEK293 lacZ (+)細胞において光を照射した部位での細胞死が確認された。このことより、“PhoTO-Gal”は、光感受性機能の“オン”と“オフ”をβ-galactosidase

によって制御した光増感剤であることが確認され、光増感剤の新たな有効性が示された (Scheme 1)。



Schemel. Design of PhoTO-Gal

今後、本手法はプロドラッグとして、癌細胞で還元酵素を産生するようにデザインされた遺伝子と共に、薬剤を投与する治療法 (gene-directed enzyme prodrug therapy) もしくは、癌細胞と特異的に結合する抗体に還元酵素を結合させた複合体と共に薬剤を投与する治療法 (antibody-directed enzyme prodrug therapy) にも適用可能であると考えられる。また、標的部位の細胞におけるpH変化や他の酵素反応等を更に識別することで、特定条件下にある細胞種のみをより高い選択性で殺傷することができる系の確立も望まれる。

[参考文献]

- 1) T. J. Dougherty, G. Lawrence, J. H. Kaufman, D. Boyle, K. R. Weishaupt, A. Goldfarb, *J. Natl. Cancer Inst.*, **1979**, 62(2), 231-237.
- 2) 加藤治文 監修, (2002) PDTハンドブック-光線力学的治療のアドバンステクニック-, 医学書院.
- 3) U. Schmid-Erfurth, T. Hasan, K. Schomacker, T. Flotte, R. Birngruber, *Lasers Surg. Med.*, **1995**, 17(2), 178-188.
- 4) Y. Koide, Y. Urano, A. Yatsushige, K. Hanaoka, T. Terai, T. Nagano, *J. Am. Chem. Soc.*, **2009**, 131(17), 6058-6059.

Topics on Chemistry

グリセリンからグリコールへの選択的転換

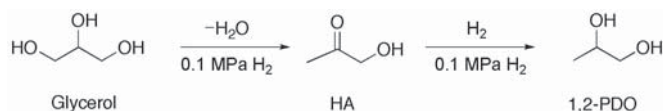
株式会社 同仁化学研究所 村井 雅樹

近年、地球温暖化防止策として二酸化炭素排出を抑える運動が盛んに行われている。現代人には必須の道具である自動車が出す二酸化炭素排出問題においても常に研究が行われ、燃料電池自動車や水素自動車の開発が進められている。また、化学産業においても、バイオエタノールやバイオディーゼル燃料（BDF）がカーボンニュートラルバイオマスとして期待されている¹⁾。「何かを生産したり、一連の人為的活動を行った際に排出される二酸化炭素と吸収される二酸化炭素が同じ量である。」という概念をカーボンニュートラルといい、地球規模での炭素の増大はないため、二酸化炭素の排出を抑えることができると考えられる。そのため、地球環境にやさしい燃料として今後も生物由来油から作られるBDFの使用増加が予想される。

一方、グリーンケミストリープログラムが、新しい時代の化学として、日米欧こぞって行動計画の一つに取り上げられている。グリーンケミストリーとは、「有害物を使わない、出さない」という観点から「環境にやさしい化学合成」「地球環境汚染防止に繋がる新しい合成法」と解釈することができる。グリーンケミストリーの方向性である12ヶ条からすれば、上述したBDFの増大という点においては、バイオマス（再生可能な生物由来資源）の利用が望ましい¹⁾。BDFとは植物油や動物油脂などの再生可能な資源からつくられる軽油代替燃料であり、現在は脂肪酸メチルエステルのみが規格化されている。原料となる油脂のエステル交換を行い、グリセリンを取り除き粘度を下げることでディーゼルエンジンに使用できるようにしている。メチルエステル化によって原料油脂から副産物であるグリセリンが生成されるため、BDFの増大に伴って余剰のグリセリンが増大される。グリーンケミストリーの観点からもこの余剰なグリセリンをどうやって化学工業原料へと変換するかの研究がなされている。また、グリセリンをジオール類やジヒドロキシアセトン、グリセロリン酸へと変換した原料は医薬品や化粧品等の原料として使用することも可能であるため、効率的なグリセリンの変換に関する多くの研究が報告されている。

今回、触媒を用いた水素化分解によってグリセリンを1,2-プロパンジオールに変換する方法として、水素化反応条件によって反応を効率化した報告と、触媒担体としてカーボンナノチューブを利用した報告の2つを紹介する。

Satoらは、グリセリンがアルミナに担持された銅触媒上では常圧の水素圧でヒドロキシアセトン（HA）の脱水反応を経て1,2-プロパンジオール（1,2-PDO）へと変換される（Scheme1）ことを示した²⁾。



HAはグリセリンから1,2-PDOへの変換反応の中間体であり、グリセリンのHAと1,2-PDOへの選択性は反応温度に依存する。HAと1,2-PDOへの変換率は190℃以上の温度で100%に達し、1,2-PDOへの選択性は190℃で最大に達し、収率は最大値を示す。一方、HAへの選択性は190℃で最低に達する。つまり、HAの1,2-PDOへの水素化は190℃前後の温度が望ましいことを示す（Fig.1）。

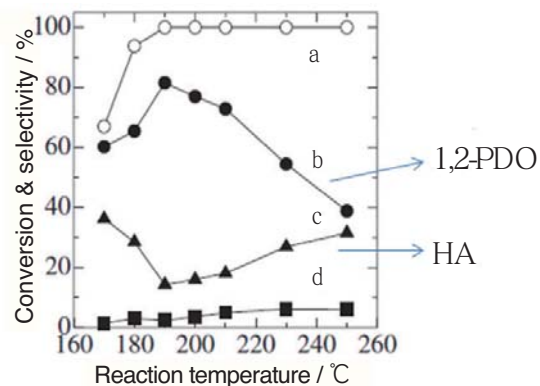


Fig. 1 Changes in catalytic activity of Cu/Al₂O₃ with reaction temperature for the reaction of glycerol. (a)Conversion of glycerol, (b)selectivity to 1,2-PDO, (c)selectivity to HA, (d) selectivity to EG. Reaction conditions: catalyst weight, 2.9 g (2.4 cm³); feed rate of 30 wt% glycerol solution, 1.8 cm³h⁻¹; H₂ flow rate, 360 cm³ min⁻¹. (S. Sato et al., Chem. Lett., 2009, 28(6);Ref.No. CY-RT 09-073)

次に、210℃、常圧条件での水素流速の変化に伴うグリセリンの転換率をFig.2に示す。その結果、1,2-PDOへの転換率は水素流速が360 cm³/minで一定となり、速いほうが高いことを示す。

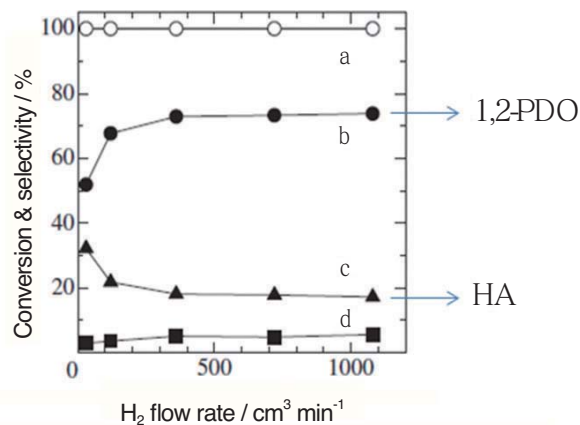


Fig. 2 Changes in catalytic activity of Cu/Al₂O₃ with H₂ flow rate at 210°C. Symbols and reaction conditions are the same as those in Fig.1. (S. Sato et al., Chem. Lett., 2009, 28(6);Ref.No. CY-RT 09-073)

カルボニル化合物の水素化反応は発熱反応であるため、グリセリンの水素化反応において、1,2-PDOへの水素化は熱力学的に低温が望ましい。温度勾配による選択率の結果をTable1に示す。180-145℃においては93 mol%以上の1,2-PDOの選択性が確認され、最高収率を得ることができる。170-135℃においては未反応のグリセリンが多く残っていたことからHAへの選択性を示すには温度が低いことが重要であることが示唆された。そのため、HAの1,2-PDOへの水素化反応は平衡を右にシフトさせるために190℃以下で行うべきである。

Table 1 Catalytic conversion of glycerol at gradient temperature^a

Top temp /°C	Reactio temp /°C	Selectivity/mol%		
		1,2-POD	HA	EG
210	170	81.9	5.9	3.8
200	160	91.7	2.7	3.0
180	145	93.7	2.6	2.4
170	135	92.3	5.7	0

^aCatalyst, Cu/Al₂O₃(N242)8.7g(7.2cm³);H₂,360cm³min⁻¹.

Conversion of glycerol, 100%.Other by products are methanol and 1-proanol.
(S. Sato *et al.*, *Chem. Lett.*, **2009**, 28(6) ;Ref.No. CY-RT 09-073)

Satoらの以前の研究でアルミナ担持銅触媒は250°CでHAへの選択性が90 mol%以上に達したことから、グリセリンのHAへの脱水反応は250°Cの高温が望ましいが、250°Cでは炭素間結合の開裂が起るため、水素気流下での1,2-PDOの選択的生成には190°Cの低温が望ましい。つまり、グリセリンのHAへの脱水とその後の1,2-PDOへの水素化は180-145°Cの間の温度勾配で効率的に進行する。グリセリンのHAへの脱水反応を高温で行い、その後の1,2-PDOへの水素化反応を低温で行う、という2段階操作が1,2-PDOへの高い選択性を可能とした。

一方、Wangらは、カーボンナノチューブ担持のRuナノ粒子がグリセリン水溶液のグリコール類(1,2-PODとエチレングリコール)の水素化分解において効果的な反応性を示すことを示した³⁾。

Ru触媒の担体として、カーボンナノチューブの他、活性炭、酸化チタン、グラファイト、アルミナを用いて比較したところカーボンナノチューブを用いたものがグリセリン変換率、1,2-PDO選択性で他の担体より良い結果を示した。さらに、1時間当たりのRu種1mol当たりの生成物mol数(TOF; Turnover Frequency)と選択性、グリコールの収率はRu粒子の平均径に依存し、TOFは連続的に衰退する。一方で1,2-PDOの選択性はRu粒子の平均径の増大に伴って増大する(Fig.3)。つまり、触媒性能においては、Ru粒子径が選択性に大きな影響をもたらす。

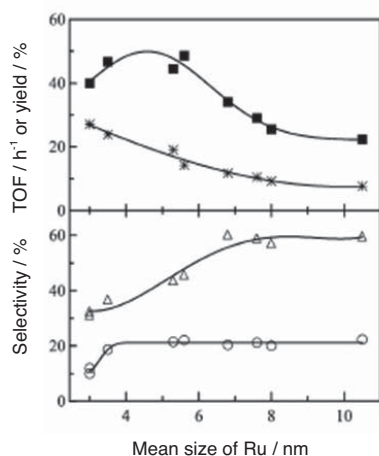


Fig. 3 Dependence of glycerol conversion, selectivity, and yield of glycols on the mean size of Ru particles. (■) yield of glycols (1,2-POD and EG), (*) TOF, (△) 1,2-POD selectivity, (○) EG selectivity.
(S. Sato *et al.*, *Chem. Lett.*, **2009**, 28(6) ;Ref.No. CY-RT 09-073)

粒子径5 nmのRu粒子がグリコールを生成するグリセリンの水素化分解においては最適であり、粒子径がこれ以上でも以下でもグリコールの収率は低くなる。つまり、グリコールの変換は本質的にRuナノ粒子の平均径に依存し、平均径5 nmのRuがグリコールの高収率を示す。

カーボンナノチューブ担持のRu触媒は活性炭やアルミナなど他の担体に比べて異なる構造を有しており、Ruナノ粒子の構造がグリセリンの1,2-PDOへの水素化には重要であることを示した。

グリーンケミストリーの観点からもグリセリンは動植物油脂あるいは簡単な工程によって糖からも得られる再生可能な資源及び食糧として重要である。近年、グリセリンを価値ある有益な化学物質へと変換しようとする試みが多くなされており、まだ発展途上の段階である。この研究に関するさらなる発展に期待したい。

〔参考文献〕

- 1) P.T. Anastas and, J.C. Warner, *Green Chemistry: Theory and Practice* **1998**.
- 2) S.Sato, M.Akiyama, K.Inui, and M.Yokota, *Chem. Lett.*, **2009**, 560.
- 3) J.Wang, S.Shen, B.Li, H.Lin, and Y.Yuan, *Chem. Lett.*, **2009**, 572.

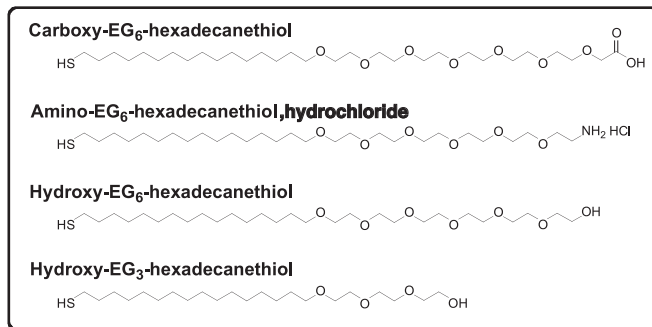
開発中

自己組織化単分子膜作製試薬

アルカンチオールやジスルフィド類が金属基板上で形成する自己組織化単分子膜 (Self-Assembled Monolayers : SAMs) は光スッチング・光電池などの薄膜光学材料、超微細フォトリソ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、マイクロアレイ、化学修飾電極、QCMやSPR等を用いたバイオセンサーなどの分野で広く応用されています。

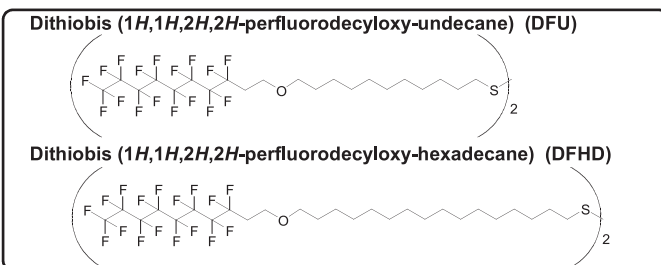
小社では様々な特性を有するアルカンチオールやジスルフィド類を販売しており、現在は下記のような新規化合物を開発中です。ご興味のある方は小社まで御問合せ下さい。

○オリゴエチレングリコール含有長鎖アルキルチオール類



オリゴエチレングリコールを有するSAMsは非特異吸着を抑えることができることから、SPRやQCM等のバイオセンサーで汎用されています。上記のオリゴエチレングリコール含有長鎖アルキルチオール類は既存のものよりも長いアルキル鎖 (C16) を有しており、より安定なSAMsが作成されると期待されます。

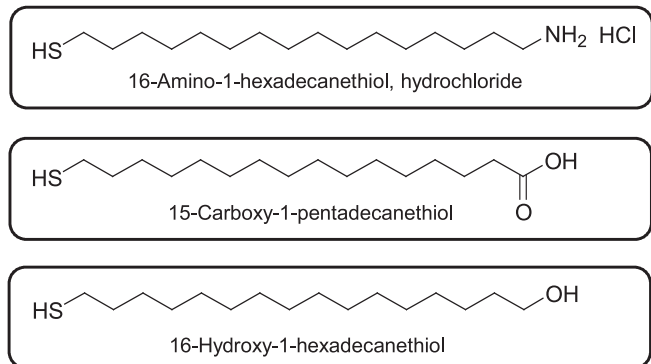
○フッ化炭素鎖末端アルキルジスルフィド類



フッ化炭素鎖末端を有するSAMsは、高い撥水性を持ち、化学的に安定な表面を形成することが期待されます。フッ化炭素鎖自体はvan der Waals力が弱く、自己組織化能が低いと考えられることから、上記のフッ化炭素鎖末端アルキルジスルフィド類には安定なSAMsを形成するよう長鎖アルキル基 (C11, C16) を導入しています。また、チオール化合物は臭気が強く、液体~ワックス状で扱い難いことから、無臭の固体で取扱の容易なジスルフィド化合物としています。

関連商品

長鎖アルキルチオール類



金属基板修飾用のアルキルチオール類に、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追加致しました。アルキル鎖長はSAMsの特性に大きく影響を与える因子の1つで、アルキル鎖長が長いほど安定なSAMsが形成されることが知られています。

16-Amino-1-hexadecanethiol, hydrochlorideはこれまで市販されていなかったことから、論文報告は殆どありませんが、SAMs上へのDNAや抗原の固定化に有用であると期待されます。15-Carboxy-1-pentadecanethiolは古くからタンパク質の固定化などに利用されていますが、小社の長鎖アルキルチオール類は他社品に比べ高純度であることから、より欠陥の少ないSAMsの作製に適していると期待されます。16-Hydroxy-1-hexadecanethiolはアミンやカルボン酸末端の長鎖アルカンチオールと共に用いることで、非特異吸着の少ないSAMsの作製に有用です。

品名	容量	価格 (¥)	コード
16-Amino-1-hexadecanethiol, hydrochloride	10 mg	16,000	A458
	100 mg	48,000	A458
15-Carboxy-1-pentadecanethiol	10 mg	13,000	C429
	100 mg	39,000	C429
16-Hydroxy-1-hexadecanethiol	10 mg	13,000	H394
	100 mg	39,000	H394

その他のSAMs 試薬

- ・ Amino type(11-,8-,6-Amino thiol)
- ・ Carboxy type(10-,7-,5-Carboxy thiol)
- ・ Carboxy disulfide(10-,7-,5-,3-Carboxy disulfide)
- ・ NHS ester type(Dithiobis(succinimidyl-undeca-,octa-,hexa)
- ・ Ferrocenyl type(11-,8-,6-Ferrocenyl thiol)
- ・ *N*-Fmoc Amino type(11-,8-,6-Fmoc amino thiol)
- ・ Hydroxyl type(11-,8-,6-Hydroxy thiol)
- ・ Ethylene Glycol導入type(Amino,Carboxy,Hydroxy)

※詳細は、小社マーケティング部までお問い合わせください。

新製品

細菌蛍光染色試薬

-Bacstain- series

Ready-to-useな蛍光染色試薬、それが-Bacstain- シリーズです。

- Bacstain - CTC Rapid Staining Kit (for Flow cytometry, for Microscopy)

CTCは呼吸活性を指標とした蛍光染色試薬です。本キットに含まれるエンハンサーの効果により従来のCTC染色に比べ高いシグナルを得ることが出来ます。検出系（フローサイト、蛍光顕微鏡）によって最適なキットをお選びいただけます。

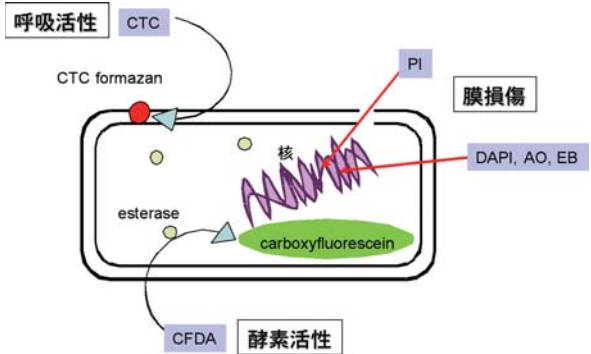
- Bacstain - CFDA solution

CFDA (Carboxyfluorescein diacetate) は細胞内エステラーゼ活性を求める色素として汎用されております。同製品はCFDAをDMSO溶液としており、試薬調製の操作なくご使用頂けます。

- Bacstain - DAPI solution, PI solution, AO solution, EB solution

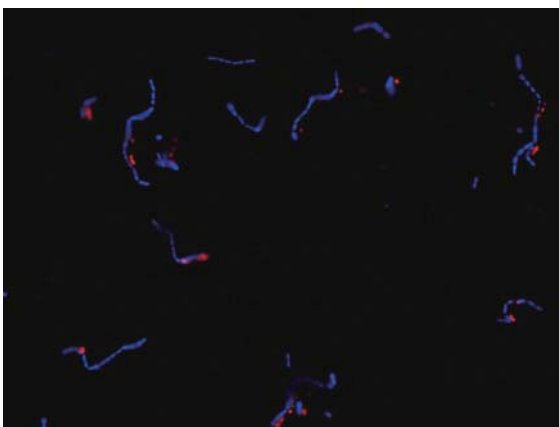
核酸染色剤として汎用される蛍光試薬類を溶液としておりますので試薬調製の手間がございません。また、少量ずつ小分けされておりますので必要量を使い切りサイズで使用できます。

品名	容量	希望納入価格(¥)	メーカーコード
-Bacstain- CTC Rapid Staining Kit (for Flow cytometry)	100 assays	20,000	BS01
-Bacstain- CTC Rapid Staining Kit (for Microscopy)	100 assays	20,000	BS02
-Bacstain- CFDA solution	100 assays	15,000	BS03
-Bacstain- DAPI solution	100 assays	7,800	BS04
-Bacstain- AO solution	100 assays	7,800	BS05
-Bacstain- EB solution	100 assays	7,800	BS06
-Bacstain- PI solution	100 assays	7,800	BS07

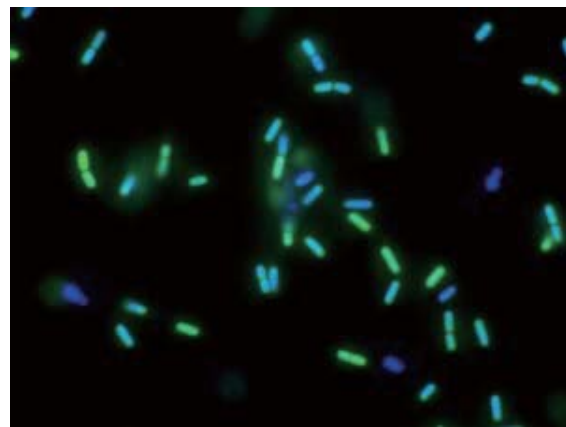


-Bacstain -による染色例

CTC/DAPI二重染色 (*L.casei* NBRC15883)



CFDA/DAPI二重染色 (*B.cereus* NBRC13494)



- 1) 前培養した*L.casei* を遠心分離後、PBS (-) に再懸濁する。
- 2) 細胞懸濁液1 ml (細胞密度 10^8 CFU/ml) に対しCTC溶液100 μ l及びenhancing reagent B 5 μ lを加え、37°Cで5分間インキュベート。
- 3) -Bacstain- DAPI solution 1 μ lを加え、室温で5分間インキュベート。
- 4) プレパラートを作成後、蛍光顕微鏡で観察。

- 1) 前培養した*B.cereus*を遠心分離後、PBS (-) に再懸濁する。
- 2) 細胞懸濁液1 ml (細胞密度 10^8 CFU/ml) に対しCFDA solution 15 μ l及び DAPI solution 1 μ l加え、室温で3分間インキュベート。
- 3) メンブラン濾過や遠心分離操作により余分な試薬を除去し、PBS (-) などに再懸濁する。
- 4) プレパラートを作成後、蛍光顕微鏡で観察。



'Forum in DOJIN 20th Anniversary International Symposium'

フォーラム・イン・ドージン 20周年記念国際シンポジウム

"Fluorescence Biology" – from molecules to systems –
「蛍光生物学」 – 分子からシステムへ –

場 所：鶴屋ホール（テトリア熊本 [鶴屋東館] 7F・熊本市手取本町 6 - 1）

定 員：300名

日 時：2009年11月27日（金）9:30～16:50（開場 9:00）

参加費：無 料

世話人：山本 哲郎（熊本大学大学院医学薬学研究部 分子病理学分野）

主 催：株式会社 同仁化学研究所

後 援：株式会社 ケミカル同仁

●講演プログラム

9:30-9:35 主催者挨拶／野田 栄二（株式会社 同仁化学研究所）

9:35-9:45 開会の挨拶／山本 哲郎

Session 1：<座長：片山 佳樹（九州大学大学院工学研究院応用化学部門）>

9:45-10:45 Alan S. Waggoner Department of Biological Sciences, Carnegie Mellon University

"New biosensors for study of pathway regulation in live cells"

「生きた細胞を用いたタンパク質機能研究のための新たなバイオセンサー」

10:45-11:30 浦野 泰照 東京大学大学院薬学系研究科 薬品代謝化学教室

"Precise design of small molecule-based fluorescence probes for elucidating biological events in living samples"

「生命現象解明に資する有機小分子蛍光プローブの精密設計」

11:30-12:15 尹 玉新 北京大学基礎医学院院長 病理学系

"PTEN is a new guardian of the genome"

「新たなゲノム守護神 PTEN」

12:15-13:25 <ランチブレイク> 展示（装置メーカー）

Session 2：<座長：西野 憲和（九州工業大学大学院生命体工学研究科生体機能専攻）>

13:25-14:10 方偉 岗 北京大学医学部副部長 病理学系

"Adenine nucleotides as a new invasion stimulator in tumor microenvironment"

「腫瘍微小環境における新たな浸潤促進因子としてのアデニンヌクレオチド」

14:10-14:55 朱 衛国 北京大学基礎医学院 生物化学・分子生物学系

"Applications of histone deacetylase inhibitors in cancer research"

「ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤の癌研究への応用」

14:55-15:10 <コーヒーブレイク>

Session 3：<座長：山本 哲郎（熊本大学大学院医学薬学研究部 分子病理学分野）>

15:10-15:55 韓 晶岩 北京大学基礎医学院 中西医结合学教室

"Dynamic visual observation on the microcirculation of organs"

「臓器微小循環の可視化研究」

15:55-16:40 宋 文杰 熊本大学大学院医学薬学研究部 知覚生理学分野

"Optical imaging of cortical activity *in vivo* using fluorescent voltage-sensitive dyes"

「電位感受性蛍光色素を用いた聴覚皮質神経活動の大規模計測」

16:40-16:50 閉会の挨拶／三浦 洵（同仁化学研究所）

17:00-19:00 ミキサー

【問い合わせ・参加申込先】

熊本県上益城郡益城町田原 2025-5（株）同仁化学研究所内

「フォーラム・イン・ドージン事務局」担当：蒲野（かばの）・尾方

Tel:0120-489548, Fax:0120-021557, E-mail:info@dojindo.co.jp

◆講演終了後、ミキサー（無料）を同会場にて予定いたしております（ミキサーは先着 120名）。

◆参加ご希望の方は、所属・氏名・連絡先（住所、TEL、FAX、E-mail）ミキサー参加有無をご記入の上、E-mail または FAX にてお申し込みください。

◆駐車場は有料となりますので（聴講による優待はございません）、できるだけ公共の交通機関をご利用ください。

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