

氏名	みやち かなこ 宮地 加奈子
学位の種類	博士(薬学)
学位記番号	論博第66号
学位授与の日付	平成25年7月16日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学位論文題目	機能性色素と金属イオンを用いる病態関連物質の分析法 の開発に関する研究
論文審査委員	(主査) 教授 三野 芳紀 (副査) 教授 土井 光暢 (副査) 教授 谷口 雅彦 (副査) 准教授 宇佐美 吉英

論文内容の要旨

21世紀は、安心・安全・健康の時代と言われているが、臨床現場においては、「健康・未病・病気」の概念が広く浸透しており、病態を早期の未病の段階で発見し、可能な限り、早期治療を行うことが現代医療には求められている。しかしながら、未病の段階においては、一般には自覚症状が少なく、放置され、病態の進展を伴う場合が多い。したがって、病態を未病の段階で把握するには、該当するバイオマーカーなどの病態関連物質の簡便、高感度測定法の開発が熱望される。当研究室では従来より、多くの生体・医薬品関連物質について、分析化学的視点から測定法の開発を探索しているが、錯生成反応が起こりやすい被分析物質においては、三元錯体、すなわち被分析物質、錯生成剤並びに金属イオン三者で生成する錯体を利用する方法、あるいは競合的錯生成反応を利用する分析法が有利であることを認めている。今回、本研究では、呈色反応及び蛍光反応両面からの追跡が可能な特性を有するキサンテン系、その類似体であるトリフェニルメタン系のような機能性に富む色素を選択し、呈色反応あるいは蛍光反応より、病態関連物質のスペルミン、医薬品、尿酸、タンパク質（ヒストン、アルブミン）の新規測定法を検討した。その結果を、(1)色素-金属錯体との三元錯体生成反応を利用する分析法、(2)色素-金属錯体との競合的生成反応を利用する分析法に分類し、以下に列挙する。

(1) 色素-金属錯体との三元錯体生成反応を利用する分析法

(1-1) スペルミン及び関連化合物の定量法の開発：キサントゲン系色素の *o*-ヒドロキシヒドロキノンフタレイン (OCPF) とマンガン(II) {Mn(II)} を用いることにより、測定波長 555 nm で 0.2~1.5 µg/ml 濃度範囲のスペルミン (Spm) を、定量感度 $\epsilon=1.4 \times 10^5 \text{ l mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ の高い感度で吸光光度定量することができた。本操作法における相対標準偏差 RSD は 0.50 % (n=10) であり、再現性にも優れていることを認めた。また、Spm と アセチルスペルミン (AcSpm) が共存する場合、前処理としてアルカリ加水分解することにより、Spm と AcSpm の総含量とそれぞれの個々の含量を算出することが可能であることが示唆された。更に、本呈色反応の フローインジェクション法 への適用を検討したところ、測定波長 555 nm で、2~20 pg/µl 濃度範囲の Spm を約 4 試料/5 分で測定することができた。

(1-2) 薬物の簡易スクリーニング法の開発：トリフェニルメタン系色素のクロムアズロール S (CAS) あるいはキサントゲン系色素のエリスロシン (ERY) を用いることにより、50 種の医薬品とアルミニウム(III) {Al(III)} との生成反応が起こるか否かについて目視的に判定する方法を考案した。陽性と判断された薬物の構造の類似性は、互いに近接するカルボキシル基、水酸基などの酸素原子含有官能基、あるいは酸素原子含有官能基とそれと近接するアミノ基などの窒素原子含有官能基を持つことであり、このことは、Al(III)が、(O, O)配位または(O, N)配位によって薬物と錯生成すると考えられた。CAS 法では、[薬物-Al^{III}-CAS]の混合配位子型三元錯体、ERY 法では、[(薬物-Al^{III})(ERY)]のイオン会合型三元錯体の生成が推測されるが、両法では、判定が若干相違する結果を得たが、今回提案した三元錯体生成反応を利用する簡易スクリーニング法では、従来では容易に目視できなかつた Al(III)錯体の生成を容易に目視によって瞬時に判別することができ、非常に有用な方法と考えられる。

(1-3) ヒストンの定量法の開発：3,4,5,6-テトラフルオロ-2-カルボキシフェニルフルオロン{TFCPF}と Mn(II) を用い、[Mn(II)-TFCPF-ヒストン]の錯生成反応の結果、[マンガン(II)-TFCPF]錯体の消光現象を利用することによるヒストンの簡便かつ高感度な蛍光光度定量法を構築することができた。本法はヒストン濃度 0.5 ~ 2.0 µg/ml において定量可能である。また、共存物質の影響が極めて少なく、更に、各種タンパク質の反応性を比較するとき、ヒストンにかなり選択的で、生体中の微量のヒストンの分析法として十分適用できると考えられた。

(2) 色素-金属錯体との競合的生成反応を利用する分析法

(2-1) 尿酸の定量法の開発：OCPF とパラジウム(II) {Pd(II)}を用い、[OCPF-Pd(II)]錯体の退色を利用する本尿酸の定量法は、極めて高感度($\epsilon = 6.5 \times 10^5 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) であり、既存のキットを用いた方法との比較測定でも良い一致を示し、感度、回収率ともに優れた結果を得ることができた。また、本法は、共存物質とくにアスコルビン酸の妨害を受け難いという点においても非常に優れており、抽出操作も全く必要とせず実試料においても簡便高感度な尿酸の定量法であるといえる。

(2-2) 微量アルブミンの定量法の開発：色素としてキシレノールオレンジ (XO)、金属イオンとしてジルコニウム(IV){Zr(IV)}を用い、[XO-Zr(IV)]錯体の退色を利用する微量アルブミンの簡便、高感度、選択的な吸光光度定量法を開発することができた。本法の感度は、ピロガロールレッド-モリブデン法 (PR 法) をはじめ従来の尿タンパク

質定量法の 50 倍以上を示すとともに、反応時間が短い、共存物質の影響が少ない、などの利点を有している。本法を実試料中の尿アルブミン測定に応用したところ、PR 法との相関も良好で、実用的な尿微量アルブミン定量法として十分適用可能であることを認めた。

以上のように、三元錯体生成反応法あるいは競合的錯生成反応法により、従来法に比べ感度、選択性、簡便性の点で優れた実用的光分析法を、病態関連物質のスペルミン、医薬品、尿酸、タンパク質（ヒストン、アルブミン）について開発することができた。

論文審査の結果の要旨

論文博士申請者の 宮地 加奈子 君は、有機試薬としてキサントン系とその類似体であるトリフェニルメタン系のような機能性に富む色素を選択し、金属イオンとの呈色反応あるいは蛍光反応を利用することにより、病態関連物質の新規測定法を検討した。その結果、以下のような有益な知見を得た。これらの知見は、分析法の原理の違いにより、(1) 色素—金属錯体との三元錯体生成反応を利用する分析法、(2) 色素—金属錯体との競合的生成反応を利用する分析法に分類できる。

(1) 色素—金属錯体との三元錯体生成反応を利用する分析法

(1-1) スペルミン(Spm)及び関連化合物の定量法の開発

キサントン系色素の σ -ヒドロキシヒドロキノンフタレイン(OCPF)とマンガン(II) {Mn(II)}を用いることにより、測定波長 555nm で 0.2~1.5 $\mu\text{g/mL}$ の Spm を高感度 ($\epsilon = 1.4 \times 10^5 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)で定量することができた。本法の相対標準偏差(RSD)は 0.50%(n=10)で、再現性にも優れていた。また、Spm とアセチルスペルミン(AcSpm)が共存する場合、前処理としてアルカリ加水分解することにより、Spm と AcSpm の総含量とともに個々の含量を算出することが可能であった。また、本呈色反応をフローインジェクション法に適用した結果も良好で、2~20pg/ μL の Spm を約 4 試料/5 分で測定できた。

(1-2) アルミニウムと錯生成する薬物の簡易スクリーニング法の開発

トリフェニルメタン系色素のクロムアズロール S (CAS)あるいはキサントン系色素のエリスロシン(ERY)を用いることにより、50 種の医薬品とアルミニウム(III){Al(III)}との生成反応が起こるか否かについて目視的に判定する方法を考案した。CAS 法と ERY 法では、判定が若干相違する結果を得たが、従来法では目視できなかった Al(III)錯体の生成を容易に目視で判断することができた。

(1-3) ヒストンの定量法の開発

3,4,5,6-テトラフルオロ-2-カルボキシフェニルフルオロン(TFCPF)と Mn(II)を用い、[Mn(II)-TFCPF-ヒストン]の錯生成反応を検討した結果、Mn(II)-TFDPF 錯体の消光現象を利用するヒストンの簡便且つ高感度な蛍光光度定量法を構築できた。本法は、ヒストン濃度 0.5~2.0 $\mu\text{g/mL}$ において定量可能であり、共存物質の影響も少ないため、生体内の微量のヒストンの分析法として適用できると考えられた。

(2) 色素—金属錯体との競合的生成反応を利用する分析法

(2-1) 尿酸の定量法の開発

色素として OCPF、金属イオンとしてパラジウム(II){Pd(II)}を用い、OCPF-Pd(II)錯体の退色を利用する高感度な尿酸の定量法($\epsilon = 6.5 \times 10^5 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)を確立した。本法は、既存のキットを用いる方法との比較測定において良い一致を示し、感度、回収率とも良好な結果を得た。また、本法はアスコルビン酸などの妨害も受けにくく、抽出操作も必要としないことから、実試料への応用も可能な簡便且つ高感度な尿酸の定量法である。

(2-2) 微量アルブミンの定量法の開発

色素としてキシレノールオレンジ(XO)、金属イオンとしてジルコニウム(IV){Zr(IV)}を用い、OCPF-Pd(II)錯体の退色を利用する微量アルブミンの簡便、高感度、選択的な吸光度定量法を開発した。本法の感度は、ピロガロールレッド—モリブデン法(PR法)はじめ従来の尿タンパク質定量法の50倍以上を示すとともに、反応時間が短い、共存物質の影響が少ない、などの利点を有している。実試料中の尿アルブミン測定に応用したところ、PR法との相関も良好であり、実用的な尿中微量アルブミンの定量法として適用が可能と考えられた。

以上のように、申請者は、数種のキサンテン系色素及びトリフェニルメタン系色素と金属イオンを用いて、病態関連物質のスペルミン、尿酸、タンパク質(ヒストン、アルブミン)の各定量法並びにAl(III)と錯生成する医薬品の簡易スクリーニング法を検討し、従来法より高感度で簡便性の優れた実用的光分析法を開発した。これらの内容は、学位論文として十分評価できるものである。

よって、上記の論文は、博士(薬学)論文として適当と判断する。