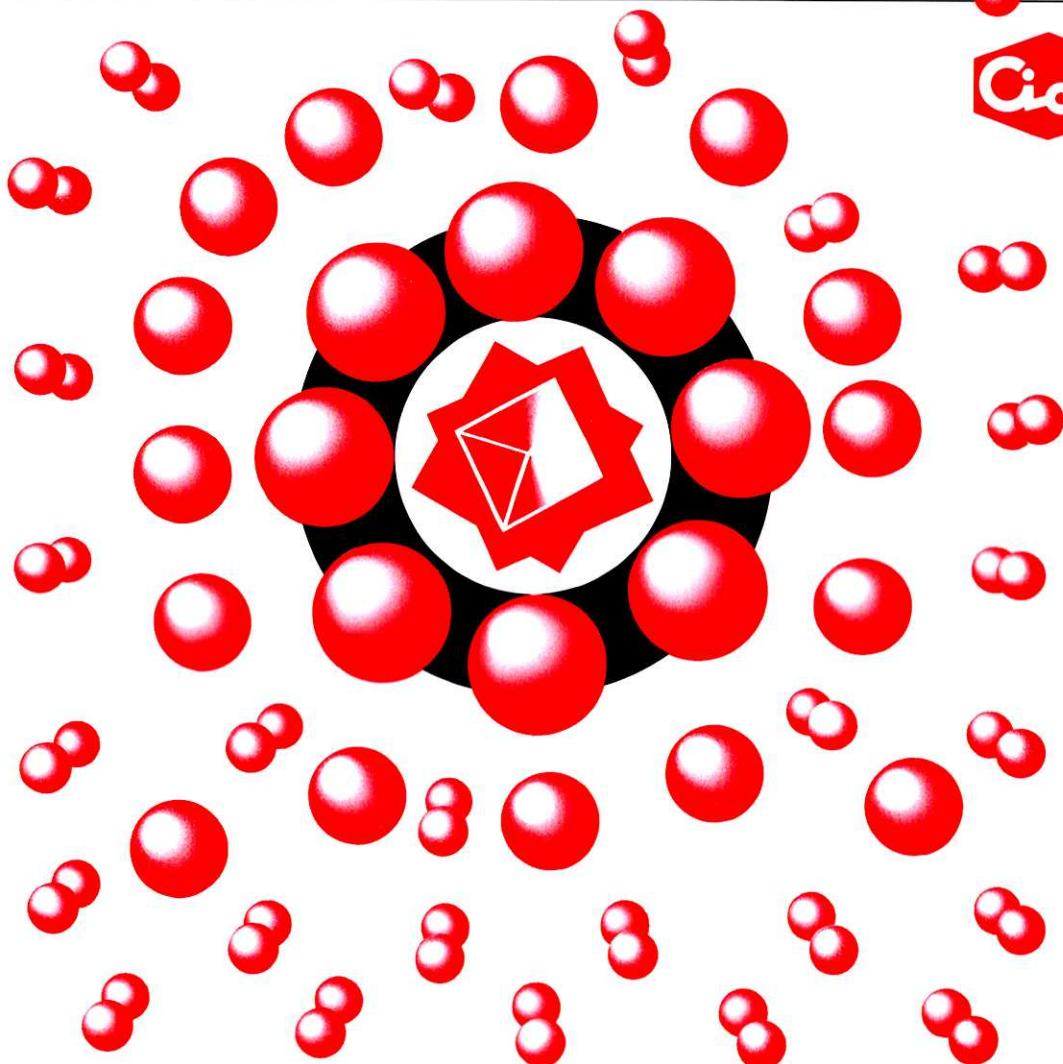


THE

ISSN 0285-2446
KANTO CHEMICAL CO., INC.
2000 No.4 (通巻178号)

CHEMICAL TIMES



Cica

目 次

遺伝子情報を医薬品へ(その1).....	坂田 恒昭.....	2
組換え医薬品の誕生		
藍藻毒ミクロシスチンの化学.....	彼谷 邦光.....	6
1) ミクロシスチンの分析法と光化学反応による無毒化法の開発	佐野 友春	
医療における薬物分析.....	江藤 精二.....	12
Therapeutic Drug Monitoring から派生した基礎的研究 (V)		
魚の寄生虫の話(その1).....	福田 芳生.....	16
皮膚と鰓の機能形態		
粘液とムチン.....	栗原 誠.....	20
生化学的にみた消化管粘液の性状		
編集後記.....		24

遺伝子情報を医薬品へ(その1)

組換え医薬品の誕生

塩野義製薬(株) 創薬研究所 主管研究員 坂田恒昭

この原稿を執筆中の2000年6月下旬に日、米、欧の共同作業として進められてきたヒトゲノム計画の成果として、ヒトの全遺伝情報が決定されたというニュースが飛び込んできた。遺伝子の情報を医薬品に応用していくという試みは、まず、遺伝情報に基づく蛋白質を大腸菌、酵母、培養細胞などで大量に生産、精製する組換え蛋白質、第二に遺伝子情報をそのまま薬にしていく遺伝子治療、最後に最近のゲノム情報に基づく医薬品(ゲノム創薬)という流れに分けられる。本稿もこの流れに基づいて各章に分けて概説していくことにする。

1.1 組換え医薬品の歴史

組換え蛋白質を医薬品に応用するという考え方は、それまで産業界とは無縁であり理学系の基礎科学であった分子生物学を産業に応用しようという最初の試みであった。それは現在、遺伝子工学という名前で広く呼ばれているものである。これまでにも生物学を産業に応用することは、発酵学により代表されるように我が国は大きく貢献してきた。

この新しい領域である遺伝子工学は、今まで困難だとされてきたいかなる種類のヒト型蛋白質を大量に得ることを基本的に可能にした。これには言うまでもなく制限酵素、ならびにRNAからDNAを合成する逆転写酵素の発見(1970年)、それらと既に発見されていたDNA修飾酵素(DNAリガーゼ、DNAポリメラーゼなど)を合わせた分子生物学への応用(1971年)が大きな飛躍のステップになっている。さらにこれら技術により、それまでは大腸菌あるいはバクテリオファージを用いた学問であった分子生物学において、ヒトを含む真核生物を材料として用いることが可能になった。

また現在では有用なヒト型蛋白質の生産方法も大腸菌を宿主として用いるだけでなく、酵母、動物細胞、昆虫細胞など多岐にわたっている。

組換え医薬品のはしりと呼べるものは、1977年米国シティーオブホープ医療研究センターの板倉らが大腸菌で

生産したソマトスタチンである。彼らはソマトスタチン遺伝子を化学的に合成し、 β -ガラクトシダーゼ融合蛋白質として大腸菌で生産させた¹⁾。この方法を使うと従来5ミリグラムのソマトスタチンを得るために50万頭のヒツジの脳が必要であったものが、同量のソマトスタチンが9リッターの大腸菌の大量培養で得られた。市販品にまでなった組換え医薬品の第一号と呼べるものは、1979年米国ジェネンテック社のゲルルにより世界で最初に大腸菌で生産されたヒト型インスリンである。彼らはヒト型インスリン遺伝子をA鎖、B鎖毎にインスリン遺伝子の塩基配列にしたがって化学合成し、それらを別々に大腸菌で生産させ、最終的に試験管内でそれぞれの鎖を結び付け活性型インスリンとした²⁾。もう一つの方法は、やはりジェネンテック社のゲルルとウルリッヒらにより脾臓のmRNAより酵素的にインスリンcDNAを合成したものがある。ただしこのインスリンは活性の無いプロインスリンのために、この後にプロテアーゼ処理で活性型にする必要がある³⁾。この組換え型ヒトインスリンは、その後米国イーライ・リリー社により商品化されている。

それに続いてインターフェロン類、インターロイキン-2、ヒト成長ホルモン、B型肝炎ウイルスワクチン、赤血球増殖分化因子エリスロポエチン、顆粒球コロニー刺激因子(G-CSF)、組織プラスミノーゲン活性化因子TPAなどのヒット商品を生み出し、多くの医者に使われるようになっている。

また、これを契機にジェネンテック、バイオジェン、アムジェンなどの様々なバイオテクノロジーを売り物にしたベンチャーカンパニーが誕生した。

1.2 くすりのできるまで

一般的にいって各製薬会社研究所で見つかったくすりの種(シード化合物)が新薬として発売されるまでの過程を概説すると、開発研究において化合物をスクリーニングしシードを見つけ、その物理化学的性状を調べると共に構造の最適化を行なうのに2~3年、効果を調べる

薬効薬理研究、体内での吸収、分布・代謝、排泄を調べる薬物動態研究、体内各所での化合物の影響を調べる一般薬理研究、毒性を調べる一般毒性研究、発癌性・安全性を調べる特殊毒性研究の前臨床試験で3~6年、同意を得た小人数の健常人による安全性の確認試験である第一相試験、同意を得た少数の患者で安全性と有効性を確認する第二相試験、同意を得た多数の患者で既存薬と比較して新薬の有効性と安全性を試験する第三相試験の臨床試験で3~7年、審査で2~3年、合計8~16年を必要とする。しかも市販後にも多くの患者に投与された結果、開発段階では発見できなかった副作用や有効性のデータ収集が義務づけられ再審査、再評価される⁴⁾。

研究段階で合成された化合物のうち、最終的に承認を取得できるのは約1/5000である⁴⁾。これは日本においても米国においてもさほど変わりない。

次に、医薬品が患者に渡るまでの過程を見てみる。日本では現在医薬分業が急速に浸透してきている。患者はかかりつけの医院もしくは病院で得た処方箋を持って、かかりつけ薬局において薬を購入するシステムになっている。

1.3 組換え医薬品の現状

現在上市されている組換え医薬品の数は多いとは言えないが、今後の発展が大きく見込まれている。1998年の日本のバイオテクノロジー関連製品の市場規模は、約1兆1800億円でそのうちバイオ医薬品は約3,440億円、バイオ技術を応用した医薬品および診断薬を含めると約5,300億円規模になる。Consulting Resources社の1997年1月の報告では、米国におけるバイオテクノロジー関連製品の市場規模は1996年では約100億ドルで、そのうち

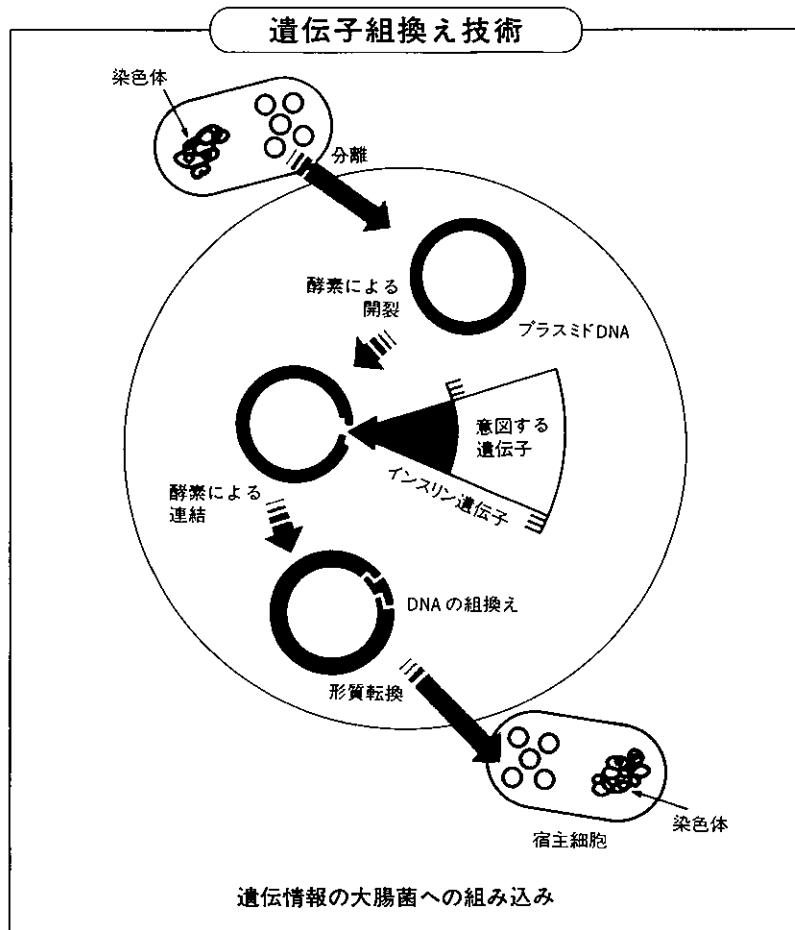


図1. 組換え技術による医薬品の生産の概略図

バイオ医薬品は約70億ドル、2001年にはバイオテクノロジー関連製品の市場規模は160億ドル程度となり、年率11%の成長が予測されている。現在の我が国のヒット商品は、エリスロポエチン、ヒト成長ホルモン、顆粒球コロニー刺激因子(G-CSF)、インターフェロン- α 、インスリン、インターフェロン- β などである。いずれも1998年度に年間200億円以上の売り上げがある。現在世界で開発中の組換え医薬品の数は、多様な病気に対して100以上の候補品が有る。

今後、バイオテクノロジーにより生産される組換え医薬品は大きくシェアを延ばすことが予想され、米国では2000年には売り上げ総額1兆2000億円程度に達するという予測もある。

遺伝子工学を利用して組換え医薬品を作る過程を図1に概説する。この例は大腸菌を用いてインスリンを生産する場合であるが、基本的には全ての大腸菌で生産する組換え医薬品は同様の過程を経ている。まず、生体各臓器より得られたmRNAを逆転写酵素を用いてcDNAライブラリーにし、それを大腸菌由来のプラスミドに組み込み、目的とするcDNAと相補性を持つプローブと呼ばれる合成オリゴヌクレオタイドを用いてコロニーハイブリダイゼーションなどの手法を用いて得ようとするcDNAを釣り上げる。現在ではこの過程はポリメラーゼチャイニアクション(PCR)法で生体各臓器よりのcDNAライブラリーさえあれば簡単に目的とする遺伝子のcDNAを得ることができる。この一連の操作を遺伝子クローニングとよばれている。クローニングされた遺伝子の塩基配列が天然のものと同じことを確認後、大腸菌で発現させるために、プロモーターと呼ばれる塩基配列を持った違う種類の大腸菌由来のプラスミドに制限酵素とDNAリガーゼなどのDNA修飾酵素を用いて遺伝子を組み込む。この大腸菌を培養して目的の蛋白を大量に生産し、精製する。得られる組換え蛋白質の量は大腸菌を宿主とした場合、通常1リッターの培養液当たり1ないし数グラム程度である。組換え蛋白質が大量に生産された場合、大腸菌内でインクルージョンボディーと呼ばれる不溶性の組換え蛋白質の塊が見られることがある(図2)。

これら大腸菌で生産された組換え蛋白質にはもちろん糖鎖の付加、リン酸化などの蛋白修飾は起こらない。このためにエリスロポエチンなどその活性に蛋白修飾が必要な蛋白質では、動物細胞などの真核細胞系を用いて組換え蛋白質を生産しなければならない。技術的には動物細胞に簡便にDNAを導入できる方法が開発されたことにより、動物細胞での生産が可能になった。現在生産に用いる動物細胞としては、ハムスター卵巣由来のCHO細

胞もしくはサルの腎臓由来のCOS細胞が使われている。動物細胞系を用いると、得られる蛋白質の量は少ないが、糖鎖付加などの蛋白修飾はおきる。しかしながら大腸菌と比べるとはるかに製造コストがかかる。このために近年、酵母、昆虫細胞を用いる方法も普及している。

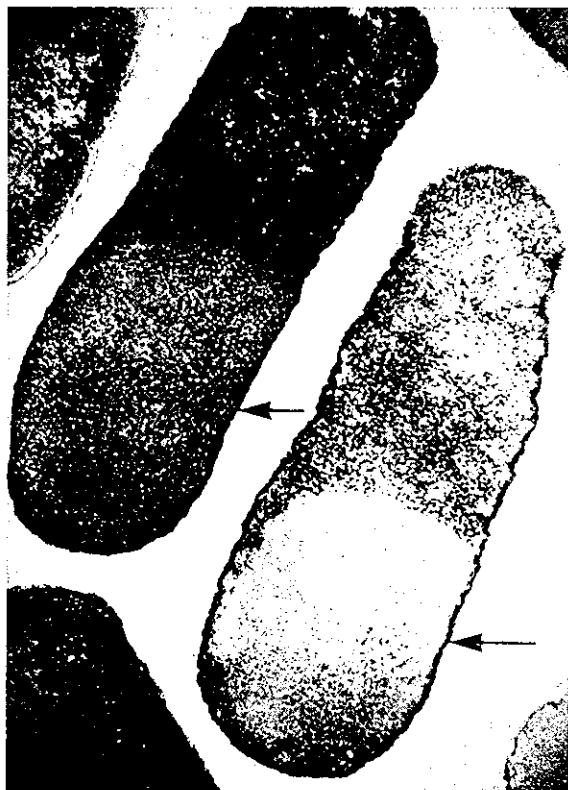


図2. 大腸菌内で生産された組換え蛋白質、不溶化したインクルージョンボディーを形成している(矢印)

1.4 組換え医薬品の特殊性

組換え医薬品は基本的には一般の医薬品と同じ過程で生産、試験、販売される。組換え蛋白が今までの医薬品と違う点は、それがまったくヒトにとって異種の合成化合物ではなくて生体内にもともとある生理活性物質であるという点である。しかし、組換え医薬品の試みは、全く新しいものであるために数多くの困難を伴った。

一般的には科学技術庁の組換えDNA実験指針にあるとおり、20リッター以上の培養で組換え蛋白質を生産する場合には科学技術庁への届け出が必要で、また物理的封じ込め施設を必要とする⁵⁾。

加えて組換え蛋白質、例えばヒト γ 型インターフェロンは従来の化合物医薬品に比べていくつかの特殊性を持っている。

インターフェロンはまず第一に、種特異性が非常に高いということである。例えばヒト γ 型インターフェロンは、マウスの受容体には作用しない。すなわちマウスにはヒト γ 型インターフェロンは効かないということになる。医薬品の開発からすれば、これは非常に大きな問題である。薬効を調べる薬効薬理研究、体内での吸収、分布・代謝、排泄を調べる薬物動態研究、体内各所での化合物の影響を調べる一般薬理研究では、この目的のために一般に使われているマウスがヒト γ 型インターフェロンそのものではできないということである。このために新たにマウス γ 型インターフェロン cDNA をクローニングし、ヒト γ 型インターフェロンと同じ大腸菌で生産させ、ヒト γ 型インターフェロンと同じ精製法にのっとった精製を行って、薬理研究に供する必要がある⁶⁾。

またヒト γ 型インターフェロンの毒性を調べる一般毒性研究には、ヒト型インターフェロンが効くサルを用いて行う必要がある。

第二に品質保証のための活性単位の設定法がなかった。このために単位測定法の手順の標準化は当時の国立予防衛生研究所（現国立感染症研究所）が行い、標準品の供給は製薬企業が行った。

このようにしてヒト γ 型インターフェロンは開発、上市され、腎癌などに対して適用認可を得ている。

1.5 組換え医薬品の問題点

繰り返しになるが、組換え蛋白質が今までのくすりと違う点は、それがまったく生体にとって異種の合成化合物ではなく生体内にもともとある生理活性物質であるという点である。しかしサイトカインなどの組換え医薬品をヒトに投与する場合、通常生体に存在する量と比較し、比べものにならないほどの多くの量を投与するためにその抗体を生じる可能性がある。さらにはアレルギーのもととなるアレルゲンになる可能性すらある。また、通常は生理的には微量で作用するものが大量に投与されたために、生体内のホメオスタシオスを乱し副作用が生じる恐れがある。例えばサイトカイン類は血圧、中枢に対する作用も認められる。

これらの点は十分に考慮されなければならない点である。今後は、全身投与ではなく、目的とする局所へ、必要なときに必要な量を投与できるようなドラッグデリバリー・システム (DDS) の開発が望まれる。

それに加えて言うまでもなく大腸菌、酵母などで生産

されるために、これらの宿主生物由來の蛋白質、核酸、糖などの不純物を完全に除く必要がある。仮にリボポリサッカロイド (LPS) などの大腸菌由來不純物が入ると、エンドトキシンショックを起こす可能性もある。

しかし、現在ヒトに対して大量投与を行うヒト血清アルブミンをかなりの低価格で生産、精製し販売する計画があり、組換え蛋白質製造技術はほぼ完成したと言えるであろう。

また同時にくすりとして瓶詰めの際には、現在のところ組換え蛋白質の安定化剤としてヒト血液から分離した血清アルブミンを使用しているが、血液製剤の安全性の問題からも今後組換えヒト血清アルブミンを使用することになると考えられる。

1.6 バイオ医薬品の今後

今後の遺伝子情報を利用した医薬品としては組換え医薬品から発展し、ヒトゲノムの解析情報から新たな薬効を有する医薬品を予測し、創って行こうとするゲノム創薬、患者個人個人の遺伝的背景・病因にあたたくすりを作つて行こうとするエビデンスベーストメディスン、さらには遺伝子そのものを薬にしようとする遺伝子治療へとバイオ医薬品の可能性はますます広がっていくものと思われる。

これらの点については次号以降記載する。

参考文献

- 1) Itakura, K., Hirose, T., Crea, R., Riggs, A. D., Heyneker, H. L., Bolivar, F., and Boyer, H. W.: Expression in *Escherichia coli* of a chemically synthesized gene for the hormone somatostatin. *Science* 198: 1056-1063(1977).
- 2) Goeddel, D. V., Kleid, D. G., Bolivar, F., Heyneker, H. L., Yansura, D. G., Crea, R., Hirose, T., Kraszewski, A., Itakura, A., and Riggs, A. D.: Expression in *Escherichia coli* of a chemically synthesized gene for human insulin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 76: 106-110(1979).
- 3) Sures, I., Goeddel, D. V., Gray, A., and Ullrich, A.: nucleotide sequence of human preproinsulin complementary DNA. *Science* 208: 57-59(1980).
- 4) 日本製薬工業協会 DATA BOOK 1996-97 (日本製薬工業協会 広報委員会編), 日本製薬工業協会, 東京(1996).
- 5) 組換え DNA 実験指針(組換え DNA 実験指針研究会編, 科学技術庁ライフサイエンス課監修), 第一法規, 東京(1997).
- 6) Nagata, K., Ohara, O., Teraoka, H., Yoshida, N., Watanabe, Y., and Kawade, Y.: Production and purification of recombinant mouse interferon- γ from *E. coli*. In: *Lymphokines and interferons*. (eds. Clements, J. M., Morris, A. G., and Gearing, A. J. H.), p. 29-52, IRL Press, Oxford(1987).

藍藻毒ミクロシスチンの化学

1) ミクロシスチンの分析法と光化学反応による無毒化法の開発

国立環境研究所 化学毒性研究室 室長 彼谷邦光
 国立環境研究所 化学毒性研究室 主任研究員 佐野友春

1. はじめに

毎年初夏から晩秋にかけて湖やダムにシアノバクテリアの水の華いわゆるアオコが発生し、水道や水環境保全の関係者はその対策に悩まされるのが常となっている。淡水産のシアノバクテリアのほとんどは毒素を生産し、それらの毒素によって多くの人や家畜、野生動物の命を奪ってきた。シアノバクテリアの毒素には肝臓毒、神経毒、皮膚毒(免疫毒)などがある。肝臓毒には世界で最も頻繁に発生しているミクロシスチンなどの環状ペプチドとアルカロイド(Cylindrospermopsin), 神経毒にはアルカロイド(Anatoxin-a, Anatoxin-a(S), aphantoxin)皮膚毒(免疫毒)にはマクロライド(lngbyatoxin)やLPS(リポポリサッカライド)などがある。肝臓毒として知られるミクロシスチンは cyclo(D-Ala¹-X²-D-MeAsp³-Z⁴-Adda⁵-D-Glu⁶-MeDha⁷)と表される。Adda は(2S,3S,8S,9S)-3-amino-9-methoxy-2,6,8-trimethyl-10-phenyldeca-4(E), 6(E)-dienoic acid, MeDha は N-methylhydroxyalanine, D-MeAsp は D-erythro-β-methylaspartic acid, X と Z は L 型の α-アミノ酸である。ミクロシスチン同族体の中でミクロシスチン-LR とは X がロイシン(L), Z がアルギニン(R) のミクロシスチンである。[Asp³; Dha⁷]ミクロシスチン-RR とは 2 番目のアミノ酸がアルギニン(R), 3 番目のアミノ酸がアスパラギン酸(MeAsp からメチル基が外れた物), 4 番目のアミノ酸がアルギニン(R), 7 番目のアミノ酸が Dha (MeDha からメチル基が外れた物) のミクロシスチンのことである。ミクロシスチンはプロテインフォスファーゼ 1 と 2A の活性を特異的に阻害し、動物だけでなく、高等植物にも種々の被害を与えていている。

1996 年 2 月のブラジルの鉱山都市カルアリ市で起きた人工透析事故(1)は、120 人にもおよぶミクロシスチン中毒患者の発生と 70 名近い死者がでたことで有名である。この事故は市の上水道用浄水場から運んできた人工透析用外液にシアノバクテリア *Microcystis aeruginosa* の毒素ミクロシスチン(microcystin)が混入して起きたものである。その他、小さな事故は枚挙にいとまがない。こ

のような状況から世界保健機関(WHO)は飲料水中のミクロシスチンのガイドラインを 1 μg/L(ミクロシスチン-LR として)と設定し、各国政府に勧告した(2)。しかし、このガイドラインにはミクロシスチンの助癌作用や発癌作用に関するファクターが加味されていないので、将来的にはさらに低い値に改訂される予定であると聞いている。

このような状況から、緊急に開発する必要のある課題として、現在 70 種類を越えるミクロシスチン同族体の全量を定量する方法の開発およびミクロシスチンの無毒化法の開発が挙げられている。当研究室ではこれまでミクロシスチンの微量全量定量法の開発を行ってきたので、これらの概要を紹介したい。また、ミクロシスチンの無毒化を紫外線を用いて行うことを提案しており、紫外線によるミクロシスチンの分解メカニズムの解明を行ってきた。これらの成果についても紹介したい。

2. ミクロシスチンの全量分析法

国内のアオコには乾燥重量当たり 0.003% 程度のミクロシスチンが含まれており、主要な同族体はミクロシスチン-RP, -YR および -LR であるが、微量なものとして他に数種類含まれている場合がある。WHO のガイドラインに適合する飲料水であるか否かの判定には正確なミクロシスチン-LR 換算当量が要求される。

現在、ミクロシスチンの定量には LC-PDA(UV), LC-MS, ELISA などがある。LC-PDA 法は ODS などの LC カラムで分離したミクロシスチンを λ_{max} である 239 nm で定量する方法である。シアノバクテリアのミクロシスチン画分にはミクロシスチン以外の環状ペプチドが多数含まれており、微量のミクロシスチンや環状ペプチドとオーバーラップしたミクロシスチンもある。このようなクロマトグラムからミクロシスチンだけをピックアップして定量することは、きわめて困難な作業である。LC-MS 法は LC で分離したミクロシスチンの検出を MS を用いて行うもので、ミクロシスチン分子に含まれる Adda 部分の特徴的な開裂フラグメントを用いて定量するもの

であるが、ここでも微量成分の定量が問題となる。ELISA 法はミクロシスチンの抗体を用いて全ミクロシスチンを定量する方法である。ミクロシスチンのモノクロナル抗体は多くの場合ミクロシスチン-LRをもとにつくられるが、-LR以外のミクロシスチンに対する結合定数は同族体間でかなり異なる。したがって、同族体の組成によって定量値も変動することになる。

LC 法や ELISA 法の欠点を補う方法として、我々は化

学分解法を提案してきた(3)。この方法はミクロシスチンの同族体の共通する部分である Adda の共役ジエンを過マンガン酸を用いて酸化し、生成したグリコールを過ヨウ素酸で酸化開裂させ、生成する 2-methyl-3-methoxy-4-phenylbutyric acid (MMPB) を GC/CI-MS または LC/FD (蛍光検出器) で定量するものである(図 1)。内部標準には MS 用に MMPB-d₃を用いている⁴⁾。蛍光用には 4-(4-methoxyphenyl) butyric acid が便利である。

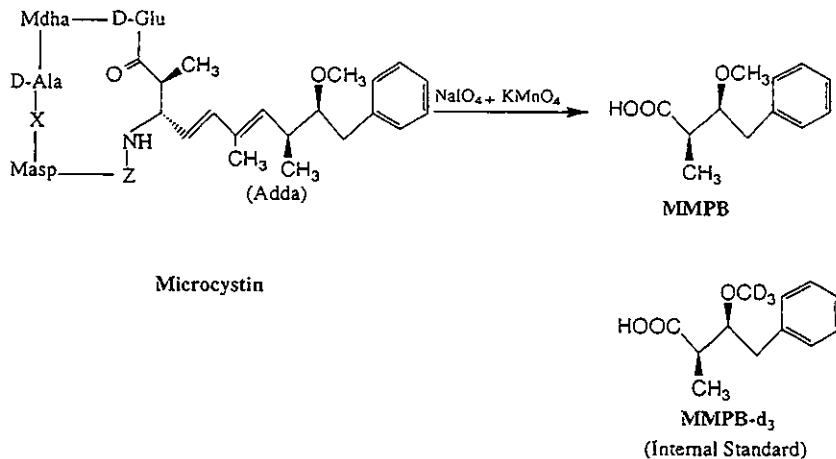


図 1. ミクロシスチンの Adda 残基からの MMPB (*erythro*-2-methyl-3-methoxy-4 phenylbutyric acid) の生成

分析手順：乾燥アオコ 5mg 程度または 50ml の湖沼水から 5% 酢酸水溶液およびメタノールでミクロシスチンを抽出し、抽出液はメタノール濃度が 25% 以下になるよう精製水を加える。これを ODS カートリッジに通し、25% メタノール水溶液で洗浄し、4ml の 90% メタノールで溶出する。溶出液は 35°C、窒素気流下で濃縮乾固する。ミクロシスチン画分を 0.2ml の 90% 酢酸または 1M 炭酸カリウムに溶解し、0.2ml の 0.05M 過マンガン酸カリウムと 5mg の過ヨウ素酸ナトリウムを加えて、室温で 2 時間時々混ぜながら反応させる。反応途中で過マンガン酸カリウムの色が消えるような場合は過マンガン酸カリウム溶液を加える。反応液が無色透明になるまで亜硫酸水素ナトリウムの 20% 溶液を少量ずつ加える。この脱色反応液に 20-200ng の内部標準 (MMPB-d₃) と 0.5ml の 10M 硫酸を加えて、生成した MMPB と内部標準を 2ml の n-ヘキサンで 3 回抽出する。抽出液は 30°C で、N₂ を吹き付けて乾燥させる。

抽出された MMPB は GC/CI-MS 用に 14% BF₃-メタノールでメチルエステルとし、n-ヘキサンで抽出する。LC

分析用にはカルボキシル基を蛍光標識する。

測定は GC/CI-MS で行う(図 2)。カラムは HP-1 キャビラリーカラム 0.32 mm × 25 m, カラム温度は 80°C で 1 分間保持、その後 250°C まで 5°C/min. で昇温。MS の測定条件はイオン化電流 : 300 mA, イオン化エネルギー : 70 eV, 加速電圧 : 3 kV, CI-MS はイソブタンを反応ガスに用いる。イオンは m/z 223 (MMPB の M⁺+1) と m/z 226 (MMPB-d₃ の M⁺+1) をモニターする SIM で検出する。MMPB の Rt は 16.05 min, MMPB-d₃ の Rt は 16.02 min である。ミクロシスチン同族体の平均分子量を 1000 と仮定すれば、検出限界である 0.1 ng の MMPB は 0.43 ng のミクロシスチンに相当することになる(図 3)。

本方法の特徴は、LC/MS や LC-UV では定量困難なミクロシスチンの微量同族体の全てが MMPB として定量できる点である。WHO の示すミクロシスチンの飲料水のガイドラインである 1 μg/L を正確に測定するには推薦できる方法である。しかし、世界的な視野に立った場合、水質試験場に GC/MS があるのは先進諸国の一端だけであり、発展途上国では GC や LC さえ行き渡っていない

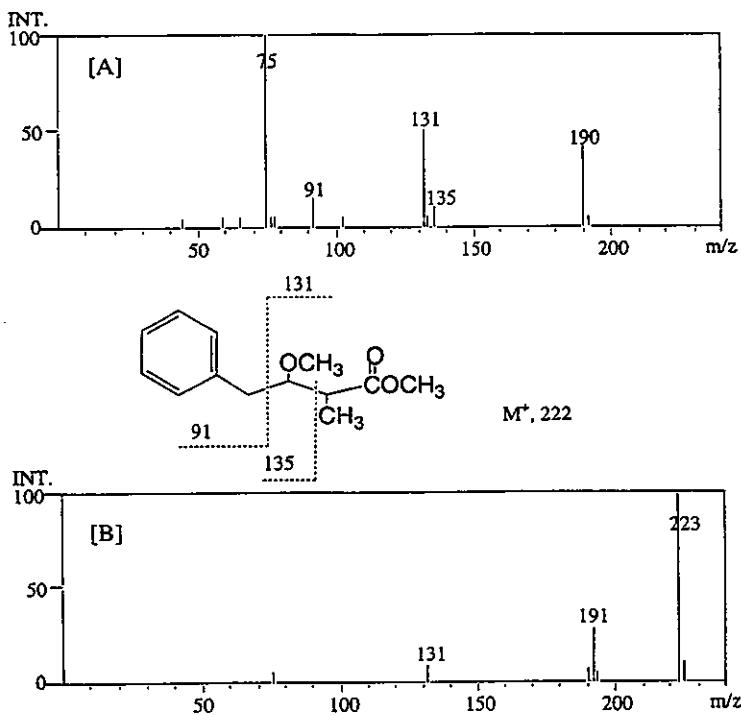


図2. MMPBメチルエステルのEIおよびCIマススペクトル
EIマススペクトル[A]では M^+ (M^+ , m/z 222)が現れない。
CIマススペクトル[B]では $[M+H]^+$ (m/z 223)が検出される。

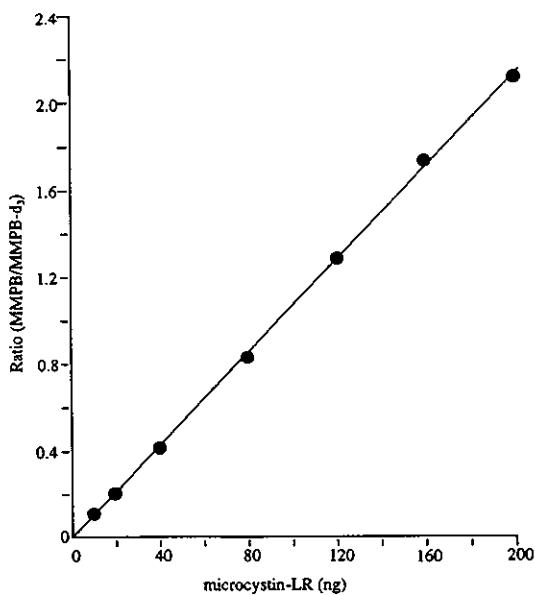


図3. ミクロシスチン濃度と生成するMMPB
と内部標準(MMPB- d_3)比の関係

いのが現状である。発展途上国の水質検査のある担当者から「あなたの開発した方法はすばらしい。しかし、あなたたちのような先進国の人達だけができる方法は財力や技術の無い発展途上国の人達をないがしろにするものである。せめてLC-UVで同じようにできる分析法を開発すべきである」と詰め寄られたことがある。今、当研究室では発展途上国の人達にも使える全ミクロシスチンのLC-UVによる定量法の開発を行っている。

3. 光化学反応によるミクロシスチンの無毒化

ミクロシスチンの λ_{max} は239 nmにあり、分子吸光係数の $\log \epsilon$ の値は4.49である。この吸収はAddaのトランス型の共役二重結合に由来する。光照射で6位の二重結合が異性化してシス型になる([6(Z)-Adda⁵] microcystinと表している)と、毒性がなくなる⁵。この反応は可逆的であるが、 λ_{max} 付近の紫外線を照射(130 μ W at 250 nm)した場合、少なくとも3種類の反応中間体が生成していることがHPLCで観察できる⁶。反応中間体の生成とともに、急速にミクロシスチンのピークが小さくな

る。どのような経路でミクロシスチンが急速に分解していくのかを調べ、紫外線によるミクロシスチンの無毒化法の開発につなげたいと考えている。

光照射条件として、ミクロシスチンを pH 7.0 の 10 mM リン酸緩衝液に溶かし (10 mg/100 ml), その 10 ml をシャーレ (直径 9 cm) に入れた。シャーレは氷冷し、紫外線が直接液面に照射されるように蓋の無い開放系とした。紫外線照射で生成するオゾンの影響を除くために、小型の扇風機でシャーレ表面に真横から風を送り続けた。

試料は 15 分ごとに 10 μl を取り、HPLC に注入した。HPLC は Mightysil RP-18 (内径 20 mm × 25 cm) のカラムを用い、60% のメタノールを含む 50 mM リン酸緩衝液 (pH 3.0) を移動相とした。流速は 10 ml/min である。反応溶液を HPLC で分析すると、未反応のミクロシスチン-LR が 24.9 min に溶出する。反応中間体の一つはミクロシスチン-LR より速く、21.2 mim に溶出する (反応中間体-I)。また、26.1 mim (反応中間体-II) と 30.0 mim (反応中間体-III) にも反応中間体が溶出した。これらの反応中間体を分取し、薄層クロマトグラフィーでさらに精製し、NMR および FABMS でその構造を解析した。反応中間体はいずれもマウスに対して 1.5 mg/kg の投与でも毒性を示さなかった。

反応中間体-I はミクロシスチンの Adda に由来する 239 nm の $\lambda_{240\text{nm}}/\lambda_{280\text{nm}}$ の比が 2.92 を示した。Positive FABMS の $[\text{M}+\text{H}]^+$ は、ミクロシスチン-LR と同じ 995.5565

であった。¹H- および ¹³C-NMR のスペクトルは Adda だけが異なっており、他のアミノ酸に変化がないことを示していた。HMBC や ROESY のスペクトルから反応中間体-I の構造は Adda の 6-7 の二重結合とフェニル基の付け根の 4 級炭素とオルト位との間の二重結合との間の [2+2] 付加がおきた、Tricyclo 構造 ([tricyclo-Adda⁵] ミクロシスチン-LR) を示した (図 4)。この構造は Adda が水系で U 字型に曲がっており、フェニル基と 6-7 の二重結合が近い距離にあることを示すものである。また、反応中間体-II は Adda の 4-5 の二重結合がシスになった [4(Z)-Adda⁵] ミクロシスチン-LR、反応中間体-III は Adda の 6-7 の二重結合がシスになった [6(Z)-Adda⁵] ミクロシスチン-LR と同定された (図 5)。

ミクロシスチンの分解速度を見ると、75 分で 50% のミクロシスチンが分解した。この分解過程において 4(Z)-Adda と 6(Z)-Adda の反応中間体は常に等量生成し、各反応時間における [4(Z)-Adda⁵] ミクロシスチン-LR と未反応のミクロシスチン-LR の比および [6(Z)-Adda⁵] ミクロシスチン-LR と未反応のミクロシスチン-LR の比が常に等しい値を示した (表 1)。このことはトランス型への異性化反応は可逆的であることを示し、4(Z) への異性化と 6(Z) への異性化は同じ割合で進むことを示している。

一方、[Tricyclo-Adda⁵] ミクロシスチン-LR の反応中間体中の割合は次第に増加していった。この [Tricyclic-Adda⁵] ミクロシスチン-LR (0.1 mg/10 ml) に紫外線を 15

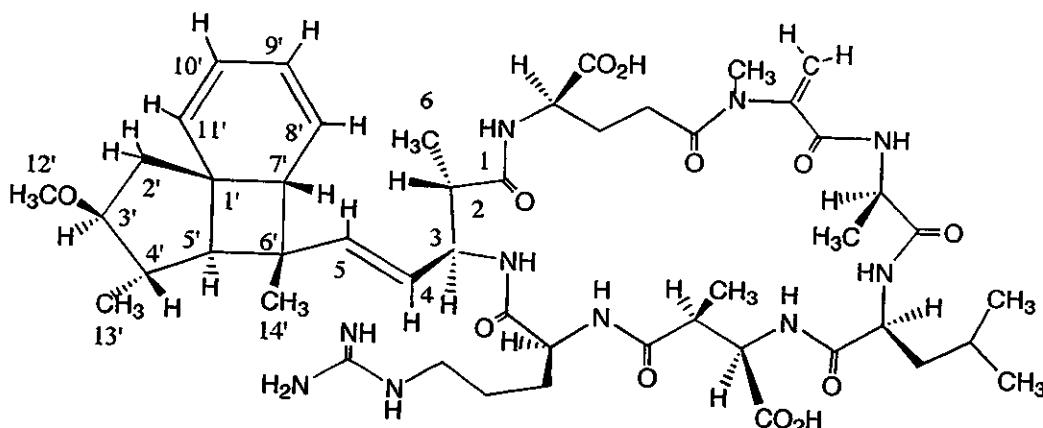


図 4. [Tricyclo-Adda⁵] ミクロシスチン-LR の構造

Tricyclo-Adda : (2S, 3S, 1'R, 3'S, 4'S, 5'R, 6'R, 7'R)-3-amino-5-(4'6'-dimethyl-3'-methoxy-tricyclo [5.4.0.01'5'] undeca-8, 10'-dien-6-yl)-2-methyl-4(E)-pentenoic acid.

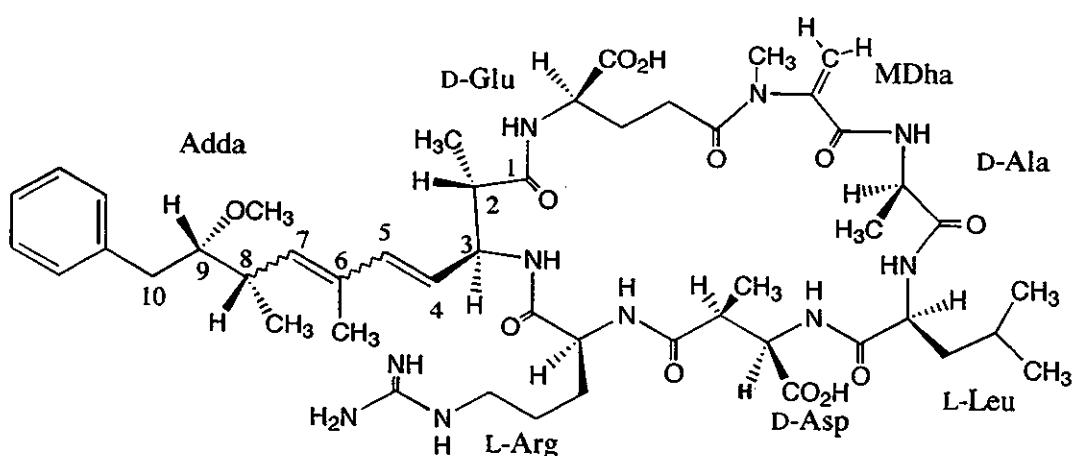


図5. ミクロシスチン-LR, [4(Z)-Adda⁵]ミクロシスチン-LR および [6(Z)-Adda⁵]ミクロシスチン-LR の構造
ミクロシスチン-LR, [4(Z)-Adda⁵]ミクロシスチン-LR および [6(Z)-Adda⁵]ミクロシスチン-LR の Adda の共役ジエンはそれぞれ 4(E), 6(E), 4(Z)6(E) および 4(E)6(Z) である。

表1. ミクロシスチンの光反応生成物の組成と回収率の経時変化^a

reaction time (min)	recovery (%)	composition (%) of recovered products				ratio	
		LR	4(Z)	6(Z)	tricyclo	4(Z)/LR	6(Z)/LR
0	100	100	0	0	0		
15	71.5	67.4	15.0	14.9	2.7	0.22	0.22
30	64.6	64.9	15.1	15.3	4.7	0.23	0.24
45	58.9	64.5	14.9	14.9	5.7	0.23	0.23
60	53.0	64.4	14.8	14.4	6.4	0.23	0.22
75	50.2	63.9	14.4	14.6	7.1	0.23	0.23

^a LR, microcystin-LR; 4(Z), [4(Z)-Adda⁵]microcystin-LR; 6(Z), [6(Z)-Adda⁵]microcystin-LR; tricyclo, [tricyclo-Adda⁵]microcystin-LR.

分照射した場合、68.3%が分解し、残存ミクロシスチンは[4(Z)-Adda⁵]ミクロシスチン-LR(3.1%), [6(Z)-Adda⁵]ミクロシスチン-LR(3.1%), ミクロシスチン-LR(14.3%), [Tricyclo-Adda⁵]ミクロシスチン-LR(11.2%)であった。これと同じ条件で[6(Z)-Adda⁵]ミクロシスチン-LRに紫外線を照射した場合、28.3%が分解しただけで、残存ミクロシスチンは[4(Z)-Adda⁵]ミクロシスチン-LR(15.0%), [6(Z)-Adda⁵]ミクロシスチン-LR(15.1%), ミクロシスチン

-LR(68.8%), [Tricyclo-Adda⁵]ミクロシスチン-LR(1.3%)であった。[4(Z)-Adda⁵]ミクロシスチン-LRの場合も同様な結果であった。これらの結果は[Tricyclo-Adda⁵]ミクロシスチンがミクロシスチンから可逆的に生成し、紫外線下で不安定化して分解することを示すものと考えられた(図6)。

本研究では、250 nm付近の紫外線照射によるミクロシスチンの無毒化は単に二重結合の可逆的異性化によるも

のではなく、可逆的に生成する [Tricyclo-Adda⁵]ミクロシスチンの不可逆的分解反応を主にしたものであることを示した。今後の展開によっては実用化も可能であろう。

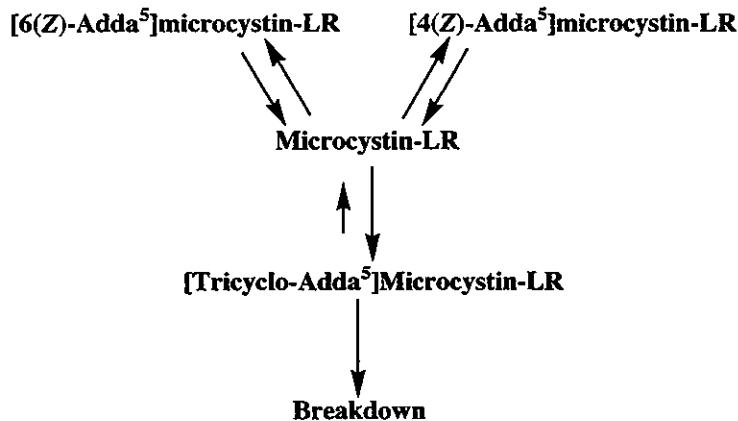


図6. 紫外線照射によるミクロシスチンの分解経路

4. おわりに

WHOは飲料水中のミクロシスチンの量をミクロシスチン-LRとして1μg/L以下にするようにというガイドラインを各國政府に勧告した。この値は大人が一日当たり2リットルの水を生涯にわたって飲み続けてもミクロシスチンの影響が出ない濃度ということであるが、データがまだ十分に蓄積されていないという理由でミクロシスチンの助癌作用のファクターが除かれている。将来、このファクターが加味される予定である。その時、地球上にWHOのガイドラインをクリアする水はあるだろうか。

参考文献

- 1) Jochimsen, E. M., Carmichael, W. W., An, J. S., Cardo, D. M., Cookson, S. T., Holmes, C. E. M., De, C., Antunes, M. D., De Melo Filho, D. A., Lyra, T. M., Barreto, C. S. V., Azevedo, S. M. F. O., & Jarvis, W. R. (1998). Liver failure and death after exposure to microcystins at a haemodialysis center in Brazil. *N. Engl. J. Med.* 338 : 873-878.
- 2) World Health Organization, Rolling Revision of WHO guidelines for Drinking water Quality, Report of Working Group Meeting on Chemical Substances for the Updating of WHO Guidelines for Drinking-water Quality. Geneva, Switzerland, 22-26 April 1997.
- 3) Sano, T., Nohara, K., Shiraishi, F. & Kaya, K. (1992) A method for micro-determination of total microcystin content in water-blooms of cyanobacteria (blue-green algae). *Int. J. Environ. Anal. Chem.* 49 : 163-170.
- 4) Kaya, K. & Sano, T. (1999) Total microcystin determination using erythro-2-methyl-3-(methoxy-d3)-4-phenylbutyric acid (MMPB-d3) as the internal standard. *Analyst. Chim. Acta* 386 : 107-112.
- 5) Harada, K., Ogawa, K., Matsuura, K., Murata, H., & Watanabe, M. F. (1990) Structural determination of geometrical isomers of microcystin-LR and -RR from cyanobacteria by two-dimensional NMR spectroscopic techniques. *Chem. Res. Toxicol.* 3 : 473-481. Tsuji, K., Naito, S., Kondo, F., Ishikawa, N., Watanabe, M. F., Suzuki, M., & Harada, K. (1994) Stability of microcystins from cyanobacteria: effect of light on decomposition and isomerization. *Environ. Sci. Technol.* 28 : 173-177. Tsuji, K., Naito, S., Kondo, F., Ishikawa, N., Watanabe, M. F., Suzuki, M., & Harada, K. (1995) Stability of microcystins from cyanobacteria: effect of UV on decomposition and isomerization. *Environ. Sci. Technol.* 28 : 173-177.
- 6) Kaya, K., & Sano, T. (1998) A photodetoxification mechanism of the cyanobacterial hepatotoxin microcystin-LR by ultraviolet irradiation. *Chem. Res. Toxicol.* 11 : 159-163.

医療における薬物分析

Therapeutic Drug Monitoring から派生した基礎的研究 (V)

産業医科大学病院 薬剤部科長 薬学博士 江藤 精二

I. はじめに

前回は「Pseudo-Bartter 症候群を呈した患者尿からのフロセミド検出」および「膠原病患者における副腎皮質ホルモン剤血中濃度測定」について触れ、臨的には多少特殊な Therapeutic drug monitoring (TDM) について紹介した。今回は、TDM が臨床的にも極めて有用とされる MRSA 用抗生素と、腎機能正常者とは異なった薬物の体内動態を示す腎透析患者における TDM について紹介する。

II. MRSA 用抗生素の投与設計における薬物血中濃度測定

1. MRSA について

MRSA (メチシリン・セフェム耐性黄色ブドウ球菌) による院内感染は、新たな脅威として一時期マスコミに大きく取り上げられたことは記憶に新しい。その後、各医療機関における種々院内感染防止対策や MRSA 用抗生素の開発により、以前よりは MRSA 感染に対する防止体制が整ってきた。しかしながら、黄色ブドウ球菌のなかの MRSA 出現率は約 60% に達しており、MRSA 感染症自体は減少していない。特に、免疫能が低下した患者にとっては依然大きな脅威であることには変わりない。また、バンコマイシン (VCM)、アルベカシン (ABK) およびティコプラニンといった強力な MRSA の治療薬が認可されているにもかかわらず、これらの抗生素が適正に使用されていないことも多い。しかしながら、通常これらの抗生素は点滴静注により投与されるため、バイオアベイラビリティが 100% であり、経口剤において問題となるノンコンプライアンス (指示通り服薬しないこと) を考慮する必要がないため、投与設計は行いやすい。したがって、TDM を活用しながら MRSA 用抗生素の投与設計を行えば、極めて合理的な治療が可能である。

2. MRSA 抗生素の TDM

TDM を活用した MRSA 抗生素の投与設計は分かり易い。MRSA 抗生素を投与開始後約 3 日目、血中濃度が定

常状態¹⁾に達したときに測定する。測定ポイントは原則として、次の投与の直前と投与終了後 1 時間とする。投与直前は最低血中濃度 (トラフ値)、投与終了後 1 時間はほぼ薬効と相関する血中濃度としての最高血中濃度 (ピーク値) と考えて良い。そしてこの測定結果を基に、下表の血中濃度を指標として抗生素の投与量あるいは投与間隔を調整する。ただし、MRSA 抗生素はほとんど腎臓から排泄されるため、腎機能の程度に応じてきめ細かな投与設計が必要である。また、腎機能を考慮した投与量あるいは投与間隔を予め決定しておく必要がある。通常はクリアチニクリアランス (CLcr) の実測値か血清クリアチニン値から推定される CLcr を用い初期投与設計を行う²⁾。次に、MRSA 抗生素の投与設計に TDM が極めて有用であった症例を紹介する。

表 1. MRSA 用抗生素血中濃度の治療参考値

	トラフ値	ピーク値
バンコマイシン	5~10	25~40
アルベカシン	1~2	8~12
ティコプラニン	10~15	25~40

単位: $\mu\text{g}/\text{ml}$

【症例 1】男性患者(77歳): 急性白血病; 化学療法による好中球減少により MRSA による肺炎が発症。肺炎治療のため ABK 1回 100mg を 1 日 2 回点滴静注。しかしながら、3 日目の ABK 血中濃度はトラフ値 $0.6 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、ピーク値 $3.3 \mu\text{g}/\text{ml}$ といずれも抗菌作用を期待できない血中濃度であった(図 1)。患者は腎機能は正常であり、CLcr も $92.8 \text{ ml}/\text{min}$ と年齢のわりには高いので ABK 血中濃度が上昇しないと考えられた³⁾。そこで 1 回投与量を 200mg に増量した。その結果、図 1 に示すように ABK 血中濃度は、增量後ほぼ治療有効域を維持し、その結果肺炎は軽快した。ABK 血中濃度を測定しなければ血中濃度は治療有効域に達せず、効果が期待できない投与量を漫然と継続した可能性があった症例である。

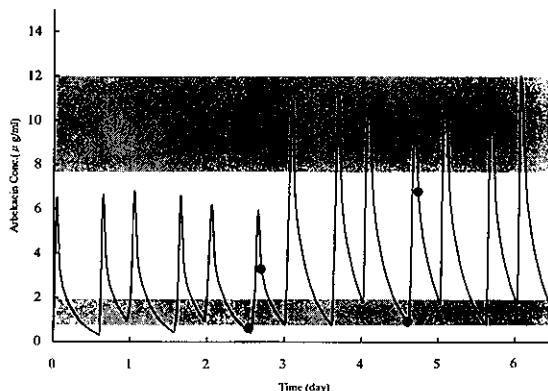


図1. 症例1におけるアルベカシン血中濃度の時間的推移

【症例2】男性患者(30歳)：MRSAによる肺炎。MRSA肺炎治療のためバンコマイシン(VCM)を初回1500mg、2回目以降1000mgを12時間毎に点滴静注。3日目にVCM血中濃度を測定したところ、トラフ値16μg/ml、ピーク値30μg/mlであり、さらに上昇傾向が認められた(図2)。この患者のCLcr値は75ml/minと少し腎機能が低下していたため予想以上に血中濃度が上昇したと思われる。そこで1000mgを24時間毎の投与に変更した。その結果、トラフ値8μg/ml、ピーク値23μg/mlが得られ、ほぼ治療有効域を維持できた。もし1回1000mgの12時間間隔投与を継続していれば、副作用が出現した可能性があった。

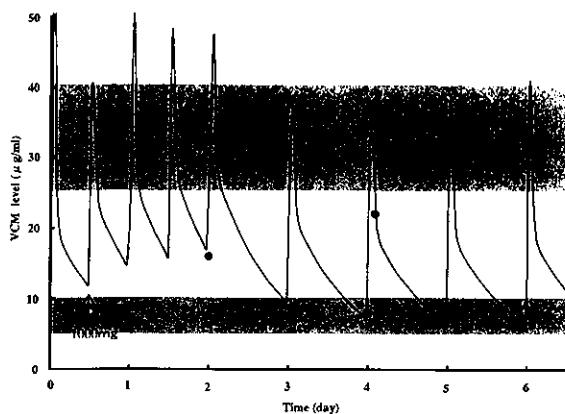


図2. 症例2におけるバンコマイシン血中濃度の時間的推移

上記2例は、血中濃度を測定することによって適正な投与法に修正できた症例である。しかしながら未だ、

MRSA用抗生素のTDMが十分に臨床の現場で活用されているとは言い難い。今後さらにMRSA抗生素のTDMを普及させる必要性を感じている。

III. 透析患者における薬物血中濃度測定

1. 透析患者における薬物体体内動態

腎不全患者では薬物の体内動態が変動しやすい要因が生じる。その中でも重要な要因として蛋白結合率の変動が挙げられる。特に血漿蛋白の中で最も重要なアルブミンとの結合率が、多くの薬物で低下することが知られている。その代表的な薬物として、抗てんかん薬であるバルプロ酸とフェニトイン、また血栓塞栓症予防・治療薬であるワーファリンがある⁴⁾。蛋白結合率が低下する原因としては、血漿アルブミンの低下、尿毒性物質によるアルブミンの薬物結合部位における競合的阻害、アルブミン自体の結合能の低下、等が考えられているが未だ明らかではない⁵⁾⁶⁾。さて、一般的には蛋白結合率が低下するとトータルの薬物クリアランスが増大し、薬物の総濃度は低下する。しかしながら、薬理作用に関与するアルブミンと結合していない遊離型血中濃度はほとんど変化しないか、患者の生理的状態によっては上昇する場合もある。したがって、総濃度が低下したということで投与量を増やすと、予期せぬ副作用が生じることがある。図3は維持透析適用の腎不全患者と腎機能正常なてんかん患者におけるフェニトインの総濃度と遊離型濃度の関係を示している。このように、腎不全患者では腎機能正常者よりも遊離型分率が高く、総濃度は同じでも遊離型濃度は約2倍となるので注意が必要である。すなわちフェニトインのように、蛋白結合率が高い薬物では、総濃度

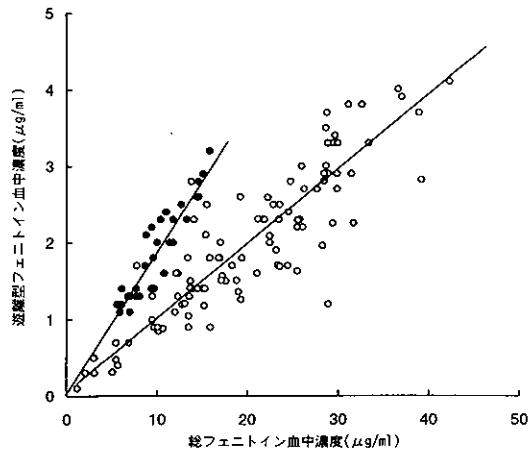


図3. 血液透析患者(●)と腎機能正常患者(○)におけるフェニトインの遊離型と総血中濃度の関係

の測定だけで投与量設定を行うと危険である。このような場合、薬理作用に直接関係する遊離型濃度を測定することが望ましい。また、透析(HD)を開始した場合、HDによる血液中薬物の除去を考慮しなければならない。特に蛋白結合率が低い薬物は除去されやすく、HD後に薬物を補充する必要がある。

2. HD患者における抗てんかん薬遊離型血中濃度測定の有用性

一般的に水溶性の高い薬物あるいは蛋白結合率が低い薬物はHDにより血液から除去されやすい。また、分布容量が大きい薬物（一般的に脂溶性が高い）は人体の組織に分布しやすいためHDによる除去率は低くなる。主

な抗てんかん薬と蛋白結合率など薬物動態パラメータを表2に示しているが、この中でフェノバルビタール(PB)とゾニサミド(ZNS)はHDにより除去されやすい。フェニトイン(PHT)やバルプロ酸(VPA)は蛋白結合率が高いため除去されにくいが、腎不全患者では腎機能正常者よりも蛋白結合率が低下している。このため、透析能が高いハイパフォーマンス膜を使用したダイアライザ（透析器）では予想以上に遊離型血中濃度が低下することがある⁷⁾。次に紹介する患者はHD中に服用中の抗てんかん薬血中濃度が急激に低下したため、HD中にけいれん発作を生じた症例である。

表2. 主な抗てんかん薬の体内動態パラメータとHDによる除去

抗てんかん薬	蛋白結合率 %	分布容量 L/kg	HDによる除去	治療有効域(総濃度) μg/ml
フェニトイン(PHT)	90	0.7	腎機能正常者：-	腎機能正常時：10-20
			腎不全患者：+	腎不全患者：5-10 遊離型として：1-2
バルプロ酸(VPA)	93	0.22	-*	30-100
カルバマゼピン(CBZ)	74	1.4	+	4-10
ゾニサミド(ZNS)	55	1.6	++	10-40
フェノバルビタール(PB)	51	0.54	++	10-25

*バルプロ酸は腎不全患者の透析においては多少透析される。しかし、投与量の変更の必要はないといわれている

【症例】慢性糸球体腎炎による腎不全のため維持HD中の50才台女性。症候性てんかん治療のためPHT300mg, PB60mg, ZNS200mgを服用していた。HD中に全身性けいれん発作を生じ、この原因としてHDによる抗てんかん薬の血液からの除去が考えられた。また、非HD日にはてんかん薬による副作用と思われる傾眠および運動失調が出現していた。そこでPHT, PB, ZNS総血中濃度およびPHT遊離型血中濃度をHDの前後および非HD日に経時的に測定し、てんかん発作をコントロールするための投与設計を企図した。ダイアライザはPS-1.3UW(ポリスルファン膜、膜面積:1.3m², UFR:45.0ml/mmHg·hr)を使用した。PHT遊離型濃度は、血清分離後直ちに限外濾過法にて遊離型を分離し、総濃度とともに蛍光偏光イムノアッセイで測定した。PBおよびZNS血中濃度はHPLC法により定量した。その結果、HDによりPHT総濃度の低下は20%であったが、遊離型濃度は約50%低下していることが判明した(図4)。またPBおよびZNS濃度はHDにより約1/3に低下しており、HD中のてんかん発作は抗てんかん薬血中濃度の低下によると考えられた(図5)。また、非透析日における傾眠傾向はPHT遊離型濃度の上昇が原因と考えられた(図4)。そこで、PHT

単剤による治療を基本方針とし、傾眠傾向を改善するため定期的な経口投与量を減らし、HD中の発作予防のためHD中にPHT補充療法を行うこととした。補充量としてはHD前後におけるPHT血中濃度から80~140mgが推定されたので、HD中の補充量を125mgとしてHD開始時より2時間点滴静注した。なお、PHTの経口投与量は1日200mgとした。その結果てんかん発作は消失し、傾眠傾向も著明に改善した。しかしHD前PHT遊離型濃度が発作時血中濃度(1.2μg/ml)レベルだったため、経口投与を250mg(朝100mg、夕150mg)に増量した。これにより、HD前のPHT遊離型濃度が1.7μg/ml、HD後1.5μg/mlとなった(図6)。また、非透析日の夕食前が2.0μg/mlとなり、てんかん発作および副作用も認められなくなったため退院となった。なお、PHT遊離型としての治療有効域は1~2μg/mlといわれているが、この症例はこの指標が有用であった。従来より、PHTは透析性が乏しいため補充投与する必要はないといわれているが、この症例のように遊離型濃度が著しく低下する場合には、PHTの補充投与が必要である。また、腎不全患者においては薬物の総濃度よりも遊離型濃度の方が投与設計に有用であることを示している。

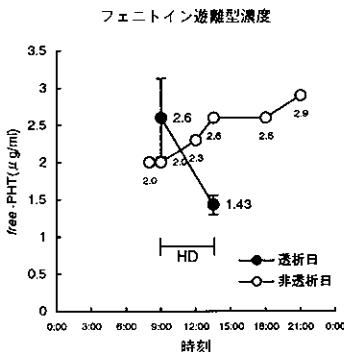
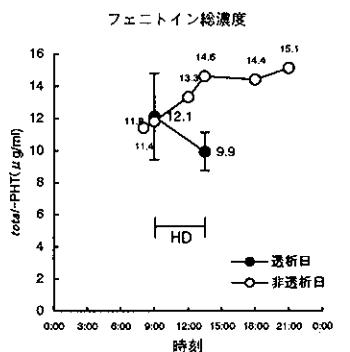


図4. フェニトイン300mg経口投与による非透析日と透析前後のフェニトイン血中濃度の変動
○：非透析日、●：透析日（透析は9時～13時までの4時間）

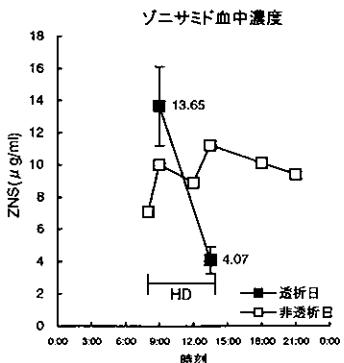
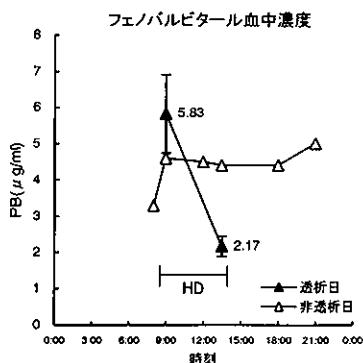


図5. フェノバルビタール60mgおよびゾニサミド300mg経口投与による非透析日と透析前後の総血中濃度

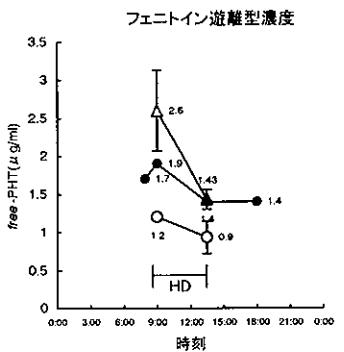
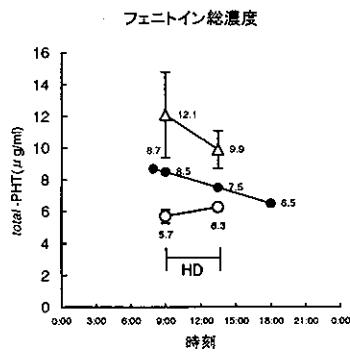


図6. HD前後におけるフェニトイン総濃度および遊離型濃度の変化
△: フェニトイン300mg経口投与
●: 経口投与250mgおよびHD開始時より125mg点滴静注(点滴時間2時間)
○: 経口投与200mgおよびHD開始時より125mg点滴静注

IV. あとがき

これまでTDMの臨床的有用性について述べてきたが、TDMが単に血液や尿中の薬物濃度を測定するだけでは本来の目的を十分に達成できないことを再度強調したい。薬物濃度を測定し、その結果の薬物速度論的解析と臨床的見地からの判断が的確に融合した時、副作用を最小限に抑え期待する薬効を最大限に引き出すことが可能となる。

References

- 1) 薬物を一定の規則で服用した場合に一定の血中濃度変化を維持するようになった状態: 薬物の消失半減期の4~5倍の期間で定常状態に達する。
- 2) G. R. Matzke, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 25, 433-437 (1984).
- 3) CLcrの正常値は80~120mL/min; 通常加齢と共に低下する。
- 4) M. M. Reinberg and M. Affrime, *Ann. NY Acad. Sci.*, 226, 115(1973).
- 5) A. Rane, et al., *Clin. Pharmacol. Ther.*, 24, 199(1978).
- 6) 馬淵非砂夫, 他, 透析会誌, 24, 295(1991).
- 7) 従来の膜よりも孔径の大きい合成高分子膜で、中分子量物質(500~5000dalton)や小分子量蛋白分子などの除去能に優れている。

魚の寄生虫の話（その1）

皮膚と鰓の機能形態

千葉県衛生研究所 医学博士 福田芳生

1. はじめに

読者の皆さんの中には、今迄に全く魚を飼ったことがないという方は、極く少ないのでしょうか。水槽の中をゆったりと泳ぐ魚を眺めていると、なぜか心が和んで来ます。精神科医はそれをアニマルセラピーと呼んでいます。

でも、水槽の水換えを怠ると、魚はたちまち元気を失ない、白い腹を見せて水面に浮くことになります。それは水中の有害な細菌、真菌、寄生虫等が勢いを増して、魚体に取り付き悪さを始めた事と大いに関連があります。一方、自然界では川や湖に様々な環境汚染物質が流入したり、pHや水温の急激な変化、渴水といった異常事態に陥ることも珍らしくありません。

魚の方も深刻な影響を受け、ひどく弱わります。その結果、上述の水槽内で繰り広げられる魚の微生物・寄生虫病が大きなスケールで展開されます。

このシリーズでは、特に魚の寄生虫とその障害について取り上げることにします。寄生虫と一口に言っても、そこにはかなりの種類があります。主要なものは原虫類、吸虫類、線虫類、甲殻類など、実に多彩な顔ぶれです。

それらの寄生虫は魚の体内深く侵入するものもありますが、大部分のものは表皮、呼吸器の鰓を主要な生活の場としています。そこで、手始めに魚の表皮と鰓の構造及び機能について述べることにします。事件が起きた時、よくその現場の状況を調べよと言われています。魚の表皮と鰓は、正に寄生虫病の事件の現場と申せましょう。

2. 表皮の構造と機能

表皮層起源の魚の鱗

筆者はよく人から、「福田先生、魚の鱗はヘビやトカゲの鱗と同じものでしょうか」と尋ねられることがあります。そこには違うはずがないじゃないかという自信すら感じられます。それで、「とんでもない、全く別物です」と答えようものなら、実に意外そうな顔をします。

そこで、カバ焼きにする前のウナギの表皮断面を光学

顕微鏡で観察してみましょう。厚さ100ミクロン前後の表皮の下側に、何やら薄く細長い物体が見えます。それが鱗なのです。英語で鱗のことをスケールと言います。ですから鱗の周囲にある隙間を指してスケールポケットと称する訳です。この鱗の存在する部分を真皮と呼び、上側の表皮と区別しています(図1のa)。

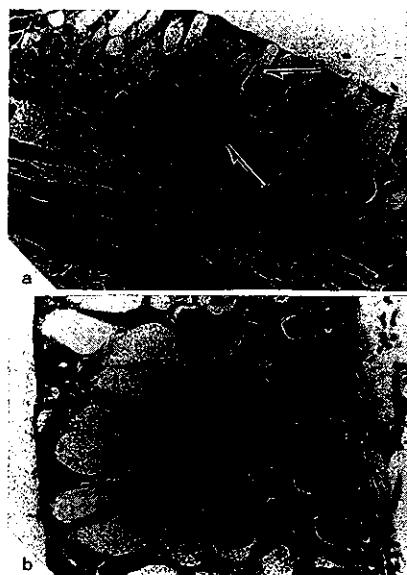


図1.

ウナギの表皮断面。aは低倍率の光学顕微鏡像で、写真上方に表皮細胞層が見える。その下側は真皮層である。表皮細胞層の真下にある長方形の物体は鱗で、スケールポケットに収まっている。上方の矢印は粘液分泌細胞、下方の矢印は棍棒状細胞。bは表皮細胞層の一部を拡大して示す。写真左が表皮表層である(aは100倍、bは200倍)。

これで御分かりのように、魚の鱗は真皮層越源ですから、怪我でもしない限り、決して体表に露出することが

ありません。一方、ヘビやトカゲの鱗は表皮最表層の角化層に端を発しています。従って鱗はいつも体表に露出しています。かように、魚の鱗は、ヘビやトカゲなどの爬虫類の鱗とは、全く起源が異なっています。

さて、魚の表皮細胞層のどこを探しても、角化層がありません。それは魚の表皮の持つ大きな特徴と申せましょう。表皮中に長楕円形の明るい細胞が多数並んでいて、その先端部が表皮表面に開口しています(図1のa, b)。それは粘液分泌細胞です。PAS染色という、粘液多糖類を特別に染め出す染色を施した時、赤く染って来ます。その内容物が唾液に溶ければ、グリコーゲンが含まれていることになります。

表皮細胞層の下位に小さな立方形の細胞が隙間なく並列し、基底膜に接しています。この立方形をした細胞列の上方に、オタマジャクシあるいは棍棒状とも言うべき、奇妙な形の細胞見えます(図1のa, b)。動物学者は、それを棍棒状細胞と呼んでいます。先述の明るい粘液分泌細胞と違って、ひどく暗い感じがします。細胞内容物はタンパク質に富んだ密度の高い物質からなっています。

指紋様構造の働き

この両分泌細胞の機能についてお話しする前に、表皮最表層表面は一体どんな構造をしているのかちょっと覗いてみましょう。魚の表皮を電子顕微鏡に掛けると、画面に私達の指先さにある指紋によく似た複雑な紋様(正確には隆起線)が浮び上って来ます。それは指紋様構造(フィンガープリントライク・パターン)と呼ばれるもので、それぞれ指紋様構造は多角形の縁取りで区切られ、独立しています。それは個々の表皮細胞の自由面ということになります(図2)。



図2.

淡水魚モツゴの表皮表面の指紋様構造を示す電子顕微鏡像。硬骨魚の表皮には種類を問わず、このような指紋様構造が存在する(図中のUはミクロンを表す)。

イギリスの魚類組織学者マリー・ホワイトアーヴィーは、この指紋構造について丹念に調べ、指紋の隆起線の周囲に付着する繊細な糸状の物質に着目しました。そして、この糸状の物質は表皮最表層の細胞による恒常的な分泌物であること。指紋様構造の複雑な隆起線は、分泌物を細胞表面に止め置くための装置なのだと結論しました。

水中で生活する魚は、表皮細胞表面の糸状物質のお蔭で、水が体表に密着することはありません。そんな訳であんなにスムーズに水中を泳ぐことができるのです。今から28年ほど以前、日本はオイルショックに見舞われ、大混乱に陥りました。その時、巨大タンカーの外壁にヌルヌルした膜状の物質を塗り付けたところ、船のスピードが上って、油代がかなり節約できたそうです。このヌルヌルした膜状物質は、魚体表面の糸状物質と同じ効果を発揮したという訳です。

更に魚では、皮膚表面に水カビや有害な細菌類が付着するのを阻止する働きがあるそうです。

粘液分泌細胞と棍棒状細胞の機能

魚の生息する河川や湖沼に水銀化合物や農薬が流入したり、急激な塩分濃度やpHの変化が起こった際、魚の表皮中の粘液分泌細胞から大量の粘液を放出し、体表を厚く覆います(図3)。それは有害な化学物質や水質の変化(悪化)から魚体を護るために自衛策なのです。魚にしてみれば、これでひと安心ということになります。でも、糖類を含んだそれらの粘液物質は70時間以上経過すると変質し始め、有害な細菌や真菌、寄生性原虫にとって恰好の栄養源に変身します。

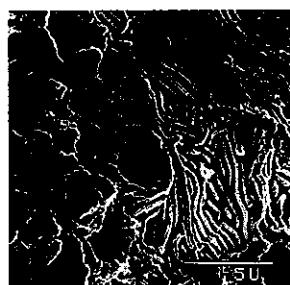


図3.

急激なpHの変化に遭遇し、表皮中の粘液分泌細胞より一斉に大量の粘液を放出したボラ。写真下方の円形の窪みは粘液腺の開口部(図中のUはミクロンを表す)

筆者の調べたカムルチーの稚魚では、水質の悪化によって放出された粘液を培地にして、表皮表面で滑走菌フレキシバクター・カラムナリスが大増殖し、表皮の一部が重篤な壊死に陥っていました。そのため真皮層の鱗が露出し、その鱗表面にも高密度のフレキシバクターの集落が観察されました(図4のa, b)。

表皮細胞層の深部に位置する棍棒状細胞も分泌腺の一

種ですが、その内容物は先述のように粘液細胞とは比較にならないほど稠密です。この棍棒状細胞は魚の表皮が何等かのアクシデントが因で傷を取った時、初めて顔を出します。そして、細胞の内容物が水中に溶け出します。その溶解物中には、肉食動物の避忌物質（アラーム・サブスタンス）が含まれていて、傷付いた魚に接近して来る外敵を追い払う働きをします。

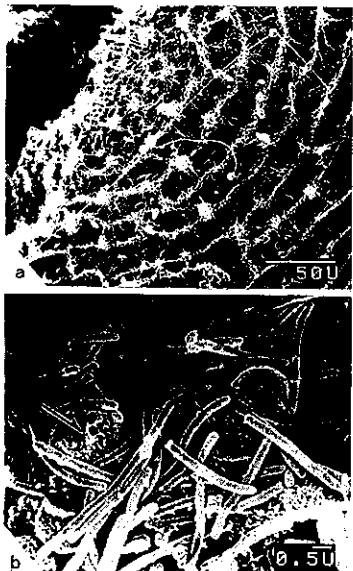


図4.

滑走菌フレキシバクター・カラムナリスに犯され、表皮細胞が壊死に陥り、鱗の露出した例。aは同心円を描いて走る鱗の隆起表面に形成された滑走菌フレキシバクターの集落を示す。bはフレキシバクターを拡大して示す。糸状の細菌の間に遊走細胞（矢印）が見える（図中のUはミクロンを表す）。

3. 鰓の構造と棍棒化

呼吸の中心は二次鰓弁

魚の頭部を外側から見ると、吻部上方に1対の鼻孔、その後方にこれも1対の目玉、そして可動的な半円形の鰓蓋があります。この鰓蓋を解剖鋏で切除してみましょう。すると、内部に5対の鰓弓が姿を現します（図5のa）。鰓弓の前4対には、鮮紅色の鰓弁が下垂しています。各鰓弁には、その両側に二次鰓弁あるいは鰓薄板と呼ばれる、薄い葉状の突起が交互に並んでいます（図5のb、図6のa,b）。

鰓弁の中心部には支柱の役目を負う硝子様軟骨があり

ます。葉状の二次鰓弁は、その両面を1~2層のひどく扁平な呼吸上皮に覆われています（図6のc）。魚は、この呼吸上皮を介してガス交換を行います。鰓の呼吸上皮は

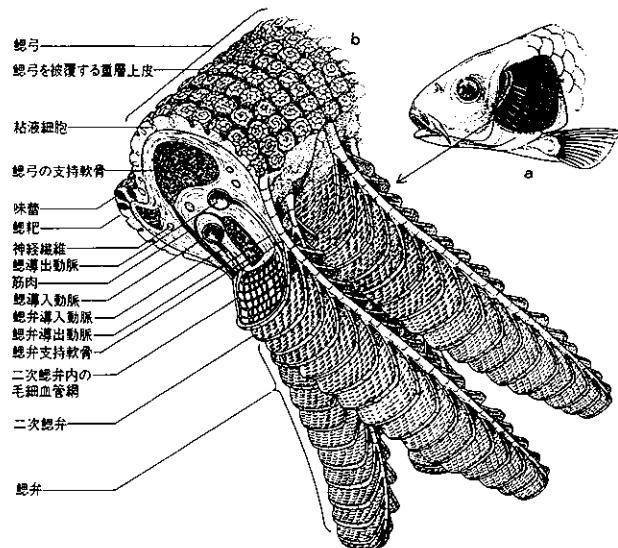


図5. コイの鰓の構造

aは鰓蓋を除去して、内部の鰓列を示す。bは鰓弓より下垂する鰓弁と二次鰓弁（福田、1990による）。

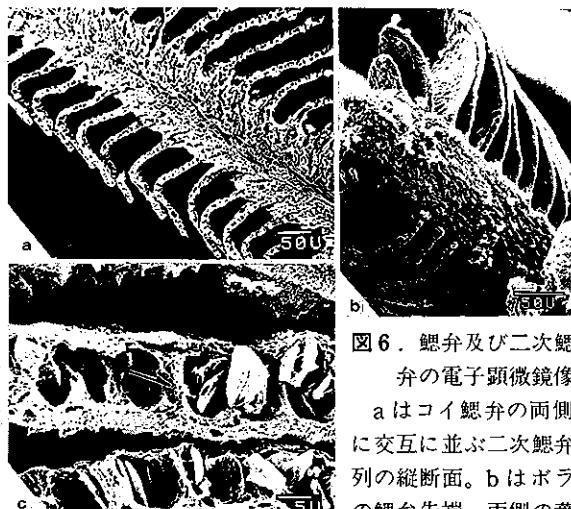


図6. 鰓弁及び二次鰓弁の電子顕微鏡像

aはコイ鰓弁の両側に交互に並ぶ二次鰓弁列の縦断面。bはボラの鰓弁先端。両側の葉状の突起は二次鰓弁。cはコイの二次鰓弁断面の拡大。中央の毛細血管腔外側に扁平な呼吸上皮がある。矢印は柱細胞（図中のUはミクロンを表す）。

私たちの肺胞上皮に近い構造をしています。では、魚を陸に上げると、なんで間もなく死んでしまうのでしょうか。

それは各二次鰓弁がべったりと重り合ってしまい、ガス交換ができないくなるからです。その様子は、例えば水に濡れた辞書のページが容易にめくれなくなるのと似ています。呼吸上皮の内側には、繊細な毛細血管網のネットワークが発達しています。それらの毛細血管網の間に多数の伸縮性に富んだ柱細胞(ピラーセル)があり(図6のc), 血液流量を調節しています。この柱細胞は血管内皮の変型したものであることが、発生学的な研究により確認さ

れています。

鰓の棍棒化

このような鰓は水中に混入した様々な環境汚染物質に接触し、障害を受けます。急性中毒の場合は、二次鰓弁の呼吸上皮の部分に激しい炎症や出血、浮腫が観察されます。一方、微量の化学物質に長期間に亘って曝露されたものでは、呼吸上皮が本来の厚さの3~4倍になったり、二次鰓弁基部上皮が異常な増殖に陥り、遂に二次鰓弁の隙間を埋め尽します(図7a, b, c)。

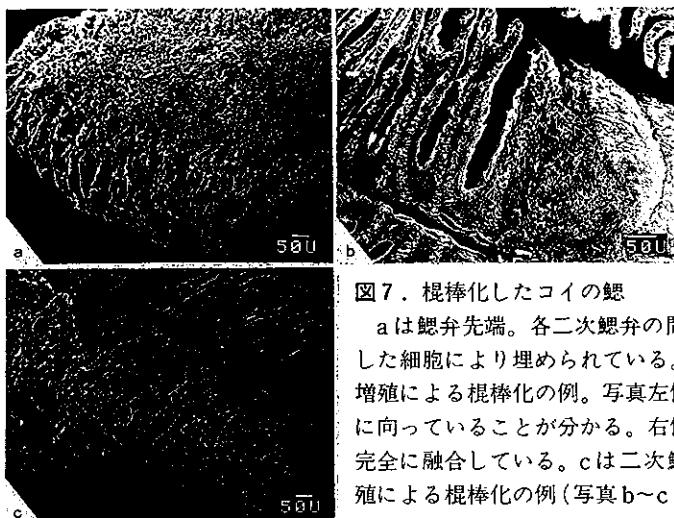


図7. 棍棒化したコイの鰓

aは鰓弁先端。各二次鰓弁の間隙は異常に増殖した細胞により埋められている。bは呼吸上皮の増殖による棍棒化の例。写真左側では徐々に融合に向っていることが分かる。右側の各二次鰓弁は完全に融合している。cは二次鰓弁基部上皮の増殖による棍棒化の例(写真b~cはいずれも鰓弁縦断面。図中のUはミクロンを表す)。

そのような状態の鰓は、元来分離しているはずの二次鰓弁が融合しているので、個々の鰓弁の様子はゴツゴツした棍棒に似ていると申せましょう。そこから、鰓の棍棒化という学術用語が生まれました。それは、魚の重要な呼吸器官である鰓を、有害な環境汚染物質から護るために防衛的な反応なのです。

しかし、それは魚にとって良い事ばかりではありません。棍棒化したために、鰓の呼吸面積の著しい減少が起

こり、ガス交換の効率が低下します。そして、鰓の棍棒化に伴う異常な増殖細胞は、病原菌や寄生虫のよい栄養になります。

このように前記の表皮に見る粘液分泌能の亢進や鰓障害は、その多くが水質汚染に端を発していることを忘れてはなりません。寄生虫の舞台背景の説明はこの辺で切り上げて、次回では、いよいよ本題の魚の寄生虫、それも原虫類についてお話ししましょう。

粘液とムチン

—生化学的にみた消化管粘液の性状—

関東化学株式会社 技術・開発本部 伊勢原研究所 所長 栗 原 誠

1. はじめに

消化管は経口的に侵入してくる病原体や有害な異物の侵襲を防ぎながら、個体の生命維持に必要な物質を選択的に吸収するといったきわめて重要な機能を果たしている。もっぱら食物の消化吸収をつかさどる胃と腸では、機能的に高度に分化した上皮細胞で被覆された粘膜が形成され、この粘膜が隔壁となって消化酵素の分泌、栄養素の吸収など、外環境と積極的に交流している。粘膜の表面には粘液とよばれる分泌物が存在し、粘膜を覆っている。粘液は粘膜の第一線の防御バリアであり、また、分泌や吸収の機序を考える上でも見過ごしてはならない存在である。

粘液は90%以上が水分で、剥離した上皮細胞の成分としてのタンパク質、核酸、脂質および電解質などを含むが、主要な成分はムチンとよばれる特殊な構造をもつ糖タンパク質である¹⁾。また、粘液は、胃、小腸、大腸、あるいは胃の部位ごとに特徴的な性格を示すが、粘液の性格はこれに含まれるムチンの性状を反映しており、ムチンの分子種によって特徴づけられている²⁾。

当研究所では、北里大学医学部の堀田恭子教授(現在、同大名誉教授)、同医療衛生学部の石原和彦教授、並びに、信州大学医学部の勝山努教授にご指導頂きながら、ムチンに対するモノクローナル抗体の開発を通して、主に消化管粘液の研究にかかわってきた。本稿では、先ず生化学的にみた消化管粘液の性状について概説する。次稿以降、抗ムチンモノクローナル抗体の開発および病態変化と粘液(ムチン)の性状との関係に触れ、我々が取り組んでいる消化管粘液研究の今後の展望について考察したい。

2. 粘液の概要

消化管の粘液は、粘膜に無数に存在している粘液産生細胞で合成され、いちど細胞内の粘液顆粒に貯えられた後、分泌される。分泌された粘液はゲル状となって粘膜表面を広く覆うと共に、可溶化されて消化管内腔に存在する。粘液は粘膜表層の潤滑性を保ち、摂取した食物を

包み込んで混和し、消化を助ける作用や、厚い粘液ゲル層を形成して粘膜の損傷を防ぐ作用がある。また、粘液は種々の病態変化や生理的変化に対していち早く反応し、質的または量的に変化することが、多くの組織化学的、生化学的な研究成果から明らかにされている^{1,3,4)}。

粘膜表面に形成される粘液ゲル層は90%以上が水分で、残りの大部分はムチン(粘液糖タンパク質)とよばれる特殊な構造をもつ糖タンパク質である。ムチンは2%以上の濃度になると粘度が急激に上昇し、5%以上で安定なゲルを形成する性質をもつ⁵⁾。粘液ゲル層にはその他に酵素、核酸、剥離した上皮細胞由来物質、血漿タンパク質、分泌型IgA、脂質、バクテリアとその分解物、電解質などが含まれるが、ゲル形成にはムチン以外の成分はほとんど関与していない⁶⁾。

防御因子としての粘液の働きはそれぞれの産生分泌器官ごとに異なっているが、そのもっともよい例は胃にみられる。胃粘膜からは常に消化酵素であるペプシンと塩酸が分泌されているが、胃粘膜表層を覆う粘液ゲル層はこれら胃自らが作り出す傷害因子に対して第一線の防御能を発揮している。事実、胃粘液ゲル層は内腔から細胞表面にかけてpH2前後からpH7付近にいたるpH勾配が形成されており^{7,8)}、粘液ゲル層は胃内腔から侵透してくる水素イオンと表層細胞から分泌される重炭酸イオンの中和の場になっている。また、胃のムチンには水素イオン侵透遅延能⁹⁾や抗ペプシン作用¹⁰⁾があることが実験的に証明されている。

3. ムチンの概要

上述したように、粘液を構成するもっとも主要な成分はムチンである。その形態は電子顕微鏡による観察から200~4000nmの多様な纖維構造をとっていることが明らかにされている¹¹⁾。ムチンの生化学的な特徴はHilkensの定義を借りれば以下のようにまとめることができる¹²⁾。

- 1) 分子量300Kda以上の高分子量の糖タンパク質である。
- 2) 中心タンパクのアミノ酸組成はセリン(Ser)、トレオニン

(Thr), プロリン(Pro)が多く、これら3つで全アミノ酸の半分近くを占める。この他にアラニン(Ala), グリシン(Gly)なども多いが、芳香族アミノ酸は少ない。3) O-グリコシド結合を介してSer, Thrに多数の10糖前後あるいはそれ以下の比較的短い糖鎖が結合し、これらが糖タンパク質全重量の50~80%を占める。4) 上皮細胞の頂端部に局在している。5) CsCl溶液を用いた平衡密度勾配遠心において、プロテオグリカンと通常の血清型糖タンパク質の中間的な密度を示す(1.4~1.5 g/mL程度)。

では、ムチンはどのような分子構造をとっているのであろうか? 1984年、物理化学者の CarlstedtとSheehanはブタの胃粘膜から分子量4,500万もの未分解のムチンを分離し、ムチン分子のモデルを提唱した¹³⁾。このムチ

ンはタンパク質のジスルフィド結合を還元することによって分子量200万~300万のサブユニットとなり、さらに、タンパク分解酵素で完全に分解すると分子量30万~40万の最小単位(モノマー)になる。この結果から、サブユニットは糖鎖が密に結合した部分と糖鎖をもたない部分をもつ1本のポリペプチド鎖からなり、サブユニット間はポリペプチド末端と末端がS-S結合で直列に並び、ひと塊となってコイルを形成している、と推定した(図1)。現在、このランダムコイルモデルがムチンの高次構造を示すものとして信じられており、広く採用されている。なお、ムチンのゲル形成能は、ムチンを還元処理してサブユニットにしたり、タンパク分解酵素によってモノマーの単位まで分解すると著しく低下する。

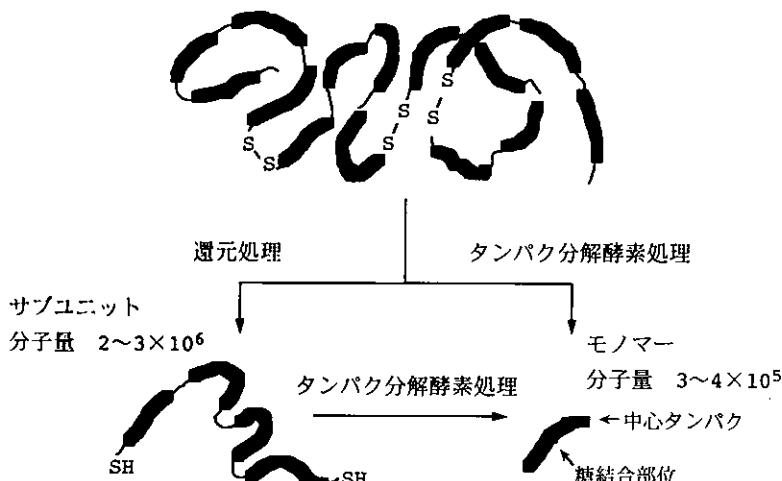
ムチン分子量 4.5×10^7 

図1. 胃ムチンの重合構造

4. ムチンの中心タンパク部分の構造

ムチンのペプチド部分の最大の特徴は、SerとThrで全アミノ酸残基数の30%以上を占め、さらにProを多く含む特殊な組成を有していることである¹²⁾。最近では、遺伝子工学的手法を用いてムチンのペプチドの一次構造の解析が行われ、いくつかのアミノ酸配列が明らかになってきた。現在報告されているヒトムチン型糖タンパク質のペプチド部分はその繰り返し構造の特性によって、少なくともMUC1からMUC8という9種類¹⁴⁾(表1)、さらに、ごく最近の報告(MUC9¹⁵⁾, MUC11¹⁶⁾, MUC12¹⁶⁾を含めると12種類に分類されている¹⁷⁾。これまでにMUC

1型, MUC2型, MUC7型の3種類のムチンのペプチド部分の全一次配列が報告されている^{18~20)}。このうちMUC1は細胞膜結合型ムチン、MUC7は分泌型ムチンのペプチドであると考えられており、いずれのムチンもゲル形成能は有さないと推定されている。一方、ヒト腸由来のMUC2型のムチンはゲル形成性ムチンの代表的なものと考えられ、中心タンパクは特徴的な一次構造をとっている。

MUC2の繰り返し配列部分はThrを14残基とProを5残基含む23残基のアミノ酸からなり、ここでのThr残基に糖鎖が密に結合していると考えられる。この繰り返し部分

のN末端側には、やや規則性を欠く繰り返し配列をはさんで550残基程度のアミノ酸が、C末端側にも同程度のアミノ酸が結合している。この両端のペプチド領域には、それぞれシステイン(Cys)を複数残基含む領域があり、ここでS-S結合することによってゲルを形成する高次構造をと

っていると考えられる。ヒト胃ではMUC5AC型、MUC6型の2種類のムチンがあり、いずれも全一次配列は明らかになっていないが、前者は胃粘膜の表層に局在する表層粘液細胞由来、後者は胃腺の深部に局在する腺粘液細胞由来ムチンのペプチドであると考えられている²¹⁻²⁴⁾。

表1. ペプチドの繰り返し構造によるヒトムチンの分類¹⁴⁾

ムチン	繰り返し構造部分のアミノ酸配列(アミノ酸数)	主要な発現部位
MUC1	PDTRPAPGSTAPPAHGVTSA (20)	乳腺、肺臓
MUC2	PTTTTPTTTTPTPTPTGTQ (23)	小腸、大腸、気道
MUC3	HSTPSFTSSITTTETTS (17)	小腸、大腸、胆嚢
MUC4	TSSASTGHATPLPVTD (16)	大腸、気道
MUC5AC	TTSTTSAP (8)	胃、気道
MUC5B	SSTPGTAHTLTVLTTTATTPTATGSTATP (29)	気道
MUC6	SPFSSTGPMATSFQTTTYPTPSHPQTTLPTHVPPFSTSLLVTPSTGT-VITPTHAQMATSASIHSPTGTIPPPPTLKATGSTHTAPPMTPTSGTS-QAHSSFSTAFTSTSLHSHTSSTTHHPEVTPSTTTITPNPTSTGTSTP-VAHTTSATSSRLPTPFTHSPPTGS (169)	胃、胆嚢
MUC7	TTAAPPTPSATTPAPPSSSSAPPG (22)	唾液腺
MUC8	TSCPRPLQEGLPGSRAAHALSRRGHRVHELPSSPGGDTGF (41)	気道

5. ムチンの糖鎖部分の構造

ムチンを構成する糖部分はムチンの全重量の50~80%を占めるが、糖の種類としてはN-アセチルカラクトサミン(GalNAc), N-アセチルグルコサミン(GlcNAc), ガラクトース(Gal), フコース(Fuc), そしてシアル酸の5種類にはほぼ限定される。これらの糖が数個からせいぜい20個程度の糖鎖として中心タンパク(コアタンパク)のSer/Thrの多い繰り返し構造部分に密に結合し、タンパク分

解酵素がペプチド部分を攻撃できないようなクラスターを形成したり、ムチン分子全体の3次元的な構造の保持に寄与していると考えられる。糖鎖は枝分れのある複雑な構造のものが多く、おそらく数100種類にもおよぶ糖鎖があると考えられるが、いずれの糖鎖もその根元の部分(還元末端)に α -GalNAcをもち、中心タンパクのSer/Thrの水酸基とO-グリコシド結合によって結ばれている。中心タンパクとの結合部位のGalNAcを含む2~3糖の

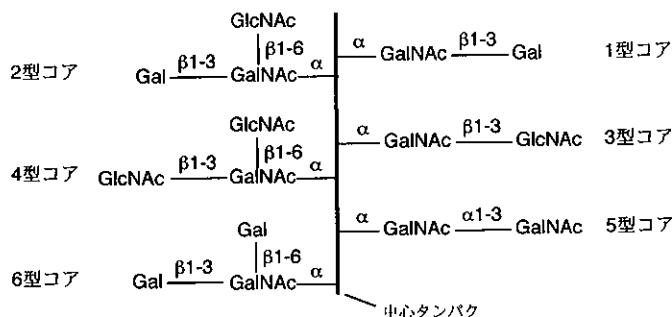


図2. ムチン型糖鎖のコア構造

部分は糖鎖コア部分とよばれ、今までのところ 6 種類に分類されている(図 2)。ここでは Gal, GlcNAc または GalNAc がいずれも β 結合によって還元末端の GalNAc の 3 または 6 位に結合し、糖鎖の根元の部分を形成している。それに続く部分は骨格部分(backbone)とよばれ、Gal と GlcNAc が直線的にまたは枝分かれして交互に β 結合して連結し、糖鎖伸長部分を形成している。さらにその先に Fuc, Gal, GalNAc やシアル酸が α 結合を介して結合し、糖鎖の先端の部分(非還元末端)を形成している。この部分は末端部分(peripheral region)とよばれている。ムチンの糖鎖はこのようなバリエーションのある糖鎖コア部分、骨格部分、末端部分の組み合わせによって、非常に多様な構造を生み出している²⁵⁾(図 3)。

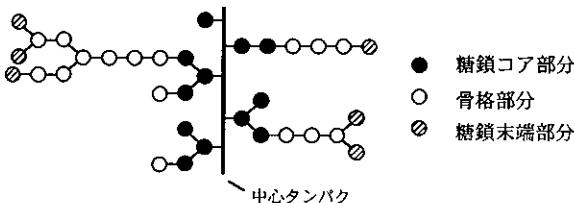


図 3. ムチンの糖鎖構造(模式図)

6. ムチン糖鎖と粘液組織化学

ムチンの糖鎖はムチン全重量の半分以上を占めており、また、ムチン分子の表面に出ていることから、ムチン分子のかなりの部分は糖鎖で覆われていると推察される。この糖鎖はムチンの分子種相互を識別するいわば顔の部分に相当しているといえる。これまで、粘液の組織化学的研究はこの顔の違いを識別する方法をさまざまな形で開発し、これらを応用して形態的にみたムチンの分布や変異等に関する情報を蓄積してきた。例えば、太田、勝山によって開発された galactose oxidase-cold thionine Schiff (GOCTS) 染色法は、galactose oxidase の基質特異性を利用して Gal/GalNAc を糖鎖末端領域にもつムチンを特異的に検出する²⁶⁾。また、Katsuyama と Spicer によって開発された paradoxical concanavalin A 染色法(PCS 法)のⅢ型では、過ヨウ素酸酸化、次いで、アルカリボロヒドリド還元後に concanavalin A レクチンと反応する糖成分をもつムチンが検出される²⁷⁾。前者は胃粘膜表層に局在する表層粘液細胞が産生するムチンと反応し、後者は胃粘膜の深層部に局在する腺粘液細胞が産生するムチンと特異的に反応することが証明されている^{26, 27)}。過ヨウ素酸酸化とアルカリボロヒドリド還元を組み合わせる手法は O-acetyl 基を有するシアル酸をもつムチンの

検出にも適用されており、このムチンは大腸粘膜の杯細胞で特異的に産生されることが明らかとなっている²⁸⁾。この他に、 α -Fuc に特異性が高い Ulex europeus agglutinin-I (UEA-I) や α -GalNAc に特異性が高い Dolichos biflorus agglutinin (DAB), α -GlcNAc に特異性が高い Griffonia simplicifolia agglutinin-II (GSA-II) などのレクチンを用いた染色法が特定の粘液細胞由来ムチンの検出に適用されている²⁹⁾。いずれの染色法も主として糖鎖末端部分に特異的な糖が局在しているか否かを判別し、ムチンの分子種の違いを可視化する手段として利用されている。

7. おわりに

粘液は粘膜防御の最前線に位置し、非常に重要な機能を果たしている。粘液の主要成分であるムチンに関する理解は1990年頃から大きく進歩し、それまであまり明確でなかった分子構造に基づく分類が可能となってきている。しかしながら、ムチンの本質は未だ解明されておらず、多くの謎を秘めている。

組織化学的にみて、消化管ではそれぞれの臓器で、または、部位特異的に固有の糖鎖をもつ様々なムチンが産生されている。これらのムチンに特異的な糖鎖の構造は、これを産生している粘液細胞の機能に対応していると考えるべきであろう。しかしながら、ムチンの構造解析はその複雑さ故に遅れており、ムチンの糖鎖構造と機能との合目的的な関係はまったくといっていいほど解明されていないのが実状である。ムチンの研究をさらに進めるためには、たとえば“モノクローナル抗体”といった特異性の高いツールを獲得することが急務であり、その開発には大きな期待が寄せられていた。

本稿では、粘液とムチンについて生化学的な側面から概説した。次稿では、われわれが開発した抗ムチンモノクローナル抗体の開発経緯といくつかの研究成果について触れたい。

参考文献

- 1) 堀田恭子、石原和彦：胃粘液の魅力を探る。メジカルビュー、東京、1999。
- 2) 勝山努、太田浩良：粘液分泌・組織化学的側面、胃—形態とその機能(川井啓市・編)、158、医学書院、東京、1994。
- 3) Neutra MR, Forstner JF: Gastrointestinal mucus : Synthesis, secretion, and function (Johnson LR ed) : Physiology of Gastrointestinal Tract, 2nd ed, Raven Press, 975, 1987.
- 4) 堀田恭子：粘液、井村、尾形、高久、他(編集)：最新内科学大系、41、胃炎、中山書店、17, 1993。
- 5) Allen A, Hutton DA, Pearson JP, et al: Mucus glycoprotein structure, gel formation and gastrointestinal mucus function. (Nugent J, O'Conner Meds) : Mucus and Mucosa, Ciba Fdn

- Sympo No. 109, Pitman Press, 137, London, 1984.
- 6) 堀田恭子, 石原和彦: 粘液分泌・生化学的侧面, 胃一形態とその機能(川井啓市・編), 166, 医学書院, 東京, 1994.
- 7) Williams SE, Turnberg LA: Demonstration of a pH gradient across mucus adherent to rabbit gastric mucosa : evidence for a "mucus-bicarbonate" barrier. Gut, 22 : 94, 1981.
- 8) Ross IN, Bahali HMM, Turnberg LA : The pH gradient across mucus adherent to rat fundic mucosa in vivo and the effect of potential damaging agents. Gastroenterology, 81 : 713, 1981.
- 9) Sarosiek J, Slomiany A, Slomiany BL : Retardation of hydrogen ion diffusion by gastric mucus constituents : effect of proteolysis. Biochem Biophys Res Comm, 115 : 105, 1983.
- 10) Takagaki YM, Hotta K : Characterization of peptic inhibitory activity associated with sulfated glycoprotein isolated from gastric mucosa. Biochim Biophys Acta, 584 : 288, 1979.
- 11) Hotta K : Mucus and mucin : fundamental aspects. (Yunoki K ed) Cytoprotection and Cytobiology, 9 : 3, Excerpta Medica, Tokyo, 1992.
- 12) Hilkens J : Biochemistry and function of mucins in malignant disease. Cancer Rev, 11-12 : 25, 1988.
- 13) Carlstedt I, Sheehan JK : Macromolecular properties and polymeric structure of mucus glycoproteins. (Nugent J, O'Conner M eds) : Mucus and Mucosa, Ciba Fdn Sympo No. 109, Pitman Press, 157, London, 1984.
- 14) Kim YS, Gum J Jr, Brockhausen I : Mucin glycoprotein in neoplasia. Glycoconjugate J, 13 : 693, 1996.
- 15) Lapensee L, Paquette Y, Bleau G : Allelic polymorphism and chromosomal localization of the human oviductin gene (MUC 9). Fert Ster, 68 : 702, 1997.
- 16) Williams SJ, McGuckin MA, Gotley DC, Eyre HJ, Sutherland GR, Antalis TM : Two novel mucin genes down-regulated in colorectal cancer identified by differential display. Cancer Res, 59 : 4083, 1999.
- 17) Hanisch FG, Müller S : MUC1 : the polymorphic appearance of a human mucin. Glycobiology, 10 : 439, 2000.
- 18) Gandler SJ, Lancaster CA, Taylor-Papadimitriou J, Duhig J,
- Peat T, Burchell J : Molecular cloning and expression of a human tumor-associated polymorphic epithelial mucin. J Biol Chem, 265 : 15286, 1990.
- 19) Gum JR Jr, Hicks JW, Toribara NW, Siddiki B, Kim YS : Molecular cloning of human intestinal mucin (MUC 2) cDNA. J Biol Chem, 269 : 2440, 1994.
- 20) Bobek LA, Tsai H, Biesbrock AR : Molecular cloning, Sequence, and specificity of expression of the gene encoding the low molecular weight human salivary mucin (MUC 7). J Biol Chem, 268 : 20563, 1993.
- 21) Toribara NW, Roberton AM, Ho SB, Kuo WL, Hicks JW, Gum E, Hicks JW, Gum JR, Byrd JC, Siddiki B, Kim YS : Human gastric mucin. J Biol Chem, 268 : 5879, 1993.
- 22) Ho SB, Roberton AM, Shekels LL, Lyftogt CT, Niehans GA, Toribara NW : Expression cloning of gastric mucin complementary DNA and localization of mucin gene expression. Gastroenterology, 109 : 735, 1995.
- 23) De Bolos C, Garrido M, Real FX : MUC6 apomucin shows a distinct normal tissue distribution that correlates with Lewis antigen expression in the human stomach. Gastroenterology, 109 : 723, 1995.
- 24) Inatomi T, Tisdale AS, Zhan Q, Spurr-Michaud S, Gipson IK : Cloning of rat Muc5AC mucin gene : comparison of its structure and tissue distribution to that of human and mouse homologues. Biochem Biophys Res Commun, 236 : 789, 1997.
- 25) Feizi T, Gooi HC, Childs RA, Picard JK, Uemura K, Loomes LM, Thorpe SJ, Hounsell EF : Tumour-associated and differentiation antigens on the carbohydrate moieties of mucin-type glycoproteins. Biochem Soc Trans, 12 : 591, 1984.
- 26) Ota H, Katsuyama T, Ishii K, Nakayama J, Shiozawa T, Tsukahara Y : A dual staining method for identifying mucins of different gastric epithelia mucous cells. Histochem J, 23 : 22, 1991.
- 27) Katsuyama T, Spicer SS : Histochemical differentiation of complex carbohydrates with variants of the Concanavalin A-Horseradish peroxidase method. J Histochem Cytochem, 26 : 233, 1978.

〈編集後記〉 今年の夏は厳しい残暑が続きましたが、朝夕はようやく過ごしやすい季節となりました。20世紀最後のスポーツ最大の祭典「シドニー五輪」が、9月15日開幕されました。日本人選手の活躍に一喜一憂とともに、全種目・全選手を通して、「期待と勝負、笑と涙、美と技、金と銀」等の融合した感動のドラマが数多く生まれ、皆様は周囲の方々とそのドラマを酒場で、レストランで、会社で語りあい、残暑の疲労回復剤、会話の助

燃剤、食欲・飲酒の起爆剤等に大いに活用されたことと思います。本誌も愛読者の皆様に多くの感動が生まれることを目標に、2000年最後の編集に取り組みました。

本号では坂田先生、彼谷先生・佐野先生、江藤先生、福田先生の方々から専門分野より興味ある玉稿を頂戴し、その後に、弊社研究陣が開発した抗ムチンクロナール抗体の紹介を掲載いたしました。今後とも興味ある内容と感動にご期待ください。
(三城記)

〒103-0023 東京都中央区日本橋本町3丁目2番8号
電話 (03) 3279-1751 FAX (03) 3279-5560
インターネットホームページ <http://www.kanto.co.jp>
編集責任者 三城 侑三 平成12年10月1日 発行

