

## バイオチップによる酸化ストレスマーカーの迅速アッセイ

永井 秀典, 脇田 慎一

### 1 はじめに

近年, 生体内の抗酸化システムを越えて生成した強い酸化作用を有する活性酸素種 (ROS) や活性酸化窒素種 (RNOS) による生体傷害, いわゆる酸化ストレスが老化や種々の生活習慣病と関連していることが報告され, 大きな関心を集めている。また, 最近, ROS のシグナル伝達調節因子としての挙動に関する研究に注目が集まっている。

一般に ROS は<sup>1)</sup>, 殺菌作用や炎症作用を有するマクロファージ等生体防御系の細胞で多く産生され, その多くは酸素分子由来のスーパーオキシドである (図1)。スーパーオキシド自身は, その反応性は弱いものの, 一酸化窒素 (NO) が近傍に存在すると極めて速い速度で反応し, 強力な酸化能を有するペルオキシナイトライト (OONO<sup>-</sup>) となる。また, スーパーオキシドの一部は, さらに強力なヒドロキシルラジカルとなり, DNA, タンパク質, 生体膜等と反応し, 酸化損傷させる。

特に, DNA に対する酸化損傷は遺伝子変異をもたらし, 発癌や老化を誘発することが知られている<sup>2)</sup>。したがって, 酸化ストレスの計測は, 老化, 糖尿病, 動脈硬化, その他多くの疾患に対する予防医学の観点から重要であると考えられる<sup>3)</sup>。

そこで筆者らが, マイクロチップ電気泳動法により, 酸化ストレスマーカーのハイスループットアッセイを検討して得られた結果を紹介する。

### 2 酸化ストレスマーカー

ROS は高い反応性を持つことから, 様々な生体分子へ作用し酸化物を形成する。DNA の酸化に由来する 8-hydroxyguanosine (8-OHGuo) は, 生体内の酸化ストレスの評価に適切なマーカーであることが知られている<sup>4)</sup>。さらに最近, RNOS である OONO<sup>-</sup> により, DNA のニトロ化合物である 8-nitroguanosine (8-NO<sub>2</sub>Guo) や, ウイルス感染により 8-

chloroguanosine (8-ClGuo) を生じることが報告され, 新たな酸化ストレスマーカーとして注目されている<sup>5)6)</sup>。

### 3 マイクロチップ電気泳動法

現在, これら DNA 酸化損傷マーカーを分析する場合, HPLC による分離後, UV や電気化学検出器 (ECD) により検出する方法が用いられている。8-OHGuo の場合, 抗原抗体反応による特異的結合能を利用した ELISA (enzyme linked immunosorbent assay) 法も開発されている。NO の分析には, Griess 法<sup>7)</sup>による比色法がよく用いられている。しかし, これらの手法は, 煩雑な前処理や長い測定時間が必要である。

一般にストレスに対する生体の応答は, 個人差や日内変動があり, マーカー濃度の経時的な変動を観測することが重要である。そのためには, 各種ストレスマーカーの迅速アッセイ法が不可欠であるが, そのような分析法は確立されていないのが現状である。

一方, 半導体微細加工技術を用いて分析装置の微小化, 分析の迅速化を目指す研究が盛んに進められている<sup>8)</sup>。一般に, 分離部や反応器の微小化により, 比表面積が増大するため界面反応が迅速となる。さらに, 容器の微小化により熱容量が小さくなるため, 伝熱も短時間で済むうえ, 試料・試薬の節約や廃液の削減等, 分析コストの大幅な削減が可能である。これらの長所を利用して, 従来のキャピラリー電気泳動 (CE) をチップ化したマイクロチップ電気泳動法が開発され, 分離分析の高性能化が達成されている。

### 4 DNA 酸化ストレスマーカーの迅速アッセイ

マイクロチップ電気泳動装置 (島津製作所製 MCE-2010) を用いて, ミセル動電クロマトグラフィー (MEKC) の分離モードにより, 8-OHGuo, 8-NO<sub>2</sub>Guo, 8-ClGuo と未修飾の 4 種類のスクレオシドを混合した標準試料の迅速分離をまず検討

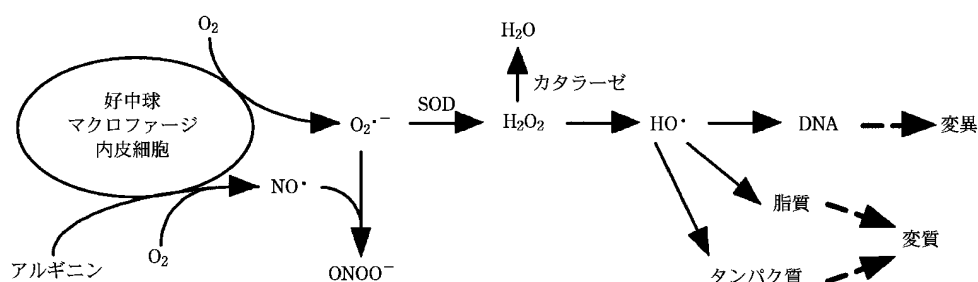


図1 ROS, RNOS の作用機序

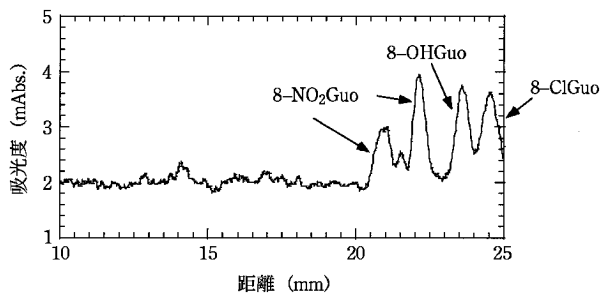


図2 DNA酸化ストレスマーカーの多成分同時検出

した。酸化ストレスマーカーであるDNA酸化損傷代謝産物の生成は、DNA中の直接的な酸化によって生じた損傷塩基がDNA修復機構により切り出されて細胞外へ排出される経路とともに、DNA合成の原料庫であるヌクレオチドプールにおけるDNA前駆体自身の酸化による生成経路が重要と考えられている。したがって、DNA酸化損傷マーカーの測定には、正常なヌクレオチドやヌクレオシドと完全に分離して定量することが必要である。

分析条件には、MEKCモードで微小流体制御を行うことにより、わずか12秒の分離時間で、3種類のDNA酸化損傷マーカー及び正常なヌクレオシド標準溶液の分離に関して、8-NO<sub>2</sub>Guoのニトロ基の酸化/還元体を含む4本のピークの完全分離を達成した(図2)。

これにより、各DNAの酸化ストレスマーカーの同時検出が技術的に可能であることを見いだしたが、検出にUV吸収を使用したために、検出限界は250 μMである。代表的なDNAの酸化ストレスマーカーであるグアノシンの酸化体濃度は、尿中の水分摂取量による尿濃度変化を補正したクレアチン補正值は健康者では5.5~80 nMであり<sup>9)</sup>、試料濃縮などによる大幅な感度向上が不可欠である。一般的なHPLC法では、ECDにより高感度かつ選択的に分離分析を行っており、現在、マイクロチップ電気泳動-ECD法による高感度化を進めている<sup>10)</sup>。

### 5 NO代謝産物の迅速アッセイ

NOは多彩な生理・病理作用への関与のみならず、図1に示したように、ROSと結合して細胞への傷害を引き起こす典型的なRNOSであることから、高い注目を集めている。一般にNO発生量は、その半減期が極めて短いことから、亜硝酸、硝酸イオンの測定により推定される。しかし、現状のNO代謝物アッセイキットは酵素による還元と比色測定を組み合わせた手法(1~2時間)を用いているため、迅速アッセイにはほど遠い。

今回、筆者らはNO代謝物の迅速アッセイを実現するためにCEを用いた。一般的なCE泳動液を用いた場合、生体試料中の塩化物イオンの除去を行わないと、分析は困難である。また、CE分離分析法では、試料と泳動液の両方に含まれる成分は相殺されて、ピークの出現を抑制することが可能である。筆者らはこの特徴に着目し、①高塩濃度の泳動液を用いることで、生体試料中の塩化物イオンを除去する前処理プロセスを必要としないメソッド開発を検討した。そして、②陽イオン界

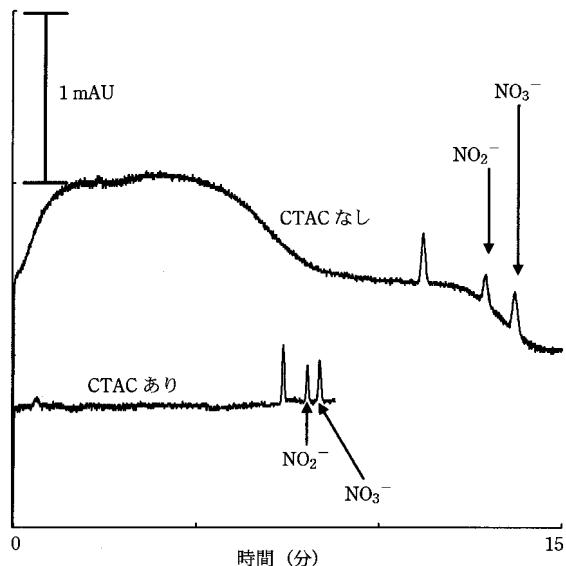
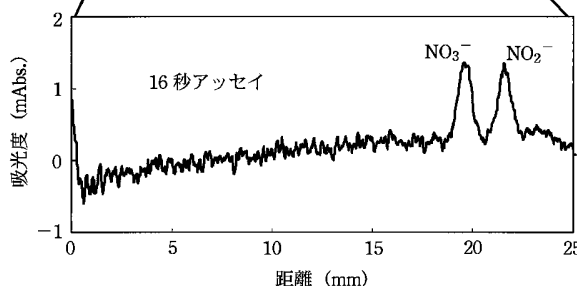
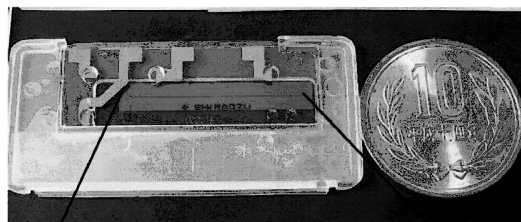


図3 CEによるNO代謝物の分離とCTAC添加による迅速化



(上)石英製電気泳動用マイクロチップ、(下)エレクトロフェログラム

図4 マイクロチップ電気泳動によるNO代謝物の迅速分離

面活性剤であるcetyltrimethylammonium chloride (CTAC)を泳動液に添加することにより、電気浸透流を制御した迅速分離を検討した。

その結果、図3に示すように比較的迅速な測定を可能にした。さらに、泳動液組成の改良により、ヒト血清及びヒト唾液中の亜硝酸、硝酸イオンについて7分以内の定量を達成した。

さらに、微細加工技術により流路を形成した石英チップ(図4上)を用いるマイクロチップ電気泳動により、飛躍的な迅速化を目指した。先に述べた泳動液を用い、試料導入や分離分析時の条件検討を行ったところ、標準溶液中の亜硝酸、硝酸イオンをわずか16秒で分離検出することができた(図4下)。実試料としてヒト唾液を対象に、本法を適応したところ、亜硝酸、硝酸イオンの迅速分離を達成した<sup>11)</sup>。

これらの研究成果を基に、今後、生体中の酸化ストレスマーカーを前処理なしでオンサイト計測が可能な迅速アッセイシステムの構築が期待できる。

## 6 おわりに

マイクロチップ電気泳動法の迅速分離技術を利用することにより、代表的な酸化ストレス関連マーカーのハイスループットアッセイが可能であった。マイクロチップ電気泳動法では、検出部の微小化が原因となる光学的な濃度感度の低下は免れないが、今後、オンチップ前処理技術や、CE法において大きな成果が得られているオンライン濃縮法のマイクロチップへの適用が進むことにより、実試料への適応が可能になるものと期待される。

最後に、多成分の同時分析技術の確立は、単に酸化ストレスについて定量的な評価を可能にするだけではなく、各ストレスマーカーの発生メカニズム解明とともに、酸化ストレス要因の特定を可能にし、より具体的に生活習慣の改善のための指針を提供できるものと期待される。

謝辞 最後に、この特集で紹介した筆者らの研究成果は、当研究センターの二木鋭雄センター長、岩橋 均副センター長、吉田康一研究チーム長をはじめ、我々の研究チームの宮道 隆氏、田中喜秀主任研究員、竹田さほり主任研究員（併任）、中山雄介氏、米田 恵さんの協力を得て行ったものである。また、研究連携を行っている神戸大学福土恵一教授、同大学齊藤恵逸教授とその学生諸氏に厚く感謝の意を表します。

## 文 献

- 1) 井上正康編：“活性酸素とシグナル伝達”，p. 22 (2001)，(講談社)。
- 2) H. Kasai, H. Hayami, Z. Yamaizumi, H. Saito, S. Nishimura : *Nucleic Acids Res.*, **12**, 2127 (1984).
- 3) 吉田康一，二木鋭雄：バイオインダストリー，**20**(4)，14 (2003)。
- 4) 大澤俊彦：“活性酸素”，日本化学会編，p. 74 (1999)，(丸善)。
- 5) R. S. Sodum, E. S. Fiala : *Chem. Res. Toxicol.*, **14**, 438 (2001).
- 6) M. Masuda, T. Suzuki, M. D. Froesen : *J. Biol. Chem.*, **276**, 40486 (2001).
- 7) K. Schulz, S. Kerber, M. Kelm : *Nitric Oxide*, **3**, 225 (1999) ; 原著は R. Griess : *Chem. Ber.*, **12**, 426 (1879).
- 8) 脇田慎一：ぶんせき，**2002**, 242.
- 9) 斎藤 秀，山内 博，蓮井ゆり，蔵重 淳，越智宏倫，吉田勝美：臨床検査，**44**, 195 (2000).
- 10) 永井秀典，宮道 隆，金高健二，西井準治，脇田慎一，伊永隆史，二木鋭雄：第6回化学とマイクロ・ナノシステム研究会，p. 84 (2002).
- 11) T. Miyado, Y. Tanaka, H. Nagai, Y. Nakayama, S. Takeda, K. Saito, K. Fukushi, Y. Yoshida, S. Wakida, E. Niki : Abstracts of 3rd Int. Conf. on the Biology, Chemistry and Therapeutic Application of Nitric Oxide, p. 94 (2004).



永井秀典 (Hidenori NAGAI)

産業技術総合研究所ヒューマンストレスシグナル研究センター (〒563-8577 大阪府池田市緑丘1-8-31)。北陸先端科学技術大学院大学工学研究科機能科学専攻博士課程後期修了。工学博士。<現在の研究テーマ>ストレス計測評価チップ及び高集積化を指向した流体制御法の開発。<趣味>スノーボード，バイク。  
E-mail : hide.nagai@aist.go.jp



脇田慎一 (Shin-ichi WAKIDA)

産業技術総合研究所ヒューマンストレスシグナル研究センター (〒563-8577 大阪府池田市緑丘1-8-31)。広島大学大学院理学研究科博士課程前期修了。工学博士。<現在の研究テーマ>ストレス計測評価ロボチップの構築と実証。<主な著書>“センサ先端材料のやさしい知識” (共著) (オーム社)。<趣味>アウトドア，野球 (カープ) 観戦，ライブ鑑賞，ガーデニング。  
E-mail : s.wakida@aist.go.jp

## 新刊紹介

### 液クロを上手につかうコツ ——誰も教えてくれないノウハウ——

中村 洋 監修

液体クロマトグラフィー研究懇談会の中村 洋委員長が、2003年の東京コンファレンス(幕張)で企画した本書と同名の講習会の内容を監修して刊行したものである。この本に先行して「液クロ虎の巻」から始まる液クロに関するQ & Aタイプの3部作があるが、そこでは質問が系統だててまとめられていたわけではない。散らばってしまったQ & Aのうち重要

なものをカテゴリーごとにまとめたのが本書であるとも言えよう。日本中の至るところで液クロが使用されるようになって、液クロがブラックボックスとなった。液クロの原理や装置になじみの少ない人には、装置が本当に良い状態なのか？ どのように最適な溶離液組成を決めてゆくのか？ といった疑問がでて当然である。HPLCのポンプのヘッドや検出器のセルを分解掃除したり、チューブの接続やカラムの充填を実際に行うことができるユーザーでないと、メンテナンスは年に1回、時に、数年に1回、ということになる。装置やカラムの選定のコツや、溶離液の選択や調製のコツ、検出器の問題点など実務的な問題に答える内容となっている。副題に、「誰も教えてくれないノウハウ」とある。液クロを多少は知っていると自負する人にも参考となる記述があると思う。

(ISBN 4-621-07453-9・B5判・210ページ・2,850円+税・2004年刊・丸善)