

<研究課題> 糖尿病性腎症早期発見を可能にする新規オンサイトスクリーニング法の開発

～高齢者人工透析導入数の減少と医療費削減を目指して～

代表研究者 長崎大学大学院医歯薬学総合研究科 准教授 大山 要

【まとめ】

本研究では血清アルブミンと選択的に結合する蛍光プローブを開発し、アルブミンの高選択的・高感度検出を実現した。本プローブはアルブミンとの結合特性は従来のプローブより10倍以上優れており、幅広い用途に応用可能な性能を示した。複雑な成分組成の血液中でも良好な検出が可能であったことから、より単純な成分組成である尿試料は十分に可能であると考えられる。

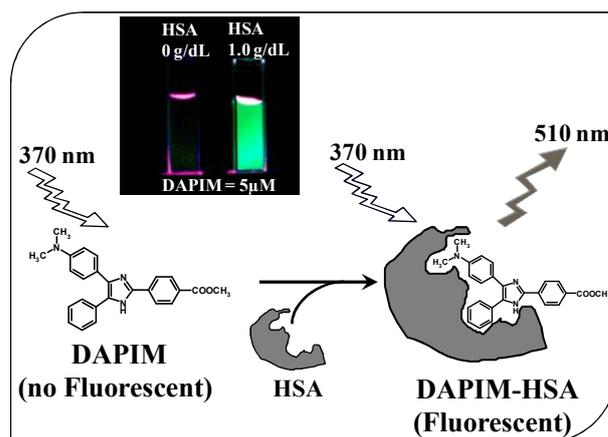
1. 研究の目的

本研究ではアルブミンのオンサイト蛍光スクリーニング法の開発を行う。本法は、アルブミンと特異的に結合して蛍光を発する蛍光プローブを基盤としており、オンサイトでの可視スクリーニングを実現するものである。具体的には、患者生体試料と蛍光プローブのみを混合し、紫外光を照射するという簡単な操作で、アルブミンの検出が完了するという極めて簡便・迅速なスクリーニングが可能である。より多くの糖尿病性腎症予備軍を抽出することを重視し、本研究は定期健康診断などでのオンサイトスクリーニングに応用可能な、簡便性・迅速性・低コストを重視した手法の開発を目指す。

2. 研究方法と研究成果

本研究ではまず、開発した蛍光プローブ 4-[4-(4-dimethylaminophenyl)-5-phenyl-1H

-imidazol-2-yl]benzoic acid methyl ester (DAPIM) がヒト血清アルブミン (HSA) との特異的な結合でその蛍光が著しく増大する蛍光特性を見出し、酸化・還元アルブミンの定量に有効であることを確認した。続いて、DAPIM のヒト血清アルブミン (HSA) への特異性を検証するため、競合結合試験及び Scatchard



plot により結合サイトの特定及び結合定数の算出を行った。その結果、DAPIM は HSA の site II に結合し、結合定数は $3.65 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ であった。特に結合定数は、これまでに報告されている HSA 用プローブに比べ 10-100 倍以上高く、DAPIM が極めて特異性の高いプローブであることが明らかとなった。さらに現在、DAPIM-HSA 複合体の X 線結晶構造解析を行うことで結合様式の解明を試みている。

次に、蛍光プローブの定量性が極めて重要であることから、DAPIM を用いて HSA の定量を行った。HSA 標品を対象に定量性を確認した後、ヒト血清試料中の HSA を定量し、従来

法であるブロモクレゾールグリーン法（BCG法）と比較した。DAPIMを用いた定量結果は、BCG法で得られた結果と良好な相関性を示した。このことから、DAPIMが血清中でも選択的にHSAと結合し、その結合量がHSA量に依存的事であることが明らかとなった。

さらに、HPLCとDAPIM誘導体化を組み合わせた分析法で、還元型アルブミンと酸化型アルブミンを選択的に定量が可能となり、両アルブミンの血清中での存在比を決定することに成功した。本法を用いて健常人と糖尿病患者の血清解析を行ったところ、酸化型アルブミンの上昇が認められた。

3. 今後の課題

今回得られた検出感度は、DAPIMの高い結合定数から想定していた感度に比べ低かったため、極微量のマーカを探索対象とするには現在進行中のDAPIMのX線構造解析の結果を基にした、DAPIMの構造改変が必要と思われる。

4. 研究成果の公表方法

（論文投稿予定）

Analytical Chimica Acta

Analytical Biochemistry

以上