

# 先人の文献との出会いと新しい研究の発掘

山 田 孫 平

## 1. はじめに

我々が何か新しい研究を始めるとき、何かしら今までの既存の研究を調べるのは当然のことである。現在の調査は PubMed や SciFinder などのデータベースを検索して行う電子情報の研究サイトから検索するのが一般的である。そして簡単に情報が得られるわけであり、今や沢山の情報が溢れる現代社会であるといえる。しかし、本誌投稿者の学生時代（40年以上前）はパソコンを用いてインターネットを検索して得られる情報は一部限られた人しか使うことができない時代であった。また、タイプライターやワープロを使うのもやっとの時代である。化学分野で、例えば有機化学文献を調べるには図書館通いして検索書を調べ、原書やコピーを取り寄せ調べるしかなかった。当時有機化学の文献調査では主流が2つあり、一つはバイルシュタインでドイツの検索書、もう一つはケミカルアブストラクトでアメリカの検索書であった。この2つで、化合物名と構造式分子式から調べたものである。現在、文献検索を行うと、古い文献は画像として読み込んだものがある。所謂原本の取り込みされたもの、として目にすることが偶にあり、当時の考え方や書式などその時代を感じることが出来る。また、文献検索で、入手するのに有料などで原本を直接取り寄せる場合もある。このような古い時代の先人の文献（先人の論文）は、研究を進めるとき、非常に役に立つ場面に遭遇する。たとえば、興味をそそられ、何かしら新しい発見への道標となることがある。これは先人文献の出会いからの研究への出発ということがいえる。「巨人の肩に立つ」(Standing on the shoulders of Giants) や「温故知新」(Developing New Ideas based on Study of The Past Literature) という事かもしれない。逆に、文献調査して、化学文献等の古い文献で、自分が研究しようとしたことが、既に検討され、完結してい

る場合もあり、がっかりすることもある。さて、役立つ場合を述べると、例えば、古い文献で自分が予想を描いていた結果と違う場合、何故かと新たに研究を進める。条件違いや偶発的に得られた自分の検討結果と異なる場合に新たな発見といったことであろうか。あるいは、もっと多くの役立つ場面が出てくるとも考えられる。古い文献の研究内容が一般常識とされていた事柄が、新たに得られた研究によって覆され、新事実の発見に繋がるという非常にドラステックなことがあるかもしれない。先人の文献との出会いが、本誌投稿者としては新しい事柄（新発見）を得る有用な情報元というべきか研究のネタとしての活用に繋がると考える。この考えは、研究者としては日頃より感覚的にお持ちで、昨今の検索ツールの進歩により、研究への手がかりを見つけ出すのが容易に思えるが、目的の文献に出会える機会はそう簡単ではない。それ故、先人の文献に出会えることは新しい研究を進める上で非常に重要である。本誌投稿者も先人の文献の研究から新たな研究を進めることが出来た。その為、あえて出会った文献からの新しい研究について、いくつかの事例からその重要性の一端を述べる。

本論では、先人の化学論文3例の出会いと本誌投稿者がかかわってきた関係の研究について述べる。

## 2. 先人の論文1例目との出会いと「膵臓疾患を検査するリパーゼ活性測定」に関する研究について

まず、膵臓疾患の検査法に関する文献との出会いを申し上げる前に、リパーゼについて、論文1例目と出会うまでの当時の背景を含めて簡単に紹介する。1975年頃、膵臓疾患の検査方法としてはリパーゼの活性測定を行うことが盛んであった。リパーゼは脂肪を分解する酵素として膵臓に存在する。リパーゼは膵臓の膵外分泌細胞の変性や壊死により血中に逸脱するため、血中濃度が高くなると膵臓の疾患が疑われる。そこで、この血中でのリパーゼ活性を測定する方法を膵臓疾患の検査方法として確立することが重要とされて、リパーゼを如何に測定するかであった。

1975年頃の測定方法の主流は脂肪に見立てたトリオレインという物質の懸濁液の濁りを分光光度計で340nmの波長で測定する方法で、濁りがリパーゼの作用により減少することを利用して、その濁りの減少量を酵素活性値として測定してリパーゼ量を測ろうとするものである。トリオレインは化学的には脂肪酸エステルに分類される物質である。何故この脂肪酸エステルがリパーゼ測定に用いるのかは、リパーゼという酵素が脂肪酸エステル（この場合トリオレイン、酵素に対して基質に相当する物質）に働いて分解するためである。このときの基質を分解する状態変化（濁りの減少）を利用してリパーゼ量を測定するものである。

ここでリパーゼの測定に関して課題がみられた。リパーゼを測定する際に、リパーゼ以外の同じように擬似的に働く酵素（主にエステラーゼ等）により偽陽性の誤差を生み出すという欠点を持つ問題があった。更にもう一つの問題として、濁りを測定する場合には、分子吸光係数といった標準を定めにくく、一定な濁りにする標準液をつくり、それに対しての相対値から求める必要がある。

このような問題に対して一定の改善が見られる論文に出会うことが出来た。

先人論文1例目として「S. Kurooka, S. Okamoto, M. Hashimoto, A novel and simple colorimetric assay for human serum lipase. *J. Biochem.*, 1977;81:361-369.」との出会いがあった。

この論文に関して、先ず、エステラーゼに対し阻害剤であるPMSF（phenyl methylsulfonyl fluoride）を加え、擬似的な酵素の活性を抑制する方法を用い最初の問題を改善されている。また、濁りの問題の解決策は、一度濁った状態でリパーゼを反応させ、一定時間後に、有機溶媒（アセトン）を加え、リパーゼの酵素反応を停止させて、濁りを沈殿させ、濁っていない上澄みを測定する方法（エンドポイント法）が考えられた。このとき、濁りを測定するのではなく、波長412nmの黄色の吸光度を測定するものである。このことにより、黄色の吸光度から得られる分子吸光係数を用い、標準液を用いなくてよい方法が可能となる。更に、何故黄色の吸光度を測定できるかという、チ

オール (SH) を SH 定量試薬の DTNB (5,5'-dithio-bis-(2-nitro-benzoic acid)) にて発色させ、412nm の黄色の吸光度を測定するからである。ここで、何故 SH が出てくるのかであるが、これはリパーゼの基質がトリオレインではなく、BALB (2,3-dibutyrylthio-1-propyl butyrate ;  $\text{CH}_2(\text{SCOCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3)\text{CH}(\text{SCOCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3)\text{CH}_2(\text{OCOCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3)$ ) という新しい基質に変えたことに由来する。

基質について述べると、先ず、トリオレインの構造はグリセロールの3つの脂肪酸エステルであり、グリセロールは3つのヒドロキシ基 (OH) を持っている。これが3つの脂肪酸のカルボキシ基 (COOH) の部分とエステル結合 ( $\text{CH}_2(\text{OCOR})\text{CH}(\text{OCOR})\text{CH}_2(\text{OCOR})$ ) の OCOR 部分、R は脂肪酸であるオレイン酸鎖部分) したものである。トリオレインのエステル部分はリパーゼにより加水分解され、濁りの減少の測定は出来るが、濁りの減少以外の方法は難しいと考えられ、他の検出できる基質を考案していた。そこで、考案した基質として、一般に市販されている BALB を用いることを考えた様である。BALB はどのような基質であるかという、グリセロールの OH の官能基部分の2つがチオール (SH) で末端の1つはそのまま OH の 2,3-ジチオプロパノール (構造式 ;  $\text{CH}_2\text{SHCH}_2\text{SHCH}_2\text{OH}$ , 略 ; BAL) に対し、3つとも脂肪酸である酪酸のエステル ( $\text{CH}_2(\text{SCOR})\text{CH}(\text{SCOR})\text{CH}_2(\text{OCOR})$ 、R は酪酸の側鎖部分である) である。このときエステルがリパーゼにより加水分解を受けると SH と酸に分解され、生成した SH を DTNB で測定する方法として考案している。

つまり、リパーゼ測定は基質 BALB (2,3-dibutyrylthio-1-propyl butyrate) を用いリパーゼにより生成した BAL の SH を DTNB にて黄色に発色させその吸光度からリパーゼ量を測定するもので、この測定法の主原理である。この際、脂肪酸のエステルが低脂肪酸である酪酸であればエステラーゼの干渉影響が考えられ、エステラーゼ阻害剤 PMSF を反応時に加えることにより、リパーゼの活性のみを優位に測定することが出来る方法である。また、新しい基質 BALB でもあってもトリオレインに比べれば濁度は少ないもののリパーゼとの

反応液では濁りが発生し、黄色の発色液を測定する場合濁りの影響をもたらす。これを改善する為に、最初に記載した濁りの除去法（一度反応を停止させ濁りを除く）であるエンドポイント法を使用し、測定方法の改善を行い、新しい測定方法として考案し、実際にはこの方法は実用化されリパーゼキット S として市販された。

しかし、この時、何故この基質を採用したのか非常に疑問を持った。それは、エステル結合部分にある。BALB は S 原子の入ったチオエステル部分がすべてではなく 2 箇所のみで、残りは酸素原子のエステルであったことである。何故すべてをチオエステルにしなかったのかである。すべてを同じにすれば反応原理的にも簡単であると考えた。

この疑問から本誌投稿者の研究をスタートした。先ず、3 箇所チオエステルの基質とその関連基質の合成を試みた。これは厄介な合成であったが、偶々、文献にあった基質の BALB 及びエステルを分解する微生物 *R. delemar* 由来のリパーゼが市販されており、その両原材料から 3 箇所チオエステル (1,2,3-tributyrthio-propqane) 及び、2 箇所チオエステルで 1 箇所エステルでない OH の dibutrylthiopropyl alcohol (DBTPA) を合成することが出来た。その結果、前者の 3 箇所チオエステルではリパーゼによりエステルが分解しないことが判明した。また、DBTPA は酵素反応溶液では自動分解してすべてエステルでない 2,3-di-mercapto-1-propyl alcohol (BAL) になることが判明した。つまり、リパーゼが酵素として反応するのはチオエステル（イオウ原子を含むエステル）ではない、酸素原子のエステルのみであることが明らかになった。その為、酸素原子のエステルが 1 つは必要であった。もう一つ判明したことは、BALB において酸素原子のエステルが分解して生じる DBTPA は、リパーゼ反応の緩衝液中ですべてのエステルが自動分解することである。このことから、リパーゼによる分解で自動的に生じる SH 基を DTNB で発色させ測定できることがわかった。次に、エステラーゼの影響を受けない長鎖脂肪酸のエステルの合成を試み、長鎖としてオレイン酸とリノール酸のエステルを合成した。合成品を検証し、リパーゼ活性がより高いオレイン酸がもっとも良好な

基質 (dibutylthiopropyl oleate) という結果であった。詳細内容は文献として「M. Yamada, T. Fujita, New procedure for the measurement of pancreatic lipase activity in human serum using a thioester substrate. Clin.Chim.Acta, 2007;383:85-90.」を投稿し、以下内容も含めこの文献に記述した。

しかし、この基質にはもう一つの超えなければならない問題点があった。基質の水緩衝液中の溶解度の問題があり、そのままでは一定吸光度が得られない分散溶解しない点であった。実用化されていた BALB の測定法は、先ず、基質を緩衝液に分散溶解して先ずリパーゼ検体と一定時間反応させ、有機溶媒アセトンを加えリパーゼ反応を終了させて、濁りを除く。次に上清液を DTNB の発色試薬にて波長 412nm の吸光度を測定する。その時、検体なしの空試験を対照として検体リパーゼ活性の変化量を測定する方法 (エンドポイント法) として用いた。これは一度反応をストップさせる必要があった。これに対して当時、測定するのに多量に検体処理できる自動分析装置が出来ていたので、反応中の吸光度の変化量を直接測定する方法 (レートアッセイ法) が普及し、処理工程が少なく時間短縮できる方法として主流であった。これを実現させるためには初期吸光度が一定で緩衝液中にて溶解できる状態で測定できることが重要な課題であった。

この問題には次の文献 (G Renard, J Grimaud, El Zant, M APina, J Graille. An improved method for the colorimetric assay of lipase activity using an optically clear medium. Lipids, 1987;22:539-541) に出会い解決された。この文献のポイントは基質を溶解できる溶媒である heamethyl phosphoric triamine (HMPA) を見出したことである。この溶媒によりこの濁りの問題についても解決できた。

以上の問題解決により、最初に出会った文献ですでに実用化されていたリパーゼ測定用基質よりも優れた基質 dibutylthiopropyl oleate の開発が完了した。最初の文献の基質は BALB でエステルのアルコール側が OH で、酸部分が酪酸に対して、新しく開発したものはオレイン酸で、リパーゼに対しての特異性も向上し、干渉物質エステラーゼについての阻害剤 PMSF は不要となり、

また、HMPA 溶媒により基質を溶解させることができ、新測定法が開発できた。

ところが、この基質開発の間に新しい基質である 6-methylresorufin ester of 1-O,2-O-dilauryl-rac-glycero-3-glutaric acid が開発された。長鎖カルボン酸エステルの基質という概念から逸脱するものであるが、測定することが可能であり、dibutylthiopropyl oleate 基質との比較で、ヒト検体 80 例でリパーゼ活性値の相関は  $r = 0.992$  と非常に相関するものであった。この測定原理はリパーゼにより基質が加水分解され、緩衝液中で発生する methylresorufin アニオンの波長 580 nm での吸光度変化量から活性値を測定する方法であった。

しかし、この基質にも欠点があり、pH 安定性において、pH8.4 近辺では安定であるが、pH9.2 (dibutylthiopropyl oleate 基質ではこの pH にて測定) では不安定である。この pH9 以上に行っているのは、エステラーゼの影響をなくす為であり、pH8 前半近辺ではエステラーゼ活性の至適領域であり、影響を少なからず受けるものと考えられる。その為、この研究の集大成として、dibutylthiopropyl oleate [I] 基質のリパーゼ測定法 (追加にリパーゼの活性化剤の colipase 添加した方法として) を提唱した (Fig.1)。

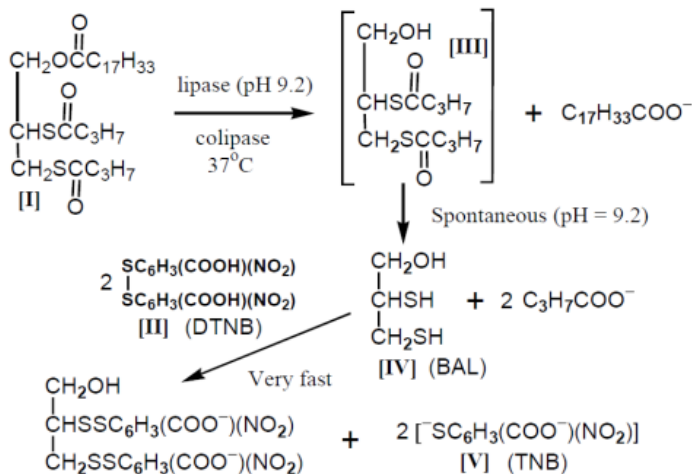


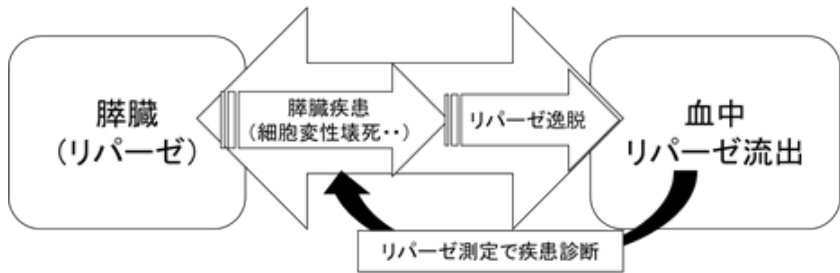
Fig. 1 Principle of the Enzymic Reaction

この様に2つの文献の出会いにより、そこから一つの研究成果を完結することが出来た。これは成功事例と考える。

ところが残念なことに、このようなリパーゼ測定法の開発の後半頃にはリパーゼ測定の需要頻度が少なくなり、その時期にはアミラーゼのアイソザイム(P型(膵臓)S型(唾液))の測定がされるようになり、膵臓疾患診断の主流となった。最後には思わぬ結果になり、結論として、提唱案は実用化に至らなかった。

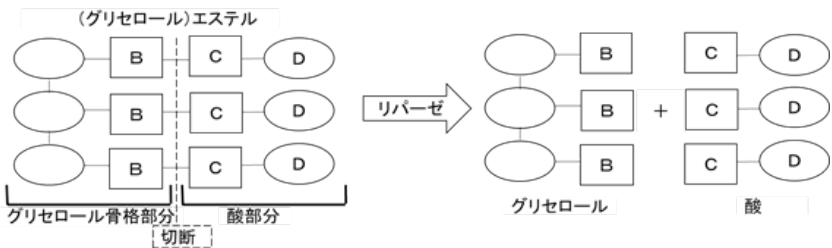
【以上述べた先人論文1例目からの研究内容を以下に簡単にまとめる】

①リパーゼの臨床的意義の概要 (リパーゼは膵臓に存在する酵素である)



膵臓の疾患により臓器の細胞の変性壊死で逸脱して血中に流出するリパーゼ量を測定することにより疾患の診断を行う。

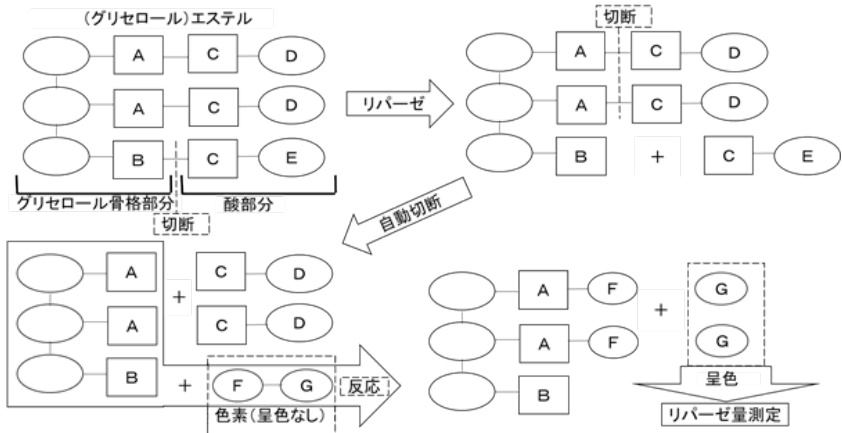
②リパーゼ酵素の働き



リパーゼは上図のグリセロール骨格部分と酸部分が結合したエステルを分解してグリセロールと酸に分解する酵素である。



③リパーゼ測定の原理



④リパーゼ測定の原理の解説

図に示す様にグリセロールエステルを測定するリパーゼ含有検体に添加してリパーゼの分解物が二次的に自動分解して生成する物質を色素で反応させて生じる呈色強度からリパーゼ量を測定する。

[先人論文の課題]

- 1) リパーゼが作用しグリセロールエステルを切断する特異性が低い。改善策として特異性を向上させるためリパーゼと同様に切断するエステラーゼを阻害する阻害剤を添加する必要がある。特異性の向上が必要。
- 2) グリセロールエステルの溶解性が悪く、懸濁液中でリパーゼを作用させて測定すると色素の呈色強度に影響をもたらす。そのため、溶解性の高い反応液が必要である。この文献では一度反応を停止して反応液を懸濁でない澄明な液として測定する方法を採用して、直接測れないために工程が増える問題が残る。
- 3) リパーゼの基質のトリオレインはグリセロールエステルがすべて同じ構造に対し、新しい基質 BALB のエステルが同じ構造でないのはなぜか不明である。

[新たなグリセロールエステル(の完成 (新たな論文へ)]

- 1) 特異性の高いグリセロールエステルの合成を酵素などを利用して完成した。これはリパーゼが作用するエステル部分のみ特異性の高い酸(オレイン酸等)を用いた。
- 2) 溶解性向上には新たな反応溶解液を見出し、直接測定が可能になった。
- 3) グリセロールエステルの構造が同じでないのは、色素と反応するグリセロールの2つの部位はリパーゼが作用しない点とリパーゼが反応する部位は特異性の高い酸を採用している点およびリパーゼが反応後の生成物が自動分解して色素と直ちに反応する点にある。

[市場へ実用化]

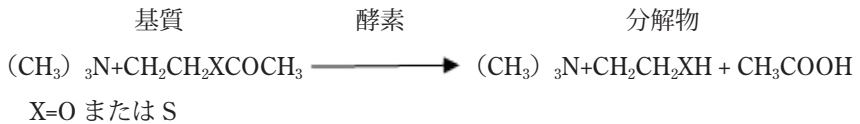
新たなグリセロールエステル完成時期には別のアミラーゼのアイソザイム(P型・S型)の測定で膵臓の疾患を測定する方法が主流となり実用化には至らなかった。

### 3. 先人の論文2例目との出会いと研究(通常肝機能疾患のコリンエステラーゼ活性測定の検査法)

最初に、肝機能疾患の検査法に関する文献との出会いを申し上げる前に、コリンエステラーゼについて簡単に述べる。コリンエステラーゼは肝細胞で合成されて血液中に分泌される酵素で、肝硬変を調べる検査のひとつである。肝硬変は、肝障害の終末期で、肝細胞が破壊されつくして肝臓が硬くなり(線維化)、肝細胞が働かなくなってコリンエステラーゼがつかられなくなり、血液中の値は低くなる。肝機能疾患を調べる検査の一つとしてこの酵素であるコリンエステラーゼを測定するための方法が必要であった。肝機能診断は健康診断でGOT、GPTそして $\gamma$ -GTPが一般的であり、これらは肝臓臓器の障害により逸脱する酵素の測定であるが、コリンエステラーゼは常時臓器で生産され存在するものを測定するものである。そのほか社会問題となった地下鉄サリンのサリン中毒の診断としても測定される。

コリンエステラーゼ酵素の一般的定義はコリンエステルを加水分解する酵素である。つまり、コリンエステラーゼを簡単に測定するにはコリンエステルを測定するかその分解物を測定する方法が一般的である。特に分解物を測定する方法が最も簡単である。

## コリンエステラーゼ酵素測定法



X=O の基質はアセチルコリン X=S の基質はアセチルチオコリン

方法；基質の分解物を測定し、基質がアセチルチオコリンの場合チオコリンを SH 発色色素でリパーゼの事例と同様に呈色させ間接的に測定する。 $\text{CH}_3\text{COOH}$  の酸の側鎖部分  $(\text{CH}_3)$  が立体障害の大きいベンゼン環などを有した酸を用い酵素の特異性と安定性を向上させた。

この測定方法の開発が盛んであった 1987 年頃当時もこの手法の研究が主流であった。また日本の臨床診断測定方法の標準化が特に盛んに進められていた。先行で海外のドイツではブチリルチオコリン（先行文献としては先人論文 2 例目 (No1) G.L.Eelman, Biochem.Pharmacol., 1961;7;88-95) やアメリカではアセチルチオコリン（先行文献として先人論文 2 例目 (No2) は G.Szasz, Clin.Chim.Acta, 1968;19;191-204) を基質として測定する方法が標準化されていた。しかし、これにはコリンエステラーゼの酵素特異性に問題があった。これを改善するために、本誌投稿者は新しい基質を開発した。新しい基質として 2,3-dimethoxybenzoylthicholine (2,3-ジメトキシベンゾイルチオコリン) を合成した。この特異性の解決策として、脂肪酸（ブチリルチオコリンでは酪酸、アセチルチオコリンでは酢酸に相当する）の代わりに芳香族を有する酸（ベンゼン環を有する安息香酸の置換基を有する化合物）を用いることにより改善できた。この測定法は特許（国際特許特願 61-007742）と論文（M.Yamada

etal., Benzoylthiocholine derivatives as substrates for pseudo-cholinesterase : synthesis and application., Chem.Parm.Bull., 1987; 35;1491-1496) にした。更に製品化を行い、現在も診断薬として市販使用されている。しかし、日本の標準化法としてはパラヒドロキシベンゾイルコリンを基質とする酵素法（詳細は述べないが）が採用されている。その後の論文としては、より安定で特異性の高い基質（シクロヘキシルチオコリン）も合成し論文（M.Yamada etal., New thio cholinester substrates for assay of human serum cholinesterase. Clin. Chem., 2001;47;1962-1966）とした。この研究としては最終的に製品化に結び付くことで完成度の高い研究にすることができた事例で大きな成功例の一つである。

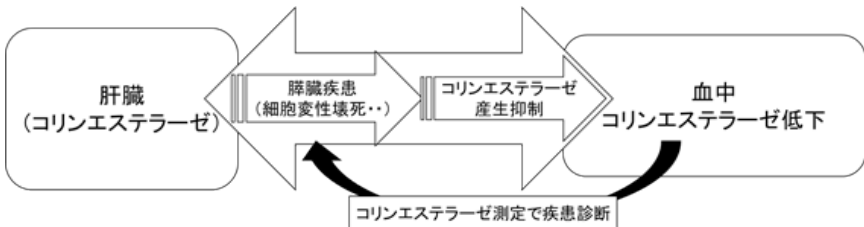
上記研究は 2001 年の論文投稿により完結した。しかし、本誌投稿者は先人の文献との出会いにより次の研究に関係を持つことができた。それは基質特異性の課題で、コリンエステラーゼには 2 つ酵素が知られており、pseudo タイプと true タイプがあり、前者の酵素は血中に非常に多く存在しており、肝臓の機能に関与する酵素である一方、後者の酵素は血中含量が少ない成分であるが、神経伝達系に関与する酵素という一面が知られており、特にアルツハイマー病に関与していると考えられている。1970 年にアメリカのデイビス博士らとイギリスのペリー博士らが、アセチルコリンの不足がアルツハイマー病の原因であると説を発表している（藤本大三郎著，老化を防ぐ科学，1996 年発行，講談社）。これは脳内アセチルコリンの濃度が低下することが関与していると考えられ、この低下は true タイプのコリンエステラーゼによりアセチルコリンの分解を促進していると考えられる。つまり、true のコリンエステラーゼの増加がアルツハイマー病と関係していると推定され、この酵素を測定するとことによりアルツハイマー病の診断に寄与できるのではないかと考えた。測定方法は基質としてアセチルコリンを用いて測定する酵素によって発生するコリンをコリンオキシダーゼにより分解して、その時発生する過酸化水素を発色色素で測定する。このとき、血中には同時に pseudo タイプのコリンエステラーゼがあるので、pseudo タイプと true タイプの合計で測定されるの

で、true タイプのコリンエステラーゼの抗体を予め反応中に存在させたものとそうでないものとの差を求め、両方の酵素の比を求める。この比とアルツハイマー病との相関を研究することにより、アルツハイマー病の診断に適用しようとする方法を考えた。実際のところ、特異性の高い true タイプのコリンエステラーゼの抗体を現状入手に至らなかった。この抗体の入手がこの研究の課題であるが、現状、アルツハイマーの診断法は確立されていないので、別の true タイプのコリンエステラーゼ活性測定方法についても検討の余地もあると思われる。アルツハイマー病の診断については研究途上と考える。この診断方法が確立できれば大きな成果につながると思われる。今後に期待したい。

【以上述べた先人論文 2 例目からの研究内容を以下に簡単にまとめる】

①コリンエステラーゼの臨床的意義の概要

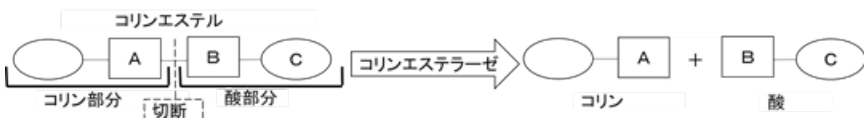
(コリンエステラーゼは肝臓で産生され常時血中に存在する酵素である)



肝臓の疾患により臓器の細胞の変性壊死で産生抑制にて血中コリンエステラーゼの低下量を測定により疾患の診断を行う。

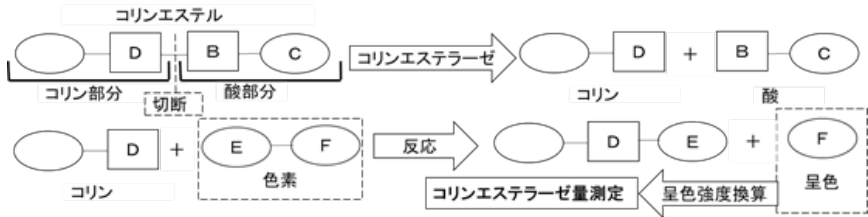
また、地下鉄サリン事件によるサリン毒性をコリンエステラーゼ測定で診断することにも利用された。

②コリンエステラーゼ酵素の働き



コリンエステラーゼは上図のコリン部分と酸部分が結合したエステルを分解してコリンと酸に分解する酵素である。

### ③コリンエステラーゼ測定の原理



### ④コリンエステラーゼ測定の原理の解説

図に示す様にコリンエステルを測定するコリンエステラーゼ含有検体に添加して分解物を色素と反応させて生じる呈色強度を求めてコリンエステラーゼ量を測定する。

#### [先人論文の課題]

文献もあるが、ドイツとアメリカにてコリンエステラーゼの測定法の標準化が行われ、それぞれのコリンエステル（ドイツ；ブチリルチオコリンエステル、アメリカ；アセチルチオコリンエステル）が採用されている。しかしこのコリンエステルにはコリンエステラーゼに対する特異性が低いという課題がある。改善策として特異性を向上させるためコリンエステラーゼ（Pseudoタイプ）と同様に切断するコリンエステラーゼ（Trueタイプ）を阻害する阻害剤を添加する必要がある。特異性の向上が必要。

#### [新たなコリンエステルの完成（新たな論文へ）]

特異性の高いコリンエステルの合成を完成した。これはコリンエステラーゼ（Pseudoタイプ）が作用するエステル部分のみ特異性の高い酸（2, 3-ジメトキシ安息香酸）を用いた。このコリンエステル（2, 3-ジメトキシベンゾイルチオコリン）の安定性も良好である。

## [市場への実用化]

新たなコリンエステルは国際特許化および製品化され実用化され現在も市販されている。しかし、日本のコリンエステラーゼ測定法の標準化は別の酵素法が採用された。尚、その後、さらに特異性と安定性の高いコリンエステル（シクロヘキシルチオコリン）を合成し論文とした。

## [更なる発展]

コリンエステラーゼ（true タイプ）の測定でアルツハイマーの診断に可能性が見られ、今後の研究に期待される。

**3. 先人の論文 3 例目との出会いと研究の方向性（2 型糖尿病の検査法）**

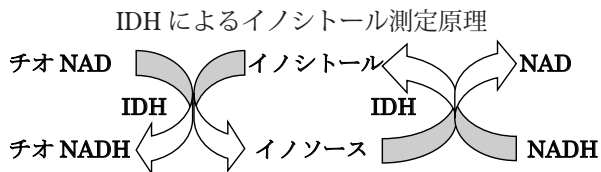
昨今でも糖尿病の患者は増加し、糖尿病合併症は生活習慣病の死因の上位にランクされている。糖尿病の診断測定は血中や尿中のグルコースを測定することと、ヘモグロビン A1c (HbA1c) を測定することにより、測定値が健常人の正常域から超えるかどうかの判断で糖尿病を診断する方法が主流である。特に HbA1c は総ヘモグロビン量に対する HbA1c 量が過去 1～2 ヶ月間の積分的な血糖値を反映し、現在最も利用されている血糖コントロールマーカーで、糖尿病患者の経過観察や病態診断に使われている。この HbA1c の測定は HPLC 法と免疫比濁阻害法（ラテックス比濁法）がある。

このように糖尿病の測定方法には種々あるが、糖尿病でも、潜在的疾患の多い 2 型糖尿病を診断する方法には、標準化された方法が無いのが現状である。その中で、尿中に排斥されるイノシトールの異性体である Chiro（カイロ）イノシトールの増加が、2 型糖尿病に見られるという文献に出会った。この文献（先人論文 3 例目）は J Larner, J W Craig. Urinary myo-inositol-to-chiro-inositol ratios and insulin resistance. *Diabetes Care*, 1996;19:76-78. である。この文献には GC-MS 装置を使いイノシトールの異性体であるミオ（myo）タイプとカイロ（chiro）タイプを測定すると、2 型糖尿病患者（NIDDM ; none insulindependent diabetes mellitus）ではカイロ - タイプが増加することが述べ

られていた。更にミオとカイロの比を比較するとミオを分母とするとき大きな値となる。つまり、この比が大きいと2型糖尿病の診断に役立つというものであった。

2型糖尿病の測定方法が確立されない中、非常に興味深い文献である。この開発にあたり、GC-MS というのは一般的でないので、それぞれのミオとカイロの各異性体イノシトールについて分別測定が出来る方法を模索した。当初はHPLCによる分別法も検討したが、別途HPLC装置が必要で、ランニングコストが高い問題や、低濃度の為高感度が要求される為、別な方法を模索した。

そのころメーカーである旭化成ファーマではミオ及びカイロそれぞれの分解酵素の研究が行われていた。これはイノシトールデヒドロゲナーゼ (IDH) 酵素を用いイノシトールを測定する方法である。イノシトールを補酵素チオ NAD で IDH 酵素によりイノソースとチオ NADH に変換し、更に補酵素 NADH と IDH でイノシトールに変換させ、繰り返し酵素サイクリングを用いてチオ NADH の 405nm の増加量からイノシトール量を測定する方法である。本誌投稿者はその応用を模索した (以下測定原理)。



(予めイノシトールのカイロ・ミオ異性体の一方を抗体で阻害し、特異性を必要としない IDH で阻害されないイノシトールを測定する方法)

そして、ミオかカイロのいずれかの特異性のある IDH 酵素を調製し、検体にいずれかの酵素を添加し、イノシトールを測定し、一方は特異性の無い IDH 酵素で測定した値から差し引くと、ミオイノシトールデヒドロゲナーゼであれば、カイロイノシトール量、カイロイノシトールデヒドロゲナーゼであればミオイノシトール量が測定できると考えた。しかし、現実には、IHD の



ミオタイプとカイロタイプの酵素の特異性がそれほど高いものではなく、別の方法も考えた。まず、その前に前提条件がある。イノシトールの異性体には、5種類の異性体があるが、生体内ではほとんどがミオタイプでそれ以外にはカイロタイプがあり、残りのムコタイプを含む3種類はほとんど検出されないとされている。

そこで、すでにある市販のIHD酵素はミオに対してもカイロに対しても特異性は無いと考えられ、測定酵素はそのまま市販のものを使用して、ミオとカイロのいずれかイノシトールの抗体（特開平8-21835号広報によるカイロイノシトール抗体による免疫測定法として開示された抗体を用いる等）を使用し、いずれかの抗体でそのイノシトールを免疫阻害する阻害法で測定することにより、抗体を使用しない場合が、総イノシトール量で、ミオタイプの抗体の場合の値を引くとカイロイノシトール量となり、カイロタイプの場合はミオイノシトール量となると考えられた（カイロイノシトールの抗体については特許化されておりそれを入手する必要がある）。しかも総イノシトールに対するカイロイノシトールの比を取れば、カイロイノシトール量をより大きな値として反映できる可能性があると考えた。

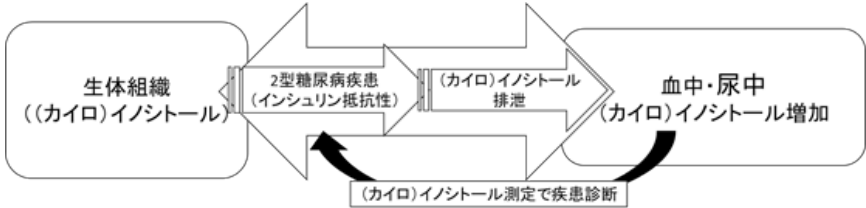
しかし、この開発の頃、旭化成ファーマ(株)が、ミオイノシトール測定キットのルシカMIを販売し（ミオイノシトールのみ測定）、実質、2型糖尿病の指標的なブドウ糖負荷試験を反映できるとされ、新規保険収載検査項目として平成20年1月1日より反映されることになった。その為、この開発は非常に高いハードルとなり、開発を中断した。つまり、研究結果を出すには至らなかった。

しかしながら、カイロイノシトールと総イノシトールの比は尿中を考えると蓄尿を取る必要のない部分尿などでも期待でき、また、ブドウ糖の負荷試験をしないでも優位な値を反映するのではないかと予想され、今後の研究に期待したい。

【以上述べた先人論文3例目の内容を以下に簡単にまとめる】

① 2型糖尿病でカイロイノシトール測定 of 臨床的意義の概要

(2型糖尿病患者でカイロイノシトールが血中や尿中に増加する)

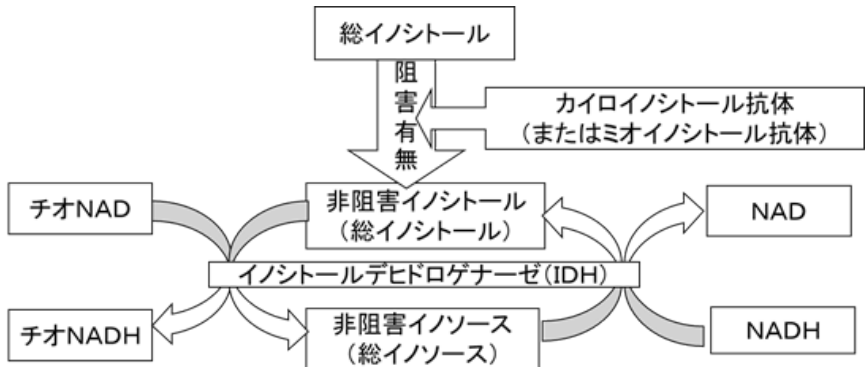


2型糖尿病疾患により生体組織から排泄される血中・尿中の (カイロ) イノシトールの増加量を測定により疾患の診断を行う。

②カイロイノシトールの働き

イノシトールは特に通常糸球体より排泄され尿細管で再吸収されるが、高血糖状態においてグルコースと競合する為、グルコースが代わりに再吸収されて尿排泄量が増加する。特にイノシトール異性体であるカイロイノシトールの増加が大きいとされている。

③カイロイノシトール測定の原理



イノシトールにはミオイノシトールとカイロイノシトールの2つの異性体が存在する。この合計の異性体を総イノシトールとする。

イノシトールデヒドロゲナーゼ (IDH) 酵素を用いイノシトールを測定する

方法である。

最初に抗体を添加しない状態でイノシトールを補酵素チオ NAD で IDH 酵素によりイノソースとチオ NADH に変換し、更に補酵素 NADH と IDH でイノシトールに変換させ、繰り返し酵素サイクリングを用いてチオ NADH の色の変化の増加量から総イノシトール量を測定する。

別に、カイロかミオタイプのイノシトールの抗体で各イノシトールと結合させ、抗体を結合させたイノシトールは次のイノシトールデヒドロゲナーゼの酵素の反応を阻害する。非阻害イノシトールは補酵素チオ NAD で IDH 酵素により非阻害イノソースとチオ NADH に変換し、更に補酵素 NADH と IDH で非阻害イノシトールに変換させ、繰り返し酵素サイクリングを用いてチオ NADH の色の変化の増加量から非阻害イノシトール量を測定する。

カイロイノシトール量（ミオイノシトール抗体では非阻害イノシトール量になる）は総イノシトールと非阻害イノシトール量（カイロイノシトール抗体）の差から求めることが出来る。

### ③カイロイノシトール測定の実験の解説

[先人論文の課題]

最初の先行文献ではカイロイノシトールの測定は GC - MS といった高額な装置を用い測定されている。

課題は高額な装置を使用しない方法が望まれていた。

次の文献内容はイノシトールデヒドロゲナーゼを用いる方法でイノシトールを測定されていた。これではイノシトールの異性体（カイロとミオタイプの2種類が主異性体）が分別測定できない。

[新たな測定方法への模索]

異性体を分別測定するためにイノシトールの抗体を用いる方法を考案した。

上記記載のカイロイノシトール測定の実験のとおり、一方のイノシトールに対する抗体を反応させ、抗体が結合したイノシトールに対してイノシトールデヒドロゲナーゼ酵素が働かないようにし、抗体が結合していないイノシトール

を測定する方法である。抗体と反応させないイノシトールを総イノシトール量として、抗体がある場合のイノシトール量とし、その差からカイロイノシトールを測定する。最終的にはカイロイノシトールとミオイノシトール（あるいは総イノシトール）の比を測定することにより、2型糖尿病の診断に適用する。比を測定することにより、測定の時間変動が少なく、尿検体の扱いでは、長時間の変化を見る蓄尿でなく短時間の変動を見る部分尿での可能性も期待できる。

現在、ミオイノシトール測定法が保険点数を取得して市販されているが、異性体の関係が反映できておらず2型糖尿病の診断が十分といえないと考えられ、今後の開発に期待したい。

#### 4. あとがき

先人の論文を元に新たに発掘し得られた研究に関して3点の内容を紹介させていただいた。まったくの初めから研究をスタートすることはまず無いと思われるので、論文との出会いからの研究がとても重要と考える。入念な検索あるいは偶発的に論文と出会うことにより、何かを感じ取って次へのステップの鍵になることは間違いないと思われる。出会いもラッキーな場合とそうでない場合もあるが、いずれも何らかの結論に結びつけることが出来る。そのため、ドラスティックな結果が出せるよう期待しながら、研究を進めて行きたい。論文に出会うには多くの検索と思考を惜しむなかれである。また、多くの違った側面から研究を進めるのも忘れてはならないと考える。今回、ご紹介した先行論文との出会いから研究の進め方・考え方について参考にしていただければ望外の喜びである。

(奈良県立医科大学非常勤講師・博士研究員・化学教室)