

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 5 日現在

機関番号：17301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2014

課題番号：23790051

研究課題名(和文) 抗癌剤の副作用リスクをスクリーニング検査できる新規蛍光誘導体化法の開発

研究課題名(英文) Development of a novel fluorescence derivatization method for the screening of the risk of side effects caused by anticancer drugs

研究代表者

柴田 孝之 (SHIBATA, Takayuki)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(薬学系)・助教

研究者番号：10448491

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、研究代表者が開発したウラシル特異的蛍光反応を、ハイスループットな尿中ウラシル濃度の定量に応用し、簡便かつ迅速なDPD欠損症の診断法の開発研究を行った。その結果、希釈した尿検体に試薬を添加し加熱するのみで、多検体の尿中ウラシル濃度を数分以内に検査できる手法を確立した。この結果は、本手法が臨床現場におけるDPD欠損症の簡易検査に適用可能であることを示唆するものである。また、本研究で用いたウラシル蛍光反応の反応条件を変更することで、シトシンおよびオロト酸に特異的な蛍光反応をそれぞれ発見した。

研究成果の概要(英文)：In this research, a uracil-specific fluorogenic reaction developed by our research group was applied to the quantification of urinary uracil concentration for the development of a facile and rapid diagnostic method of DPD deficiency. As a result, we have succeeded in a simultaneous analysis of urinary uracil level using multiple samples, which requires a simple addition of aqueous reagent solutions and heating for a few minutes. The result suggested that the present method would be applicable to the screening test of DPD deficiency at a clinical site. In addition, by changing the reaction conditions of the uracil-specific fluorogenic reaction, we also have discovered novel fluorescence derivatization methods specific to cytosine and orotic acid, respectively.

研究分野：有機化学、分析化学

キーワード：DPD欠損症 ウラシル ベンズアミドオキシム 蛍光反応 臨床検査 スクリーニング シトシン オロト酸

### 1. 研究開始当初の背景

5-フルオロウラシル(5-FU)を始めとするフッ化ピリミジン系抗癌剤は、DNA 合成阻害や RNA 機能阻害を誘発して抗癌活性を示す一方、核酸成分であるウラシルを分解するジヒドロピリミジンデヒドロゲナーゼ(DPD)によって不活化される。従って、DPD 活性が欠損している患者にフッ化ピリミジンを投与した場合、フッ化ピリミジンの血中濃度が異常に上昇し、重篤な副作用を引き起こす。先天的に DPD の活性が通常の30%以下である患者は、人口比で5%程度存在すると考えられているため、患者の DPD 活性には注意を払う必要がある。しかし、既存の DPD 活性検査法は煩雑であること、高額な検査費用を必要とすることから、フッ化ピリミジンの投与後に嘔気などの副作用や血液検査での異常が認められた場合に限り、その患者の DPD 活性が測定されている。そのため、DPD 欠損が判明して投与を中断したにも関わらず、副作用が重篤化して死に至った例が、日本を含め世界中で報告されている。このような事故を回避するためには、全てのフッ化ピリミジン投与対象者に対して投与前に DPD 活性を検査する必要があり、簡便・低コストかつ多検体を同時に検査できる、新しい DPD 欠損症の診断法の開発が強く望まれている。

### 2. 研究の目的

研究代表者らは最近、ウラシル特異的な、新しい蛍光誘導体化反応を開発した。この反応は、ベンズアミドオキシム(BAO)を蛍光試薬として用い、フェリシアン化カリウムの存在下、強塩基性水溶液中で2分間加熱するだけで、約50種類の生体成分のうちウラシルのみに強い蛍光を与えるものである。DPD 欠損患者では、尿中のウラシル濃度が増加することが知られているため、尿を用いて本反応に付しウラシル濃度を定量できれば、DPD 欠損症の診断に応用できると考えられる。本研究では、簡便・迅速かつ多検体を同時に測定できる、DPD 欠損症のスクリーニング検査法の創製を最終目標として、反応液の蛍光強度を測定するのみで尿中ウラシル濃度を定量できる手法の確立を試みた。

### 3. 研究の方法

(1)平成23年度は、尿に含まれるウラシルを蛍光法によって定量できる条件を探索した。具体的には、まず尿に含まれる蛍光性夾雑物質が蛍光を発しない励起波長でウラシルのみを蛍光検出できる BAO 誘導体の探索研究を行った。様々な置換基を持つ BAO 誘導体を用いて、励起波長或いは蛍光波長のレッドシフトが観察できるか確認した。また、反応条件の最適化を行い、ウラシル以外の物質に由来する蛍光強度を反応前後で変化させない条件を探索した。

(2)平成24年度は、反応液の蛍光強度を測定するのみで尿中ウラシルを定量するための、適切なブランク測定法について検討した。次に、尿検体に試薬を添加して蛍光反応に付し、反応液の蛍光強度を測定するのみで尿中ウラシルを定量できる、ハイスループットな尿中ウラシルの定量法の開発を試みた。

(3)平成25・26年度は、数人の健常人ボランティアから提供された尿試料を用いて、本手法の信頼性を評価した。すなわち、HPLC 法による尿中ウラシル/ジヒドロウラシル比の測定を試みると同時に、HPLC によるウラシル定量値と本手法によるウラシル定量値の誤差を評価した。また、マイクロプレートリーダーによる多検体の同時検査を試みた。加えて、反応条件を変化させることで、ウラシル以外の核酸塩基に対して特異的蛍光検出が可能になるかスクリーニングを行った。

### 4. 研究成果

(1)BAO の芳香環にメチル基、アミノ基、ニトロ基など、種々の置換基を有する15種類の BAO 誘導体を用いて、ウラシル由来の蛍光強度を測定した。その結果、どの BAO 誘導体を用いた場合でも、励起/蛍光波長のレッドシフトは観測されなかったが、BAO の3位にメチル基を導入した3-メチルBAO(3-MBAO)は、BAO と比較して約1.2倍強い蛍光をウラシルに対して与えた。そこで、BAO と3-MBAO を用いて、尿中ウラシルの蛍光誘導体化反応を高速液体クロマトグラフィーで評価したところ、尿中夾雑物質由来の蛍光強度に違いは見られなかった。これらの結果より、尿中ウラシル定量を行う場合、3-MBAO の方が尿中の蛍光性夾雑物質の影響を受けにくいことが明らかになった。

(2)まず、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)を用いて、試薬の種類・反応時間・反応温度等を変化させて、尿中蛍光物質の反応前後における蛍光強度を網羅的に調査した。その結果、尿検体にフェリシアン化カリウムを添加せずに加熱した場合の尿中蛍光物質の総和が、全ての試薬を添加し加熱して得られた蛍光の総和からウラシル由来の蛍光を差し引いた値とほぼ等しくなることを見出した。この結果を踏まえ、標準添加法による尿中ウラシル定量を行った。すなわち、濃度既知のウラシル標準液を尿に添加し蛍光反応に付した後、得られた蛍光強度を上述のブランクで差し引き得られた直線の切片から、尿に含まれるウラシルの絶対量を算出した。この手法により、1検体に対して4種の反応液を作成し、これらの反応液の蛍光強度を測定するのみで尿中ウラシル濃度を定量できる可能性を明らかにした。

(3)健常人の尿中ウラシルの定量を行ったところ、サンプル間で反応阻害率や夾雑物質の

量に大きな差があり、尿を直接用いてウラシルを蛍光体に変換させるための標準プロトコールの作成が困難であることが分かった。そこで、反応阻害物質や蛍光性夾雑物質に関して物性を評価したところ、ウラシル定量を特に妨げる物質は、ウラシルと比較して非常に低極性であることが明らかになった。そこで、希釈尿を蛍光反応に付した後、生じたウラシル蛍光体を有機溶媒で抽出することによって、全ての尿検体においてウラシル蛍光体のみが検出できることが分かった。また、氷冷した反応液を 96 穴マイクロプレートに移し、マイクロプレートリーダーで蛍光強度を測定することで、10 検体の同時尿中ウラシル定量が可能であることを見出した。

更に、3-MBAO の類縁体である 4-トリフルオロメチル BAO を用い、反応液にジメチルホルムアミドを添加することで、本反応がシトシン特異的に蛍光を与えることを発見した。この反応は、ウラシルをはじめ、他の類似構造を有する化合物や生体物質を含む約 70 種の物質に対して全く蛍光を与えないという特異性を示した。また、強塩基として用いる水酸化カリウムの代わりに炭酸ナトリウムを使用することで、本反応がオロト酸特異的に蛍光を与えることを見出した。現在、本反応を尿中オロト酸の定量に応用し、オロト酸尿症のスクリーニング検査法の開発研究へ展開中である。

#### 5 . 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 14 件)

El-Mahdy AF, Ejupi V, Shibata T, Kabashima T, Lu J, Kai M., Facile preparation of streptavidin-coated sephadex beads and their application to chemiluminescence detection of a target DNA, *Microchim. Acta*, 182, 495-503, 2015, 査読有.

DOI: 10.1007/s00604-014-1348-9

Baj S, Krawczyk T, Pradel N, Azam MG, Shibata T, Dragusha S, Skutil K, Pawlyta M, Kai M., Carbon Nanofiber-based Luminol-biotin Probe for Sensitive Chemiluminescence Detection of Protein, *Anal. Sci.*, 30, 1051-1056, 2014, 査読有.

DOI: 10.2116/analsci.30.1051

Yasmin H, Rahman MS, Shibata T, Kabashima T, Kai M., A Novel Fluorometric Method for the Selective Determination of Pro-Gly and Pro-Gly-Pro, *Int. J. Pept. Res. Ther.*, 20, 441-446, 2014, 査読有.

DOI: 10.1038/srep04950

Yasmin H, Kabashima T, Rahman MS, Shibata T, Kai M., Amplified and

selective assay of collagens by enzymatic and fluorescent reactions, *Sci. Rep.*, 4, 4950, 2014, 査読有.

DOI: 10.1007/s10989-014-9406-z

Dragusha S, Shibata T, Yin S, Fujita JY, Kabashima T, Kai M., Selective, sensitive and fluorometric determination of urinary cytosine with 4-trifluoromethylbenzamidoxime and N,N-dimethylformamide, *Clin. Chim. Acta*, 429, 123-128, 2014, 査読有.

DOI: 10.1016/j.cca.2013.11.027.

El-Mahdy AF, Shibata T, Kabashima T, Kai M., Dendrimer-like polymeric DNAs as chemiluminescence probes for amplified detection of telomere DNA on a solid-phase membrane, *Chem. Commun. (Camb)*, 50, 859-861, 2014, 査読有.

DOI: 10.1039/c3cc47454b

Smanmoo S, Kawasaki S, Tangboriboonrat P, Shibata T, Kabashima T, Kai M., Selective FL quenching or enhancing of diimine ligands by guanine, *J. Fluoresc.*, 23, 853-857, 2013, 査読有.

DOI: 10.1007/s10895-013-1216-8

Rahman MS, Kabashima T, Yasmin H, Shibata T, Kai M., A novel fluorescence reaction for N-terminal Ser-containing peptides and its application to assay caspase activity, *Anal. Biochem.*, 433, 79-85, 2013, 査読有.

DOI: 10.1016/j.ab.2012.10.018.

Zhu Q, Shibata T, Kabashima T, Kai M., Inhibition of HIV-1 protease expression in T cells owing to DNA aptamer-mediated specific delivery of siRNA, *Eur. J. Med. Chem.*, 56, 396-399, 2012, 査読有.

DOI: 10.1016/j.ejmech.2012.07.045.

Yasmin H, Shibata T, Rahman MS, Kabashima T, Kai M., Selective and sensitive determination of peptides using 3,4-dihydroxyphenylacetic acid as a fluorogenic reagent, *Anal. Chim. Acta*, 721, 162-166, 2012, 査読有.

DOI: 10.1016/j.aca.2012.01.035.

Azam MG, Shibata T, Kabashima T, Kai M., Alkaline phosphatase-labeled macromolecular probe for sensitive chemiluminescence detection of proteins on a solid-phase membrane, *Anal. Bioanal. Chem.*, 401, 1211-1217, 2011, 査読有.

DOI: 10.1007/s00216-011-5196-8.

Azam MG, Shibata T, Kabashima T, Kai M., Sensitive Chemiluminescence Detection of Prion Protein on a Membrane by Using a

Peroxidase-Labeled Dextran Probe, Anal. Sci., 27, 715-720, 2011, 査読有.

DOI: 10.2116/analsci.27.715.

Shibata T, Wainaina MN, Miyoshi T, Kabashima T, Kai M., A manual sequence method of peptides and phosphopeptides using 4-(1'-cyanoisoin-dolyl) phenylisothiocyanate, J. Chromatogr. A, 1218, 3757-3762, 2011, 査読有.

DOI: 10.1016/j.chroma.2011.04.040.

Yamasuji M, Shibata T, Kabashima T, Kai M, Chemiluminescence detection of telomere DNA in human cells on a membrane by using fluorescein-5-isothiocyanate-labeled primers, Anal. Biochem., 413, 50-54, 2011, 査読有.

DOI: 10.1016/j.ab.2011.01.047

[学会発表](計41件)

椛島力, 曾宮実和子, 柴田孝之, 甲斐雅亮, 3,4-DHPAA 蛍光反応の新規プロリダーゼ活性測定法への応用, 日本薬学会第135年会, 2015年3月25~28日, 神戸学院大学他(神戸市).

川島歌織, 椛島力, 柴田孝之, 甲斐雅亮, ペプチドに特異的な蛍光反応を用いた HIV/HCV 識別法の開発, 第31回日本薬学会九州支部大会, 2014年12月6~7日, 第一薬科大学(福岡市).

曾宮実和子, 椛島力, 柴田孝之, 甲斐雅亮, 4-DHPAA を用いた新規プロリダーゼ活性測定法の開発. 第31回日本薬学会九州支部大会, 2014年12月6~7日, 第一薬科大学(福岡市).

尹晟, 椛島力, 柴田孝之, 甲斐雅亮, Dihydroorotate dehydrogenase assay using a specific fluorescence reaction, 日本分析化学会第63年会, 2014年9月17~19日, 広島大学(広島市).

Valon Ejupi, 椛島力, 柴田孝之, 甲斐雅亮, Assay of collagenase activity in human cells using a novel fluorescence reaction, 日本分析化学会第63年会, 2014年9月17~19日, 広島大学(広島市).

椛島力, 朱欽昌, 川島歌織, 矢ヶ部良太, 柴田孝之, 甲斐雅亮, ペプチド特異的蛍光誘導体化反応を用いた変異型 HIV-1 プロテアーゼの識別, 日本薬学会第134年会, 2014年3月27~30日, 熊本大学他(熊本市).

椛島力, 朱欽昌, 川島歌織, 矢ヶ部良太, 柴田孝之, 甲斐雅亮, 薬剤耐性を示す HIV-1 プロテアーゼの新規蛍光識別法の開発, 第54回日本熱帯医学会大会, 2013年9月10-12日, 長崎大学(長崎市).

Sheng Yin, Takayuki Shibata, Shpend Dragusha, Jun-ya Fujita, Tsutomu

Kabashima, Masaaki Kai, A novel and specific fluorescence reaction for orotic acid, The Twelfth Asian Conference on Analytical Sciences, 2013年8月22-24日, 九州大学(福岡市).

川島歌織, 椛島力, 朱欽昌, 永本佳菜子, 矢ヶ部良太, 柴田孝之, 甲斐雅亮, 新規蛍光反応を用いたウイルス識別法の開発, 第50回化学関連支部合同九州大会, 2013年7月6日, 北九州国際会議場・AIMビル(北九州市).

松木勝仁, 椛島力, 朱欽昌, 永本佳奈子, 矢ヶ部良太, 川島歌織, 柴田孝之, 甲斐雅亮, マイクロチップ電気泳動を用いた迅速なペプチド検出法の開発, 第29回日本薬学会九州支部大会, 2012年12月8-9日, 熊本大学(熊本市).

Dragusha Shpend, 柴田孝之, 尹晟, 椛島力, 甲斐雅亮, A novel fluorescence derivatization reaction specific for cytosine, 日本分析化学会第61年会, 2012年9月19-21日, 金沢大学(金沢市).  
尹晟, 柴田孝之, Shpend Dragusha, 椛島力, 甲斐雅亮, A fluorescence reaction for the sensitive quantification of orotic acid, 第30回九州分析化学若手の会 夏季セミナー, 2012年7月27-28日, 休暇村指宿(指宿市).

Yasmin Hasina, 柴田孝之, Rahman Mohammed Shafikur, 椛島力, 甲斐雅亮, A highly sensitive and quantitative assay for collagen in biological sample by a novel fluorescence reaction, 第72回分析化学討論会, 2012年5月19-20日, 鹿児島大学(鹿児島市).

Rahman Mohammed Shafikur, 椛島力, Yasmin Hasina, 柴田孝之, 甲斐雅亮, A novel fluorescence reaction for N-terminal serine-containing peptides and its application to assay of caspase activity, 第72回分析化学討論会 2012年5月19-20日, 鹿児島大学(鹿児島市).  
Shpend DRAGUSHA, 柴田孝之, 藤田順也, 尹晟, 椛島力, 甲斐雅亮, 4-Trifluoromethylbenzamidoxime as a specific fluorogenic reagent for cytosine, 日本薬学会第132年会, 2012年3月28-31日, 北海道大学(札幌市).

尹晟, 柴田孝之, 藤田順也, Shpend DRAGUSHA, 椛島力, 甲斐雅亮, A fluorescence reaction for the sensitive quantification of orotic acid, 日本薬学会第132年会, 2012年3月28-31日, 北海道大学(札幌市).

Rahman Mohammed Shafikur, 椛島力, Yasmin Hasina, 柴田孝之, 甲斐雅亮, カスパーゼ3および8活性の新規蛍光測定法の開発, 日本分析化学会第60年会, 2011年09月14-16日, 名古屋大学(名古屋市).

Yasmin Hasina, 柴田孝之, Rahman Mohammed Shafikur, 椛島力, 甲斐雅亮, Determination of collagen in mammalian tissue by a novel fluorescence reaction, 日本分析化学会第 60 年会, 2011 年 09 月 14-16 日, 名古屋大学(名古屋市).

藤田順也, 柴田孝之, Akhoondi Reza, 椛島力, 甲斐雅亮, 3-メチルベンズアミドオキシムを用いた尿中ウラシル定量法およびジヒドロピリミジン脱水素酵素欠損症診断への応用, 日本分析化学会第 60 年会, 2011 年 09 月 14-16 日, 名古屋大学(名古屋市).

柴田孝之, 甲斐雅亮, ウラシル特異的な蛍光反応による DPD 欠損の簡易診断, 第 10 回国際バイオ EXPO, 2011 年 6 月 29 日-7 月 1 日, 東京ビッグサイト(東京都).

〔産業財産権〕

取得状況 (計 1 件)

名称 : URACIL-SPECIFIC FLUORESCENCE DETECTION REACTION AND METHOD FOR EXAMINING DIHYDROPYRIMIDINE DEHYDROGENASE DEFICIENCY

発明者 : 甲斐雅亮, 柴田孝之

権利者 : 同上

種類 : 特許

番号 : US8, 871, 520 B2

出願年月日 : 2013 年 2 月 28 日

取得年月日 : 2014 年 10 月 28 日

国内外の別 : 外国

6. 研究組織

(1) 研究代表者

柴田 孝之 (SHIBATA, Takayuki)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(薬学系)・助教

研究者番号 : 1 0 4 4 8 4 9 1

(2) 研究協力者

藤田 順也 (FUJITA, Jun-ya)

DRAGUSHA, Shpend

尹 晟 (YIN, Sheng)

島村 亮祐 (SHIMAMURA, Ryosuke)