ポリアミン
Polyamine

Vol.6 No.2
Nov. 2019

巻頭言
鈴木 秀之
シリーズ ポリアミン研究
川喜田 正夫、平松 恭子
シリーズ 実験手技ノート
東 恭平
最新の研究紹介
宮本 みなほ
秀瀬 涼太
西尾 天志
福田 青郎
松本 光晴
植村 武史
学会レビュー
下川 ひろみ

日本ポリアミン学会
The Japanese Society of Polyamine Research

ポリアミン
Polyamine

Vol. 6 No. 2
Nov. 2019

巻頭言

・ 抹茶の深緑への想い　鈴木 秀之　30

シリーズ ポリアミン研究

・腫瘍マーカーとしてのポリアミン　川喜田 正夫、平松 恭子　32

シリーズ　実験手技

・LC-MS/MSを用いた尿中3-hydroxypropylmercapturic acidの分析　東 恭平　43

最新の研究紹介

・イネ芽生えの成長とポリアミン関連遺伝子発現に対するサーモスペルミンの効果
　宮本 みなほ　50
・分岐鎖ポリアミン合成酵素のC末端部位の触媒反応における重要性
　秀瀬 涼太、藤原 伸介　50
・抗腫瘍活性を有するノルスペルミジンがDNA高次構造と遺伝子機能に及ぼす特異的作用
　西尾 天志　51
・超好熱菌細胞内で大型ポリアミンにより発現が制御される遺伝子
　福田 青郎、藤原 伸介　51
・腸管細菌叢のポリアミン産生誘導による血管内皮機能の改善：無作為化二重盲検並行群間比較試験
　松本 光晴　52
・GSTπはアクチン再構築を介してcaveolin-1調節性ポリアミン取り込みを促進する
　植村 武史　52

学会レビュー

・“2019年ポリアミンに関するゴードン会議”に参加して　下川 ひろみ　53

事務連絡　55

編集後記　56

ポリアミン投稿ガイドライン　57

日本ポリアミン学会
The Japanese Society of Polyamine Research

ポリアミン（2019）6:30-31

抹茶の深緑への想い

鈴木 秀之
（京都工芸繊維大学）

深緑は６月の季語だそうですが、私は抹茶の深緑をイメージしてしまい、それは盛夏である７月８月に結びついてしまいます。なぜそうなるのか。話は少し長くなります。私は京都にある私立の中高一貫校の卒業生です。毎年８月初めに学校全体の同窓会があり、卒業年次順送りで幹事当番が回ってきて、各学年がいろいろ工夫を凝らします。

ちょうど10年前が私達の卒業年次が当番でした。当時武者小路千家の千宗守家元が同窓会の会長をされていたこともあり、同窓会に来て頂いた同窓生をお茶席でもてなすということになりました。７月に４回ある土曜日に特別にお家元直々に稽古をつけていただけることになり、同期の幹事から「何回出席できるか」と問い合わせがありました。長年京都で暮らしていながらそういったことに馴染んでおらず、同窓会もすっかりご無沙汰していたので、せっかくの機会だからと気楽に「４回」と答えて、７月の第一土曜日の昼下がりに官休庵に出かけていきました。地下鉄今出川駅から武者小路通を西に進み、新町通を渡り終えると官休庵の前辺りにおじさん達が20人近く集まって異様な雰囲気を醸しているのが目に入ってきました。近づくと何と見覚えのある私の同期生達。皆、手に持った扇子で扇ぎながら「暑い」「暑い」といっています。気がつけば私も扇子を使いながら同じ仕草。このとき、鏡に映された自分を見たようで、「自分はおじさんなんだ」とつくづく実感しました。「気づくの遅過ぎ」と言われそうです。大学ではいつも若い学生達に囲まれているので自分もいつまでも若い気でいましたが、考えれば学生が扇子を使っているのを見たことがありません。

さて、官休庵の稽古場に通して頂き、役割分担の上、その役割ごとに練習をすることになりました。幹事から「当日は５人が代わる代わるお手前をすることにしたし。で、４回全部に出席できる鈴木はお手前担当ね」と宣告され、その日から猛練習が始まりました。お家元の監督の下、社中の皆さんが丁寧にかつ辛抱強く教えて下さり、４回目には何とか一通りできるようになっていました。お家元から、「さすがは我が後輩達、試験前の一夜漬けに慣れているので覚えるのが早い」とお褒めの言葉？を頂き、同窓会当日も何とか役目を果たすことができました。

同窓会当日のお手前のことはあまり覚えていませんが、官休庵の露地の奥にある練習場に通って、棗[注1）]のふたを開けると、その中にふわっと軽やかに美しく盛られた抹茶の何とも言えない深緑色が今も深く印象に残っています。練習の度に、数杯のお茶を頂いたのですが、いつもとてもおいしくいたきました。お気に入りの銘茶を使っておられたであろうことはもちろんのこと、抹茶の量も、お湯の温度も量も、点て方も厳しくチェックを受けていたので当然かもしれませんが。

何回目かの練習で水屋に入ったとき、お弟子さん達が見たこともない大量の抹茶をふるいにかけ、棗に移し替えておられる姿を見ました。いつもの美しい抹茶の丘はこのように作られていたんだと知り、自分は本当に上辺を掠っただけと感じました。

ポリアミン（2019）6:30-31

話は変わりますが、抹茶は碾茶[注2)]を石臼で挽いて作られます。私達は、この碾茶がポリアミンであるスペルミジンとスペルミンの両方を高濃度含んでいることを見出しました。ポリアミン研究をされておられる皆様はよくご存じのことですが、ポリアミンは、ヒトを初めとする真核生物にとって必須のものです。ヒトは、オルニチン→プトレッシン→スペルミジン→スペルミンという順で生合成できます。しかし、残念なことに、加齢とともにプトレッシンからスペルミジンの合成能が衰えていきます。健康寿命伸長のためにはスペルミジン合成能の低下を補うことが有効だとの報告が相次いでいます。

幸いヒトは、食事から、あるいは腸内細菌が作ったスペルミジンやスペルミンを取り込むことで、補うことができます。京都府特産のどの食材がスペルミジンやスペルミンを多く含んでいるかを調べると、緑茶の茶葉はスペルミジンとスペルミンの両方を多く含んでいることが分かりました。しかし、煎茶や玉露のように、お茶の葉にお湯を注いだのでは残念ながらほとんど抽出されません。しかし、抹茶はお茶の葉全体を摂取するという点が違います。腸管壁から抹茶中のスペルミジンとスペルミンが吸収されるかは判っていませんが、抹茶は粒が細かく、私達は菌体内のポリアミン量測定時に酸抽出を行っていることから、胃酸で抽出されると考えています。覆下自然仕立てで栽培され、先端の数葉のみが収穫されて作られる宇治の高級碾茶のスペルミジンとスペルミン量が特に高かったことから、京都府の茶業研究所は、「高品質抹茶摂取時の機能性の医学的評価」の研究委託を今年度から始めました。これまでポリアミンに興味を持っておられなかった方々にもポリアミンに興味を持っていただく機会となって、ポリアミン研究の輪が広がり、すばらしい研究成果が発表されることを期待して私の巻頭言を終わらせていただきます。

注１）　なつめ。抹茶を入れておく容器。

注２）　てんちゃ。抹茶の原料となる蒸し製緑茶の一種。玉露と違って蒸した後、揉まずに乾燥する。

ポリアミン（2019）6:32-42

腫瘍マーカーとしてのポリアミン

川喜田 正夫[a]、平松 恭子[b]

公財）東京都医学総合研究所　幹細胞プロジェクト
〒156-8506 東京都世田谷区上北沢2-1-6
連絡先　川喜田正夫、e-mail: kawakita.ms@gmail.com

I.　はじめに

1971年にRussellは、尿中に排泄されるポリアミン量が癌患者で増加すること、固形癌では外科的切除によって健常者のレベルに復帰することを報告した[1,2]。これを契機として「腫瘍マーカーとしてのポリアミン」が意識され、尿中ポリアミンの分析に研究者が関心をもつようになってから半世紀になろうとしている。私達がジアセチルスペルミン（DiAcSpm）の存在を見いだして研究をスタートさせ、おくれてこの話題に深く関わるようになった1990年代の初めは、20年余りの尿中ポリアミン研究を通じて尿中総ポリアミンや尿中の主要モノアセチルポリアミンが実用的な腫瘍マーカーとして有効とはいえないという見方が広く定着しようとしていた時期であり[3,4]、腫瘍マーカーとしてのポリアミンの研究が下火になりつつある時期であった。その時から数えてもすでに30年近い時間が経過した。尿中DiAcSpmを腫瘍マーカーとして確立し、臨床に役立てるという目標に向けて進めてきた私達の研究の紆余曲折をこのあたりで振り返ってみようと思う。

II.　DiAcSpmとの出会いとその後

1970年代、80年代に蓄積されたデータは、癌患者の尿中でポリアミンが上昇する傾向は明らかであるものの、その増え方が健常者とあまり変わらない場合や良性疾患でも同じように上昇する場合があるために腫瘍マーカーとしての切れ味に欠け、実用性は期待できないという評価[3]に要約されるものであった。HPLCによる私達の尿中ポリアミン分画分析の結果も全体としては当然同じような傾向を示していた。ここで幸運だったのは私達が分画後のポリアミンを酵素法で検出定量する方法を利用していたことであり[5]、このことが、それまでの研究の中ではほとんど問題にされたことがなかったDiAcSpmおよびジアセチルスペルミジン（DiAcSpd）に私達を導いてくれることになった。1級アミノ基の反応性を利用する、現在でも一般的な検出定量法ではジアセチルポリアミンが検出できないのに対して、酵素法はジアセチルポリアミンに対しても高い検出性能を示すことができたのである。

私自身にとっては初参加となった1993年1月の第9回ポリアミン研究会（城西大学）で、藤田保健衛生大の永津グループから癌患者の尿中にDiAcSpmが検出されたことが報告された[c]。当時私達は、C18カラムで分画したポリアミン成分を固定化酵素カラムに通し、脱アセチル化した後にオキシダーゼで酸化して、生成したH_2O_2を電気化学検出器で定量するという方法でHPLCによる分画分析を行っていた[5]。ジアセチルポリアミンがあるとすれば、私達のシステムでも検出できるはずだ、そして、DiAcSpmの性質から考えて、保持時間はAcSpmよりも長いだろうと考えられた。だがそれまでは、AcSpmが溶出したところで私達は次の測定の準備に入っており、その部分のデータはとっていなかった。「そういえば、検出器の電極を再生してベースラインの戻りを待っているときに『ときどき』おか

[a]現在：東京都医学総合研究所　客員研究員
[b]現所属：東京都健康安全研究センター

[c]この時の報告でも引用されていたが、癌患者の尿中にDiAcSpmが検出されることは、van den Bergらによって1986年に報告されていた（van den Berg *et.al*. Clin Chem 32: 1930-1937 (1986)）。しかし、その後この研究の進展は報告されていない。

ポリアミン（2019）6:32-42

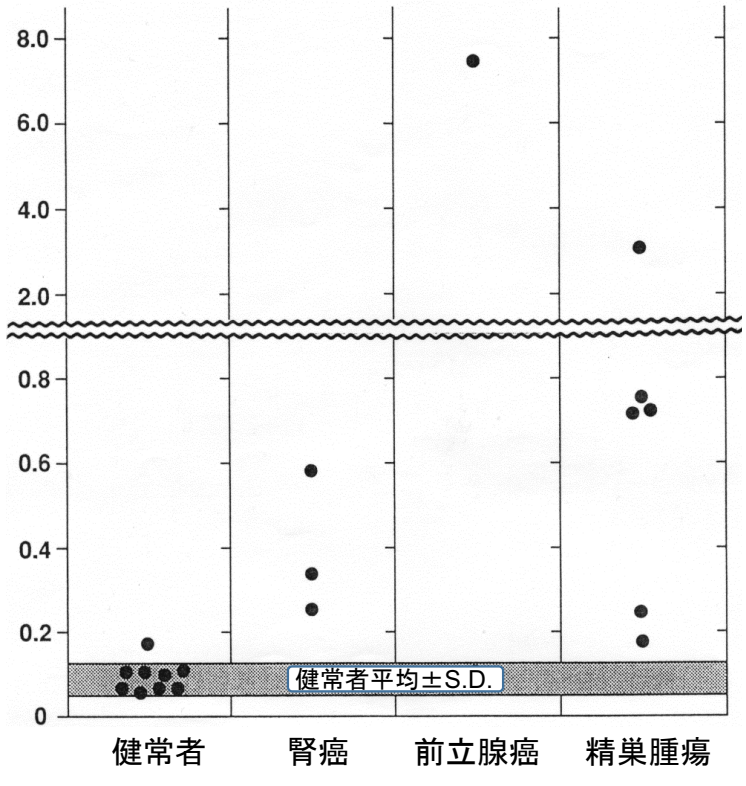


図1．DiAcSpmの同定後、最初に行った健常者と癌患者の尿中DiAcSpmの測定結果

健常者と腎癌、精巣腫瘍、前立腺癌患者の尿中DiAcSpmをHPLCで測定し、クレアチニン補正値を比較した。

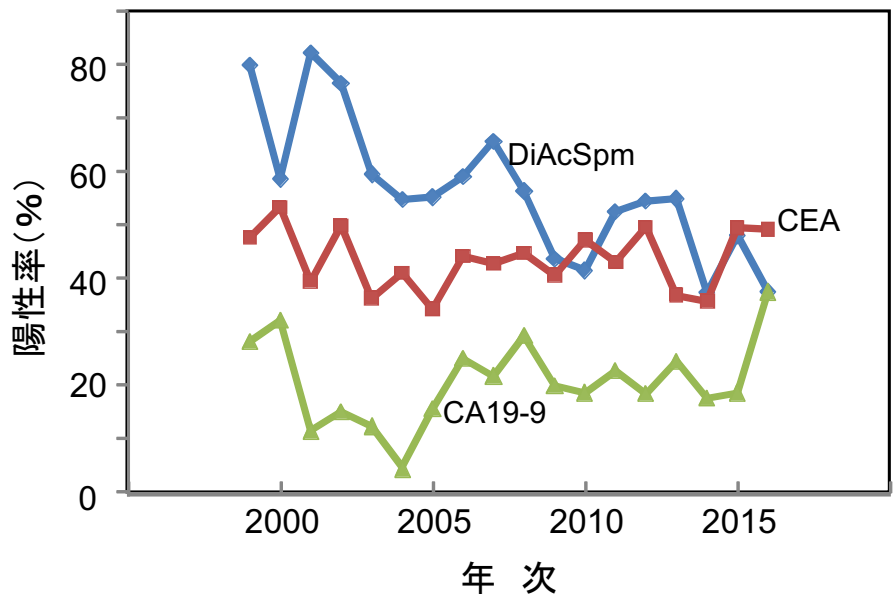
しなピークが出ることがあります。」平松のこんな気づきがきっかけで、分析時間を延ばしてみたところ、ある精巣腫瘍の患者の尿で非常にはっきりしたピークが出てきた。鮫島(当時城西大学)博士から供与を受けたDiAcSpmの標準品と一致する物質であった[6]。それならば、ということで、当時ストックしてあった健常者と、駒込病院泌尿器科の尿検体についてまとめて測定した最初の測定結果を図1に示す。これは、予想をはるかに超えたデータで、私とポリアミンの世界の結びつきを決定づけることになった結果であった。

HPLCによる分画とアシルポリアミンアミドヒドロラーゼ、ポリアミンオキシダーゼ、プトレスシンオキシダーゼの3種類の固定化酵素を利用するポリアミン検出系を組み合わせた分析系[5]を用いた初期の研究を通じて、2種類のジアセチルポリアミン、DiAcSpmとDiAcSpdが同定され、さらに、それらが尿中の主要成分である各種のモノアセチルポリアミンと比較して格段に癌との関連性が高く、特に前者は癌検出感度に優れ、後者は癌特異度が高いというそれぞれ異なる特徴を示すことが明らかになった[6, 7]。私達はここでこの2種類のジアセチルポリアミンに的を絞り、人々の関心が失せ始めていた腫瘍マーカーとしてのポリアミンの臨床応用を目指した研究を再出発させることにした。これに続く10年余りの研究については簡単なまとめの記事を2006年に記した[4]。この間の経過を編年史的に要約しよう。

HPLCによる分析の結果を見た臨床検査の専門家の反応は、「臨床検査に応用したいのなら抗体を作って測定の簡便化を図れ。」ということであった。N^1-アセチルスペルミジン(N^1Ac-Spd)とDiAcSpmの構造の一部が共通しており、しかも健常者尿中における両者の存在比が30:1でDiAcSpmが圧倒的に少量であることを考えると、尿中のDiAcSpmをN^1Ac-Spdと識別し、定量することができるだけの高い特異性を持つ抗DiAcSpmハプテン抗体を作成するのは無理ではないかという懸念もあった。しかし幸いなことにこのハードルは比較的早くクリアーすることができ、ウサギの抗血清からDiAcSpm特異性の高い成分を親和性精製することによってN^1Ac-Spdとの交差反応が0.04%という高度に特異的な抗DiAcSpm抗体を得ることができた[8] [d]。この抗体を使ってELISA系を構築し、臨床検査からの要請に応えるための基礎を整えたうえで、私達は腫瘍マーカーとしての価値を評価するために必要な、大量の臨床データを蓄積する研究に取りかかった。この時期に駒込病院大腸外科と共同で行った研究の結果は印象的なものであった。大腸癌患者約250名について、尿中DiAcSpmの陽性率を大腸癌の代表的な血清腫瘍マーカーであるCEAと比較したところ、DiAcSpmはCEAの約2倍の感度を示すことがわかった[9]。さらに注目されたのは、比較的早期の癌に

[d]その後、文献8とほぼ同様の方法でこの親和性精製抗体に匹敵する性能をもつモノクローナル抗体がトランスジェニック社およびミクリ免疫研究所で作成され、一定の性能をもつ検査薬の作成に不可欠の抗体の安定供給が可能になった。

ポリアミン（2019）6:32-42



年次	N
1999	31
2000	57
2001	143
2002	158
2003	121
2004	44
2005	91
2006	115
2007	57
2008	78
2009	97
2010	105
2011	64
2012	125
2013	122
2014	66
2015	68
2016	77

図2.　大腸癌患者の尿中DiAcSpm、血清CEA、および血清CA19-9 値の年次別推移

都立駒込病院大腸外科を受診した大腸癌患者の手術前腫瘍マーカー値。尿中DiAcSpmの測定法の変遷については本文を参照。ELISAと自動分析試薬の相関の結果に基づいて、後者の測定に基づいて設定したカットオフ値の1.2倍の値をELISAのカットオフ値として陽性率を算出し、作図した。CEA, CA19-9は都立駒込病院検査部で測定した。

おいては、CEAと比較してDiAcSpmの陽性率が著しく高いということであった。この結果は乳癌においても同様であった。尿中DiAcSpmが高い癌検出感度を示すことは、その後、いくつかのグループによって複数の癌種で認められることが報告された[10,11,12,13,14]。次節以下に述べる通り、DiAcSpmの陽性率にはその後、何故か経年的に若干低下する傾向が認められて私達を悩ませているのだが、癌の比較的早期の段階から既存の腫瘍マーカーと比較して高い陽性率を示す傾向は変わらない。いずれにしても、比較的早期の癌に対して高い感度を示すというこの特性が、幸いなことにいくつかの検査薬メーカーの注意を惹くことになった。そしてその中から、金コロイド凝集法による自動分析試薬キット（アルフレッサファーマ社）が開発された[15)] [e]。この試薬は汎用の生化学自動分析機に対応できるため、水分摂取量の違いによる尿の濃度の変動を補正するためのクレアチニン補正値の算出に必要な尿中クレアチニンの測定とともに臨床検査施設のルーチン測定に簡単に組み込むことができるもので、その臨床性能試験が進められている。この臨床試験の成績に基づいて体外診断薬としての承認を得ることができれば、DiAcSpmの臨床応用を目指した私達の研究にも一つの区切りが来ることになる。

III. 測定値の方法間比較と大腸癌患者の尿中DiAcSpm値の経年推移

20年以上に亘る尿中DiAcSpmの研究の中で最近になって私達は一つの厄介な問題に遭遇した。大腸癌患者の尿中のDiAcSpm測定値に一貫して減少傾向を示す経年推移が認められることである（図2）。並行して測定している血清CEA　値にはこのような経年推移は認められていない。尿中DiAcSpm測定値の中央値の年次別推移を見ても、陽性率の推移と同様にいずれの病期においても減少傾向が見られた。このことは、患者の集団が示す尿中DiAcSpm値が全体として経年的に減少する傾向があることを

[e]私達はその後、簡単な測定器で容易に尿中DiAcSpmが測定できる簡易測定系として、イムノクロマト法によるDiAcSpm測定系を開発した[Moriya S et al. J Clin Lab Anal 28:452-460 (2014)]。この測定系はその後、尿中クレアチニンとの同時測定キットとしてテクノメディカ社によって製品化され、現在、研究用試薬として販売されている　[このキットによる測定とその結果については、児玉他　日本臨床検査自動化学会検査自動化学会誌 43: 21-27 (2018)を参照]。

ポリアミン（2019）6:32-42

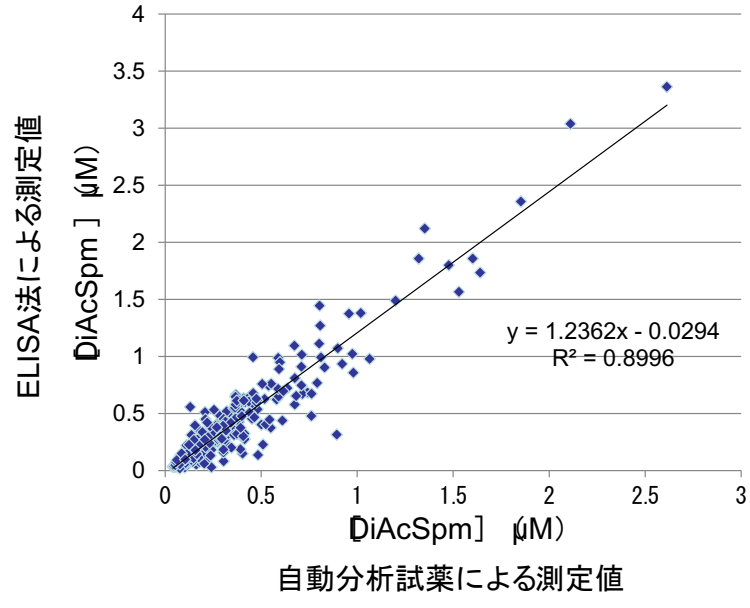


図3.　DiAcSpm測定値の方法間相関

トランスジェニック社のモノクローナル抗体を用いたELISA法による測定値とアルフレッサファーマ社の金コロイド法による自動分析試薬を用いた測定値を比較した。

示していた。

DiAcSpmの発見以来、臨床検査への応用を目指して、我々は常により簡便な測定法の開発、確立を図ってきた。臨床データの蓄積がこのような測定法の開発と並行して行われたため、図2の結果にも時期によって異なる方法で測定したデータが含まれていることになる。測定法の変遷は、以下のようにまとめられる。

1．HPLCによる分画測定（1993～1999）：直接的な化学分析であり、測定値の信頼性は高い。この方法による最初期のデータは図2には含まれていない。
2．特異的抗体（親和性精製ポリクローナル抗体）を用いて開発したELISA法（1999～2002.8）。ELISA法による測定値とHPLCによる測定値は極めてよく一致していた[8]。
3．トランスジェニック社が開発したモノクローナル抗体の供与を受けて改変したELISA測定系による測定（2002.8～2003.8）。
4．このトランスジェニック社の抗体を用いて、アルフレッサファーマ社と我々が共同開発した自動分析試薬による測定（2003.9以降）。これ以後、試薬は本質的には変わっていない。自動分析機による測定値とトランスジェニック社の抗体によるELISA法で得られた測定値（図3）はよく相関しているが、ELISA法による測定値は自動分析試薬による測定値より若干高めの値を示す傾向があることがわかった。

このような測定法の変遷を踏まえて、2003年以前と2003年以後の陽性率の違いの一部はELISA法と金コロイド法という測定法の違いに起因するものである可能性を否定できない。しかし、図2のデータは二つの測定法の間の相関係数を考慮して作図したものであり、測定法による違いは、大きな陽性率の違いの全てを説明するには十分でない。特に2003年以降は一貫して自動分析試薬を用いた測定結果を採用してきており、測定値の経年推移を測定法の変遷に帰することができないのは明らかである。また、2012年、2014年に測定した検体について、2017年に同一の測定法で再測定した結果は高い再現性を示し、金コロイド凝集法による自動分析試薬の優れた性能を確認させる結果となった。

そのようなわけで経年推移の原因は現在のところ不明である。受診患者の質が最近10年余りの間に大きく変化した事実はない。また、検査の対象は初診時の治療前の尿に限られているため、測定値の経年推移の原因を患者に対する処置、治療法の変化に

ポリアミン（2019）6:32-42

帰することもできない。2010年以降は測定値もある程度落ち着きを見せているようであるが、DiAcSpmの測定値の今後の推移についてはなお注意深く見守る必要があるだろう。私達は当初、DiAcSpmが単独で既存のマーカーに置き換わることができる性能をもつのではないかと期待した。しかし、このような経年推移の経験を経て、この期待は修正せざるを得ないようである。現在は、既存の有用なマーカー、例えばCEAとの組み合わせによって単独では得られない情報を引き出し、有用な診断補助手段として利用できる方向を目指すのが適当であると考えている。このことが今後、厳密な臨床試験によって実証されることを期待したい。

IV．DiAcSpmの生成と排出

DiAcSpmが体内でどのようにして生成しどのように排泄されるかということは、腫瘍マーカーとしての特性をよりよく理解するために重要な問題の一つである。大腸癌患者の手術検体を用いた研究によって、癌組織には早期の段階から隣接正常組織と比較して多量のDiAcSpmが含まれることが明らかになった[16]。胃癌、肺癌、子宮体癌についても、比較的早期の段階から癌組織におけるDiAcSpmの上昇が認められた。特に子宮体癌においては、腫瘍が子宮内膜に限局しているIa期の段階から、ほぼすべての検体でDiAcSpmの上昇が確認されている[17]。早期癌の段階から癌組織のDiAcSpm量が増大する傾向はヒトの癌に普遍的な現象であり、この組織DiAcSpmの増大が早期癌における尿中DiAcSpmレベルの上昇をもたらしているのだと考えられる。癌組織で生成し、組織から血中に排出されたDiAcSpmは腎糸球体でろ過され、他のポリアミン成分や各種の低分子物質とともに原尿中に排出された後、尿細管を経て最終的に尿中に排泄される。その過程で、他のポリアミン成分やミネラル、糖質などは種々の割合で尿細管から再吸収されて再び体内循環に戻されるが、DiAcSpmに対しては再吸収が起こらない[18]。その結果、DiAcSpmの尿中排泄量には体内における生成量が他のポリアミン成分と比較して鋭敏に反映されるのだと考えられる(図4)。この図式は大筋においては間違っていないと考えているが、問題がないわけではない。大腸腫瘍の場合、腫瘍組織のDiAcSpmは前癌状態と考えられる高度異型腺腫の段階ですでに高頻度で上昇することが示されている[16]。しかし、この段階では尿中DiAcSpmの上昇は見られていないケースが多い。

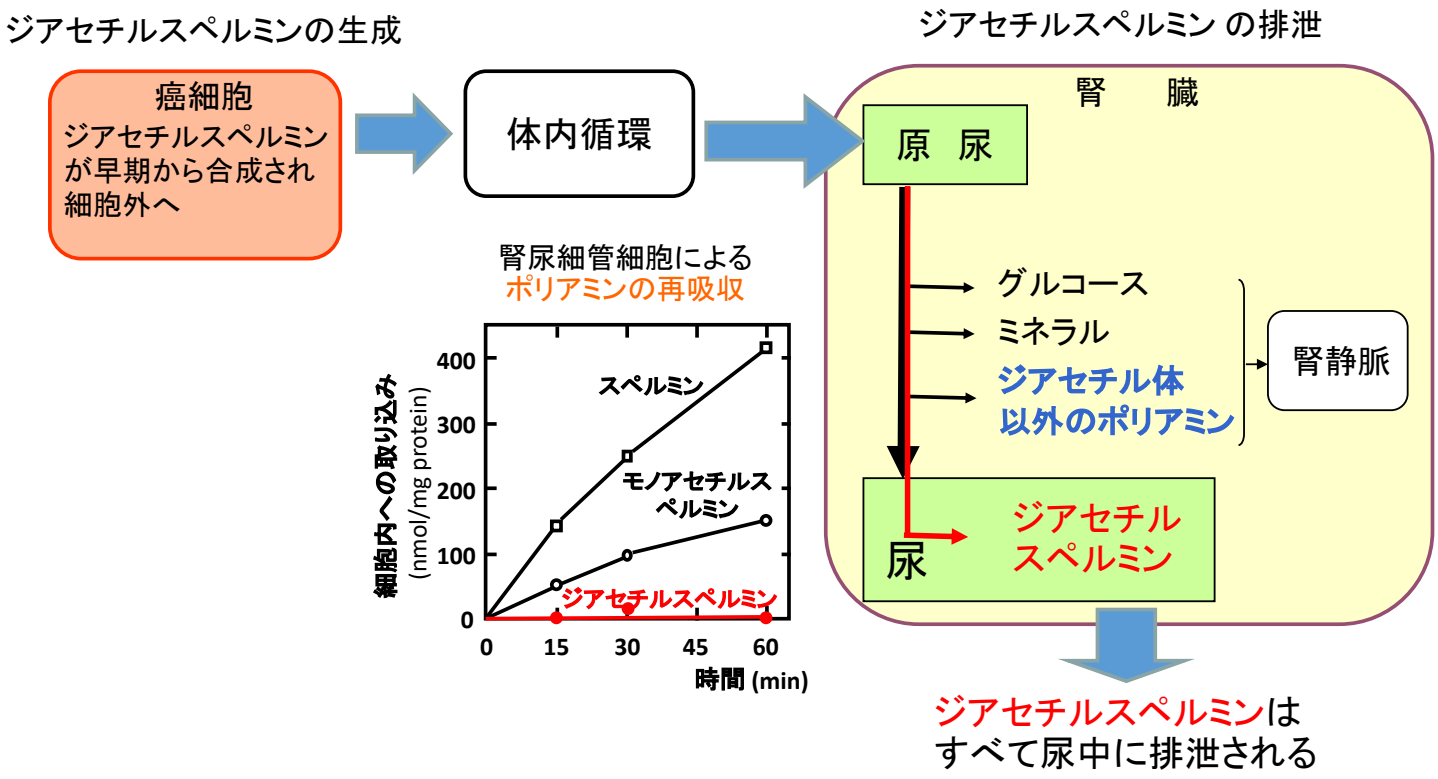


図4.　DiAcSpmの生成と排泄

ポリアミン（2019）6:32-42

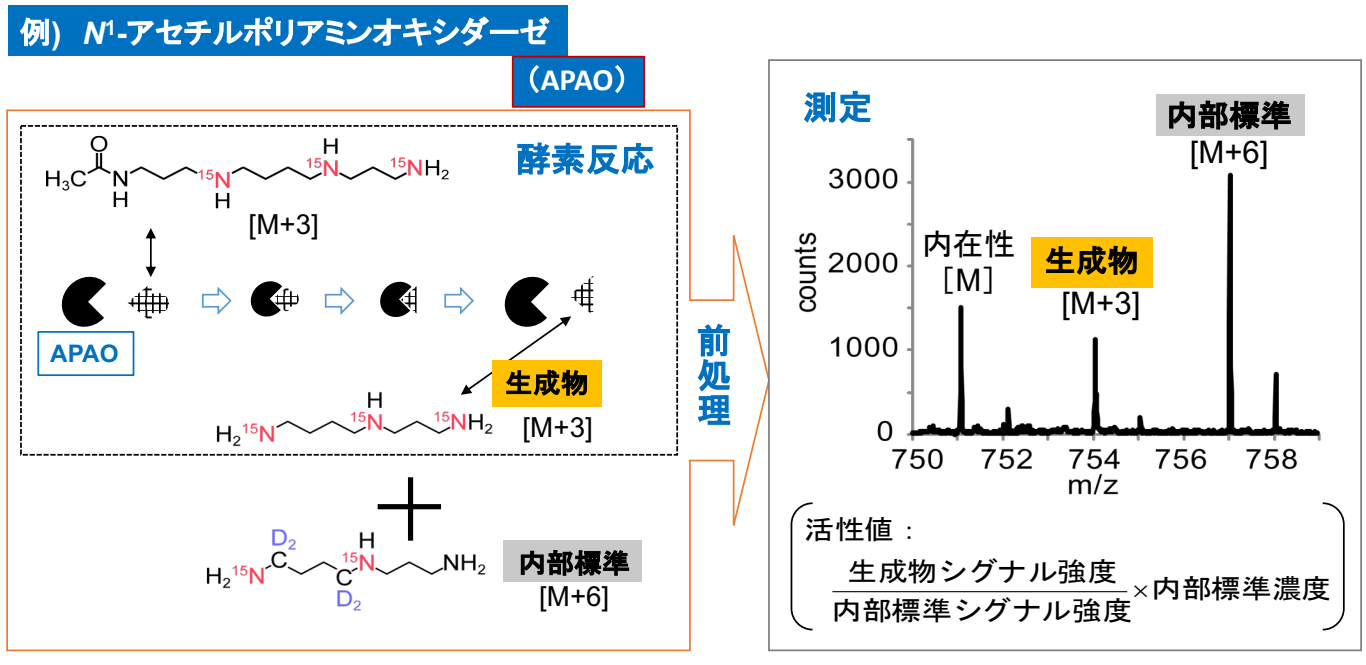


図5.　安定同位体標識基質を用いた質量分析法によるポリアミン代謝関連酵素活性の測定：　N^1-アセチルポリアミンオキシダーゼの場合

細胞内におけるポリアミンの代謝、とりわけポリアミンオキシダーゼによるアセチルポリアミンの分解経路はこれまでのところほとんど解析されていない。組織ポリアミン量と尿中ポリアミン量の乖離の原因を明らかにするためには細胞内のアセチルポリアミンの代謝について詳しく検討する必要があるのではないだろうか。

大腸癌および乳癌の組織でN^1Ac-Spdの上昇がみられることは1980年代から報告されていたが[19, 20]、癌化に伴うDiAcSpmの変化はもとより癌化に伴う細胞内のポリアミン代謝全般についてもまだ十分な解析は行われていない。ポリアミンの細胞内プールと代謝酵素系を包括的に解析するための方法として、私達は安定同位体標識ポリアミンおよび関連物質を用いた質量分析法による解析法を開発した。これは、ESI-TOF　マススペクトロメトリーによるポリアミンの定量[21, 22]を基礎とする比較的単純な方法である。安定同位体標識した基質を用い、酵素反応させると、生成物も標識体であるため、微量の生成物を質量分析によって内在物とはっきり区別ができ、さらに大きな質量の内部標準を用いることで、定量を行うことができる[23]。図5に例示したN^1アセチルポリアミンオキシダーゼの場合であれば、質量数の3大きいアセチルスペルミンを基質として用いると、生成物として質量数3大きいスペルミジンが生成する。ここに質量数が6大きい内部標準を反応後に添加して質量分析を行えば、内部標準とのシグナル強度比から生成物の量を正確に定量することが可能である。この方法のメリットの一つは、あらかじめ基質・内部標準をそろえておけば[f]、7種あるポリアミン代謝関連酵素活性を同じ装置、同じ方法で測定することができるという点である。この分析法が今後のポリアミン研究に活かされることを期待したい。

V．DiAcSpm測定の臨床的意義

検査薬の開発が進展した現在、DiAcSpmの臨床応用を図るためには、どのような局面で尿中DiAcSpm測定が臨床家のニーズに合った情報を提供できるかという観点から、臨床的な意義に十分に配慮して研究を進めて行くことが必要だと考えられ

[f]東京都医学研の私達の研究室は2018年3月をもって閉鎖・解散となったが、鮫島と森谷が合成した標識基質およびそれらの前駆体の多くは、現在、慈恵医大分子生物学講座に保管をお願いしている。ポリアミン代謝の研究のために活用したいという学会員の方がおられたら筆者あてにご連絡いただければご相談に応じることができる。

ポリアミン（2019）6:32-42

る。そのような考えで行った都立駒込病院との共同研究の結果のいくつかについてここで紹介したい。

大腸癌の治療前陽性率に関する研究結果を報告した当時、私達はDiAcSpmが既存の血清腫瘍マーカーCEA，CA19-9を凌ぐ高感度の腫瘍マーカーであり、大腸癌に関する第一選択の腫瘍マーカーになり得るだろうと期待した。しかし、前節に述べた測定値の経年推移に関する経験を経て、現在はその考えを修正し、CEAとの併用によって癌診断の補助として役立てることを目指すのが適切なのではないかと考えている。一方、細胞増殖に伴うポリアミン代謝の活性化の反映として癌の種類を問わずにしかも比較的早期から上昇するという汎用腫瘍マーカーとしてのDiAcSpmの特性は一貫して変っておらず、大腸癌を含めていくつかの癌において、診断および治療の過程において臨床サイドで必要とされる情報を提供できる可能性が示唆されてきている。

1)　IA期非小細胞肺癌の病理学的浸潤性に関する手術前予測と手術前尿中DiAcSpm値の関連

確定診断後の癌診療においては治療方針を策定するための判断材料として多くの情報が利用されているが、臨床サイドからは常により適切な判断を可能にする新たな指標となる情報の提供が待たれている。

早期の肺癌に対して、現行の標準的な手術術式（肺葉切除＋縦隔リンパ節郭清）は「切りすぎ」ではないか、すなわち、腫瘍が浸潤していない段階であれば縮小手術（肺葉部分切除）で十分ではないか、とする考え方が近年有力になっている。したがって、腫瘍の非浸潤性を事前に予測できれば縮小手術の適応決定に役立つため、臨床的意義が大きいと考えられる。そこで私達は、臨床病期IA期の患者171例について手術後の病理検査の結果を参照して腫瘍の浸潤要素と種々の手術前検査情報の間の関連について解析した。ロジスティック回帰分析の結果、病理学的浸潤性[g]と有意に関連した3種類の因子、①腫瘍径2cm以下（p＝0.005）、②薄切CTにおける腫瘍消失率[h]が0.75以上（p＝0.005）、③尿中DiAcSpmがカットオフ値以下（p＝0.005）の中の一つに手術前DiAcSpm値が含まれることが明らかになった。しかも、この3種類の因子のうち、②と③の2種類の基準を満たす症例の95%（37/39）については実際に非浸潤性であったことが手術後の病理検査によって確認できるという結果が得られた[14]。この結果は、手術前尿中DiAcSpm値が、非浸潤性の予測因子として縮小手術（肺葉部分切除）の適応決定に応用できる可能性があることを示している。今後も症例を重ねて研究する必要があるが、このような形でDiAcSpm検査値を他の検査指標と組合せることにより、早期非小細胞肺癌の縮小手術の適応決定に有用な情報が得られるとすれば、その臨床的意義は大きいと考えられる。

2)　手術前尿中DiAcSpm値および血清CEA値による大腸癌および肺癌の早期再発リスク評価

臨床的にみて、癌が完全に取りきれたと考えられる手術、すなわち根治的手術を受けた患者の中にも一定の頻度で再発患者が出現する場合があることが知られている。術後の補助治療やフォローアップにおいて適切な治療方針の策定を可能にするために、根治的手術後の再発リスク評価は大きな臨床的課題である。

手術後の再発リスクが癌の病期によって大きく異なることはよく知られているが、手術前マーカー値も再発リスク因子の一つであると考えられている。大腸癌の症例について詳細に検討したところ、尿中DiAcSpm、血清CEAのいずれに関しても、術前高値群は1年半から2年までの間の早期再発リスクが特に大きい傾向があった。再発時期とその後の患者の生存の関係について調べたところ、早期に再発し

---

[g]リンパ節転移陽性、血管侵襲陽性、リンパ管侵襲陽性、胸膜浸潤陽性のいずれか少なくとも一つが認められること

[h]高分解能CTにおいて、2種類の観察条件（肺野条件および縦隔条件）で測定した場合に得られる腫瘍径の比で表される診断指標：数値が高いものほど浸潤性は低いとされ、有意な浸潤性予測因子であることが報告されている

ポリアミン（2019）6:32-42

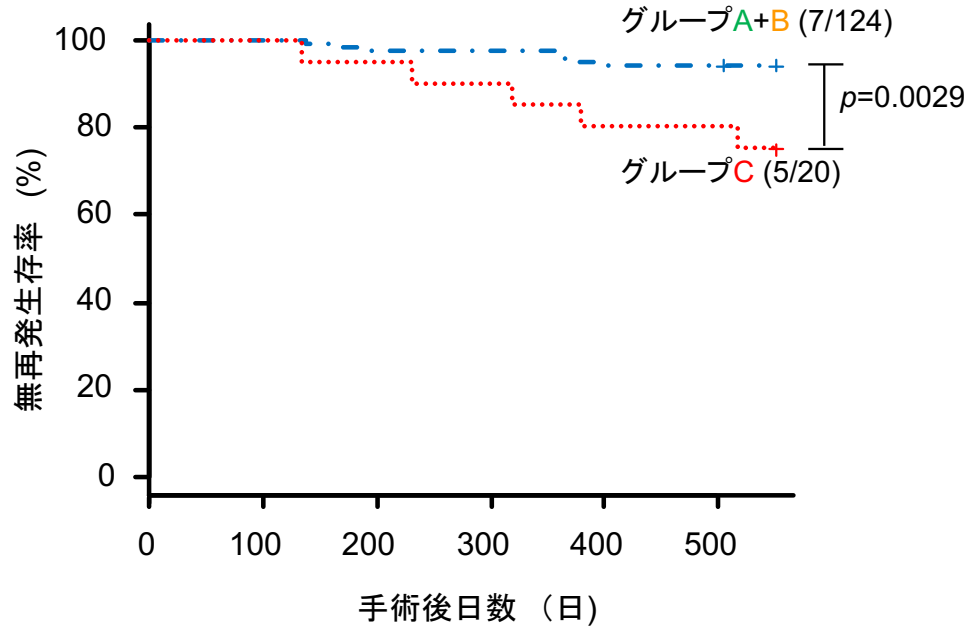


図6.　手術前DiAcSpm値，CEA値とII期大腸癌の早期再発リスク

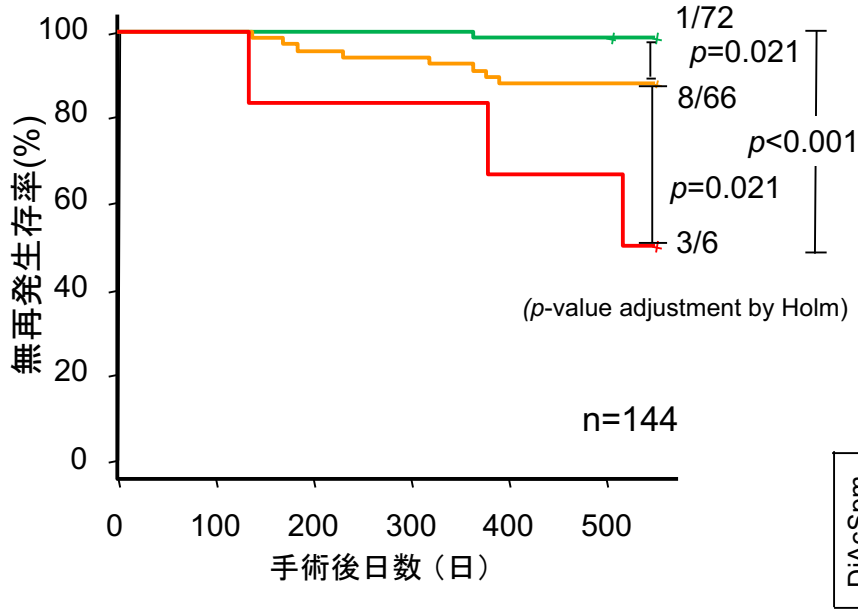
II期患者数 n = 144。（　）内の数字は（再発症例数/各群の患者数）を示す。

た患者は時間がたってから再発した患者と比較して再発後の生存期間が短い、すなわち、予後が悪い傾向があった。このことは、早期再発リスク評価が患者の予後予測とも関連する重要な情報の一つであることを示している。

大腸癌の場合、0期、I期の早期癌は手術前マーカー値の如何にかかわらず早期再発リスクはほとんどないため、術後補助化学療法は行われていない。一方、III期の大腸癌については、全体に手術後再発のリスクが比較的大きく、根治的手術を行った場合にも全症例で術後補助化学療法を行うことが、公式の診療ガイドラインで標準治療として推奨されている。そのため、新規の再発リスク評価基準に対する臨床的な需要はさほど大きくない[24]。これに対して、II期患者に関しては、患者の予後が多様であり、一部、再発を抑えるために補助化学療法が必要な患者がいることはわかっているものの、術後補助化学療法は標準治療としては推奨されておらず、しかも、補助化学療法を行う必要があるかどうかの選択基準はまだ確立されていない。このことを念頭に、手術前尿中DiAcSpm値と血清CEA値の2種類の腫瘍マーカーの数値を組合せることによってII期患者の早期再発リスクの評価に有用な情報が得られるかどうかについて検討した結果、尿中DiAcSpmおよびCEA値が両方高値の患者とそれ以外の患者の間に再発リスクの大きな違いがあることがわかった（図6）。

早期再発リスク評価の精度は静脈侵襲情報との組み合わせによってさらに向上した。すなわち、①マーカー値が高く、静脈侵襲も中等度以上の患者（赤）は、II期では、少数であったが、その再発リスクは非常に高い。②一方、少なくとも一方のマーカーが低値で、静脈侵襲が軽度な、II期全体の約半数の患者（緑）については、早期再発はほとんど見られず、この群に対しては補助化学療法が不要であることが示唆された。③II期患者の約半数を占める残りの患者（オレンジ）は、それよりも有意に早期再発リスクが高かった（図7）。再発リスクに関するこのような情報は、大腸癌II期患者に対する術後補助化学療法の必要性の判断材料の一つとして臨床的有用性が高いと考えられる。

肺癌についても同様の知見が得られた。肺癌の場合、I期とII期以降で再発リスクが大きく異なる。そこで、全症例を病期で群別し、各群をさらにDiAcSpm値，CEA値で層別化して無再発生存期間を比較した。その結果、I期患者の約半数はDiAcSpmとCEAがどちらも低値であり、そのような患者については早期再発のリスクがほとんどな



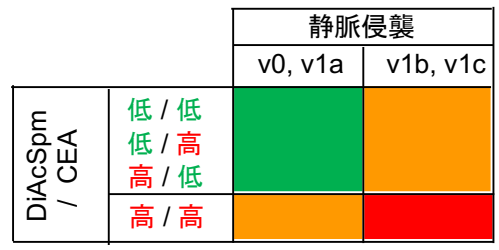


図7.　II期大腸癌完全切除後の再発リスク：DiAcSpm, CEA値と静脈侵襲情報の組合せ

静脈侵襲の程度による分類については、大腸癌研究会；大腸癌取り扱い規約第9版　改訂のポイント（http://www.jsccr.jp/whatsnew/kiyaku9.html）を参照。II期患者数 n = 144。再発症例数/各群の患者数を生存曲線の右端に示した。

い、ということがわかった[25]。I期肺癌に関しては、II期大腸癌と同様、手術後に補助化学療法を施行するかどうかの選択基準が確立されていない。術前マーカー値による低リスク群の割り出しは、術後補助化学療法が必要かどうかを判断する材料の一つとして、臨床的にも役に立つのではないかと考えられる。

術前マーカー値と術後再発リスクの間のこのような関係は、大腸癌、肺癌に限らず、種々の癌にもあてはまる可能性があり、腫瘍マーカーの新しい活用法を示唆するものだといえるのではないかと考えられる。

振り返ってみれば、私達とポリアミンの関わりは、DiAcSpmにはじまりDiAcSpmから抜け出すことなく終わろうとしている。DiAcSpm自動分析試薬の製造承認が首尾よく得られ、DiAcSpm検査が癌診療の現場で実際に使われるようになれば、その中からこれまで見えていなかった特性が明らかになり、新しい用途が見えてくるのではないか、そんな期待をもちながら筆をおこうと思う。

謝辞

この研究は、臨床の共同研究者との緊密な協力なしには進めることができなかった。私達の乏しい経験では、継続的かつ積極的な協力を惜しまない臨床医と出会うことがこの種の臨床共同研究を実りあるものにするうえで最も大切でありながら最も得難い要件の一つであった。東京都立駒込病院大腸外科の高橋慶一博士には、臨床医としての多忙な日常の中で専門の大腸外科の領域での緊密な協力にとどまらず、病院内の協力体制の整備も含め、複数の診療科にわたる共同研究の橋渡しを粘り強く、また誠意をもって続けていただいた。この場を借りて厚く御礼を申し上げたい。

参考文献

1. Russell D, Levy C, Schimpft S, Hawk I. Urinary Polyamines in Cancer Patients. Cancer Res. 1971;31:1555-1558.
2. Russell D. Increased polyamine concentrations in the urine of human cancer patients. Nature New Biol 1971;233 144-145.
3. Bachrach U. Polyamines as markers of malignancy. . Prog Drug Res 1992;39 9-33.
4. Kawakita M, Hiramatsu K. Diacetylated

derivatives of spermine and spermidine as novel promising tumor markers. J Biochem. 2006;139:315-322.
5. Hiramatsu K, Kamei S, Sugimoto M, Kinoshita K, Iwasaki K, Kawakita M. An improved method of determining free and acetylated polyamines by HPLC involving an enzyme reactor and an electrochemical detector. J Biochem. 1994;115:584-589.
6. Hiramatsu K, Sugimoto M, Kamei S, Hoshino M, Kinoshita K, Iwasaki K, Kawakita M. Determination of amounts of polyamines excreted in urine: demonstration of N1,N8-diacetylspermidine and N^1,N^{12}-diacetylspermine as components commonly occurring in normal human urine. J Biochem. 1995;117:107-112.
7. Sugimoto M, Hiramatsu K, Kamei S, Kinoshita K, Hoshino M, Iwasaki K, Kawakita M. Significance of urinary N^1,N^8-diacetylsermidine and N^1,N^{12}-diacetylspermine as indicators of neoplastic diseases. J Cancer Res Clin Oncol. 1995;121:317-319.
8. Hiramatsu K, Miura H, Kamei S, Iwasaki K, Kawakita M. Development of a sensitive and accurate enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) system that can replace HPLC analysis for the determination of N^1,N^{12}-diacetylspermine in human urine. J Biochem. 1998;124:231-236.
9. Hiramatsu K, Takahashi K, Yamaguchi T, Matsumoto H, Miyamoto H, Tanaka S, Tanaka C, Tamamori Y, Imajo M, Kawaguchi M, Toi M, Mori T, Kawakita M. N^1,N^{12}-Diacetylspermine as a sensitive and specific novel marker for early- and late-stage colorectal and breast cancers. Clin Cancer Res. 2005;11:2986-2990.
10. Nakayama Y, Torigoe T, Minagawa N, Yamaguchi K. The clinical usefulness of urinary N^1,N^{12}-diacetylspermine (DiAcSpm) levels as a tumor marker in patients with colorectal cancer. Oncol Lett. 2012;2:970-974.
11. Yamaguchi K, Nakamura M, Shirahane K, Konomi H, Torata N, Hamasaki N, Kawakita M, Tanaka M. Urine diacetylspermine as a novel tumor marker for pancreatobiliary carcinomas. Digestive and Liver Dis. 2005;37:190-194.
12. Enjoji M, Nakamuta M, Arimura E, Morizono M, Kuniyoshi M, Fukushima M, Kotoh K, Nawata H. Clinical significance of urinary N1,N12-diacetylspermine levels in patients with hapatocellular carcinoma. Int J Biol Markers. 2004;19:322-327.
13. Umemori Y, Ohe Y, Kuribayashi K, Tsuji N, Nishidate T, Kameshima H, Hirata K, Wtanabe N. Evaluating the utility of N^1,N^{12}-diacetylspermine and N^1,N^8-diacetylspermidine in urine as tumor markers for breast and colorectal cancers. Clin Chim Acta. 2010;411:1894-1899.
14. Takahashi Y, Sakaguchi K, Horio H, Hiramatsu K, Moriya S, Takahashi K, Kawakita M. Urinary N^1,N^{12}-diacetylspermine is a non-invasive marker for the diagnosis and prognosis of non-small-cell lung cancer. Brit J Cancer. 2015;113:1493-1501.
15. Kawakita M, Hiramatsu K, Yanagiya M, Doi Y, Kosaka M. Determination of N^1,N^{12}-diacetylspermine in urine: a novel tumor marker. Methods Molec Biol; 720: 367-378.
16. Kuwata G, Hiramatsu K, Samejima K, Iwasaki K, Takahashi K, Koizumi K, Horiguchi S, Moriya S, Kobayashi M, Kawakita M. Increase of N^1,N^{12}-diacetylspermine in tissues from colorectal cancer and its liver metastasis. J Cancer Res Clin Oncol. 2013;139:925-932.
17. 八杉 利治, 平松 恭子, 岩崎 香里, 堀口 慎一郎, 森谷 俊介, 高橋 慶一, 川喜田 正夫. 婦人科悪性腫瘍におけるN^1,N^{12}-ジアセチルスペルミン測定の意義. 日本分子腫瘍マーカー研究会誌. 2013;28:39-40.
18. Miki T, Hiramatsu K, Kawakita M. Interaction of N^1,N^{12}-diacetylspermine with polyamine

transport systems of polarized porcine renal cell line LLC-PK1. J Biochem. 2005;138:479-484.
19. Takenoshita S, Matsuzaki S, Nakano G-I, Kimura H, Hoshi H, Shoda H, Nakamura T. Selective Elevation of the N^1-Acetylspermidine Level in Human Colorectal Adenocarcinomas. Cancer Res. 1984;44:845-847.
20. Kingsnorth A, Wallace H. Elevation of monoacetylated polyamines in human breast cancers. Eur J Cancer Clin Oncol. 1985;21:1057-1062.
21. Samejima K, Otani M, Murakami Y, Oka T, Kasai M,Tsumoto H, Kohda K. Electrospray Ionization and Time-of-Flight Mass Spectrometric Method for Simultaneous Determination of Spermidine and Spermine. Biol Pharm Bull. 2007;30:1943-1946.
22. Samejima K, Hiramatsu K, Takahashi K, Kawakita M, Kobayashi M, Tsumoto H, Kohda K. Identification and determination of urinary acetylpolyamines in cancer patients by electrospray ionization and time-of-flight mass spectrometry. Anal Biochem. 2010;401:22-29.
23. Moriya S, Iwasaki K, Samejima K, Takao K, Kohda K, Hiramatsu K, Kawakita M. A mass spectrometric method to determine activities of enzymes involved inpolyamine catabolism. Anal Chim Acta. 2012;748:45-52.
24. 大腸癌治療ガイドライン. 大腸癌研究会; http://www.jsccr.jp/guideline/index.html.
25. Takahashi Y, Horio H, Sakaguchi K, Hiramatsu K, Kawakita M. Significant correlation between urinary N^1,N^{12}-diacetylspermine and tumor invasiveness in patients with clinical stage IA non-small cell lung cancer. BMC Cancer. 2015:15:65

ポリアミン（2019）6:43-49

LC-MS/MSを用いた尿中 3-hydroxypropylmercapturic acidの分析

東 恭平

東京理科大学薬学部薬学科病態分析化学研究室

(千葉県野田市山崎2641)

連絡先　東　恭平、e-mail: higase@rs.tus.ac.jp

1. はじめに

ポリアミン研究をされている方にとって3-hydroxypropylmercapturic acid (3-HPMA)は聞き慣れないかもしれません。3-HPMAは反応性の高い不飽和アルデヒドであるアクロレインの尿中代謝産物です。ポリアミン代謝によるアクロレインの産生とその毒性については千葉科学大学の坂本先生が紹介されていますので[1]、主にアクロレインの代謝経路を説明した後に3-HPMA分析法を紹介したいと思います。

細胞内ポリアミン量は生合成系・分解系・輸送系により厳密に調節されています。細胞内のポリアミン濃度が高くなるとスペルミンオキシダーゼ(SMO)などのポリアミン分解系酵素が誘導され、スペルミン (SPM)はスペルミジン (SPD)にSPDはプトレッシン (PUT)に変換されます。その際、副産物として生じる3-アミノプロパナール、および3-アセタミドプロパナールから反応性の高い不飽和アルデヒド「アクロレイン」が産生されます(図1)[2]。細胞内で生じたアクロレインはグルタチオン (GSH)と反応

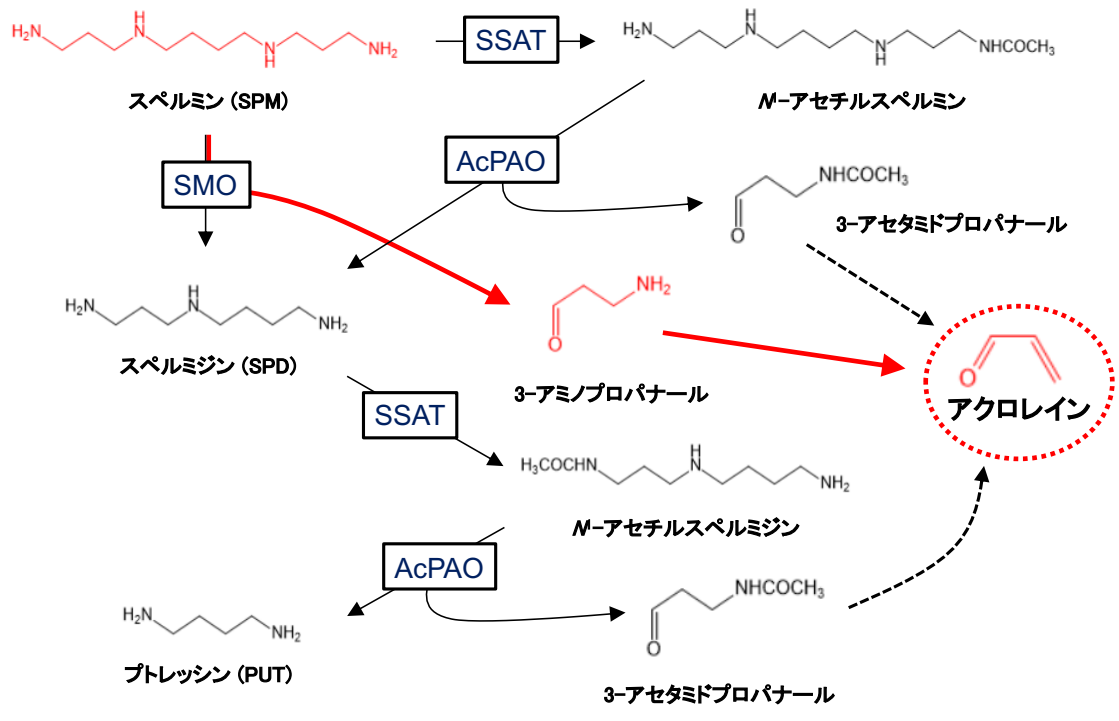


図1. 動物細胞のポリアミン代謝経路

SMO, Spermine oxidase;　AcPAO, Acetylpolyamine oxidase; SSAT, Spermidine/spermine N^1-acetyltransferase.

ポリアミン（2019）6:43-49

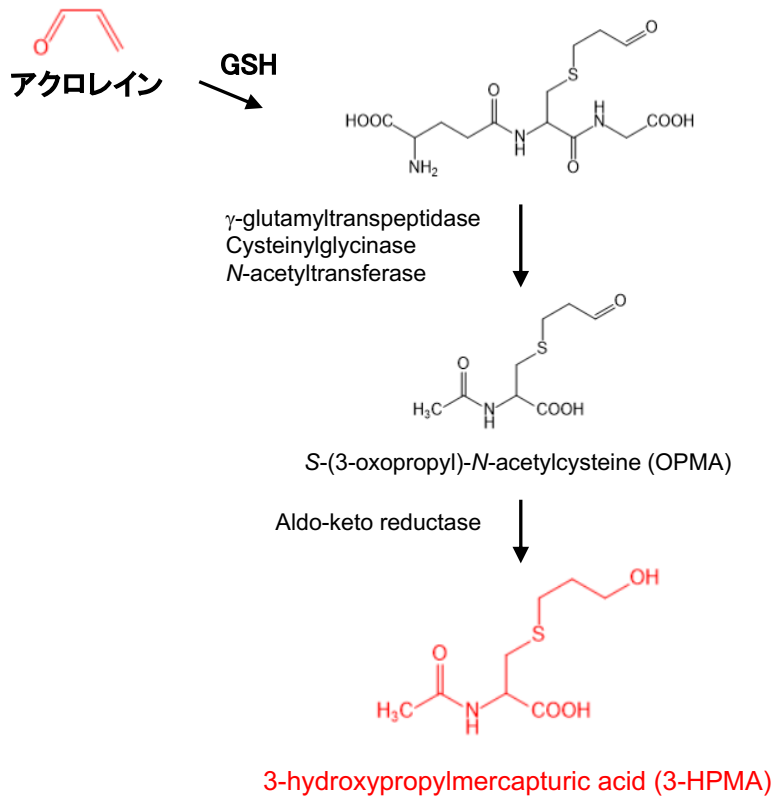


図2. アクロレイン代謝経路

して無毒化された後、肝臓と腎臓における種々の酵素によって代謝されてできた「3-HPMA」が尿中へと排泄されます (図2)[2]。近年、脳梗塞、アルツハイマー病や心疾患において、尿中3-HPMA濃度と重症度に相関性があることが報告され、3-HPMAは炎症性疾患マーカーとして大変期待されています[3-6]。

一方で、アクロレインは煙草の煙や廃油に多く含まれること、および抗癌剤であるシクロフォスファミドの肝代謝物であることから[2]、アクロレイン代謝に関する研究が行われ、3-HPMAが主な尿中代謝産物として同定されました[7, 8]。実際、 [2,3-^{14}C]アクロレインをラットに静脈内投与した場合の尿中代謝産物およびその割合は、*N*-acetyl-*S*-2-carboxy-2-hydroxyethylcysteine (5.4–10.4%)、*N*-acetyl-*S*-2-carboxyethylcysteine (2.6–18.3%)、*N*-acetyl-*S*-3-hydroxypropylcysteine (3-HPMA: 52.5–73.8%)および3-hydroxypropionic acid (5.2–33.2%) であること、および [2,3-^{14}C]アクロレインを経口投与した場合の尿中代謝物およびその割合は、3-HPMA (22.5–41.2%)、シュウ酸(16.8–34.9%)、*N*-acetyl-*S*-2-carboxy-2-hydroxyethylcysteine (7.8–18.1%)、*N*-acetyl-*S*-2-carboxyethylcysteine (3.1–11.7%)および3-hydroxypropionic acid (5.6–30.8%)であることから、3-HPMAがアクロレインの主な尿中代謝産物であると考えられています[8]。

尿中3-HPMA分析法は、固相抽出法を用いて尿試料から3-HPMAを抽出した後に、LC-MS/MSで分析することが一般的です。3-HPMAにはカルボキシ基があるため、UV検出 (210 nm)[9]、蛍光検出および電気化学検出[10]による検出も可能ですが、3-HPMAに類似した構造の代謝物が多く尿に含まれているため、カラムを用いて3-HPMAのピークを夾雑物質から分離することは困難です。一方、三連四重極を搭載した質量分析計では、エレクトロスプレーイオン化 (ESI)によって3-HPMAをイオン化した後、Q1でプリカーサーイオンとしてm/z 210[M-H]$^-$を選択、Q2で緩衝ガスと衝突させて低分子化、Q3でプロダクトイオン m/z 91 [HO(CH$_2$)$_3$S]$^-$を選択して検出するので、選択性に優れています。質量分析計によって3-HPMAの感度は様々 (検出下限: 0.049~22 µg/L)ですが、どの論文でも非喫煙者 (37~730 µg/g クレアチニン：Cre)に比べて喫煙者 (132-5345 µg/g Cre)の尿中3-HPMA濃度が高いことが報告されています[6]。すなわち、三連四重極を搭載した質量分析計であれば、メーカーを問わず分析が可能であることを示唆しています。しかしながら、イオンサプレッション(夾雑物質による目的物質のイオン化の阻害)を防ぐため、感度の高い質量分析計以外は前処理として固相抽出を必要とします。今回は、Eckertら[11]が報告した固相抽出法と、AB sciex社 (現Sciex社)製の質量分析計API2000を用いた分析法について紹介したいと思います。

2. 実験方法

2-1. 固相抽出

(1) 尿試料200 µLに内部標準物質としてd$_3$-3-HPMA溶液 (100 µM)を4 µL添加します (最終濃度2 µM)。

(2) 尿試料204 µLに50 mM ギ酸アンモニウム (pH 2.5) 200 µL、およびギ酸4 µLを混合し、2000 x gで10分間遠心分離します。

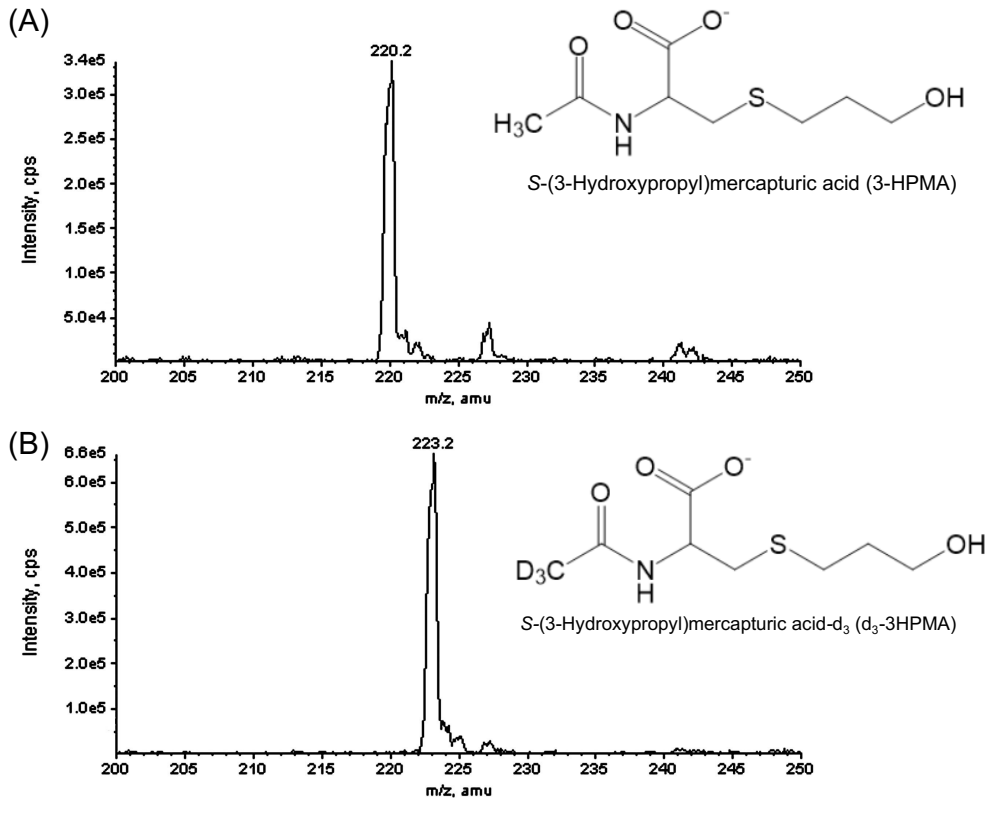


図3. Q1スキャンによる3-HPMA (A)およびd3-3-HPMA (B)の検出

最終濃度 が1.5 μM になるように3-HPMAおよびd_3-3-HPMA溶液を1 mLずつ調製した後、シリンジポンプを用いて質量分析計に持続注入した。

(3) 遠心分離している間、固相抽出カラムであるISOLUTE ENV + (100 mg, 3 mL, Biotage)を固相抽出用マニホールドにセットし、メタノール6 mLをカラムに通液させて、固相カラムを平衡化します。次に、ギ酸 (pH 2.5) 6 mLを固相カラムに通液させて平衡化します。固相抽出カラムを通液させる際は、真空ポンプを用いて固相抽出用マニホールドのタンクの中を陰圧にします。

(4) 遠心分離後、得られた上清400 μLを固相カラムに供します。

(5) ギ酸 (pH 2.5) 3 mL、次に5% メタノールを含むギ酸 (pH 2.5) 1.5 mLを通液させて固相カラムを洗浄します。

(6) 洗浄した固相カラムはバキュームポンプを用いて20分間乾燥させます。

(7) 乾燥させた固相カラムに2% ギ酸を含むメタノール 2.5 mLを通液させて、3-HPMAを溶出させます。溶出液をネジ付きチューブ (ガラス製)で回収します。

(8) 溶出液が入ったネジ付きチューブをアルミブロック恒温槽用窒素ガス吹き付けユニットにセットし、N_2存在下40℃で蒸発乾固させます。

(9) 5 mM 酢酸アンモニウム (pH 6.5) を含む88% アセトニトリル溶液 1 mLで再溶解し、分析試料とします。データは示しませんが、固相抽出法による抽出効率は67.6%でした。

2-2. LC-MS/MSによる3-HPMA分析の最適化

脳梗塞患者の尿中3-HPMAを測定した時のクロマトグラフや質量分析計について記載します[3)]。

(1) 質量分析計はAB sciex社製のAPI 2000TM LC-MS/MSシステムを使用し、システムコントロールはAnalyst®1.4.2 ソフトウェアを使用します。ESIをNegative modeに設定します。

(2) 3-HPMA又はd_3-3-HPMAを最終濃度が1.5 μMとなるようにメタノールで溶解させます。調製した3-HPMA溶液1 mLをシリンジに入れ、シリンジポンプにセットします。その

ポリアミン（2019）6:43-49

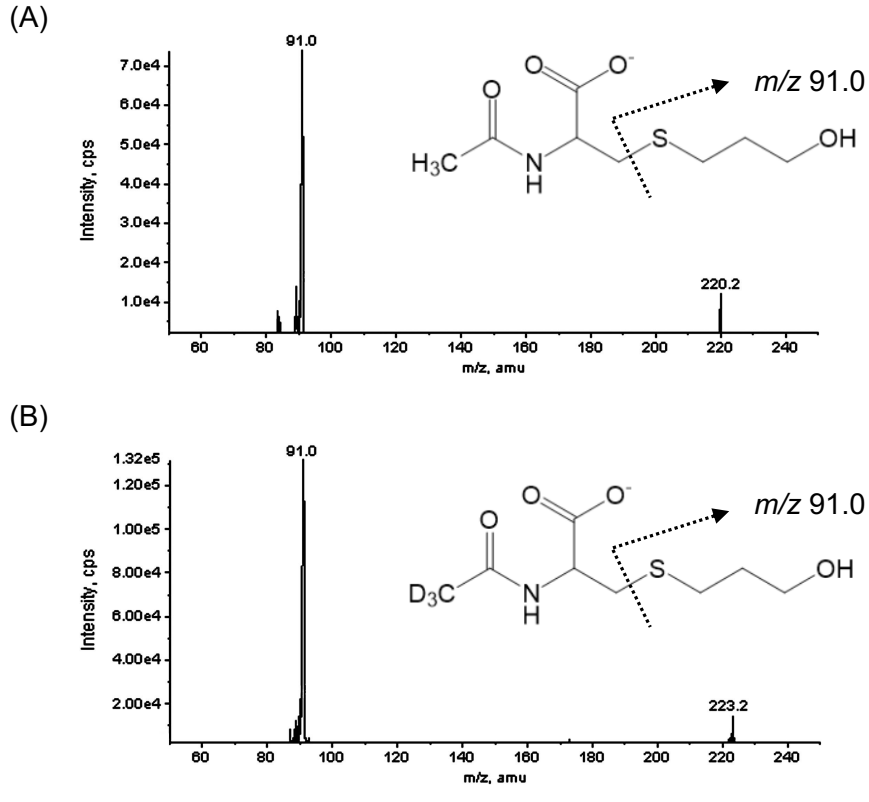


図4. 3-HPMA (A)およびd3-3-HPMA (B)のプロダクトイオンの検出

最終濃度 が1.5 μM になるように3-HPMAおよびd_3-3-HPMA溶液を1 mLずつ調製した後、シリンジポンプを用いて質量分析計に持続注入した。

後、シリンジポンプを流速5.0 L/minに設定し、質量分析計に持続注入します。質量分析計をQ1 Scanに設定し、3-HPMAはm/z 220.2 $[M-H]^-$、d_3-3-HPMAはm/z 223.2 $[M-H]^-$を検出します (図3)。

(3) 次にMSをProduct ion scanに設定し、m/z 91 $[HO(CH_2)_3S]^-$を検出します。d_3-3-HPMAは3-HPMAのメチル基の水素が重水素に置換されているため、プロダクトイオンは重水素を含まないm/z 91.0 $[HO(CH_2)_3S]^-$ が主なピークとして検出されます (図4)。後述のQuantitative optimizationにこの操作は必要ありませんが、3-HPMA標準品を確認するために行います。

(4) Precursor ion を3-HPMAでは220.2、d_3-3-HPMAでは223.2に設定し、Quantitative optimizationによりMRMトランジション(MRM 法で用いる Q1と Q3の質量の組み合わせ)の最適化を行います。3-HPMAの場合、主なプロダクトイオンはm/z 91.0 $[HO(CH_2)_3S]^-$ であるため、自動的にm/z 91.0が選択され、強度が高く検出されるよう電圧の最適化が行われます (表1)。

表1. MS/MS分析条件

Analyte	3-HPMA	d_3-3-HPMA
Precursor ion (Q1)	220.3	223.2
Product ion (Q3)	91	91
Declustering potential (V)	-21	-21
Entrance potential (V)	-10.5	-10.5
Collision energy (V)	-18	-20
Collision cell exit potential (V)	0	-2

(5) HPLCによる3-HPMAの分離には、Agilent社製のポンプ (Agilent 1100 binary pump)、カラムオーブン (Agilent 1100 column compartment)、オートサンプラー (Agilent

ポリアミン（2019）6:43-49

1100 G1367A WPALS Well Plate)を使用します。液体クロマトグラフの電源を入れ、Analyst®1.4.2　を使ってクロマトグラフと質量分析計をシンクロさせます。

(6)　ポンプAをONに設定し、溶離液A　(5　mM　酢酸アンモニウム　(pH　6.5)　を含む88%　アセトニトリル溶液)を流します。

(7)　3-HPMAとd$_3$-3-HPMAを0.15　μMとなるようにメタノールで調製した後、200　μLをそれぞれオートサンプラーバイアルに入れます。

(8)　3-HPMA溶液5　μLをLC-MS/MSに供してフローインジェクションアナリシスを行い、イオンソースの最適化を行います (表2)。

表2. イオンソースの条件

Curtain gas	25
Collision gas	3
Ion spray voltage	-4000
Temperature	475 °C
Ion source gas 1	45
Ion source gas 2	60

(9)　カラムXBridge HILIC (3.5 m, 2.1 mm×150 mm,　Waters)をクロマトグラフに接続し、溶離液A (5 mM 酢酸アンモニウム (pH 6.5) を含む88%　アセトニトリル溶液)と溶離液B　(5 mM 酢酸アンモニウム (pH 6.5) を含む5% アセトニトリル溶液)でカラムを平衡化します。また、溶離液の流速とグラジエント条件を表3のように設定します。

(10)　尿試料200 μLに100 μM d$_3$-3-HPMA (内標準物質)溶液4　μL　(最終濃度2　μM)を混合した後、100 μM 3-HPMA溶液もしくは10 μM 3-HPMA溶液を0、0.1、1、5、10、20および30　μMになるようにそれぞれ添加します。各試料から3-HPMAを固相抽出　(実験方法2-1参照)した後、LC-MS/MSに供します。3-HPMAおよびd$_3$-3-HPMAの溶出時間は、約5分です

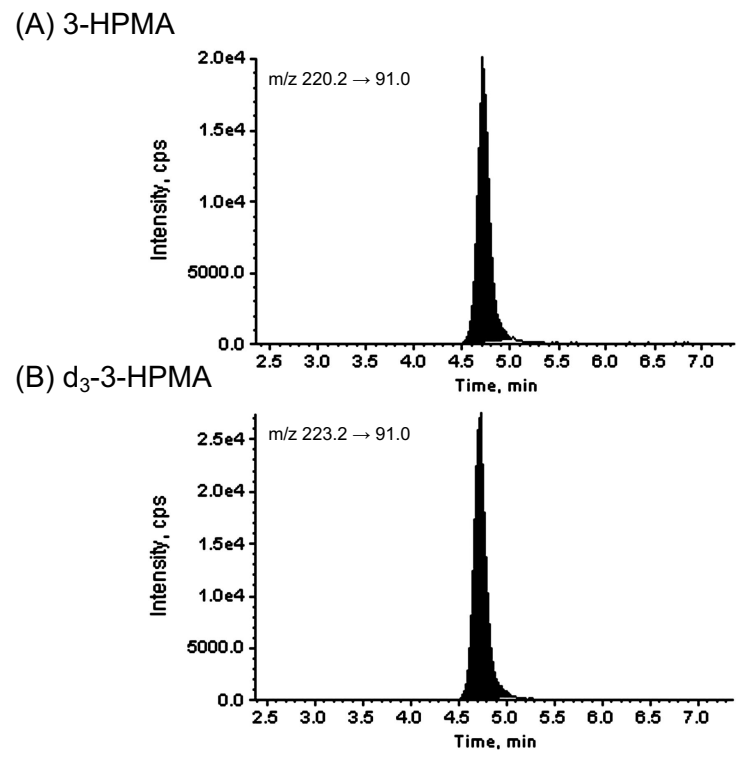


図5. 3-HPMA (A)およびd$_3$-3-HPMA (B)のクロマトグラムと内標準法による検量線の作成 (C)

内標準物質としてd$_3$-3-HPMAを2　μM　添加した尿試料に、標準物質である3-HPMAを0、0.1、1、5、10、20、30 μMになるようにそれぞれ添加した。その後、固相抽出した後、LC-ESI-MS/MSで分析した　(A,　B)。内標準物質のピーク面積に対する各濃度の3-HPMAのピーク面積の比を縦軸に、3-HPMAの濃度を横軸にして検量線を作成した。尿試料中に含まれる3-HPMA濃度はピーク面積比から求めた。

(図5)。その後、内標準物質のピーク面積に対する各濃度の3-HPMAのピーク面積の比を縦軸に、3-HPMAの濃度を横軸にして検量線を作成します (図5C)。

(11)　尿試料中に含まれる3-HPMA濃度を求める時は、内標準物質であるd$_3$-3-HPMAを2　μM　添加した後、固相抽出、LC-MS/MSを行いま

す。分析により得られたピーク面積比より、尿中3-HPMA濃度を算出します。

表3. 3-HPMAの分離条件

Time (min)	Solvent A (%)	Solvent B (%)	Flow rate (mL/min)
0	100	0	0.3
8	100	0	0.3
10	65	35	0.3
10.5	65	35	0.4
15	65	35	0.4
17	100	0	0.4
17.5	100	0	0.3
30	100	0	0.3

3. 実験例

(1) 健常人の尿200 µLに100 µM d_3-3-HPMA溶液4 µLを添加した後、3-HPMA溶液を添加して濃度が0、0.1、1、5、10、20、30 µMとなるように調製し、検量線作成用とします。

(2) 被験者の尿200 µLに100 µM d_3-3-HPMA溶液4 µLを添加します。

(3) 検量線用の尿試料もしくは被験者の尿試料204 µLに50 mM ギ酸アンモニウム (pH 2.5) 200 µL、ギ酸4 µLを添加して混合します。その後、2000 x gで遠心分離して得た上清400 µLを固相カラムに供します。

(4) 固相カラムをメタノール6 mL、次にギ酸 (pH 2.5) 6 mLを通液させて平衡化させます。尿試料を固相カラムに供した後、ギ酸 (pH 2.5) 3 mL、次に5% メタノールを含むギ酸 (pH 2.5) 1.5 mLを通液させて固相カラムを洗浄します。洗浄した固相カラムはバキュームポンプを用いて20分間乾燥させます。乾燥させた固相カラムを2% ギ酸を含むメタノール 2.5 mLを通液させて3-HPMAを溶出させます。各溶出液を40℃の水浴中でN_2を用いて蒸発乾固させた後、5 mM 酢酸アンモニウム (pH 6.5) を含む88% アセトニトリル溶液 1 mLで再溶解させます。

(5) 各溶液10 µLをLC-MS/MSによる供して分析します。検量線は、内部標準物質としたd_3-3-HPMAのピーク面積と3-HPMAのピーク面積比を各濃度でプロットして作成します。被検者の尿中3-HPMA量は、d_3-3-HPMAのピーク面積と3-HPMAのピーク面積比を計算し、作成した検量線を用いて算出します。

(6) 尿中3-HPMA濃度は尿中クレアチニン (Cre)量で補正して、尿中3-HPMA量 (µmol/g Cre) を求めます。クレアチン量はCreatinine Assay Kit (Cayman Chemical Company) で定量できます。

4. おわりに

3-HPMAは分子内の二つの水酸基を*N*,*O*-ビス(トリメチルシリル)トリフルオロアセトアミドにより誘導体化 (トリメチルシリル化)した後に、GC-MSで測定することができます[5, 12]。しかしながら、誘導体化の作業は煩雑で、再現性のある定量を行うにはある程度の技量を要します。一方LC-MS/MSでは、試料の前処理として固相抽出を行いますが、96ウェルプレート型の固相抽出カラムが開発されるなど、多検体同時処理が可能となり汎用性が高まっています。今後、試料の前処理化や質量分析計の操作が更に簡略化され、疾患バイオマーカーとしての3-HPMA研究が発展することを期待しています。

参考文献

1. 坂本明彦、富取秀行、ポリアミンの酸化分解により産生されるアクロレインの細胞毒性と疾患、学会誌ポリアミン3 (2), 38-46 (2016)
2. Stevens JF, and Maier CS. Acrolein: sources, metabolism, and biomolecular interactions relevant to human health and disease. Mol Nutr Food Res. 2008;52(1):7-25.
3. Yoshida M, Mikami T, Higashi K, Saiki R,

ポリアミン（2019）6:43-49

Mizoi M, Fukuda K, et al. Inverse correlation between stroke and urinary 3-hydroxypropyl mercapturic acid, an acrolein-glutathione metabolite. Clin Chim Acta. 2012;413(7-8):753-9.

4. Yoshida M, Higashi K, Kuni K, Mizoi M, Saiki R, Nakamura M, et al. Distinguishing mild cognitive impairment from Alzheimer's disease with acrolein metabolites and creatinine in urine. Clin Chim Acta. 2015;441:115-21.
5. DeJarnett N, Conklin DJ, Riggs DW, Myers JA, O'Toole TE, Hamzeh I, et al. Acrolein exposure is associated with increased cardiovascular disease risk. J Am Heart Assoc. 2014;3(4).
6. Higashi K, Igarashi K, and Toida T. Recent Progress in Analytical Methods for Determination of Urinary 3-Hydroxypropylmercapturic Acid, a Major Metabolite of Acrolein. Biol Pharm Bull. 2016;39(6):915-9.
7. Parent RA, Caravello HE, and Sharp DE. Metabolism and distribution of [2,3-14C]acrolein in Sprague-Dawley rats. J Appl Toxicol. 1996;16(5):449-57.
8. Parent RA, Paust DE, Schrimpf MK, Talaat RE, Doane RA, Caravello HE, et al. Metabolism and distribution of [2,3-14C]acrolein in Sprague-Dawley rats. II. Identification of urinary and fecal metabolites. Toxicol Sci. 1998;43(2):110-20.
9. Sanduja R, Ansari GA, and Boor PJ. 3-Hydroxypropylmercapturic acid: a biologic marker of exposure to allylic and related compounds. J Appl Toxicol. 1989;9(4):235-8.
10. Higashi K, Shibasaki M, Kuni K, Uemura T, Waragai M, Uemura K, et al. Determination of 3-hydroxypropylmercapturic acid in urine by three column-switching high-performance liquid chromatography with electrochemical detection using a diamond electrode. J Chromatogr A. 2017;1517:79-85.
11. Eckert E, Drexler H, and Göen T. Determination of six hydroxyalkyl mercapturic acids in human urine using hydrophilic interaction liquid chromatography with tandem mass spectrometry (HILIC-ESI-MS/MS). J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci. 2010;878(27):2506-14.
12. Conklin DJ, Haberzettl P, Lesgards JF, Prough RA, Srivastava S, and Bhatnagar A. Increased sensitivity of glutathione S-transferase P-null mice to cyclophosphamide-induced urinary bladder toxicity. J Pharmacol Exp Ther. 2009;331(2):456-69.

最新の研究紹介

イネ芽生えの成長とポリアミン関連遺伝子発現に対するサーモスペルミンの効果

宮本 みなほ
岡山大・院・自然科学　植物発生研究室

Effect of thermospermine on the growth and expression of polyamine-related genes in rice seedlings
Minaho Miyamoto, Satoshi Shimao, Wurina Tong, Hiroyasu Motose, Taku Takahashi
Plants, 2019, 8(8) pii: E269.

シロイヌナズナのサーモスペルミン合成欠損変異株*acl5*は、木部道管が過剰に分化して矮性を示す。また、外的に加えたサーモスペルミンは根の木部分化を顕著に抑制することから、サーモスペルミンは木部分化の適度な抑制に働くと考えられる。しかしサーモスペルミンの働きは、その他の植物ではほとんど調べられてこなかった。

今回我々は、単子葉植物イネの芽生えにおけるサーモスペルミンの効果を、成長や遺伝子発現に着目して調べた。その結果、サーモスペルミンを添加して育てたイネの根では、シロイヌナズナと同様に明確な道管が観察されなくなった。さらにシロイヌナズナとは異なり、師部に特異的な遺伝子*OsHB5*や*OsYSL16*に加え、単子葉植物に特徴的な細胞外局在型のポリアミンオキシダーゼをコードする*OsPAO2*や*OsPAO6*の発現も劇的に誘導されることがわかった。以上より、イネではサーモスペルミンはシロイヌナズナと異なる遺伝子群の発現にも作用していることが示唆された。

分岐鎖ポリアミン合成酵素のC末端部位の触媒反応における重要性

秀瀬 涼太、藤原 伸介
関西学院大学理工学部生命科学科

The C-terminal flexible region of branched-chain polyamine synthase facilitates substrate specificity and catalysis.
Hidese R, Toyoda M, Yoshino KI, Fukuda W, Wihardja GA, Kimura S, Fujita J, Niitsu M, Oshima T, Imanaka T, Mizohata E, Fujiwara S.
FEBS J., 2019, 286(19): 3926-3940

分岐鎖ポリアミンは好熱菌の高温での生育に必要である。これまでに、我々は好熱性アーキア*Thermococcus kodakarensis*より分岐鎖ポリアミン合成酵素BpsAを初めて見出している。本酵素は、脱炭酸*S*-アデノシルメチオニン（dcSAM）のアミノプロピル基をポリアミン基質の第２級および第３級アミンに転移する反応を触媒する。BpsA-ポリアミン基質のX線結晶構造解析およびBpsA-dcSAM反応中間体の精密質量分析の結果より、BpsAのC末端部位に存在する５つの酸性アミノ酸残基（Glu^{339}, Asp^{342}, Asp^{343}, Glu^{344}, and Glu^{345}）のいずれか２つがアミノプロピル基により修飾されていた。これは、ピンポン機構反応の決定的な証拠である。５つの酸性アミノ酸残基のうち触媒残基を特定しない点で、これまでに例のない極めてユニークな性質をもつ酵素である。

抗腫瘍活性を有するノルスペルミジンがDNA高次構造と遺伝子機能に及ぼす特異的作用

西尾 天志
同志社大学大学院　生命医科学研究科

Specific effects of antitumor active norspermidine on the structure and function of DNA
Takashi Nishio, Yuko Yoshikawa, Chwen-Yang Shew, Naoki Umezawa, Tsunehiko Higuchi, Kenichi Yoshikawa, Scientific Reports, 2019, 9: 14971

ノルスペルミジン(NSPD)はスペルミジン(SPD)の構造類似体であり、抗腫瘍活性を有することで知られているが、その作用機序については不明な点も多い。本論文では、これらのポリアミンが遺伝子発現の亢進と抑制の二面性を示し、亢進作用に関してはSPDが、抑制作用に関してはNSPDがより強い活性を示すことを見出した。原子間力顕微鏡、蛍光顕微鏡によるDNA一分子計測と、モンテカルロシミュレーションによる理論的考察から、NSPDとSPDのDNAへの結合様式の違いが高次構造に関して特異的な変化をひき起こしていることが明らかとなった。

本論文では、ポリアミンが誘導するDNAの高次構造転移が遺伝子発現活性の制御に直接関与している事が示されている。本研究で行ったような、長鎖DNAの一分子観察と遺伝子機能の関連を明らかにするような実験手法は、DNAを標的とした新規薬剤の開発研究への応用展開などにも有用であろう。

超好熱菌細胞内で大型ポリアミンにより発現が制御される遺伝子

福田 青郎、藤原 伸介
関西学院大学 理工学部 生命科学科

Genes regulated by branched-chain polyamine in the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus kodakarensis*
Wakao Fukuda, Yuka Yamori, Masafumi Hamakawa, Mamoru Osaki, Moeko Fukuda, Ryota Hidese, Yu Kanesaki, Akiko Okamoto-Kainuma, Satoru Kato, Shinsuke Fujiwara
Amino Acids, 2019, in press. Doi: 10.1007/s00726-019-02793-4.

本研究では、高温環境で分岐鎖ポリアミンを生産する超好熱性アーキア*Thermococcus　kodakarensis*を対象として、超好熱菌細胞内における大型ポリアミンの転写・翻訳への寄与を調べた。

分岐鎖ポリアミンを合成可能なKU216株と合成できないDBP1株の生育を比較すると、DBP1株はKU216株に比べ93 ºCで完全な生育阻害、92 ºC以下で生育遅延を示す。90 ºCで培養した各株についてプロテオーム解析を行ったところ、150種類を超えるタンパク質が、片方の株からのみ検出された。さらにトランスクリプトーム解析を行ったところ、タンパク質の増減と転写産物の増減は必ずしも一致しなかった。ことから超好熱菌の遺伝子発現は、mRNA及びタンパク質レベル両方で分岐鎖ポリアミンの有無に影響を受けることがわかった。しかもその寄与は一様ではなく、より温度が低くなる（85　ºC）と発現に分岐鎖ポリアミンが不要になる場合や、温度に関係なくその存在が発現に重要である場合もあることが示唆された。

腸管細菌叢のポリアミン産生誘導による血管内皮機能の改善：無作為化二重盲検並行群間比較試験

松本 光晴
協同乳業(株)研究所

Endothelial function is improved by inducing microbial polyamine production in the gut: A randomized placebo-controlled trial

Mitsuharu Matsumoto, Yusuke Kitada, Yuji Naito

Nutrients 2019, 11: E1188

ポリアミン（スペルミジン、スペルミン）の抗炎症作用とオートファジー誘導作用は、心血管系疾患のリスク低減に有効と推測されている。本研究では、腸内細菌叢のプトレッシン（スペルミジンの前駆体）産生誘導作用が確認済みの*Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* LKM512とアルギニンを添加したヨーグルト(*Bifal*＋Arg　YG)を作製し、動脈硬化症の初期症状である血管内皮機能への効果を評価した。BMI 25付近の健常成人（n = 44）を2グループに分け、*Bifal*＋Arg YG およびプラセボ（通常ヨーグルト）を100g/day、12週間投与する無作為化二重盲検並行群間比較試験を実施した。その結果、*Bifal*＋Arg　YG群の反応性充血指数（EndoPATで測定した血管内皮機能の指標）の変化量がプラセボ群より有意に高く、血管内皮機能の改善が認められた。また、*Bifal*＋Arg　YG群はプラセボ群と比較し、糞便プトレッシン濃度と共に血清スペルミジン濃度も有意に高値を示した。これらの結果は、腸内細菌叢が産生したプトレッシンが生体内に移行しスペルミジンに変換され、その生理効果で血管内皮機能が改善したことを示唆している。本論文は、外因性ポリアミンの動脈硬化症予防効果をヒト臨床試験で直接的に確認した初の報告となる。

GSTπはアクチン再構築を介してcaveolin-1調節性ポリアミン取り込みを促進する

植村 武史
株式会社アミンファーマ研究所

GSTπ stimulates caveolin-1-regulated polyamine uptake via actin remodeling

Takeshi Uemura, George Tsaprailis, Eugene W. Gerner

Oncotarget 2019, 10:5713-5723

がん細胞は高いポリアミン取り込み活性を示すことが多く、ポリアミン合成阻害剤と取り込み阻害剤の併用ががん治療に有効であると考えられている。効果的なポリアミン取り込み阻害剤の開発のため、動物細胞のポリアミン取り込み系を明らかにする必要がある。大腸がん細胞では、カベオラ構成蛋白質caveolin-1がポリアミン取り込みの抑制因子であることが明らかになったが、詳細な機構は不明であった。今回我々は、大腸がんでしばしば見られるcaveolin-1発現の減少がグルタチオン転移酵素GSTπの細胞外への分泌を促進することを見いだした。GSTπが細胞表層にあるアクチンをグルタチオン化し、アクチン繊維の再構築を促進した結果、エンドサイトーシスによるポリアミン取り込みが上昇した。抗体によりGSTπを不活化すると、ポリアミン取り込みが抑制された。この結果により、ポリアミン合成阻害剤とGSTπ阻害剤の併用が効果的に細胞内ポリアミンを減少させることが示唆され、新たな大腸がん予防、治療法の可能性が示された。

ポリアミン（2019）6:52-53

“2019年ポリアミンに関するゴードン会議”に参加して

下川 ひろみ
石川県立大学大学院 生物資源環境学研究科 修士1年

私は、アメリカ・ニューハンプシャー州の、ウォータービルバレーで2019年6月22日から23日に開催されたGordon Research Seminar (GRS) と、6月23日から28日に開催されたGordon Research Conference (GRC) に参加し、GRSで口頭発表とポスター発表を、GRCでもポスター発表を行いました。

私にとって初めての国際学会で、さらに口頭発表もあったため準備の段階から緊張の連続でした。1か月前からプレゼンテーションのスライドと原稿を作成し、さらに原稿を何度も読んで発音の練習をしました。今まで、英語を話す経験はほとんどなかったのでかなり苦戦しました。

学会会場へは、ボストンのホテルで前泊をし、事前に予約したシャトルバスに3時間ほど乗り、会場であるウォータービルバレーへ向かいました。シャトルバス乗り場では他の分野のゴードン会議へのシャトルバスも多く集まっていました。乗り場にはポスターを抱えた様々な人種の研究者がとても多くいました。日本人はおろか、アジア人もほとんど見当たらなかったため、アメリカに来たことを強く実感し、身が引き締まる思いがしました。

GRSの初日である6月22日は昼過ぎから発表が始まりました。GRSはGRCに先立って行われる若手の会合です。ここでは様々なポリアミンの若手の研究者による最新の研究のプレゼンテーション聞くことができ、とても刺激的で私も研究をさらに頑張らねばならないな、と感じました。夕方からは最初のポスターセッションが始まりました。このときの発表は緊張と、慣れない英語に終始混乱したまま時間が過ぎていきました。夕食を終え、さらに発表を聞き、1日目は終わりました。宿舎はコテージのような作りになっていました。とても整った環境でしたので、しっかりと休息をとり、2日目の発表に備えることができました。（図1）

図1　宿舎 (Golden Eagle Lodge)

私の発表の時間は2日目の朝でした。朝食もそこそこに、朝からプレゼンテーションのチェックを入念に行いました。ポインターの使い方、強調する単語、発音しづらい単語の最終確認を行いました。練習の成果もあり、15分間の発表はなんとか無事に終わりました。しかし、恐れていた5分間の質疑応答が始まりました。私は日本語での学会発表でも質疑応答が苦手です。このため質疑応答は私にとって鬼門でした。質問を予測して用意していたものの、案の定、英語が聞き取れず内容どころでは無く、とても悔しい思いをしました。しかし、質問が3件ほどあったので、自分の発表が伝わったのだと思い、少し英語に対して自信を持つことができました。その後のポスターセッションで質疑応答をしてくださっ

ポリアミン（2019）6:52-53

た先生が、私のポスターのところに来てくださり、再度質問しなおしてくださいました。そして、そこでなんとか質問に答えることができました。また、他の参加者の方々も私のポスターのところへやってきて、「わかりやすい英語だったよ」や「面白い研究だね」と声をかけてもらい、励みになりました。

午後になってGRCが始まり、昨年のポリアミン学会の年会でお会いした先生方がいらして、やっと少しだけ緊張から解放されました。

GRCでは世界中のポリアミン研究の第一人者の先生方のお話を直接聞くことができ、とても勉強になりました。特に、私の研究と関係する、“Polyamines in Aging and Other Diseases” のセッションでの先生方のご講演は大変興味深く、大きな学びとなりました。このセッションでご講演されたベルリン自由大学のStephan Sigrist先生は昨年のポリアミン学会でもご講演いただいた先生です。Stephan先生とは、夕食の席を何度かご一緒することができ、研究のお話だけではなく、ポリアミン学会の際の日本での思い出話をお聞きすることができました。

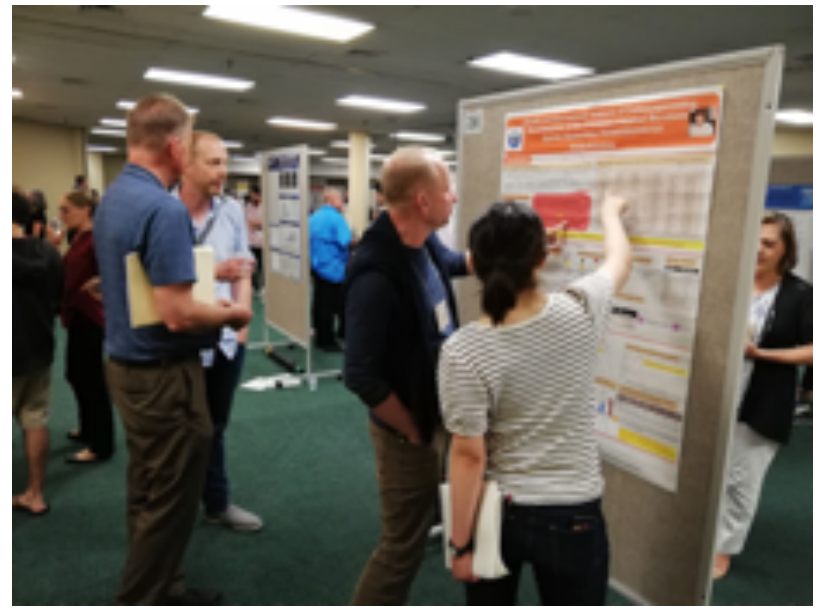


図2　ポスター発表でのディスカッションの様子

また、GRCでのポスター発表では、2日間、発表する機会がありました。GRSではうまく英語が出てこずに伝えたいことを伝えられない場面もありましたが、GRCでは自分の発表を自分の言葉で説明できるようになり、他の先生方とディスカッションを行うことができ、とても勉強になりました。（図2）

GRC、GRSでの発表を聞き、世界ではポリアミンとガンとの関連の研究が自分の想像以上にとても多くされているのだと感じました。微生物や植物とポリアミンとの関連はこれまでに聞いたことがあったため、以前にも増してポリアミン研究の奥深さを感じることができました。

図3　ハイキングに行ったメンバーとの記念写真

昼休みはGRSから参加していた若手の研究者とともにハイキングに行くなどして過ごしました。（図3）このとき、雑談の中で私が修士1年だと伝えると、「修士1年でGRSに来ることはとても恵まれているよ」と言われ、大変貴重な経験をしていることを実感しました。このような世界のポリアミン研究に触れる、またとない機会に参加することができ、自分の勉強不足さを痛感するとともに、より一層研究へのモチベーションが高まりました。

最後になりましたが大変貴重な経験を支援してくださいました日本ポリアミン学会に深く感謝申し上げます。

事務連絡

日本ポリアミン学会第11回年会のご案内

会　期：2020年1月24日（金）13:00　～25日（土）16:00（予定）
会　場：東京慈恵会医科大学　大学1号館講堂（3階）
〒105-8461 東京都港区西新橋3-25-8
問い合わせ：poly_11nenkai@jikei.ac.jp
第11回年会案内：http://pa.umin.jp/11th_nenkai_info2.pdf
年会特別講演: 順天堂大学大学院医学研究科神経学講座准教授 斉木臣二 先生
内容：「血中老化関連物質ポリアミンがパーキンソン病患者で変化することを発見しオートファジーを介する抗加齢効果と病態との関連を示唆した論文（米国神経学会誌 Annals of Neurology 誌）の内容」を中心にご発表いただく予定です。
企画・運営委員会招待講演: 久留米大学医学部生理学講座准教授 柳（石原） 圭子 先生
内容：心機能における内向き整流性カリウムチャネルと細胞内ポリアミンの関係および細胞外ナトリウム、カリウムが与える影響

事務局よりご案内

学会費の納入をお願いします

今年度の学会費の納入をお願いいたします。会計年度は４月から翌年３月までとなっております。研究室でまとめて納入される場合は、事務局（polyamine@jikei.ac.jp、TEL:03-3433-1111(内)2275、FAX:03-3436-3897）まで納入者全員のお名前をお知らせください。これまでの未納分のある方は合わせてご納入ください。よろしくお願いいたします。

1.会費（年額）　正会員　一般 4,000円　　学生 2,000
賛助会員　30,000円
2.振込先　三菱東京UFJ銀行　虎ノ門支店（支店番号：041）
普通口座　0084363　日本ポリアミン学会　事務局　松藤千弥

編集後記

猛暑が続き、秋はいつくるのかと思っていたら、台風の後、日毎に寒さがつのり、急な冬の訪れを感じています。

2009年に発足しました日本ポリアミン学会は、令和元年に10周年を迎えました。また、令和元年8月29日付けで日本学術会議協力学術研究団体の指定を受けることとなりました。これに指定されていないと国が認める正式な学術団体とはならず、出張費が出ないので学会に参加しづらいという企業・大学の方達からの要望があり、評議員会、企画・運営委員会、事務局の方々が何年も前から準備を進め、この節目の年に認定の運びとなりました。認定されたことにより、企業の方・若手研究者の活性化を目指す手助けになれば幸いです。加えて、国際会議準備に関する国のサポートに申請することが可能となったため、研究会から学会に昇格させ、国際会議を日本で開催したいという希望に一歩前進したことになります。

今号は、鈴木先生に巻頭言を執筆していただきました。同窓会からヒントを得、抹茶をポリアミン研究の題材にされた京都らしい健康寿命伸長に関する大変興味深いお話しです。また、健康寿命伸長の話題に関連したフォーラム企画が、7倍の倍率を勝ち抜き、来月の日本分子生物学会で開催されます。

＜第42回日本分子生物学会年会＞
2F-07　ポリアミン代謝調節と健康　～人生１００歳時代を生き抜くために～

ポリアミン研究が益々発展し、皆様が長寿になることを祈念いたします。皆様のご意見、ご要望をお待ちしております。
（ポリアミン学会誌編集委員会　委員　照井祐介）

＜ポリアミン学会誌編集委員会＞
委員長　小黒明広（慈恵医大）
委員　　大城戸真喜子（慈恵医大）
植村武史（アミンファーマ研）
照井祐介（千葉科学大）
松本靖彦（明治薬科大）
森屋利幸（共和化工）

日本ポリアミン学会 学会誌「ポリアミン」
第6巻2号(2019年11月)

発行:日本ポリアミン学会
http://pa.umin.jp/
polyamine@jikei.ac.jp
製作:日本ポリアミン学会 企画・運営委員会

ポリアミン投稿ガイドライン

1. はじめに

「ポリアミン」は日本ポリアミン学会の機関誌として、ポリアミンおよびそれに関連した研究成果を発表する。本誌への発表を通じ、学会員、研究者間での議論を促進することを目的とする。できるだけ平易な日本語を用い、ポリアミン初学者および学生の理解を支援するとともに、常に最新の研究成果を掲載し、第一線で活躍する研究者の参照にも耐える誌面を目指す。

2. 投稿資格と条件

投稿論文は未発表のものに限る。本会員は全て本会誌に投稿することができる。また、本会員以外の者が本会誌へ投稿することを妨げない。

3. 論文の査読

投稿論文の掲載に先立ち、本会誌編集委員および編集委員の委託を受けた複数の研究者により査読を行う。論文の採否は、査読者の意見を参考にし、本誌編集委員会において決定する。また、本誌編集委員会は原著者に対し原稿の修正を依頼することができる。

4. 論文の種類

「ポリアミン」は以下の章を含むが、これらに限定されない。編集委員会は、著者に対し執筆を依頼することができる。

a. 巻頭言
b. シリーズ　ポリアミン研究
c. シリーズ　実験手技ノート
d. 学会レビュー
e. 最新の研究紹介、最新の論文紹介

a. 巻頭言

編集委員会の依頼により、学会方針の総括、研究の方向性への助言などを自由形式で記載する。原稿の文字数に制限は設けない。図を含めることができるが、図はガイドラインの要求を満たす必要がある。

b. シリーズ ポリアミン研究

自身の研究に基づく新知見を発表する。本文は未発表のものに限る。原稿の文字数に制限は設けない。図を含める場合、図は下記ガイドラインの要求を満たす必要がある。参考文献がある場合、参考文献ガイドラインに従って必ず参考文献リストを文末に付す。誌面のレイアウトに指定のある場合は、参照用PDFを用意することで指定できる。ただし、フォント、余白の違いにより完全に一致しないことがある。内容に関して、編集委員および編集委員の委託を受けた複数の研究者による査読を行う。本誌掲載水準を満たしていないと判断された場合、誌面掲載は見送られる。

c. シリーズ 実験手技ノート

自身の使用している、または新規に開発した実験手技を発表する。本文は未発表のものに限る。原稿の文字数に制限は設けない。図を含める場合、図は下記ガイドラインの要求を満たす必要がある。参考文献がある場合、参考文献ガイドラインに従って必ず参考文献リストを文末に付す。誌面のレイアウトに指定のある場合は、参照用PDFを用意することで指定できる。ただし、フォント、余白の違いにより完全に一致しないことがある。内容に関して、編集委員および編集委員の委託を受けた複数の研究者による査読を行う。本誌掲載水準を満たしていないと判断された場合、誌面掲載は見送られる。

d. 学会レビュー

学会参加体験、主催体験を紹介する。原稿の文字数に制限は設けない。図を含める場合、図は下記ガイドラインの要求を満たす必要がある。

e. 最新の研究紹介、最新の論文紹介

本会員およびポリアミン研究に興味のある方に向け、ポリアミン関連の最新の研究についての有用な情報を提供する。「最新の研究紹介」はポリアミン関連の論文を公表した著者がその研究内容を紹介する。「最新の論文紹介」はポリアミン関連論文の研究内容を紹介する。同論文に複数投稿希望があった場合、投稿者合意の上で全て掲載する。ただし、同一グループからの重複投稿は編集委員会で調整する。原稿を作成する前にあらかじめ事務局に投稿希望の旨を連絡すること。

5. 原稿の作成

原稿は和文とし、Microsoft　Word形式（doc、docx）またはテキスト形式（txt）で作成する。巻頭言、シリーズ　ポリアミン研究、シリーズ　実験手技ノート、学会レビューには文字数の制限を設けない。最新の研究紹介、最新の論文紹介はA4版半分に収まるよう（目安として35文字×20行）、以下の３部で構成する。

1. 日本語の論文のタイトル、本解説文を作成した著者名と所属
2. 論文のタイトル、著者名、雑誌名、発表年、号、ページ
3. 研究内容の要約

参考文献

本文中の出現順に番号を振り、例のように上付きの算用数字と片括弧でご記載する。参考文献リストは文末に例に従って、著者、タイトル、雑誌名、巻号、ページ、発表年をご記載する。

参考文献例

本文

細胞増殖・分化に重要な役割を果たすポリアミン[プトレッシン(PUT)、スペルミジン(SPD)、スペルミン(SPM)][1,2]の細胞内濃度は、生合成、分解、輸送により調節されている。

参考文献

1. Pegg AE: Mammalian polyamine metabolism and function. IUBMB Life. 61:880-894 (2009)

2. Igarashi K, & Kashiwagi K: Modulation of cellular function by polyamines. Int J Biochem Cell Biol. 42:39-51 (2010)

図の書式

図のフォーマットはPDF、TIFF、JPEG、EPS形式で作成する。Microsoft Powerpoint形式は色、フォント等に予期しない変更が加わる可能性がある。可能であれば、確認用PDFを添付する。PDF、EPSファイルの場合はフォント埋め込みを行って保存する。紙面のカラーモードはRGBになる。CMYKモードで作成された図は色がオリジナルと異なる場合がある。解像度は300 dpi以上とし、解像度が低い場合、編集委員より高解像度の図をお願いする場合がある。他誌に掲載された図を用いる場合は、著作権を考慮し、使用許可をとること。

表記について

プトレスシン、プトレッシン、プトレシン、putrescineなどはプトレッシンの表記で統一する。本文中の日本語の句読点は「、」および「。」を用いる。括弧「（ ）」は全角文字を使用する。

使用フォントの制限について

日本語の斜字体は対応していない。

数式、構造式について

数式、構造式は図として準備する。

特殊文字の使用について

ギリシャ文字（μ、π等）、斜体、上付、下付といった文字は、使用フォントやソフトによって正確に表示されない可能性がある（μがmとなる等）。混乱を避けるため、原稿作成時に赤字等でご指示いただくことを推奨する。

6. 著作権

本会誌に掲載された論文等の著作権は全て日本ポリアミン学会に帰属する。

<広告>

加齢へ、遺伝子レベルアプローチ

Gene-level approach to aging

SOYPOLYA®

「ソイポリア®」
遺伝子の潤滑剤ポリアミンを健康食品素材化

"SOYPOLYA®"
Of material for health food has a lubricant can be said polyamine gene.

「ソイポリア®」は食用大豆を加工し精製した素材。
「ソイ」は大豆を「ポリア」はポリアミンを表しています。

"SOYPOLYA®"purified material processed soybean.
"SOY" is a soybean, "POLYA" represents the polyamine.

加齢に伴う減少が確認されているポリアミンには、アンチエイジング効果が示唆されているばかりか、動脈硬化抑制や腸管の成熟などの生理機能など、体内での重要な役割が報告されています。

The polyamines have been found decline with aging, not only has been suggested that anti-aging, physiological functions such as maturation of the intestine and inhibit atherosclerosis has been reported an important role in the body.

コンビ株式会社 ライフサイエンス事業部
〒338-0832 埼玉県さいたま市桜区西堀 5-2-39 Tel:048-845-5710 http://www.combi.co.jp/f-foods/

Combi Corporation Life Science Div.
5-2-39,Nishibori,Sakura-ku,Saitama-shi,Saitama 338-0832 Japan Tel:+81-48-845-5710 http://www.combi.co.jp/f-foods/