

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) **公開特許公報** (A) (11)特許出願公開番号

特開2001 - 318097

(P2001 - 318097A)

(43)公開日 平成13年11月16日(2001.11.16)

(51) Int.Cl ⁷	識別記号	F I	テ-マ-ト* (参考)
G 0 1 N 33/53		G 0 1 N 33/53	G 2 G 0 4 5
// G 0 1 N 33/48		33/48	P

審査請求 未請求 請求項の数 3 O L (全 6 数)

(21)出願番号 特願2000 - 137900(P2000 - 137900)

(22)出願日 平成12年5月11日(2000.5.11)

(71)出願人 000004086

日本化薬株式会社

東京都千代田区富士見1丁目11番2号

(72)発明者 藤原 邦雄

熊本県熊本市若葉2 - 9 - 14 - 402

(72)発明者 鶴 大典

熊本県熊本市細工町5 - 30 - 802

Fターム(参考) 2G045 AA24 BB23 BB25 CB02 DA78

DA80 FB03 FB07 GC15

(54)【発明の名称】 投与化合物の組織内または細胞内分布検出法

(57)【要約】

【課題】投与した化合物の組織または細胞内における取り込みや分布(局在性)を微細且つ簡便に検出できるようにする。

【解決手段】化合物の免疫原性を損なうことなく、組織または細胞内に効果的に固定し、それらを免疫組織化学的に検出すること。

【特許請求の範囲】

【請求項1】化合物の組織内分布を検出するにあたり、脂肪族一級アミノ基を有する化合物を投与し、多官能性アルデヒド化合物で固定化後、免疫組織化学染色することを特徴とする脂肪族一級アミノ基を有する化合物の組織内または細胞内分布検出法。

【請求項2】脂肪族一級アミノ基を有する化合物が制癌剤である請求項1記載の検出法。

【請求項3】多官能性アルデヒド化合物がグルタルアルデヒドである請求項1または2に記載の検出法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、組織または細胞内における化合物の取り込みや分布（局在性）を検出する方法に関する。

【0002】

【従来の技術】薬剤の局在性を調べる方法は、放射性同位元素で標識した薬剤を合成し、動物や培養組織に投与して取り込ませ、その後、薬剤を凍結やホルマリンでその存在部位に固定し、さらに、培養組織の場合はそのまま、動物の場合は組織を薄切し、これをフィルム上に置いて感光させる方法（オートラジオグラフィ）が用いられてきた。また、薬剤それ自身に蛍光等物理的に検出可能な特性がある場合、それらの性質を利用して薬剤の局在性を検出してきた。

【0003】しかしながら、オートラジオグラフィの場合には、わざわざ放射性同位元素で標識した薬剤を合成する必要があるうえ、間接的な検出法であることから、薬剤の細胞内における微細な分布状況を把握するためには不都合であった。また、薬剤それ自身に蛍光がある場合においては、検出感度が低い等、必ずしも充分なものではなかった。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、組織または細胞内における化合物の取り込みや分布（局在性）を、微細且つ簡便に検出できるようにすることを目的とする。

【0005】

【課題を解決するための手段】本発明者は、前記したような問題点を解決すべく鋭意研究を重ねた結果、組織または細胞内の脂肪族一級アミノ基を有する化合物を、免疫原性を損なうことなく効果的に固定し、それらを免疫組織化学的に測定することにより、組織または細胞内の脂肪族一級アミノ基を有する化合物の取り込みや分布を正確に微細な部分まで簡便に検出できることを見出し、本発明を完成させた。

【0006】即ち、本発明は、（1）化合物の組織内分布を検出するにあたり、脂肪族一級アミノ基を有する化合物を投与し、多官能性アルデヒド化合物で固定化後、免疫組織化学染色することを特徴とする脂肪族一級アミ

ノ基を有する化合物の組織内または細胞内分布検出法、（2）脂肪族一級アミノ基を有する化合物が制癌剤である上記（1）記載の検出法、（3）多官能性アルデヒド化合物がグルタルアルデヒドである上記（1）または（2）に記載の検出法、に関する。

【0007】

【発明の実施の形態】以下、本発明を詳細に説明する。本発明は、化合物の組織内分布を検出するにあたり、脂肪族一級アミノ基を有する化合物を投与し、多官能性アルデヒド化合物で固定化後、免疫組織化学染色することを特徴とする脂肪族一級アミノ基を有する化合物の組織内または細胞内分布検出法である。本発明に使用する脂肪族一級アミノ基を有する化合物とは、分子中に、多官能性アルデヒド化合物と十分に反応しうる程度の活性を有する一級アミノ基を、一つ以上持っていればよく、多官能性アルデヒド化合物との反応位置は特に限定されるものではない。これらの化合物としては、後記の制癌剤の他に、抗菌抗生物質等、リジン残基やN末フリーのペプチドからなるホルモン性の薬剤や開発中の治療薬、ヒトの健康を害する可能性の有る食品添加物、残留農薬、環境汚染物質、または、それらの代謝関連物質等、分布の研究を要求される物質であれば、これらの全てを包含するが、好ましくは制癌剤が挙げられる。制癌剤としては、癌細胞に対して特異性の高い殺細胞活性、増殖抑制、アポトーシス、免疫誘導による癌細胞の排除等を誘導し、結果的に癌の治療に有効な物質を含む。メカニズムからは、ブスルファンに代表されるアルキル化剤、5-フルオロウラシルやテガフルに代表される代謝拮抗剤、マイトマイシンC、プレオマイシンやアドリアマイシンに代表される抗腫瘍性抗生物質製剤、エトポシドやタキソールに代表される抗腫瘍性植物成分製剤、リユープロレリンやゴセレリンに代表されるその他のホルモン剤（抗ホルモン剤を含む。）、その他の抗腫瘍用薬に分類されるタモキシフェン、トレミフェンやフルタミド等のホルモン拮抗剤類、シスプラチン、カルボプラチン等のプラチナム類、クレスチンやベスタチン等の免疫賦活剤類等がある。

【0008】本発明において、化合物を投与しその分布検出の対象となる組織または細胞は、化合物の取りこみや分布を調べたいものであれば何であってもよく、動物植物を問わず、特に限定されない。動物体、例えばマウス、ラット、犬、サル等に投与して薬剤の行方を追跡したり（分布）、蓄積部位を探ったり、新薬の開発研究に利用すること等もできる。また、癌患者に投与された制癌剤が、狙った癌組織に到達したかどうかや副作用の原因の探索等のために組織等を採取し検出することにも、本発明は利用することができる。動物組織や動物の培養細胞においては、組織や細胞内の作用部位を特定したり、薬効のメカニズム解明に利用することができる。植物の場合も同様で、例えば農薬の場合、その作用部位を

特定したり蓄積性を調査する等、幅広く利用することができる。本発明の検出法において、脂肪族一級アミノ基を有する化合物の投与量は、使用する化合物、検出の対象、測定方法等により異なるが、in vitroの系の場合0.01 μg/mLから10 mg/mL程度が、in vivoの系の場合0.01 mg/kgから1 g/kg程度が使用される。

【0009】本発明で使用する多官能性アルデヒド化合物は、目的化合物の抗原性を保持しながら存在局所に固定し、且つ組織の固定をして不溶化する。多官能性アルデヒドとしては、組織に固定化する目的化合物の分子中に存在する脂肪族一級アミノ基と、十分な反応性を有するホルミル基を2つ以上有するものであれば特に限定されない。好ましくは、脂肪族ジアルデヒド、例えばエタンジアル（グリオキサール）、プロパンジアル、ペンタンジアル（グルタルアルデヒド）等が挙げられる。グルタルアルデヒドの場合、培養細胞や動物組織の処理（目的化合物の固定）に用いる溶液の濃度は、0.01から10%が好ましく、特に好ましくは0.2から2%の範囲が挙げられる。

【0010】本発明に使用する免疫組織化学染色法とは、多官能性アルデヒドによって組織に固定された目的化合物を、それと特異的に反応する抗体を用いて、その局在性を検出できるものであれば何であってもよく、特に制限されない。上記抗体の製造法は特に限定されず、通常の方法、即ち、目的化合物を牛血清アルブミン等の蛋白質に結合し、マウス、ラット、家兎、ヤギ、馬、豚、鶏、鶏卵等に投与して免疫して得る方法でもよい。また、抗体の検出においては、内因性物質の局在性を研究するため等に従来から用いられている免疫組織化学染色法を応用すればよい。即ち、蛍光物質、酵素、金コロイド等で直接標識した抗体を用いて組織を免疫染色し、蛍光顕微鏡で抗体の蛍光を、光学顕微鏡で抗体の酵素反応で生じた色素を、電子顕微鏡で抗体の酵素分子や金コロイドを検出することにより可能である。さらに、抗原に反応した抗体を間接的に検出する方法として、蛍光物質、酵素、金コロイド等で標識した2次抗体を用いる方法、予めビオチンで標識した抗体を薬剤に反応させておき、2次反応として蛍光物質、酵素、金コロイド等で標識したアビジンを反応させ、アビジン・ビオチン複合体を作成させることによる検出方法（ABC法）等も用いられる。

【0011】また、免疫組織化学染色の際、組織の固定化に伴い抗原性の低下が起きることがあり、種々の対処法が検討されている。本発明においても、同様の工夫が必要な場合は、抗原性の回復や増強のため、通常行われている酸処理、還元処理、酸化処理、酵素処理、界面活性剤処理等の処理法を単独または組み合わせて行うことができる。例えば、本発明のグルタルアルデヒドを用いる処理の場合、組織に固定化されたダウノマイシンやブ

レオマイシンの抗原性の回復には、塩酸処理、水素化ホウ素ナトリウム還元処理及びプロテアーゼ処理が有効であった。

【0012】

【実施例】以下の実施例により本発明をより具体的に説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。なお、以下の表1～5中の記号は、+は免疫組織化学染色で明らかに反応している場合であり、+の数が多いほど強く反応していることを表し、±は若干反応している場合、-は反応が確認できない場合を表す。また、蛍光検出の場合も同様である。

【0013】実施例1 培養細胞内のダウノマイシンの免疫組織化学染色法による細胞内分布検出法

抗ダウノマイシン抗血清

藤原等の方法（J. Immunol. Methods, 45, p195-203 (1981)）に従い、2官能性架橋試薬、N-(マレイミドブチリルオキシ)コハク酸イミド（GMBS）（同仁化学研究所製）を用いて、ダウノマイシンとウシ血清アルブミン（BSA）を結合させ、ダウノマイシン・BSA複合体を調製する。このダウノマイシン・BSA複合体を抗原として、家兎に2週毎に4回感作し、抗ダウノマイシン抗血清を作成する。

【0014】細胞培養と固定

ヒト・メラノーマ由来の細胞株であるBD株を、MEM培地を用い、スライドガラス上で単層状に培養する。密集直前まで細胞を増殖させた後、0.3 μg/mL濃度のダウノマイシンを含むMEM培地に置換え、0.5～24時間インキュベートする。この培地を捨て、Mg²⁺とCa²⁺を含まないPBSで洗浄後、1.0%グルタルアルデヒド（GA）（ナカライテスク社製）を含むPBSで、室温下に30分間浸漬して細胞を固定する。さらに、0.15 Mの塩化ナトリウムを含む50 mM濃度のトリス・塩酸緩衝液（pH 7.4）（TBS）で洗浄し、免疫染色に供する。

【0015】前処理

前記のグルタルアルデヒド固定した培養細胞に、前処理として、順次、以下の処理を加える。(1)4規定塩酸処理：室温下に、4規定塩酸で30分間インキュベート後、TBS洗浄を5分間、4回繰り返す。(2)水素化ホウ素ナトリウム還元処理：0.5 mg/mLの水素化ホウ素ナトリウムを含むTBS溶液で5分間反応させた後、TBS洗浄を5分間、4回繰り返す。(3)プロテアーゼ処理：室温下に、20 μg/mL濃度のBacillus amyloliquefaciens由来のプロテアーゼ（タイプV、比活性8.9 U/mg、シグマ社製）を含むTBS溶液で30分間反応させた後、TBS洗浄を5分間、4回繰り返す。(4)ブロッキング：室温下に、サポニン0.1%、BSA 1%、正常ヤギ血清10%を含むTBS溶液で1時間ブロッキングする。

【0016】免疫染色

前処理した組織に、サポニン0.1%、BSA0.25%、正常ヤギ血清10%、トリトンX-100の0.1%を含む50mM濃度のTBS(pH7.4)で5000倍に希釈した抗ダウノマイシン抗血清を、4で一夜反応させる。塩化ナトリウム0.15MとトリトンX-100の1%を含む50mM濃度のトリス・塩酸緩衝液(pH7.4)(TBST)で3回洗浄後、サポニン0.1%、BSA0.25%、正常ヤギ血清10%を含む50mM濃度のTBST(pH7.4)で300倍に希釈した抗ウサギIgGヤギ抗体(Fab')の西洋わさ

【0017】細胞内ダウノマイシンの分布

実施例1-のダウノマイシン濃度を、0.3μg/mLから0.1μg/mL、0.03μg/mLに変えて同様に処理・免疫組織化学染色した組織の光学顕微鏡観察結果(本発明)と、ダウノマイシン固有の蛍光を観察する蛍光顕微鏡観察結果(蛍光検出)、及び実施例1-

のダウノマイシン濃度を0.3μg/mLから0.1*

表1 本発明と蛍光検出法との感度比較

ダウノマイシン処理濃度 (μg/mL)	検出感度	
	本発明 GA固定	蛍光検出 GA固定 FA固定
0.3	+++	- ++
0.1	++	- +
0.03	+	- -

【0019】実施例2 マウスにおけるダウノマイシンの組織内分布検出法

50gの雄性ddYマウスに、ダウノマイシン15mg/kg(200μL)を尾静脈から投与した。2時間後、ペントバルビタール麻酔下に、左心室から4.0mL/分の流速で生理食塩液50mL、次いで、2%のグルタルアルデヒドを含むPBSを50mL還流した。解体した各組織は、還流に用いた固定液と同組成の固定液

表2 ダウノマイシンの組織内分布

臓器	組織	部位/細胞	染色強度
腎臓	糸球体	タコ足細胞	++
		メサンギウム細胞	-
		曲部*	-
	近位尿細管	曲部*	++
		曲部*	+++
		直部	±
	ヘンレのループ	細管	++
		太い管	±
	遠位尿細管	曲部	++
		集合管	±
膵臓		ランゲルハンス細胞	++
		腺房細胞	±

*μg/mL、0.03μg/mLに変え且つ固定液の1%GAを3.7%ホルムアルデヒド(FA)に変えて固定した組織のダウノマイシン固有の蛍光を観察する蛍光顕微鏡観察結果を比較し、核内の検出感度を表1に示した。本発明によりダウノマイシンはBD株細胞の核内及びその周辺の細胞質中に分布していることが検出された。一方、蛍光法では、固定法の違いによってダウノマイシンの分布検出結果が異なった。即ち、1%GA固定の場合には、核周辺の細胞質中に強い蛍光を示したが、核内の蛍光は極めて弱かった。3.7%FA固定の場合には、核内のみ強い蛍光を認めた。これらの結果は、GAは固定力が強いが核内のダウノマイシン蛍光を消光し、FAは固定力が弱く細胞質中のダウノマイシンが細胞質中のライソゾームやゴルジ器官に十分に固定化できないことを示している。従って、本発明の免疫染色法によれば、蛍光法では不可能であった同一細胞試料によるダウノマイシンの核と細胞質中での同時検出が可能となった。また、本発明のダウノマイシンの核内での検出感度は、表1の様に従来の蛍光検出法より3倍高かった。

【0018】

で、さらに、4で24時間浸漬して固定した。固定した組織は、定法に従ってパラフィン包埋後、5μmに薄切し、組織標本とした。パラフィン切片組織標本の染色は、定法により脱パラフィン後、実施例1のグルタルアルデヒド固定した培養細胞と同様の方法で免疫染色した。その結果、各組織及びその細胞は、表2の様に染色された。

【0020】

胃	基底部	主細胞、壁細胞	±
	幽門部	幽門腺底部細胞	+
腸	小腸	villus cells	-
		陰窩細胞	+
大腸		パネート細胞	+
		十二指腸腺細胞	+
		陰窩腺底部細胞	+
心臓		陰窩部表層細胞	-
		心筋細胞	+
平滑筋		平滑筋細胞	+
末梢毛細血管		血管内皮細胞	++8

【0021】実施例3 部位には刃染色性免疫組織化学染色法による細胞内分布検出法
細胞処理の薬剤をダウノマイシンからアドリアマイシンに変え、薬剤濃度を4 µg/mL、0.9 µg/mL、0.3 µg/mL、0.06 µg/mLとし、実施例1と同じ抗ダウノマイシン抗血清を用いて実施例1と同様に処理・免疫組織化学染色した細胞を光学顕微鏡下に観察し、その結果を表3に示した。抗ダウノマイシン抗血清は、ダウノマイシンと化学構造が極めて近似するアドリアマイシンとも、高い反応性を示し、アドリアマイシンの分布の検出にも応用可能である。

*【0022】実施例4 エピルピシンの免疫組織化学染色法による細胞内分布検出法
細胞処理の薬剤をダウノマイシンからエピルピシンに変え、実施例1と同様に処理してその結果を表3に示した。抗ダウノマイシン抗血清は、ダウノマイシンと化学構造が極めて近似するエピルピシンとも、反応性を示し、エピルピシンの分布の検出にも応用可能である。なお、これらのダウノマイシン類縁体のなかで相対的な反応性は、ダウノマイシン>アドリアマイシン>エピルピシンの順で、構造の類似性の順に一致していた。

表3 ダウノマイシン構造類似体との反応性

薬剤処理濃度 (µg/mL)	アドリアマイシン	エピルピシン
4	++++	++++
0.9	++++	+++
0.3	+++	++
0.06	++	+

【0024】実施例5 プレオマイシンの免疫組織化学染色法による組織内分布検出法
抗プレオマイシン抗血清
藤原等の方法(Cancer Treat. Reports, 67, p363-369 (1983))に従い、GMB Sを用いて、プレオマイシンとBSAを結合させ、プレオマイシン・BSA複合体を調製する。このプレオマイシン・BSA複合体を抗原として、家兎に、2週毎に4回感作し、抗プレオマイシン抗血清を作成する。

細胞培養と固定
BD株を、MEM培地を用い、スライドガラス上で単層状に培養する。密集直前まで細胞を増殖させた後、20 µg/mL濃度のプレオマイシンを含むMEM培地に置き換え2時間インキュベートする。この培地を捨て、Mg²⁺とCa²⁺を含まないPBSで洗浄後、1.0%グルタルアルデヒドを含むPBSで、室温下に30分間浸漬して細胞を固定する。さらに、TBSで洗浄し、免疫染色に供する。

【0025】前処理
前記のグルタルアルデヒド固定した培養細胞に、前処理

20 として、順次、以下の処理を加える。(1)4規定塩酸処理：室温下に、4規定塩酸で30分間インキュベート後、TBS洗浄を5分間、4回繰り返す。(2)水素化ホウ素ナトリウム還元処理：1mg/mLの水素化ホウ素ナトリウムを含むTBS溶液で5分間反応させた後、TBS洗浄を5分間、4回繰り返す。(3)プロテアーゼ処理：室温下に、20 µg/mL濃度の前出のBacillus amyloliquefaciens由来のプロテアーゼを含むTBS溶液で40分間反応させた後、TBS洗浄を5分間、4回繰り返す。(4)ブロッキング：室温下に、サポニン0.1%、BSA1%、正常ヤギ血清10%を含むTBS溶液で1時間ブロッキングする。

【0026】免疫染色
前処理した組織に、サポニン0.1%、BSA0.25%、正常ヤギ血清10%を含む50mM濃度のTBST(pH7.4)で10000倍に希釈した抗プレオマイシン抗血清を、4で一夜反応させる。TBST3回洗浄後、サポニン0.1%、BSA0.25%、正常ヤギ血清10%を含む50mM濃度のTBST(pH7.4)で300倍に希釈した抗ウサギIgGヤギ抗体(F

ab')の西洋わさびペルオキシダーゼ標識体で、室温下に2時間2次反応を行う。さらに、TBS Tで2回、TBSで1回洗浄後、定法に従い、3,3'-ジアミノベンジジン・4塩酸塩(DAB)で染色する。

【0027】 プレオマイシン抗体の特異性

実施例5-の抗プレオマイシン抗血清の特異性を確認するため、実施例5-のプレオマイシンに代えて、市販の抗生物質であるペプレオマイシン、マイトマイシンC、ダウノマイシン、アドリアマイシン、ジェンタマイシン、カナマイシンを用いて、BD株を処理(各薬剤の濃度は20µg/mL)し、実施例5-に従って組織染色した。その結果、表4の様に、プレオマイシンと類縁化合物に当たるペプレオマイシンとは反応したものの、その他の薬剤とは全く反応性を示さなかった。この結果、抗プレオマイシン抗血清はペプレオマイシンの分布の検出にも応用可能である。

【0028】

表4 プレオマイシン免疫組織化学染色の特異性

投与薬剤	染色強度	
プレオマイシン	+++	20
ペプレオマイシン	++	
マイトマイシンC	-	
ダウノマイシン	-	
アドリアマイシン	-	
ジェンタマイシン	-	
カナマイシン	-	

【0029】 マウスにおけるプレオマイシンの組織内

表5 プレオマイシンの腎臓内分布

臓器	組織	部位/細胞	染色強度
腎臓	系球体	タコ足細胞	±
		メサンギウム細胞	-
	近位尿細管	曲部*	±
		曲部*	++
		曲部*	+++
		直部	+
	ヘンレのループ	細管	+
		太い管	-
遠位尿細管	曲部	-	
集合管		-	

* 部位により染色性に差があった。

【発明の効果】本発明の多官能性アルデヒド化合物による固定化後の免疫組織化学染色法を用いる脂肪族一級アミノ基を有する化合物の組織や細胞内分布の検出方法に

分布

50gの雄性ddYマウスに、プレオマイシン15mg/kg(200µL)を尾静脈から投与した。3時間後、ペントバルビタール麻酔下に、左心室から4.0mL/分の流速で生理食塩液50mL、次いで、2%のグルタルアルデヒドを含むPBSを50mL還流した。解体した各組織は、還流に用いた固定液と同組成の固定液で、さらに、4で24時間浸漬して固定した。固定した組織は、定法に従ってパラフィン包埋後、5µmに薄切し、組織標本とした。パラフィン切片組織標本の染色は、定法により脱パラフィン後、グルタルアルデヒド固定した培養細胞と同様の実施例5-の方法で免疫染色した。腎臓が典型的に染色されたので、腎臓内でのプレオマイシンの組織分布を、表5に示した。

【0030】

より、新薬の開発や薬剤の副作用発生機序等の情報を簡便に得ることが可能となる。

专利名称(译)	检测施用化合物的细胞内或细胞内分布的方法		
公开(公告)号	JP2001318097A	公开(公告)日	2001-11-16
申请号	JP2000137900	申请日	2000-05-11
[标]申请(专利权)人(译)	日本化药有限公司		
申请(专利权)人(译)	日本化药有限公司		
[标]发明人	藤原邦雄 鹤大典		
发明人	藤原 邦雄 鹤 大典		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/48		
FI分类号	G01N33/53.G G01N33/48.P		
F-TERM分类号	2G045/AA24 2G045/BB23 2G045/BB25 2G045/CB02 2G045/DA78 2G045/DA80 2G045/FB03 2G045/FB07 2G045/GC15		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：精细和方便地检测所施用化合物在组织或细胞中的掺入或分布（定位）。解决方案：化合物在组织或细胞中有效固定而不损害化合物的免疫原性，并进行免疫组织化学检测。