

## 【科学分野】

## 細胞機能・遺伝子の解析

標識化合物を用いて、細胞のタンパク質や核酸の合成状態や遺伝子の発現状態の解析などが可能である。これらの手法は、細胞生物学、分子生物学といった基礎研究の分野で広く利用されている。

ホルモン、増殖因子、サイトカインといった生体内活性物質の刺激を受けた細胞では、酵素の活性が変化したり、細胞分裂が引き起こされたり、または遺伝子の発現変動が惹起されたりする。このような変化は、通常ある指標の変動から定性的または定量的に観察することができる。この目的のためには、放射性同位元素で標識された化合物を用いたトレーサ法が有用である。**トレーサ法**とは、放射性同位元素で標識された物質を使って、放射能を目印にその物質の挙動を追跡する方法である。この方法の特徴は、放射線を出す以外は元の物質と化学的にまったく同じ挙動を示す物質（トレーサ）を用いていることである。また、放射能の測定は物質量が極微量でも可能であるため、通常トレーサによる薬理学的な効果が現れることはない。

## 細胞生物学での応用

## 1) タンパク質に関連した実験

細胞の情報伝達機構にはタンパク質のリン酸化という過程が随所にみられる。ある生理活性物質の刺激によってどのようなタンパク質のリン酸化が誘導されるのかを観察するため、放射性のPを細胞に取り込ませる実験が汎用される。このPがタンパク質に結合していく過程を放射能測定やオートラジオグラフィなどで定量化または視覚化する。例えば、 **$^{32}\text{P}$  または  $^{33}\text{P}$  で 位のリン酸が標識されたATP**を培養液中に添加し、特定のタンパク質を電気泳動で分離し、オートラジオグラフィでPの結合量を観察する。

細胞内におけるタンパク質の合成（翻訳）では、リボゾーム上でmRNAの情報に基づき指定のアミノ酸をペプチド結合で連結していく。あらかじめ培養液中に標識アミノ酸を添加しておくことで、合成されたタンパク質に放射性アミノ酸が組み込まれていくため、タンパク質を回収し放射能を測ることで、その細胞におけるタンパク質合成の変動を観察することができる。この目的のために $^3\text{H}$ 、 $^{14}\text{C}$  標識の**L-ロイシン**や $^{35}\text{S}$  標識の**L-メチオニン**、**L-システイン**などが用いられる。

## 2) 核酸に関連した実験

細胞が増殖するためには、DNAの合成およびそれに伴うRNAの合成が必要である。これらの核酸の量は、常時厳密に調整されているため、その劇的な量の増加は分裂によって数が倍増する細胞増殖を反映するひとつのパラメータとなる。核酸の合成は、アデニン、グアニン、チミン、シトシン、ウラシルなどの塩基とリボース、デオキシリボースといった糖が結合したチミジンやデオキシウリジンといったヌクレオシドを原料とする。これにリン酸が結合することでDNAやRNAを構成するヌクレオチドができる。そのため、培養液中などに放射性のヌクレオシドを添加し、細胞への取り込みを観察することで、核酸合成の変動を測定することができる。この目的のために、 $^3\text{H}$ 、 $^{14}\text{C}$  標識の**デオキシチミジン**や**ウリジン**が用いられる。また測定が容易である  $\beta$ 線を放出する  $^{125}\text{I}$  標識の**5-ブromo-2'-デオキシウリジン**といった標識化合物もある。これらの物質は培養細胞を用いた実験で利用されているが、マウスなどの実験動物に直接投与し全身オートラジオグラフィを行うことで、*in vivo*での核酸合成の状況観察も可能である。

## ポイント整理

### トレーサ法

放射性同位元素で標識された物質の放射能を目印にその物質の挙動を追跡する方法

トレーサ { 放射線を出す以外は元の物質と化学的にまったく同じ挙動を示す。  
薬理的な効果が現れることはない。

### 細胞生物学での応用

#### タンパク質関連

リン酸化：<sup>32</sup>Pまたは<sup>33</sup>Pで 位のリン酸が標識されたATP タンパク質への取り込み 情報伝達機構の解析

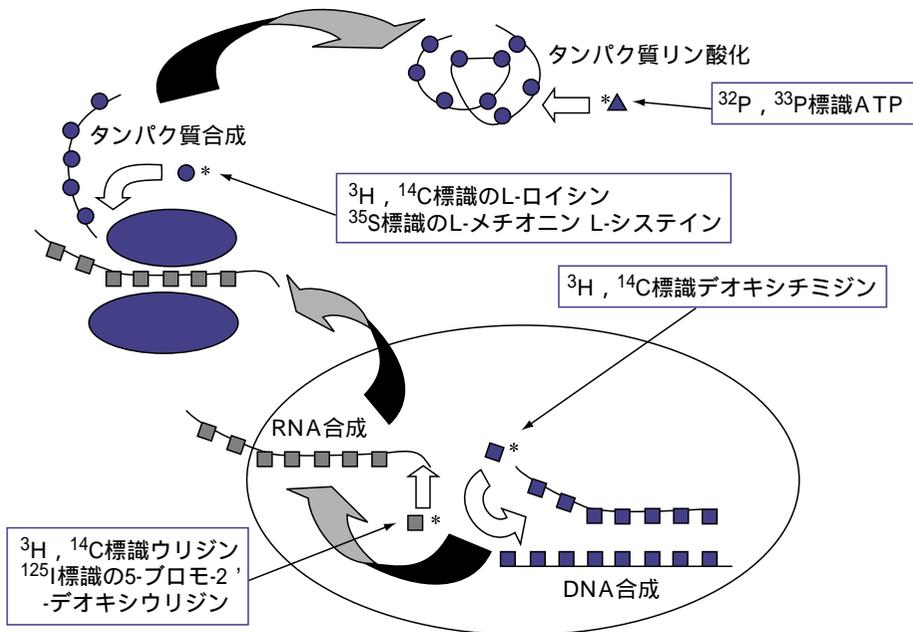
合成状況：<sup>3</sup>H, <sup>14</sup>C標識のL-ロイシン

細胞への取り込み タンパク質合成状況の観察

<sup>35</sup>S標識のL-メチオニンやL-システイン

#### 核酸関連

合成状況： ( <sup>3</sup>H, <sup>14</sup>C標識のデオキシチミジンやウリジン ) 細胞への取り込み 細胞増殖の指標  
( <sup>125</sup>I標識の5-プロモ-2'-デオキシウリジン )



## 知識を広げる

### 無細胞タンパク質合成技術

細胞そのものを用いずにタンパク質の合成を再現する方法である。細胞より抽出した翻訳に必要な成分に目的タンパク質をコードするmRNA, 基質となるアミノ酸, エネルギー源(ATP)等を加えることで, 試験管内で人工的にタンパク質を合成することが可能となる。このような実験においても標識アミノ酸は利用される。

## 遺伝子工学・分子生物学での応用

### 1) DNAの塩基配列決定法

DNAは、4種類のヌクレオチドが連結した高分子化合物であるが、ここに含まれる塩基の配列は、生体において実際に機能しているタンパク質のアミノ酸配列の情報そのものである。したがって、DNA塩基配列の決定は、生命科学の研究において最も重要な作業のひとつである。このための一般的な手法として、**ジデオキシ法（サンガー法）**が知られている。酵素等必要な物質の存在下でのDNA合成において、鋳型となる（解析したい）DNAに相補的な配列で、原料となるヌクレオチドが連結されていく。この反応系に3'位に水酸基のない2',3'-ジデオキシリボヌクレオチド、すなわち不完全なヌクレオチドを添加しておくことと必要なヌクレオチドの代わりに不完全なそれを連結した時点で合成は止まる。この結果、合成途中のさまざまな長さのヌクレオチド断片が生成する。これらをゲル電気泳動で分離し、短いものから順に並べることで鋳型DNAの塩基配列を読み取ることができる。このヌクレオチド断片の目印として、<sup>32</sup>P, <sup>33</sup>P, <sup>35</sup>Sなどで**位のリンを標識したデオキシヌクレオチド**（[<sup>-32</sup>P] dCTP, [<sup>-35</sup>S] dCTPなど）が反応系に添加される。電気泳動後は、オートラジオグラフィにて断片を視覚化して解析に供与する。なお、このようなヌクレオチドの標識は、蛍光標識を用いる手法が普及し、現在ではRIを用いることはあまりない。

### 2) 遺伝子発現の解析法

細胞内におけるある特定のタンパク質の量的変化を解析する場合、それをコードしているDNAの発現量を把握することは重要である。また、そのDNAの情報を翻訳によって読み取ったmRNAの発現量も同様にタンパク質量の変動を反映している。このような目的で行われる実験のひとつにハイブリダイゼーション法がある。細胞や組織からDNAやmRNAを抽出し、これをゲル電気泳動によってサイズ別に分離する。次にゲル内に埋まっているDNA鎖、mRNA鎖を適当な膜（ニトロセルロース膜など）の表面に転写する。別に目的のDNAやmRNAと相補的な配列の鎖（プローブ）を作成し、放射性同位元素で標識しておく。一般に<sup>32</sup>P, <sup>33</sup>P, <sup>35</sup>Sなどで**位のリンを標識したデオキシヌクレオチド**で合成した鎖が用いられる。膜上のDNA鎖、mRNA鎖にこのプローブを反応させ、目的の配列を持つ部分に結合させる。結合した量はオートラジオグラフィで検出、定量が可能となる。細胞より抽出したDNAを制限酵素で切断後の発現量を解析する方法を**サザンブロットイング**、mRNAの発現解析は**ノーザンブロットイング**という。

同様の原理で、組織切片中のDNA、mRNAの発現を解析する方法としてin situハイブリダイゼーションがあり、遺伝子発現の研究推進においては重要な手法となっている。このうち、マウス胎児など丸ごとの生体で行う方法を特に**ホールマウントin situハイブリダイゼーション**という。ただし、これらの手法では取り扱いの容易な蛍光物質標識プローブを用いるのが一般的である。

### 3) 遺伝子とタンパク質の相互作用の解析法

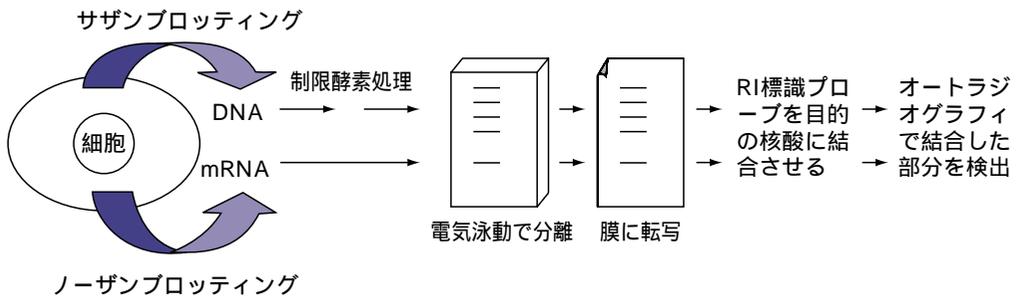
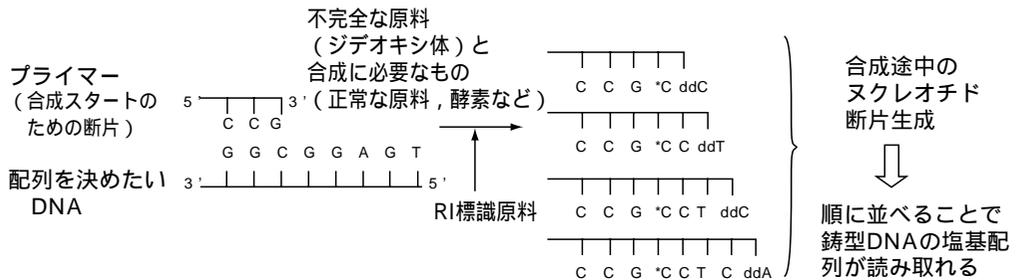
細胞の核内では、転写因子のようなタンパク質がDNAの特定の配列を認識して結合する現象がみられる。あるDNA配列に結合するタンパク質を検出したい場合、放射性同位元素で標識したDNA断片をタンパク質溶液と混和し、電気泳動によってタンパク質と結合したDNAを分離し、オートラジオグラフィによって検出する。このような手法を**ゲルシフトアッセイ**という。また、タンパク質と結合させた後、DNAを分解する酵素を処理すると、タンパク質結合部分は切れないため、その部分だけをオートラジオグラフィで検出できる。これを**フットプリンティング法**という。

## ポイント整理

### 遺伝子工学・分子生物学での応用

- ・ DNAの塩基配列決定法：ジデオキシ法（サンガー法）；  
不完全な原料（ジデオキシリボヌクレオチド）  
の取り込み部位でDNA合成が停止することを利用
  - ・ 遺伝子発現の解析法：
    - サザンブロッティング；DNAの発現量を解析
    - ノーザンブロッティング；mRNAの発現量を解析
  - ・ 遺伝子とタンパク質の相互作用の解析法：
    - ゲルシフトアッセイ
    - フットプリンティング法
- }  $^{32}\text{P}$ ,  $^{33}\text{P}$ ,  $^{35}\text{S}$ などで標識したデオキシヌクレオチドをトレーサとして使用  
([  $^{32}\text{P}$  ] dCTP, [  $^{35}\text{S}$  ] dCTPなど)

### ジデオキシ法（サンガー法）



## 知識を広げる

### DNA 診断

肝炎ウイルスなどが持つDNAやRNAを人の血清や組織から検出、これを定量して病気の診断をする方法である。目的の配列を持つ核酸を検出するために、その配列と相補的な核酸断片を $^{32}\text{P}$ などの放射性同位元素で標識し、これを試料に反応させてオートラジオグラフィを行う。ただし、検出法は、取り扱いの容易な酵素標識や蛍光標識が主流になってきている。この方法で、ウイルスだけではなくある種の細菌の感染症や癌遺伝子の発現状況、遺伝病の診断などが可能となっている。

## 【医療分野】

## 放射性医薬品

放射性同位元素を含んだ物質や放射性同位元素が何らかの形で結合した物質で、そこから放出される放射線を利用して病気の診断や治療に用いられる医薬品のことをいう。

## 定義

放射性医薬品とは、物質から発生する放射線を利用して、病気の診断や治療を目的に利用される医薬品のことである。この医薬品としては、構成元素のひとつを安定同位体から放射性同位体に置換したあるいはキレート剤などによって放射性同位元素を結合させた無機または有機化合物、あるいはタンパク質などがある。また法的な定義では、**日本薬局方**または**放射性医薬品基準**に記載されているものとされる。また、これらに未収載のものでも厚生労働大臣の承認を得たものや治験薬や高度先端医療に用いられている物質が含まれる場合もある。放射性医薬品は薬事法によりすべて処方せん医薬品に指定されている。

## 分類

放射性医薬品には、人体に直接適用する**インビボ診断薬**と**インビボ治療薬**の他に、人体に直接適用しないが血液検査のように体外で診断を行う**インビトロ診断薬**も該当する。ただし、治療のために人体に適用される放射性物質が密封されたラジウム針やヨード針などは、治療用放射線器具に該当し、放射性医薬品には含まれない。インビボ診断薬は、物質の性質に従って体内に分布した状況を、体外から放射線を検出することで把握し、疾病の診断をするものである。この医薬品には、体外から放射線検出が容易な  $\alpha$ 線放出核種や消滅放射線を放出する  $\beta^+$ 放出核種が用いられる（**核医学診断**）。放射線の検出法として、ガンマカメラやSPECT、PETなどが用いられる（p.150参照）。インビボ治療薬は、体内に集積した部位で放射線を組織に照射し、病巣を破壊する目的で用いられる。現在、臨床的な使用は、 $\beta^-$ 線放出核種を使った内部照射療法に限られている。インビトロ診断薬は、血液中のホルモンの定量など体外での分析に用いられる。半減期が比較的長い  $\beta^-$ 線や  $\beta^+$ 線放出核種を使ったRIA、RRAやIRMAがある（p.108参照）。

## 特徴

インビボ放射性医薬品の目的は、そこから発生する放射線を利用して診断・治療を行うことである。したがって、人体に直接適用するインビボ利用では、目的を達成したなら速やかに放射能が消失し、患者が必要以上に被ばくしないことが望ましい。そのため、通常は物理的半減期の短い核種が用いられる。つまり放射能の減衰は医薬品としての利用価値がなくなることを意味するため、放射性医薬品の有効期限は一般医薬品に比べてきわめて短い。また、放射性物質は、自身が放つ放射線のエネルギーによって、化学結合の切断が引き起こされる場合がある。この自己分解によっても放射性医薬品としての有効性を失う場合がある（p.80参照）。

診断・治療に必要な放射線を発生するための放射性物質は物質質量としては、きわめて微量でよい。したがって、たとえ放射性医薬品が物質として薬理学的性質を持っていたとしても、その薬効が人体に現れることはない。すなわち、放射性医薬品では、用量-作用関係はみられない。

その他、放射性医薬品の利用のためには、医療法や放射線障害の防止に関する法律などの放射線関連法令に則った施設や管理が必要である点が、一般医薬品との大きな違いである。

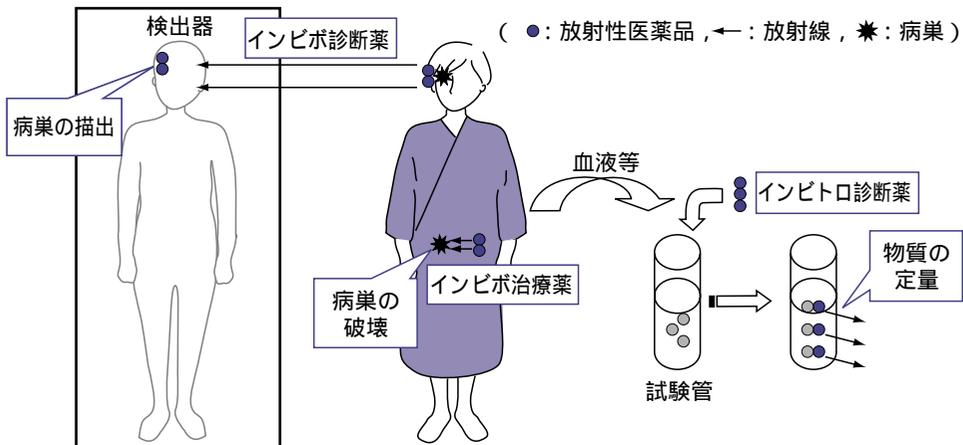
## ポイント整理

### 定義

- ・日本薬局方，放射性医薬品基準に記載。
- ・病気の診断・治療のために，人体に直接適用するもの（インビボ）または直接は適用しないもの（インビトロ）。
- ・厚生労働大臣の承認を受けたもの（治験用，高度先端医療に用いられているもの等）。
- ・薬事法によりすべて処方せん医薬品に指定。

### 分類

目的	放射性医薬品の種類	使用される核種		方法等
		線種	半減期	
治療	インビボ治療薬	-	比較的短い	内部照射療法
診断	インビボ診断薬	,	短い,きわめて短い	ガンマカメラ,SPECT,PET
	インビトロ診断薬	,	比較的長い	RIA,RRA,IRMA



### 特徴

- ・物理的半減期が短いものが多い
  - ・自己分解がある
  - ・物質量は微量 薬理作用は発現しない 容量 - 作用関連はない
  - ・放射線関連法令の規制を受ける 特別な施設，管理を要する
- } 有効期限が短い

## 知識を広げる

### 放射性医薬品を規制する主な法令等

医療法 } 放射性医薬品と治験薬およびそれを使用する施設を規制  
薬事法 }

放射性同位元素等による放射性障害の防止に関する法律（放射線障害防止法）：PET用の医薬品を合成するための施設や放射性廃棄物の扱いなどを規制

その他，放射性医薬品を扱う医療従事者の教育や被ばく管理，健康診断等が，医療法，放射線障害防止法，電離放射線障害防止規則などに規程されている。