

色素と金属イオンを用いる 病態関連物質の分析法の開発に関する研究

田中 (宮地) 加奈子^{a*}, 藤田芳一^b

Research on the Development of Analytical Methods for Pathologic-related Substances Using Dye and Metal Ion

Kanako TANAKA (MIYACHI) and Yoshikazu FUJITA

^a EP-PharmaLine Co., Ltd., 3-27-12 Nishi-Ikebukuro, Toshima-ku, Tokyo 171-0021, Japan

^b Osaka University of Pharmaceutical Sciences, Nasahara, Takatsuki-shi, Osaka 569-1094
Osaka Shin-ai College, Furuichi, Joto-ku, Osaka-shi, Osaka, 536-8585

(Received October 16, 2020 ; Accepted December 1, 2020)

Abstract In today's clinical site, the concept of "health, undiagnosed disease, and disease" is gaining popularity. In order to catch the symptoms of disease in the stage of undiagnosed, development of simple and highly-sensitive pathologic-related substances is required.

In this study, xanthene-based dyes and triphenylmethane-based dyes are selected as substrates for pathologic-related substances measuring methods. Xanthene dyes are detectable both in the color reaction and fluorescence reaction. Triphenylmethane-based dyes have some structure similarities with xanthene-based dyes, so these are also selected as the substrates. These dyes form a ternary complex with pathologic-related substances and a metal ion. We investigated new measuring methods of variety of pathologic-related substances, such as spermine and proteins (histone, albumin).

In the spectrophotometry of spermine using *o*-hydroxyhydroquinonephthalein (QP) and manganese {Mn(II)}, this method was applicable in the range of 0.2 to 1.5 $\mu\text{g/mL}$ spermine concentration. In this range, the molar extinction coefficient (ϵ) was $1.4 \times 10^5 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. In the spectrofluorometry of histone using 3,4,5,6-tetrafluoro-2-carboxyphenylfluorone and manganese {Mn(II)}, this method was applicable in the range of 0.5 to 2.0 $\mu\text{g/mL}$ histone concentrations. In the spectrophotometry of albumin using xylenol orange and zirconium {Zr(IV)}, this method was applicable in the range of 1.0 to 9.0 $\mu\text{g}/10\text{mL}$ HSA (human serum albumin) concentration. The detection sensitivity was more than 50 times higher than that of conventional methods, such as the PR method.

The new methods are superior to the conventional methods in terms of sensitivity, selectivity, and convenience. Good results have been obtained in rapid analyses using FIA and application to actual samples. It is suggested that these new methods are effective and useful in the clinical site.

Key words — spectrophotometry, spectrofluorometry, dye and metal ion, pathologic-related substances

1. はじめに

臨床現場においては、「健康・未病・病気」の概

念が広く浸透しており、病態を早期の未病の段階で発見し、可能な限り、早期治療を行うことが現代医療には求められている。未病とは、“自覚症状

*^a 株式会社EPファーマライン メディカルアフェアーズ部 審査事業グループ, 東京都豊島区西池袋3丁目27号12番, e-mail:tanaka140319@eppharmaline.co.jp

^b 大阪薬科大学, 大阪親愛学院短期大学

本総説は、宮地加奈子の博士論文に基づき再構成したものである

はないが検査結果に異常がある場合”，あるいは“自覚症状はあるが検査結果に異常がない場合”を指す。未病の段階において、自覚症状がない場合は放置され、病態の進展を伴う可能性が高い。自覚症状のない段階で病態を把握するには、該当するバイオマーカーなどの病態関連物質の簡便、高感度な測定法の開発が必要である。

現在の病態関連物質の測定法においては、マトリックス成分が極めて複雑な試料を扱っている関係上、分離と特異性に優れたHPLC、GC、酵素分析法、免疫測定法などが汎用されている¹⁾。一方、最近の臨床化学分野における、光分析法の代表である吸光光度法は、新しい反応原理の探索や新しい有機試薬の開発も含め、活発には行われていないのが現状である。しかしながら、吸光光度法は、① $A = \varepsilon cl$ で示されるように、測定値が ε によって一義的に定義されるので、吸光度を再現性よく測定できる、②安価な機器を用いて簡易な操作で信頼しうるデータが比較的高感度に得られる、③フローインジェクション法(FIA)や自動分析に適用されやすい、などの特徴を有しており、優れた分析法であることに変わりはない¹⁻³⁾。吸光光度法や蛍光光度法のような光分析法は、より簡便、迅速、高感度で信頼性のある測定法である。したがって、臨床現場での多くの要求を満たす臨床化学分析法として活用することが期待される。

被分析物質の化学的性質を踏まえ、光分析法を反応様式別に分類すると、

- [1] 被分析物質の酸化還元能を利用する方法
- [2] 被分析物質の錯生成能を利用する方法
- [3] 被分析物質を誘導体化する方法
- [4] その他の方法

に大別される。

このうち、[2]の方法は、他の方法に比べて、反応速度、操作の簡便性などの面で優位性がある。また、今回取り上げる病態関連物質のスペルミン、タンパク質は、その構造中に窒素原子、酸素原子、硫黄原子を含むため、それらの原子の非共有電子対を通して金属イオンと配位結合し、金属錯体が生成しやすい。したがって、[2]の分析法が効果的であると考えられる。

さらに[2]は、用いる分析試薬によって、以下に分類される。

- [2-1] 金属イオンとの錯生成反応を用いる方法
- [2-2] 有機試薬との錯生成反応を用いる方法
- [2-3] 有機試薬と金属イオンの両者を用いる方法

このうち、有機試薬、金属イオン及び被分析物質の三者間で生成する三元錯体生成反応を利用する[2-3]の方法は、簡便で高感度、高選択性などの長所を有している⁴⁻¹²⁾。また、[2-3]においては、金属イオンと有機試薬との間の呈色錯体生成反応中に、その金属イオンと錯生成能を有する被分析物質を共存させることにより、競合的に錯体生成反応を起こさせ、その結果としての呈色錯体の退色を利用する分析法も考えられる。

これら三元錯体生成反応に適している有機試薬は、キノイド構造を形成する高度に発達した π 電子系(発色団)を持つため、その有効面積が大きい。また、五・六員環キレート生成基の近傍に電子供与性基(助色団)を持つ。キサnten系、トリフェニルメタン系色素などの色素は、高次錯体が生成し易いなどの特徴を有するため、金属イオンとの錯生成に伴い吸光係数の大きな増大や高い蛍光強度を示す^{2, 13)}。

一方、このような三元錯体反応による呈色錯体は、いずれもかさ高くなることによる沈殿生成が見られる場合が多く、したがって分散剤の共存が必要となる。そこで、生成物に対し適切な界面活性剤を選択し、形成されるミセル溶液中で、色素、金属イオン、被分析物質の三者を反応させると、(a)高次錯体生成に伴う高感度化と呈色体の安定化、(b)生成する呈色錯体のミセル界面への濃縮効果による感度の上昇と安定性の増大、(c)選択性の向上、(d)さらなる呈色化学種の吸収断面積の増加などの効果が期待できる。

本総説では、呈色反応及び蛍光反応両面からの追跡が可能な特性を有するキサnten系と、その類似体であるトリフェニルメタン系の色素を選択し、吸光光度法、蛍光光度法により、病態関連物質のスペルミン、タンパク質(ヒストン、アルブミン)の新規測定法を検討した。

2. 色素－金属錯体との三元錯体生成反応を利用する分析法

2-1. スペルミン及び関連化合物の吸光光度定量に関する検討

ポリアミンは、3個以上のアミノ基を持つ非タンパク性の脂肪族アミンの総称で、メチオニンやアルギニンに由来し、ポリアミン合成経路によりオルニチンからまずプトレッシン (Put) が生成され、ついでスペルミジン (Spd), スペルミン (Spm) がつくられる¹⁴⁾。临床上ポリアミンの測定は、悪性腫瘍診断の補助、術後化学療法後の効果判定に有用であり、又、心筋梗塞、膠原病やその他の炎症性疾患でも高値を示し、このような病態のアセスメントに役立つ可能性が示唆されている¹⁴⁾。

ポリアミンの定量法としては、高速液体クロマトグラフ法¹⁵⁻²²⁾ (HPLC: High Performance Liquid Chromatography), 免疫酵素法²³⁾ (ELISA: Enzyme Linked Immunosorbent Assay) あるいはガスクロマトグラフ法^{24,25)} (GC: Gas Chromatography) などが報告されている。一方、ポリアミンは複数の窒素原子を持つため、マンガン(II) {Mn(II)}, 亜鉛(II), パラジウム(II) など多くの金属イオンと錯生成することが知られている^{26,27)} にもかかわらず、その金属配位能を利用した定量法は殆ど報告されていない。

そこで、今回、ポリアミンのうち Spm を取り上げ、{金属－色素－Spm} の三元錯体生成反応を検討し、トリス/塩酸緩衝液と非イオン性界面活性剤 Tween 40 共存下、色素として *o*-ヒドロキシヒドロキノンフタレイン (*o*-カルボキシフェニルフルオロン, QP), 金属イオンとして Mn(II) を用いることにより、Spm の簡便、高感度な吸光光度定量法を開発した。Fig.1 に本法における吸収スペクトルを示した。さらに、共存物質の影響、呈色錯体の組成、Spm と AcSpm の逐次分析について検討した。また、本呈色反応に基づく FIA の開発についても検討を加えた。

設定した定量操作に従って Spm の検量線を作成したところ、0.2～1.5 μ g/mL の Spm 濃度範囲で原点を通る良好な直線を得ることができた。本法における {Mn(II)-QP} 溶液に対する {Mn(II)-QP-Spm} 溶液の見かけのモル吸光係数 (ϵ) は、 $\epsilon = 1.4 \times 10^5$ L mol⁻¹cm⁻¹ と高感度であった。また、0.5 μ g/mL における相対標準偏差 (RSD) は 0.50% (n = 10) であり、再現性にも非常に優れていた。Spm 及びその関連化合物の定量感度 (ϵ) 並びに再現性 (RSD) を Table1 に一括表示するが、Spd, AcSpm は Spm のほぼ 1/2 程度の感度であり、また、Put, カダベリン (Cad) は殆ど本呈色反応を示さなかった。

加えて、本法における共存物質の影響を Spm

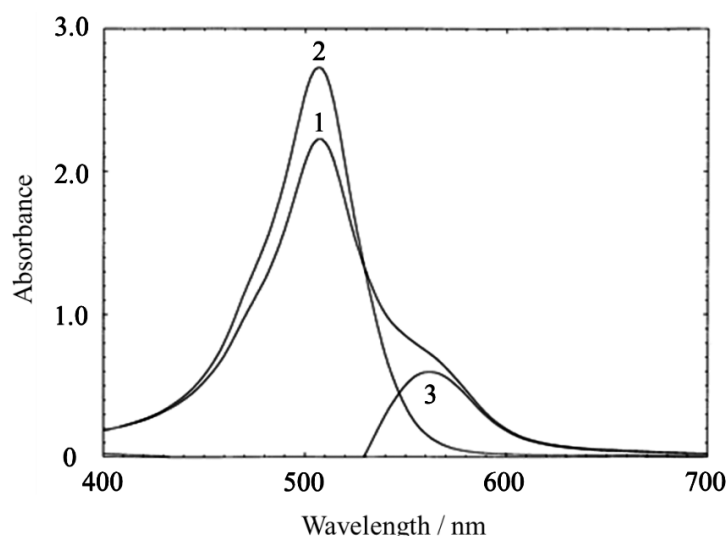


Fig. 1 Absorption spectra of {Mn(II)-QP-Spm} and {Mn(II)-QP} solutions

Spm; 5.0×10^{-6} M; Mn(II); 5.0×10^{-5} M; QP; 5.0×10^{-5} M; Tween 40; 0.2 %; pH 8.0; reference; Water: curve 1; {Mn(II)-QP-Spm} solution: curve 2; {Mn(II)-QP} solution: curve 3; curve 1 minus curve 2.

文献28) に加筆・訂正

Table 1 Molar absorptivities and reproducibilities of Spm and its related compounds

Compound	$\epsilon (\times 10^4)$	RSD (%)
Spm	14.0	0.50
Spd	6.1	0.60
Put	0.06	—
Cad	0.05	—
AcSpm	7.50	—
N^8 -AcSpd	0.30	—
AcPut	0	—

Spm : Spermine $H_2N(CH_2)_3NH(CH_2)_4NH(CH_2)_3NH_2$

Spd : Spermidine $H_2N(CH_2)_4NH(CH_2)_3NH_2$

Put : Putrescine $H_2N(CH_2)_4NH_2$

Cad : Cadaverine $H_2N(CH_2)_5NH_2$

AcSpm : Acetylspermine $H_2N(CH_2)_3NH(CH_2)_4NH(CH_2)_3NHCOCH_3$

N^8 -AcSpd : N^8 -Acetylspermidine $CH_3COHN(CH_2)_4NH(CH_2)_3NH_2$

AcPut : Acetylputrescine $H_2N(CH_2)_4NHCOCH_3$

文献28)に加筆・訂正

Table 2 Effect of foreign substances

Substance	Molar ratio (Substance/Spm)	Recovery (%)
None	—	100.0
Cu(II), nitrate	1	100.0
Fe(III), sulfate	1	115.2
Zn(II), nitrate	100	100.0
NaCl	100	100.0
KNO ₃	100	100.0
Na ₂ HPO ₄	100	100.0
KCN	100	100.0
Glucose	100	100.0
Glycine	100	100.0
Thiamine	20	100.0
Urea	100	100.0
Creatinine	100	100.0
Caffeine	100	100.0

Mn(II); 5.0×10^{-5} M: QP; 5.0×10^{-5} M: Tween 40; 0.2 %: pH 8.0: reference; {Mn(II)-QP} solution. 文献28)に加筆・訂正

0.5 μ g/mLを用いて検討した。Table 2に示すように、本法では、塩化ナトリウムやアミノ酸（グリシン）などの共存物質の影響が少ないことが分かった。次に、本呈色体の組成を連続変化法及びモル比法で求めたところ、Mn(II):QP:Spm = 1:2:2という結果が得られた。また、生体中のSpmとその代謝物のAcSpmは、両者が共存している場合が多く、また生理機能も相違するので、それぞれの含量あるいは総量を求めることは、大変重要で意義深い。SpmとAcSpmが共存する場合、前処理とし

て炭酸ナトリウムを用いてアルカリ加水分解することにより、Spmとほぼ同感度でAcSpmを定量することができた。けん化前後のSpmとAcSpmの混液の吸光度を測定することにより、SpmとAcSpmの分別定量とそれらの総定量が可能であると考えられる。すなわち、SpmとAcSpmの両者が共存している場合、けん化処理前に測定した吸光度をA₁、けん化処理後に測定した吸光度をA₂、混液中のSpm量に相当する吸光度をX、AcSpm量に相当する吸光度をY、けん化処理前の(AcSpm/Spm)感

度比を a とすると, $A_1 = X + aY$, $A_2 = X + Y$ の二式が成立するので, A_1 , A_2 を測定することにより, X , Y を求めることができ, Spm と AcSpm の分割定量と総定量が可能と考えられる.

本呈色反応は比較的速やかに進行するため, FIA による Spm 定量法の開発が可能であると考えられる. そこで, FIA の基礎的条件として, 反応コイルの長さ, 流速, 反応温度, 試料注入量, 測定波長などについて, 検討を加えた. その結果, 2 ~ 20pg/ μ L の Spm を感度よく定量することができた. 約5分間で4回試料溶液を注入することが可能であり, Spm の迅速分析法としても極めて優れていることを認めた.

2-2. ヒストンの蛍光光度定量に関する検討

哺乳類細胞の核内においてゲノム DNA は裸の状態では存在せず, 高度に組織化された DNA - タンパク質複合体を形成している. この高次構造をクロマチン^{29,30)}と呼んでおり, ヌクレオソームの繰り返し構造がらせん状につながったものである. ヌクレオソームは, H2A, H2B, H3, H4 ヒストンタンパク質^{31,32)} が2分子からなるヒストンオクタマーに, 146塩基対の DNA が約2回転巻き付いた構造をとっている. ヒストンはリシン, アルギニンなどの塩基性アミノ酸を多数もつ塩基性タンパク質³³⁾ で, 酸性である DNA と結合している. 以前は, DNA をコンパクトに束ねるためのみの構造体として考えられてきたが, ヒストンがクロマチン構造の構成体であるだけでなく, 遺伝子発現

など, ゲノム機能や動態を制御するために中心的な役割^{34,35)} を果たすことが次第に明らかになってきた.

ヒストンの定量法としては, わずかに ELISA 法³⁶⁻³⁹⁾ が報告されているのみで, それ以外の方法は殆ど報告されていない.

一方, 蛍光光度法は, 吸光光度法に比べ, 定量感度, 選択性などの面で優れているので, 微量分析が要求される生体分析, 臨床分析分野などで広く用いられている分析法である. 3,4,5,6-テトラフルオロ-2-カルボキシフェニルフルオロン(TFCPF)は, 優れた蛍光試薬として汎用されているフルオレセインと類似した構造を有している強い蛍光を発するキサントゲン系色素である. 色素 TFCPF と Mn(II)を用いる吸光光度法⁴⁰⁾を参考に, TFCPF の発蛍光性を利用した微量ヒストンを定量するための蛍光光度法の開発を計画した.

今回, トリス/塩酸緩衝液とトリトン X-100 共存下, [Mn(II) - TFCPF - ヒストン] の反応の検討に基づいて, [Mn(II) - TFCPF] 錯体の消光現象を利用することにより, ヒストンの簡便かつ高感度な蛍光光度定量法を開発した. Fig.2 に本法における蛍光スペクトルを示した. さらに, 共存物質の影響, 各種タンパク質との反応について検討した.

設定した定量操作に従ってヒストンの検量線を作成したところ, 0.5~2.0 μ g/mL のヒストン濃度範囲で良好な直線を得ることができた. また, ヒストン濃度1.0 μ g/mL における RSD は3.94% (n = 5) で

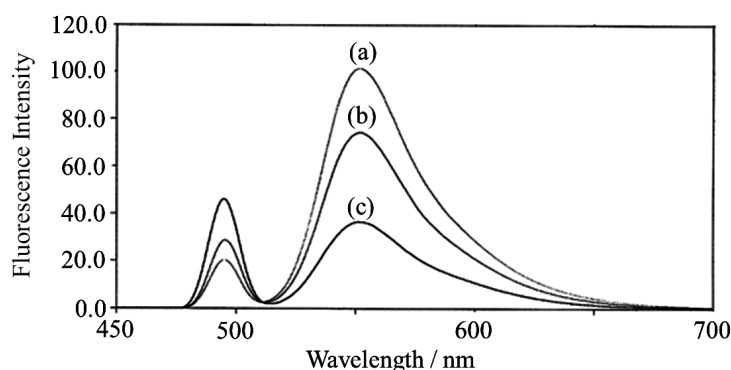


Fig. 2 Fluorescence emission spectra

Mn(II); 1.5×10^{-6} M; TFCPF; 1.0×10^{-6} M; 1.0mL of 1.0 %Triton X-100; pH 9.0; excitation wavelength;494nm: curve(a);Mn(II)-TFCPF solution: curve(b);Mn(II)-TFCPF-histone(1.0 μ g/mL)solution: curve(c);Mn(II)-TFCPF-histone(2.0 μ g/mL)solution. 文献41)に加筆・訂正

Table 3 Reaction between several proteins and manganese (II)-TFCPF complex

Protein ^{a)}	$\Delta F, \%$	/	% ^{b)}	pI ^{c)}	MW ^{d)} / kDa
Histone	27.3	/	100.0	10.5	21.5
Myelin basic protein	13.9	/	50.9	12.0 - 13.0	18.4
Lysozyme	0.0	/	0.0	10.5 - 11.0	14.5
Cytochrome C	3.3	/	12.1	10.1	12.4
Trypsin	1.3	/	4.8	10.1 - 10.5	24.0
Lactoferrin	1.0	/	3.7	8.2 - 9.2	75 - 80
HSA	0.0	/	0.0	4.7	60.4
Protease (<i>S.griseus</i>)	2.5	/	9.2	8.5 - 9.2	19.0
γ - Globulin	0.3	/	1.1	6.9	155 - 160
Fibrinogen	0.0	/	0.0	5.5 - 5.8	340

Mn(II); 1.5×10^{-6} M; TFCPF; 1.0×10^{-6} M; 1.0mL of 1.0 % Triton X-100; pH 9.0:

a) Protein taken; 1.0 μ g/mL: b) Percent with respect to histone: c) isoelectric point: d) Molecular weight. 文献41)に加筆・訂正

あり、再現性にも比較的優れていた。加えて、本法における共存物質の影響を検討した結果、極めて共存物質の影響が少ないことが分かった。さらに、各種タンパク質の反応性を比較すると、ヒストンにかなり特異的だった。(Table 3)したがって、生体中の微量のヒストンの分析法として十分適用できると考えられる。

3. 色素－金属錯体との競合的生成反応を利用する分析法

アルブミンの吸光度定量に関する検討

タンパク質は、金属イオンあるいは色素など様々な物質と相互作用を起こしやすく、プロモクレゾールグリーン、プロモフェノールブルー、クマシーブリリアントブルー-Gなどの色素との間に、{タンパク質－色素} 会合体生成によるメタクロマジー現象を示し、それらの色素の吸収スペクトルが大きく変化すること(タンパク誤差)が知られている。このことを利用するタンパク質測定法が開発されており⁴²⁻⁴⁴⁾、色素に代えて {色素－金属} 錯体とタンパク質が共存すると、その {色素－金属} 錯体の吸収スペクトルが大きく変化することが予測される。

我々は、タンパク質の定量法として種々の方法^{4, 45-47)}を開発したが、これらの方法にも特定のタンパク質を定量できないという問題があり、改良の余地がある。また、単にタンパク質の多少が

分かるだけで充分であった時代から、尿の個々の構成微量タンパク質量と各種疾患の関連性(例えばアルブミンと糖尿病性腎症など)を迅速、正確に測定することが必要となってきた⁴⁵⁾。

今回、界面活性剤共存下での酸性域において、トリフェニルメタン系色素のキシレノールオレンジ(XO)と、金属イオンのジルコニウム(IV){Zr(IV)}錯体の退色を利用する尿微量アルブミンの簡便、迅速で高感度な吸光度定量法を開発した。Fig.3に本法における吸収スペクトルを示した。加えて、各種タンパク質との反応性、呈色錯体の組成について検討した。さらに、ヒト尿を試料として、本邦において総タンパクの標準定量法として汎用されているPR法⁴⁸⁾との比較検討を行った。

設定した定量操作に従って、ヒト血清アルブミン(HSA)の検量線を作成したところ、1.0～9.0 μ g/10mL HSA濃度範囲において原点を通る良好な直線を得ることができた。定量感度は、PR法の約50倍と高感度で、より低濃度のHSAを正確に定量できることを認めた。さらに、HSA 5 μ g/10mLでのRSDは、3.46%(n=6)であり、再現性にも優れていた。また、各種タンパク質との反応性について検討したところ、Table 4に示すように、アルブミンに特異的に反応することを認めた。次に、本呈色錯体におけるXO:Zr(IV)の組成比について、モル比法、連続変化法で検討したところ、

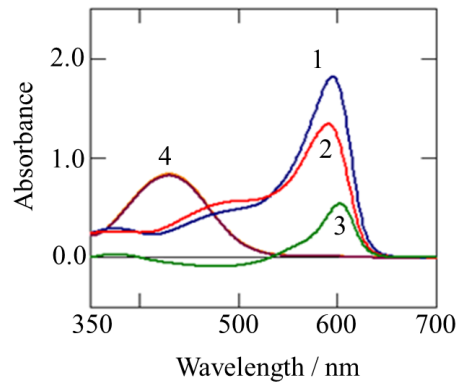


Fig.3 Absorption spectra obtained by the standard procedure

HSA;5 μ g/10mL: Zr(IV); 4.0×10^{-5} M: XO; 4.0×10^{-5} M: surfactant;0.15 %: pH 2.5: reference;water:
 curve 1;XO-Zr(IV) solution: curve 2;HSA-XO-Zr(IV) solution:
 curve 3;curve 1 minus curve 2: curve 4;XO and XO-HSA(100 μ g) solution. 文献49)に加筆・訂正

Table 4 Reaction between several proteins and XO-metal complex

Protein ¹⁾	This method (%) ²⁾	PR method (%) ²⁾	Molecular weight	pI ³⁾
HSA	100	100	6.9×10^4	4.8
γ -G	0	61	1.5×10^5	5.8~7.2
Hemoglobin	5	38	6.5×10^4	6.8
Myoglobin	0	53	1.7×10^4	6.8
β_2 -Microglobulin	0	137.2	1.2×10^4	
Transferrin	0	115	7.5×10^4	
Fibrinogen	0	6	4.0×10^5	5.5
α_1 -Acid Glycoprotein	10	35	4.4×10^4	2.7
Albumin, glycosylated human	0	95.7		
α_1 -Antitrypsin	0	28	5.1×10^4	
Lysozyme	0		1.4×10^4	11.1
Cystatin C	0	77.7	1.3×10^4	9.3
Tamm-Horsfall Glycoprotein	0	41.5	7.0×10^6	
α_1 -Microglobulin	0		3.0×10^4	

1) Uncorrected. 2) Percent with respect to HSA. 3) Isoelectric point. 文献49)に加筆・訂正

HSA共存下, 非共存下に関わらず XO : Zr(IV) = 1 : 1の結果が得られた。

次に, 本法を実試料中の尿タンパク質測定に応用した。比較対象としてPR法を用いたところ, 本法との相関係数は $r = 0.844$ ($n = 20$), 回帰式は $y = 0.761x + 1.03$ であった。(Fig.4) PR法に比べて本法が低値を示しているのは, PR法がアルブミン以外のタンパク質とも反応しているのに対し, 本法はおそらくアルブミンのみと反応しているためであると考えられ, 本法は尿中の微量アルブミンに特異的な定量法として適用可能であることが示唆された。

4. 結語

本総説では, 呈色反応及び蛍光反応両面からの追跡が可能な特性を有するキサントン系, その類似体であるトリフェニルメタン系の色素を選択し, 呈色反応あるいは蛍光反応より, 病態関連物質のスペルミン, タンパク質(ヒストン, アルブミン)の新規測定法を検討した。

本総説の結果から, 三元錯体生成反応法あるいは競合的錯生成反応法により, *o*-ヒドロキシヒドロキノンフタレインおよびMn(II)を用いるスペルミンの吸光光度定量法, 3,4,5,6-テトラフルオロ-2-カルボキシフェニルフルオロンおよびMn(II)を

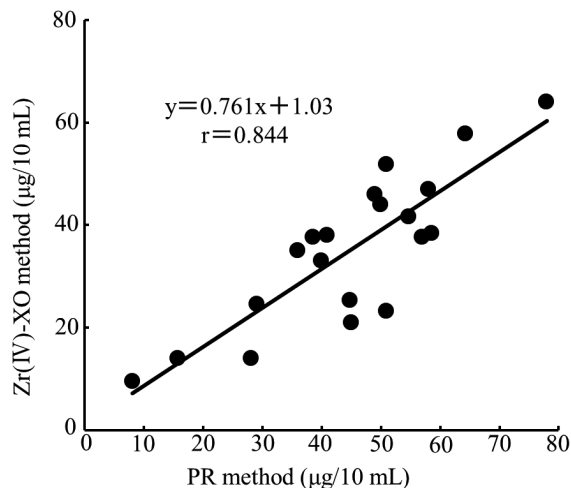


Fig.4 Correlation between results for urinary protein assays, as obtained by the PR method(X) and the present method(Y).

用いるヒストンの蛍光光度定量法，キシレノールオレンジおよびZr(IV)を用いるアルブミンの吸光光度定量法を開発した。本法は，従来法に比べ感度，選択性，簡便性の点で優れており，FIAを用いた迅速分析への適用や，実試料への応用についても良好な結果が得られたため，臨床現場への活用にも有効な分析法であることが示唆された。

謝辞

本研究に際し，ご協力をいただきました近畿大学医学部附属病院薬剤部 森山健三元薬局長に謹んで感謝の意を表します。また，本研究を進めるにあたり，御助言を賜りました大阪薬科大学 三野芳紀名誉教授，土井光暢教授，谷口雅彦教授，宇佐美吉英教授，山口敬子講師に深く感謝いたします。また，本実験に際し，ご協力いただきました大阪薬科大学臨床化学研究室諸氏に心より感謝の意を表します。

References

- 1) 藤田芳一：ぶんせき，**11**，596 (2008).
- 2) 無機応用分析編集委員会，“無機応用分析6”，共立出版，東京 (1979).
- 3) 四ツ柳隆夫，伊藤純一，化学の領域，**31**，56 (1977).
- 4) Y.Fujita, I.Mori and S.Kitano, *Bunseki Kagaku*, **32**, E379 (1983).
- 5) Y.Fujita, I.Mori, S.Kitano, H.Kawabe, and Y. Kamada, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **57**, 1828 (1984).
- 6) Y.Fujita, I.Mori, S.Kitano, H.Kawabe, and Y. Koshayama, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **58**, 815 (1985).
- 7) Y.Fujita, I.Mori, K.Fujita, S.Kitano, and T.Tanaka, *Chem. Pharm. Bull.*, **33**, 5385, (1985).
- 8) I.Mori, Y.Fujita, H.Kawabe, K.Fujita, T.Tanaka, H.Kawabe, and A.Kishimoto, *Analyst (London)*, **111**, 1409 (1986).
- 9) Y.Fujita, I.Mori, K.Fujita, Y.Nakahashi, and T. Tanaka, *Chem. Pharm. Bull.*, **35**(12), 5004 (1987).
- 10) Y.Fujita, I.Mori, and M.Toyoda M, *Anal. Sci.*, **8**, 313 (1992).
- 11) 藤田芳一，森 逸男，豊田美奈子，田口一彦，*分析化学*，**42**(1), T1-T5 (1993).
- 12) Y.Fujita, I.Mori, and T.Matsuo, *Anal. Sci.*, **12**, 115 (1996).
- 13) E.B.Sandell and H.Onishi, “Photometric Determination of Traces of Metals General Aspects”, John Wiley & Sons, New York, (1978).
- 14) 五十嵐一衛，“神秘の生命物質－ポリアミン”，共立出版，東京 (1993)
- 15) 永津俊治編，“生理活性アミンと生体防御 (上・下)”，共立出版，東京 (1981)
- 16) N.Seiler, *J.Chromatogr.*, **379**, 157 (1986).

- 17) C.Molins-Legua, P.Campins-Falco, A.Sevillano-Cabeza, M.Pedron-Pons, *Analyst (London)*, **124**, 477 (1999).
- 18) K.Maruta, R.Teradaira, N.Watanabe, T.Nagatsu, M.Asano, K.Yamamoto, T.Matsumoto, Y.Shionoya, K.Fujita, *Clin.Chem.*, **35**, 1694 (1989).
- 19) K.Shinpo, K.Fujita, K.Maruta, R.Teradaira, T.Nagatsu, *Clin.Chim.Acta*, **131**, 143 (1983).
- 20) N.Seiler, N.Frank, F.N.Bolkenius, B.Knodgen, *Biochem.J.*, **225**, 219 (1985).
- 21) C.Loser, U.Wunderlich, U.R.Fosch, *J.Chromatogr.*, **430**, 249 (1988).
- 22) T.Weiss, G.Bernhardt, A.Buschauer, K.W.Jauch, H.Zirngibl, *Anal.Biochem.*, **247**, 294 (1997).
- 23) K.Fujiwara, H.Kanetake, K.Furukawa, Y.Masuyama, G.Bai, H.Tanimori, T.Kitagawa, *J.Biochem.*, **118**, 1211 (1995).
- 24) M.D.Denton, H.S.Glazer, D.C.Zellner, F.G.Smith, *Clin.Chem.*, **19**, 904 (1973).
- 25) M.Niitsu, K.Samejima, S.Matsuzaki, K.Hamana, *J.Chromatogr.*, **641**, 115 (1993).
- 26) D.C.Weatherburn, *Aust.J.Chem.*, **36**, 433 (1983).
- 27) L.Lomozik, R.Jastrzab, *J.Inorg.Biochem.*, **93**, 132 (2003).
- 28) K.Miyachi, K.Moriyama, T.Yamaguchi, H.Tominaga, S.Kamino, and Y.Fujita, *Anal. Sci.*, **23**(9), 1103–1107 (2007).
- 29) 岩井浩一, 三田隆 編, “クロマチン”, 講談社, 東京 (1979).
- 30) 大場義樹, “クロマチン”, 東京大学出版会, 東京 (1986).
- 31) S. Budavari, M. J. O’Neil, A. Smith, E. Patricia Heckelman, “The Merck Index”, 11th ed., Merck & Co., Inc., Rahway, N.J., U.S.A. **4643** (1989).
- 32) “Methods in Enzymology **170** Nucleosomes”, ed. by P. M. Wassarman and R. D. Kornberg, Academic Press, Inc., San Diego, California (1989).
- 33) E. H. Nooij, H. G. K. Westenbrink, *Biochim. Biophys. Acta*, **62**, 608-609 (1962).
- 34) 中尾光善, *細胞工学*, **20**, 342-349 (2001).
- 35) 北林一生, *細胞工学*, **23**, 1134-1138 (2004).
- 36) P. Kurki, M. Gripenberg, P. Parlanen and T. Helve, *J. Clin. Pathol.*, **40**, 1475-1480 (1987).
- 37) C. Geisler and M. Hoier-Madsen, *J. Immunol. Methods*, **80**, 211-219 (1985).
- 38) T. Biswas, F. W. Miller, Y. Takagaki and P. H. Poltz, *J. Immunol. Methods*, **98**, 243-248 (1987).
- 39) R. L. Rubin, “Manual of Clinical Laboratory Immunology”, 4th ed., ed. by N. R. Rose, et al, Am. Soc. Microbiol., Washington **108** (1992).
- 40) H Kadobayashi, T Nakamori, T Yamaguchi, and Y Fujita, *Chem.Lett.*, **33**, 610 (2004).
- 41) K.Miyachi, M.Hoshino, H.Kadobayashi, K.Moriyama, M.Asano, T.Yamaguchi, and Y.Fujita, *Chem. Pharm. Bull.*, **61**(4), in press (2013).
- 42) 菅原潔, 副島正美, “生物化学実験法、蛋白質の定量法”, 学会出版センター (1979).
- 43) 福井哲也, 伊藤正樹, “タンパク質定量法”, 廣川書店 (1991).
- 44) M.M. Bradford, *Anal. Biochem.*, **72**, 248 (1976).
- 45) 藤田芳一: *ぶんせき*, **6**, 486 (1997).
- 46) Y.Fujita, I.Mori, M.Toyoda, K.Kato, M.Nakamura and T.Nakanishi, *Chem.Pharm.Bull.*, **38**, 956 (1990).
- 47) Y.Fujita, I.Mori and M.Toyoda, *Anal.Sci.*, **7**, 771 (1991).
- 48) 藤田芳一: *ぶんせき*, **6**, 320 (2005).
- 49) K.Miyachi, H.Kurokawa, K.Moriyama, S.Morimoto, K.Tabuse, M.Asano, T.Yamaguchi, and Y.Fujita, *Chem. Lett.*, **41**(1), 58–59 (2012).