

図2 . Cytotoxic activity against cancer cells and hemolysis of various peptides. A, dose-dependent effect of SGP (○), SGP-DL(□), Hel 13-5 D3 (△) and Hel 13-5 D5 (◇) in growth inhibition of the HepG2. B, Hemolytic activity of SGP (○), SGP-DL(□), Hel 13-5 (△), Hel 13-5 D3 (◇), and Hel 13-5 D5 (●).

一方、Hel13 5D5においては30μM~50μMで最大35%に達することが確認された。この結果は、D-アミノ酸導入がペプチドの膜との相互作用に変化を与えた可能性を示す。そこで次に、我々は、円二色性スペクトル(CD)及び赤外(ATR-IR)スペクトルを用いてペプチドの二次構造を調べたところ、水溶液中ではHel 13 5がα-ヘリックス構造をとっていたのに対し、D-アミノ酸を三つ導入したD3ではα-ヘリックス構造と3₁₀ヘリックス構造を、さらにD-アミノ酸を五つ導入したD5では3₁₀やβ-構造が主体となっていることが分かった。加えて、D-アミノ酸導入ペプチドにおいては、生体膜類似組成磷脂質存在下で、さらに構造の変化がすすみ、いずれもβシート/turn構造の割合が増加した。これは、D-アミノ酸を導入したペプチドが脂質と相互作用しやすいようにその構造を変えたためだと考えられる。

そこでさらに、ペプチドの膜との相互作用について調べるため、我々はTrpのイミダゾール基に注目し蛍光スペクトル測定を行った所、Hel 13 5D5のみが膜内に挿入されないという結果を得た。

現在、塩基性の両親媒性ペプチドの細胞膜への作用機構として、表面活性剤の膜溶解作用 detergent-like theory および膜表面へのカーペッ

トのように蓄積よることによって膜の乱れを引き起こす carpet-like theory が提唱されている。Hel13 5D5の場合、溶血活性がないことから分かるように、ペプチドがその膜表面上に蓄積したことによって細胞死を引き起こす carpet-like 機構であることが示された。おそらくD-アミノ酸導入によりα-ヘリックスが崩壊したために、その両親媒性構造が壊れて脂溶性が減少し、その結果、膜に挿入できる能力を失ったのだろう。しかし、新たに形成されたβシート構造による会合的性質が、本来ペプチドがもつ塩基性と膜との静電相互作用による膜表面への蓄積を、増強したのであろう。また、Hel13 5D5を除く全てのペプチドは膜に挿入し、その作用法は細胞膜を破壊することで細胞死を引き起こす detergent like 機構であることが予想される。

おわりに

膜へ作用して癌細胞毒性を示すタンパク質やペプチドへのD-アミノ酸の導入による、毒性を維持したまま、溶血活性を減少し得たことは、これらの局所的応用のみならず、全身投与への可能性を示す。特にHel13 5D5は細胞毒性が強く、溶血活性の減少は、顕著であった。このことは、この化合物のもつ carpet-like な性質を

更に強めてやることが、正常細胞と癌細胞の間の選択制を強めることを示唆する。

癌細胞二重膜の外側には正常細胞二重膜に比べ、phosphatidylserine のようなアニオン性リン脂質が豊富であることが知られている。これを基に、Hel13 5D5 の一部の Lys をカチオン性の高いアミノ酸 Arg と変換した化合物を新たにデザインした。現在それらの細胞毒性や構造についての上記同様の実験を比較検討中である。

参考文献

- 1 . H. M. Ellerby, S. Lee et al., J. Biol. Chem.,278, 35311 (2003)
- 2 . S. Lee et al., J. Biol. Chem., 276,41224 (2001)
- 3 . Y.Shai, et al., J. Biol. Chem., 278,21018 (2003)
- 4 . I. Tokunaga et al., Peptide Science 2005, (Ed., T. Wakamiya) p 213 (2006)

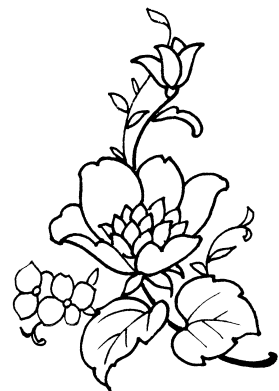


表1 充填概要と充填条件

装置No	充填試料と充填量				散布水		
	焼却灰 (kg)	下水汚泥 コンポスト(kg)	有機物 含有率(%)	充填密度 (t/m ³)	水道水	NB	散布量 (ml)
					有機物量(g/l)	有機物量(g/l)	
No.1	57	-	6.9	1.34	0	-	2200
No.2	57	-	6.9		-	7*	2200
No.3	57	-	6.9		-	12**	2200
No.4	50.7	6.2	9.5		0	-	2200
No.5	44.3	12.5	13.4		0	-	2200

*NB 濃度 (7 g/l) は10年間の散布で有機物量が充填焼却灰の7% (10% - 3%) となるのに必要な濃度である

**NB 濃度 (12 g/l) は10年間の散布で有機物量が充填焼却灰の12% (15% - 3%) となるのに必要な濃度である

とから、焼却残渣の土壤還元化はこれら作用を促進することによって達成できると考えられるが、焼却残渣単独では生物的風化は起こりにくい。

そこで本研究では、微生物の生育にとって必要な栄養源を処分場の覆土材に混合、又は浸出水の循環等の方法を用いて供給することによって微生物の活性化を図り、焼却残渣を植物生産性がある土壤に還元することが可能かについて検討した。

2. 実験方法

試料は10mmふるいを通した焼却残渣と供給する有機源として液体有機物 (NB) 及び固体有機物 (下水汚泥コンポスト) の3種類である。実験試料の概要を表1に示す。焼却残渣と下水汚泥コンポストの混合割合は有機物含有率を10% (4)、15% (5)となるように調整した。有機源を液体で加える実験 (2、3) の場合の有機物の添加量は10年間の全添加有機物量が焼却残渣の10% (2)、15% (3)となるようにNB (Nutrient Broth) の濃度を調整して降雨の代わりに散水した。1、3、6、12及び15ヶ月後に試料を採取し、pH、有機物含有量、細菌数及び植物の生育度について試験を行った。

3. 実験結果

3.1 微生物の活性化効果

図2～図4に各試料中の細菌数の経時変化を示す。上層では、1、2、3で最初の6ヶ月間に微生物の著しい増加が見られ、充填時において 10^2 cells/gであったものが、 $10^6 \sim 10^8$ cells/gに達した。3はその後も増加し、12ヶ月目には5とほぼ同じ 10^8 cells/gに達した(図2)。一方4、5では、コンポストを添加しているため、充填時にすでに $10^6 \sim 10^7$ cells/gの細菌が生息しており、1、2、3ほどの急激な増加は見られなかったものの、6ヶ月目には各々 10^7 cells/g及び 10^8 cells/gで高い菌数レベルで推移した。特に、5は5つの槽の中で最も菌数が高いレベルを維持していた。このことは、コンポスト中の細菌が焼却残渣と

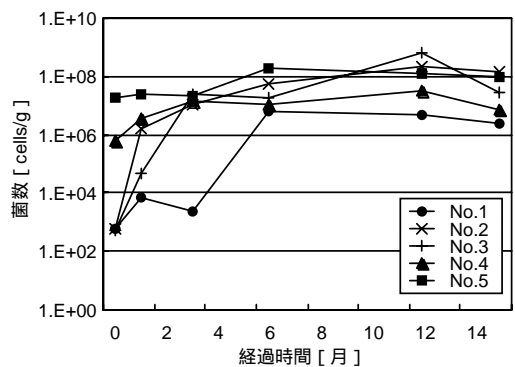


図2 充填廃棄物中の細菌数

混合後も生息し続けていることを示していると同時に、有機物量が多いほどその効果は大きいことを示している。

3.2 物理化学的風化効果に関する検討

図2に、各試料の上、中及び下層におけるpHの推移を示す。上層では、どの槽でも顕著なpHの低下が見られた。6ヶ月目の時点では、5のpHが9.2で、最も低下が大きく、次いで4が9.8で、コンポストを混合した槽の低下が大きかった。しかし、15ヶ月目には2及び3は5とほぼ同様に中性に近い値まで低下した。1及び4では、6ヶ月目以降pHの低下はほとんどみとめられず、1はpH10.5~11.5、4は9.8前後で、充填時に比べて低下はしているものの依然としてアルカリ性領域にある。次に、中層、下層はほぼ同じ傾向を示し、5のみpHの低下が見られ、6ヶ月目以降は

pH9前後で推移した。pHの低下が大きかった槽及び層位では、塩化物イオン濃度の差が見られないことや、細菌数が多いことから、細菌の生育によって発生するCO₂がpHの低下を促しているものと考えられる。

3.3 植物生産性に関する検討

小松菜の生育試験の結果を写真1に示す。発芽率はいずれの槽も80%以上で高かったが、成長を示す長さ、葉の数及び重量は5が最も大きく、次いで2及び3であり、下水汚泥コンポストを加えた4は無添加の1同様に小松菜の生育は悪かった。廃棄物のpH、塩分濃度及び含水率等から物理化学的風化が進行していると予想された5上層が最も植物生産性が高かったことから、5が最も土壤還元化が進行していると考えられる。

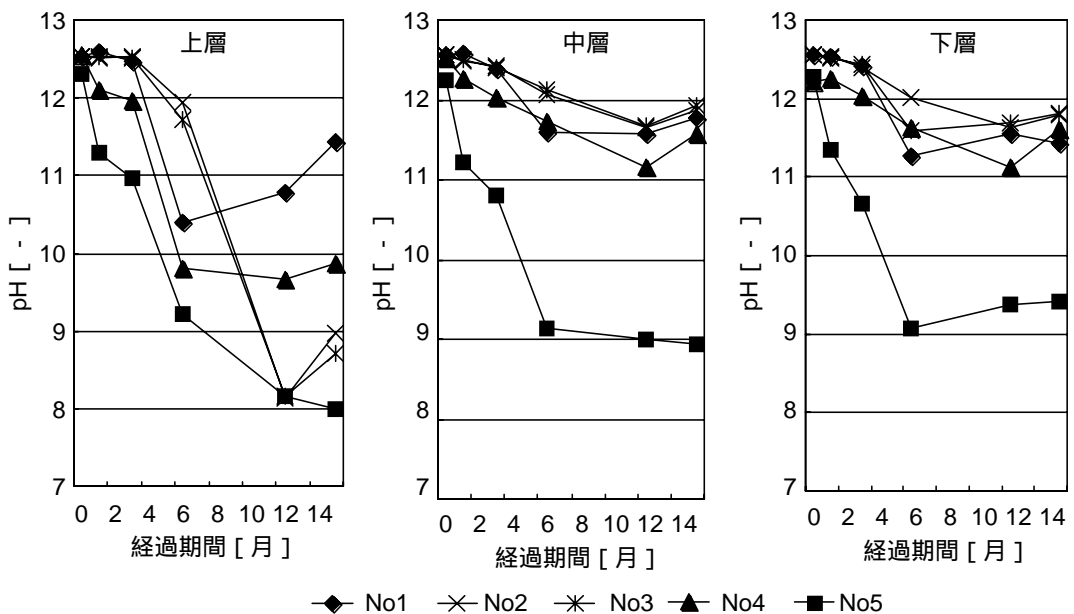


図3 充填廃棄物のpH

4. 結論

焼却残渣にある一定量の有機分を加えることによって微生物活性を高めることができた。また、微生物活性が上昇することによってpHの中性化が促進されたと同時に、腐植物質の生成に起因すると考えられる保水性の向上がみられた。これによって、植物の生産性が高まった。これらの効果は有機資材単独よりも微生物含む有機資材の方が大きくなることもわかった。このことは、有機分だけを添加するよりも微生物も一緒に添加する方が焼却残渣主体の最終処分場の土壤還元化にとってより効果があることを示唆するものである。

【参考文献】

- 1) 田中信寿；環境安全な廃棄物埋立処分場の建設と管理、技報堂出版、PP 4、2000
- 2) 松藤康司他；熱灼減量の違いによる焼却灰の埋立特性、第35回土木学会年次学術講演会、pp 826 827、1980
- 3) 太田寛行他；初期土壌生成と微生物群集、日本ペドロジー学会2005年度大会、pp .12 15、2005

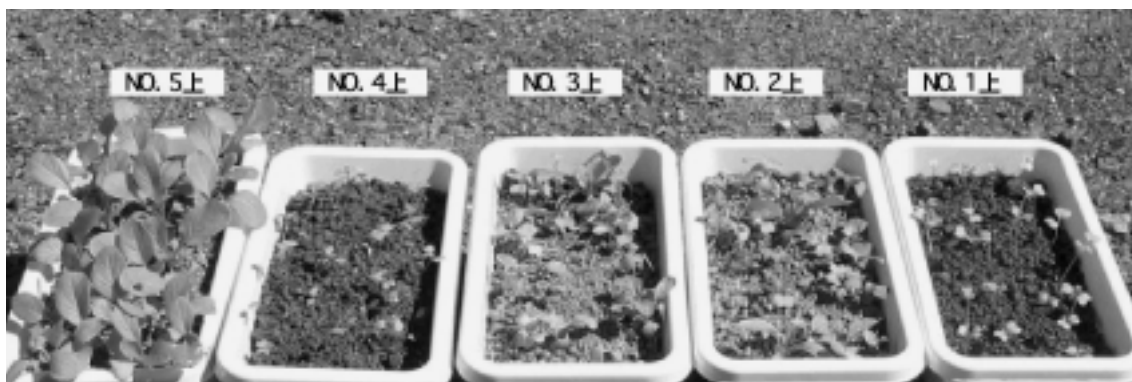


写真1 小松菜の生育状況（各槽の上層廃棄物試料）



tokine array kit を用いて、LPS 刺激による脳血管内皮細胞の cytokine 産生を測定した。

【結果・考察】

LPS は濃度依存的に HIV-1 の血液脳関門透過を増大させた。この LPS による透過性亢進は NO 合成酵素阻害薬である L-NAME (1.3mM) およびシクロオキシゲナーゼ阻害薬である indomethacin (1.5μM) によって抑制されなかった。ペリサイト存在下では、この LPS の HIV-1 透過性亢進作用は脳血管内皮細胞単独時よりも増大した (Fig 3)。LPS は TNF-α および IL-6 産生を増大させた。一方、gp120 は濃度依存的に HIV-1 の血液脳関門透過を減少させた。

これらの結果から、LPS は NO およびプロスタグランジン類の産生を介さずに HIV-1 の血液脳関門透過を増加させることが明らかになった。また、ペリサイトがこの LPS の作用を増強することから、LPS による血液脳関門構成細胞からのサイトカイン産生が HIV-1 の血液脳関門透過を亢進することが示唆される。また、gp120 は HIV-1 の血液脳関門透過を亢進しなかった。以上、HIV-1 の血液脳関門透過は HIV-1 それ自身によっては促進されず、エイズ炎症病態が HIV-1 の脳移行を容易にするものと推測される。

【今後の展望】

現在 HIV-1、gp120 および Tat による脳血管内皮細胞からのサイトカイン産生について検討中であり、エイズ脳症において血液脳関門が炎症反応を仲介することが明らかとなれば、新たな治療標的を提示できる。また、HIV-1 の脳血管内皮細胞への取り込みにおける adsorptive endocytosis の機序について、糖鎖への結合およびサイトカイン産生を介した細胞内情報伝達機構を明らかにしたい。Adsorptive endocytosis は従来血液脳関門を透過できない巨大分子の輸送系であると想定され、この機構解明は血液脳関門に

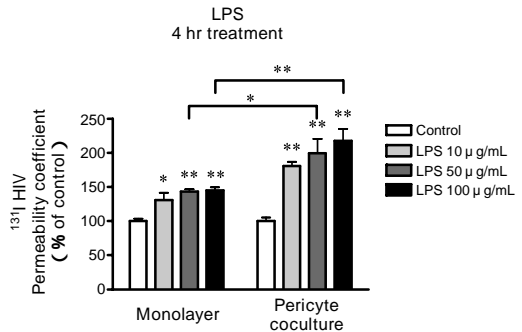


Fig 3 LPS による HIV-1 の BBB 透過

おける物質輸送に新たな可能性を提供すると思われる。

II . 業績一覧

[論文]

- 1) Release of cytokines by brain endothelial cells: A polarized response to lipopolysaccharide. Verma S., Nakaoke R., Dohgu S., Banks WA. Brain Behav Immun.2006 (in press)



を行っているが、今後は制定される試験方法にも対応していく必要がある。しかし、試験方法は対象濃度をガスクロが利用できる1 ppmに制定しているが、現実にはシックハウス症候群はその10～100分の1程度で発症するため、これら低濃度の有機物に対応できる光触媒の開発が必須となる。

水質浄化性能の試験方法

水中の汚染物質に対する光触媒の性能評価試験方法としては、水中には数多くの化学物質が存在するため、性能評価の指標物質をラジカル捕捉剤であるジメチルスルホキシド(DMSO)とし、それが光触媒への照射によって生成するOHラジカルなどと反応して生成するメタンスルホン酸を測定する方法が開発された。図2に示すような装置を使う。本研究所では、実社会で問題となっている環境ホルモン様物質としてフェノール、ビスフェノールAなどを用いて分解実験を行っている。これらの分解実験と並行して、光触媒自体の性能を評価するために、上述の試験方法を今後加えていく予定である。

その他の研究事例

本研究所においては、空気浄化、水質浄化の他にも、光触媒を用いた防汚性能については、数年前より本研究所外壁および試験片などを用いて屋外曝露試験を行っている。この結果と、光触媒自体の物性測定(例えば親水性の測定など)を行うことで防汚性能と光触媒物性の相関関係を調査し、より高性能な光触媒の開発を行っている。また殺菌試験については、医学部と共同で現実的に問題となっている大腸菌やレジオネラ菌類の光触媒による殺菌などを行っている。これらについても順次JIS原案が作成され(例えば防汚試験については「水接触角の測定」や「湿式分解性能」など)、光触媒の性能評価方法が規格化されていくが、これらの性能

試験方法を取り入れつつ、現実的な問題を実証試験によって評価し、解決していくようなスタンスで研究を続けていく予定である。

参考文献

- 1) (財)日本ファインセラミックス協会: “平成17年度経済産業省委託事業成果「基準認証研究開発事業 光触媒試験方法の標準化」(2006)。
- 2) JIS R1701 - 1「ファインセラミックス 光触媒材料の空気浄化性能試験方法 第一部: 窒素酸化物の除去性能」(2004)。
- 3) 東英子、中野勝之、資源循環・環境制御システム研究所平成16年成果報告書など(2005)。

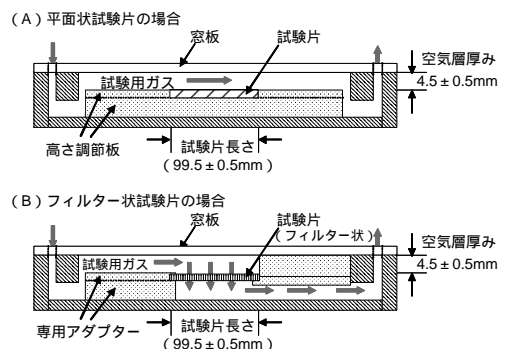


図1 大気浄化試験装置の断面図

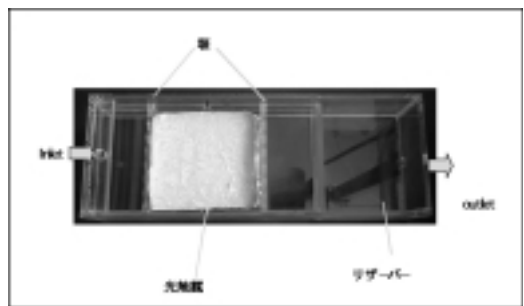


図2 水質浄化試験装置の概観