

和光純薬工業株式会社



## 多重膜リポソームによる遺伝子導入用試薬

### Genetransfer Iyo

遺伝子研究用

**使い勝手を大幅に高めました!**

#### 特長

多重膜層の間に DNA を取込み、導入した DNA の安定化を図っています。

DNA 包埋リポソームを簡単に調製できます。

血清中でも影響を受けません。

導入細胞への毒性が低い。

小包装のため、従来の Genetransfer よりコスト低減できます。

070-04441      0.2ml (0.2 $\mu$ mol total lipids) 用×5本入り      29,000 円

性能、使用方法につきましては、P.23 をご参照ください。

#### 目次

化学大家 \_\_\_\_\_

「リービッヒの薬学・化学教室」

島尾 永康..... 2

総説 \_\_\_\_\_

「糖鎖の固相合成」 深瀬 浩一..... 6

「改正変異原性試験について(その1:Ames 試験)  
- OECD ガイドラインとのハーモナイゼーション -」

清水 英佑..... 10

シリーズ \_\_\_\_\_

< Talking of LAL >

「第33話 エンドトキシンの測定条件」

土谷 正和..... 18

< How to アポトーシス >

「第4話 アポトーシスの解析法 - TUNEL 染色法」

小路 武彦..... 20

< 免疫一口メモ >

「炎症とケモカイン」 義江 修..... 26

テクニカルレポート \_\_\_\_\_

「大気中のアルデヒド、ケトンの HPLC 分析  
(その2)」 上森 仁志..... 14

新製品フラッシュ \_\_\_\_\_

ジーントランスファー Iyo..... 1,23

TRACE 社 動物血清..... 5

ペプチド合成用溶媒..... 9

ソフトマウント 550、エオシン Y 染色液、ロバスタチン、コンパクチン..... 13

内分泌攪乱物質調査対象品目、高速液体クロマトグラフ用・残留農薬試験用溶媒..... 15

武田薬品工業(株) 生活環境カンパニー APE ELISA キット..... 16

ラット IL-4 ELISA キット Wako..... 17

PARP 抗体、PARP、ICE 阻害剤 W-3... 19

抗マウス RP105、ラットモノクローナル抗体、抗マウス IL-5 レセプター、ラットモノクローナル抗体、他..... 22

日研フード(株) 日本老化制御研究所 8-OHdG チェック..... 24

ヒートショックタンパク質抗体..... 25

ケモカイン、他..... 27

レジオネラ検出キット、アゾキシメタン... 28

# リービッヒの薬学・化学教室

科学史家 島尾 永康

## パトロンの引き立て

19世紀ではよくあることだが、リービッヒの場合もパトロンたちがかれの生涯に決定的な役割を果たしている。リービッヒを化学の先進国フランスへ公費留学させたのは、ヘッセン公国の閣僚シュライエルマッヘルである。パリで少年時代からの化学的愛玩物だった雷酸塩を研究してアカデミーで発表したとき、パリの学界で知名の士だったドイツ人、アレクサンダー・フンボルトの眼に留まった。フンボルトはリービッヒを大化学者ゲーリュサックに紹介し、その研究室に入れてもらうという望外の機会を与えた。大講堂でゲーリュサックの講義を聴くことはできても、研究室には入れなかったからである。ゲーリュサックとは共著論文、“雷酸銀の分析”を発表するまでになった。自分の全生涯の業績の基礎はゲーリュサックの研究室で作られた、と後年かれは述懐している(リービッヒ『自伝』1871年執筆)。こうしてリービッヒは、精密科学としての化学を最初にドイツ語圏に導入することになる。帰国後のリービッヒをギーゼン大学の化学教授に推薦したのもフンボルトである。34歳年長のフンボルトとリービッヒの共通点は、少年期に古典・人文系教育から脱落したことである(Pfeiffer, 1997)。フンボルトが奨励し、財的援助を与えた自然科学の学徒は数多い。この精神は後年のフンボルト基金に受け継がれて現在に至っている。

## 個人的事業としての薬学・化学教室

1824年5月、リービッヒはギーゼンに着任した。“ギーゼン”という地名は、ラン河に注ぐ“流れ”を意味する。上ヘッセンの主要都市で当時の人口は5500人であった。ギーゼンの大学は1607年、ヘッセン・ダルムシュタット公国の方伯ルートウィッヒによって設立されたのでルートウィッヒ大学とよばれ、哲、医、法、神の四学部をもち、1830年代の学生数は300~400で、その地域の出身者たちであった。戦後、ルートウィッヒ大学は閉鎖され、1957年、新たにユストゥス・リービッヒ大学となった。

助教授の給与はきわめて薄給で、年俸300グルデンはパリ留学費の半年分より少



図1. 薬学・化学教室(現在はリービッヒ記念館)のファサード (Courtesy Liebig-Museum Giessen)

なかつた。先任の化学教授チンメルマンは実験室をリービッヒと共用しないと声明したので、閣僚シュライエルマッヘルはここでも助け船を出し、リービッヒに大学の管轄外の兵舎の守衛室をあてがって実験室とし、その運営は自由にしてよいことにした(図1)。リービッヒは、かつてトゥウムスドルフがエルフルト大学で、薬剤師のために設けたような化学実習教室の開設を考えた。大学の拘束を受けない、つまり大学から見放された形での出発はリービッヒの意欲をかき立てたであろう。最初の化学教室は実験室(R1)、天秤室(R2)、試薬と生成物の倉庫(R3)、洗浄室(R4)、助手室(R5)の5室からなる。二階にはリービッヒが家族とともに住んだ(図2)。

1824年11月の冬学期から開講した。最初の受講者は薬学12人であった。受講費18グルデンを徴収した。教室の開設は財政的に大きな負担となり、苦況はかなり長く続いた。翌年12月、正教授となり、年俸800グルデン、実験室費用約300グルデンを支給されたが、(1830年の1グルデンの購買力は最近の6マルクに相当するという)実験室の薬品や装置はポケット・マネーで賄わなければならなかつた。一人でも多くの学生を集めるために、大層入学資格のない者も入れたし、当時としては異例

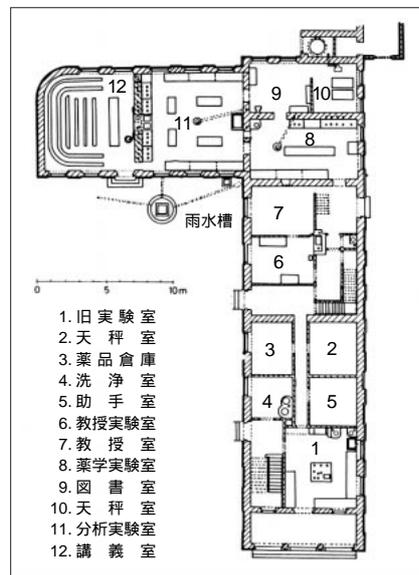


図2. 薬学・化学教室の平面図(1842)

の次のような広告も出した。「大学の化学実験室では冬学期の全期間、化学の実習をおこなっている。学生は朝から晩まで各種の分析をやらねばならない。そして毎週かならず試験がある。(『薬学雑誌』1827)。

最初の実験室には換気装置はなかつたので、通風には窓や戸を開けた。危険な実験は部屋外のギリシア式の柱のある処でやった。当時もすでにかなり有毒な物質を、今日から見れば必要量以上に使ったので、換気の悪い部屋での化学実験で健康を害するものも多かった。リービッヒも喘息状態になったことがある。

市販の原料は純粋ではなかつたので、それを精製して試薬をつくらねばならなかつた。リービッヒの奨めによって、ダルムシュタットの薬剤師メルクが、純薬の生産を始めたのは1830年である。実験や洗浄の水は雨水を使った。分析用の天秤はロング・アーム型で振動が遅かつたので、リービッヒは一回の秤量ごとにたばこを一本吸うことができた。

## 有機元素分析法の完成

リービッヒはゲーリュサックの研究室で有機元素分析を学んだ。それは正確だが、非常に熟練を要し、時間がかかつた。リー

ビッチはこれからの化学は有機化学であること、その有機化学の進歩は、簡単で、迅速で、確実な分析技術の開発にかかっていると見て取り(『自伝』)、帰国後はもっぱらその改良に力を注ぎ、7年かかって燃焼分析装置を完成させた。ゲーリュサックとテナールの装置では燃焼管は垂直に配置されていたが、ベルセリウスは燃焼管を水平に配置して安定性を高め、水は塩化カルシウムに吸収させて重量測定した。炭酸ガスは容量を測定するか、水酸化カリに吸収させて重量を測定した。炭酸ガスの定量が最大の難点だった。リービッチはそれを固体の水酸化カリでなく、カリ溶液に結合させるというアイデアを思いつき、最終的には「カリ球(五球ともいう)の発明によって解決した。5個のガラス球からなるこの装置を作ったのは、ガラス細工の上手な門下生エットリングである(図3)。下の3球が炭酸ガスを吸収し、上の2球は水酸化カリが燃焼管へ逆流するのを防ぐ。「この装置の新しい点は、他でもない、その単純性と完璧な信頼性である」と自負した(Liebig, 1831)。ベルセリウスは7試料の分析に18カ月かかったが、リービッチは70試料を4カ月で分析し、その速度は前者の45倍となった。有機元素分析はもはや熟練を必要とせず、ルーティンとなった。カリ球の発明の有機化学研究における重要さは、生物学における顕微鏡に匹敵するともいわれる(Strube, 1998)。カリ球はリービッチの化学教室のシンボルになっている。

## 大学の公的施設としての発展

1833年までには毎年、薬学10~15人、化学3~5人の受講者がくるようになった。リービッチはこれに自信を得たのか、大学を説得してそれまで個人的事業だった化学教室を大学の公的施設として認めさせた。のみならず待遇の改善を要求して、応じなければゲーゼンを去ると迫った。その結果、年俸は880グルデンに、実験室費用は619グルデンに増額され、化学教室も増築されて、初めて教授室(R7)と教授実験室(R6)をもつことができた。『農芸化学』(1840)と『動物化学』(1842)を書いたのはこの教授室である。その後、名声が上がるにつれて他の大学から招聘の話がくるようになるが、そのたびにリービッチはそれを利用して昇給と実験室費用の増額を勝ちとった。1835年にはアントワープ大学からの招聘があり、これをテコにして年俸を1250グルデンに、実験室費用と助手エット

リングの給料を合わせて714グルデンに増額させ、増築の約束も取りつけた。1837年にはペテルスブルク大学からの招聘があったので、年俸は1650グルデンになり、1840年にはウィーン大学からの招聘があったので、年俸3200グルデン、実験室費1500グルデンとなった。

1839年には第二次の増築がおこなわれ、薬学志望者のための薬学実験室(R8)、化学志望者のための分析実験室(R11)、図書室(R9)、天秤室(R10)、講義室(R12)ができた。化学教室の全面積は364平米となり、最初の2倍以上になった。実験室には当時としては最新式の排気装置がとりつけられた。とはいってもこの化学教室のすべては質素でつましいものだった。

57.50平米の講義室には最初は中央の四列の簡素な机とベンチしかなく、外側の湾曲した机とベンチは後に追加された(図4)。定員60席としても、窮屈すぎると感じられる。実際は100人以上が講義を聞いたというから、すし詰め状態であったろう。リービッチの講義はとくに流暢でもなければ、表現が洗練されていたわけでもなかった。述べていることがらを初めて経験するかのようになり、少しかえながらしゃべった。友人や学生たちはこういう講義の仕方を真似るようになったという(Heilenz, 1996)。法律の学生だったホフマンや、建築の学生だったケクレが化学に転じたのは、いずれもリービッチの講義を聴いてのことである。

## 『リービッチ・アナーレン』

リービッチが金に困っているのを見て、ハイデルベルク大学の薬学教授ガイガーが、かれが編集していた『薬学雑誌』の共編者になることを勧めたのは1831年である。この雑誌は翌年、『北ドイツ薬剤師協会雑誌』と合併して、『薬学アナーレン』と改題され、薬剤師ブランデス、化学教授リービッチ、薬学教授ガイガーが編集者となった。リービッチが共編者になると『アナーレン』は変わり始めた。ガイガーがつねに客観的で冷静な執筆を心がけたのに対して、リービッチは俗受けするような文体で、生き生きとした鋭い表現を使って、複雑な内容も簡潔で明快で分かりやすくした。しかし熱心なあまり、ドイツの化学文献は、「汚物にまみれて成長の止まった子供」であるといった暴言も吐いた(1834)。他の化学者を手厳しく批判し、個人的な配慮を全くしなかった。容赦ないそのやり方から、『アナーレン』は処刑台で、リービッチは死刑執

行人といわれた(Caesar, 1998)。

1830年代の中頃から次第に優秀な化学志望の学生がくるようになり、化学の実習教室はいつのまにかリサーチ・スクールへと変わり、『アナーレン』はその機関誌になっていった。1846年には、15人の学生が32篇の論文を発表するまでになっていた。

1837年、最初の訪英のあと、リービッチはこれを国際的な雑誌にするために英仏の化学者グラハムとデュマを共編者にした。事実上の共編者だったヴェーラーは賛成しなかったが、この年、化学論文のほうが多くなったので、ヴェーラーの提案によって『化学・薬学アナーレン』と改題した。リービッチの死の翌年、1873年、かれを記念して『ユストゥス・フォン・リービッチ・化学・薬学アナーレン』と呼ばれることになり、まもなく『リービッチ・化学アナーレン』となった。この『リービッチ・アナーレン』は120年以上続いた後、1997年12月、廃刊となった。ドイツ、オランダ、ベルギー、フランス、イタリアの化学者の統合機関の『ヨーロッパ有機化学雑誌』へと発展し、リービッチの名前を冠した歴史的な雑誌名はついに消えた(次頁図5)。

## リサーチ・スクールの形成

薬学の学生だけで始まったリービッチの化学教室は、1835年までは薬学の受講者



図3. リービッチがゲーゼンにいたころのカリ球の最後の实物。150年以上前の、きわめて薄いガラスで、破損しやすいのでケースに収められている。



図4. 講義室

が化学の3倍以上だったが、1830年代後半には化学が上回り始め、1840年代には2倍以上になった。1843年には化学と薬学の学生数は68人となって、ピークに達し、リービヒ一人で全学の学生数の15%を他所から引き寄せていた。この年、別館を設けて学生15人を助手ヴィルに任せた。28年間にわたるリービヒの薬学・化学教室の受講者の総数は正確には把握できないが、薬学300人、化学431人、計731人、そのうち化学教授になったものは約60人という数字がある(Boulaine, 1991)。1830~1850年間に限定しての研究では、ギーゼン大学入学時の志望は、薬学252人、化学407人、その他59人、計718人。同じ期間に薬学・化学でギーゼン大学からPh.D.を取得したものは141人、ポスト・ドクトラルとしてきたものは29人である(Fruton, 1988)。Ph.D.取得者とポスト・ドクトラルの数がギーゼンのリサーチ・スクールの規模と見てよいらう。初歩的な実習は助手たちにまかせ、上級の学生にはそれぞれテーマを与えて自由にやらせ、毎朝、前日の結果と次の計画を報告させては、同意もしくは反対した、とリービヒはいうが、実際はそれほどリベラルではなく、性急で怒りっぽい独裁者だったといわれる。雑誌へは学生の名前で発表させた。この点では寛大だったし学生の励みにもなった。しかし学生の失敗の責任をとりたくなかったからという見方もある。ともあれ「ギーゼンには何の娯楽も気晴らしもなく、われわれは夜明けから日没まで仕事をした。ギーゼンは大學も町も小さいので、気を散らさず仕

事に集中できた。学生たちも充実した時を過ごしたという満足感をもった」という(『自伝』)(図6)。

1846年の時間表によれば、週のうち4日は午前6時という早朝から講義が始まっている。ヴィルやフレゼニウスやコップが、吹管分析法、定量・定性分析、結晶学、化学の経済と技術などを講義し、リービヒの実験化学の講義は11時から12時まで、午後3時から6時半までが実験となっている。このころアメリカから来たホースフォード(のちハーヴァード大学教授)は、初対面の印象を、科学者というより陸軍将校の感じだったと述べている(Van Klooster, 1956)。

フランスから恩師ゲーリュサックが、その長男ジュールを留学によこしたのは1831年、まだ個人的な化学教室の時期で、リービヒが国際的にも有名でなかったときである。ゲーリュサックは息子に化学をやらせようとしたが、エコール・ポリテクニクがあまりにも数学的すぎて化学の学生に向かないと、ギーゼンに送ってきたのである。リービヒはかれに博士学位を取得させて帰らせた。世界中から学生が集まってきたのは、第二次増築後である。最終的には国外からの留学生は194人になった。イギリスが最も多く、83人、スイス38人、フランス27人、アメリカ16人、ロシア13人、イタリア5人、ポーランド、ノルウェー、オランダ、ルクセンブルグ各2人、デンマーク、ベルギー、スペイン、メキシコ各1である(Fruton, 1988)。

イギリスの科学者は、デーヴィ、ドールトン、ファラデーなど、あまりにも個人主義的すぎて、リサーチ・スクールを形成するにいたらなかった。ファラデーには一人の門下生もない。ベルトレを中心に集まったアルクイユ協会は、フランスにおけるリサーチ・スクールの兆しと見ることができるが、エコール・ポリテクニクはその硬直性のゆえにリサーチ・スクールを形成できなかった。小人数ながらリサーチ・スクールを作ったのはデュマである。ドイツではリービヒを先頭に、ヴェーラー、ブンゼン、パイエルらが次々にリサーチ・スクールを形成して、プロの化学者の育成に貢献した(Morrell, 1972)。



図6. 分析実験室の学生たち(トラウトショルトとリトゲン画、1840)。左端は遠くメキシコからきたオルティゴサ。カリ球を手にしている。右端は地元ギーゼンの人ホフマン(のちにベルリン大学教授)。中央の座っている人物の左はヴィル(のちにリービヒの後継者としてギーゼン大学教授)。



図7. リービヒ石像の頭部  
門下生ホフマンの尽力で、1890年にギーゼンに建造されたリービヒ石像は、第二次大戦中ギーゼンの70%が破壊された激しい空爆にも堪えたが、1945年5月、心ない米兵によって射撃の標的とされて破壊され、この頭部だけが残った。

世界中から学生が集まってきたころには、リービヒは有機化学者として最盛期を過ぎており、その関心は農業と生理学への化学の応用へと移っていた。『農芸化学』は11カ国語で44版を重ねることになるが、このため農業の実際と論争に巻き込まれ、4回も訪英している。『化学書簡』と題した一般向けの論集は、初版(1843)の16篇が、最終版(1865)では50篇に膨れ上がり、11カ国語で51版を重ねることになる。こうしてドイツの化学者として空前の著名人・公人となっていった。ミュンヘン大学に移った1852年には、まだ49歳だったが、実験指導は一切せず、講義だけおこない、教授実験室はもつというのが条件だった(図7)。

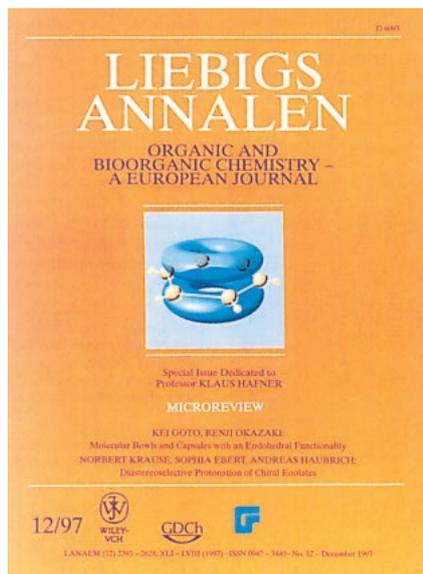


図5. 『リービヒ・アナーレン』の最終号(1997年12月)

## TRACE

## ウシ胎児血清 及び他の 動物血清

トレース・バイオサイエンスは、オーストラリアならびにニュージーランドの動物由来原料から、研究、生化学、医薬市場へ高付加価値の製品を提供しています。畜産が基幹産業の両国では動物検疫が厳しいため、自国で製造されたウシ胎児血清、仔ウシ血清、ウマ血清などの動物血清は、狂牛病プリオンによる汚染がありません。また、トレース・バイオサイエンスの血清由来製品は、最高品質と各バッチの追跡性 (TRACE-ability) を保証するために、屠場からの血液の集荷、遠心分離、最終精製工程まで、自社で一貫製造されていますので、医薬品の製造にも安心してご使用いただけます。

### 特長

#### 安全性：

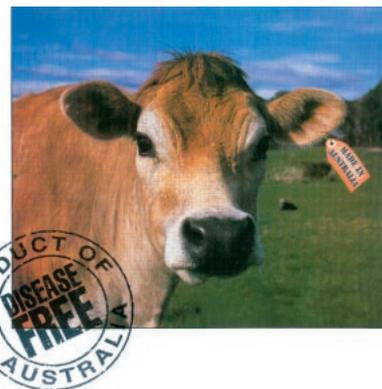
オーストラリア及びニュージーランドでは動物検疫が厳しく、汚染国からの動物、畜産品の輸入は禁止されています。したがって、両国の原料粗血清だけを使用して製造された動物血清は、狂牛病プリオンやその他の主要な伝染性病原体による汚染の可能性がありません。

#### 安定品質：

USDA 認可の衛生管理が行き届いた屠場から原料血液を入手し、オーストラリア及びニュージーランドにある GMP 基準適合施設で精製しています。また、原料血液から、自社で一貫製造していますので、万一の場合、ウシの飼育された牧場まで完璧に追跡調査 (TRACE-ability) が可能です。  
トレース・バイオサイエンスは ISO 9001 適合企業です。

#### 大ロットサイズ：

最高 1,600ℓ のロットまで供給可能です。



### 最終製品品質管理

#### 化学的検査：すべての血清

pH  
浸透圧  
ヘモグロビン  
全タンパク質  
ガンマグロブリン  
エンドトキシン  
その他(ご要望によりホルモンなど)

#### ウイルス検査：ウマ、ブタ、ヒツジ以外の血清

BVD (ウシウイルス性下痢-粘膜病)ウイルス  
抗 BVD ウイルス抗体  
IBR (ウシ伝染性鼻気管炎)ウイルス  
PI-3 (パラインフルエンザ 3 型)ウイルス

#### 微生物学的検査：すべての血清

無菌性  
マイコプラズマ

#### 機能及び細胞毒性検査：ウシ胎児血清

コロニー形成率試験  
CHO (チャイニーズハムスター卵巣由来細胞)  
VERO (アフリカモドリザル腎由来細胞)  
クローニング効率試験  
SP2/0-Ag14 (マウス骨髄腫細胞)

### ロットチェック

ロットチェック用サンプル及び上記試験結果が記載された分析証明書を提供致します。  
当社代理店あるいは当社営業員にお問合わせ下さい。

コード No.	メーカーコード	品名	容量	備考
533-69545	15-010-0500V	Fetal Bovine Serum ウシ胎児血清	500 ml	
-	15-015-0500V	Heat Inactivated FBS 非働化ウシ胎児血清	-	
536-70841	15-022-0100V	Newborn Bovine Serum	100 ml	生後 6 日以内の仔ウシから採取 ニュージーランド産
538-70845	15-022-0500V	新生仔ウシ血清	500 ml	
-	15-030-0500V	Bovine Calf Serum 仔ウシ血清	-	生後 12 か月以内の仔ウシから採取
-	15-035-0500V	Donor Calf Serum ドナー仔ウシ血清	-	検疫隔離された牧場の生後 12 か月以内のドナー仔ウシから採取
-	15-050-0500V	Bovine Adult Serum ウシ血清	-	生後 12 か月以上のウシから採取
-	15-055-0500V	Donor Bovine Adult Serum ドナーウシ血清	-	検疫隔離された牧場の生後 12 か月以上のドナーウシから採取
-	15-040-0500V	Donor Horse Serum ドナーウマ血清	-	検疫隔離された牧場のドナーウマから採取
-	15-045-0500V	Swine Serum ブタ血清	-	
-	15-090-0500V	Sheep Serum ヒツジ血清	-	生後 12 か月以上のヒツジから採取

価格については、当社代理店あるいは当社営業員にお問合わせ下さい。

# 糖鎖の固相合成

大阪大学大学院 理学研究科 深瀬 浩一

生物活性物質などの機能性分子の開発や機能の解明に有機合成は大きな役割をはたしてきた。科学技術の進歩に伴って化合物の機能評価に必要な時間が短縮されるのは当然であり、有機合成が機能分子開発研究全体の律速にならないためにも、効率的な合成法を開発していくことは極めて重要な課題である。現在合成の迅速化 (high throughput synthesis) を目指し、固相合成が大きな注目を集めている。固相合成は中間段階で分離、精製が不要であり、液相合成に必要な分液、濃縮等の操作も不要であるため、迅速合成が容易である。固相合成法の他の特徴としては、自動化が液相合成に比べ容易である点もあげられる。合成の自動化が関連分野にどんなに大きな貢献をもたらすか、ペプチド、核酸をみれば容易に想像できるであろう。最近のコンビナトリアルケミストリーの発達に伴って、固相合成は大きな進展をとげたが、液相合成に比べると用いることのできる反応は少なく、まだまだ発展途上で、十分に普及したとはいえない。固相合成では液相合成の条件がそのまま使えることは少なく多くの場合それなりの条件検討が必要になる。用いる固相担体によって、反応性、収率が異なるので、反応に適した担体を選択する必要がある。しかも固相合成では反応の進行のチェックが難しいため、合成方法が確立するまでには相当な時間と労力を要するという欠点も存在する。ただし条件さえ確定すれば、固相合成は液相合成よりも容易である。

さて本稿の主題である糖質化合物は細胞分化、神経機能、癌の転移、急性炎症などに関わっており、インフルエンザウイルス、コレラ毒素、ペロ毒素、大腸菌線毛のレセプターが糖ある

いは糖鎖であること、高等動物の免疫系を活性化する細菌表面複合糖質が存在すること等、様々な認識をになう分子として、その機能の重要性が認識されている。しかしながら、糖鎖の機能の解明はペプチド、核酸等の他の一次代謝産物に比べると大きく遅れている。これはペプチドや核酸は固相合成法が確立しているため、機能研究のための化合物供給が容易であるのに対して、糖鎖については合成に経験的な要素が多分に必要で、一般的な合成法が確立していなかったためである。最近では糖鎖合成も多大な発展を遂げ、液相合成であるならば相当複雑な化合物でも合成できるようになったが、糖鎖の合成には相当な専門的知識が必要とされ、誰でもができるというものではない。そこで糖鎖合成の一般化を目指し、糖鎖の固相合成研究が検討されるようになった。

糖鎖の固相合成は 1970 年代から検討はされていたが、1993 年に、Danishefsky によってグリカルを糖供与体に用いた固相合成法が発表されてから大きな注目を集めるようになった (図 1)<sup>1)</sup>。彼らの糖鎖固相合成の一連

の検討は確かに興味深い、一般的な糖鎖固相合成法にはなりにくい。Kahne は自ら開発したグルコシルシルホキッドを糖供与体に用いるグリコシド化反応を適用して、隣接基関与を利用した  $\beta$ -グリコシド鎖の合成に成功した<sup>2)</sup>。Kahne らはさらにこの方法を適用して固相上にタグ付きの糖鎖ライブラリーを構築した<sup>3)</sup>。彼等はこのライブラリーを用いて樹脂上でレクチンとの結合実験を行い、本来のリガンドよりも強く結合する人工糖鎖を見出している。Transcell Technologies 社では糖をベースにした医薬品の開発を目指し、Kahne の方法を適用して糖鎖ライブラリーを合成してアッセイを行っている。グリコシルトリクロロアセトイミデート法の開発者である Schmidt もイミデートを糖供与体に用いて糖鎖合成を達成した<sup>4)</sup>。イミデートを用いる方法は汎用性が高く、筆者らの研究においても固相上でもグリコシル化は問題なく進行した。グリコシルトリクロロアセトイミデートは触媒量のルイス酸で容易に活性化されるので固相合成でも一般的な手法の一つとなるであろう。Nicolaou はチオグリコシドをジメ

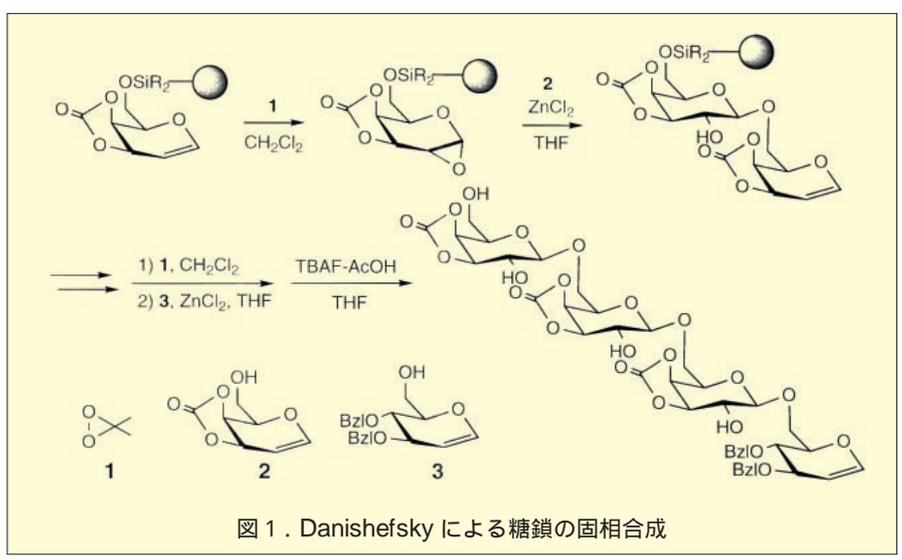


図 1 . Danishefsky による糖鎖の固相合成

チルチオスルホニウムトリフラート (DMTST) で活性化してグリコシル化反応を行った後、数種ある保護基を選択的に除去することによって分枝を有するエリシター糖鎖 (植物寄生菌の糖鎖、宿主植物の抗菌性物質であるファイトアレキシンを誘導する) を合成した (図2)。この研究で示されているように、糖鎖の固相合成は固相上でのグリコシル化反応だけでなく、固相上での保護基の切断、糖鎖を固相に結合させるリンカーも重要である。

固相上でのグリコシル化は Königs-Knorr 法のような不均一系の反応は避けた方がよいだろう。これら以外の方法は固相合成でも普通に用いることができると考えられる。上記の方法以外にも、グリコシルリン酸、グリコシル亜リン酸を糖供与体を用いる手法は有望である。

さて不溶性の樹脂を用いた固相合成では液相の反応に比べて固相に結合させた基質の反応性が低下する傾向がある。現在汎用されている 1% ジビニルベンゼン架橋ポリスチレン樹脂やポリエチレングリコール-ポリスチレン樹脂のようなゲル状樹脂を固相担体に用いる限り、反応剤がゲル中を浸透していく速度が遅いために反応速度が低下する。そこで、Krepinsky<sup>6)</sup>および伊藤<sup>7)</sup>によって、溶解性ポリマーであるポリエチレングリコールに担持させる糖鎖合成が報告された。溶解性ポリマーを用いることによって上記の問題は回避される。反応後はエーテルを加えてポリマーを沈殿させることで、容易に過剰の反応剤を除くことができる。伊藤らはこの溶解性ポリマー法を用い、グルコシルフルオリドとチオグリコシドを用いたオルソゴナルグリコシル化法によって  $\alpha$ -マンノシド鎖の合成に成功した。一方伊藤らはマンノシル供与体の 2 位と受容体のグリコシル化される位置を架橋することで立体制御が困難な  $\beta$ -マンノシドの合成を達成しているが (この架橋が "gate-

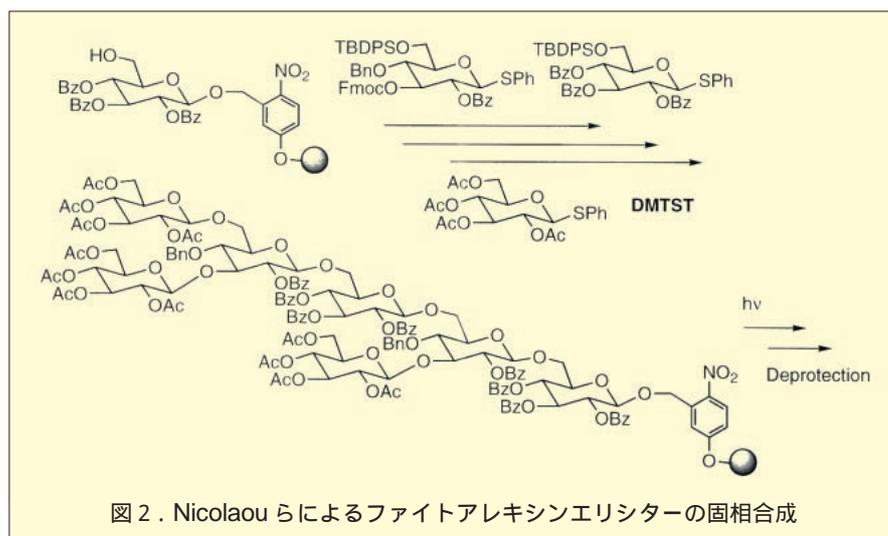


図2. Nicolaou らによるファイトアレキシンエリシターの固相合成

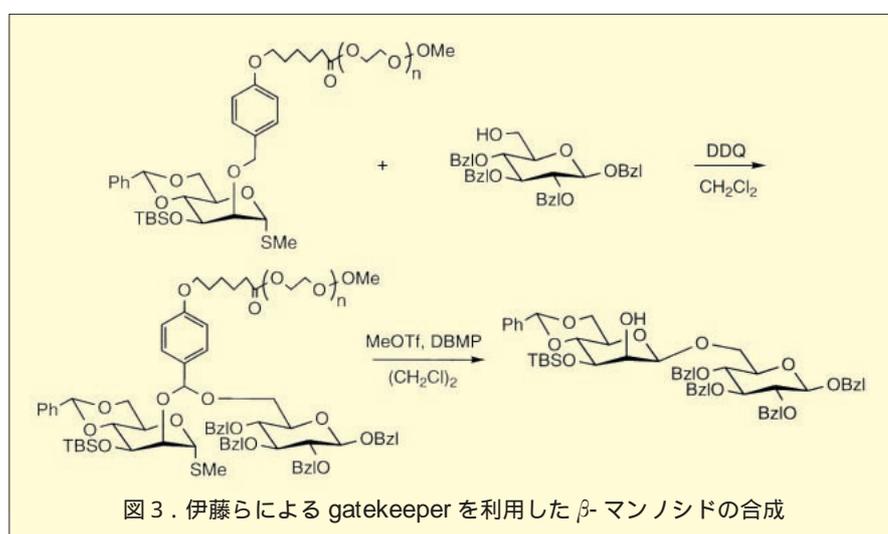


図3. 伊藤らによる gatekeeper を利用した  $\beta$ -マンノシドの合成

keeper" と呼ばれる) gatekeeper にこのポリマーを用いることによって反応後に gatekeeper 部および未反応化合物から目的物を簡便な操作で分離する手法を開発した (図3)。

固相合成を行う上でもう一つの難点は担体のポリマーを膨潤させる溶媒のみが使用可能である点である。上記の 1% ジビニルベンゼン架橋ポリスチレン樹脂やポリエチレングリコール-ポリスチレン樹脂はエーテルには膨潤しない。糖鎖合成ではしばしばエーテルの溶媒効果を利用して  $\alpha$ -選択的なグリコシル化が行われるが、これらの樹脂を担体に用いる場合はエーテル-塩化メチレンの混合溶媒を用いなければならず、結果的に  $\alpha$ -選択性は減少

する。溶媒に関する制限は溶解性ポリマーの場合にも存在する。

以上のように糖鎖の固相合成は近年目覚ましい発展を遂げてはいるものの、グリコシル化の立体制御が困難な糖鎖の固相合成はなされていないなど、まだまだ完成には程遠い。そこで我々は一般的な糖鎖の固相合成法の開発を目指し、以下の研究に着手した。

糖鎖の固相合成法として上記の2つの問題点をあげたが、我々は多孔質ポリスチレンを固相担体として用いることでこれらの問題点を解決できるのではないかと考えた。最近 Argonaut 社から多孔質ポリスチレンの表面にアミノ基を導入した固相担体 Argopore<sup>TM</sup> が開発された。この樹脂はジビニルベ

ンゼンの架橋度が高いためほとんど溶媒に膨潤しないが、そのかわり孔の中に溶媒が浸入してポリマー表面上で反応が進行する。そのためほとんど全ての溶媒が使用可能で、反応速度も向上するものと考えられる。

実際に我々はグリコシルトリクロロアセトイミデートあるいはチオグリコシドを糖供与体を用いて、エーテル中での $\alpha$ -選択的なグリコシル化に成功した<sup>8)</sup>。イミデート法では選択性が低かったが、チオグリコシドの活性化に我々の開発した PhIO-SnCl<sub>4</sub>-AgClO<sub>4</sub>, PhIO-TMSClO<sub>4</sub>, NBS-LiNO<sub>3</sub>, 等を用いることで高い選択性を達成した(図4)。

糖鎖の固相合成を容易にするためには、ペプチド合成における Fmoc 基のように固相合成に適した保護基を開発しなければならないが、このような

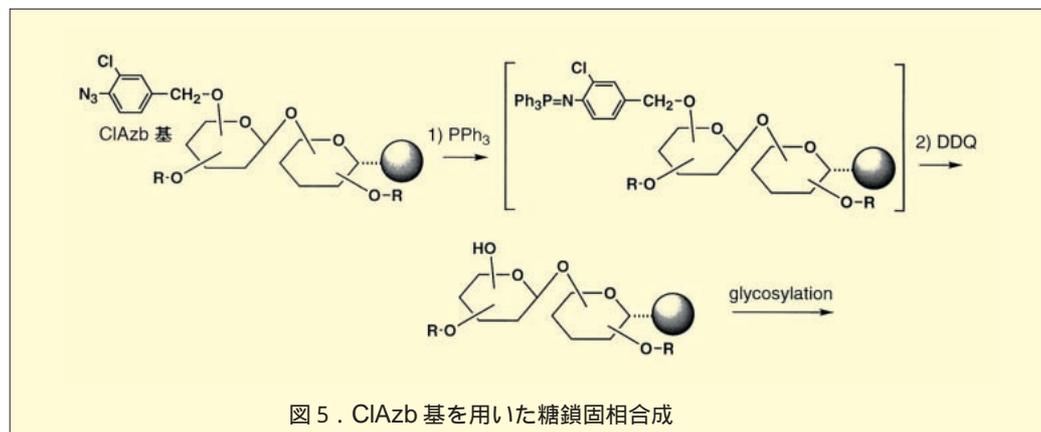
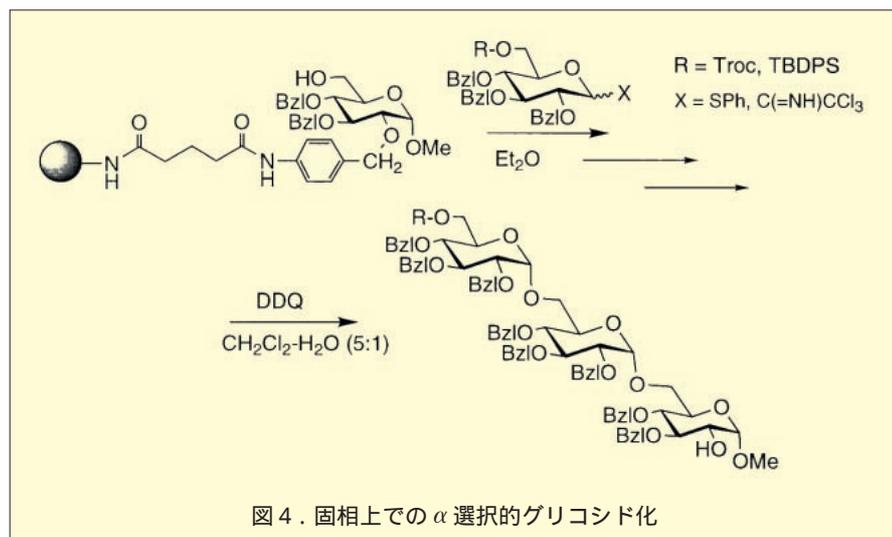
観点からの研究はあまり行われていない。我々は数年前から新しいエーテル型の保護基として *p* 位窒素置換ベンジル基の開発を続けており、*p*-ニトロベンジル基、*p*-アシルアミノベンジル基、*p*-アジドベンジル基(Azb)を開発してきた<sup>9)</sup>。*p*-アシルアミノベンジル基は *p*-メトキシベンジル(MPM)基と同様に DDQ 酸化で切断され、しかも MPM 基よりもはるかに耐酸性に優れているため糖質合成に有用な保護基であり、固相合成にも適用可能である。Azb 基は糖鎖合成に適用するには耐酸性が十分ではなかったためその点を改良した 4-アジド-3-クロロベンジル(CIAzb)基を開発した<sup>10)</sup>。CIAzb 基は DDQ 酸化に安定であるが、PPh<sub>3</sub> を作用させてイミノホスホラン中間体に変換した後に DDQ 酸化することで、固相上でも速やかにかつ定量的に除

去される(図5)。現在は以上の成果をもとに様々な糖鎖の固相合成を検討している。

現在は糖鎖の固相合成は実用には至っていないが、近いうちに液相合成と同程度には行うことができるようになるだろう。しかしグリコシル化反応は用いる糖によって最適な条件がかなり異なってくるので、一般的でかつ実用的な固相合成法の開発はかなりの困難が予想される。しかしながら生体内で見られる糖の結合様式は実際にはそれほど多様ではない。そこでそれぞれの結合様式に適したグリコシド化反応を探索し、さらにそれらの結果をデータベース化していけば、最終的には様々な糖鎖合成を行う上で最適の合成経路、合成手法を予測することができるようになるであろう。道のりはまだかなり遠いが実用的な糖鎖固相合成法を開発できれば、糖鎖の機能研究に大きく貢献するものと考えている。

〔参考文献〕

- 1) a) S. J. Danishefsky, K. F. McClure, J. T. Randolph, P. B. Ruggeri, *Science*, 260, 1307 (1993). b) J. T. Randolph and S. J. Danishefsky, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 33, 1470 (1994). c) John T. Randolph, Kim F. McClure, and S. J. Danishefsky, *J. Am. Chem. Soc.*, 117, 5712 (1995). d) C. Zheng, P. H. Seeberger, and S. J. Danishefsky, *J. Org. Chem.*, 63, 1126 (1998).
- 2) L. Yan, C. M. Taylor, R. Goodnow, Jr., D. Kahne, *J. Am. Chem. Soc.*, 116, 6953 (1994).
- 3) R. Liang, L. Yan, J. Loebach, M. Ge, Y. Uozumi, K. Sekanina, N. Horan, J. Gilderskeve, C. Thompson, A. Smith, K. Biswas, W. C. Still, and D. Kahne, *Science*, 274, 1520 (1996).
- 4) a) J. Rademann and R. R. Schmidt, *Tetrahedron Lett.*, 37, 3989 (1996). b) J. Rademann and R. R. Schmidt, *J. Org. Chem.*, 62, 3650 (1997). c) A.



- Heckel, E. Mross, K.-H. Jung, J. Rademann, and R. R. Schmidt, *Synlett*, 1998, 171.
- 5) K. C. Nicolaou, N. Winssinger, J. Pastor, F. DeRoose, *J. Am. Chem. Soc.*, 119, 449 (1997).
- 6) S. P. Douglas, D. M. Whitfield, J. J. Krepinsky, *J. Am. Chem. Soc.*, 117, 2116 (1995).
- 7) a) Y. Ito, O. Kanie, and T. Ogawa, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 35, 2510 (1996). b) Y. Ito and T. Ogawa, *J. Am. Chem. Soc.*, 119, 5562 (1997). c) Leonid O. Kononov, Y. Ito, and T. Ogawa, *Tetrahedron Lett.*, 38, 1599 (1997).
- 8) K. Fukase, Y. Nakai, K. Egusa, and S. Kusumoto, XIX International Carbohydrate Symposium, San Diego, 1998.
- 9) K. Fukase, K. Egusa, Y. Nakai, and S. Kusumoto, *Molecular Diversity*, 2, 182 (1997).
- 10) K. Egusa, K. Fukase, and S. Kusumoto, *Synlett*, 1997, 675.

## 関連商品

### 4-Azido-3-chlorobenzyl Bromide 糖合成用

013-16961      1g      11,000円

## ペプチド合成用溶媒シリーズ商品化完了!

### ペプチド合成用溶媒

固相法によるペプチド合成(特に自動合成機による合成)に使用される溶媒類を品揃え致しました。  
低水分、低アミンを保証しておりますので、安心してご使用頂けます。

[規格]

#### • N-Ethyl-diisopropylamine

Assay(cGC)..... min.99.0%  
Water..... max.0.01%  
Foreign amines ... to pass test

#### • Piperidine

Assay(cGC)..... min.99.0%  
Water..... max.0.025%  
Foreign amines..... to pass test

#### • Trifluoroacetic Acid

Assay..... min.99.0%  
Water..... max.0.01%

#### • N,N-Dimethylformamide

Assay(cGC)..... min.99.5%  
Water..... max.0.005%  
Amines(as dimethylamine)  
max.3ppm

#### • Dichloromethane

Assay(cGC)..... min.99.0%  
Water..... max.0.005%  
Amines(as dimethylamine)  
max.3ppm  
Stabilizer(2-Methyl-2-butene)  
0.0005 ~ 0.005%

#### • 1-Methyl-2-pyrrolidone

Assay(cGC)..... min.99.0%  
Water..... max.0.01%  
Amines(as CH<sub>3</sub>NH<sub>2</sub>)... max.3 ppm

コード No.	品名	容量	希望納入価格(円)
054-06321	N-Ethyl-diisopropylamine	200ml	12,000
161-18811	Piperidine	200ml	6,000
205-14101	Trifluoroacetic Acid	450ml	16,000
041-25451	N,N-Dimethylformamide	1ℓ	3,600
047-25453		1ℓ × 6	21,000
		3ℓ	7,300
048-25581	Dichloromethane	1ℓ	3,100
044-25583		3ℓ	6,300
132-12101	1-Methyl-2-pyrrolidone	1ℓ	6,800
138-12103		3ℓ	14,000

[関連商品]

コード No.	品名	容量	希望納入価格(円)
028-11951	Bottle Adapter (3ℓ用)	1個	6,600
025-12181	Bottle Adapter Packing	2個	2,700

専用ボトルアダプター及びパッキンを付ける事により、装置にそのまま取り付ける事ができます。

# 改正変異原性試験について (その1: Ames 試験)

## - OECD ガイドラインとのハーモナイゼーション -

東京慈恵会医科大学 環境保健医学講座 清水 英佑

### はじめに

化学物質のがん原性を効率よく事前に予知できる方法として、カリフォルニア大学の Ames 教授らがサルモネラ菌を用いた変異原性試験法を発表して以来、かれこれ 20 年近くなる。この間、様々な改良が加えられ、また他の短期試験方法と組み合わせてがん原物質の検出のために世界中で広く用いられてきた。

我が国では、労働安全衛生法(労安法)を改正(1977年7月)、職業がん予防の観点より年間 100kg 以上の新規化学物質を製造・輸入する場合には、届け出の際サルモネラ菌と大腸菌を用いた変異原性試験結果を報告することが義務づけられたのを機会に、1979年3月に「微生物を用いる変異原性試験のテストガイドライン」が公表された。また、化学物質の審査及び製造等に関する法律(化審法)が1986年5月に改正されたのを機に、1987年3月にガイドラインが公表された。一方、OECD(経済協力開発機構)でも1983年5月にサルモネラ菌および大腸菌を用いたガイドラインがそれぞれ公表された。

1997年6月にOECDの化学物質の安全性試験に関するテストガイドラインが改正されたこと、および国際的なハーモナイゼーションの機運も十分高まっていたことから、我が国でも、OECDのガイドラインを尊重した上で、労働省は1997年10月1日より、また、化審法は1998年4月1日より、変異原性試験方法および報告書の様式についての統一が図られた。他の関係省庁でもこれに準ずるものと思われる。

ここでは、微生物を用いた変異原性試験について改正点や注意点を述べることにする。

### 微生物を用いる変異原性試験

#### 1. 試験方法

OECDでは本試験を2回行うことになっているが、我が国では、用量設定試験と本試験を行うことにより試験結果の再現性を確認できる。両者で不一致の結果が出た場合には、確認試験を行う。

#### 2. 使用菌株について

労安法では5菌株(サルモネラ菌4種と大腸菌1種)が必須であった。しかし、OECDでは、これまでサルモネラ菌と大腸菌のテストガイドラインは別だてとなっており、いずれを選択してもよいことになっていた。今回のOECDの改正により、国際間・国内を問わず表1の5菌株を用いることになった。

TA1537の代わりに用いるTA97は、生育が良くないため改良したのがTA97aであるが、感度がよい反面、自然復帰変異数が高く出るので扱いにくいのが難点である。また、TA102も同様の問題点を持っているため扱いにくい。

大腸菌に関しては、我が国の試験機関はすでに実績があり、これまで通

りで特段問題は生じないが、プラスミッドの入った WP2uvrA/pKM101 を使用すれば、より感度よく検出できることになる。

労働省に提出された新規化学物質のうち、変異原性試験結果が陽性を示した物質は13%で、このうち大腸菌にのみ陽性を示した物質は7%を占めていることから、今回のOECDの改正は適切であったといえる。

#### 3. 被験物質の用量・用量段階について

用量設定試験では、最高用量は5mg/plateとする。生育阻害が見られる場合は最高濃度の所を生育阻害を示した用量とする。

一方、本試験は用量設定試験の結果を参考に、生育阻害がなければ5mg/plateを最高用量として公比2で、生育阻害があれば生育阻害を認める用量を最高用量とし、生育阻害を認めない用量が少なくとも4段階以上あるようにする。OECDでは沈殿を認める場合には、被験物質が沈殿を生ずる最低濃度を最高用量とするとあるが、実際には、沈殿を生じていても復帰変異コロニーが多数出ることもあり、生育阻害を重視した試験を行うことが重要である。

表1. 変異原性試験に用いる菌株

次の5菌株を用いて試験を行う。

1. Salmonella typhimurium TA98
2. Salmonella typhimurium TA100
3. Salmonella typhimurium TA1535
4. Salmonella typhimurium TA1537  
または TA97a もしくは TA97
5. Escherichia coli WP2uvrA  
または WP2uvrA/pKM101  
もしくは Salmonella typhimurium TA102

表 2. 被験物質の溶解に用いる溶媒の選択

1. 水に可溶で安定物質	水溶液
2. 水に難溶で安定物質 DMSO に可溶で安定物質	DMSO 溶液
3. 水に難溶で不安定物質 (加水分解等) DMSO に可溶で安定物質	脱水 DMSO
4. 水や DMSO に難溶で不安定物質 但し、アセトンに可溶で安定物質	アセトン溶液 (脱水) または他の安定な溶媒を用いる
5. 適切な溶媒がない場合	水または DMSO 中に超音波等により分散させた懸濁液とする

注: DMSO と反応する物質(例: 酸ハロゲン化物等)もあるので、用いる溶媒中での安定性は事前に調べ、適切な溶媒を選択する。安定性が事前に明らかでない場合には、溶解した際に発熱、発泡、発色等の変化の有無を調べる必要がある。  
文献等で記載のない新たな溶媒を使用するときは、テスト菌株や S9mix に毒性を示さないことを証明するデータを添付する。

#### 4. 対照物質について

変異原性試験では、陰性対照物質と陽性対照物質がある。陰性対照物質は、被験物質を溶解するための溶媒を用いる。溶媒の選択にあたっては表 2 に示すような条件を満たす必要がある。その他文献的に使用が認められているものであればよい。

陽性対照物質は、用いる菌株に対して適切な既知の変異原物質を用いる。陽性対照物質に対する反応で、使用菌株の性状をある程度判断できるため、むやみに高濃度を設定することは好ましくない。

#### 5. 使用プレート数

OECD は 3 枚としているが、我が国では被験物質の用量および対照物質ごとに 2 枚以上とする。科学的に正しく評価できれば 2 枚でよく、疑わしい場合には確認試験を行うことが望ましい。統計学的な判定は原則として必要としない。

#### 6. 代謝活性化系の添加

発がん物質の多くは生体内で代謝

活性化を受けて DNA と反応する。試験管内での変異原性試験に、薬物代謝系を誘導した哺乳類の肝ミクロソーム分画と助酵素類を加えた S9mix を組み込むことで検出感度を上げることができる。通常ラットを用いるが、ニトロソ化合物等はハムスター肝 S9の方が感度よく検出できるものもある。誘導剤もかつては PCB が用いられたが、環境汚染の観点から、現在ではベンゾフラボンとフェニバルビタール誘導による S9 が用いられる。ラット肝 S9 で陰性を示した場合に、化学構造の特徴を考慮して、他の肝 S9 を用いた試験を追加することが望ましい。

#### 7. 報告書の様式

これまで、国内の報告書の様式は届け出先により若干異なっていた。今回の改正により見出しのタイトルを除けば、届け出先による様式の差はなくなった。但し、見出しに関しては、労安法では「微生物を用いる変異原性試験結果報告書」であり、化審法では「細菌を用いる復帰突然変異試験結果報告書」となる。

内容面でもいくつかの改善と簡略化なされた。まず、一般的事項では、溶媒中の被験物質の安定性について記載する。試験の方法の項では、選定理由についてプレインキュベーション法やプレート法だけでなく、ガス状物質に関しても記載できるようになった。さらに試験条件でも記載項目がわかりやすくなった。また、試験結果の判定の項では、判定理由はもちろんであるが、参考事項の欄に試験責任者の見解を記入できるようになった。

#### 8. 物性を考慮した試験の実施

被験物質は固体・液体・気体に大別される。このうち個体に関してはこれまで溶媒に溶解し、あるいは懸濁して試験が実施されてきた。気体はガス状物質として特殊の方法で試験が行われている。一方、液体の場合は物質により、沸点の低い物質、気化しやすい物質等があり、37 の試験条件下で被験物質が菌と十分な時間接触しているかどうか、物性を考慮した試験方法を選択することが必要である。

## 9. 菌株の管理

Ames 試験では、菌株の管理は極めて重要である。保存方法、保存期間、前培養方法と時間、菌株の特性チェック、対照値の管理があげられる。

前培養では、最近ニュートリエントブロスのロット差が問題となっているので、適切なロットの物を使用することが望ましい。また、菌株の特性では、逆戻り菌数の管理も同時に行うことが大事である。これは、ピオチンのみのプレートに菌を播き、目安として TA100 では 50 以下、TA98 では 15 以下、TA1535 と TA1537 ではほぼ 0 個となるようなコロニーを選別する。対照値(陰性・陽性)の管理は、各機関ごとに経年的なデータを蓄積しているはずであるから、管理値と異常値の判

定を明確にしておくことが大切である。

### おわりに

国際的協調時代に入り、各国とも GLP 適合機関が行った試験結果の相互受け入れはすでに行われている。本年は GLP 査察も国際間で相互に行うことが承認され、すでに実施され始めた。労働省が Ames 試験の精度管理事業を始めてすでに 10 年近くになる。しかし、依然として不適切な結果を報告する機関がある。GLP を遵守し正しい試験を行い、定性的・定量的に正しい結果を出す努力をすることが大切である。試験担当者が交替しても、技術の継続性が保てるように、また、人事異動にも企業としての工夫を考慮

することが望まれる。

尚、この原稿は、日本環境変異原学会の中に設置された OECD のドラフトを検討するための委員会および日本バイオアッセイ研究センター松島泰次郎所長を委員長とする委員会で検討したことを基に作成したことを記して謝辞とする。

## 薬物代謝試験用、酵素組換え体マイクロソーム

コード No.	品 名	容 量	希望納入価格(円)
547-00363	Cytochrome P450 3A4, Human, recombinant Microsome	1.5 nmol/vial	36,000
544-00373	Cytochrome P450 2D6, Human, recombinant Microsome	0.5 nmol/vial	36,000
545-00381	Cytochrome P450 2C19, Human, recombinant Microsome	2 nmol/vial	36,000
545-00641	UDP-Glucuronyltransferase1*6 recombinant Microsome	5mg	28,000
546-00431	UDP-Glucuronyltransferase1*1 recombinant Microsome	5mg	35,000
548-00631	Flavin-containing Monooxygenase 3, recombinant Microsome	100 $\mu$ g	69,000
544-00611	Control Microsome, Solution	0.5ml	17,000

## Human CYP 肝臓マイクロソーム

コード No.	品 名	容 量	希望納入価格(円)
539-61301	Pooled HepatoSNine	25mg/ml/vial	28,000
536-61291	Pooled HepatoSome	20mg/ml/vial	28,000
536-61311	HepatoScreen Test kit	1 キット	520,000

## CYP 3A4 検出用

コード No.	品 名	容 量	希望納入価格(円)
535-45141	6 $\beta$ -Hydroxycortisol ELISA Kit	1 キット	178,000

## キシレンフリー封入剤の品揃え充実!

### Softmount 550

病理・細胞診自動封入機用

ソフトマウントは有害なキシレンを全く使用しない高い安全性と優れた性能をもつ封入剤です。今回、既存のマニュアルタイプに新しく自動封入機用を追加しました。

成分：ユーカリ、松樹皮から抽出した天然のピネン系溶剤(レモゾールA)にポリスチレン樹脂を溶解しています。

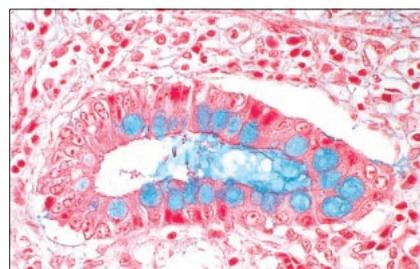
特長：

- ・自動封入機用に適した粘度に調整済

み(約 550cps(25 ))

- ・キシレンと同等の速乾性をもつ
- ・低臭・低毒性
- ・光、空気酸化による変色・退色を防止する
- ・HE染色・特殊染色・免疫染色に使用可能
- ・封入時の伸展性、透明性に優れている
- ・屈折率：約 1.50(20 )

197-11591 250ml 7,000 円



大腸 pH 2.5 アルシアン青 (× 400)

〔関連商品〕

マニュアルタイプ(粘度:750cps(25 ))

Softmount  
病理研究用

199-11311 250ml 7,000 円

## HE 染色試薬

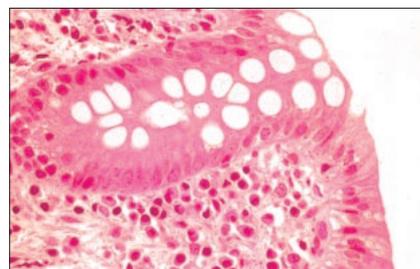
### エオシン Y 染色液 3 種

病理研究用

ヘマトキシリン・エオシン染色に使用され、細胞質・細胞間質・線維類を淡赤～濃赤色に染めます。

1% エオシン Y 水溶液と 0.1%、0.5% のエオシン Y エタノール溶液が

あり、各々優れた染色性を示しますが、水溶液タイプは凍結切片時、またエタノール溶液タイプはパラフィン切片の厚さにより選択できます。



胃バイオプシー HE (× 400)

コード No.	品名	容量	希望納入価格(円)
051-06495	0.5%EosinY Ethanol Solution	500ml	照会
054-06505	0.1%EosinY Ethanol Solution	500ml	照会
051-06515	1%EosinY Solution	500ml	照会

〔関連商品〕

コード No.	品名	規格	容量	希望納入価格(円)
131-09665	Mayer's Hematoxylin Soln.	病理研究用	500ml	4,200
134-13065	Mayer's Hematoxylin Soln.(× 2)	病理研究用	500ml	照会

## HMG-CoA レダクターゼ阻害剤

### Lovastatin

### Compactin【ML-236B】

生化学用

3-ヒドロキシ-3-メチルグルタリル補酵素 A(HMG-CoA)レダクターゼを阻害するロバスタチン、コンパクトンは一連のコレステロール生合成系における律速段階を特異的に阻害することで高脂質の低下を引き起こします。がん原遺伝子として知られる ras 遺伝子産物 Ras タンパク質の C 末端側に 3ヶ所の修飾を受けますが、細胞膜局在化に深い関わりを持つファルネシル化をロバスタチンで阻害され Ras の膜への局在が阻止される事が報告されています。また、コンパクトンはホルモン生合成活性化神経ペプチド

(PBAN)により促されるカイコの性ホルモン、ボンビコール生合成に関わるアシル CoA レダクターゼの特異的な阻害剤としても報告されており、最近注目されている昆虫神経ペプチド類の作用機構の研究に有用です。

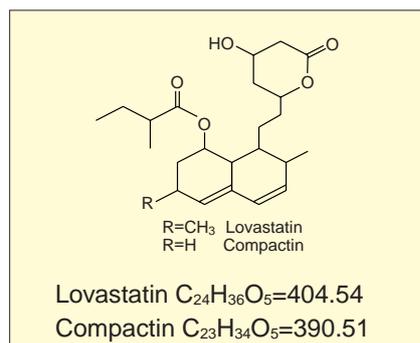
〔規格〕

含量(HPLC): 95.0% 以上

エタノール溶状: 限度内

〔参考文献〕

- 1) 松本省吾: バイオサイエンスとインダストリー, Vol.53, No.9 (1995).
- 2) 吉田 稔: 蛋白質・核酸・酵素, Vol.41, No.12 (1996).
- 3) Singer, I. I., Scott, S., Kazazis, D. M.



and Huff, J. W.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85, 5264 (1988).

4) Endo A., Kuroda, M. and Tanzawa, K.: FEBS LETTERS, 72, 323 (1976).

### Lovastatin

125-04581 25mg 17,000 円

### Compactin

033-17301 25mg 19,000 円

# 大気中のアルデヒド、ケトンの HPLC 分析(その2)

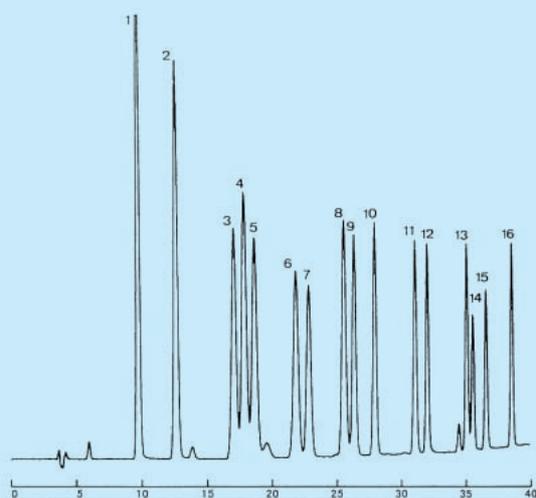
和光純薬工業株式会社 大阪研究所 上森 仁志

前報において、1)アルデヒド類は有害大気汚染物質として、国内では大気汚染防止法(2成分) 悪臭防止法(6成分)により、また米国では、EPA等により15成分の測定法が示され、2,4-ジニトロフェニルヒドラゾン(DNPH)誘導体としてGCまたはHPLCにより分析されていること。2)ODS(C18)シリカを用いるHPLC分析法はGC法に比べ幾つかの利点があること。3)国内の防止法への適応検討において、Wakosil-II5C18RS 充てん剤が有効に利用できることを報告した。しかし、ODSシリカを用いるHPLC分析では、DNPH-n-ブチルアルデヒドとDNPH-イソブチルアルデヒドを分離できないという欠点があり、その分離定量には

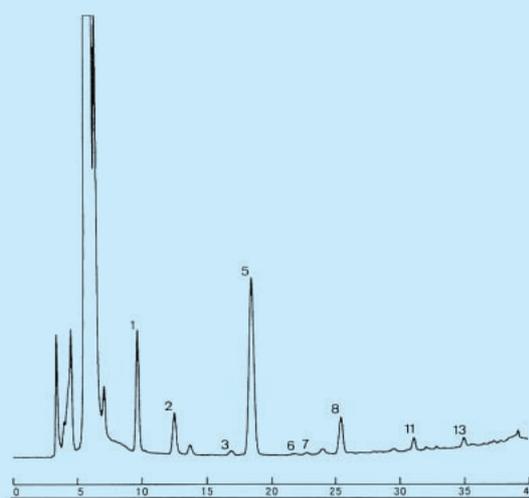
GC法が必須要素となっていた。今回、筆者らのグループではこれらの問題点を解決し、しかもEPA法にも対応可能な分析システムの構築を目的に検討を進めた結果、シリカゲルにトリアコンチル基(C30)を化学結合させた充てん剤が、DNPH-n-ブチルアルデヒドとDNPH-イソブチルアルデヒドの分離に有効であり、しかもアルデヒド類の多成分一斉分析に対応可能であるとの新知見を得、グラジエント溶出法によるDNPH-アルデヒド分析システムを完成させた。以下分析例として、16成分標準品および屋外大気をDNPH含浸シリカ捕集管で誘導体化後、アセトニトリルで溶出した試料のクロマトグラムを示した。

ODSシリカを用いる分析法は、DNPH-n-ブチルアルデヒドとDNPH-イソブチルアルデヒドの分離が達成されないものの、イソクラティック法による短時間分析が可能であり、大気汚染防止法等の限定成分の測定には有効な方法である。また一方、今回紹介したDNPH-アルデヒド分析システムは、分析に時間を要するものの、従来HPLC法で分離が不可能であったDNPH-n-ブチルアルデヒドとDNPH-イソブチルアルデヒドの完全分離を達成し、しかもEPA処方にも対応可能など今後の利用度は高いものと考えている。測定目的に応じて両法を使い分けていただければ幸いである。

WS-DNPH による 16 成分標準品の分析例



WS-DNPH による屋外大気試料の分析例



## HPLC Conditions

Column : Wakosil-DNPH, Column size : 4.6mmφ × 250mm, Instruments : Shimadzu LC-10A, Eluent : A ; Wakosil-DNPH Eluent A, B ; Wakosil-DNPH Eluent B, Gradient : High Press. gradient mode, mix. vol. 500μl, 0-16min. B 0%, 16-35min. B 0-90%, 35-40min. B 90%, Flow Rate : 0.6ml/min at 37 °C, Detector : UV360nm, 0.016Aufs, Inj. Vol. : 10μl each 0.625μg/ml (as aldehyde, ketone), Sample : -2,4-DNPH / 1. Formaldehyde, 2. Acetaldehyde, 3. Propionaldehyde, 4. Acrolein, 5. Acetone, 6. Isobutyraldehyde, 7. n-Butyraldehyde, 8. Crotonaldehyde, 9. Isovaleraldehyde, 10. n-Valeraldehyde, 11. Benzaldehyde, 12. Hexaldehyde, 13. o-Tolualdehyde, 14. m-Tolualdehyde, 15. p-Tolualdehyde, 16. 2,5-Dimethylbenzaldehyde

## 水環境中の外因性内分泌攪乱物質の実態概況調査対象品目

環境庁、建設省で進められている、「河川水中の外因性内分泌攪乱物質の実態概況調査」の対象品目一覧表を作成しました。分析時にお使い下さい。

環境	建設	物質名	コード No.	品名	規格	容量	希望納入価格(円)	
		ポリ塩化ビフェニール類 (PCB)	-	Accu Standard 社品を取扱っております。資料をご請求下さい。				
		ポリ臭化ビフェニール類 (PBB)	-	Accu Standard 社品を取扱っております。資料をご請求下さい。				
		トリブチルスズ	203-07791	Tributyltin( ) Acetate	家庭用品試験用	1g	2,100	
			208-08983	Tributyltin( ) Chloride	和光一級	1g	1,400	
		トリフェニルスズ	204-13331	Triphenyltin( ) Acetate Std.	残留農薬試験用	200mg	5,200	
			201-13341	Triphenyltin( ) Chloride Std.	残留農薬試験用	200mg	5,000	
			208-13351	Triphenyltin( ) Hydroxide Std.	残留農薬試験用	200mg	5,200	
		アルキルフェノール類 (C4 ~ C9)	020-04522	<i>o</i> -s-Butylphenol	和光特級	25g	1,600	
			027-05012	<i>p</i> -s-Butylphenol	和光一級	25g	1,500	
			021-04552	<i>o</i> -t-Butylphenol	和光一級	25g	2,600	
			027-06651	<i>m</i> -t-Butylphenol	Pr.G.	10g	3,000	
			028-13531	<i>p</i> -t-Butylphenol Std.	環境分析用	500mg	4,500	
			019-11022	<i>p</i> -t-Pentylphenol	和光一級	25g	950	
			164-19381	<i>p</i> -n-Pentylphenol Std.	環境分析用	500mg	照会	
			089-07511	<i>p</i> -n-Hexylphenol Std.	環境分析用	500mg	照会	
			082-07501	<i>p</i> -n-Heptylphenol Std.	環境分析用	500mg	照会	
			(オクチルフェノール)	208-14451	<i>p</i> -t-Octylphenol Std.	環境分析用	500mg	照会
			(ノニルフェノール)	159-02061	<i>p</i> -n-Octylphenol Std.	環境分析用	500mg	照会
			ビスフェノールA	146-06791	<i>p</i> -n-Nonylphenol Std.	環境分析用	500mg	照会
				025-13541	Bisphenol A Std.	環境分析用	500mg	4,500
			フタル酸ジ-2-エチルヘキシル	041-16541	DOP Std.	フタル酸エステル試験用	1g	2,600
		フタル酸ブチルベンジル	023-06371	BBP Std.	フタル酸エステル試験用	1g	4,100	
		フタル酸ジ- <i>n</i> -ブチル	047-16521	DBP Std.	フタル酸エステル試験用	1g	2,600	
		フタル酸ジシクロヘキシル	046-26621	Dicyclohexyl Phthalate Std.	フタル酸エステル試験用	1g	照会	
		フタル酸ジエチル	042-17051	DEP Std.	フタル酸エステル試験用	1g	2,600	
		ベンゾ [a]ピレン	029-01111	Benzo[a]pyrene	和光特級	100mg	4,400	
		2,4-ジクロロフェノール	049-26611	2,4-Dichlorophenol Std.	環境分析用	500mg	照会	
		アジピン酸ジ- <i>n</i> -エチルヘキシル	047-24191	DOA Std.	可塑剤試験用	1g	2,600	
		ベンゾフェノン	026-13571	Benzophenone Std.	環境分析用	500mg	照会	
		4-ニトロトルエン	146-06811	<i>p</i> -Nitrotoluene Std.	環境分析用	500mg	照会	
		オクタクロロスチレン	152-02051	Octachlorostyrene Std.	環境分析用	25mg	照会	
		フタル酸ジペンチル	047-26651	Di- <i>n</i> -pentyl Phthalate Std.	フタル酸エステル試験用	1g	照会	
		フタル酸ジヘキシル	048-26701	Dihexyl Phthalate Std.	フタル酸エステル試験用	1g	照会	
		フタル酸ジプロピル	045-26571	Di- <i>n</i> -propyl Phthalate Std.	フタル酸エステル試験用	1g	照会	
		スチレン 2 量体 3 量体	048-26561	1,3-Diphenylpropane Std.	環境分析用	500mg	照会	
			044-26541	2,4-Diphenyl-1-butene Std.	環境分析用	10mg	40,000	
			040-26521	<i>cis</i> -1,2-Diphenylcyclobutane Std.	環境分析用	10mg	照会	
			047-26531	<i>trans</i> -1,2-Diphenylcyclobutane Std.	環境分析用	10mg	40,000	
			206-14371	2,4,6-Triphenyl-1-hexene Std.	環境分析用	10mg	35,000	
			161-19271	1a-Phenyl-4e-(1'-phenylethyl)-1,2,3,4-tetrahydronaphthalene Std.	環境分析用	10mg	照会	
			168-19301	1e-Phenyl-4e-(1'-phenylethyl)-1,2,3,4-tetrahydronaphthalene Std.	環境分析用	10mg	照会	
			168-19281	1a-Phenyl-4a-(1'-phenylethyl)-1,2,3,4-tetrahydronaphthalene Std.	環境分析用	10mg	照会	
			165-19291	1e-Phenyl-4a-(1'-phenylethyl)-1,2,3,4-tetrahydronaphthalene Std.	環境分析用	10mg	照会	
			203-14381	Triphenylcyclohexane Std.	環境分析用	10mg	照会	
		<i>n</i> -ブチルベンゼン	029-13561	<i>n</i> -Butylbenzene Std.	環境分析用	500mg	照会	
		スチレンモノマー	197-10751	Styrene Std. Soln. (1.0μg/μl pentane)	悪臭物質試験用	2ml x 5	6,300	
		17-β-エストラジオール	052-04041	β-Estradiol	生化学用	1g	3,100	

環境：環境庁調査品目(24物質)/建設：建設省調査品目(9物質)

## 大入り包装追加しました!

### 高速液体クロマトグラフ用・残留農薬試験用溶媒

ご好評頂いております、残留農薬試験用・高速液体クロマトグラフ用溶媒の大入り包装を追加しました。既存品と併せてご利用ください。

#### < 高速液体クロマトグラフ用溶媒 >

コード No.	品名	規格	容量	希望納入価格(円)
206-10736	Trifluoroacetic Acid	HPLC 用	5ml x 5A	30,000
048-20623	N,N-Dimethylformamide	HPLC 用	3ℓ	10,000

#### < 残留農薬試験用溶媒 >

コード No.	品名	規格	容量	希望納入価格(円)
011-11303	Acetonitrile 300	残留農薬試験用	3ℓ	7,200
052-04443	Ethanol 300	残留農薬試験用	3ℓ	10,500
135-08823	Methanol 300	残留農薬試験用	3ℓ	4,650
132-08833	Methanol 1,000	残留農薬試験用	3ℓ	5,250
034-16753	Cyclohexane 300	残留農薬試験用	3ℓ	9,600

武田薬品工業株式会社  
生活環境カンパニー

## タケダ環境汚染診断薬

### 非イオン界面活性剤 APE ELISA キット

非イオン界面活性剤は、近年、家庭用洗剤への普及により生産量が増加しています。非イオン界面活性剤の全生産量の約10%をしめ、主に工業用洗剤や分散剤として使用されているポリオキシエチレンアルキルフェニルエーテル（アルキルフェノールエトキシレート、略称 APE）は、外因性内分泌攪乱化学物質（環境ホルモン様物質）と考えられているアルキルフェノールの前駆物質であるということが明らかになりつつあり、ヨーロッパでは既に APE を規制の対象にする動きがあります。

現在、環境水中の APE 測定法（上水試験法）には、カリウムテトラチオシアン酸亜鉛法やテトラチオシアンコバルト酸法が採用されていますが、これらの方法は煩雑な抽出・濃縮操作及び有害な有機溶剤（1,2-ジクロロベンゼン、ベンゼン）を必要とする点があります。

本品は、酵素免疫定量法により、固相抽出との組み合わせで、環境水中の APE を高感度かつ簡便に測定できるキットです。

#### 特長

煩雑な前処理の必要なく試料を測定に用いることができます（定量範囲は 0.05 ~ 0.5mg/l と広く、簡易な固相抽出により、さらに低濃度の測定ができます）。

1,2 ジクロロベンゼン等の有機溶剤を使用しないので安全です。

短時間（総測定時間：約 2 時間）で測定できます。

#### 構成

APE 標準原液 (NP10EO, 1mg/l 20% メタノール)	4ml	1 本
抗原酵素複合体粉末	7ml 用	2 本
抗原酵素複合体溶解液	8ml	2 本
発色基質溶液	250 $\mu$ l	1 本
発色基質希釈液	15ml	1 本
抗 APE モノクローナル抗体固相化マイクロプレート	96well	1 枚
混合用マイクロプレート	96well	1 枚
6 倍濃縮洗浄液	50ml	1 本
発色停止液	15ml	1 本
使用説明書	1 部	

チューブキットは固相化マイクロプレートの代わりに固相化チューブ（20 本）が入り、混合用マイクロプレートは含まれません。

コード No.	メーカーコード	品名	容量	希望納入価格(円)
304-06071	910163	APE ELISA キット(マイクロプレート)	1 キット(96 回用)	70,000
301-06081	910170	APE ELISA キット(チューブ)	1 キット(20 回用)	50,000

## 関連商品

### 陰イオン界面活性剤 LAS ELISA キット

#### 特長

高感度(0.02-0.5mg/l)なのでサンプルの濃縮は不要です。

クロロホルム等の有機溶剤を使用しないので安全です。

短時間(総測定時間：約 2 時間)で測定できます。

コード No.	メーカーコード	品名	容量	希望納入価格(円)
300-06051	906609	LAS ELISA キット(マイクロプレート)	1 キット(96 回用)	50,000
307-06061	910156	LAS ELISA キット(チューブ)	1 キット(20 回用)	35,000

#### 【参考文献】

- 1) 郷田泰弘ら：第49回全国水道研究発表会講演集，p494-495 (1998).
- 2) 郷田泰弘ら：第48回全国水道研究発表会講演集，p484-485 (1997).
- 3) Fujita et al. : *Environ. Sci. Technol.* 32, 1143-1146 (1998).

## Rat IL-4 ELISA Kit *Wako*

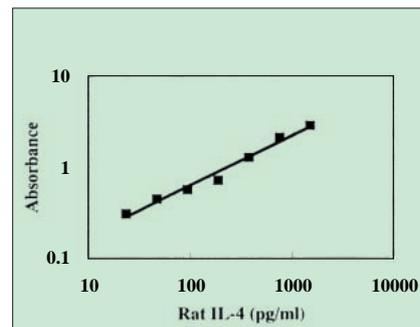
インターロイキン - 4 (IL-4) は、分子量約 15kDa のサイトカインで、Th2 細胞または肥満細胞から産生されます。B 細胞増殖因子として発見された IL-4 は、B 細胞だけでなく免疫系、血球系細胞に対し広範な生物活性をもつことが知られています。

本キットは、IL-4 に特異的なポリクローナル抗体とモノクローナル抗体を用いたサンドイッチ ELISA 法に基づいており、血清、培養上清中のラット IL-4 を高感度に定量することができます。

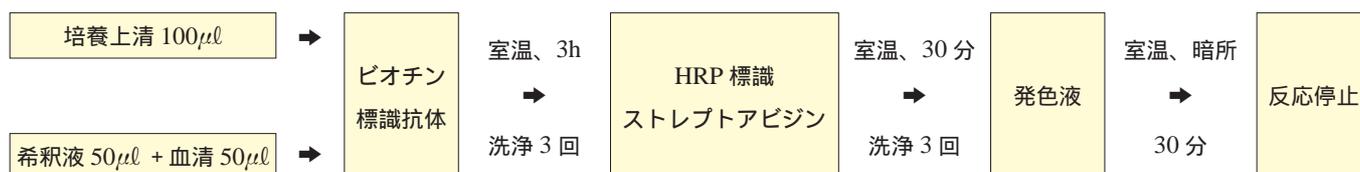
### キット内容

(1) 抗体固定化マイクロプレート	1 枚
(2) ラット IL-4 標準品	2 本
(3) 標準品希釈液	30ml
(4) ビオチン標識抗体	7ml
(5) HRP 標識ストレプトアビジン( 100 × )	0.15ml
(6) HRP 標識ストレプトアビジン希釈液	15ml
(7) 発色液 (TMBz)	12ml
(8) 洗浄液 (25 × )	50ml
(9) 反応停止液	12ml
(10) プレートカバー	3 枚

### 標準曲線



### 操作法



### 性能

(1) 感度	標準曲線範囲	23.4-1,500pg/ml	(2) 添加回収	ラットプール血清	Av.84%
	感度	15pg/ml		組織培養液 (10%FCS 含有)	Av.102%
(3) 特異性					
ラット IL-4 と反応します。また、ヒト IL-1、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-7、IL-8、IL-10、IL-12、IL-15、マウス IL-2、IL-3、IL-4、IL-6、IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$ 、ラット MCP-1、MIP-2、TNF- $\alpha$ とは交差反応しません。					

コード No.	品名	包装	希望納入価格(円)
293-53801	Rat IL-4 ELISA Kit <i>Wako</i>	96 回用	70,000

### 関連商品

コード No.	品名	包装	希望納入価格(円)
297-53701	Rat IL-1 $\beta$ ELISA Kit <i>Wako</i>	96 回用	70,000
291-54201	Rat IL-2 ELISA Kit <i>Wako</i>	96 回用	70,000
299-53901	Rat IL-6 ELISA Kit <i>Wako</i>	96 回用	70,000
309-04681	Panatest Rat IL-8 (PRF081)	96 回用	90,000
299-54001	Rat IL-10 ELISA Kit <i>Wako</i>	96 回用	70,000
293-53301	Rat TNF- $\alpha$ ELISA Kit <i>Wako</i>	96 回用	70,000
295-54101	Rat IFN- $\gamma$ ELISA Kit <i>Wako</i>	96 回用	70,000

## 第33話 エントキシンの測定条件

エンドトキシン試験を行う上で測定条件の決定は非常に重要です。各国の局方やFDAのガイドラインを見ても、測定のバリデーションとして、測定法の性能確認と対象試料の測定条件の決定を行うよう規定されています。測定法の性能確認については、使用する試薬に表示された性能を確認するというので、大きな問題が起こることはあまりないと思われます。しかし、試料の測定条件の決定では、エンドキシンの活性が変化しやすいこともあり、種々の問題が起こります。試料の測定条件は、基本的にエンドキシンの添加回収試験で決定します。通常、エンドキシンを測定試料に添加し、これをリムルス試薬に加えて測定します。この方法でエンドキシンの試料からの影響による活性変化が考慮されていないことは、第22話及び第23話でお話ししました。筆者はこの点がどうも気になるので、今回、エンドキシンの測定条件の決定方法について具体的に提案してみたいと思います。

まず、試料がリムルス試験に影響を与える場合、影響を受ける対象としてリムルスの反応系とエンドキシンの少なくとも2種類が考えられることを思い出して下さい。試料がエンドキ

シンの活性に影響を与える場合、エンドキシンの添加回収試験は試料のリムルス反応系への影響についてはなにも答えてくれません。すなわち、現在行われている添加回収試験は、実用的にほとんど問題がないにせよ、何を知ろうとしているかが不明瞭な試験と思われます。筆者は、「エンドキシン試験は、試料がリムルス反応系に影響を与えない条件で行う」ことが重要と考えています。

実際の条件設定について考えてみましょう。局方等に記載されている反応干渉因子試験を未経験の試料について行うためには、予備試験が必要です。すなわち、予備試験で反応干渉因子試験を行う試料濃度を決定するわけです。予備試験として、(1)試料の希釈系列を作成し、ある濃度のエンドキシンを添加する方法、(2)試料に高濃度のエンドキシンを添加し、これを用いて希釈系列を作成する方法、の2通りがあります。いずれの場合も、エンドキシンを添加しない試料の測定が必要です。エンドキシンを添加した試料の測定値からエンドキシンを添加していない試料の測定値を引いて、添加したエンドトキシン量で割って100倍すると、エンドトキシン回収率(%)がでできます。試料の希釈率の変化とエンドトキシン回収率の変化を比較して、期待する回収率(規定によって許容される回収率の範囲が異なります)に収まる試料濃度を選び、その濃度で反応干渉因子試験を行って、条件設定がうまくいくかを確認するということになります。

ほとんどの試料は上記の方法で条件設定が可能です。しかし、ロットやエンドトキシン添加後の保存時間によって測定可能な濃度が大きく異なっ

たり、(2)の方法で希釈に伴ってエンドトキシン回収率が100%に収束しない場合には、試料がエンドトキシンに影響を与えている可能性を疑うべきです。試料がエンドトキシンに影響を与えているかどうかを確実に調べる方法は、現在のところ見あたりません。しかし、以前にご紹介した「試料とエンドキシンを別々にリムルス試薬に添加する方法(別添加法)」は、一つの有力な手段です。例えば、ある試料の10倍希釈液を試験したいときには、5倍希釈試料0.05mlをリムルス試薬0.2mlに添加し、すぐにエンドトキシン溶液0.05mlを添加して測定を行います。エンドトキシン溶液は、試験を行う濃度の2倍のものを作成して使用します。この方法では、通常の方法に比べてエンドトキシンが試料に接する時間が少なく、エンドキシンの活性が変化しにくいと考えられます。本法の回収率と従来法の回収率に違いがある場合は、試料がエンドトキシン活性に影響している可能性が非常に強いと考えられます。試料がエンドトキシン活性に影響を与える場合は、この別添加法で条件設定を行うべきではないでしょうか。

試料の測定系への影響を評価できるエンドトキシン試験条件の設定について考えてきましたが、どのような状態のエンドキシンを測定するべきかについての解答が得られているわけではありません。今後、エンドキシンの潜在的な活性をどのように捉えるか、標準的なエンドキシンの存在状態をどのように設定するかについて、基本的な概念を確立する必要があると思われる。

今回は「第34話  $\beta$ -グルカンとリムルス試薬の反応性」の予定です。

エンドトキシン活性の変化にも御注意下さい。



## アポトーシスカスケード研究用

### PARP【Poly(ADP-ribose)polymerase】

PARP は、アルキル化剤や紫外線などによる DNA の損傷によって活性化され、NAD を基質としてポリ(ADP-リボシル)化を行なう酵素で、DNA 修復に関与していることが知られています。また PARP は、アポトーシスの中期にその限定分解が観察され(これは活性化 Caspase-3 (活性型 CPP32) の良い基質になっているからとされています) それらは最終的な DNA 断片化と並びアポトーシスのマーカー的現象として認識されています。まだ不明な部分が多いアポトー시스と PARP の関係、その PARP を限定分解しアポトーシスの実行過程を担うプロテアーゼカスケードの機構解明のツールとしてご利用下さい。

#### Anti PARP C-terminus, Rabbit 免疫化学用

免疫原 : ウシ PARP 自己修飾ドメインの C 末端 (アミノ酸残基 509-524) に相当する合成ペプチド

形状 : ウサギ抗血清

特異性 : ヒト、ウシ、ラット、マウスの PARP (116kDa) 及び 85kDa の PARP の分解産物と反応します。

実用希釈倍数 :

ウエスタンブロット 1:500  
019-16821 100 $\mu$ l 48,000 円

#### Anti PARP, Monoclonal Antibody, Affinity purified 免疫化学用

免疫原 : 精製された仔ウシの胸腺由来の PARP

形状 : PBS 凍結品 (0.2mg/ml)

クローン No. : C-2-10

サブクラス : IgG<sub>1</sub>

特異性 : ヒト、サル、ハムスター、ラット、マウスの PARP (116kDa) 及び 85kDa の PARP の分解産物と反応します。ニワトリとは反応しません。

実用希釈倍数 :

ウエスタンブロット 1:100

〔参考文献〕

- 1) Lamarre, D. *et al.* : *Biochim. Biophys. Acta*, 950, 147 (1988).
- 2) Lazebnik, Y. A. *et al.* : *Nature (Lond.)*, 371, 346 (1994).
- 3) Datta, R. *et al.* : *J. Biol. Chem.*, 272, 1965 (1997).

016-16831 100 $\mu$ g 照会

## Poly(ADP-ribose)polymerase Solution (EC 2.4.2.30)【PARP】

生化学用

起源 : ウシ胸腺

10l, 0.1mM PMSF, 30 ~

ティングのポジティブコ

形状 : 本品 0.5mg/ml に対し 50 mM Tris(pH 8.0), 1mM EDTA, 0.6M NaCl, 25 mM Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, 1mM DTT, 10mM 2-mercaptoetha-

40% sucrose を含む溶液

ントロール

分子量 : 116kDa

最適 pH 範囲 : pH 7 ~ 8

〔参考文献〕

- 1) Ghayur, T. *et al.* : *Nature*, 386, 619 (1997).

用途 : Caspase のコントロール基質<sup>1)</sup>、ウエスタンブロッ

168-18821 100 $\mu$ g 照会

## ICE 阻害剤 新製品追加発売!

### ICE Inhibitor W-3【Z-ASP-CH<sub>2</sub>-DCB】

生化学用

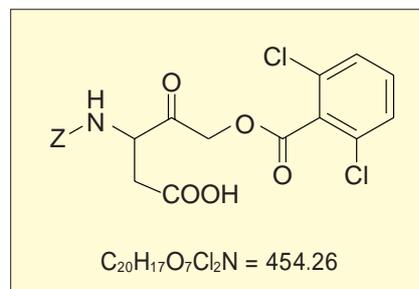
ICE 阻害剤 W-3 は ICE (Interleukin-1  $\beta$  Converting Enzyme) の選択的阻害剤で、アポトーシスを制御します。本品は脂溶性の高い Z 基 (benzyl-oxy-carbonyl) をもち細胞に効率よく取込まれます。

〔参考文献〕

- 1) Roland E. Dolle *et al.* : *J. Med. Chem.* 37, 563 (1994).

095-04133 100mg 24,000 円

〔関連商品〕



〔規格〕

含量 : 95.0% 以上

コード No.	品名	容量	希望納入価格(円)
094-04061	ICE Inhibitor W-1【Ac-YVAD-CHO】	10mg	41,000
091-04071	ICE Inhibitor W-2【Ac-YVAD-CMK】	10mg	39,000

## 第4話 アポトーシスの解析法— TUNEL 染色法

アポトーシスは特定の遺伝子産物によって意図的に引き起こされる能動的な細胞死として注目を集めている。それは、その遺伝子発現を人為操作することにより、細胞死をある時には抑制し、ある時には誘導できることを期待させるからである。従って、受動的な細胞死であるネクローシスとは根本的に区別される必要がある<sup>1)</sup>。既に本シリーズで解説されたように、アポトーシスとネクローシスは電子顕微鏡観察による形態的差異から区別されたものであるが、もっと簡便で一度に多数の細胞について評価できる細胞死検出法が色々模索された。一方、アポトーシスでの最も初期的な生化学的变化がゲノムDNAの二本鎖切断にあり、細胞死過程を解析する際の重要なマーカーの一つと見なされている。1992年に、Gavrieli等<sup>2)</sup>によりDNAに生じた二本鎖切断部位を視覚化することにより死細胞を同定する分子組織細胞化学的方法 (terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP-biotin nick end labeling (TUNEL あるいは in situ TdT)法) が考案され、現在では非常に広く利用されている<sup>3-6)</sup>。本稿では、TUNEL法の原理とその応用並びにDNA単鎖切断部位を視覚化する in situ nick translation (ISNT)法<sup>7,8)</sup>との比較も含め種々の問題点についても述べたい。

1. 必要性和意義<sup>9)</sup>

アポトーシスに伴うDNA鎖切断は二本鎖切断であり、特に生化学的にはアガロースゲル電気泳動上での180-200塩基対の倍数からなるラダー形成として知られる。一方、ネクローシスではDNA単鎖切断が主で、電気泳動上はスミアーとなると思われる。しかしながら、確かにDNAは遺伝情報の世代を越えた保持並びに各個体の存在に必要な遺伝子の発現を担う情報分子として、極めて安定な化学物質という印象を与えるが、実際には増殖・分化・死という細胞の生活環の中で頻りに切断され、また必要に応じて修復されていることが明らかになっている<sup>7)</sup>。例えば、哺乳類細胞で

のDNAの除去修復時には一過的な一本鎖切断が生じるし、ある種の血球細胞株の細胞分化過程に於いては分化誘導に伴って一過的にDNAの一本鎖切断が生じる。更に骨格筋細胞や目のレンズ細胞の終末分化に伴っては恒常的なDNAの一本鎖切断の存在が認められている。このように、DNA鎖切断は細胞死過程に於ける核崩壊時にも生じるのは当然として、同時にそれ以外の場合にも組織切片内には別の理由でDNA鎖切断をもつ細胞が存在する可能性があることを認識する必要がある。従って、多数の生理状態の異なる細胞集団からなる組織に於いては、全細胞の平均値として得られる生化学的な結果だけでは不十分であり、しかも通常のヘマトキシリン・エオシン等による組織染色と比べ感度の良い、TUNEL法やISNT法による細胞個々のレベルでのDNA鎖切断の検出が必須である。

## 2. TUNEL法の原理と実際

1)原理<sup>9)</sup>: 原理を図1に示した。DNAの3'-OHがfreeである時、そこにterminal deoxynucleotidyl transferase (TdT)を作用させると末端にヌクレオチドが付加される。この際に、biotin-16-dUTP<sup>3,4,6)</sup>やDig-11-dUTP<sup>5)</sup>等を取り込ませ、最終的に horseradish peroxidase (HRP) 標識抗biotin抗体や抗Dig抗体を用いて免疫組織化学的に染色する。この反応自体は、オリゴヌクレオチドの標識等<sup>10)</sup>でよく知られた反応である。陰性対照は、ハプテン化された核酸アナログの代わりにチミンを添加するか、或いは酵素のみを除いて反応させた標本を作製する。陽性対照としては、DNase Iによる前処理を行った標本を使用する(処理条件: 0.1 μg/ml DNase Iを10 mM MgCl<sub>2</sub>存在下で37℃、10min作用させる)。一本鎖DNAの末端や二本鎖DNAでも二本鎖切断部位は効率よく反応するのに対し、二本鎖DNAのニック部位の標識効率は低いと信じられており、従って本法はDNAの二本鎖切断部位を組織切片上ではより効率よく検出する方法と解釈され、アポトーシス細

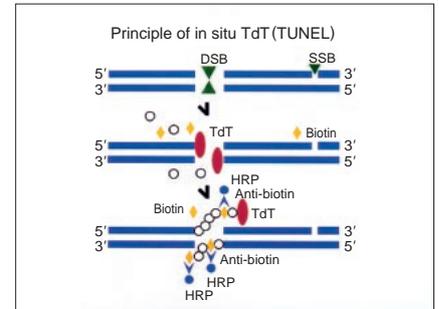


図1. TUNEL法の原理: DNAの二本鎖切断部位(DSB)等の遊離の3'-OH端に、TdTを作用させてハプテン化dUTPを取り込ませ、最終的にHRP標識抗ハプテン抗体を用いてシグナルを免疫組織化学的に視覚化する。切片上では、一本鎖切断部位(SSB)はTdTとの反応性に劣る。

胞核の同定に頻用される根拠となっている。

2)操作方法と実例並びに注意点: 実際のプロトコールの一例を表1に示した。DNA鎖を切断する操作や3'-OHが修飾されるような固定操作は避けられるべきである。組織中或いは混入したDNase I活性の阻害は、EDTAの添加によりCaやMg等の二価イオンを除くことで容易に可能である。組織化学の常として一度脱パラ等の操作過程を始めたなら、切片が不用意に乾燥することのないよう注意を払う。偽陽性や偽陰性を被る原因となる。種々の対照実験は必ず一連の実験過程に挿入する。最終的にシグナルの検出にはHRP活性を利用するので、内因性のperoxidase活性の阻害が必要な場合がある。そのためには、0.3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/メタノールに室温で15分程度浸漬するが、この操作はTdTの反応修了後に行なう。ラジカル反応によってDNA切断が起こり、人為的な呈色が生じる可能性があるからである。特に細胞核全体のバックグラウンドレベルの染色が強い場合は基質とTdT量をそれぞれ1/4-1/8及び1/2-1/4へと下げることをお勧めしたい。グルココルチコイド処理胸腺細胞でのアポトーシス核とCCl<sub>4</sub>処理ラット肝細胞のネクローシス核を染色した結果、共にTUNEL陽性核が認められたがそれらはISNTでも染色され、DNAの単鎖切断と二本鎖切断が程度の

差はあれ両細胞死で共存することが明らかである<sup>11)</sup>。パラフィン切片でも、基本的にISNTと同様な細胞集団がTUNELで染色される<sup>8)</sup>。多くの論文では、TUNEL法で染色された核は直ちにアポトーシスを意味すると解釈されているが、上述の如くこれは必ずしも正しくはない。ネクローシスの核もそのDNAには一本鎖並びに二本鎖切断を含み、理論的にも実際的にも本法で検出可能であるからである。典型的なアポトーシス核はTUNEL染色で陽性となるが、逆は必ずしも真ならずである点を強調したい。TUNEL法によって染色された実例を図2に示す。

### 3. 結果の解釈と注意点

切片の場合には、そもそもDNAは切断されており、更に固定等の作業に伴って人為的にDNA鎖切断が生じる可能性がある。従って、殆どの核が薄く呈色しても全く不思議ではない。本稿で述べたTUNEL法は条件を至適化している

ので、濃染した核のみ観察すればよい。特に、酸化されていることが予想されるホルマリンで固定された組織では、ホルムアルデヒドから生じたギ酸によりDNAが破壊されていると考えられ、バックグラウンドレベルの染色が高い。核酸アナログを標識しているハプテンの種類によっても特有の非特異的反応が経験される。検出したDNA鎖切断の意義を確認する上で、電顕観察を始めPCNAやKi-67等の細胞増殖検出パラメーターやFasやFas ligand等の種々の細胞死マーカーの発現検討<sup>13)15)</sup>も併用することが必要であると考えられる。

### 4. 終わりに

本稿では、酵素反応を利用しより特異的にDNA鎖の切断箇所を視覚化する分子組織細胞化学的方法論<sup>12)</sup>の一つであるTUNEL法についてご紹介し、アポトーシス検出法としての利点と問題点を述べた。正しい理解を持って、有効に利用されることが強く期待される。尚、この

方法はキット化されており、それらを利用することで簡便に行なうことが可能となっている点を付け加える。

### 〔参考文献〕

- 1) 小路武彦、中根一穂：アポトーシス概論。In 現代病理学大系補遺1, 東京, 中山書店, 35-45, 1995
- 2) Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson SA : Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. J Cell Biol 119:493-501, 1992
- 3) Koji T, Kobayashi N, Nakanishi Y, et al : Immunohistochemical localization of Fas antigen in paraffin sections with rabbit antibodies against human synthetic Fas peptides. Acta Histochem Cytochem 27: 459-463, 1994
- 4) Hakuno N, Koji T, Yano T, et al : Fas /APO-1/CD95 system as a mediator of granulosa cell apoptosis in ovarian follicle atresia. Endocrinology 137:1938-1948, 1996
- 5) Nogae S, Miyazaki M, Kobayashi N, et al : Induction of apoptosis in ischemia-reperfusion model of mouse kidney: Possible involvement of Fas. J Am Soc Nephrol 9 : 620-631, 1998
- 6) Wang R-A, Nakane PK, Koji T : Autonomous cell death of mouse male germ cells during fetal and postnatal period. Biol Reprod 58 : 1250-1256, 1998
- 7) Koji T : Nonradioactive in situ nick translation: A useful molecular histochemical tool to detect single-stranded DNA breaks. Acta Histochem Cytochem 29:71-79, 1996
- 8) Hashimoto S, Koji T, Kohara N, et al : Frequency of apoptosis relates inversely to invasiveness and metastatic activity in human colorectal cancer. Virchows Arch 431:241-248, 1997
- 9) 小路武彦：DNA鎖切断の分子組織細胞化学的検出法。電子顕微鏡 31:145-148, 1996
- 10) In Situ Hybridization(小路武彦編), 学際企画, 東京, in press
- 11) Hashimoto S, Koji T, Niu J, et al : Differential staining of DNA strand breaks in dying cells by non-radioactive in situ nick translation. Arch Histol Cytol 58: 161-170, 1995
- 12) Molecular Histochemical Techniques (Koji T, Ed), Springer-Verlag, Tokyo, in press

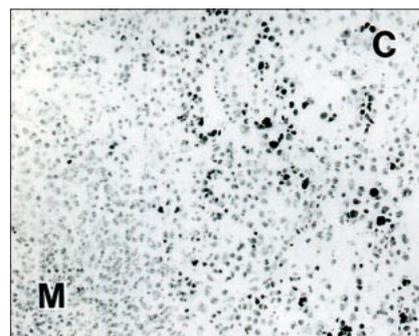


図2. グルコルチコイド投与ラット胸腺の新鮮凍結切片に於けるTUNEL法によるアポトーシス細胞核の検出。Hydrocortisone (10mg/100g BW)の腹腔内投与2時間後でのラット胸腺切片でTUNEL反応を行ったもの。皮質(C)と髄質(M)との境界領域に黒色の呈色核として陽性細胞核が認められる。<sup>11)</sup>

表1. TUNEL法のプロトコル(パラフィン切片の場合)<sup>16)</sup>

- 1)パラフィン切片をシラン処理スライドグラスに拾い、トルエン-エタノール系列を用いて常法に従って脱パラ操作を行う。
- 2)PBSで洗浄する(5 min, 3回)。
- 3)Proteinase K (1-10 μg/ml, 37℃, 5-15 min)処理する。
- 4)PBSで洗浄する(5 min, 3回)。
- 5)DDWで軽くリンスする。
- 6)1 × TdT buffer<sup>\*1)</sup>を添加(25-30 μl)し、湿室中で室温、30 min 反応させる。
- 7)反応溶液<sup>\*2)</sup>を添加(25-30 μl)し、よく攪拌した後湿室に入れる。容器全体をシールして37℃の保温器にて1-2 hr 反応させる。
- 8)50 mM Tris/HCl (pH 7.5)で洗浄する(5 min, 3回)。
- 9)PBSで洗浄する(5 min, 1回)。
- 10)500 μg/ml goat IgG/5% BSA/PBSを切片に添加(25-30 μl)し、湿室内に静置する(1 hr)。
- 11)上記溶液を拭取り、HRP標識anti-biotin抗体(Vector; 1:50 - 1:100)/5% BSA/PBSを添加し、よく混ぜて湿室内に静置(3 hr)。
- 12)0.075% Brij35/PBSで洗浄する(15 min, 4回)。
- 13)0.1 M リン酸ナトリウム緩衝液(pH 7.5)中に0.5 mg/ml ジアミノベンジジン(DAB)/0.01% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> / 0.02% NiSO<sub>4</sub> (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> / 0.025% CoCl<sub>2</sub>を含む溶液に浸漬(5-6 min)後、水洗する。
- 14)脱水系列・透徹操作後、封入する。

\*1) 1 × TdT buffer: 25 mM Tris/HCl (pH 6.6), 200 mM potassium cacodylate, 0.25mg/ml BSA.

\*2) TUNEL 反応溶液

	添加量	最終濃度
5 × TdT buffer	20 μl	1 × TdT buffer
10 mM Dithiothreitol	1 μl	0.1 mM
25 mM CoCl <sub>2</sub>	6 μl	1.5 mM
1 mM dATP	2 μl	20 μM
1 mM Bio-16-dUTP	1 μl	10 μM
25 units/μl TdT	0.8 μl	0.2 U/μl
DDW	69.2 μl	
Total	100.0 μl	

### 〔関連商品〕

Apoptosis *in situ* Detection Kit wako  
アポトーシス研究用

295-53501 40回用 60,000円

## B細胞のアポトーシス研究用

### Anti Mouse RP105, Rat Monoclonal Antibody

免疫化学用

RP105はマウスB細胞に特異的に発現される分子量約105kDaの細胞表面分子です。特に成熟B細胞において強く発現されています。抗RP105抗体で架橋されると強い活性化シグナルを伝達し、放射線やデキサメタゾンで誘導されるB細胞アポトーシスの阻止や著明なB細胞増殖を誘導します。

免疫原: BALB/c マウスの脾臓細胞

形状: 凍結乾燥品

クローン No.: RP/14

サブクラス: Rat IgG<sub>2a</sub>

精製法: 硫酸分画

特異性: マウス成熟B細胞表面に発現するRP105抗原を認識します

実用希釈倍数: 免疫蛍光法 1 ~ 5 $\mu$ g/test

免疫沈降法 10 ~ 30 $\mu$ g/sample

〔参考文献〕

- 1) Miyake, K. *et al.* : *J. Exp. Med.*, 180, 1217(1994).
- 2) Miyake, K. *et al.* : *J. Immunol.*, 154, 3333(1995).
- 3) Yamashita, Y. *et al.* : *J. Exp. Med.*, 184, 113(1996).

014-16251 200 $\mu$ g 30,000円

### Anti Mouse IL-5 Receptor, Rat Monoclonal Antibody

免疫化学用

IL-5は、細胞表面に発現しているIL-5レセプターに結合することによりB細胞や好酸球の増殖・分化を誘導することが知られています。IL-5レセプター $\alpha$ 鎖はIL-5に特異的に結合し、IL-3やGM-CSFに共通な $\beta$ 鎖と複合体を形成する事により、高親和性レセプターとなります。IL-5のシグナル伝達機構、及び炎

症・アレルギー研究にご利用下さい。

形状: PBS凍結品

免疫原: マウスT88-M細胞の膜画分

精製法: プロテインG

特異性: マウスIL-5レセプターと特異的に反応する

〔参考文献〕

- 1) Yamaguchi, N. *et al.* : *Int. Immunol.*,

2, 181 (1990)

- 2) Hitoshi, Y. *et al.* : *J. Immunol.*, 144, 4218 (1990)

- 3) Migita, M. *et al.* : *Cell. Immunol.*, 133, 484 (1991)

- 4) Kikuchi, Y. *et al.* : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92, 11814 (1995)

コード No.	Clone No.	サブクラス	Flow Cytometry	中和活性*	包装	希望納入価格(円)
017-17341	H7	IgG <sub>2a</sub>	1:500	2 $\mu$ g/ml	100 $\mu$ g	30,000
014-17351	T21	IgG <sub>1</sub>	1:500	0.08 $\mu$ g/ml	100 $\mu$ g	30,000

\* 0.1U/mlのマウスIL-5の存在下のY16細胞(IL-5依存性初期B細胞株)の増殖をほぼ完全に抑制する。

## Oligo(dT)-cellulose

遺伝子研究用

セルロースにOligo(dT)の5'末端領域を共有結合により固定しています。アフィニティークロマトグラフィーによるPoly(A)<sup>+</sup>RNAの精製に有効です。

Poly(A)結合: 1gのOligo(dT)-celluloseに対し0.5mol/l NaCl, 10mmol/l Tris-HCl pH 7.5の条件下で、80(OD260)unitsのPoly(A)が結合

mRNA結合: 1gのOligo(dT)-celluloseに対し、約1mgのPoly(A)<sup>+</sup>RNAが結合

547-00461 250mg 15,000円 543-00463 1g 40,000円

## CALBIOCHEM® G418 Sulfate Sterile-Filtered Aqueous Solution

遺伝子工学実験における選択試薬です。アミノグリコシド系抗生物質で、トランスポゾンTn5のneo遺伝子にコードされるアミノグリコシド3'-ホスホトランスエステラーゼにより不活性化されます。

一般的に、このことを利用して、neo遺伝子を用いたトランスフェクションした目的の遺伝子が恒常的に発現している細胞を単離する操作で、その形質転換細胞のみを選択するために、培地中に添加して使用されます。

〔規格〕

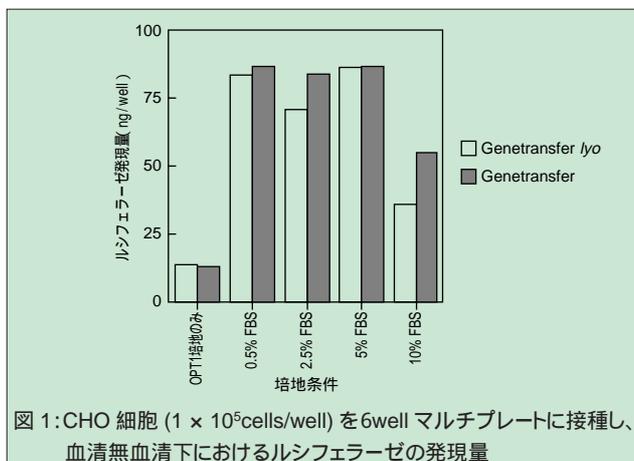
純度(TLC): 98%以上

力価: 700 $\mu$ g/mg以上

コード No.	品名	容量	希望納入価格(円)
530-68151	G418 Sulfate	250mg	7,500
536-68153	G418 硫酸塩	1g	14,400
534-68154		5g	52,400
537-68161	G418 Sulfate, Sterile-Filtered Aqueous Solution	10ml	10,400
533-68163	G418 硫酸塩、フィルター滅菌水溶液	50ml	36,700

## 多重膜リポソームによる遺伝子導入用試薬

### Genetransfer Iyo



## 使い勝手を大幅に高めました！

本試薬は従来の遺伝子導入法であるりん酸カルシウム法、リポソーム法よりも効率よく目的遺伝子を各種細胞へ導入できます。また本品は従来より好評を頂いて来ましたジーントランスファーの姉妹品として、使い勝手を大幅に高めつつ、性能は同等に保持した凍結乾燥品です。培養培地中の血清の影響を受けにくい<sup>図1</sup>のも本品の特長です。

### 原理

遺伝子を構成しているDNAは生理的条件下では負に帯電しています。従って遺伝子はプラスミドとともに負に帯電しており、表面がカチオン脂質で構成されている多重膜リポソーム層にDNA溶液を加え、攪拌する事によりDNAが包埋されます。このDNA-リポソーム複合体<sup>図2</sup>は負に帯電している動物細胞表面に吸着され、細胞の貪食作用により容易に細胞内へ取込まれます。

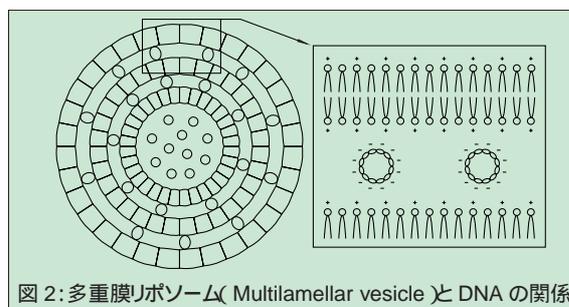
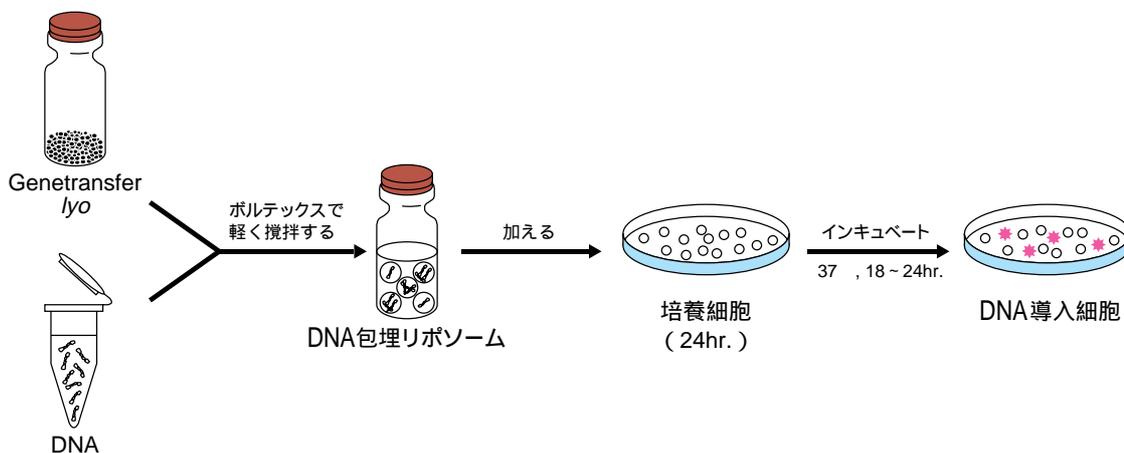


図 2: 多重膜リポソーム (Multilamellar vesicle) と DNA の関係

### 使用方法



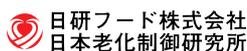
### 【参考文献】

- 1) Koshizaka, T., Hayashi, Y. and Yagi, K. : *J. Clin. Biochem. Nutr.*, 7, 185 (1989).
- 2) 八木國夫 : *Mebio*, 4月号 26 (1992).
- 3) 八木國夫、野田倫、大石誠子、黒野昌庸 : 公開特許公報, 平 4-108391.
- 4) 八木國夫 : *実験医学*, Vol. 12, 59 (1994).

コード No.	品名	規格	容量	希望納入価格(円)
070-04441	Genetransfer Iyo	遺伝子研究用	0.2ml 用 × 5 本入り	29,000

### 関連商品

コード No.	品名	規格	容量	希望納入価格(円)
074-03621	Genetransfer	遺伝子研究用	1ml	21,000



## DNA 酸化損傷マーカー「8-OHdG」測定キット

「8-OHdG Check」は DNA の酸化的損傷のバイオマーカー「8-OHdG」を定量できる測定キットです。世界に先駆けて開発され、簡便に酸化的ストレスを評価できるという点で他に類を見ないものです。本キットは「8-OHdG」に特異的なモノクローナル抗体を使用した ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) キットで、人及び実験動物の尿・血清・細胞培養液中等の他、各種 DNA 中の「8-OHdG」の測定にご利用いただけます。

### ◆特長

1. 簡単：分離のための高価な機器や煩雑な前処理の必要はなく、生体成分の測定に適しています。
2. 高感度：特異性の高いモノクローナル抗体が 8-OHdG を特異的に認識し、類似物質を認識しません。0.5 ~ 200ng/ml の範囲で測定可能です。
3. 迅速：分析時間は 1 プレート当たり 3.5 時間です。
4. 多種類の微量サンプルに最適 (n=3 で 18 サンプル分析可能、サンプル必要量は 150 $\mu$ l)。
5. 分割式プレートで、分割使用が可能で、無駄がありません。

### ◆8-OHdG Check の用途・有用性

体内に取込まれた酸素のうち最低でも数%は活性酸素に変換されると言われています。生成した活性酸素のうち一部は、生体成分である脂質・タンパク質・DNA 等に酸化傷害を与えることとなります。トータルとしての活性酸素量が多くなったり、生体に備わっている抗酸化システムの機能が低下したりして、バランスが崩れ、活性酸素等による酸化的ストレスレベルが高くなると生体成分の傷害が増加し、老化や疾病を引き起こします。8-OHdG (8-ヒドロキシデオキシグアノシン) は DNA 構成成分である dG (デオキシグアノシン) が酸化されて生成する物質であり、最終的に尿中に排出されます。従って、8-OHdG は DNA の酸化傷害のバイオマーカーとして有効なことは勿論ですが、生体内の酸化的ストレスの大きさの指標としての利用も期待されます。使用している抗 8-OHdG モノクローナル抗体は特異性が高く [文献 2]、複雑な前処理の必要がない為、共存物質の多い生体成分に適しています。

次のような用途があります。

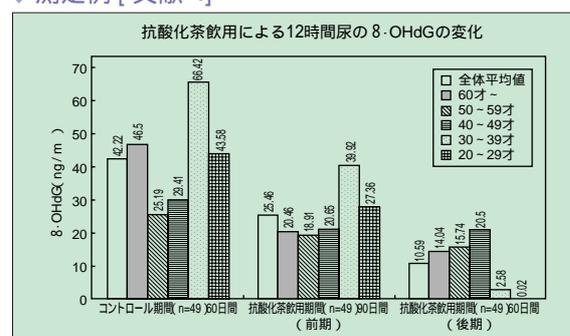
- 1) 生体 (細胞、組織) の酸化的ストレスの評価 [文献 1]
- 2) 老化のフィードバック用検出ツールとしての利用と、老化予防検討の有用情報の提供
- 3) 個別の運動・生活習慣の酸化的ストレスの評価
- 4) 酸化的ストレスに関する生活習慣の総合評価と、がん・生活習慣病の予防法開発のための情報提供
- 5) 病気の治療及び投薬時の酸化的ストレスの評価と、治療法検討に有用な情報の提供
- 6) 未病状態の情報の提供と、発症時予防解析に有用な情報の提供 [文献 3]
- 7) 食品及び飲料の抗酸化機能についての、人その他の動物での非侵襲的な評価 [文献 4]
- 8) 皮膚への紫外線等による酸化的ストレスの評価と、防護法検討に有用な情報の提供



### ◆キット内容

1. 8-OHdG 固相化プレート (96 ウェル、分割式)
2. 第一抗体 抗 8-OHdG マウスモノクローナル抗体)
3. 第一抗体溶解液
4. 第二抗体 (POD 標識抗マウス IgG 抗体)
5. 第二抗体溶解液
6. 発色剤 (TMBZ 溶液)
7. 発色剤希釈液
8. 5 倍濃縮洗浄液
9. 反応停止液
10. 8-OHdG 標準液
11. プレートシール

### ◆測定例 [文献 4]



### 〔関連文献〕

- 1) Sri Kantha, S. et al. : Biochem. Biophys. Res. Comm., 223, 278-282 (1996)
- 2) Toyokuni, S. et al. : Lab. Invest., 76, 365-374 (1997)
- 3) Erhola, M. et al. : FEBS Lett., 409, 287-291 (1997)
- 4) 越智宏倫:「老化制御食品の開発」, p.294, (株式会社光琳) (1995)

コード No.	メーカーコード	品名	容量	希望納入価格 (円)
301-06101	KOG-200S	8-OHdG Check	1セット	80,000

### 〔関連商品〕

コード No.	メーカーコード	品名	容量	希望納入価格 (円)
305-06121	MOG-100	8-OHdG モノクローナル抗体	100 $\mu$ g/ml	100,000
301-06123	MOG-020	8-OHdG モノクローナル抗体	20 $\mu$ g/0.2ml	26,000
308-06111	MHN-100	4-HNE モノクローナル抗体	100 $\mu$ g/ml	70,000
304-06113	MHN-020	4-HNE モノクローナル抗体	20 $\mu$ g/0.2ml	18,000

## ヒートショックタンパク質抗体

ヒートショックタンパク質は、熱刺激により誘導されるタンパク質として命名された一群の分子種ですが、熱以外にも金属、細胞周期、虚血、炎症など様々な要因により誘導されるためストレスタンパク質とも呼ばれています。HSP60のシャペロン機能はよく知られていますが、疾患との関連では感染症を中心に研究が進められてきており、現在では慢性関節リウマチなど自己免疫疾患との関連性に注目が集められています。

### Anti *H.pylori* HSP60, Monoclonal Antibody

免疫化学用

免疫原: *H.pylori* TK1029 由来の部分精製 60kDa 抗原

精製法: イムノグロブリン分画  
クローン No.: H9

サブクラス: IgG<sub>2a</sub>

特異性: *H. pylori* HSP60 だけでなく、他菌種抗原とも広く反応する

実用希釈倍数:

ウエスタンブロット

1:100 ~ 1:10,000

[参考文献]

Yamaguchi, H. et al. : *J. Med. Microbiol.*, 46, 819 (1997)

014-16991 200 $\mu$ g 35,000 円

### Anti Mycobacterial HSP65, Monoclonal Antibody

免疫化学用

免疫原: リコンビナントマイコバクテリウム HSP65

精製法: Protein A

クローン No.: B97

サブクラス: IgG<sub>2a</sub>

特異性: マイコバクテリウム HSP65 と特異的に反応するが、哺乳動物及び *E. coli* Gro EL 65kDa とはほとんど反応しない

実用希釈倍数:

ウエスタンブロット

1:1,000 ~ 1:5,000

免疫組織染色 1:200 ~ 1:1,000

018-14071 200 $\mu$ g 31,500 円

### Anti Human HSP27, Monoclonal Antibody

免疫化学用

免疫原: HeLa Total Protein

形状: 培養上清の凍結品

クローン No.: mH3

サブクラス: IgG<sub>1</sub>

特異性: ヒト、マウスと反応するが、原生動物とは反応しない

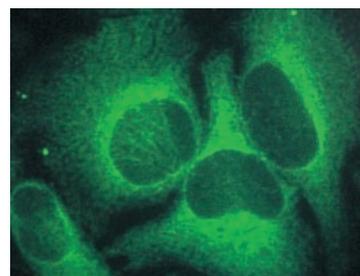
実用希釈倍数:

蛍光抗体法 1:1 ~ 1:4

間期の細胞は細胞質が網目状に、また分裂期には均一に染色される

ウエスタンブロット 1:1 ~ 1:8

018-17251 5ml 25,000 円



分裂期期の HeLa 細胞の抗 HSP27 抗体による染色像

### Anti Human HSC73, Monoclonal Antibody

免疫化学用

免疫原: HeLa 細胞

形状: 培養上清の凍結品

クローン No.: NT22

サブクラス: IgM

特異性: ヒト、マウス、ウシ HSC73 と特異的に反応するが、HSP72 とは反応しない

実用希釈倍数:

ウエスタンブロット ~ 1:100

免疫組織染色 ~ 1:10

018-15551 1ml 25,000 円

### Anti Human HSP90 $\alpha$ , Monoclonal Antibody

免疫化学用

免疫原: リコンビナントヒト HSP90 $\alpha$

精製法: 硫酸分画

クローン No.: K41233

サブクラス: IgG<sub>1</sub>

特異性: ヒト HSP90 $\alpha$  (アミノ酸 216-285) と特異的に反応する

実用希釈倍数:

ウエスタンブロット 1:200

免疫組織染色 1:800

016-17051 200 $\mu$ g 30,000 円

### Anti Human HSP90 $\beta$ , Monoclonal Antibody

免疫化学用

免疫原: リコンビナントヒト HSP90 $\beta$

精製法: 硫酸分画

クローン No.: K3701

サブクラス: IgM

特異性: ヒト HSP90 $\beta$  (アミノ酸 185-289) と特異的に反応する

実用希釈倍数:

ウエスタンブロット 1:200

免疫組織染色 1:800

013-17061 200 $\mu$ g 30,000 円

# 炎症とケモカイン

近畿大学 医学部 細菌学講座 義江 修

組織に損傷や微生物の感染などの侵襲が加わると生体はただちに炎症反応によって対応する。周知のように炎症反応は発赤、腫脹、発熱、疼痛、の4徴によって特徴づけられるが、これらの徴候はおもに末梢血管の拡張、浸出液の増加、白血球の組織浸潤、痛覚刺激物質の産生、などの一連の生理的反応に由来する。炎症とは滲出液と白血球を障害された組織に集める反応であると言える。急性期の炎症反応は画一的で、おもに好中球が浸潤するが、慢性化するにしたがって炎症像は変動型となり、浸潤する白血球の主体は単球/マクロファージに移り、さらに免疫応答のレベルに応じてリンパ球が浸潤し、アレルギー性炎症では好酸球が浸潤する。このような白血球の組織浸潤は生体防御機構にとって必須の反応であるが、それによる悪影響がさらに病的状態の原因ともなりうるいわば「諸刃のやいば」である。そのために白血球の組織浸潤を人工的に制御できれば、さまざまな急性疾患や慢性疾患の治療に役立つと期待される。

白血球の組織浸潤はセレクチンやインテグリンなどの細胞接着分子と各種の細胞遊走因子が複雑に組み合わさって、あたかもエリアコードを形成するように作用して行われる<sup>12)</sup>。細胞遊走因子としてはまず古典的走化因子と総称されるさまざまな物質が知られている。補体成分の分解産物であるC3aやC5a、アラキドン酸代謝産物のロイコトリエンB4、リン脂質の一種である血小板活性化因子、細菌由来のフォルミル化ペプチド、などである。これらはあらかじめ存在する物質から由来する2次代謝産物であり、組織の障害にともなってすみやかに産生される。しかし白血球の特定のタイプに対する特異性は低く、そのため異なるタイプ

の白血球の組織浸潤を十分説明することができなかった。これらに対し特定の白血球のケモタキシスを誘導する一連のサイトカイン、いわゆるケモカインの存在が知られるようになったのは比較的最近のことである。すなわち、まず1986年にリボポリサッカライド(LPS)で活性化されたヒト単球から産生される好中球の走化因子としてIL-8が発見され、また1987年にはさらに単球の走化因子としてMCP-1が発見された<sup>13)</sup>。その後はケモタキシス活性とともに構造上の共通性も同定の指標とされて、この10年ほどの間につぎつぎと新しいケモカインが発見されてきた。ヒトでは現在すでに30種以上のケモカインが報告されている<sup>1)</sup>。

ケモカインは保存されている4つのシステイン残基のうちN端側の2個の形成するモチーフにより大きくCXCとCCのふたつのサブファミリーに分類される。すなわちCXCではふたつのシステインの間にアミノ酸が1個介在するが、CCでは連続している。この4つのシステインは1番目と3番目および2番目と4番目の間でジスルフィド結合を形成し、安定な立体構造を形成する。このCXCとCCのモチーフはケモカインを機能的に分類する上でもきわめて有用である。すなわち、CXCケモカインは一般に強力な好中球の走化因子である。一方、CCケモカインは一

般に強力な単球の走化因子である。ただしCXCケモカインでもリンパ球に対する作用が示されており、またCCケモカインの多くはリンパ球、好塩基球、あるいは好酸球などに対する作用が報告されている<sup>13)</sup>。CXCケモカインとCCケモカインの分類は遺伝子の染色体上での位置についても関係する。すなわち、CXCケモカイン遺伝子はヒトでは4番染色体q12-q13にクラスターを形成し、CCケモカイン遺伝子は17番染色体q11.2にクラスターを形成する<sup>13)</sup>。ただし次回に述べるように、このようなケモカイン系の伝統的なルールに対する例外が最近つぎつぎと見いだされてきている<sup>14)</sup>。またC型やCXC型のモチーフをもつケモカイン様分子も見いだされている<sup>13)</sup>。

古典的走化因子もケモカインもすべて7回膜貫通G蛋白共役型レセプ

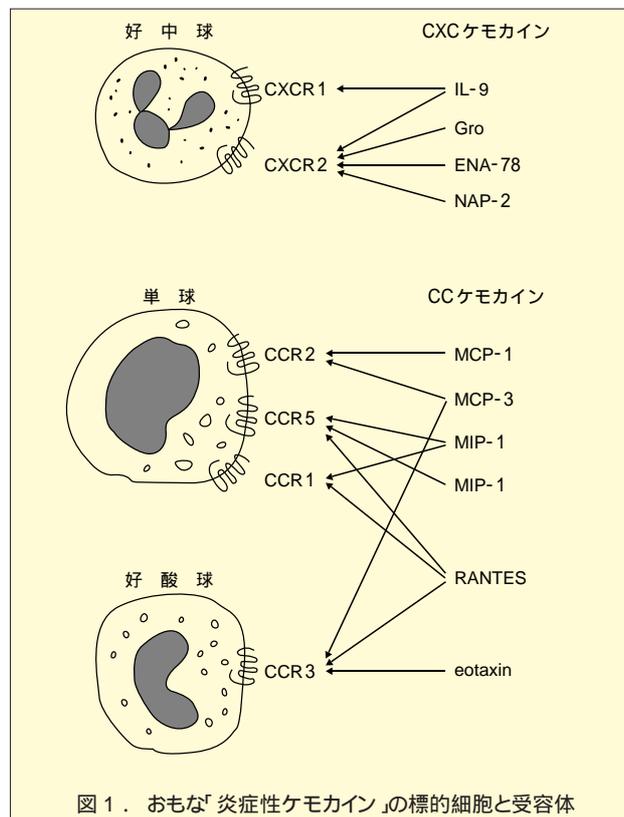


図1. おもな「炎症性ケモカイン」の標的細胞と受容体

ターに結合して作用する。現在までにケモカインレセプターは16種同定されている<sup>1)</sup>。ケモカイン系に特有な性質として、ひとつのケモカインが複数のレセプターに作用し、またひとつのレセプターが複数のケモカインと反応する、という他のサイトカイン系には全く類を見ない複雑なリガンド・レセプター関係がある<sup>1,3)</sup>。この場合、結合親和性や作用効力はそれぞれの組み合わせによって異なるが、それにしてもなぜケモカイン系にはこれほど複雑なリガンド・レセプター関係が存在する

のか不思議であった。しかし現在ではこのような関係はおもに好中球、単球、好酸球などを標的細胞とするいわば「炎症性ケモカイン」で特に際立った特徴であることがわかってきた(図1)<sup>4)</sup>。そのためこのような複雑なリガンド・レセプター関係は、さまざまな炎症反応に際して必要な種類の白血球をただちに強力に動員するために適応し発達してきた、いわば「泥縄式進化」の結果であると推測される。すなわち炎症反応では特異性の高い質的な動員よりも、少々特異性は低くても

量的に十分な動員が重要なのではないだろうか。また試験管内では重複して作用するケモカインの場合でも生体内ではそれなりに特異的な役割を担っている可能性も考えられる。個々のケモカインの生体内での役割の解明が待たれる。

〔参考文献〕

- 1) 義江 修 : 「免疫 98-99」, p.176, (中山書店) 1998
- 2) Springer TA. : *Cell*, 76, 301 (1994)
- 3) Rollins BJ. : *Blood*, 90, 909 (1997)
- 4) Yoshie O. *et al.*: *J. Leukoc. Biol.*, 62, 634 (1997)

## ケモカイン

コード No.	品 名	容 量	希望納入価格(円)
Human			
091-04331	Interleukin-8(endothelial cell-derived), recombinant	25 $\mu$ g	39,000
098-04341	Interleukin-8(monocyte-derived), recombinant	25 $\mu$ g	39,000
095-04351	IP-10, recombinant	25 $\mu$ g	39,000
137-13011	MCP-1, recombinant	20 $\mu$ g	照 会
138-13041	MIP-1 , recombinant	20 $\mu$ g	39,000
181-01441	RANTES, recombinant	20 $\mu$ g	39,000
Rat			
131-13031	MCP-1, recombinant	10 $\mu$ g	照 会
135-13051	MIP-1 , recombinant	20 $\mu$ g	39,000
188-01451	RANTES, recombinant	20 $\mu$ g	39,000

## Protein Standard, BSA Solution (10mg/ml)

### タンパク質定量用

Lowry法やBCA法等でタンパク質を定量する場合に用いる標準タンパク質です。様々なタンパク質量法を用い相関係数を確認しています。またロット間差がありませんので安心して使用できます。

溶 状 : 30% グリセリン溶液

SDS-PAGE : 99% 以上

相 関 係 数 : UV 吸 収 法、Lowry 法、BCA 法、Bradford 法、DC Protein 法でそれぞれ 0.990 以上であることを確認

免疫拡散沈降 : Ouchterlony 法にて、1 本の沈降線になることを確認済み

163-18871 5 × 1ml 27,000 円

## 選択的 iNOS 阻害剤

### CALBIOCHEM® 1400W

*in vivo* 及び *in vitro* における iNOS の選択的で、反応速度が遅く、結合力の強い阻害剤です。(最大速度定数 0.028s<sup>-1</sup>、結合定数は 2 $\mu$ M)

持続時間が 2 時間以上と長く、阻害は補因子 NADPH に依存し、eNOS に比べ iNOS に対してヒトにおいて 5000 倍選択的に、ラットにおいては 1000 倍

選択的に作用することが報告されています。

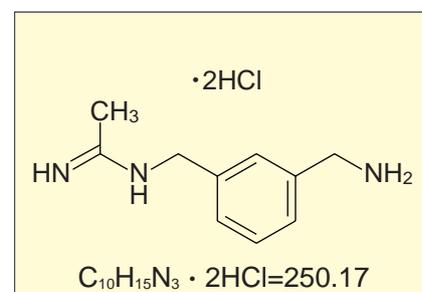
〔規 格〕

純度 (HPLC) : 95% 以上

溶 解 性 : 水、メタノールに可溶

〔参考文献〕

- 1) Garvey, E. P. *et al.* : *J. Biol. Chem.*, 272, 4959 (1997).



- 2) Thomsen, L. L. *et al.* : *Cancer Res.*, 57, 3300 (1997).

539-69461 5mg 21,500 円

## イムノクロマトを用いたレジオネラ簡易検出キット

### Legionella Detection Kit

レジオネラ血清群タイプ1検出用

本キットは、空調用冷却塔水等の水中から、レジオネラ感染症の多くを占めるレジオネラニューモフィラ (*Legionella pneumophila*) 血清群1型を、メンブランフィルター法による検出試料の濃縮と、金コロイドイムノクロマト法を用いた簡易検出試薬との組み合わせにより検出するキットです。

本キットは体外診断用ではありません。

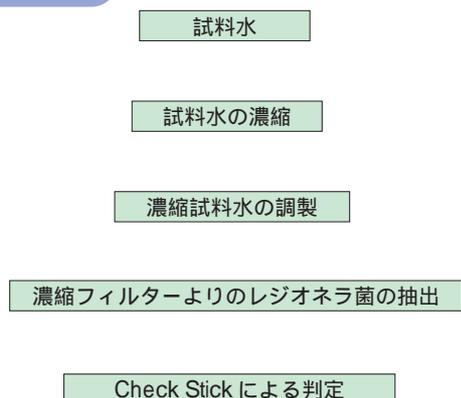
#### 特長

- ・レジオネラ症の起病菌として最も検出率の高いレジオネラニューモフィラ血清群1型を特異的に検出
- ・培養を必要とせず約1時間(検水濃縮約30分、抽出約20分、判定約10分)で判定可能
- ・特殊な機器を必要とせず、わずか4段階の操作で、結果は赤紫色のラインにより判定
- ・濃縮操作を組合わせているため、レジオネラ菌数  $5 \times 10^3$  CFU/100 ml まで検出可能

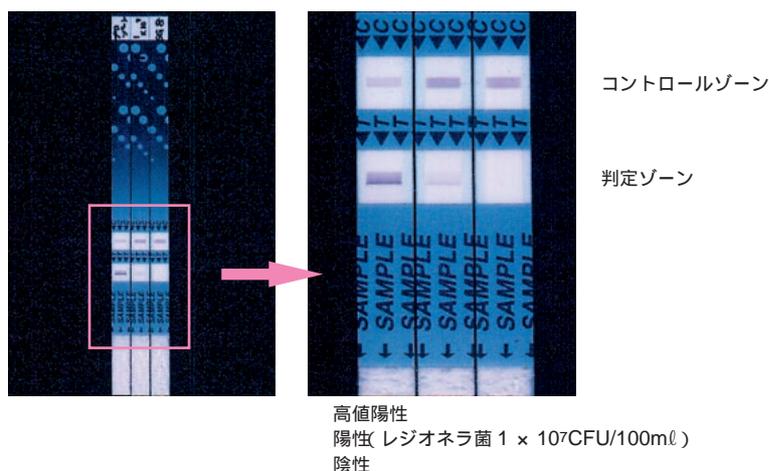
#### 内容

- |                         |     |
|-------------------------|-----|
| (1) Check Stick         | 10枚 |
| (2) Pre-Filter          | 10枚 |
| (3) Extraction Solution | 10本 |
| (4) Filter              | 10枚 |

#### 検出方法の概略



#### 判定結果



293-54901 10回用 80,000円

フリーダイヤル：0120-052-099  
フリーファックス：0120-052-806

## 大腸がん誘発剤(ラット)

### Azoxymethane

生化学用

アゾキシメタンは、ラットに皮下注射すると大腸がんを特異的に誘発します。投与量は、15mg/kg体重を週1回×約3週間です。投与後数週間すると腫瘍の発生が確認できます。

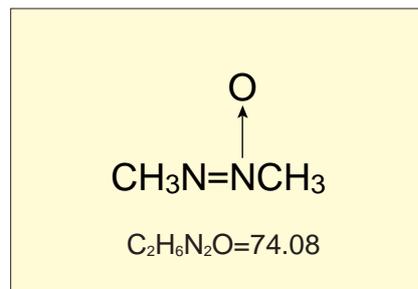
〔規格〕

含量(HPLC)：95.0%以上

〔参考文献〕

- 1) 広瀬善信、田中卓二 他：日本癌学会総会記事，p.269 (1996).
- 2) 田中卓二、隅田孝司、小川浩史：Foods Food Ingredients J. Jpn. 177, 43 (1998).

017-17081 100mg 13,000円



掲載されている試薬は、試験・研究の目的にのみ使用されるものであり、家庭用、医療用等の用途には用いられません。

希望納入価格には消費税等が含まれておりません。

発行所 和光純薬工業株式会社  
〒540-8605  
大阪市中央区道修町三丁目1番2号  
TEL. 06-203-3741(代)

発行日 1998年10月15日  
発行責任者 岸井松司  
編集責任者 大西礼子  
印刷所 共進社印刷株