

和光純薬時報

和光純薬工業株式会社



死細胞、全細胞数及び細胞生存率を測定する 蛍光試薬を用いた高感度細胞毒性測定試薬セット

Cytotoxic Fluoro-test wako 細胞毒性測定用

本試薬は、Fluorometric Assay based on Cell Lysis & Staining method (FACLS 法)を用いた、死細胞、全細胞数及び細胞生存率を高感度に測定するキットです。

- ・ 操作時間が、約 5 分で測定可能です。
- ・ 薬剤や pH、温度、培地成分の影響を受けません。
- ・ 浮遊細胞、接着細胞どちらも測定可能です。

(測定の実用例)

- 細胞毒性測定試験
- 細胞増殖能測定試験
- 細胞の生死の割合の測定
- 動物実験代替試験

293-55001 1,000 回用 31,000 円

キットの性能につきましては、P.13 をご参照下さい。

目次

百年前の化学 _____
「1899 年の化学を顧みて」
芝 哲夫..... 2

総説 _____
「改正変異原性試験について(その 2: 染色体異常試験) - OECD ガイドラインとのハーモナイゼーション」 清水 英佑..... 6
「核酸蛍光染色剤を用いた新しい細胞増殖及び、細胞生存率測定法(FACLS 法)」
加藤 文法..... 9
「糖脂質の糖鎖構造の変化と癌(後編)」
瀧 孝雄..... 14

シリーズ _____
< Talking of LAL >
「第 34 話 β - グルカンとリムルス試薬の反応性」 土谷 正和..... 20

< How to アポトーシス >
「第 5 話 アポトーシス誘導分子: Fas-Fas リガンド(FasL)の機能と変異」
松沢 昭雄..... 22

< 免疫一口メモ >
「免疫とケモカイン」
義江 修..... 28

テクニカルレポート _____
「合成オリゴヌクレオチド精製用「Wakosil DNA カラム」について」
上森 仁志..... 18

新製品フラッシュ _____
細胞毒性フルオロテストワコー..... 1,13
住友精密工業(株)フタル酸エステル類測定用水、(株)ヤマモト抗体研究所 コイピテロジェニン ELISA キット..... 5
日本製薬(株)日局充てん試験対応ソイビーン・カゼイン・ダイジェスト培地「ダイゴ」... 8
バリドキシルアミン A..... 16
トレハロース二水和物、ストレプトアビジン、タイプ L-012 ナトリウム..... 17
ワコーパック Wakosil- 5C22、WS DNP、ワコーシル DNP 溶解液 A・B..... 19
(株)サンギ GPDH 活性測定キット他..... 21
アンチマイシン A、アンチセンスコントロールテンプレート..... 24
(株)ニッポンジーン ドロップ PCR キット、スマートラダー..... 25
トリス、マイヤーヘマトキシリン溶液(x2)... 26
レブチン、Tocris 社 コンパウンドライブラリー..... 27
ケモカイン、サイトカイン..... 29
抗ヒトレチノイド X レセプター β 、モノクローナル抗体他..... 30
イムノスター試薬、グルタミン酸トランスポーター抗体..... 31
ペロトキシントラック..... 32

1899 年の化学を顧みて

大阪大学名誉教授 芝 哲夫

放射線が二成分に分かれる

1896年に A. H. Becquerel が X 線の研究から偶然に発見した放射線は3年後の1899年になって、少なくとも二成分に分かれることがわかった。E. Rutherford の実験によって、ウラニウムからの放射線は薄いアルミニウム箔に吸収されるものと、それを通過するものとに分かれた。Rutherford は前者を α 線、後者を β 線と呼んだ¹⁾。両成分は磁気的にも分離されることが、E. Giesel²⁾ によりポロニウムで、H. Becquerel³⁾ によりラジウムで、それぞれこの年に確認された。 α 線の本体がヘリウムであることは、やはり Rutherford により1908年に、また β 線が電子であることは、1901年に W. Kaufmann により明らかにされた。さらにウラニウムの放射線には電磁波である γ 線も含まれていることが1900年に P. Villard によって報告された⁴⁾。

ウラン鉱石から第三の放射性元素アクチニウム発見

Curie 夫妻が1898年にウラン鉱石から放射性元素としてはじめてポロニウムとラジウムを発見したことはよく知られている。その翌年の1899年に Curie 夫妻と親交があった Andre-Louis Debierne が同じウラン鉱石ピッチブレンドの溶出液にアンモニアを加

えて生じた希土類混合物の中から、第三の新放射性元素アクチニウム actinium を発見分離した^{5,6)}。この元素名アクチニウムはギリシア語の光線を意味する aktinos に由来する。Debierne は1910年に Curie 夫人に協力して、純粋なラジウムの単離にも成功している。

アクチニウムが発見された3年後の1902年に F. Giesel はやはりウラン鉱石ピッチブレンドから放射線を発する元素を分離してエマニウム emanium と名づけたが⁷⁾、後に Giesel 自身エマニウムはアクチニウムと同一物質であることに気づき⁸⁾、O. Hahn がそれを証明した⁹⁾。

アクチニウムはランタンに性質が似る89番元素であったが、最初はランタンに続くいわゆるランタノイドのような同類元素はアクチニウムにはないと考えられていたが、1940年代になって、ネプツニウム neptunium、プルトニウム plutonium などの新元素が人工的に作られるようになって、15元素より成るアクチノイド actinoid 系列が成立することになった。

二重結合の部分原子価説

二重結合、特に共役二重結合を持つ化合物が反応性に富むことから、J. Thiele は C=C 二重結合の部分原子価または残余原子価とよばれる原子価

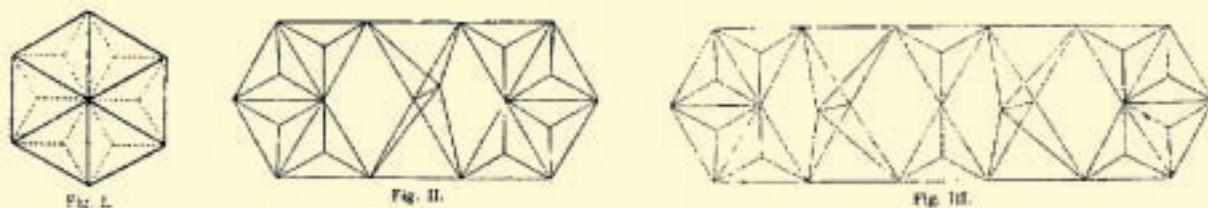


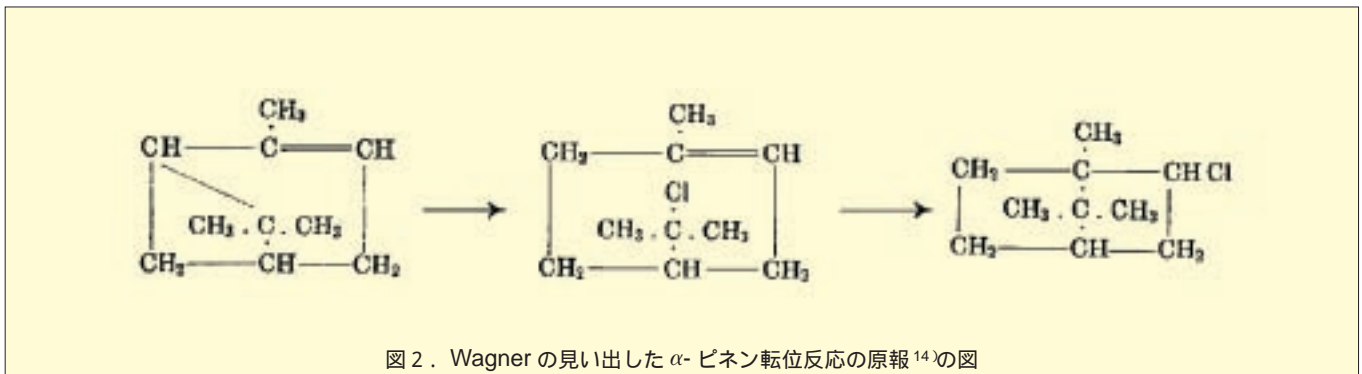
写真1. J. Thiele

説を提唱してその反応性を説明しようとした^{10,11,12)}。二重結合に關与する炭素原子には反応に利用できる第二原子価を部分的に持つとするものである。たとえば、ブタジエンの場合、中央の2、3位の炭素原子の部分原子価は互いに中和されているが、1、4位の末端の部分原子価は中和されないので、1、4付加が起こると説明された。この説はベンゼンに対する共鳴構造説の前段階の説ともみなされる(図1)。

Wagner-Meerwein 転位反応見つかる

1899年、G. Wagner と W. Brickner が二環性テルペンである α -ピネンがエーテル中塩化水素によって、炭素骨

図1. Thiele の報告¹³⁾に部分原子価で画かれたベンゼン(Fig. I), ナフタリン(Fig. II), アントラセン(Fig. III)¹³⁾



格が変わった塩化ボルニルを生成するという転位反応をはじめて見つけた¹⁴⁾(図2)。

その後1913年になってH. Meerweinが二環性テルペンに限らず、シクロヘキサン系、さらには鎖状炭化水素に対しても、塩化水素添加のみならず逆に脱塩化水素、脱水反応に際しても、同様な転位反応が広く起こることを明らかにした¹⁵⁾。今日では中間にできた炭素陽イオンに向かって隣接する基が転位する反応をまとめて一般にWagner-Meerwein転位と称されている。そのきっかけとなったのが1899年のWagnerらの発見であった。

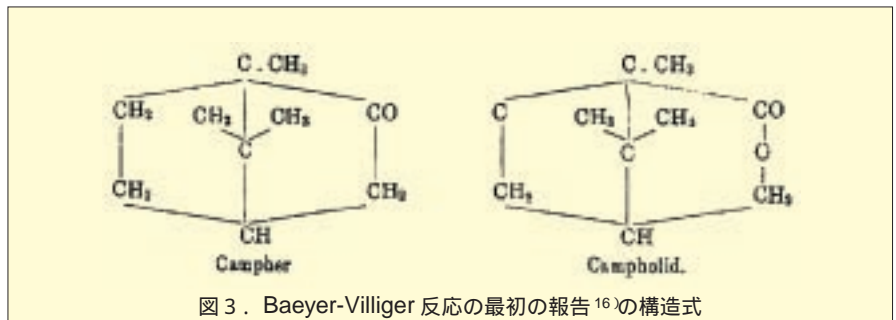


写真2. A. Baeyer

Baeyer-Villiger 酸化反応見つかる

ケトンをペルオキシ酢酸などの過酸で酸化すると、酸化と同時に転位反応が起こって、カルボン酸エステルを生成することをA. BaeyerとV. Villigerがこの年に発見した¹⁶⁾。したがってこの反応はBaeyer-Villiger反応またはBaeyer-Villiger転位と呼ばれる。

酸素原子への転位はメチル基よりかさ高いアルキル基やアリール基の方が起こりやすいので、メチルケトンからは酢酸エステルが生成する。また環状ケトンからはこの反応でラクトンが得られる。BaeyerとVilligerは最初この反応の酸化剤にCaro酸すなわちペルオキシ-硫酸 H_2SO_5 を用い、メントンから ϵ -ラクトン、カンファーからカンフォリドを得た^{16,17)}(図3)。



写真3. P. Sabatier

副腎血圧上昇物質のエピネフリンの存在報告さる

副腎エキスには強心作用、止血作用があるので、1800年代中頃から治療薬としての期待が高まり、多くの研究者によってその研究が行われ、有効成分の分離が試みられた。1899年に至って、米国のジョーンズ-ホプキンス大学のJ. J. Abelがはじめて副腎の血圧刺激物質としてエピネフリン epinephrin と称する物質を分離した²⁰⁾。その時に報告された分子式は $C_{17}H_{15}NO_4$ で、純粋な物質といえるものではなかった。

1901年になって高峰讓吉によって結晶として単離された同じ作用物質はアドレナリンと命名されて、その分子式は $C_9H_{13}NO_3$ であった²¹⁾。

還元ニッケル触媒を用いた硬化油の製造

炭素炭素二重結合を持つ有機化合物はニッケル粉末触媒存在下に気相で250-300℃で容易に還元飽和されることがフランスのP. SabatierとJ. B. Senderensによって見いだされ、この方法で不飽和脂肪の油から硬化油が製造されることになった^{18,19)}。Sabatierはこの仕事によって、1912年にノーベル賞を受賞した。

解熱剤アスピリン発売さる

18世紀のはじめにイギリス人 E. Stone はマラリアの高熱で苦しむ人々に柳の樹皮を煎じて飲ませてその苦しみを救った。この柳の解熱作用は成分のサリチル酸によることがわかった。因みにサリチル酸 salicylic acid の名は柳のラテン名 salix に由来する。しかしサリチル酸自身には副作用があってそのまま薬剤にはならなかった。

1897年に F. Hoffmann がサリチル酸と無水酢酸からアセチルサリチル酸を合成した。その翌々年の 1899 年になって、この化合物の薬剤作用を H. Dresser²²⁾と J. Wohlgemuth²³⁾が臨床的に調べて、副作用の少ない、すぐれた鎮痛、解熱作用があることを明らかにした。同年にさらに K. Witthauer はザールのハレの看護婦病院でその臨床結果を確認した²⁴⁾。それによってアセチルサリチル酸はアスピリン aspirin の名で Bayer 社から市販されることになった²⁵⁾。

サリチル酸の古名は、それがとれるセイヨウナツユキソウ *Spiraea ulmaria* の名からスピラエ酸 spiraeic acid と呼ばれていた。ここに得たアセチルサリチル酸は天然物ではない純化学的に作ったものであるという意味で spirae に否定詞 a をつけて aspirin と名づけられた。このアスピリンは錠剤として市場に売り出された最初の薬剤であった。

水素がはじめて固化される

前年の 1898 年に水素の液化に成功したイギリスの J. Dewar は翌 1899 年に固体水素を作り出し、低温到達記録を 14K まで下げて、絶対零度に向けての一步を進めた。このことによりこれまで知られていたすべての物質はヘリウムを除いてすべて固体となることがわかった。

化学の巨匠相次いで逝く

Friedel-Crafts 反応を見つけたフランスの化学者 Charles Friedel が 1899 年 4 月 20 日にフランスのモンパンで亡くなった。

ジエチル亜鉛を発見し、有機金属化学の道を開き、また太陽スペクトル中にヘリウムを見つけたイギリスの化学者 Sir Edward Frankland も 8 月 9 日にノルウェーのゴラアで死去した。

ドイツの化学者で分光分析学を完成させ、セシウムやルビジウムの新元素を発見するとともにブンゼンバーナーの発明で知られる Robert Wilhelm Bunsen がこの年 8 月 16 日にハイデルベルグで逝去した。墓はハイデルベルグ南墓地にある(写真 4)。

わが国で初めての薬学博士 4 名誕生

わが国薬学の先覚者で、麻黄の成分エフェドリンの発見で有名な長井長義、フグ毒テトロドキシンの研究で知られる田原良純、東京大学医学部薬学科教授で、日本薬学会設立にも貢献した下山順一郎、丹波敬三の 4 名が明治 32 年(1899)に東京大学総長推薦によって、わが国最初の薬学博士となった。長井はそれより前、明治 14 年(1881)に留学先のベルリン大学よりドクトル・デル・フィロゾフィーの学位を既に得ていた。

なおこの同じ年、タカジアスターゼ、アドレナリンの研究で有名な滞米中の高峰讓吉もわが国の工学博士の学位を受けている。

P. Sabatier の切手を提供頂いた伊藤良一氏に感謝申し上げます。

{ 参考文献 }

- 1) Rutherford, E. : *Phil. Mag.*, 47, 109 (1899).
- 2) Giesel, F. : *Ann. Physik.*, 69, 834 (1899).
- 3) Becquerel, H. : *Compt. Rend.*, 129,



写真 4 . R. W. Bunsen

- 996 (1899).
- 4) Villard, P. : *Compt. Rend.*, 130, 1010, 1178 (1900).
- 5) Debierne, A. : *Compt. Rend.*, 129, 593 (1899).
- 6) Debierne, A. : *Compt. Rend.*, 130, 906 (1900).
- 7) Giesel, F. : *Ber.*, 35, 3608 (1902).
- 8) Giesel, F. : *Ber.*, 37, 1696, 3963 (1904).
- 9) Hahn, O. : *Physik. Z.*, 7, 557 (1906).
- 10) Tiele, J. : *Ann. Chem.*, 306, 87 (1899).
- 11) Tiele, J. : *Ann. Chem.*, 319, 129 (1901).
- 12) Tiele, J. : *Ann. Chem.*, 311, 241 (1900).
- 13) Tiele, J. : *Ann. Chem.*, 306, 129 (1899).
- 14) Wagner, G., Brickner, W. : *Ber.*, 32, 2302 (1899).
- 15) Meerwein, H. : *Ann. Chem.*, 396, 200 (1913).
- 16) Baeyer, A., Villiger, V. : *Ber.*, 32, 3625 (1899).
- 17) Baeyer, A., Villiger, V. : *Ber.*, 33, 858 (1900).
- 18) Sabatier, P., Senderens, J. B. : *Compt. Rend.*, 128, 1173 (1899).
- 19) Sabatier, P., Senderens, J. B. : *Compt. Rend.*, 132, 1254 (1901).
- 20) Abel, J. J. : *Z. Physiol. Chem.*, 28, 318 (1899).
- 21) Takamine, J. : *J. Soc. Chem. Ind.*, 20, 746 (1901).
- 22) Dresser, H. : *Arch. Ges. Physiol. (Pflüger)*, 76, 306 (1899).
- 23) Wohlgemuth, J. : *Therap. Monatsch.*, 13, 276 (1899).
- 24) Witthauer, K. : *Heilkunde*, 3, 396 (1899).
- 25) Hoffmann, F. : US-P. 644 077 (1898/1900).

住友精密工業株式会社

環境ホルモン測定用試薬

フタル酸エステル類測定用水

近年、外因性内分泌攪乱化学物質(環境ホルモン)の問題が世界的に注目されています。環境ホルモンは、人間のホルモンシステムに作用し、生殖障害・悪性腫瘍等を引き起こす影響があり、人間に世代を超えた深刻な影響を与える可能性が有ります。今回、フタル酸エステル類の測定用にフタル酸エステル類を極限まで低減した水を発売しました。

また、農薬類測定用水、Pops類(ダイオキシン類等)測定用水も製品化を予定しておりますのでお問い合わせ下さい。



〔規格値〕

分析項目	規格値 (ng/l)	分析項目	規格値 (ng/l)
4- オクチルフェノール	100	フタル酸ジシクロヘキシル	50
ノニルフェノール	50	フタル酸ジエチル	50
フタル酸ジ-2- エチルヘキシル	100	オクタクロロスチレン	50
フタル酸ブチルベンゼン	50	フタル酸ジペンテル	50
フタル酸ジ-n- ブチル	100	フタル酸ジヘキシル	50
アジピン酸ジ-2- エチルヘキシル	100	フタル酸ジプロピル	50
ビスフェノール A	50	スチレンの 2 or 3 量体	50

〔用途〕

試料からのフタル酸エステル類の抽出溶媒として
固相抽出カラムの洗浄
器具の洗浄
空試験用の水

キャンペーン期間：平成 11 年 1 月 7 日～ 4 月 6 日

フタル酸エステル類測定用水を通常の半額で提供します。この機会に是非お試しください。

コード No.	メーカーコード	品 名	容 量	希望納入価格 (円)	キャンペーン価格 (円)
301-06841	EH001	フタル酸エステル類測定用水	300ml × 6	12,000	6,000



クマモト抗体研究所

コイ ビテロジェニン ELISA キット

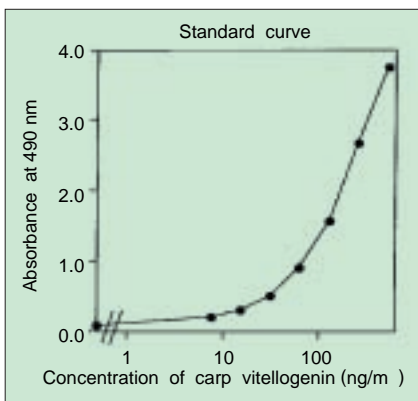
ビテロジェニン(Vg)は産卵期のメスの血中で増加する卵黄前駆体で、本来オスには有りません。しかしオスにエストロジェン処理を行うと、Vgの産生が認められます。このことから、近年、河川などの環境水中にある内分泌攪乱物質のバイオマーカーとして注目されています。

本キットは、コイ Vg に特異的な 2 つの抗体を用いたサンドイッチ ELISA 法に基づいており、血清中のコイ Vg を定量することができます。

〔測定原理〕

キットのマイクロプレートには抗コイ Vg 抗体がコートされており、検体及び標準液中のコイ Vg を捕獲します。さらに HRP 標識抗コイ Vg 抗体を反応させると、ウエル上に固定化抗体 抗原 抗体のサンドイッチ型複合体が形成されます。抗体により捕獲されたコイ Vg は、HRP により触媒される発色反応により定量されます。

〔標準曲線〕



〔測定範囲〕

7.8 ~ 500ng/ml

〔保存条件〕

2 ~ 8

〔キット内容〕

- | | |
|------------------------------|--------|
| (1) 抗体固定化マイクロプレート | 1 枚 |
| (2) コイ Vg 標準品 | 2 本 |
| (3) 検体希釈液 | 30ml |
| (4) HRP 標識抗コイ Vg 抗体(× 100) | 0.15ml |
| (5) 基質液 | 16ml |
| (6) OPD(オルトフェニレンジアミン)錠 | 2 錠 |
| (7) 濃縮洗浄液(× 20) | 20ml |
| (8) 反応停止液 | 6ml |

コード No.	メーカーコード	品 名	容 量	希望納入価格 (円)
303-06161	KH003	コイ ビテロジェニン ELISA キット	96 回用	90,000

〔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)
300-06811	KH004	コイ ビテロジェニン モノクローナル抗体(IG2)	100µg	40,000
304-06831	KH005	マミチヨグ ビテロジェニン モノクローナル抗体(3E11)	100µg	40,000
307-06821	KH007	マダイ ビテロジェニン モノクローナル抗体(5A4)	100µg	40,000
-	KH006	メダカ ビテロジェニン モノクローナル抗体	100µg	40,000

改正変異原性試験について（その2：染色体異常試験）

- 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

サルモネラ菌を用いた変異原性試験とともに、化学物質のがん原性を効率よく検出するため、ほ乳類培養細胞を用いた染色体異常試験が広く用いられている。

我が国では、昭和40年代に生じたPCBによる環境汚染問題を契機に、世界に先駆けて化学物質の安全性確保を目的として「化学物質の審査及び製造の規制に関する法律（化審法）」が制定された（1973年10月）。しかし、諸外国の情勢に対応するため1986年12月に化審法を改正し、スクリーニング毒性試験項目として「ほ乳類を用いる28日間の反復投与毒性試験並びに細菌を用いる復帰突然変異試験及びほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験による変異原性試験」が定められ、その試験方法が公表された。これにより、国内の製造および輸入の総量が1トン以上の物質で、難分解、低蓄積性の物質について指定化学物質に該当するか否かを判定するためにスクリーニング試験が実施されることになった。

一方、1983年にOECD（経済協力開発機構）のテストガイドラインが公表されて以来、欧米ではこのガイドラインにより試験が行われて来たが、1997年6月に国際的なハーモナイゼーションの観点から大きな改訂がなされた。我が国でもこの動きを尊重した上で、労働省、厚生省、通商産業省、環境庁、農林水産省等が報告書の様式の統一化に向けて調整がなされてきた。

その結果、労働省では1997年9月29日に告示され（基発652号）、1998年4月1日より実施された。また、化審法では、1997年10月31日に局長通達が出され、1998年4月1日より実施

された。

ここでは、*in vitro* 染色体異常試験について改正点や注意点を述べることにする。

ほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験

1. 染色体異常試験の種類について

In vitro 染色体異常試験は、短時間処理法、連続処理法および細胞増殖抑制試験がある。このうち、細胞増殖抑制試験は、前2者の試験を実施するにあたり、試験に用いる被験物質の用量範囲を設定するための試験である。細胞の増殖抑制およびその他の細胞毒性を指標とする。

これ以外に、試験結果が疑陽性に出た場合に確認試験を行う必要がある。また、陽性結果が被験物質のpH等により影響を受けたことが危惧される場合には、適切な処理をした上で行う追加試験がある。

今回の改訂での大きな特徴は、短時間処理法で試験結果が明らかに陰性の場合には連続処理試験を実施しなけなければならないが、陽性の場合には、連続処理試験を省略することができることである。

2. 使用細胞株について

チャイニーズ・ハムスター肺由来の線維芽細胞（CHL/IU細胞）、ヒト末梢血リンパ球またはその他のほ乳類培養細胞の初代、継代若しくは株細胞を用いる。

但し、我が国では、これまでの実績と扱い易さから、CHL/IU細胞を用いることが望ましい。ガイドラインもこの細胞株を用いた場合について記述されている。

3. 被験物質の用量・用量段階について

1 細胞増殖抑制試験

本試験を実施するに当たり、用量範囲を設定するための試験で、直径60mmのプレート（培養液は5ml）に約 4×10^3 個/mlの細胞を播種する。プレート数は各用量につき1枚以上を用いる。

被験物質の細胞に対する毒性が不明の場合には最高用量を5mg/mlまたは10mMのいずれか低い用量とし、原則として公比2で6段階以上の用量を選定する。

細胞増殖抑制試験で得られた50%以上の細胞増殖抑制用量を最高用量として、原則として公比1.5～2で、3段階以上の用量を選定する。細胞毒性が認められない場合には、5mg/mlまたは10mMのいずれか低い用量を最高用量とし、以下の短時間処理試験および連続処理試験を実施する。

2 短時間処理試験

直径60mmのプレート（培養液は5ml）に約 4×10^3 個/mlの細胞を播種するが、培養開始から被験物質の処理までの時間を変更するときはそれに併せて播種細胞数を調整する。原則としてプレート数は各用量ごとに2枚以上を用いる。

代謝活性化を用いる場合と用いない場合について行うことはこれまで通りである。

3 連続処理試験

OECDのテストガイドラインでは24時間でよく、必要に応じて48時間処理を行うとある。また、倍数体の観察についても参考程度で我が国と若干異なる。しかし、我が国ではこれまでの実績から、倍数体を観察することが必要であり、48時間処理も行うことが

望ましい。また、24 時間処理と 48 時間処理とで D_{20} 値が変わってくることも考えられる。これは被験物質の染色体異常のリスクを低く評価する危険性につながる。

4. 被験物質溶解溶媒の選択について
被験物質の性状により次のような選択をする。

- (1) 水溶性で、水に安定ならば滅菌生理食塩水とする。
- (2) 水に難溶、DMSO に可溶で安定な物質の場合には DMSO に溶解させる。
- (3) 水や DMSO に難溶の場合には、1% カルボキシメチルセルロース・ナトリウム溶液の懸濁とする。培養液そのものを溶媒とすることもできる。

5. 対照物質について

試験技術の正確さや用いた細胞の安定性を保証する意味で毎試験ごとに陰性対照と陽性対照を置く必要がある。

陰性対照は原則として溶媒対照とするが、特殊な溶媒を用いたときは、溶媒をいれないものを置くこともある。

陽性対照は代謝活性化を加えない場合と加えた場合とで指定された物質を用いる。染色体異常出現率が 20 ~ 40% になる濃度がよい。

6. 染色体異常の観察について

各用量当たり、よく拡がった分裂中期細胞 200 個 (各プレート当たり 100 個) 以上を、顕微鏡下 600 ~ 1000 倍で観察する。ノーカバーレンズを用いると便利である。

構造異常は表 1 に示す分類に従い、いずれかの異常を 1 個以上持つ細胞を異常細胞 1 個として記録するとともに、異常の種類を記録する。また、染色体数が倍加している細胞 (倍数体や核内倍加) が出現した場合にはその出現率を記録する。

表 1. 構造異常の分類

- 染色体型切断 (chromatid break : ctb)
- 染色体型交換 (chromatid exchange : cte)
- 染色体型切断 (chromosome break : csb)
- 染色体型交換 (chromosome exchange : cse)
- その他の異常 (断片化など) (others)

注：染色体幅以下の非染色性部位をギャップとし、別途記録するが、構造異常には含めない。

表 2. 染色体の構造異常および数的異常の判定基準

異常細胞の出現率 (%)	判定基準
5% 未満	陰 性
5% 以上 10% 未満	疑陽性
10% 以上	陽 性

注：CHL/IU 細胞を用いた試験で、これまでの蓄積データを基にした場合の基準である。

7. 結果の評価について

試験が適切に実施されて得られた結果が評価の対象となる。

被験物質処理群の値が陰性対照値と比較して明らかに上昇し、かつ、用量依存性が認められれば陽性と判定する。総数にはギャップのみを持つ細胞の出現率を除く。CHL/IU 細胞を用いた試験での判定基準は表 2 に示す。統計学的解析は必要としない。

単一用量で陽性となった場合でも、その再現性が確認されれば (確認試験) 総合的に陽性と判断する。特に疑陽性や用量依存性が認められなかった場合には確認試験を実施する。しかし、短時間処理や連続処理試験で明らかに陰性または陽性の結果が得られれば確認試験の必要性はない。

また、被験物質により pH が著しく影響を受け、陽性結果 (false positive) を

示すことがある。この場合には適切な方法で中和した後に追加試験を実施する必要がある。

定量的評価のためには、陽性結果が得られた場合に、用量依存性から、構造異常を持つ細胞または数的異常を持つ細胞が 20% 出現する推定被験物質濃度 (D_{20} 値) を求め、mg/ml として記述する。

8. 報告書の様式

試験結果報告書に関しては、今回 OECD とのハーモナイゼーションによる見直しで、これまでと様式がだいぶ変わっているが、省庁間による相違はない。Ames 試験による試験結果報告書と整合性を取った部分もある。

9. 物性を考慮した試験の実施

被験物質は固体・液体・気体で大別

される。Ames 試験の場合と同様に、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蒸気圧の異なる物質があり、37 の試験条件下で被験物質が細胞と十分な時間接触しているかどうかが重要であり、物性を考慮した試験方法を選択することが必要である。特に培養細胞の場合には、気層と液層が交互に入れ替わる回転

式曝露方法が最適である。

また、培養液と接触すると析出する被験物質がある。培養細胞には貪食能(phagocytosis)があることから、析出した濃度に関しても試験範囲とすることが望ましい。

おわりに

Ames 試験に比較すると染色体異常試験は時間がかかるだけでなく、高度の技術と熟練が要求される。

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。昨年は 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。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。

尚、この原稿は、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。

New Products



日局充てん試験対応

ソイビーン・カゼイン・ダイジェスト培地「ダイゴ」

—メンブランフィルターろ過性能 Up・ 線照射済み—

医薬品・食品の充てんラインチェックを定期的実施する方、粉末培地の滅菌にお困りの方、また培地のメンブランフィルターろ過でお困りの方に、「メンブランフィルターろ過性能を Up」し、「 γ 線を照射」した「日局充てん試験対応、ソイビーン・カゼイン・ダイジェスト培地」をご用意しました。

特長

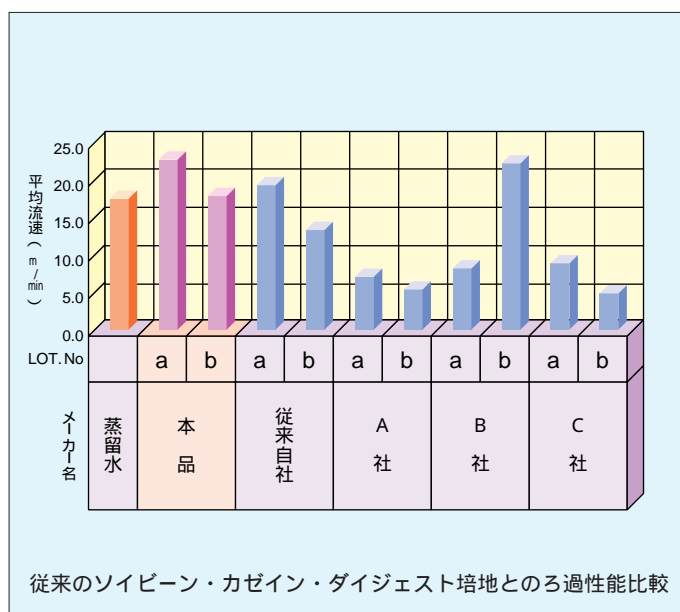
- ・メンブランフィルターろ過性能は、メンブランフィルター 1cm² 当たり 100ml までろ過したときの平均流速が、(本培地を調製した) 水に対して 70% 以上の流速を保証しています。
- ・ γ 線は 20kGy を照射しています。照射による培地性能の低下はありません。

従来の SCD 培地に較べて、照射による特異な臭いがあります。

(ガンマ線照射線量の単位は、kGy(キログレイ)とい、従来の rad(ラド)との関係は、10kGy=1M(メガ)rad となります。

放射線滅菌の場合の指標菌 *B.pumilus* ATCC27142 の D 値はドライタイプで 1.8 ~ 2.0kGy です。

- ・「培地性能試験記録」を添付しています。
- ・従来のソイビーン・カゼイン・ダイジェスト培地「ダイゴ」と組成・性能は同じです。



コード No.	品名	容量	希望納入価格(円)
397-20061	日局充てん試験対応 ソイビーン・カゼイン・ダイジェスト培地「ダイゴ」	600g	9,500

核酸蛍光染色剤を用いた新しい細胞増殖及び、細胞生存率測定法(FACLS 法)

石原産業株式会社 中央研究所 医薬研究開発グループ 加藤 文法

1.はじめに

医薬品、農薬、化粧品、食品などの製品開発分野、医学、薬学、生物学上の研究分野、及び臨床的な検査・診断分野などの幅広い分野に渡って、細胞毒性を簡便かつ迅速にしかも正確に測定する方法は、利用価値が高く、MTT 法¹⁾をはじめ種々の方法が考案され実用化されてきている。しかしながら、既に実用化されたこれらの方法においても改善されるべき点はいくつか残されている。既存法の共通の問題点として、大量の検体の細胞毒性をマイクロプレートを使用して試験する際、プレート毎に良い細胞培養条件下で測定されたかどうかを客観的数値によりバリデーションすることが困難な点が挙げられる。できたとしても面倒な操作を別に付加しなければならない。現状ではこれをカバーするため、試験者は顕微鏡下で細胞状態を観察し、良否を経験的(主観的)に判断するのが一般的であろうと予想される。更に今日では、コンビナトリアルケミストリーを応用して大量に化合物が合成される時代となり、これに充分対応しうる測定系の開発が要求されるようになってきている。

今回、核酸蛍光染色剤と細胞膜損傷剤とを組み合わせることで、このバリデーションの問題を解決し、さらに簡便かつ迅速に、多検体の試料中の細胞増殖並びに、細胞生存率を測定できる新たな試験方法 (FACLS 法 , Fluorometric Assay based on Cell Lysis & Staining method) の確立を試みた^{2,3)}。

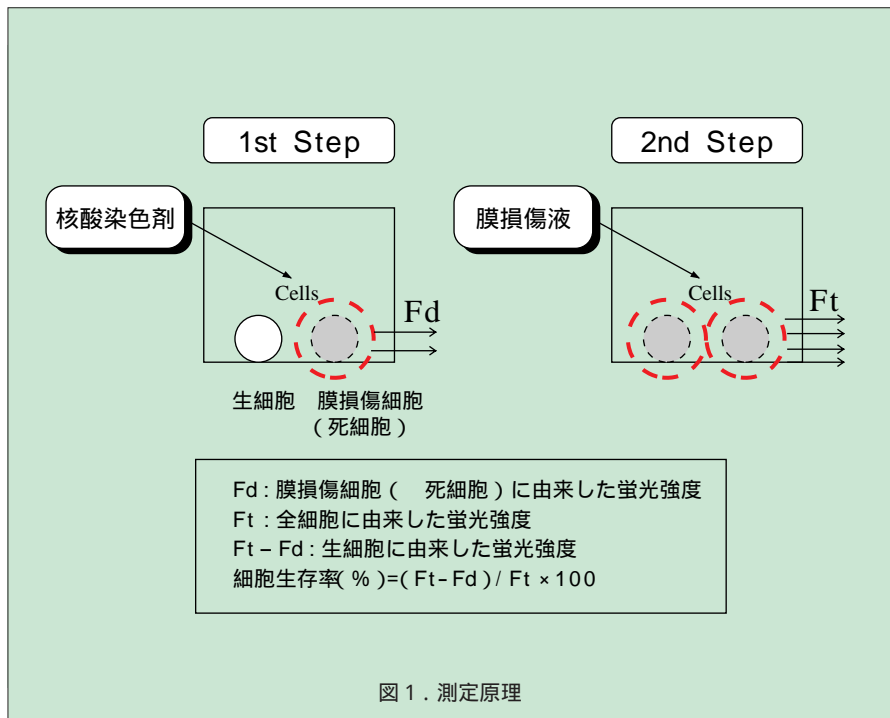


図 1. 測定原理

本測定法の原理と特徴

1. 測定原理 (図 1 参照、基本的に 2 ステップで操作が完了)

ここで使用する核酸染色剤は、核酸と結合していない状態では蛍光強度は 0 付近で、核酸と結合することにより蛍光強度が 100 ~ 1000 倍増強する。又、蛍光強度が長時間安定で、プロピジウムなどより励起定数が一桁上である。本剤は、生細胞に対しては膜透過性を示さず、細胞膜に障害のある死細胞の核酸と結合して蛍光を発する。

1) 死細胞数の定量

生細胞及び死細胞が共存する測定系に、死細胞のみを通過する性質を持つ核酸蛍光染色剤を作用させ、その蛍光強度を蛍光測定計で測定し、まず死細胞数を定量する。

2) 全細胞数の定量

引き続き同一の系に細胞膜損傷剤を作用させ、生細胞の膜を傷害するこ

とによって測定系に存在する全細胞数を蛍光測定計で定量する。

3) 生細胞数の定量

全細胞数に相当する蛍光強度と死細胞数に相当する蛍光強度の差から生細胞数に相当する蛍光強度を算出する。

4) 細胞生存率

生細胞数に相当する蛍光強度を全細胞数に相当する蛍光強度で割ることにより算出する。

2. 特徴

1) 室温にて簡便で迅速な測定が可能 (5 分程度) 。

インキュベーション、セルハーベスト、遠心操作、色素洗浄、色素溶解など面倒な操作が不要。基本的に 2 ステップで操作が完了。

2) マイクロプレート上の多検体の生細胞数、及び細胞生存率を同時に測定できる。

各プレート毎に培養条件を客観的

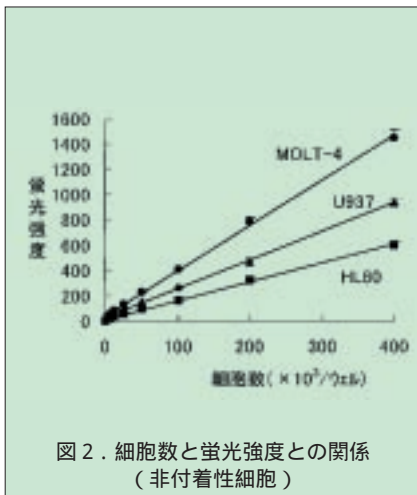


図2．細胞数と蛍光強度との関係
(非付着性細胞)

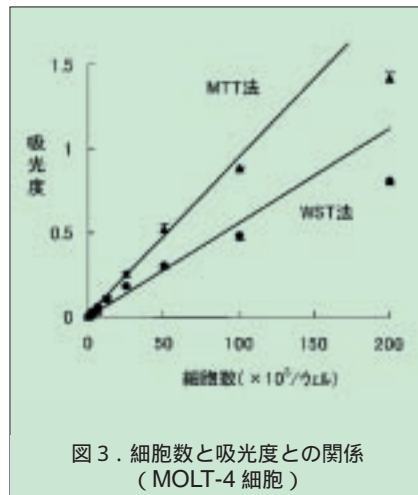


図3．細胞数と吸光度との関係
(MOLT-4細胞)

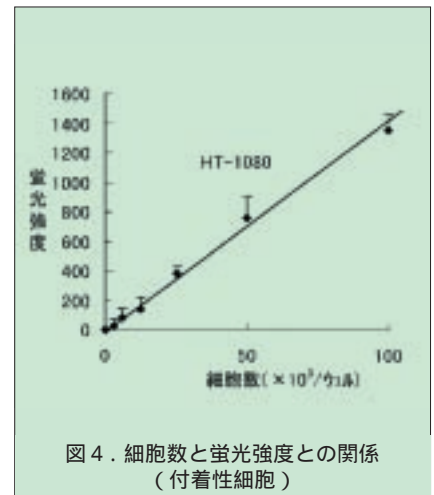


図4．細胞数と蛍光強度との関係
(付着性細胞)

- にバリデート(数値化)することができる。
- 3) 浮遊細胞、接着細胞どちらも測定可能。
- 4) 酵素反応を利用しないため、薬剤によるpHの変動、インキュベーション温度、反応時間、血清中酵素等の影響を受けにくい。
- 5) 有機溶媒、放射性元素を使用しないので取扱い操作がより安全で廃棄が容易。
- 6) 測定原理、操作が簡単であり完全自動化への対応が容易。

応用例

1. 付着性、非付着性細胞における細胞数測定の定量性について
非付着性のMOLT-4細胞について96ウェルマイクロプレートを用いその定量性を検討した結果、 $3 \times 10^3 \sim 4 \times 10^5$ 個/ウェルの範囲の細胞数において蛍光強度との間で直線性が見られた(図2)。これを既存の細胞数測定法であるMTT法⁴⁾やWST法⁵⁾と比較すると(図3)、本法は定量性の範囲がより広くなっており、これまでの方法よりも細胞数等の条件設定が容易であると考えられる。その他の非付着性細胞であるU937、HL60においても、それぞれ細胞種毎に蛍光強度は異なるが、MOLT-4同様に細胞数と蛍光強度と

の間で直線関係が認められた(図2)。一方、付着性細胞HT-1080では $3 \times 10^3 \sim 1 \times 10^5$ 個/ウェルの範囲の細胞数において直線性が見られた(図4)。これら非付着性細胞ではウェルあたり 2×10^5 個程度で、又、付着性細胞では、 1×10^5 個以下でコンフルエントな状態となる。従って、本法は、付着性、非付着性どちらのタイプの細胞に対しても、一般的な培養試験系においては充分測定に耐えうる定量性の範囲を有しているものと思われる。

2. 細胞生存率測定について

- Trypan blue 法⁶⁾との比較 -
- 良好な条件下(適宜培地交換)と悪

い条件下(培地交換しない)で培養した細胞(MOLT-4)を用いて、それぞれの細胞生存率を測定した。その結果、どちらの培養条件下においても、既存の細胞生存率測定法であるTrypan blue法とほぼ同様の結果が得られた(表1)。従って、本法は細胞培養条件が良好であるか否かを既存法とほぼ同様の感度でチェックできることが確認された。一般的にTrypan blue法では、試験系からその一部をスライドグラスに移し、これを顕微鏡下でさらに限定された視野の中の細胞について試験者が肉眼で生死(細胞内色素取込み)を経験的に判断(カウント)することによって測定される。一方、本法

培養条件	本法	Trypan blue法
適宜培地交換	99.1%	98.3%
培地交換なし	88.5%	84.8%

処理時間(秒)	細胞生存率(%)
0	99.1
15	86.7
60	57.6

においては、試験系全体を反映した客観的数値として測定結果を示すことができる。又、大量のサンプルをまとめて迅速に処理できる点でも優れている。さらに本法のもう一つの利点としては機械的(物理的)損傷にも対応が可能なことである。その例として、超音波処理を時間を変えて細胞に施した後、それぞれの生存率を本法にて測定すると、処理時間に依存して細胞傷害を受けていること(細胞生存率低下)が確認された(表2)。Trypan blue 法では、死細胞が細胞としての形を留めないこの種の傷害に対して原理的にも測定することは不可能である。

3. 薬剤の細胞傷害性についての評価 - MTT 法との比較 -

代表的な抗癌剤の一つであるマイトマイシン C(MMC)は MOLT-4 細胞に対して細胞傷害性を示す。本剤の活性評価を本法と既存の細胞数測定法である MTT 法との間で比較検討した。

1) 迅速性、簡便性

表3に示すように、本法では飛躍的な測定時間の短縮が可能となった(1プレートあたり約5分)。MTT法(トータル約3時間20分)と比べると、その

表3. 薬剤による細胞傷害性の検討(MTT法との比較)

方法(MOLT-4細胞に対するマイトマイシンCの作用の例)

96穴マイクロプレート

薬剤希釈液添加(400 μ g/mlより公比1:10で段階希釈) 50 μ l/well
細胞懸濁液添加 3×10^4 cells/150 μ l/well
37、2日間培養

細胞傷害性測定

本 法		MTT 法	
核酸蛍光染色剤添加 10 μ l/well	1分	遠心分離、2000rpm	5分
プレートミキサー攪拌	30秒	上清除去	2分
蛍光測定(Fd)	30秒	MTT試薬(0.04%)100 μ l/well添加	1分
細胞膜損傷剤 10 μ l/well	1分	37、5%CO ₂ 培養	3時間
プレートミキサー攪拌	30秒	PBS 100 μ l/well添加	1分
蛍光測定(Ft)	30秒	遠心分離、2000rpm	5分
		上清除去	2分
		DMSO(100%) 100 μ l/well添加	1分
		プレートミキサー攪拌	5分
		吸光度測定	30秒
合計所要時間	約5分	合計所要時間	約3時間20分
(蛍光リーダーの機種により異なる)			

最初のステップである遠心操作の間に、本法では全ての測定操作が完了する。操作性の面でも遠心分離や洗浄操作、インキュベーション等が不要であり簡便性が大幅に増している。

2) 細胞傷害性(薬効・毒性)評価

MMCの抗腫瘍活性を MTT 法と本

法で検討した結果、IC₅₀値が MTT 法では5.5 μ g/ml、本法では2.2 μ g/mlと数値的にほぼ同じオーダーとなった(表4)。ここで両者には2倍程度の差があるが、これは恐らく測定原理の違いに起因するものと考えられる。即ち、MTT法は細胞のミトコンドリア内の脱

表4. マイトマイシンCの抗腫瘍活性の評価 - MTT法との比較

方法	評価項目	マイトマイシンC処理濃度(μ g/ml)						IC ₅₀ (μ g/ml)
		0	0.01	0.1	1	10	100	
本法	死細胞数(Fd)	1.3	- 2.0	- 2.3	- 5.3	5.7	18.7	
	全細胞数(Ft)	327.3	247.7	246.3	201.3	87.7	32.3	
	生細胞数(Ft - Fd)	<u>326.0</u>	249.7	248.6	206.6	82.0	13.6	
	細胞生存率(%)*	99.6	100.8	100.9	102.6	93.5	42.1	
	%コントロール**	100.0	76.6	76.3	63.4	25.2	4.2	2.4
MTT法	生細胞数(吸光度)	<u>1.228</u>	1.221	1.468	1.165	0.420	0.032	
	%コントロール**	100.0	99.4	119.5	94.9	34.2	2.6	5.5

表中の細胞数は、蛍光強度或いは、吸光度における相対値として表示

* : 細胞生存率(%) = (Ft - Fd) / Ft × 100

** : %コントロールは、下線値をそれぞれ100として計算

水素酵素活性を利用した方法であり、細胞膜がある程度壊れていても、酵素活性が残存していれば生細胞として評価される系である。一方、本法は細胞膜破壊を指標としており、細胞死に至る過程で、ある程度の損傷が細胞膜に加われば、死細胞として検出される系である。この測定原理の違いが、両者のIC₅₀値の差を反映していると予想される。どんな測定系を採用するにせよ、それぞれの測定原理を十分認識した上で結果を解釈し、薬剤の作用性を評価する必要があると思われる。

3 細胞生存率の評価及び、培養条件のバリデーション

本法では生細胞数と生存率の測定が、遠心操作や培養上清のプレート間移し替えなどの面倒な操作をすることなくほぼ同時にできる。従って、1回の実験から得られる情報が増え、薬剤の効果を多面的に評価できる。表4でのMMCの測定結果を例にすると、本剤では1 μ g/mlの低濃度では細胞増殖抑制作用のみである(生細胞数は63.4%に減少しているが、生存率はほぼ100%である)が、高濃度になるに従い細胞傷害作用が強くなっている(100 μ g/mlの濃度では、生細胞数は4.2%に、生存率は42.3%まで減少している)ことが判定できる。一方、MTT法では単独では生細胞数に対応したデータのみで生存率に関しては情報が得られない。MTT法が改良されたXTT法やWST法では操作面で簡便性が増しているが、測定原理はほぼ同じであり、生存率が評価できないことは同様である。

本法のこのような利点は、薬効(毒性)評価系が細胞状態の良好な条件下で行われていたか否かを客観的数値(生存率)として確認するバリデーションにも応用できる。表4の例では、薬剤無処理群の生存率が99.6%であり、本試験系は良好な培養条件下で評価されたものと判断される。一般的には、プレート毎にこのような薬剤無処

理群を設置するのが普通であるので、同様にすれば特別な操作を付加することなく、各プレート毎にバリデーションを行うことが可能となる。

4. 完全自動化への対応について

放射性同位元素を使用しない方法として、これまでMTT法、WST法、遊離LDH測定法⁷⁾、クリスタルバイオレット染色法⁸⁾、ニュートラルレッド取込み法⁹⁾、Calcein AM法¹⁰⁾など種々の測定法が考案、改良されてきた。しかしながら、これら既存の方法においても37インキュベーション、遠心操作、洗浄、色素抽出など、いずれかの操作を加える必要がある。そのため完全自動化ができないか或いは、できたとしても特別な装置を必要とし、測定システム全体が複雑となり、高価なものになってしまう。

一方、本法においては、これらの操作を必要とせず、有機溶媒も使用しないので取扱いが非常に簡便であり、蛍光測定装置の小規模な改良により完全自動化への対応が可能であると思われる。

IV. 本法の問題点について

本法の測定原理に由来して、次のような問題点がある、或いは考えられる。

1. 原理的には核酸を定量する方法であり、測定系に核酸が混在すると干渉を受ける。
含量によっては、バックグラウンド補正で測定可能。
2. 本法の蛍光測定で使用する励起波長、測定波長付近に吸収を持つ薬剤により干渉を受ける。
吸収性の程度によっては、バックグラウンド補正で測定可能。
3. 蛍光測定装置側の測定方式、光学系の特徴等により、バックグラウンドが高くなり測定が困難となる場合がある。一方、本法と蛍光測定

装置がうまくマッチしていれば、細胞数が千個以下のオーダーまで定量性があることが確認されている。

V. おわりに

今回、核酸蛍光染色剤と細胞膜損傷剤とを組み合わせる用いることにより、多検体試料中の生細胞数と細胞生存率とを同時に簡便かつ迅速に測定できる新たな試験方法(FACLS法)を紹介した。小規模な試験への利便性はもちろんであるが、この方法を採用することにより、既存の方法では困難であった試験系のバリデーションを含めた完全自動化測定への対応が容易になると思われる。本法が医薬品、化粧品、農薬をはじめ、多分野にわたる動物実験代替法試験に応用され、又、それらの研究・開発の発展の一助となることを期待したい。

[参考文献]

- 1) Mossman T. J.: Immunol. Methods 65, 55-63. (1983)
- 2) 加藤文枝ら：第10回日本動物実験代替法学会 P-17
- 3) Kato F. et al : Toxicol. in Vitro, in press
- 4) Carmichael J et al: Cancer Reserch 47, 936-942 (1987)
- 5) Ishiyama M. et al: Chem. Pharm. Bull. 41, 1118-1122 (1993)
- 6) 今井勝行ら：細胞免疫実験操作法(理工学社)15-16
- 7) Sasaki T et al: Toxicol. in Vitro 6, 451-457 (1992)
- 8) Saotome K et al: Toxicol. in Vitro 3, 317-321 (1989)
- 9) Borenfreund E et al: Toxicol. Lett. 24, 119-124 (1985)
- 10) Morris S.J. et al: Bio Techniques 8, 296 (1990)

死細胞、全細胞数及び細胞生存率を測定する 蛍光試薬を用いた高感度細胞毒性測定試薬セット

Cytotoxic Fluoro-test wako (FACLS method)

本試薬は、Fluorometric Assay based on Cell Lysis & Staining method (FACLS 法)を用いた、死細胞、全細胞数及び細胞生存率を測定するキットです。測定には核酸蛍光染色剤と細胞溶解剤とを組合せて使用します。この核酸蛍光染色剤は、細胞膜に障害を受けた死細胞の膜を通過して核酸と反応することにより蛍光を発生し、生細胞に対しては膜透過性を示さない特長があります。この性質を利用した蛍光測定により、高感度測定が可能となります。また付着、浮遊細胞ともに使用可能です。

従って、下記の様な項目の測定に有効です。

- ・ 細胞毒性測定試験
- ・ 細胞の生死の割合の測定
- ・ 細胞増殖能測定試験
- ・ 動物実験代替試験

特長

- (1) 同一のウェル内で死細胞数、全細胞数及び細胞生存率が短時間で測定可能です。
- (2) 測定試料に対して培地交換、細胞洗浄、細胞遠心分離、色素溶解などの煩雑な操作が不要です。
- (3) 2ステップで操作が完了、迅速な測定が可能である(5分程度)ため、蛍光プレートリーダーを用いて多検体処理が可能です。
- (4) 酵素反応を利用しないため、薬剤によるpHの変動、測定温度、反応時間、血清添加の培養液に含まれる酵素活性などの影響をほとんど受けません。
- (5) ラジオアイソトープ、有機溶媒等を使用しないので取扱い操作及び試験後の廃棄が容易です。
- (6) 浮遊細胞、接着細胞のどちらでも測定可能です。
- (7) 本蛍光法は、死細胞を選択的に検出でき、従来の吸光測定法に比べ高感度測定が可能です(非付着性 MOLT-4 細胞 $3 \times 10^3 \sim 4 \times 10^5$ 個 / ウェル(200 μ l)、付着性 HT-1080 細胞 $3 \times 10^3 \sim 1 \times 10^5$ 個 / ウェル(200 μ l))。

操作概要

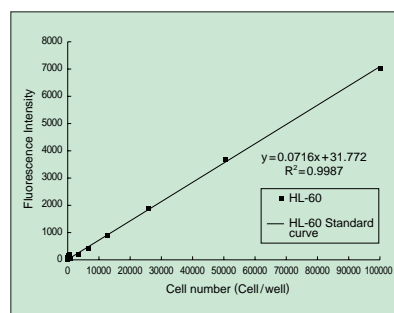
細胞培養系(被験物質添加)[例: 96穴マイクロプレート 200 μ l/well]	
所用時間	【インキュベーション(各試験系において検討された時間)】
1分	[Fluorescence Reagent 添加 10 μ l/well]
30秒	[攪拌]
30秒	[蛍光測定] (Ex: 420nm, Em: 460nm)(FD)
1分	[Lysis Solution 添加 10 μ l/well]
30秒*	[攪拌] *測定細胞種、細胞数により至適時間が異なる場合があります。
30秒	[蛍光測定] (Ex: 420nm, Em: 460nm)(FT)
細胞生存率 (%) =	$\frac{FT - FD}{FT} \times 100$
FT: 全細胞数に相当する蛍光強度 FD: 死細胞数に相当する蛍光強度	

細胞毒性試験の原理

Fluorescence Reagent は、核酸と結合していない状態では蛍光強度は0付近ですが、核酸と結合すると蛍光強度が100 ~ 1,000倍に増強します。また、この試薬は生細胞に対しては膜透過性を示さず、細胞膜に障害のある死細胞の核酸と結合して蛍光を発生します。この原理を利用し死細胞、全細胞数、細胞生存率を算出します。

検量線の作成例

平均蛍光強度値と細胞数の相関を検量線を作成して判定
測定例: 蛍光/吸光マルチプレートリーダースペクトラフルオで HL-60 細胞を用いて検量線サンプルを作成し、測定した結果。



内容

Fluorescence Reagent	500 μ l	1本
Lysis Solution	10ml	1本
293-55001	1,000回用	31,000円

〔関連商品〕

コード No.	メーカーコード	品名	内容	特長
534-52061	F129.003	スペクトラフルオ	1台	蛍光/吸光マルチプレートリーダー
536-67031	F129.005	スペクトラフルオプラス	1台	蛍光/発光/吸光マルチプレートリーダー

コード No.	メーカーコード	品名	内容
532-53961	TCN-ex B126300	励起吸光用フィルタースライド	1個
539-53971	TCN-emB126400	蛍光用フィルタースライド	1個

パンフレットを用意しております。ご請求下さい。

糖脂質の糖鎖構造の変化と癌(後編)

大塚製薬株式会社 細胞工学研究所 瀧 孝雄

[前編は、Vol.66 No.1 に掲載されており、本稿はその後編です。]

癌組織特異的糖脂質

ヒト癌の糖脂質研究から癌組織や癌細胞特異的な糖脂質が明らかにされてきた。

1. Fucosyl-GM1 (Fuc-GM1)

- 肺小細胞癌の糖脂質 -

Nilsson によって Fuc-GM1 が肺癌に特徴的な糖脂質であることが報告されて以来、これを支持する多くの論文が提出されている。特に肺小細胞癌に検出されるこの脂質は、有効な診断や治療のマーカーとなると考えられる^{15)~17)}。

2. sLe^a - 膵臓癌、胆のう癌 -

Koprowski らのグループによって作成された N19-9 モノクローナル抗体は sLe^a 構造を認識する^{18), 19)}。膵臓癌や胆のう癌患者の血清中に高い頻度で検出されるこの抗原は、糖脂質よりむしろ糖タンパクに発現している。

3. GM3, GD3, GM2 そして GD2

- メラノーマ -

これらのガングリオシドはメラノーマの特徴的糖脂質である。メラノーマ細胞を免疫することによって、これらの糖脂質に対する抗体が作成されてきていると共に、メラノーマ患者由来のモノクローナル抗体も作成され、治療への応用が試みられている^{20)~24)}。どの患者にはどの種のガングリオシドが蓄積しているかを治療前に調べる必要があるが、メラノーマは immunotherapy が最も進んでいる腫瘍である。

4. パラグロポシド (PG) シリアリル 2-6 パラグロポシド (S2-6PG)

- 肝癌の糖脂質 -

筆者らは癌患者腹水の糖脂質分析から PG (Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc β 1-1Cer) が肝癌の患者に高い頻度で検出されることを見出した²⁵⁾。PG に対する抗体を用いた測定

表 1. 癌における Le^x および Le^a 関連糖脂質の発現

Le ^x (SEEA-1)		膵臓癌 大腸癌 大腸癌肝転移巣
Dimeric Le ^x Trimeric Le ^x		大腸癌
Sialyl Le ^x (sLe ^x)		大腸癌 肝転移巣
Sialyl dimeric Le ^x		大腸癌
Sialyl Le ^a		大腸癌 膵臓癌 胆のう癌
Disialyl Le ^a		大腸癌

法から、肝癌患者血清中にも PG が高い頻度で検出されることが明らかになった²⁶⁾。PG のシアル酸誘導体 S2-6PG が肝癌の特徴的糖脂質であることは前節でしめた。

5. Le^a, sLe^a 関連糖鎖 - 大腸癌 -

大腸癌組織を抗原として作成した抗体から Le^a や sLe^a 構造を認識するものが得られる。Le^a, sLe^a 関連糖鎖については表 1 を参照されたい。

6. N- グリコリルシアル酸 (NeuGc) を含有する糖脂質

シアル酸には表 2 に示すように、N-アセチル型 (NeuAc) と N-グリコリル型 (NeuGc) がある。この分子種は動物や種による特徴的な分布を示す。マウス、ラット、ウシ、ブタ、イヌ、ウマ等は NeuGc を含む糖脂質がみられるが、ヒトやニワトリには NeuGc は存在しないと思われていた。ところがモノクローナル抗体やガスクロマト-質量分

析器による微量分析法が用いられるようになってヒト癌組織の複合糖質に NeuGc が検出されるようになった^{27)~30)}。その含量は NeuAc の 1% を越えないが免疫学的意義や臨床応用に興味を持たれている²⁸⁾。

糖転移酵素の癌性変化 - ガラクトース転移酵素の場合 -

癌化によって糖脂質の糖鎖が変化することは糖脂質合成に関与する糖転移酵素が変化することを示唆している。筆者らは癌患者腹水の糖脂質分析で PG が癌関連糖脂質であることを見出したが、PG 合成酵素(ガラクトース転移酵素)も癌患者腹水や血清中に高い頻度で検出されることを見出した^{31), 32)}。

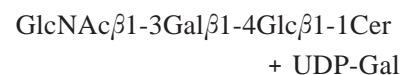
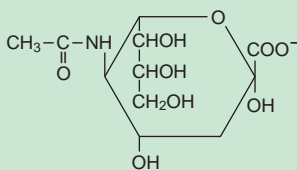


表2. N-グリコシルノイラミン酸 (NeuGc) と癌

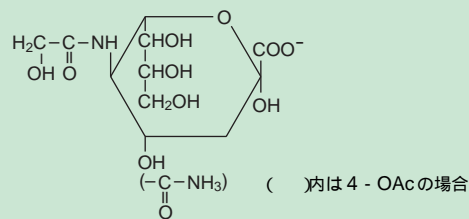
NeuGc を含む複合糖質	NeuGc が検出される癌組織
MUC-1 糖タンパク (O-結合糖鎖) 糖タンパク	乳癌 ヒト胃癌細胞株 NUGC 4
4-OAc-GM3	大腸癌
GM2, SPG, GM3, OAc-GM3	ヒト癌組織
GD3	ヒトメラノーマ

GM3, NeuGca2-3Galβ1-4Glcβ1-1Cer
 GD3, NeuGca2-8NeuGca2-3Galβ1-4Glcβ1-1Cer
 GM2, GalNAcβ1-3 (NeuGca2-3) Galβ1-4Glcβ1-1Cer
 SPG (sialylparagloboside), NeuGca2-3Galβ1-3GlcNAcβ1-3Galβ1-4Glcβ1-1Cer

N-アセチルノイラミン酸 (NeuAc)



N-グリコシルノイラミン酸 (NeuGc)



GalB1-4GlcNAcB1-3GalB1-4GlcB1-1Cer
 + UDP

糖転移酵素は通常ゴルジ膜に局在しているが、PG合成酵素が血清中に検出されることは、癌化によって酵素がなんらかの修飾を受けていることを示している。培養癌細胞の上清から精製した酵素の性質を調べてみると、次のようなことがあきらかになった。

(1) PG合成酵素はラクトース合成酵素と同じアミノ酸配列を持っていること。(2)細胞密度が高くなり、細胞どうしが接触するようになると酵素は細胞膜に分布するようになり、やがて細胞外に放出される。(3)酵素は限定分解を受けて可溶性タンパクとなって分泌される。

細胞外に分泌された酵素は、細胞表面の複合糖質のGlcNAc残基に結合して細胞間相互作用に影響を与えると想像される。実際、癌細胞にはGlcNAcを認識するレクチンがよく結合すること、レクチン結合部位と同じ部分にPG合成酵素が検出されることが明らかになった。

またGlcNAcを接着ペプチド(Arg-

Gly-Asp)と共に固相化した分子の濃度勾配をゲル中に作成しておき、このゲルにB₁₆F₁₀メラノーマ細胞をまくと、細胞はGlcNAcの濃度に依存した分布を示すこと、転移性のメラノーマは非転移性のメラノーマに比較して、ガラクトース転移酵素活性が5倍も増加していることが明らかにされた³³⁾。

最近、筆者らはPG合成酵素の簡便で特異的な活性測定法を開発したが、本測定法を用いた分析から、血中のPG合成酵素活性測定は癌の検出に有効であること、転移がみられる患者血清中には本酵素活性が極めて高いこと、予後観察に極めて高い有効性を示すこと等が明らかになった³²⁾。

転移に関連する糖脂質

筆者らは大腸癌の肝転移巣にLe^aおよびsLe^aが多量に検出されることを報告したが³⁴⁾、同じような知見がいくつかのグループからも報告されている^{35),36)}。神奈木らのグループは転移癌と血管内皮細胞との接着にはsLe^aやsLe^xとセレクチンを介する反応が関与していることを報告している³⁷⁾。筆者ら

は肝への高い転移性をもつマウスリンパ腫細胞にはGD1αが高濃度に検出されることを見出し、GD1αの標的組織への接着性の関与を調べてきた。その結果、GD1αは転移性癌細胞と肝の類洞内皮細胞(HSE)との接着を強く阻害すること、HSEはGD1αを固相化したプレートに特異的に接着することを見出した。我々は、糖鎖構造をもつペプチドをファージディスプレイライブラリー法を用いて作成することに成功した。このペプチドはマウスリンパ腫の転移を有意に阻止した。GD1αはヒトにもその存在が明らかにされており、今後この分子の機能解明に大きな興味を持たれる。

おわりに

モノクローナル抗体を用いた研究が癌の糖脂質研究に導入され、さらに物理化学構造分析が進展するに連れて、糖鎖の癌性変化はさらに複雑であることがわかり、一般化することの困難さを示すこととなった。しかし、一方ではこれまでの研究成果を基に、糖脂質によるワクチンの開発や免疫療法の試みも進められている。癌の糖鎖研究は早期発見と治療への応用が実現してはじめて大きな意味を持つようになる。今後の研究にはこれまでのような基礎的分析をさらに蓄積する一方で、分析技術の開発を進めると共に、糖鎖を認識するタンパク分子の人工合成とこれを応用した臨床応用が期待される。

〔参考文献〕

- 15) Nilsson, O., Brezicka, F. T., Holmgren, J., et al. : (1986) Detection of a ganglioside antigen associated with small cell lung carcinomas using monoclonal antibodies directed against fucosyl-GM1. *Cancer Res.*, 46 : 1403-1407.
- 16) Brezicka, F. T., Olling, O., Nilsson, O., et al. : (1989) Immunological detection of fucosyl-GM1 ganglioside in human lung cancer and normal tissues with monoclonal antibodies. *Cancer Res.*, 49 : 1300-1305.
- 17) Vangsted, A. J., Clausen, H., Kjeldsen,

- T. B., et al. : (1991) Immunological detection of a small lung cancer-associated ganglioside (Fuc-GM1) antigen in serum. *Cancer Res.*, 51 : 2879-2887.
- 18) Koprowski, H., Steplewski, Z., Mitchell, K., et al. : (1979) Colorectal carcinoma antigen detected by hybridoma antibodies. *Somat. Cell Genet.*, 5 : 957-972.
- 19) Magnani, J. L., Nilsson, B., Brockhouse, M., et al. : (1982) A monoclonal antibody-defined antigen is a ganglioside containing sialylated lacto-N-fucopentaose. III. *J. Biol. Chem.*, 257 : 14365-14369.
- 20) Portoukalian, J., Zwingelstein, G. and Dore, J. F. : (1979) Lipid composition of human malignant melanoma tumors at various levels of malignant growth. *Eur. J. Biochem.*, 94 : 19-23.
- 21) Tai, T., Cahan, L. D., Paulson, J. C., et al. : (1984) Human monoclonal antibody against ganglioside GD2: Use in development of enzyme-linked immunosorbent assay for monitoring of anti-GD2 in cancer patients. *J. Natl. Inst.*, 73 : 627-633.
- 22) Irie, R. F. and Morton, D. L. : (1986) Regression of cutaneous metastatic melanoma by intralesional injection with human monoclonal antibody to ganglioside GD2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 83 : 8694-8698.
- 23) Shirata, K., Kuwana, Y., Nakamura, K., et al. : (1993) A mouse/human chimeric anti-ganglioside GD3 antibody with enhanced antitumor activities. *Cancer Immunol. Immunother.*, 36 : 373-380.
- 24) Helling, F., Shang, A., Calves, M., et al. : (1994) GD3 vaccines for melanoma : Superior immunogenicity of keyhole limpet hemocyanin conjugate vaccines. *Cancer Res.*, 54 : 197-203.
- 25) Taki, T., Kojima, S., Seto, H., et al. : (1984) Glycolipid composition of ascitic fluids from patients with cancer. *J. Biochem (Tokyo)*, 96 : 1257-1265.
- 26) Myoga, A., Taki, T., Arai, K., et al. : (1988) Detection of patients with cancer by monoclonal antibody directed to latoneotetraosylceramide (paragloboside). *Cancer Res.*, 48 : 1512-1516.
- 27) Higashi, H., Hirabayashi, Y., Fukui, Y., et al. : (1985) Characterization of N-glycolylneuraminic acid-containing gangliosides as tumor-associated Hanganutziu-Deicher antigen in human colon cancer. *Cancer Res.*, 45 : 3796-3802.
- 28) Kawai, T., Kato, A., Higashi, H., et al. : (1991) Quantitative determination of N-glycolylneuraminic acid expression in human cancerous tissues and avian lymphoma cell lines - a tumor associated sialic acid by gas chromatography-mass spectrometry. *Cancer Res.*, 51 : 1242-1246.
- 29) Hirabayashi, Y., Higashi, H., Kato, S., et al. : (1987) Occurrence of tumor-associated ganglioside antigens with Hanganutziu-Deicher antigenic activity on human melanomas. *Jpn. J. Cancer.*, 78 : 614-620.
- 30) Miyoshi, I., Higashi, H., Hirabayashi, Y., et al. : (1986) Detection of 4-O-acetyl-N-glycolylneuraminyl-lactosylceramide as one of tumor-associated antigens in human colon cancer tissue by specific antibody. *Mol. Immunol.*, 23 : 631-638.
- 31) Taki, T., Nishiwaki, S., Ishii, K., et al. : (1990) A simple and specific assay of glycosyltransferase and glycosidase activities by an enzyme-linked immunosorbent assay method, and its application to assay of galactosyltransferase activity in sera from patients with cancer. *J. Biochem.*, 107 : 493-498.
- 32) Nishiwaki, S., Taki, T., Handa, N., et al. : (1992) Elevation of 4 β -galactosyltransferase activity for paragloboside synthesis in sera of patients with cancer. *Cancer Res.*, 52 : 1875-1880.
- 33) Brandley, B. K., Shaper, J. H. and Schnaar, R. L. : (1990) GlcNAc gradient distribution of B16F10 melanoma. *Dev. Biol.* 140 : 161-171.
- 34) Taki, T., Takamatsu, M., Myoga, A., et al. : (1988) Glycolipids of metastatic tissue in liver from colon cancer : Appearance of sialylated Le^x and Le^x lipids. *J. Biochem (Tokyo)*, 103 : 998-1003.
- 35) Hoff, S. D., Matsushita, Y., Ota, D., et al. : Increased expression of sialyl dimeric Le^x antigen in liver metastasis of human colorectal carcinoma. *Cancer Res.*, 49 : 6883-6888.
- 36) Matsusako, T., Muramatsu, M., Shirahama, T., et al. : (1991) Expression of a carbohydrate signal, sialyl dimeric Le^x antigen is associated with metastatic potential of transitional cell carcinoma of the human urinary bladder. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 181 : 1218-1222.
- 37) Takada, A., Ohmori, K., Takahashi, N., et al. : (1991) Adhesion of human cancer cells to vascular endothelium mediated by a carbohydrate antigen, sialyl Lewis A. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 179 : 713-719.

New Products

Validoxylamine A [VAA]

生化学用

バリダマイシンの一種であるバリドキシルアミン A は多くの動物・菌種において、トレハラーゼの特異的な阻害剤として知られています。トレハラーゼはトレハロースを2分子のグルコースに加水分解する酵素で、VAAにより阻害を受けるとエネルギー代謝が乱され、致死的な効果をもたらします。またゴキブリ等の昆虫種においても同様な阻害剤として報告されており²⁾ 代謝のメカニズム解明に有用な試薬です。

〔規格〕

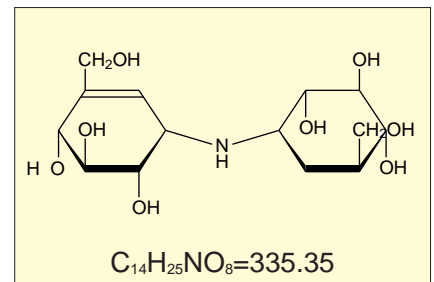
含量 (cGC) : 95.0% 以上

メタノール溶状 : 限度内

〔参考文献〕

- 1) Kameda, Y., Asano, N., Yamaguchi, T. and Matsui, K. : *J. Antibiot.* XL, 563 (1986).
- 2) Kono, Y., Takahashi, M., Matsushita, K., Nishina, M., Kameda, Y. and Hori, E. : *J. Insect Physiol.*, 40, 455 (1994).
- 3) Kyosseva, S.V. et al. : *Arch. Biochem. Biophys.* 316, 821 (1995).

220-01321 20mg 15,000 円



〔関連商品〕

Trehalase Solution (E.C. 3.2.1.28)

生化学用

205-14461 2.5units 12,000 円

安価なトレハロース、ストレプトアビジン新発売

トレハロース、ストレプトアビジンの廉価製品の発売を開始しました。バルク供給も可能ですので、別途お問合せ下さい。

Trehalose Dihydrate

和光一級

トレハロースは、グルコース2分子が1,1結合した非還元性二糖の一種で、タンパク質の変性防止や澱粉の老化防止など多くの特長を持つことが知られています。本品は酵素反応により製造されており、安価にご使用頂けます。

〔規格〕

含 量 : 97.0% 以上 (HPLC)
水 溶 状 : 試験適合
乾 燥 減 量 : 8 ~ 11% (105、減圧)

205-14162	25g	1,800 円
207-14161	100g	6,000 円
209-14165	500g	18,000 円

Streptavidin, Type

生化学用

ストレプトアビジンは、*Streptomyces avidinii* より産生されるタンパク質で、卵白アビジンに比べ非特異吸着が低く抑えられています。ビオチンとの特異的結合性を利用して、特定のタンパク質の高感度検出に用いられます。

形 状 : 凍結乾燥品
起 源 : *Streptomyces avidinii*
ビオチン結合能 : 10 ~ 20units/mg

198-11641	1mg	3,000 円
194-11643	5mg	12,000 円
192-11644	25mg	45,000 円

新規な高感度発光基質

L-012 ナトリウム

生化学用

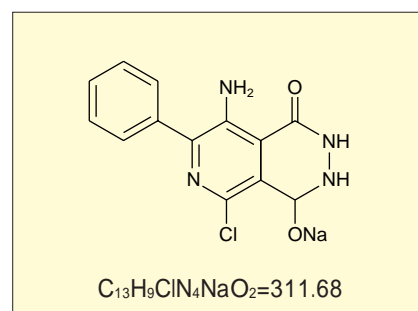
L-012 [8-Amino-5-chloro-7-phenylpyrido [3,4-d] pyridazine-1,4-(2H, 3H) dione] は新規なピリドピリダジン構造を有する合成発光基質です。ルミノールに比べて発光量が極めて大きく、ペルオキシダーゼ様活性を高感度に測定することができます。また、中性域で発光する性質があるため、生理条件下組織細胞中のスーパーオキシドアニオン、ヒドロキシラジカル、ハイポクロライドなどの活性酸素の測定に有効です。

〔特長〕

- 1) ルミノールと比較し発光量が極めて大きく、ペルオキシダーゼ様活性を高感度に測定することができます。
- 2) 中性域で発光する性質があり、生理条件下組織細胞中のスーパーオキシドアニオン、ヒドロキシラジカル、ハイポクロライドなどの活性酸素の測定に有効です。

〔品質規格〕

水 溶 状 : 澄明
含 量 (HPLC) : 98.0% 以上



〔参考文献〕

- 1) Ii, M., Yosida, H. *et al.* : *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 193, 540(1993).
- 2) Nisinaka, Y., Aramaki, Y. *et al.* : *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 193, 554(1993).
- 3) 今田伊助、佐藤英介、宮本雅史、市森有三、井上正康: *生化学*, 69, 728(1997).

コード No.	品 名	容 量	希望納入価格 (円)
129-04621	L-012 Sodium Salt	10mg	10,000

合成オリゴヌクレオチド精製用「Wakosil DNA カラム」について

和光純薬工業株式会社 大阪研究所 上森 仁志

合成オリゴヌクレオチドは、プローブとして遺伝子のクローニングや特定遺伝子の検出に、プライマーとして、シーケンスやPCRに広く利用されている。オリゴヌクレオチドの分離精製法としては、ゲル電気泳動法、イオン交換クロマト法、ゲルろ過法、逆相クロマト法が利用されているが、クロマト法は操作性に優れ、特に脱塩操作が不要な逆相クロマト法は利用度が高いと考えられる。このクロマト法も、目的とする精製純度により、カートリッジカラムを利用した簡易精製法とHPLCによる高純度精製法に大別される。筆者らのグループでも、合成オリゴヌクレオチドの純度検定や分離精製に活用できる専用カラムとしてWakosil DNA カラムを開発した。本カラムは、100 mer 程度までの合成オリゴヌクレオチドの精製に利用でき、同一塩基のオリゴマーなら 50mer 程

度まで一塩基ずつの認識が可能である。図1.に oligo dA mixture の分離例を示した。また実施例として、合成 FITC- 蛍光標識プライマー(22 mer : 100 O.D260 unit/ml) の分離精製と純度確認に応用した場合のクロマトグラムを図2.に示した。以上、Wakosil

DNA カラムは、合成オリゴヌクレオチドの純度検定から分離精製までを1本の分析用カラムで短時間に達成でき、しかも20~40 O.D/回の精製が可能などの利点があり有用性が高いものと考えている。

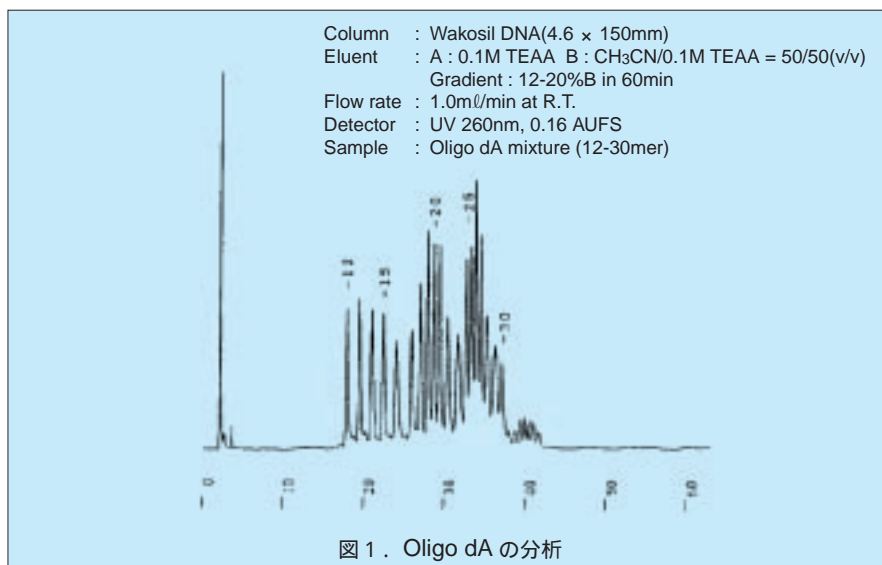


図1. Oligo dA の分析

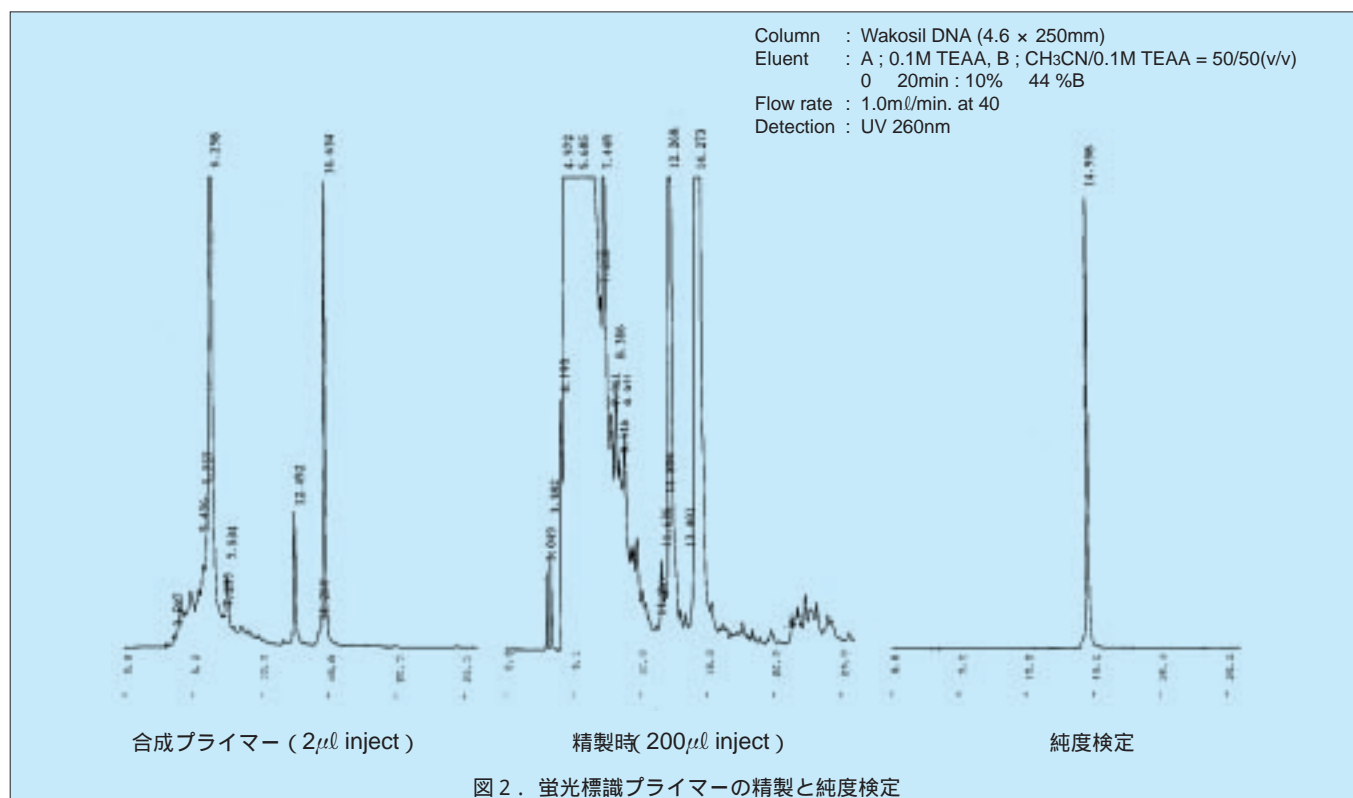


図2. 蛍光標識プライマーの精製と純度検定

HPLC 用カラム

ワコーパック Wakosil- 5C22

粒子径 5 μ m 高純度シリカゲルにドコシル(C22)基を導入後、完全エンドキャッピングした高性能充てん剤です。C22 充てん剤はアルキル基が長く、ODS(C18)充てん剤に比べて保持能・分離挙動が異なる場合があります。従来の ODS 充てん剤では分離が困難な試料の分析にぜひ一度お試しください。

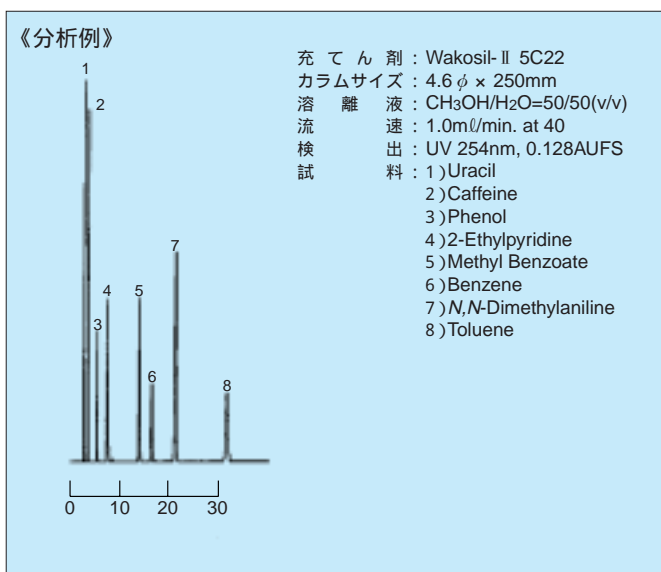
独自の分離挙動

高純度シリカゲル使用

高分離能、高理論段数

内径 1.0 ϕ ~ 20 ϕ の各カラムサイズに対応

カラムサイズ	カラムタイプ	希望納入価格(円)
4.0 ϕ × 150mm	デュボン	45,000
4.0 ϕ × 250mm		48,000
4.6 ϕ × 150mm	ウォーターズ	45,000
4.6 ϕ × 250mm		48,000



DNPH アルデヒド分析システム

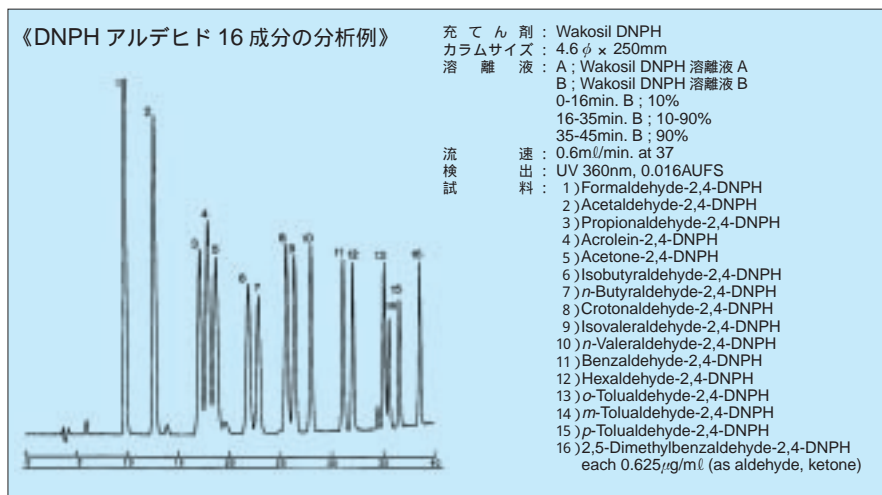
ワコーパック WS DNPH

ワコーシル DNPH 溶離液 A・B

アルデヒド類は有害大気汚染物質として環境中に広く存在します。ワコーパック WS DNPH は、アルデヒド類の 2,4-ジニトロフェニルヒドラジン (DNPH) 誘導体を分析する HPLC 用カラムです。

従来の HPLC カラムでは分離できなかった 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実現しました。専用溶離液と組み合わせることで、グラジエント溶出による多成分の一斉分析が可能です。

DNPH アルデヒド 16 成分の一斉分析が可能 !!



品名	カラムサイズ	カラムタイプ	記号	希望納入価格(円)
ワコーパック WS DNPH	4.6 ϕ × 250mm	デュボン	オID	65,000
		ウォーターズ	オIW	

コード No.	品名	容量	希望納入価格(円)
233-01611	ワコーシル DNPH 溶離液 A	1 ℓ	5,000
230-01621	ワコーシル DNPH 溶離液 B	1 ℓ	1,200

〔関連商品〕

コード No.	品名	規格	容量	希望納入価格(円)
062-03481	ホルムアルデヒド-2,4-ジニトロフェニルヒドラゾン標準液 (40 μ g HCHO/ml in acetonitrile)	排ガス分析 (HPLC)用	2ml × 5	10,500
012-17391	2種アルデヒド DNPH 混合標準液(ホルムアルデヒド-DNPH, アセトアルデヒド-DNPH, 各アルデヒドとして 0.1 μ g/ μ l in acetonitrile)	大気汚染物質 測定(HPLC)用	2ml × 5	12,000
012-15451	6種アルデヒド化合物混合標準液(アセトアルデヒド-DNPH, プロピオンアルデヒド-DNPH, ホルムアルデヒド-DNPH, イソブチルアルデヒド-DNPH, <i>n</i> -吉草酸アルデヒド-DNPH, イソ吉草酸アルデヒド-DNPH, 各アルデヒドとして 0.1 μ g/ μ l in acetonitrile)	悪臭物質試験 (HPLC)用	2ml × 5	15,700

第 34 話 - グルカンとリムルス試薬の反応性

リムルス試薬がエンドトキシンだけでなく β -グルカンにも反応することは、すでにお話したとおりです。一口に β -グルカンといっても、重合度や β -1,6 結合の割合などの違いにより、いろいろな構造が考えられます。では、リムルス試薬に反応しやすい β -グルカンの構造とはどのようなものでしょうか。今回は、 β -グルカンの重合度と修飾度の観点から、 β -グルカンとリムルス試薬の反応性について考えてみましょう。

リムルス試薬と各種グルカンとの反応性は Fig. 1 の通りです。各バーは、curdlan の活性を 1 としたときのそれぞれの活性を表しており、バーが長いほどリムルス試薬との反応性が強いということになります。Paramylon から curdlan まではすべて β -1,3-グルコシド結合を持っており、これらの反応性が高いことから、リムルス試薬は β -1,3-グルコシド結合を持っているグルカンによく反応すると考えられます。

それでは、いくつくらいのグルコースがつながれば、リムルス試薬が活性化するのでしょう。Fig. 2 に、ギ酸分解したカードランの分画物を用いた筆者らのデータを示します。重合度 (Degree of polymerization) が 6 のものはほとんど反応しませんが、14 では少し反応が認められ、49 以上でほぼ一定となりました。

curdlan は β -1,3-グルコシド結合のみからなる直鎖の β -グルカンといわれていますが、天然の β -グルカンでは、curdlan のようなグルカンは少なく、 β -1,3-グルコシド結合以外に β -1,6-グルコシド結合を持っているものが多いようです。筆者らは、curdlan をカルボキシメチル化 (CM 化) し、リムルス試薬との反応性への影響を調べました。その結果、一つのグルコース

あたり 0.7 個以上の CM 基が導入されると反応性の低下が認められました。1 個以上が導入されるとその反応性は大幅に低下しました。このことから、 β -1,6-グルコシド結合が増えると β -グルカンのリムルス試薬に対する反応性が低下する可能性が考えられます。

このような視点からもう一度 Fig. 1 のデータを見直してみましょう。直鎖の curdlan の反応性が最も強く、 β -1,6-グルコシド結合を持つ lentinan や laminaran の活性は低くなっています。また、グルコースの重合度が 20 から 30 程度の laminaran は、重合度 5000 以上の lentinan に比べると、反応性が低いという結果です。このあたりの結果は、curdlan 分解物や CM 化 curdlan の反応性と傾向が一致していると思います。

これらの結果をまとめますと次のようになります。

- (1) リムルス試薬は β -1,3-グルコシド結合をもつグルカンに反応する。
- (2) β -グルカンのリムルス試薬に対する反応性は、グルコースの重合度が大きくなるに従って増大し、重合度が 50 を越えるとほぼ一定になる。
- (3) β -グルカンのリムルス試薬に対する反応性は、 β -1,3-グルコシド結合以外の結合が増えるに従って反応性が低下する。

今回のデータは、筆者らの試薬を用いた結果です。日本産カプトガニ由来の試薬を用いた報告¹⁾もありますのでご参照下さい。

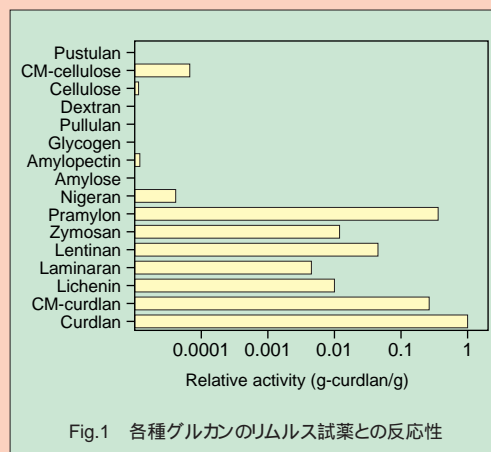


Fig.1 各種グルカンのリムルス試薬との反応性

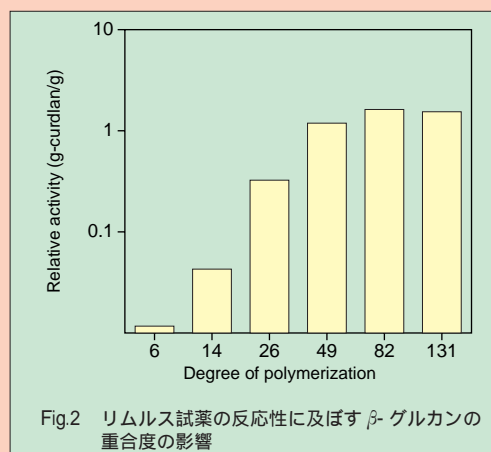


Fig.2 リムルス試薬の反応性に及ぼす β -グルカンの重合度の影響

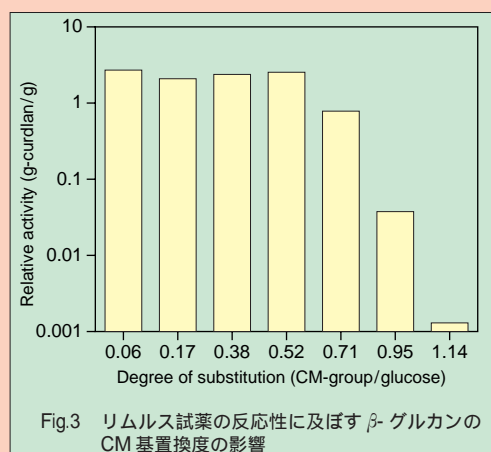


Fig.3 リムルス試薬の反応性に及ぼす β -グルカンの CM 基置換度の影響

今回は「第 35 話 抗生物質のエンドトキシン試験」の予定です。

〔参考文献〕

1) Tanaka, S. et al. : Carbohydr. Res., 218, 167 (1991).



肥満、糖尿病研究関連キット

GPDH 活性測定キット(脂肪合成活性測定用)

グリセロール 3 リン酸脱水素酵素(GPDH)の活性がより簡便に測定できます。

簡単な操作

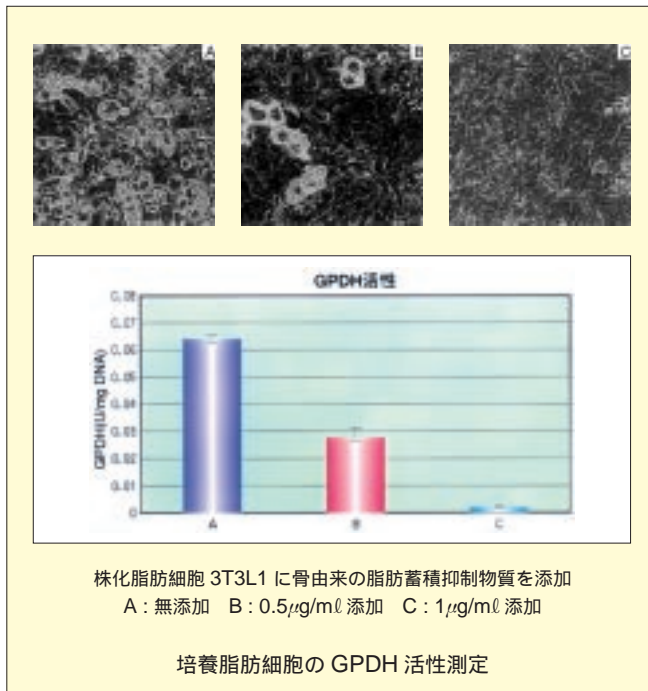
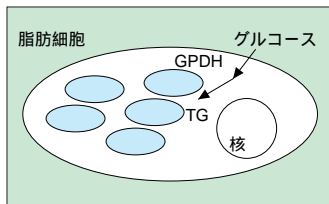
凍結乾燥粉末に蒸留水を加えるだけで測定が可能

多検体の測定が可能

96 ウェルプレートリーダーを使用すれば最大 500 検体まで測定可能

〔キットの構成〕

	成分	包装形態
反応基質	トリシン緩衝液 ,pH 7.4 EDTA・2Na DTT DHAP NADH 安定化剤	25 検体分 / ボトル× 4 本 (凍結乾燥状態)
	酵素抽出試薬	トリシン緩衝液 ,pH 7.4 EDTA・2Na



褐色脂肪細胞培養キット

褐色脂肪組織は過剰に摂取したエネルギーを脂肪として蓄えると同時に脂肪のエネルギーを直接熱として体外に放出する特殊な働きを持ち、交感神経から出るノルアドレナリンのベーター作用の支配のもとに、エネルギー消費の自動調節に寄与しています。

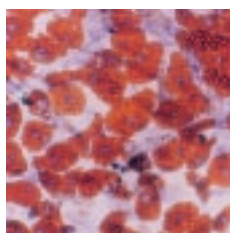
本キットは、褐色脂肪細胞の機能を損なうことなく、Primary Culture の状態で褐色脂肪細胞をお届けします。

〔用途〕

- 抗肥満、抗糖尿病薬のスクリーニング
- 褐色脂肪細胞の機能解析
- 褐色脂肪細胞の熱エネルギー放出

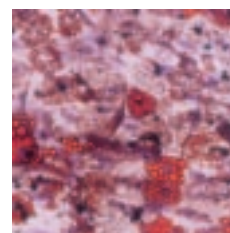
〔キットの構成〕 各 1 本

褐色脂肪細胞	25ml フラスコ
増殖用メディウム	125ml
分化誘導メディウム	100ml
脂肪細胞維持メディウム	125ml

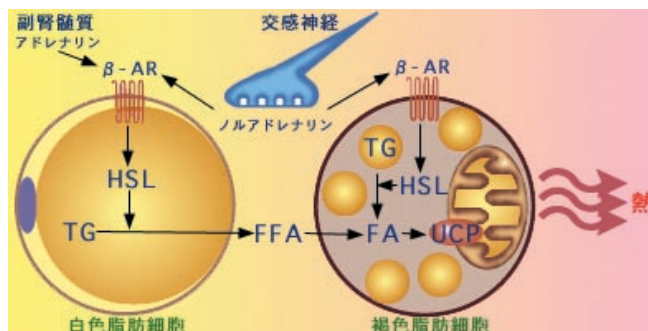


培養褐色脂肪細胞

ノルアドレナリン添加



脂肪滴が縮小する



コード No.	メーカーコード	品名	規格明細	希望納入価格 (円)
309-06141	AK0001	GPDH 活性測定キット	100 検体用	50,000
306-06151	AK0002	褐色脂肪細胞培養キット	一式	100,000

第5話 アポトーシス誘導分子:Fas-Fas リガンド(FasL)の機能と変異

本シリーズで繰り返し述べられているように、アポトーシスが生体の発生やホメオスタシスで重要な役割をはたしていることが広く認識されて世界中で盛んに研究されている。アポトーシスの主要な経路の一つである Fas-FasL に関する研究は、わが国の研究者が世界をリードし、現在のアポトーシス研究の隆盛の火つけ役となったことで注目される。

1. Fas と FasL

Fas は細胞を殺す活性をもつモノクローナル抗体 (mAb) に対する抗原として発見された¹⁾。APO-1、CD95とも呼ばれている。cDNA クローニングにより、Fas は TNF/NGF リセプタースーパーファミリーに属する型膜タンパク質であることが明らかにされた²⁾。Fas-cDNA をトランスフェクトした細胞が抗 Fas mAb によりアポトーシスを起こすことから、Fas がアポトーシスシグナル (death signal) を細胞内へ送りこむリセプターであることが確かめられた。Fas は胸腺、肝臓、肺、腎臓で高く発現し、ほかの臓器・組織でも低いながら広く発現している。

生体内では抗 Fas mAb にかわって、FasL が Fas と結合してシグナルを送りこむ役目をはたしている。細胞傷害性 T リンパ球 (CTL) からの cDNA クローニングにより、FasL は TNF ファミリーに属する型膜タンパク質で C 末端を細胞外に出していることが明らかにされた²⁾。Fas に比べて FasL の発現は限定され、主に NK 細胞や T 細胞で活性化時に発現するが、精巣や眼球でも発現している。またプロテアーゼにより細胞表面から切断され、可溶性 FasL として生体内に存在することもある。

Fas を介するアポトーシスについては、図1に示す death シグナル伝達経

路が明らかになっている³⁾。FasL は Fas と結合することによりシグナルを細胞内へ送りこみ、このシグナルは細胞内の death domain (DD) を通して FADD に伝えられる。FADD は death effector domain (DED) を通して caspase8 を活性化し、活性化された caspase8 は一連のシステインプロテアーゼより成る caspase カスケードを活性化することにより、DNA の断片化、タンパク質の分解、核の凝縮を特徴とするアポトーシスを惹き起こす。ほかに DAXX や RIP を介する経路も報告されている。

2. Fas と FasL の異常と病気

Fas-FasL シグナル伝達経路に異常が起きたら、どうなるのだろうか。マウスで表面マーカーとして Thy1 をもつ CD4 と CD8 をもたずに B 細胞マーカーである B220 をもつ異常な T 細胞 (CD4⁻ CD8⁻ であることから“double negative (DN)”T 細胞と呼ばれている) が末梢で増加、蓄積して著明な全身性リンパ節腫脹を起こす mutant が見つかった⁴⁾。この DN T 細胞の出現は一つの劣性遺伝子 *lpr* (lymphoproliferation) によって支配されている。染色体マッピングにより、Fas 遺伝子が第 19 染色体上の *lpr* と同じ場所にあることが判明して解析が進み、*lpr* は Fas の第 2 イントロン内へのトランスポゾン (ETn) の挿入による突然変異で Fas を発現していないことが明らかになった⁵⁾。このことから、Fas は T 細胞の分化や機能の調節という重要な役割をもつことが分かった。*lpr* マウスの胸腺では T 細胞の選択が正常に進行していることから、Fas-FasL 装置は胸腺で排除されずに末梢

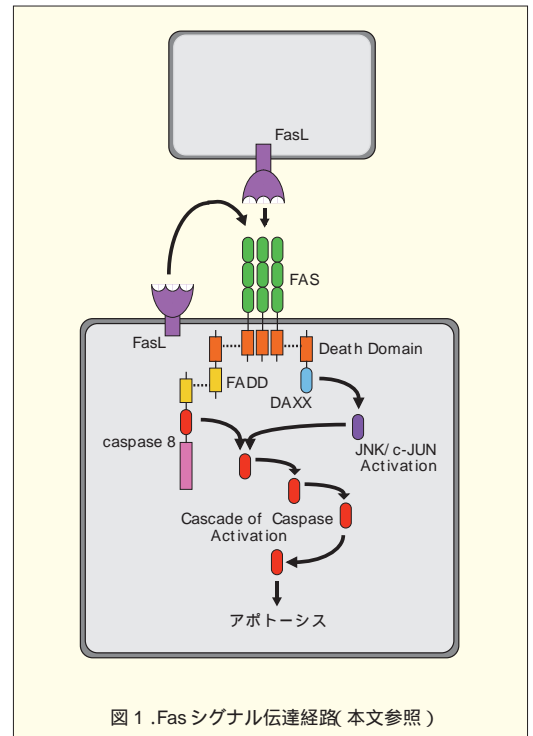


図1. Fas シグナル伝達経路 (本文参照)

に流出した自己反応性 T 細胞や役目を終えたリンパ球をアポトーシスにより除去して、この装置が故障すると本来必要としない異常な細胞がリンパ節に蓄積すると考えられる⁷⁾。実際に、抗 DNA 抗体、リウマチ因子、免疫複合体などの自己抗体が証明されている。

Fas と FasL は一体となって働いているので、FasL に変異が起こっても同じ異常が起こるはずである。やはりマウスで *lpr* と全く同じ DN T 細胞蓄積によるリンパ節腫脹を起こす劣性遺伝子 *gld* (generalized lymphoproliferative disease) がすでに第 1 染色体上に見つかった。この *gld*こそ FasL の突然変異遺伝子で細胞外領域に点変異を起こしフェニルアラニンがロイシンに代わり、産生される変異 FasL (mFasL) が Fas と結合できないことが分かった²⁾。すなわち、*lpr* マウスでは Fas の発現がないために、*gld* マウス

では mFasL が Fas と結合できないために、末梢に DN T 細胞が蓄積し識別できないほどよく似た病状が現われる。著者らは lpr と gld を橋渡しするユニークな Fas の突然変異遺伝子 $lpr^{c\#}$ (lpr complementing gld) を見つけている⁶⁾。 $lpr^{c\#}$ は Fas の細胞内の DD 部分の点変異でイソロイシンがアスパラギンに代わったために death シグナルを伝えられない。そのために Fas-FasL 経路が中断してアポトーシスが起こらなくなり、DN T 細胞蓄積によるリンパ節腫脹が起こる。 $lpr^{c\#}$ は death シグナルを伝えられないが FasL と結合できる変異 Fas (mFas) を細胞表面に発現するために、 $lpr^{c\#}$ と gld は異なる染色体上にある劣性遺伝子であるにもかかわらず、 $lpr^{c\#}$ と gld マウスを交配して作った F_1 マウスで軽度ながら DN T 細胞によるリンパ節腫脹が起こる。この不可解な現象は、

$$\frac{lpr^{c\#}}{Fas} \cdot \frac{gld}{FasL}$$

この F_1 マウスがこの遺伝子型であることから Fas、mFas、FasL、mFasL が同じ分子数ずつ作られ、mFas が FasL と結合するために Fas に death シグナルを送りこむ FasL が不足してアポトーシスの効率が低下して起こると考えられている。 lpr、 $lpr^{c\#}$ 、gld のいずれも MRL マウスで自己抗体産生に加えて重症な糸球体腎炎、血管炎や関節炎を起こすので、Fas と FasL の変異が自己免疫病の原因となる可能性がある。ヒトでも lpr マウスと酷似したリンパ節腫脹などの症状をしめす自己免疫性リンパ球増多症の小児患者で Fas の突然変異が見つかった⁷⁾。自己抗体による溶血性貧血、血小板減少症や好中球減少症が起こっている患者もいる。

Fas-FasL 経路のシグナル伝達障害が異常リンパ球蓄積や自己免疫病を起こすように、機能過剰も生体にとって有害にはたらく。マウスに抗 Fas mAb を注射すると急性肝障害で数時間以内に死亡する²⁾。 $lpr^{c\#}$ マウスでは全く異常が見られないことから、mAb

が肝細胞表面に発現している Fas と結合して death シグナルを送りこみ肝細胞のアポトーシスを起こしたためと考えられる。また、動物の肝炎モデルで可溶性 Fas や抗 FasL mAb の投与が肝炎を予防することから、肝炎に Fas-FasL 経路が関係している可能性がある。 HIV 感染患者の CD4 T 細胞で Fas の発現が上昇して Fas を介するアポトーシスに感受性になっていることから、AIDS 患者で見られる CD4 T 細胞の減少に Fas-FasL 経路が関与しているという報告もある。

3. Fas、FasL と癌

アポトーシスの観点から眺めると、癌はアポトーシスに抵抗性になり無限に増えつづける細胞集団と考えられる。肝細胞は Fas を高発現し、抗 Fas mAb によりアポトーシスを起こすことは既に述べた。肝癌細胞も同様に Fas を発現していれば、FasL や抗体により死滅させることが可能であるが、多くの肝癌は Fas の発現を停止したり低下させて CTL からの攻撃を免れている⁸⁾ (図 2A)。このような癌細胞へ Fas cDNA をトランスフェクトすると再びアポトーシスを誘導できることから、Fas の癌遺伝子治療への応用が考えられる。

肝癌のなかには Fas を発現しないだけでなく FasL を発現して逆に CTL をアポトーシスさせて免疫機構による排除から逃れているものもある (図 2B)。正常組織でも FasL を発現している精巢のセルトリ細胞や眼球の角膜は、MHC が異なるレシピエントに移植しても FasL により CTL をアポトーシスさせて、長く生存できる⁹⁾。この現象は“immune privilege”と呼ばれ、臓器移植への応用が考えられている。しかし、遺伝子導入により FasL を過剰発現させた正常細胞や癌細胞を移植すると大量の好中球の浸潤が起こり、炎症反応により拒絶される現象

もみられている¹⁰⁾ (図 2C)。

以上のように、Fas と FasL は微妙なバランスの上で免疫系を中心として生体のホメオスタシスを保っている。今後の研究でさらに新しい機能が明らかになることが期待される。

〔参考文献〕

- 1) Yonehara, S., Ishii, A. and Yonehara, M. (1989) J. Exp. Med. 169, 1747-1756
- 2) Nagata, S. (1997) Cell 88, 355-365
- 3) Depraetere, V. (1998) Current Biol. 8, R704
- 4) Cohen, P. L. and Eisenberg, R. A. (1991) Annu. Rev. Immunol. 9, 243-269
- 5) Watanabe-Fukunaga, R., Brannan, C. I., Copeland, N. G. et al. (1992) Nature 356, 314-317
- 6) Matsuzawa, A., Moriyama, T., Kaneko, T. et al. (1990) J. Exp. Med. 171, 519-531
- 7) Rieux-Laucat, F., Le Deist, F., Hivroz, C. et al. (1995) Science 268, 1347-1349
- 8) Strand, S., Hofmann, W., Hug, H. et al. (1996) Nature Med. 2, 1361-1366
- 9) Green, D. R. and Ware, C. F. (1997) Proc. Nat. Acad. Sci. 94, 5986-5990
- 10) Seino, K., Kayagaki, N., Okumura, K. et al. (1997) Nature Med. 3, 165-170

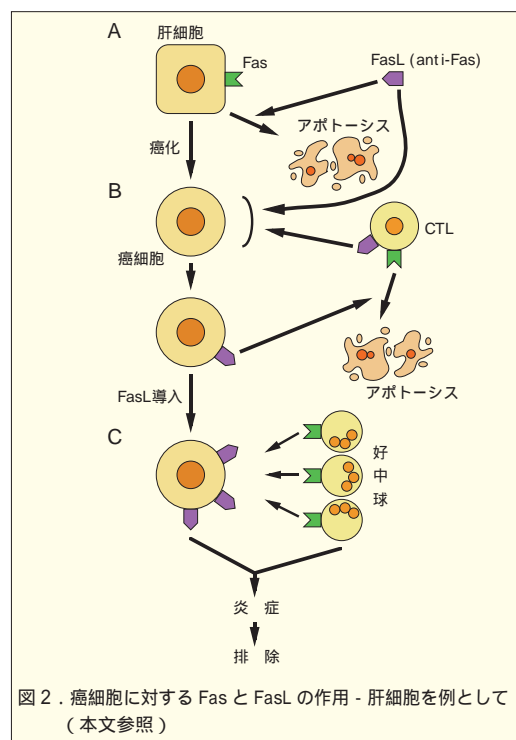


図 2. 癌細胞に対する Fas と FasL の作用 - 肝細胞を例として (本文参照)

電子伝達系及びアポトーシスの研究に

Antimycin A, from *Streptomyces sp.*

生化学用

抗カビ作用をもつ抗生物質の1つで、8位アルキル基の異なるA₁～A₉化合物の混合物です。ミトコンドリアの呼吸鎖の電子伝達をチトクロムbとチトクロムc1の間で阻害します。また、bcl-2によって阻害されないアポトーシスを誘導するとの報告もあります。

〔規格〕

含量(TLC): 99%以上

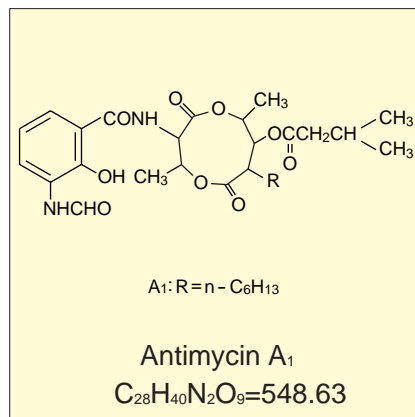
エタノール溶状: 限度内

〔参考文献〕

Wolvetang, E. J. *et al.*: *FEBS Lett.*, 339, 40(1994).

015-17021 25mg 4,000円

011-17023 100mg 11,500円



Antisense Control Template

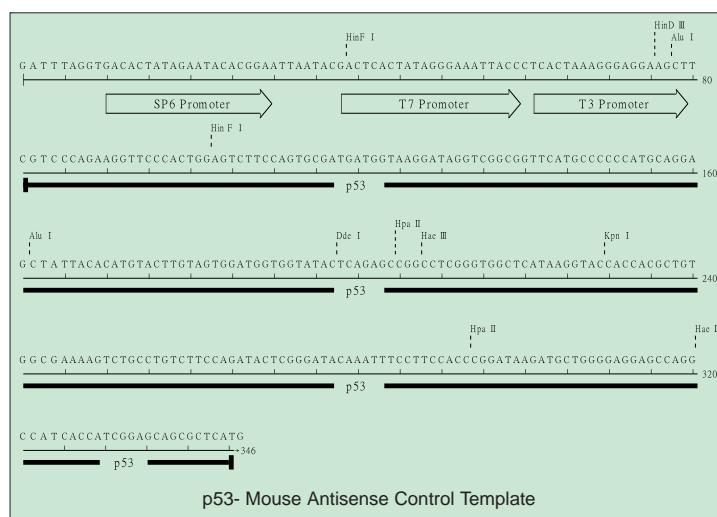
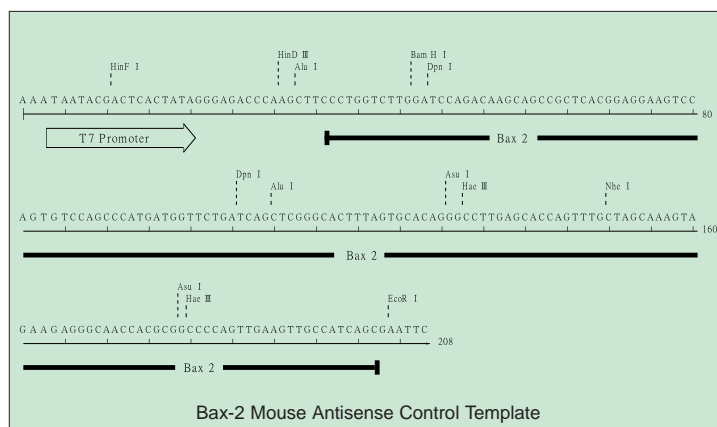
遺伝子研究用

下記遺伝子を含むアンチセンスコントロールテンプレートで、リニアになっているため *in vitro* 転写反応のテンプレートとして直ちに使用できます。T7 RNA Polymerase や他の Polymerase を用いてこのテンプレートで転写を行う事により、アンチセンス RNA を生じ、これらの転写物は、リボヌクレアーゼや S1 ヌクレアーゼプロテクションアッセイ、RT-PCR アッセイ、ノーザン及びドットプロットのプロープとして使用できます。

濃度: 0.5mg/ml

形状: 10mM Tris-HCl (pH 7.5), 1mM EDTA

貯法: -20



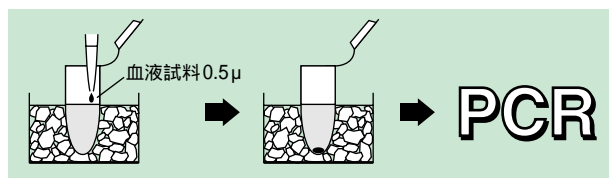
コード No.	品名	容量	希望納入価格(円)
546-00671	Bax-2 Mouse Antisense Control Template	10μg	22,000
547-00721	p53-Mouse Antisense Control Template	10μg	22,000
540-00711	p53-Human Antisense Control Template	10μg	22,000
543-00701	c-myc Human Antisense Control Template	10μg	22,000
540-00691	Bcl-X Mouse Antisense Control Template	10μg	22,000
543-00681	Bcl-2 Mouse Antisense Control Template	10μg	22,000
549-00661	Bax-1 Mouse Antisense Control Template	10μg	22,000



血液をそのまま PCR、DNA 精製不要

Drop PCR Kit for Human Blood

Drop PCR Kit for Human Blood は、血液を直接 PCR 反応液に添加(滴下: Drop)するだけで、目的の遺伝子を検出できるように開発された製品です。

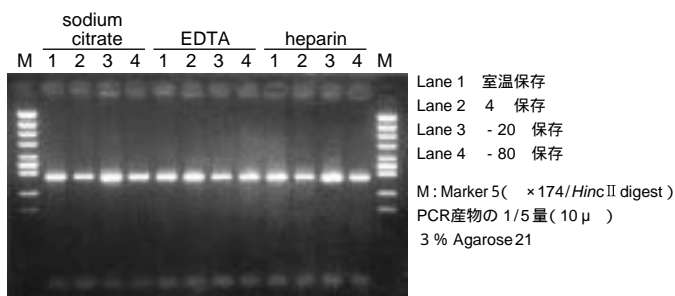


抗凝固剤による影響はありません

3種類の抗凝固剤(sodium citrate, EDTA, heparin)処理血を、室温・冷蔵(4℃)・冷凍(-20℃、-80℃)条件下で約2カ月半保存し、添付の Control Primer^{*1)}(p53Primer Exon 6: 275bp)を用いて PCR を行った。

〔特長〕

- ◆ 血液試料 0.5 μ l を直接 PCR 反応液に添加するだけで PCR が行えます。
- ◆ 各種抗凝固剤処理血、凝固血及び血痕試料を使用できます。
- ◆ 1kbp 以下の DNA の増幅に適しています。
- ◆ DNA 精製を行う必要がないため、
 - ・短時間で解析できます。
 - ・操作が簡便であり、一度に多数のサンプルを処理することができます。
 - ・精製過程におけるクロスコンタミネーションの可能性が少なくなります。
 - ・ウイルス感染血等を扱う際の危険性が少なくなります。
- ◆ 詳細なマニュアルが添付されています。



*1) ヒト p53 遺伝子 Exon 6 を含む領域 (275bp) を増幅させるためのプライマーです。
ニッポンジーン製品 p53 Primer Exon 6 (コード No. 319-03521) forward と reverse の混合液です。

318-03851 60 回分 55,000 円

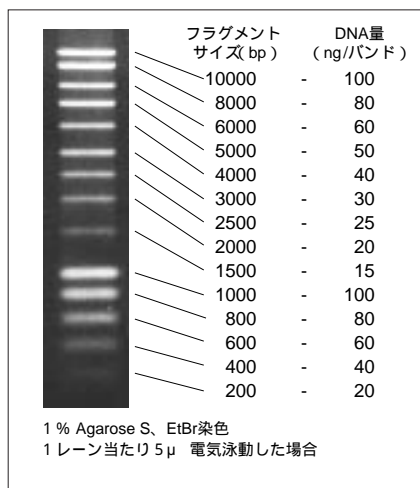
本品は、株式会社島津製作所との技術提携により製品化しました。



DNA のサイズと量が比較できる

Smart Ladder(0.2-10kbp)

Smart Ladder(0.2-10kbp)は、直鎖状二本鎖 DNA のサイズや DNA 量の目安となる Size & Mass マーカーです。



- ▶ 色素マーカー添付
- ▶ 1kbp と 10kbp のバンドを強調
- ▶ マーカーのフラグメントサイズから DNA 量が概算できる

↓
5 μ l アプライした場合、1,600 ~ 10,000bp の範囲ではフラグメントサイズの 1/100 量(15 ~ 100ng/バンド)になり、200 ~ 1,000bp ではフラグメントサイズの 1/10 量(20 ~ 100ng/バンド)になります。

〔使用方法〕
通常 1レーンに 5 μ l 使用して下さい(写真参照)。

〔形状〕
10mM Tris-HCl (pH 8.0)、1mM EDTA、0.025% bromophenol blue、0.025% xylene cyanol FF、2.5% Ficoll 400、0.1% NaN₃

317-03941 500 μ l(100 回分) 22,000 円

高品質・高純度のトリス試薬 !!

生化学用

生化学用トリスシリーズすべてに含量、吸光度分析など厳密な製品規格を設定しております。あらゆる場面で汎用される本製品群は自信を持ってユーザーの皆様にお届けできます。

〔Tris 999 の規格例〕

含量(滴定分析)	99.9% 以上	硫酸塩 SO ₄	0.002% 以下
吸光度 A ₂₉₀	=0.05 以下(40% w/v in water)	塩化物 Cl	5 ppm 以下
	A ₂₆₀ =0.05 以下(40% w/v in water)	カルシウム Ca	4 ppm 以下
pH	10.0 ~ 10.8(0.1M 溶液)	乾燥減量(105)	0.1% 以下



Tris HCl 500g Tris 999 1kg Tris Acetate 250g

コード No.	品 名	容 量	希望納入価格(円)
013-16385	2-Amino-2-hydroxymethyl-1,3-propanediol 999 【Tris 999】	500g	8,000
011-16381		1kg	13,700
017-16383		5kg	50,000
015-16921	2-Amino-2-hydroxymethyl-1,3-propanediol Acetate 【Tris Acetate】	100g	5,000
011-16923		250g	10,000
010-17451	2-Amino-2-hydroxymethyl-1,3-propanediol Hydrochloride 【Tris HCl】	100g	4,200
012-17455		500g	15,000
016-17453		1kg	25,000

Mayer's Hematoxylin Soln.(× 2)

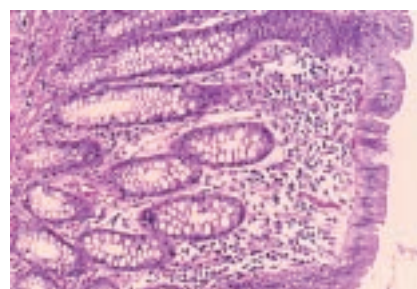
病理研究用

細胞核染色用試薬。通常処方 of Mayer's Hematoxylin 溶液に比べ 2 倍法のものにはヘマトキシリン含量が多いため、より短時間で核内構造の細部まで鮮明に染色され、超薄切片にも使用できます。

〔組 成〕

ヘマトキシリン(C.I. 75290)	2g
よう素酸ナトリウム	0.4g
カリウムミョウバン	50g
抱水クロラル	50g
くえん酸	1g

134-13065 500ml 5,000 円



胃バイオプシー HE 染色 (× 200)

〔関連商品〕 [各種処方ヘマトキシリン液](#)

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
032-14635	Carrazzi's Hematoxylin Soln.	病理研究用	500ml	4,200
073-03711	Gill's Hematoxylin Soln. No.1	病理研究用	1ℓ	6,800
070-03721	Gill's Hematoxylin Soln. No.2	病理研究用	1ℓ	7,800
077-03731	Gill's Hematoxylin Soln. No.3	病理研究用	1ℓ	8,400
121-03905	Lillie-Mayer's Hematoxylin Soln.	病理研究用	500ml	4,700

レプチン

従来脂肪組織は、エネルギーを貯蔵するだけの臓器と考えられていました。ところが、近年脂肪組織が様々な液性因子を分泌することが明らかになりつつあり、またそれらが摂食行動、エネルギー消費、糖脂質代謝、インスリン作用などに影響することから、肥満糖尿病、動脈硬化症、虚血性心疾患におけるその臨床的意義も注目されています。その脂肪細胞由来の液性因子の1つであるレプチンは、ob遺伝子より産生され飽食因子であると考えられています。摂食の抑制、エネルギー消費の増加、LH, FSH, TSHの上昇、ACTH, NPY産生の低下などが知られています。

Leptin, Human, recombinant

生化学用

産 生: ヒトレプチンのcDNAを組み込んだ発現プラスミドを持つ *E.coli* により生産

形 状: フィルター滅菌後 PBS から凍結乾燥 (安定剤不含)

分子量: 16kDa

生物学的活性: 1 ~ 10mg/kg/day で ob/ob C57 BL/6J マウスの体重及び食餌の摂取量に、用量依存的減少が認められます

121-04561 1mg 48,000 円

Leptin, Mouse, recombinant

生化学用

産 生: マウスレプチンのcDNAを組み込んだ発現プラスミドを持つ *E.coli* により生産

形 状: 10mM クエン酸 Na, pH 4.0 から凍結乾燥 (安定剤不含)

分子量: 16kDa

生物学的活性: 1 ~ 10mg/kg/day で ob/ob C57 BL/6J マウスの体重及び食餌の摂取量に、用量依存的減少が認められます

128-04571 1mg 40,000 円

〔参考文献〕

- 1) Halaas, J. L. *et al.* : *Science*, 269, 543 (1995).
- 2) Campfield, L. A. *et al.* : *Science*, 269, 546 (1995).



High Throughput Screening や化合物ライブラリーの包括に大変便利!

Compound Library

TOCRIS社は、カタログ製品約800品目から、ご希望に応じた品目を、ご希望に応じた容量にて、96穴マイクロチューブプレートにて、化合物提供を行っております。また、カタログには掲載されておらず、薬理作用がまだ、不明である中間体も、品質管理試験がされていませんが、同様に96穴マイクロチューブプレートで提供させていただきます。これらの品目の Structure Database フロッピー (SD file) は、無料で提供しておりますので資料請求カードにてご請求下さい。

ご覧頂くには、Windows 3.1 以上のOSを搭載した ISIS/BASE がインス



ールされている IBM PC もしくはその互換機が必要になります。

ご注文は、当社営業担当者までご相談下さい。

〔関連商品〕

ISIS/Desktop

(Windows, Machintosh ハイブリット版)
533-90251 一式 198,000 円

免疫とケモカイン

近畿大学 医学部 細菌学講座 義江 修

この稿では最近見いだされたリンパ球や樹状細胞に特異的に作用するケモカインについて紹介する。詳しくは文献1、2の総説を参照されたい。

リンパ球は生理的な状態でも血液と組織の間で絶えず再循環とホーミングを繰り返している。すなわち1次リンパ組織である骨髄や胸腺で分化成熟したナイーブなB細胞やT細胞は末梢血に放出され、血液と脾臓、リンパ節、パイエル板、虫垂などの2次リンパ組織との間で再循環を繰り返す。一方、末梢組織で抗原を取り込んだ樹状細胞は所属のリンパ組織に移行して抗原ペプチドとMHCクラスII抗原の複合体を提示する。そして抗原特異的なナイーブT細胞がこの複合体を認識するとさらにCD28とCD80やCD86との結合による共シグナルも加わってT細胞は増殖を開始し、最終的にエフェクター/メモリーT細胞に分化する。エフェクター/メモリーT細胞は活性化されたときに産生するサイトカインの種類からさらにTh1型(IL-2、IFN- γ などを産生)とTh2型(IL-4、IL-5などを産生)に大別される。Th1はおもに細胞性免疫や自己免疫疾患に関与し、またTh2は液性免疫やアレルギー反応を促進する。そして血液中に放出されたエフェクター/メモリー

T細胞は再び循環を開始するが、その循環経路はナイーブT細胞とは異なり、おもに炎症組織や皮膚、腸管粘膜固有層などといった標的抗原の存在する可能性の高い組織へと遊走し、そこから移入リンパ管を経てリンパ節へ還流する。このようにして個々には数に限りのある抗原特異的な多数のクローンが常時再循環することによって生体はきわめて巧妙な仕方免疫学的に監視されている。

リンパ球の組織特異的な再循環にはまずそれぞれのクラスやサブセットが発現するホーミングレセプターと標的組織の血管内皮細胞が発現するそれらのリガンド(アドレッシン)との特異的結合が重要である。例えば、リンパ節に選択的ホーミングするナイーブT細胞はLセレクトインを高レベルで発現し、一方リンパ節に存在する高内皮小静脈にはセレクトインと結合する糖鎖リガンドがGlyCAM-1やCD34上に発現されている。またパイエル板へホーミングするナイーブT細胞の場合はLセレクトインとともに $\alpha 4\beta 7$ インテグリンも発現しており、一方パイエル板の高内皮小静脈はMAdCAM-1やVCAM-1を発現している。大半のメモリー/エフェクターT細胞はLセレクトインの発現が低いいため、2次リンパ

組織へホーミングする効率はナイーブT細胞と比べると低いが、そのかわりに2次リンパ組織以外の末梢組織へ選択的に移動する。

このような細胞接着分子による特異的結合に加えて、さらにリンパ球をこれらの組織の微小環境へと誘導する一群のケモカインが存在する(表1)。例えば、SDF-1はリンパ球やCD34陽性前駆細胞に対する強力な遊走活性を示し、そのレセプターCXCR4はB細胞、T細胞、CD34陽性前駆細胞などで発現している。またCXCR5は2次リンパ組織でのB細胞領域(濾胞や胚中心)の形成に必須であり、そのリガンドBCA-1/BLCはB細胞に対する特異的な遊走因子である。TARCはおもに胸腺の髄質に存在する樹状細胞で恒常的に産生されており、そのレセプターCCR4は胸腺の皮質に存在するCD4単独陽性T細胞に発現している。このことからTARCは胸腺内でポジティブセレクションを受けたCD4単独陽性胸腺細胞の皮質から髄質への移動に関与していると考えられる。さらにCCR4は末梢血ではおもにCD4陽性メモリーT細胞の一部(~20%)に発現しており、しかもこれらの細胞はTh2タイプのサイトカインを選択的に産生する。そのため末梢組

表1. 免疫系ケモカイン

ケモカイン	別名	主要発現組織	産生細胞	主要標的細胞	レセプター
CXCケモカイン					
IP-10		リンパ節、脾臓、肝臓、胸腺	IFN- γ 処理細胞	活性化T	CXCR3
MIG		脾臓、肝臓	IFN- γ 処理細胞	活性化T	CXCR3
SDF-1	PBSF	脾臓、膵臓、卵巣、小腸	ストローマ細胞	ナイーブT、B、CD34+	CXCR4
BCA-1	BLC	肝臓、脾臓、リンパ節	樹状細胞(?)	B	CXCR5
CCケモカイン					
TARC		胸腺、肺、腸管	樹状細胞	CD4+ T(Th2)	CCR4
MDC	STCP-1	胸腺、リンパ節、虫垂	マクロファージ	CD4+ T(Th2)	CCR4
LARC	MIP-3 α /Exodus	腸管	腸管上皮細胞	T、B、樹状細胞	CCR6
PARC	DC-CK1/AMAC-1	肺、リンパ節、胸腺	樹状細胞、マクロファージ	ナイーブT	
ELC	MIP-3 β	2次リンパ組織	高内皮静脈(?)	T、B、樹状細胞	CCR7
SLC	6Ckine/Exodus-2	2次リンパ組織	高内皮静脈	T、B、樹状細胞	CCR7、CXCR3

織では TARC やレセプターを共有する MDC は樹状細胞やマクロファージから産生され、Th2 タイプの T 細胞をこれらの抗原提示細胞へと呼び集めると考えられる。また PARC はリンパ節の胚中心や T 細胞領域の樹状細胞で産生されており、リンパ節でのナイーブ T 細胞のホーミングと活性化に関与することが示唆されている。LARC はおもに腸管上皮細胞で産生されており、一方レセプター CCR6 は T 細胞や B 細胞で発現しており、さらに肺組織から分離した樹状細胞や臍帯血 CD34 陽性細胞から分化させた樹状細胞でも発現している。LARC は腸管粘膜での免疫組織の形成に関与すると考えられる。SLC や ELC は 2 次リンパ組織の傍濾胞皮質領域 (T 細胞ゾーン) で強く発現しており、これらの共有レセプ

ター CCR7 は T 細胞、B 細胞および成熟樹状細胞に広く発現している。さらに T 細胞を活性化すると CCR7 の発現は強く増強することから、これらのケモカインは 2 次リンパ組織へのリンパ球の生理的ホーミングとともに免疫応答での T 細胞の遊走にも重要な役割を担っていると考えられる。

好中球や単球をおもな標的細胞とする「炎症性ケモカイン」でもその多くがメモリー T 細胞に対する遊走活性を示す。この事実は好中球や単球が主体の炎症反応でもやがてリンパ球の浸潤が起こることをよく説明し、炎症反応と免疫応答の密接な関係を裏付けるものである。さらに本稿でふれたリンパ球や樹状細胞に特異的に作用する言わば「免疫系ケモカイン」はそれぞれに特有のパターンでリンパ系組

織を中心に構成的に産生されており、リンパ球のクラスやさまざまな機能的サブセットの体内での移動とホーミングを生理的に制御し、それによって免疫組織の形成や機能維持に必須の役割を担うと考えられる。さらにこれらのケモカインの産生はさまざまな刺激やサイトカインによっても強く誘導されることから、免疫応答でも重要な役割を担うと考えられる。これらのケモカインの生理的および病的な役割の解明が要望される。

〔参考文献〕

- 1) 義江 修 : 「免疫 98-99」, p.176, (中山書店 1998)
- 2) 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			
058-06461	ENA-78, recombinant	20 μ g	39,000
055-06471	Eotaxin, recombinant	10 μ g	39,000
077-04451	GRO- α , recombinant	25 μ g	39,000
091-04331	Interleukin-8(endothelial cell-derived), recombinant	25 μ g	39,000
098-04341	Interleukin-8(monocyte-derived), recombinant	25 μ g	39,000
095-04351	IP-10, recombinant	25 μ g	39,000
137-13011	MCP-1, recombinant	20 μ g	39,000
138-13161	MCP-3, recombinant	10 μ g	39,000
138-13041	MIP-1 α , recombinant	20 μ g	39,000
136-13081	MIP-1 β , recombinant	10 μ g	39,000
181-01441	RANTES, recombinant	20 μ g	39,000
Mouse			
052-06481	Eotaxin, recombinant	10 μ g	39,000
135-13171	MCP-3, recombinant	10 μ g	39,000
185-01461	RANTES, recombinant	20 μ g	39,000
Rat			
072-04521	GRO, recombinant	25 μ g	39,000
074-04461	GRO- β , recombinant	25 μ g	39,000
131-13031	MCP-1, recombinant	10 μ g	39,000
135-13051	MIP-1 α , recombinant	20 μ g	39,000
188-01451	RANTES, recombinant	20 μ g	39,000

サイトカイン

コード No.	品 名	容 量	希望納入価格 (円)
Human			
097-03951	Interleukin-2, recombinant	50 μ g	39,900
094-03961	Interleukin-4, recombinant	10 μ g	50,000
093-03811	Interleukin-5, recombinant	3 μ g	52,500
090-04281	Interleukin-11, recombinant	10 μ g	39,000
071-04111	GM-CSF, recombinant	10 μ g	39,900
203-11101	TNF- α , recombinant	10 μ g	43,000
Mouse			
091-03971	Interleukin-3, recombinant	10 μ g	39,900
090-03941	Interleukin-4, recombinant	10 μ g	50,000
201-13461	TNF- α , recombinant	20 μ g	39,900
Rat			
099-04251	Interferon- γ , recombinant	100 μ g	39,000
096-04261	Interleukin-1 β , recombinant	5 μ g	39,000
093-04271	Interleukin-6, recombinant	10 μ g	39,000
203-14261	TNF- α , recombinant	20 μ g	39,000

レチノイド研究用試薬

レチノイン酸は細胞の分化や増殖、アポトーシス、または脊椎動物の形態形成など多くの生物機能を制御する、いわば生命の中枢的役割を持つ生理活性物質です。生物学的同効物質であるレチノイドを含め、これらは核内に存在する特異的レセプターを介し、ビタミンD同様、ホルモンとしての作用機構が解明される一方で、数種のレチノイドレセプターの発見とともに他の核内レセプターをも含んだ複雑なネットワークが明らかにされました。レチノイン X レセプター (RXR) は、レチノイン酸レセプター (RAR) のホモログとして発見されそのリガンドは長らく不明でしたが、今日では、9-*cis*-レチノイン酸がリガンドとして確立されています。また RAR、甲状腺ホルモンレセプター及びビタミンDレセプター (VDR) とヘテロダイマーを形成することにより各々の応答遺伝子発現の調整に起因し、広く核内レセプターの情報伝達に関与していることがわかっています。

Anti Human Retinoid X Receptor , Monoclonal Antibody

免疫化学用

免疫原 : ヒト RXR β 組換え体	特異性 : ヒト、マウスの RXR β (~ 50kDa) と反応しますが、RXR α 及び γ とは反応しません	実用希釈倍数 : ウエスタンブロット 1:400
形状 : PBS 溶液 (2mg/ml)		
クローン No. : MOK13-17		
サブクラス : IgG ₁		012-17031 100 μ g 65,000 円

Retinoid X Receptor , Human, recombinant, Soln.

生化学用

製法 : ヒト RXR β (rH-2R II BP) の cDNA を組み込んだバキュロウイルス発現ベクターを感染させた Sf9 細胞抽出物より生産	形状 : 本品 2mg/ml に対し、20mM HEPES pH7.9, 0.1M KCl, 0.2mM EDTA, 0.5mM DTT, 20% グリセロール、プロテアーゼ阻害剤を含む溶液	分子量 : 51kDa 用途 : ゲルシフトアッセイ ¹⁾ 、ウエスタンブロッティングのコントロール
		187-01421 50 μ g 33,000 円

- 〔参考文献〕
- 1) Marks, M. S. *et al.* : *Mol. Endocrinol.*, 6, 219 (1992)
 - 2) Berroddin, T. J. *et al.* : *Mol. Endocrinol.*, 6, 1468 (1992)
 - 3) MacDonald, P. N. *et al.* : *Mol. Cell. Biol.*, 13, 5907 (1992)
 - 4) Minucci, S. *et al.* : *Mol. Cell. Biol.*, 14, 360 (1994)

〔関連商品〕

コード No.	品名	規格	容量	希望納入価格(円)
180-01271	9- <i>cis</i> -Retinoic Acid	生化学用	5mg	18,900
204-14171	TTNPB (RAR 選択的アゴニスト)	生化学用	5mg	13,500
017-16621	Am80 (RAR α,β 選択的アゴニスト)	生化学用	5mg	35,000
014-16631	Am580 (RAR 選択的アゴニスト)	生化学用	5mg	35,000
180-01391	Re80 (RAR アゴニスト)	生化学用	5mg	35,000
039-16781	Ch55 (RAR アゴニスト)	生化学用	5mg	40,000
123-04521	LE540 (RAR アンタゴニスト)	生化学用	5mg	48,000
186-01114	<i>all-trans</i> -Retinoic Acid	生化学用	50mg	2,100
182-01111			250mg	4,200
188-01113			1g	12,000

ImmunoStar 発光試薬のみで発売開始

発売記念キャンペーン実施中!

ImmunoStar Reagents

キャンペーン期間▶ ~ 1999年3月31日

プロットイング用

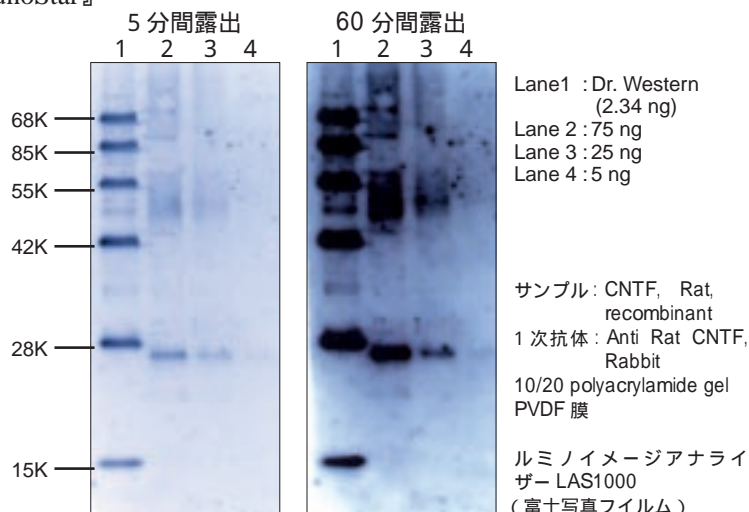
ご好評頂いております超高感度イムノプロットイング検出システム『ImmunoStar Kit』に含まれる発光用試薬のみで構成した『ImmunoStar Reagents』の発売を開始しました。従来のABC法に限らず、様々な手法に対応できるようにシンプルな構成となっております。発売を記念しまして『ImmunoStar』全製品を特別価格にて提供させていただきます。

〔特長〕

1. 発光の持続時間が数時間に延長されています。
2. 発光試薬の自己発光が低く抑えられていますので、S/N比が非常に高くなっています。
3. 発光試薬のみの構成となっておりますので、様々な実験系に対応できます。

〔キット構成〕

内容	1,000cm ² 用	5,000cm ² 用
発光溶液 A	70ml	330ml
発光溶液 B	70ml	330ml
発光溶液 C	30ml	120ml



コード No.	品名	包装	希望納入価格(円)	キャンペーン価格(円)
295-55201	ImmunoStar Reagents	1,000cm ² 用	13,000	8,000
291-55203		5,000cm ² 用	30,000	20,000

〔関連商品〕 ImmunoStar Kit は、発光試薬のほか、ブロッキング溶液、ビオチン標識二次抗体(マウスまたはウサギ) ABC 溶液、希釈用緩衝液、洗浄液から構成される超高感度イムノプロットイングキットです。

コード No.	品名	包装	希望納入価格(円)	キャンペーン価格(円)
291-54603	ImmunoStar Kit for Mouse	1,000cm ² 用	25,000	17,000
297-54703	ImmunoStar Kit for Rabbit	1,000cm ² 用	25,000	17,000

神経伝達研究用

グルタミン酸トランスポーター抗体

神経伝達は、神経伝達物質がシナプス間隙に放出されることにより開始し、受容体に結合後、ニューロンなどに取込まれることにより終了します。グルタミン酸を特異的に取込むグルタミン酸トランスポーターは3種類報告されており、アストログリアには GLT-1、特定のニューロンとブルキンエ細胞には EAAC1、ニュー

ロンとアストログリアには GLAST が局在することが分かっています。

	GLT-1	EAAC1	GLAST
免疫原	C 末端ペプチド	C 末端ペプチド	C 末端ペプチド
精製法	プロテイン A アフィニティ	抗原アフィニティ	抗原アフィニティ
交叉反応	ラット、ウシ	未試験 ¹⁾	未試験 ²⁾
ウエスタンブロット	1:300 - 1:500	1:100 - 1:1,000	1:100 - 1:1,000
免疫組織染色	1:300	1:100 - 1:500	1:100 - 1:500

1) 抗原部位のホモロジーはラット、マウス、ウサギ、ヒトの間では 100%。

2) 抗原部位のホモロジーはラット、マウス、ヒト、ウシの間では 100%。

コード No.	品名	規格	包装	希望納入価格(円)
015-16421	Anti Rat Glutamate Transporter (GLT-1), Rabbit	免疫化学用	200μg	30,000
019-17281	Anti Rat Glutamate Transporter (EAAC1), Rabbit	免疫化学用	100μg	62,000
016-17291	Anti Rat Glutamate Transporter (GLAST), Rabbit	免疫化学用	100μg	62,000

イムノクロマトによりベロトキシン(VT1,VT2)を簡易に検出可能

Verotoxin test wako

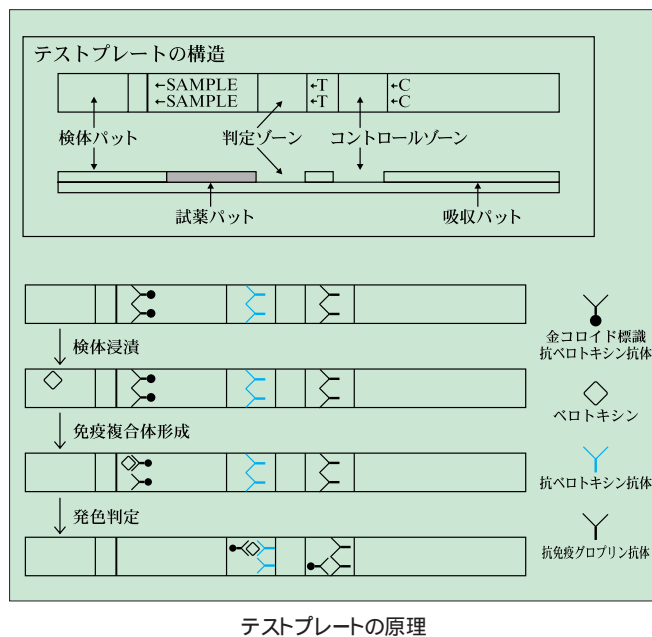
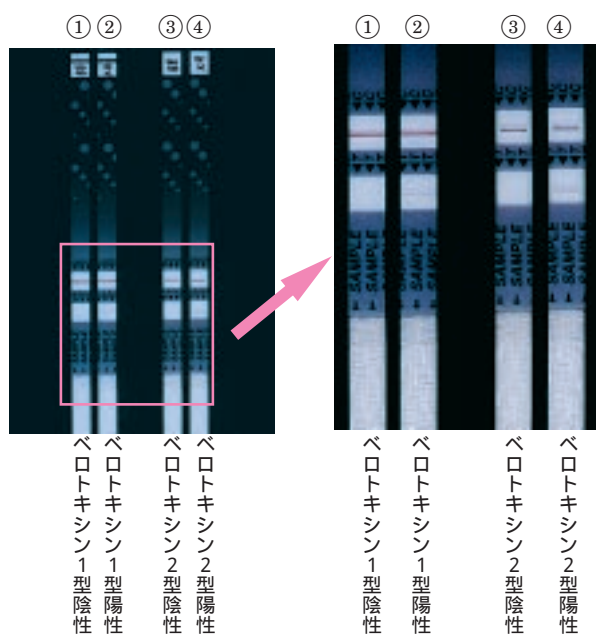
ベロトキシン 1 型, 2 型検出用

病原性大腸菌には、感染により出血性の大腸炎を起こす一群の存在が知られており、腸管出血性大腸菌と呼ばれています。腸管出血性大腸菌による感染症は、指定伝染病に指定されており、食肉をはじめ、食品の汚染が主要な感染源と考えられています。この腸管出血性大腸菌は O-157:H7 等ベロトキシンと呼ばれる毒素を生産する事を特長としており、ベロトキシン生産性大腸菌(VTEC)と称されています。ベロトキシンには、抗原性の違いにより 1 型(VT1)と 2 型(VT2)の 2 種類があり、特に VT1 は志賀毒素と同じである事が知られています。VTEC は、VT1 単独生産株、VT2 単独生産株及び VT1-VT2 両生産株があり、更に VTEC の血清型でもベロトキシン非生産株が存在することから、VTEC の判定にはベロトキシンの生産の有無を確認することが極めて重要です。

本品は、金コロイド標識抗ベロトキシンモノクローナル抗体を使用し、イムノクロマト法により大腸菌が産生するベロトキシンを検出します。本品は体外診断用医薬品ではありません。

- 特長**
- 1: 試薬の調製を必要とせず、ワンステップで簡便かつ短時間に検出できます。
 - 2: VT1 及び VT2 をそれぞれ検出できます。
 - 3: 抗原抗体反応により、ベロトキシンを高感度かつ特異的に検出できます。

- 内容**
- VT1 検出用テストプレート 25 枚
 - VT2 検出用テストプレート 25 枚



コード No.	品名	規格	容量	希望納入価格(円)
299-55101	Verotoxin test wako	ベロトキシン 1 型, 2 型検出用	25 回用	50,000

記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. 06-6203-3741(代)	発行日	1999年1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