

和光純薬工業株式会社



超微量分析用

高純度酸
超純水

pptレベルの超高純度試薬

ふっ素樹脂 (PFA) 製容器使用
(超純水は高密度ポリエチレン容器を使用)

検査成績書添付

コード No.	品名	規格	容量	希望納入価格(円)
148-06935	硝酸(1.42)	超微量分析用	500ml	16,000
089-07555	塩酸	超微量分析用	500ml	16,000
198-11825	硫酸	超微量分析用	500ml	18,000
217-01031	超純水	超微量分析用	1l	5,000

詳しくは、P.32をご参照下さい。

目次

化学家 _____

「ゴットフリート・ワグネル」
芝 哲夫..... 2

総説 _____

「蛍光偏光法による核酸塩基配列の迅速な検出法」
鶴岡 誠..... 6

「Helicobacter pylori」
三瓶 接子、石川喜美男、久川 芳三、
宮 哲正、赤石 清美、梅宮 敏文、
岸沢 充、麻生 晃、屋嘉比康治..... 9

「『届出感染症』に指定されたクリプトスポリジウム症 糞便検査、環境水検査における直接蛍光抗体法の有用性」
井関 基弘.....14

「QOL維持を目指した新癌免疫療法 NIE (neuro-immune-endocrine 細胞の発見)」
海老名卓三郎..... 18

シリーズ _____

< Talking of LAL >

「第36話 エンドトキシンと電子線」
土谷 正和.....25

< How to アポトーシス >

「第7話 アポトーシス実行分子: caspase ファミリー」
三浦 正幸.....26

< 脳科学ーロメモ >

「グリア細胞の NO とニューロン死」
野村 靖幸.....30

テクニカルレポート _____

「HPLC 法による水中農薬の一斉分析」
上森 仁志.....22

新製品フラッシュ _____

超微量分析用高純度酸、超純水..... 1,32

TRACE 社 ウシ血清アルブミン及び他のタンパク製品.....5

TECAN 社 ポラリオン..... 8

パソプレップ 580 他..... 13

マンノーストリフラート..... 16

NADPH-P450 酸化還元酵素 他..... 17

免疫系ケモカイン..... 19

アンジオスタチン 他..... 20

オステオプロテゲリン 他..... 21

ワコーバック Handy ODS、ワコーバックワコーシル Agri-9・専用溶離液 23

海碯(メタノール洗浄品) 他..... 24

TAPS-スルホナート..... 28

rGFP、rBFP 他..... 29

抗 sGC、モノクローナル抗体..... 31

タモキシフェンくえん酸塩、アルデヒド分析用アセトニトリル..... 33

環境分析用溶媒..... 34

環境分析用試薬..... 35

ダイオキシントラップビーズ 他..... 36

ゴットフリート・ワグネル(1831-1892)

大阪大学名誉教授 芝 哲夫

明治初期の日本の化学工業、化学教育に貢献し、その後半生を日本の近代化のために尽くしたドイツ人化学者ゴットフリート・ワグネル Gottfried Wagener にこの「化学大家」シリーズに登場してもらおう。

ワグネルは1831年7月5日に、ドイツのハノーヴァーで官吏の子として生まれた。年少の頃から非常な英才であったが、内気で寡黙な性格であった。後にワグネルに師事した中澤岩太の追憶¹⁾にも、その唯一の欠点はあまりに謙譲で、小心翼翼、自らの長を語らなかつたことであると述べている。16歳で工芸学校を卒業し、翌年ゲッチンゲン大学に入学した。大学では有名な数学者ガウスの影響を受けて、数学、物理学に興味を持った。高等教員試験に合格後、さらにベルリン大学に学び、1852年に得た学位の論文も“Das Pothenotsche Problem”と題する数学に関するものであった。

学位を得たワグネルは、その年パリに赴き、まずフランス語をはじめ、イタリア語、スペイン語、英語、オランダ語などを習得して語学の才能を発揮した。生活のために、数学、物理学の教師、翻訳官などの職を転々とするうちに、デュマの化学講演を聴いて化学の学力も深めた。1860年頃スイスのラ・ショードフォン工業学校に職を得て赴任し、4年間勤務したが、その講義内容は時計制作法など機械工作に関するものであったらしい。この工業学校は学校制度の改革のために解散となり、その後はワグネルの兄弟と溶鉱炉改良や化学工場経営などに携わったが、いずれも事業は失敗に終わった。その時、アメリカ系企業のラッセル商会が日本の長崎に石鹼製造工場の設立を計画し、その技術者としてワグネルが推薦された。



写真1. ゴットフリート・ワグネル

1868年5月15日(慶応4年4月23日)、36歳のワグネルは单身長崎に到着した。ラッセル商会の石鹼工場の計画、設備には問題はなかったが、製品の石鹼に対する当時の日本人の興味と需要がなく、この工場もやがて閉鎖の憂目を見ることになった。その直後の明治3年(1870)に、佐賀藩がワグネルを迎えて、有田の製陶技術の指導を要請した²⁾。ワグネルは有田の窯業者に顔料として高価な天然呉須(ごす)に代えて、酸化コバルトを使用し、旧来の薪による焼成法に代る石炭窯を教えた。欧州における化学知識を日本の製陶に導入することによって、はじめてわが国の陶器製造に近代化の光を当てたのである。

しかし明治4年(1871)の廃藩置県によって、佐賀藩との契約も続かず、ワグネルは文部省から東京の南校に語学教師として招かれることになった。翌5年(1872)には後の東京医学校になる東校の予科教師として就任し、物理、化学、数学、博物学を教えた。

明治6年(1873)にウイーンで開催

される万国博覧会に明治政府ははじめて参加することを決定した。その技術顧問にはワグネルを措いてないとして、副総裁佐野常民からの強い要請があり、文部省から工部省への肩替えの経路を経て、ワグネルは日本からの出品の調達、選定の任務を与えられてウイーンに赴いた。同年5月から6月まで開かれたこの博覧会で日本の伝統工業がはじめて欧州で紹介されたのはワグネルの寄与がなければ不可能であった。この時、23名の技術者が同行したが、博覧会終了後、彼らに欧州の新技術習得の便宜、斡旋の世話を引き受けたのもワグネルであった。帰国後ワグネルによって書かれた博覧会報告書は当時の日本の殖産事業にとっての貴重な資料で、これを見てもいかにワグネルの役割が大きかったかがわかる^{3,4)}。

明治7年(1874)、ワグネルが日本に帰国すると、南校は開成学校と改称されて、ここに製作学教場が設置されていた。これはワグネルがウイーン万国博覧会に赴く前に、佐野常民に建議していたもので、わが国における工業技術者の育成の徒弟制度に代って近代的養成機関の必要性を具申ししていた。ワグネルは当然その教場の教師に任命されて、実地に技術者教育に当った。この製作学教場は精練、工作の2科から成り、約50名の生徒が入学した。明治8年(1875)には文部省の開成学校とは別に内務省の勸業寮勤務も兼ねていた。これは翌9年(1876)アメリカのフィラデルフィアで開催される万国博覧会にワグネルが再び技術顧問としての事務嘱託に任命されることを見越しての措置であったと思われる。ワグネルは勸業寮において、工業製品の試作、改良を指導するとともに、博物館設立にも参画した。また明治

10年(1877)には勸業寮主催で東京で開催された第1回内国勸業博覧会にもワグネルは深く関与することになった。しかし二度にわたる万国博覧会への出張と勸業寮兼務が文部省側には快からず思われたのであろうか、文部省での再雇用はならず、勸業事業の終了とともにワグネルは政府機関から解雇されることになった。

京都府では明治3年(1870)に、明石博高(ひろあきら)が京都舎密局(せいみきょく)を開いて、化学製品の製造殖産事業を開始していた。この舎密局の外国人教師ヘールツが明治9年(1876)横浜司薬場へ移った後に、ワグネルはその後任として招聘されることになった⁵⁾。ワグネルは明治11年(1878)2月から2年間の契約で京都舎密局に雇用され、同局に併置された化学学校(一説には医学校)において理化学を教えるとともに、陶磁器、七宝、硝子、石鹼、ビール、メッキなどの製法改良の研究に取り組んだ。なかでも七宝の彩色法の改良は従来の不透明な釉を改良して美麗清澄な色彩を作出したもので、ワグネルの代表的な業績となった^{2,5)}。また舎密局内に耐火煉瓦を用いた新式陶器焼成窯も完成させ、五条坂に陶磁器実験工場を建設した。京都薬科大学の創始者の一人、小泉俊太郎はこの時のワグネルの理化学講義の聴講生であり⁶⁾、島津製作所の創始者島津源蔵は舎密局に出入りして、ワグネルから理化学器械製作の指導を受けた者であった。ワグネルはこの他に梅津の洋紙製紙場、伏見の鉄工所などの事業も援助し、京都地方における殖産事業の振興に貢献した。大正13年(1924)には、ワグネルの偉業を慕う京都の人々によって、岡崎公園にワグネル顕彰碑(写真2)が建立された。

ワグネルの勤務にはどういうわけか不運が続く。明治14年(1881)に京都府知事となった北垣国道の政策転換によって、舎密局と化学学校は廃止され



写真2. 京都岡崎公園にあるワグネル顕彰碑

ることになり、再びワグネルは東京に舞い戻った。この年、東京大学理学部では英国人教師アトキンソンが帰国したので、ワグネルがその後任として製造化学を教授することになった。ワグネルの東京大学理学部の雇用契約は明治19年(1886)まで続いたが、同年東京大学は東京帝国大学と改められた時、ワグネルは同工科大学応用化学科教師に任ぜられ、現在の東大工学部の基を開いた。

東京大学とは別にワグネルは勸業寮時代からわが国の勸業に対する意見を上申ししていた。その効果もあって、明治14年(1881)に東京工業大学の前身である東京職工学校が創設された。明治17年(1884)ワグネルは東京大学兼務のままこの東京職工学校の製造化学教師に任命された。翌年さらに農商務省も兼務して陶器窯を考案している。この頃、後に旭焼と改名された吾妻焼の製造事業に乗り出し、試験工場を赤坂葵町に開設した。明治19年(1886)に東京職工学校に陶器玻璃工科が新設された時、ワ



写真3. 旭焼皿

グネルは主任教授に就任した。長い遍歴の後、ようやくワグネルはその実力にふさわしい地位を得たといえる。ここには実習工場も併設されていて、ワグネルはかねてより研究を続けていた釉下に色絵を施す新技術によって旭焼を完成させた(写真3)。明治23年(1890)からは浅野総一郎の出資で深川東元町で旭焼製造所を開設して、その製造を開始した。

またワグネルはこの間に「工業の方針」⁷⁾を書いてわが国工業の方針について政府当局に進言するなど、日本の

工業の将来に対する親身の有益な助言を与えることを怠らなかった。東京大学理学部時代の明治15年(1882)には助手の中澤岩太、学生植田豊橋とともに硝子成分の珪酸比率の法則を創案して、珪酸の多少により、珪酸磁器、玻璃磁器、礬土磁器の3種に分類する報告を発表している⁸⁾。ワグネルはまた日本文化に対し深い理解を示し、わが国の度量衡、貨幣制度についての著述もある。特に日本の美術工芸品に興味を抱いて、多くの日本画その他の美術品を収集した。後年それが旭焼のデザインとして生かされた。また明治16年(1883)から19年(1886)までは在日ドイツ人による独逸東亜細亜研究協会の会長を務めた。

ワグネルは来日前からリュウマチの持病に悩まされていた。症状が悪化した明治23年(1890)9月から同25年(1892)1月まで母国ドイツへ帰って保養につとめた。日本に帰国後も栃木県塩原温泉で療養を続けたが、明治25年(1892)11月8日に、東京駿河台の自宅で逝去した。61歳の独身の生涯を日本の地で終り、青山墓地に埋葬された(写真4)。没後45年の昭和12年(1937)11月18日に、ワグネルの功績を称えるために、ワグネル記念碑(写真5)が東京職工学校の後身の大岡山の東京工業大学構内に建立された。

日本を想い、日本の化学工業の発展を親身に願って、多くの寄与を果たしてくれたワグネルの功績を日本の化学者は忘れてはならない。最後にワグネルの伝記の文献名を追記しておく⁹⁻¹¹⁾。

〔参考文献〕

- 1) 中澤岩太「ワグネル先生来歴第一段」梅田音五郎編『ワグネル先生追懐集』72、昭和13年。
- 2) 寄田啓夫「佐賀藩有田におけるワグネルの窯業技術指導とその意義」香川大学教育学部研究報告、第1部、83、1(1991)。
- 3) 土屋喬雄編『G・ワグネル 維新産業建

設論策集成』北隆館、1934。

- 4) 加藤幸三郎「G・ワグネルと殖産興業政策の担い手たち」『講座 日本技術の社会史別巻2 人物篇近代』日本評論社、1986。
- 5) 田中緑紅『明治文化と明石博高翁』57~68、明石博高翁顕彰会、1942。
- 6) 加藤誠軌、園田義雄「ワグネル 日本の近代窯業育ての親」セラミックスサロン、18(1)、57(1983)。
- 7) ドクトルワグネル述「工業の方針(第一、第二)」、明治21年、『ワグネル先生追懐集』193、昭和13年。
- 8) G. Wagener : Ueber Glas, Glasuren, Porzellan, Steinzeug und Feuerfeste Thone. *Diglers Polytechn. Journal*, 246, 30(1882) 『ワグネル先生追懐集』274、昭和13年。
- 9) 植田豊橋『ワグネル伝』博覧会出版協会、大正14年。
- 10) 寄田啓夫「『ワグネル伝』考(1) 生い立ちと来日前の経歴 -」香川大学教育学部研究報告第1部、77、53(1989)。
- 11) 寄田啓夫「『ワグネル伝』考(2) 来日後の経歴」香川大学教育学部研究報告第1部、78、1(1990)。



写真4. 東京青山墓地にあるワグネル墓



写真5. 東京大岡山、東京工業大学構内にあるワグネル記念碑



TRACE ウシ血清アルブミン及び他のタンパク製品

トレース・サイエンティフィックは、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由来製品は、狂牛病プリオンによる汚染がありません。新生仔ウシ由来の血清アルブミン(BSA)、イムノグロブリン、フェチュイン、トランスフェリンなどのタンパク製品は、ニュージーランド産が供給されます。また、トレース・サイエンティフィックのウシ血液由来製品は、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:

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、自国の新生仔ウシ由来血液だけを使用して製造されたタンパク製品は、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、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・サイエンティフィックは ISO 9001 適合企業です。

熱処理や有機溶媒処理を行わない独自の製造法:

原料血清から塩析によって精製しており、熱処理、有機溶媒処理を全く行わずに低温操作しているため、得られるタンパク質はすべて単量体です。また、限外濾過および透析によって、残存する塩や低分子物質が除去されており高純度です。

優れた溶解性:

凍結乾燥粉末のため、高い溶解性が得られます。

コード No.	メーカーコード	品名	容量	希望納入価格(円)
521-32653	303050-00005		5g	6,400
529-32654	303050-00010		10g	8,900
525-32656	303050-00050	Bovine Serum Albumin	50g	15,900
523-32652	303050-00100	Premium Grade	100g	28,400
523-32657	303050-00250	ウシ血清アルブミン	250g	59,300
527-32655	303050-00500	プレミアムグレード	500g	107,300
521-32658	303050-01000		1kg	198,300
528-32663	303051-00005		5g	10,000
526-32664	303051-00010		10g	11,200
522-32666	303051-00050	Bovine Serum Albumin	50g	17,600
520-32662	303051-00100	Protease Free Grade	100g	30,200
520-32667	303051-00250	ウシ血清アルブミン	250g	51,700
524-32665	303051-00500	プロテアーゼフリーグレード	500g	101,000
528-32668	303051-01000		1kg	173,100
525-32673	303055-00005		5g	6,300
523-32674	303055-00010		10g	7,400
529-32676	303055-00050	Bovine Serum Albumin	50g	14,600
527-32672	303055-00100	Cell Culture Grade	100g	24,800
527-32677	303055-00250	ウシ血清アルブミン	250g	54,300
521-32675	303055-00500	細胞培養グレード	500g	80,800
525-32678	303055-01000		1kg	135,100
522-32683	303056-00005		5g	6,800
520-32684	303056-00010		10g	7,900
526-32686	303056-00050	Bovine Serum Albumin	50g	28,400
524-32682	303056-00100	Fatty Acid Free Grade	100g	50,500
524-32687	303056-00250	ウシ血清アルブミン	250g	89,600
528-32685	303056-00500	脂肪酸フリーグレード	500g	147,800
522-32688	303056-01000		1kg	236,300
529-32693	303058-00005		5g	15,100
527-32694	303058-00010		10g	16,800
523-32696	303058-00050	Bovine Serum Albumin	50g	46,700
521-32692	303058-00100	Molecular Biology Grade	100g	72,000
521-32697	303058-00250	ウシ血清アルブミン	250g	109,900
525-32695	303058-00500	分子生物学グレード	500g	200,900
529-32698	303058-01000		1kg	324,700

イムノグロブリン、フェチュイン及びトランスフェリンについては、当社代理店あるいは当社営業員にお問合わせ下さい。

BSA 製品規格

グレード名	プレミアム	プロテアーゼフリー	細胞培養	脂肪酸フリー	分子生物学
タンパク含量	> 96.0%	> 96.0%	> 96.0%	> 96.0%	> 96.0%
純度	> 99.5%	> 99.0%	> 99.0%	> 99.0%	> 99.0%
灰分	< 2.5%	< 2.5%	< 2.5%	< 2.5%	< 2.5%
水分	< 5.0%	< 5.0%	< 5.0%	< 5.0%	< 5.0%
脂肪酸	フリー	----	----	フリー	フリー
プロテアーゼ	フリー	フリー	----	----	フリー
DNase, RNase*	----	----	----	----	< 2.0
細胞培養 (CHO, Vero, SP2/O)	試験済	試験済	試験済	試験済	試験済
ウイルス (BVD, IBR, PI-3)	フリー	フリー	フリー	フリー	フリー
マイコプラズマ	フリー	フリー	フリー	フリー	フリー
イムノグロブリン	フリー	フリー	フリー	フリー	フリー

* DNase, RNase = mKunitz units/mg

蛍光偏光法による核酸塩基配列の迅速な検出法

広島市先端科学技術推進室 鶴岡 誠

1. はじめに

核酸塩基配列の迅速な検出法は、食品や環境中の微生物検査、急を要する臨床診断および各種スクリーニングに有用であると考えられる。最近では、動物や植物等のゲノム情報関連の基礎研究手法や応用技術の一つとして期待されている。また、核酸系医薬品に関する基礎または応用研究にも用いることができると考えられる。

検出法が迅速・簡便であることにより、実地検査等の迅速化のみでなく、基礎研究におけるスクリーニングや各種検証実験においても大きな効果が期待されることは知られていることとされる。

表題の蛍光偏光法は偏光蛍光解消法等と呼ばれる場合もあるが、この方法は、溶液中の分子運動に関わる研究や¹⁾、免疫反応および核酸ハイブリッド形成反応（ハイブリダイゼーション）の基礎または応用研究に用いられており、筆者らも研究を重ね、本法の迅速・簡便な検出法としての可能性に言及している²⁻⁴⁾。

平成8年春から夏にかけて、病原性大腸菌（腸管出血性大腸菌、EHEC）による感染症により日本で数千人規模の被害が発生したが、筆者らは蛍光偏光法により、この感染症の主要原因といわれるペロ毒素（型および型）タンパク質の遺伝子検出を行った⁵⁻⁸⁾。これらの実験により、同遺伝子の迅速検出の可能性については指摘できたが、実用を考えるとさらに実験検討を要する点が多いと考えられた。今回、かねてより検討を計画していたマイクロプレート対応の蛍光偏光リーダーを用いて、筆者らが研究した遺伝子検出法を迅速・簡便性の観点から検証する機会を得た。

2. 蛍光偏光法・概説

蛍光偏光法の基礎理論としては、古くは1920年代にPerrinによるラテン語の論文が知られており、その後、Weberにより詳しい理論的説明がなされている^{9,10)}。これらの論文には、蛍光偏光法の指標の一つである蛍光偏光度 P に関する以下の理論式が説明されている。

$$(a) \quad \frac{1}{P} = \frac{1}{P_0} + \left(\frac{1}{P_0} - \frac{1}{3} \right) \frac{RT\tau}{\eta V}$$

上式(a)を簡単に説明すると、 P は偏光度、 P_0 は絶対0度における偏光度、 R は気体定数、 T は絶対温度、 τ は蛍光寿命、 η は溶液の粘度、 V は蛍光物質の実効体積である。式(a)より、偏光度は、他の変数が一定の条件では、温度が低いほど、蛍光寿命が短いほど、粘度が高いほど、そして実効体積が大きいほど大きくなること分かる。

そこで、溶液の温度、粘度が一定のもとで、ある一定の蛍光物質（蛍光寿命は不変）の実効体積が大きくなれば、偏光度は大きくなるはずである。実際は、蛍光特性を変えずに蛍光物質の体積を変化させることは非常に困難で、また応用上の意味からも、ある実験対象とする物質（例えばタンパク質や核酸など）にいろいろな方法で、一定の蛍光物質を標識（ラベル）する方法をとることが多い。例えば、ある塩基配列をもった核酸に蛍光物質を標識したものが、その塩基配列と相補の配列をもつ別な核酸とハイブリダイゼーションにより結合した場合、蛍光物質を含む分子全体からすると結合前よりも実効体積が大きくなる。このとき蛍光偏光度をモニターしていれば、反応後に偏光度が大きくなっているはずである。以上は、蛍光偏光法により核酸の結合反応を測定する方法の一例である。なお勿論、粘度等、他のパラメータの変化に着目しても興味深い実験が考えられる。逆に、実験の注意点としては、

例えば溶液の温度や粘度ができるだけ一定となるよう厳しく管理する必要がある。

実は、蛍光標識された物質に結合反応や分解反応等により、何らかの実効体積の変化が生じた場合に、本当に粘度や蛍光寿命に変化がなく一定であるのかどうかについては、簡単に証明できるわけではない。筆者らも、核酸ハイブリダイゼーションや抗原抗体反応に関する過去の実験において、いくつかの検証実験を行い、粘度や蛍光寿命の変化が上記の実効体積の変化に比べ非常に小さく影響はほとんど無視できるであろうということを確認しているが、余白の都合上詳細は別な機会にゆずることとする。

3. 蛍光偏光法による遺伝子検出の原理・概説

遺伝子や核酸の検出法あるいは測定法は、いろいろな分野でさまざまな方法が提案されているが、ここでは蛍光偏光法によるものを簡単に説明する。

蛍光偏光法は、結合体（複合体）と非結合体（非複合体）の分離操作（以下 B/F 分離と呼ぶ¹¹⁾）を必要としないため、非常に迅速で簡便な検出または測定が可能であると考えられる。筆者らの行った蛍光偏光法による DNA 測定法の手順と原理を以下に記す。20 ~ 30 塩基程度のオリゴ DNA に蛍光物質を標識した蛍光標識 DNA（DNA プローブ試薬）を用意し、これをサンプルに加える。DNA プローブ試薬の塩基配列は、測定対象の塩基配列と相補な配列を選んでおく。サンプル中に測定対象の遺伝子（またはその一部）が存在すると、これに DNA プローブ試薬が、DNA ハイブリッド形成反応により結合する。この結合によって、DNA プローブ試薬の見かけ上の体積は増大する。この変化は上記種類の試薬のみを加えることで生じ、直

接、蛍光偏光度の変化として測定される。

このように手順は比較的簡単であるが、核酸のハイブリッド形成反応を高い再現性で検出することはそれほど容易ではない。過去に、蛍光偏光法により核酸のハイブリッド形成反応について研究されているが^{12,13)}、その反応速度および迅速性の観点から研究された例はみられなかった。筆者らはまず、5' 末端に蛍光物質フルオレセインを標識した一定の塩基配列のオリゴ DNA (24 塩基長) およびこれと相補配列の DNA (同塩基長) を合成し、蛍光偏光法により、これらのハイブリッド形成反応について、溶液の塩濃度および温度でどのように反応速度が変化するかを研究した³⁾。また、求めた条件により微生物遺伝子の増幅産物の検出実験を行い、実際にこの条件が遺伝子増幅産物の検出にも適用可能であることを確認した^{3,5,7,8,14)}。

なお上記以外に、蛍光偏光法の別な応用例として、蛍光標識プライマーを用いることにより遺伝子の増幅反応をほぼ同時にモニターできることが報告されている¹⁵⁾。ただし近年、国内外で研究開発が進み、B/F 分離操作を必要としない迅速な DNA 測定方法がいくつか提案されていることを指摘する。

4. 蛍光偏光法による微生物の遺伝子検出

前節で蛍光偏光法による微生物遺伝子の検出について記したが、これらの研究で用いた装置は市販の蛍光スペクトルアナライザーにオプションの偏光解析ユニットを取り付けたものであり、基本的に標準キュベット(内寸 10 × 10 mm)を使用した。この場合、多数のサンプルを測定するには、キュベットを順次取り替えながら測定する必要があった。また高価な石英製キュベットを用いる場合、数本のをサンプルを変える度によく洗いながら使用する事態も生じた。しかし、より迅速・簡便な測定を行うためには、マイ

クロプレートのように、複数のサンプルを同時に分注可能な容器を用いることができ、しかもそのすべてのサンプルを自動で測定する装置が望まれる。

筆者らは、96 穴タイプ・マイクロプレート中の蛍光物質の偏光度を自動かつ短時間に測定できる装置を用いて、その測定感度および再現性について検討を行った。さらに共同研究により開発した試薬¹⁶⁾を用いて、試験的に、腸管出血性大腸菌のベロ毒素型遺伝子の検出実験を行った。

(1) 検出条件(概略)

本実験に使用した装置¹⁷⁾は、一定の溶媒条件における FITC の偏光度を 20 mP (P=0.02) に指定することになっていて、偏光度の補正係数(G 値)を求めて絶対値を求めるようには設計されていないが、基本的に、偏光度の相対変化が測定できれば DNA ハイブリダイゼーションや免疫反応の検出には差し支えない。装置の励起光および蛍光側フィルターの中心波長はそれぞれ 485, 535 nm とし、光源のフラッシュ回数は 100 とした。マイクロプレート 96 ウェルの全測定時間(例)は約 3 分(1 ウェル当り約 2 秒)であった。

病原性大腸菌 O-157 のベロ毒素型遺伝子の一部約 200 塩基区間を非対称 PCR によって増幅した^{6,7)}。

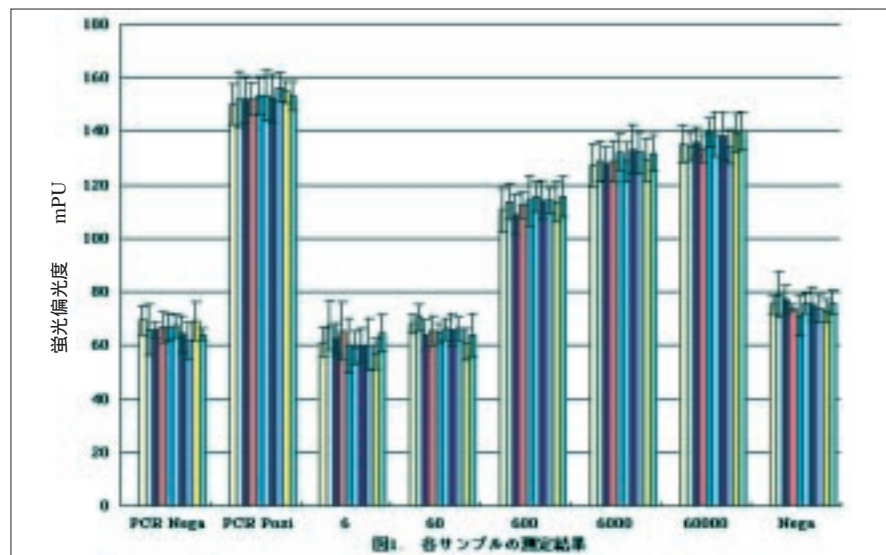
プローブ試薬と遺伝子増幅産物と

のハイブリダイゼーション条件は既報とほぼ同じだが^{3,7)}、試薬混合後マイクロプレートを 40 °C で 10 分間保温し測定した。試薬およびサンプル量はそれぞれ 200 および 20 μ l であり、プローブ試薬の最終濃度は 0.5 nM とした。

(2) 迅速かつ簡便な遺伝子検出

図 1 に実験結果の例を示す。縦軸は蛍光偏光度である。棒グラフは、各々 10 本の細い棒が 1 つの集団を作っており、集団は 8 つある。細い棒の各々は、6 つのウェルに同一のサンプルと試薬を加えた測定結果の平均値を示し、左から 3 分間隔で測定した。すなわち、1 つの集団は約 30 分間の測定データを示す。細い棒のそれぞれに付されているエラー・バーは、6 つのウェルの測定結果のサンプリング標準偏差(n=6)を示す。各集団は、プローブ試薬と各サンプルを混合したもので、左から、純水を加え PCR を施した陰性サンプル(PCR Nega)、陽性コントロールである PCR 産物(PCR Posi)、大腸菌 O-157 の 6 菌体量サンプルに対する PCR 産物、同 60 菌体量、同 600 菌体量、同 6000 菌体量、同 60000 菌体量、そしてサケ精子 DNA を含む陰性サンプル(Nega)である。

図 1 より、偏光度は、陰性のサンプル(PCR Nega, Nega)に対してはいずれも低く、陽性の標準サンプル(PCR Posi)では十分高い。また本実験によ



り、遺伝子増幅前のサンプル中に大腸菌 O-157 (ベロ毒素型遺伝子保有) が 600 菌体量以上存在すればこれを検出できると判断された。

以上のように、本実験の条件、試薬および測定装置を用いることで、微生物遺伝子の増幅産物 (マイクロプレート中、96 サンプル) を、核酸ハイブリダイゼーションの反応時間を含め 1 サンプル当たり約 8 秒で検出できる可能性が示された。この反応および処理の速度は、今後、遺伝子検出や核酸に関する基礎的研究およびスクリーニング等にとって意義深いものと考えられる。

5. おわりに

核酸の検出や測定の分野においても、迅速・簡便であることはある意味で理想に近い目標と思われるが、本実験例により、少なからず遺伝子の「迅速・簡便」な検出に近づくことができたと考えている。

蛍光偏光法は、核酸ハイブリダイゼーションの解析あるいは検出手法としてはまだ新しく、引き続きさまざま

なケースでの実験・検討が必要である。また今後、他の生体関連成分の分析や基礎研究手法としての新たな展開も期待できると考えられる。蛍光偏光法は、計測の科学技術的観点からは、筆者が過去に研究した、光磁気効果を用いた磁性薄膜の磁化過程の解析手法と非常に共通点が多い。一般に、検出や分析の対象物質により分野等を分類することは多いが、このように、検出法や計測の科学技術に「光をあてる」ことも興味深いことと思われる。

なお、本研究を実施するにあたり、和光純薬工業株式会社・ME 開発部並びに関係各位のご協力に感謝する。

〔参考文献〕

- 1) Azumi, T. and McGlynn, S. P. (1962) Polarization of the luminescence of phenanthrene. *J. Chem. Phys.* 37, 2413.
- 2) Tsuruoka, M., Tamiya, E. and Karube, I. (1991) *Biosensors Bioelectron.* 6, 501.
- 3) Tsuruoka, M., Yano, K., Ikebukuro, K., Nakayama, H., Masuda, Y. and Karube, I. (1996) *J. Biotechnol.* 48, 201.
- 4) Tsuruoka, M., Yano, K., Ikebukuro, K., McNiven, S., Takeuchi, T. and Karube, I. (1996) *Anal. Lett.* 29, 1741.
- 5) 鶴岡, 本田, 軽部 (1997) *日本臨床*, 55, 741.
- 6) Tsuruoka, M., Fukuhara, K., Murano, S., Okada, M., Honda, T. and Karube, I. (1997) *Int. Cyber Cong. Anal. BioSciences (CCAB97)*, Pharm. Soc. Jpn.
- 7) Tsuruoka, M., Fukuhara, K., Murano, S. and Okada, M. (1998) *Nucleic Acids Symposium Series*, Oxford University Press, 39, 115.
- 8) 村野, 福原, 岡田, 鶴岡, 伊藤, 河本, 山岡, (1998) *日本食品衛生学会*, 第 75 回学術講演会講演要旨集, p. 23.
- 9) Perrin, M. F. (1926) *J. Phys. Radium* 7, 390.
- 10) Weber, G. (1953) *Adv. Prot. Chem.* 8, 415.
- 11) 軽部, 民谷編著 (1994) *バイオエレクトロニクス*, 朝倉書店, p.p. 62-78.
- 12) Herning, T., Kobayashi, S., Tamiya, E. and Karube, I. (1991) *Anal. Chim. Acta.* 244, 207.
- 13) Murakami, A., Nakaura, M., Nakatsuji, Y., Nagahara, S., Qui, T-C. and Makino, K. (1991) *Nucleic Acids Res.* 19, 4097.
- 14) 藤井, 大田, 鶴岡, 河野, 猿田, 保科, (1998) *日本化学会*, バイオテクノロジー部会, 3C115.
- 15) Tamiya, E. and Karube, I. (1993) *New Function. Materials*, B, 99.
- 16) 研究用として西川物産株式会社により販売。
- 17) TECAN 社製、ポラリオンを使用。



分子生物学でのバインディングアッセイに最適な

蛍光偏光測定装置

蛍光偏光マルチプレートリーダーポラリオン

医療用具承認番号 第 13BY1220 号



〔アプリケーション例〕

分子生物学分野での結合研究
(protein, nucleic acid, carbohydrate, lipid, drug)
タンパク質 - DNA の結合相関性研究
タンパク質 - タンパク質結合研究
免疫研究
酵素分析
(protease, DNase, RNase)
DNA ハイブリダイゼーションの検出
レセプター、リガンド結合研究

蛍光偏光マルチプレートリーダーポラリオンは、分子間相互作用を高感度検出できるマイクロプレートを用いた蛍光偏光測定装置です。反応前の固定化、反応後の結合 / 未結合 (B/F) の分離のための抽出分離、洗浄が不要で、ホモジニアスな系で測定可能です。

分子生物学・創薬探索・イムノアッセイでの分析、コンビナトリアルケミストリー、HTS (ハイスループットスクリーニング) の迅速化に大きく貢献します。

〔特長〕

マルチ機能	波長範囲
・ 蛍光偏光測定機能	・ 300 ~ 700nm (蛍光偏光測定)
・ 一般蛍光測定機能	・ 230 ~ 700nm (一般蛍光測定)

優れた測定性能

- ・ < 8mP Std. Dev. at 1nM fluorescein, 96 well plate 蛍光偏光測定
- ・ < 1.5pg fluorescein / well (200μl/well) 一般蛍光測定

マルチプレート対応

- ・ 6 ~ 96 ウエルプレート、384 ウエルプレート

温度制御機能搭載 (標準装備)

- ・ (室温 + 5) ~ 42

攪拌機能搭載 (回転、直線の 2 モードを標準装備)



コード No.	メーカーコード	品名	内容
525-31291	TCNF129.002	ポラリオン	1 台

Helicobacter pylori

三瓶接子¹、石川喜美男¹、久川芳三²、宮 哲正²、赤石清美³、
梅宮敏文⁴、岸沢 充⁵、麻生 晃⁶、屋嘉比康治⁷

はじめに

1983年、強酸性下の胃内で *Helicobacter pylori* (以下 *H.pylori* と略) の分離に成功した Warrem と Marshal により、胃や十二指腸の病変と *H.pylori* のかわりについて多くの研究者によって研究されるようになった。現在、調査によると、慢性胃炎と診断された50才代の日本人の八割は、*H.pylori* に感染していると言われている。若年(10才代)に *H.pylori* に感染し、放置すると、表層性胃炎を引き起こし炎症が持続すると前癌状態である慢性萎縮性胃炎、疫学的研究から胃潰瘍や胃癌の発生、進展へ関与していることが推測されるようになった。特に1994年、世界保健機構(WHO)の癌研究機関の報告により *H.pylori* が確実に発癌性をもつ物質(definite carcinogen)と認定されてから胃癌と *H.pylori* の関係がにわかに注目を浴び胃疾患の概念は1本の糸で関連づけられるようになった。その為、*H.pylori* 菌の感染の病理学的意義に関心が集まり、胃生検の病理診断には、組織学的所見に加え、感染の有無についても併記されるのが通例となってきている。

I. *Helicobacter pylori* の病理組織学的検査法

現在、*H.pylori* (図1、2、3)の検索には、胃内視鏡検査を用いての組織からの培養、検鏡、およびウレアーゼテスト、PCR法などがある。感度の高いものは、遺伝子を利用したPCR法であるがコストが高く一般検査室でのルーチン化に問題を残している。迅速性や簡便性を考えるとウレアーゼテストであるが、除菌後などのように菌量が少ないと検出が困難である。また、

特異度では組織培養であるが、判定までに時間を要し、精度が一定しない欠点がある。スクリーニングとして、血清抗 *H.pylori* 抗体判定が簡便さで利用されている。しかし、除菌治療後においては抗体の低下まで、時間を要し、除菌効果の判定には適さない。現在、*H.pylori* の検索法として病理組織学的検査法が推奨され、多くの施設で行われている。今回は、H・E染色、ギムザ染色、Warthin starry (以下 W・S と略)法、酵素抗体法および In Situ Hybridiation (以下 ISH と略)の写真の一部を掲載する。通常の病理組織学的検査法は、ホルマリン固定後 Pathoprep568 などのパラフィン薄切標本による H・E 染色法が基本となるが、*H.pylori* の検索としては、特異的でなく、他の菌やアーチファク的なゴミなどと鑑別が困難

な場合もある。しかし、経験豊富な病理医は H・E 染色での組織学的所見で *H.pylori* の存在が予測可能である(図4、図5-1)。しかし、H・E 標本では、少数感染の場合、偽陰性となる場合があるため、各種特殊染色を行うことにより、確実に観察可能となる。各種染色法の特徴を下記に記載する。
ギムザ染色(図5-2): *H.pylori* は淡い青色に染色されるが、除菌後や

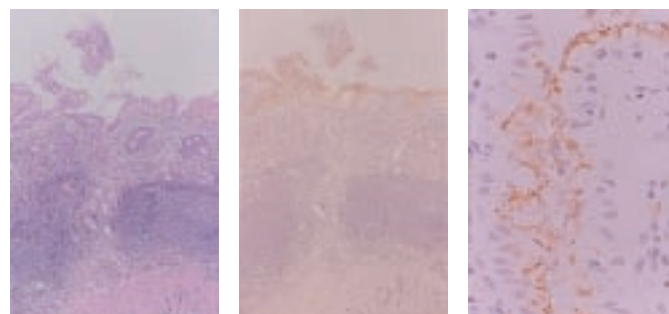


図4 慢性胃炎
粘膜は萎縮性であり、粘膜表層部は淡青色に染色され、リンパ濾胞の核は青色に染色されている。右では、同症例の *H.pylori* 抗体を用いた酵素抗体法で、H・E 染色で淡青色に染色された粘膜表層部の *H.pylori* 菌に対して陽性を示している。

(¹KIA(株)ケーアイエー細胞病理研究所、²(株)保健科学研究所、³(株)エスアールエル、⁴千葉大学医学部第一病理、⁵千葉社会保険病院、⁶帝京大学市原病院病理部、⁷帝京大学市原病院第三内科)

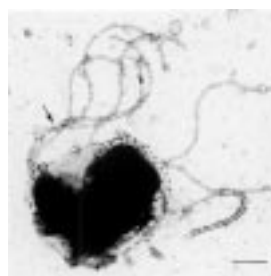


図1 難治性胃潰瘍
(*H.pylori* の電顕像)
H.pylori のネガティブ染色像
(bar = 500nm)
菌体単極から伸びる4本の鞭毛を認める。



図2 難治性胃潰瘍(*H.pylori* の電顕像)
H.pylori の透過型電顕像弱拡大
(bar = 1μm)
H.pylori は、集簇して上皮細胞(Ep)の微繊毛(Ci)に接して認める。
C 菌体は縦断面で桿状からくの字状、横断面で円形から楕円形を呈する。

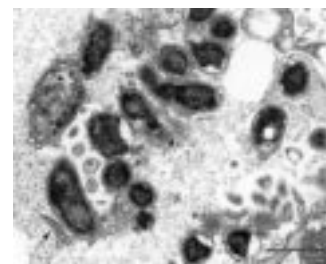
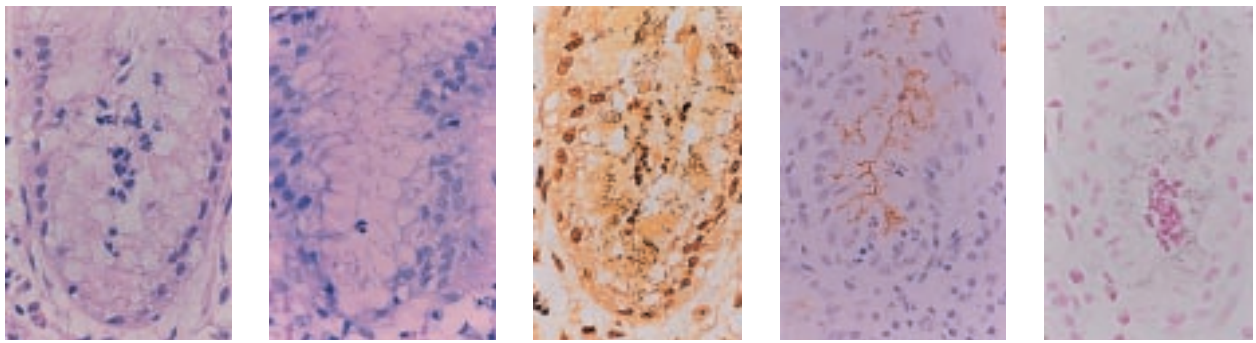


図3 *H.pylori* の透過型電顕像拡大
(bar = 1μm)
細胞膜で包まれた菌体内部にやや電子密度の低い核様構造物(n)を認める。
また、菌体の周囲に有芯構造(矢印)の鞭毛を認める。



① H・E 染色 ②ギムザ染色 ③ W・S 染色 ④酵素抗体法 ⑤ ISH 法

図 5. 慢性胃炎 慢性胃炎の症例で、H.pylori 菌体(矢印)は、①の H・E 染色では淡青色、②のギムザ染色で青色、③の W・S 染色でらせん状 - 短紡錘形の黒色を示している。④の酵素抗体法では褐色、⑤の ISH 法で青黒色を示している。

H.pylori が少数の場合、H.pylori の短紡錘形桿菌では、観察されにくい。また、今回の検索では、萎縮性胃炎や胃癌などの症例で、他の菌も検出され、鑑別が困難なものもあった。

W・S 法(図 5-3):らせん形の H.pylori 菌体が鮮明に鍍銀されるため、観察に優れている。しかし鍍銀染色法であるため操作が複雑で、手技的に安定性、再現性に欠け、染色に長時間有する。また、使用する容器や時間に厳密さが要求され、銀粒子付着によって菌体との鑑別が困難となる場合も多い。

グラム法：染色操作は簡便で多くのグラム陽性菌との鑑別やゴミなどの鑑別ができるが、操作方法で分別の仕方によっては、細胞質などと同一に染色され観察しにくい点もある。ギムザ染色同様特異性に欠ける。

アクリジン・オレンジ染色：染色操作は簡便で、可視性に優れているが、非特異的反応のため、多少の厳密さや蛍光顕微鏡が必要となるため、限られた施設でしか実施できない欠点がある。H.pylori は黄橙色から赤橙色に明瞭に蛍光色を示す。

免疫染色(図 5-4): 抗原抗体反応の特異的反応を利用した確実性のある方法である。方法には、直接法、間接法、PAP 法、ABC 法、SAB 法、LSAB 法などがあり、発色方法の違いによって異なった色に観察される。特殊染色

で判定困難な耐性菌や他の菌体との鑑別に用いられる。H.pylori は、固定法によって抗原性が低下したり、再現性、安定性に欠ける場合がある。その為、各メーカーの抗体に適した抗原の賦活化が必要となる。抗原の賦活化には、一般的に蛋白分解酵素であるトリプシンやプロテアーゼが用いられる。最近では、熱処理を利用したオートクレーブや煮沸法、圧力鍋を用いた方法、およびマイクロウェーブ法などがある。それぞれの方法を用いて予備実験が必要である。今回の検討では、ホルマリン固定切片にマイクロウェーブ処理を行うことにより、下記の ISH 法と同様な結果を得ている。酵素抗体法では、微量な H.pylori においても検出されるため除菌後の coccoidform (球状になる) 現象を起こした H.pylori を明瞭に観察できる。最近、一部の施設において酵素抗体法を用いての H.pylori の Grading が行われているが、著者らも表 1 の判定基準に従って病理診断報告書に H.pylori の有無を併記している。

ISH 法(図 5-5): H.pylori の核酸の塩基配列に結合する既知塩基を用いて発色するため、特異性が最も高く、観察に優れている。除菌後の少数の H.pylori の検出も可能である。しかし、コストが非常に高く、操作も複雑であるため、ルーチン化は困難であると思われる。

以上のことから、H.pylori の検索には、H・E 染色と酵素抗体法の組み合わせが有用であると思われる。

II .H.pylori 感染症の治療と診断

H.pylori 感染症が消化性潰瘍や慢性胃炎の主たる原因であることが明らかにされてきたが、さらに、最近では胃癌や胃 MALT リンパ腫との関連も強く示唆されるようになり、H.pylori の除菌治療の確立が急がれるところである。しかし、わが国においては保険診療が認められていないため、除菌治療についての大規模な研究が不可能であり、欧米に比べて 2 ~ 3 年の遅れをとっているのが現状である。

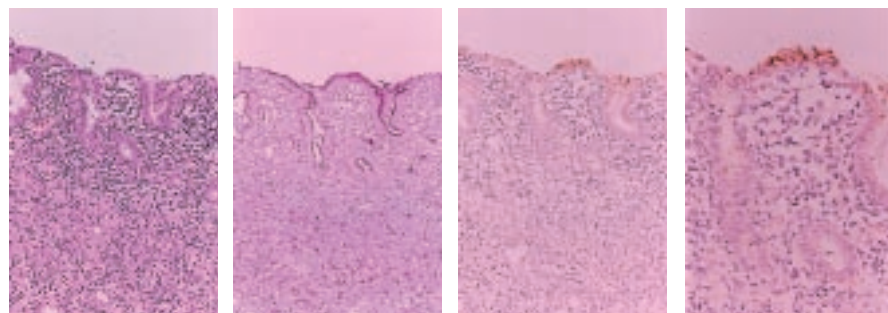
除菌治療に対する考え方は世界においても変遷してきた。1990 年のシドニーの世界消化器病学会においては再発性、出血性十二指腸潰瘍を除菌の対象とするとの statement が発表されたが、1994 年には米国の国立衛生研究所(NIH)が Consensus Development Conference において「初発、再発を問わず H.pylori 陽性の消化性潰瘍は酸分泌抑制薬に加えて抗生物質を用いて治療すべきである」と全ての H.pylori 陽性の消化性潰瘍を対象とするとのコンセンサスが発表されている。さらに、1996 年の欧州のマーストリヒト・コンセンサス・カンファレンスにおいては消化性潰瘍、MALToma、

表 1 .Helicobacter pylori(酵素抗体法)判定基準 *

-	陰 性
±	胃粘膜表層の粘液中に 1 カ所の腺窩に 5 ケ以下の浮遊がみられる。(図 6 左、右)
1 +	胃粘膜の 1 カ所の腺窩の被覆上皮のみ付着して存在する(5 ケ以上)(図 7)
2 +	胃粘膜の被覆上皮のみ付着して腺窩の数カ所に散在する。(図 8)
3 +	胃生検材料にほぼびまん性に多数付着している。(図 9)

*1 H. pylori 検索の場合には、検出率を高めるため、幽門前庭部と胃体部中部の大湾部を含む 2 カ所以上を採取。

*2 腸上皮化生、再生上皮および潰瘍や癌などの壊死部分では、菌体の検出率が低くなる。



① H・E 染色 ② Alcian-bluePAS 重染色 ③ 酵素抗体法 ④ 酵素抗体法の拡大像

図 7. 胃癌(Group V signet ring cell carcinoma)

胃生検材料で Group V と診断された症例で、粘膜下に多数の signet ring cell が認められる。②の Alcian-bluePAS 重染色では signet ring cell の粘液が赤紫色の陽性を示している。③では粘膜表層部に沿って H. pylori 抗体で陽性(1 +)を示し、H. pylori 菌が明瞭に確認できる。④は、その拡大像で H. pylori 菌が陽性を示し、らせん状 - 短紡錘形の形態がわかる。

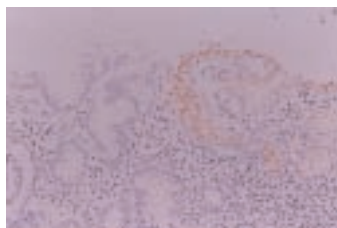


図 8. 慢性胃炎
右半分の粘膜上皮が陽性(2 +)を呈しているが、左半分の腸上皮化生を起こした部分は陰性である。

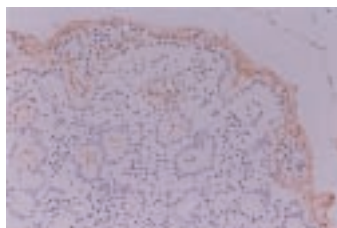


図 9. 慢性胃炎
慢性胃炎の症例で、粘膜上皮がびまん性に陽性(3 +)を呈している。

早期胃癌切除後、重症胃炎まで除菌の対象が拡大されており、これらの疾患の多い我が国としても明確な治療指針ないし方法を早急に確立する必要がある。

除菌治療の現状は世界的には酸分泌抑制剤と二種の抗菌剤を組み合わせた新三剤療法がスタンダードとなつつあるが、わが国においては昨年、やっと新三剤療法の臨床治験が開始された。PPI と抗菌薬二剤を用いた三剤療法すなわち新三剤療法は 1994 年にイタリアの Bazzoli らによって初めて報告された。その後、新三剤療法に関していくつもの報告が続いたが、それぞれの報告で PPI および抗菌薬の

種類および量、投与期間などがまちまちであり、新三剤療法を確立するためには十分な規模の検討を行い最も有

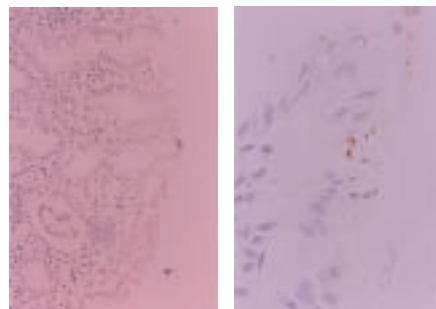


図 6. 難治性胃潰瘍
右は、左矢印の拡大像で数個の H. pylori は褐色をしている。

用なレジメンを明らかにし、スタンダードとなる治療法を確立する必要ができた。そこで、MACH1 と称される多国籍施設、二重盲検、無作為、コントロール試験がヨーロッパを中心に行われ、新三剤療法の効果および有用性について検討し、それぞれの組み合わせのレジメン間の成績を比較した。MACH1 では OME、AMO、CAM、MNZ および placebo を用いて 6 つのレジメンを作り、各々の選択肢には 100 例以上の症例が含まれておりその除菌率および副作用について検討している。投与量は OME 20mg、AMO 1000mg、CAM 250mg または 500mg、MNZ 400mg のそれぞれ 1 日 2 回投与を組み合わせ、すべて一週間投与した。結果は表 2 に示すように、OAC 500 では APT(all patients treated)にて 96.4% ITT (intension to treat)に

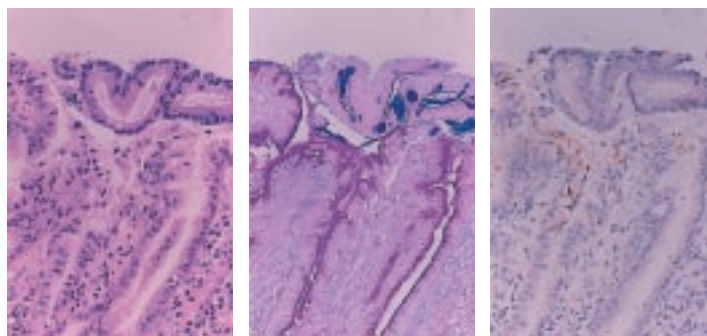


図 10. 慢性胃炎
左 H・E 染色、中 Alcian-blue PAS 重染色、右 酵素抗体法
腸上皮化生を示した中図では、腸上皮化生の部分は青色を示し、右の酵素抗体法では、その周囲は H. pylori が陰性を示している。しかし、PAS 陽性部分は H. pylori の存在を観る。

表 2.

Treatment	APT	PP	ITT
OAC250	83.8 (78.9-90.6)	85.1 (78.3-91.8)	78.5 (72.2-88.8)
OAC500	96.4 (92.9-99.9)	98.0 (95.4-100)	90.6 (85.3-95.9)
OMC250	94.6 (90.4-98.8)	94.3 (89.9-98.7)	89.7 (84.3-95.2)
OMC500	89.8 (84.4-95.3)	82.5 (87.4-97.5)	85.5 (79.3-91.7)
OAM	79.0 (71.7-86.3)	81.6 (74.5-88.7)	75.8 (68.3-83.3)
OP	0.9 (0.0-2.6)	0.9 (0.0-2.7)	0.8 (0.0-2.5)

ATP, all patients treated; PP, per protocol; ITT, intention to treat; CIL, confidence interval limits; OAC, omeprazole + amoxicillin + clarithromycin; OMC, omeprazole + metronidazole + clarithromycin; OAM, omeprazole + amoxicillin + metronidazole; OP, omeprazole + placebo.

第4回 日本ヘリコバクター学会 シンポジウム1 1998.6.18.

て90.6%、OMC250ではAPTにて94.6%、ITTにて89.7%とこの二つのレジメンにて除菌率が高かった(Lind T, et al, Helicobacter; 138-144, 1996)。この検討ではOMEとAMOとの併用では、CAMは500mgの1日2回投与を要するが、OMEとMNZ 400mgとの併用ではCAMは250mgで十分であった。すなわちMACH1で最も有効なレジメンはOME 20mgにAMO 1000mg + CAM 500mgまたはMNZ 400mg + CAM 500mgの組み合わせを1日2回行う投与方法であった。同様にわが国においても新三剤療法が行われているが、これまでの報告では一日の投与量としてはOME 20 ~ 40mg、LAN 30 ~ 60mg、AMO 1000 ~ 2000mg、CAM 400 ~ 800mg、MNZ 500 ~ 2250mgなどが(OL)AC、(OL)MCの組み合わせで1 ~ 2週間投与されている。これらの成績は(OL)ACで79.2 ~ 96.3%、(OL)MCで70 ~ 100%であった。どちらの組み合わせでも90%前後の除菌率が達成されており、除菌療法としては有効なレジメンであることが確認されている。以上のように新三剤療法は十分な除菌率が得られ、比較的副作用が少なく、またコンプライアンスも良好な治療法である。新三剤療法、とりわけ、OACはわが国の除菌治療の主流と成りつつある。また、最近の話題としては耐性菌の問題が挙げられる。特に、わが国においてはCAMに対する耐性菌

れている。

III .H.pylori 感染と内視鏡像

これまで、H.pylori 感染の重要性については胃、十二指腸潰瘍の病態への影響について多数発表されている。明らかになったことはH.pylori 除菌によって胃、十二指腸潰瘍の再発が減少することである。図11は6ヵ月以上治癒しなかった難治性胃潰瘍だが、図12は除菌治療によって4週にて治癒した時の内視鏡像である。再発の予防

が増加しており、除菌率の低下の理由となっている。しかし、一昨年に行われたMACH2においてはPPIを用いた三剤療法ではある程度効果のあることが報告さ

だけでなく、難治性潰瘍の治療効果も改善することを示唆するものである。また、除菌治療によって組織学的胃炎が改善することも明らかとなってきたが、組織学的胃炎の改善と内視鏡的胃炎の改善も同じに生じることが期待されるが、これまで、除菌治療による内視鏡的胃炎像の変化についての報告は極めて少ない。図13は除菌成功群2症例における除菌前後の内視鏡像である。上段左(症例69)は除菌前の前庭部~胃角部の所見である。明らかな斑状発赤が胃角部に認められる。上段右はその除菌後14ヵ月の同部位の所見だが発赤が明らかに改善している。下段は別の例(症例68)の体部大弯の所見を比較しているが、左の除菌前にはびまん性の発赤が明らかだが、除菌後24ヵ月には発赤が著明に改善している。すなわち、胃体部粘膜の発赤像が除菌治療によって改善することを明らかにしている。著者らは発赤像以外にびらん像についても検討したが、びらん所見はH.pyloriの有無に関わらず出没することが明らかになっ

図 11.



図 12.



図 13.

た。以上の様な胃体部粘膜の発赤像が H.pylori 胃炎の特徴的な所見であることが著者ら以外にも幾つかの研究室から報告されており、これらの研究によって、従来行われていた組織学的慢性胃炎の内視鏡診断が大きく変わる可能性が出てきている。

まとめ

H.pylori は疫学的研究から胃炎、胃潰瘍や胃癌の発生、進展へ関与していると推測され注目を浴び、除菌治療も積極的に行なわれつつある。病理診断するにおいて、H.pylori 感染による胃粘膜は非特異的な炎症が強く、組織像である程度感染の予測は可能だが、それは確実なものではない。そこで、特殊染色を行い菌体の可視化が必要となってくる。色素や銀液を用いる染色法では菌体を染め上げ、H.pylori の特徴のひとつであるらせん体を観察し、感染の有無を把握するが、このら

せん体は胃に感染する他の細菌も示す場合がある。そして、H.pylori の耐性型である coccoidform を呈する除菌後は、球菌や短桿菌との区別に容易でない。著者らも実際、いくつかの症例で H・E 染色やギムザ染色などで認められた菌体が免疫染色および ISH 法で検出されなかった不一致例を経験したため、従来の色素や銀液を用いる方法での H.pylori の判定は問題が多いと思われる。その為、H.pylori の検索法は特異的かつ高感度、そしてルーチン作業で行える低コストで操作も複雑でない染色法が望まれ、これらを総合的に考えると酵素抗体法による免疫染色が適していると思われる。現在、胃癌との関係が示唆されている H・pylori は、胃感染で重要視され、今後積極的な除菌治療が行えるよう安定した染色結果が得られる再現性の高い免疫染色法の開発が必要であると考えられる。

〔参考文献〕

- 1) 屋嘉比康治：胃疾患と Helicobacter pylori 感染症．第 45 日本臨床衛生検査技師会ナイトセミナー，1～4，(1995)
- 2) 三瓶接子，石川喜美男，宮 哲正 他：消化管の肉眼像と病理組織・細胞像 (5) Helicobacter pylori．医学検査 45 (10)：巻頭ページ，(1996)
- 3) 三瓶接子，石川喜美男，宮 哲正 他：検査と変遷と将来展望，免疫学的検査法の変遷と展望．医学検査，47(6)：巻頭ページ，959～966 (1998)
- 4) 三瓶接子，石川喜美男，宮 哲正 他：Helicobacter pylori の ISH 法と他の染色との比較．第 45 日本臨床衛生検査技師会ナイトセミナー，18～21，(1995)．
- 5) 石川喜美男，三瓶接子，宮 哲正 他：免疫組織化学染色法 NO2 応用編．1～10，関東化学 (1996)．
- 6) 三瓶接子，梅宮敏文，宮 哲正 他：Histologic Helicobacter pylori，1～3，バイエル三共 (1997)．
- 7) 三瓶接子，石川喜美男，宮 哲正 他：組織内病原体の染色ヘリコバクターピロリの染色，染色法のすべて，95～99，医歯薬出版 (1999)．

～病理組織包埋用パラフィンシリーズ～

パソプレップ 580(融点 58～60)

パソプレップ 580 は既存商品パソプレップ 568(融点 56～58)と同様にロット間の品質のパラッキをなくし、均一な炭素分布を持つ精製パラフィンに組織浸透性を高めるため、安全かつ安定な高分子化合物を添加した包埋剤です。

〔規格〕 m.p. 58～60

〔特長〕

ペレットタイプで取扱いやすい
組織への優れた浸透性
薄切性に優れている
切片の伸展性良好

脱パラフィンがスムーズに行われ、染色性に問題なし

安全性テスト合格品

- ・ FDA 法に準じた食品に対する適合性テスト：合格
- ・ 日本薬局方パラフィン試験適合性：合格
- ・ マウスに対する経口急性毒性試験：[LD₅₀]16.0g/kg 以上

・ 70℃、長時間熔融しても有害な揮発成分は認められない

〔パソプレップ 568 との違い〕

580 タイプで包埋したブロックの薄切時の感覚は 568 タイプよりも硬く、より切れ味があります。但し、融点が高いため包埋温度を高めに設定する必要があります。

コード No.	品名	規格	容量	希望納入価格(円)
165-19551	Pathoprep [®] 580	病理組織包埋用	2kg x 3	13,000

〔関連商品〕

コード No.	品名	規格	容量	希望納入価格(円)
162-18961	Pathoprep [®] 568	病理組織包埋用	500g x 12	13,000

～脱パラフィン剤・透徹剤～

キシレン、モレキュラーシープスパック入り 病理研究用

特級キシレンにモレキュラーシープス(強力な脱水剤)を添加し、水分含量を抑えました。

- 〔モレキュラーシープス〕
- ・ 専用の袋入りなので(25g x 2袋) 微細粉末の浮遊はほとんどありません。
 - ・ キシレンやアセトン適用の 4Å タイプを使用しています。

〔規格〕 水分：0.01%以下

含量(o-, m-, p- キシレン)：80%以上

245-00717 15kg 5,000円

「届出感染症」に指定された クリプトスポリジウム症

糞便検査、環境水検査における直接蛍光抗体法の有用性

大阪市立大学 医学部 医動物学 井関 基弘

はじめに

クリプトスポリジウム症は厄介な感染症である。ヒトや家畜が感染すると激しい下痢を起こすが有効な治療薬がない。エイズなどの免疫不全患者が感染すると致命的になる。世界中に分布し、下痢患者における検出頻度は高く、世界で年間数億人が感染するといわれる。子ウシなどにおける感染率も高く、死亡や発育遅延などによる経済的損失も無視できない。感染力が非常に強く、塩素などの消毒剤では殺滅できないので、水道水やスイミングプールが汚染されれば大規模な集団感染が発生し、地域社会に重大な影響をおよぼす。本年4月から施行された新しい感染症予防法では「届出感染症」に指定されている。今後、臨床検査、疫学調査、環境水調査の充実が欠かせない。

本稿では、新しく開発された直接蛍光抗体法用試薬による検査法とその有用性を紹介する。本原虫の生物学的性状や臨床症状、ヒトや動物における感染状況、河川水などの汚染状況、水道水による集団感染例などについては、1997年の本誌に紹介した¹⁾。参考にしたい。

1. 糞便材料からの検出

ヒトや家畜の下痢の原因として重要なのは *Cryptosporidium parvum* で、糞便には直径約 $5\mu\text{m}$ の短楕円形のオーシストが多数排出される。診断にはそれを検出すればよいが、通常の原因虫や虫卵検査の方法では検出できない。従来、オーシストの検出には、簡易迅速蔗糖浮遊法、蔗糖遠心沈殿浮遊法、抗酸染色法などが用いられているが²⁾、術者がオーシストの形態や染色像、鏡検像に慣れていないと判定

を誤ったり、かなり慣れていても鑑別困難な類似物を含んでいる検体がある。この悩みを解消し、クリプト検査に慣れていない検査室でも簡単・迅速・正確に検出できる試薬や検査法の開発が望まれている。

筆者らは、文部省科学研究費補助金の援助を受けて、クリプトのオーシスト壁に対するモノクローナル抗体を作成し、FITCを標識した直接蛍光抗体法用の試薬キットを和光純薬社との共同研究で開発し³⁾、その評価を実施した^{4,5)}。

表1. 直接蛍光抗体法による糞便材料の染色法

1. 清浄なスライドガラスに糞便を直径約7mm程度の円形に薄めに塗抹し、ヘアドライヤーの冷風で十分に乾燥
2. 塗抹面の周囲に蛍光染色用の撥水ペンでリング状に液を塗布し、風乾
3. メタノールで固定(2~5分)し、風乾
4. 洗浄液を塗抹面に載せる(1分)
5. 洗浄液を捨て、ブロッキング液を載せる(室温、10分)
6. ブロッキング液を捨て、洗浄液で40倍に希釈した標識抗体液を載せる(室温、10分)
7. 洗浄液で洗う(2分、3回)
8. 封入し、蛍光顕微鏡のB励起光で観察

* 陽性対照にはキットの「陽性コントロール」を使用する。
容器を震盪してから小滴をスライドガラスに載せて乾燥させ、上記の要領で染色すればよい。

注意：4~8の操作中に塗抹面が乾燥しないように湿箱を用いるのがよい。

表2. 蛍光抗体試薬の特異性

検出できるクリプトスポリジウムの種類

種名	宿主と寄生部位	オーシストの形態と大きさ(μm)
<i>Cryptosporidium parvum</i>	ヒトを含む哺乳類の腸	短楕円形 4.5-5.5 × 4.2-5.0
<i>C. muris</i>	ヒトを含む哺乳類の胃	楕円形 7-9 × 5.3-6.5
<i>C. baileyi</i>	ニワトリのファブリキウス嚢	楕円形 5.6-6.3 × 4.5-4.8
<i>C. meleagridis</i>	シチメンチョウ、ニワトリなどの腸	短楕円形 4.5-6.0 × 4.2-5.3

* クリプトスポリジウムには上記の他に魚類に寄生する種やヘビに寄生する種などがあるが、材料が入手できないので試験していない。

非特異反応が認められなかった糞便内原虫類と微生物
赤痢アメーバ、大腸アメーバ、ランブル鞭毛虫のシスト
イソスポーラ、サイクロスポーラ、数種のアイメリアのオーシスト
各種の細菌および酵母

非特異反応がみられたもの
糞便中のある種の細菌、河川水中のある種の藻類

染色操作を表1に、検出可能なクリプトの種と抗体の特異性を表2に示した。操作は簡単で、染色時間は短く、×200の倍率で検出できるので鏡検も容易であり、特異性が高いの

で判定に困ることもない。標識抗体液は1検体当たり約30 μ lなので経費も安く済む。ヒトの体外診断薬としての認可はまだ得られていないが、患者および感染動物の糞便材料からのオーシスト検出に非常に有用であると判断された。

クリプト症患者の下痢便7検体および陽性例を含むウシの糞便92検体について蔗糖遠心沈殿浮遊法、抗酸染色法との比較を行い、結論を表3に示した。感染の極期で糞便1gに $10^5 \sim 10^7$ 個もの多数のオーシストが排出されている場合は、どの方法でも検出可能であるが、回復期あるいは治癒したあとの有形便で、オーシスト数が1gに 10^3 個以下と極めて少数の場合は蔗糖遠心沈殿浮遊法でしか検出できないことがある。蔗糖浮遊法では糞便使用量が約1gであるのに対して、他の2方法では1~3mgと少ないからである。しかし、蛍光抗体法以外では判定に慣れを要するし、かなり慣れても抗酸染色法では判定困難な類似物体が含まれる検体もある。蛍光抗体法ではそれらは染色されないの

	蔗糖遠心沈殿浮遊法	直接蛍光抗体法	抗酸染色法
使用糞便量	約1g	約1mg	約3mg
手技	やや煩雑	簡単	簡単
検出率			
オーシストが多数の場合	良好	良好	やや劣る
オーシストが極少数の場合	優れる	やや劣る	劣る
判定の難易度	慣れを要する	容易	慣れても困難なことも

で判定に困ることもない。標識抗体液は1検体当たり約30 μ lなので経費も安く済む。ヒトの体外診断薬としての認可はまだ得られていないが、患者および感染動物の糞便材料からのオーシスト検出に非常に有用であると判断された。

クリプト症患者では、長期間にわたって重症の下痢を示し、毎回の検査で蔗糖浮遊法や抗酸染色法では極めて少数のオーシストしか検出されないのに、蛍光抗体法では無数の虫体が検出された。蔗糖浮遊法と抗酸染色法では、オーシストが成熟して壁が厚く、脱囊していないインタクトのものしか検出できないが、蛍光抗体法では未成熟のものや脱囊したものも検出で

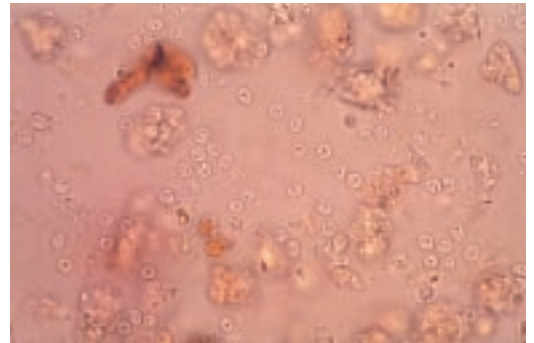


図1. 蔗糖遠心沈殿浮遊法の所見
オーシストはほぼ均一な大きさで、背景よりも明るく、内部に特徴的な顆粒がみられる。(クリプト症患者の下痢便)

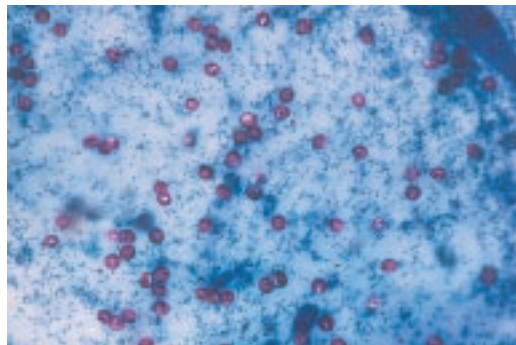


図2. 抗酸染色法の所見
オーシストは赤く染まり、ドーナツ状や馬蹄形にみえる。(クリプト症患者の下痢便)

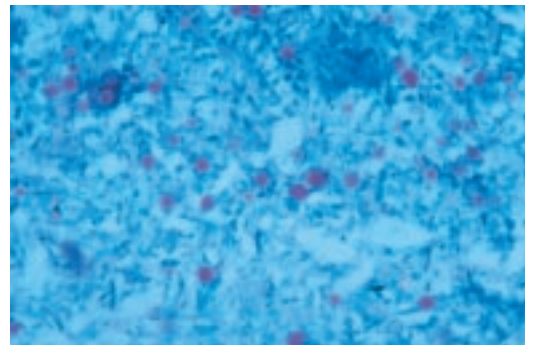


図3. 抗酸染色法の所見
赤く染まった大小不同の円形物体が多数みられるが、オーシストではない。(ヒトの下痢便)

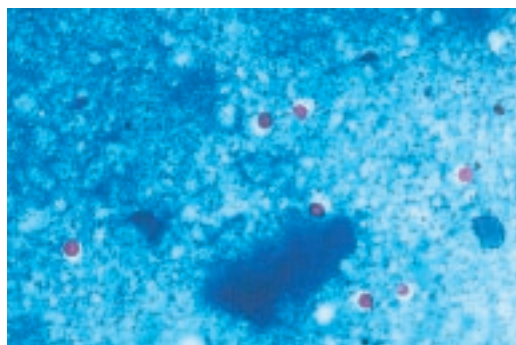


図4. 抗酸染色法の所見
赤く染まった円形物体はクリプトのオーシストによく似ているが、蔗糖遠心沈殿浮遊法や蛍光抗体法では検出されず、オーシストではない。(ウシの糞便)

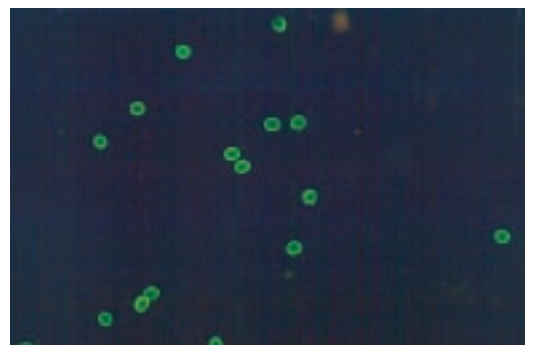


図5. 直接蛍光抗体法の所見
オーシストは青リンゴ色に明瞭に染色される。(クリプト症患者の下痢便)

きるからである。それぞれの検査方法による鏡検所見を図1～5に示した。

2. 水試料からの検出

河川水など水試料からの検出は糞便材料に較べて格段に難しい。サンプルに含まれるオーシスト数が極めて少ないし、どのメーカーの抗体を使用しても、ある種の藻類が非特異的に染色され、その形態がオーシストと極めてよく似ているからである。今回開発した抗体も同様である。この藻類との交

差反応を軽減するために現在も改良を続けている。これが実現すれば、直接蛍光抗体法では間接法に較べて染色に要する手間と時間が半減するので利点は大きい。

〔参考文献〕

- 1) 井関基弘：クリプトスポリジウム症 水道水による集団感染 .和光純薬時報 , 65(4), 6-8(1997) .
- 2) 井関基弘, 木俣 勲：技術解説 .クリプトスポリジウム症・サイクロスポーラ症 .臨床検査 ,42 ,541-546(1998) .
- 3) 木俣 勲, 他：クリプトスポリジウムの

オーシスト検出用蛍光抗体試薬の開発 .感染症誌 ,7X(増),19X(1998) .

- 4) 井関基弘, 他：クリプトスポリジウムのオーシスト検出用に開発した直接蛍光抗体法試薬の評価 .第54回日本寄生虫学会西日本支部大会講演要旨 . p.19(1998) .

- 5) Iseki, M. *et al.* : Evaluation of a newly developed direct immunofluorescent assay kit for detection of *Cryptosporidium* oocysts in fecal and water specimens. 68th Annual Meeting of The Japanese Society of Parasitology, Abstracts (1999)

Cryptosporidium Detection kit

本キットは直接法によりクリプトスポリジウムオーシストを迅速に検出することが可能です。

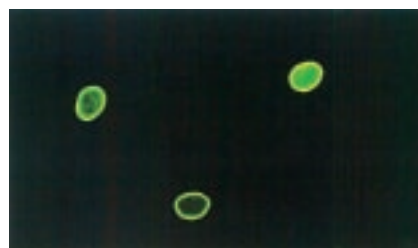
〔特長〕

- ・環境水や飲料水中及び、畜産排水・廃棄物中に存在するクリプトスポリジウムのオーシストを蛍光抗体法(直接法)により検出
- ・従来の間接蛍光抗体法に比べて染色時間を2/3～1/2に短縮
- ・本キットでは *Cryptosporidium parvum*, *C. muris*, *C. baileyi* のオーシストの検出可能
(検査試料水からのオーシストの濃縮など、染色用検体の調製までの操作は、厚生省「水道におけるクリプトスポリジウム暫定対策指針、別紙3」に記載されている方法に準拠して実施します。)

〔キット内容〕

- | | |
|---|-------|
| 1) 陽性コントロール | 5ml |
| (<i>Cryptosporidium parvum</i> の不活化オーシスト) | |
| 2) FITC 標識抗体 | 2.7ml |
| (抗クリプトスポリジウム, モノクローナル抗体、10倍濃縮液) | |
| 3) ブロッキング液 | 50ml |
| 4) 10 × 洗浄液 | 100ml |

297-54301 50回用 60,000円



蛍光観察 100 × 5

(提供: 大阪市立大学医学部医動物学教室)

1,3,4,6-Tetra-O-acetyl-2-O-trifluoromethanesulfonyl-β-D-mannopyranose

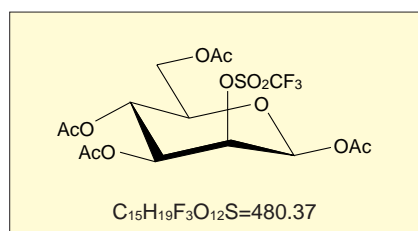
生化学用

糖鎖、チオオリゴ糖、デオキシハロゲン化糖等さまざまな糖質の化学合成の際、原料として利用されています。

〔規格〕

含量(HPLC)..... 98.0%以上
融点..... 119 ~ 122

208-14571 100mg 8,000円
204-14573 1g 照会



薬物代謝試験に有効

NADPH-P450 Oxidoreductase, Human, recombinant, Soln. Cytochrome b₅, Human, recombinant, Soln.

生化学用

二つの酵素とも一般に細胞膜に存在しており、NADPH-P450 Oxidoreductase は NADPH から電子を種々の Cytochrome P450(CYP) イソ型タンパク質に伝達し活性化させ、Cytochrome b₅ は CYP アイソザイム、特に CYP 3A サブファミリーの触媒効率を高める作用を持ちます。

本品は、CYP 反応による薬物代謝試験や創薬の研究に有効です。

コード No.	品名	容量	希望納入価格(円)
548-00751	NADPH-P450 Oxidoreductase, Human, recombinant, Soln.	200 μ g(Protein)/Vial	32,000
545-00761	Cytochrome b ₅ , Human, recombinant, Soln.	100 μ g(Protein)/Vial	27,000

〔関連商品〕

CYP ミクロソーム関連酵素

コード No.	品名	容量	希望納入価格(円)
541-00361	Cytochrome P450 3A4, Human, recombinant, Microsome	750 pmol	36,000
544-00373	Cytochrome P450 2D6, Human, recombinant, Microsome	500 pmol	36,000
545-00381	Cytochrome P450 2C19, Human, recombinant, Microsome	2 nmol	36,000

UDP グルクロン酸転移酵素

コード No.	品名	容量	希望納入価格(円)
545-00641	UDP-Glucuronyltransferase 1*6, Human, recombinant, Microsome	5mg(Protein)	28,000
546-00431	UDP-Glucuronyltransferase 1*1, Human, recombinant, Microsome	5mg(Protein)	35,000

フラビン含有酸化酵素

コード No.	品名	容量	希望納入価格(円)
548-00631	Flavin-Contain Monoxygenase 3, Human, recombinant, Soln.	100 μ g	69,000

ヒト肝臓ミクロソーム

コード No.	品名	容量	希望納入価格(円)
536-61291	Pooled HepatoSome	8mg/0.4ml	28,000
539-61301	Pooled HepatoSNine	25mg/ml	28,000
536-61311	HepatoScreen Test Kit	1Kit	520,000

その他

コード No.	品名	容量	希望納入価格(円)
535-45141	6 β -Hydroxycortisol ELISA Kit	1Kit	181,000
544-00611	Control Microsome, Solution	0.5ml	17,000

生薬試験用標準品

Sennoside B Standard

生薬試験用

局方収載品のセンナ (Sennae Folium) 中に含まれる有効成分です。センナは苦味健胃薬として消化を促進させるほか、便秘などの治療薬として用いられます。本品は標準品に必要な含量 99.0% 以上 (HPLC) を保証しております。

起源: *Cassia angustifolia* Vahl,
Cassia acutifolia Delile

化学名: (R*, S*)-5,5'-Bis (β -D-glucopyranosyloxy)-9,9',
10,10'-tetrahydro-4,4'-

dihydroxy-10, 10'-dioxo-
[9,9'-bianthracene]-2,2'-
dicarboxylic acid

〔規格〕

外観: 黄色、結晶性粉末

含量: 99.0% 以上 (HPLC による)

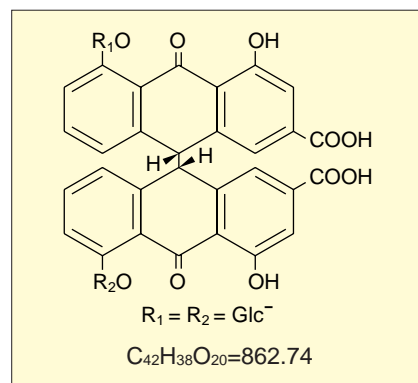
199-11811 10mg 15,000 円

〔関連商品〕

コード No.	品名	規格	容量	希望納入価格(円)
192-10201	センノシド A	生化学用	100mg	21,000
190-08531	センノシド A 標準品	生薬試験用	10mg	12,000
194-09271	センノシド B*	生薬試験用	20mg	15,000
199-10211	センノシド B**	生化学用	100mg	21,000

* 含量は 97.0% 以上 (HPLC)

** 含量は 90.0% 以上 (HPLC)



QOL 維持を目指した新癌免疫療法

NIE(neuro-immune-endocrine) 細胞の発見

宮城県立がんセンター研究所 免疫学部門 海老名 卓三郎

I. Bench から Bed へ

基礎医学者はマウスやラットを使って生体の基本作用である免疫現象を詳細に検討してきた。その結果腫瘍免疫領域では MHC 拘束の強力なキラー細胞である CTL 療法を見出した。しかしこの CTL 療法は腫瘍細胞を認識させるため、培養中に腫瘍細胞を加える操作等が必要となる。このため臨床応用となると操作が煩雑となり、無菌操作が難しい欠点がある。そこでより操作が簡単な方法が必要となった。すなわち clear“ Bench ”での基礎的な研究から“ Bed ”side での臨床応用可能な研究を目指して 5 年前より pilot 研究を開始した。試行錯誤の結果新たな免疫療法、BAK (BRM activated killer) 療法を開発した。患者さんから末梢血 20ml を採血し、リンパ球を採取した後、固相化抗 CD3 単クローン抗体と IL-2 で活性化、増殖し、2 週間後に IFN- α で NK, LAK 活性を増強させ、約 6×10^9 の自己活性化リンパ球 (BAK 細胞) を点滴静注で戻す方法である。すなわち抗 CD3 単クローン抗体、IL-2、IFN- α という BRM で活性化したリンパ球を利用する方法である。この方法が CTL 療法よりも優れているのは操作が煩雑でない点と、もう一つ新しい点を見出した。CTL 療法は TCR として従来の $\alpha\beta$ 鎖を持った CD8 陽性細胞であるが、我々の BAK 細胞は新たな T 細胞である $\gamma\delta$ T 細胞と CD16 陽性 NK 細胞という MHC 非拘束性キラー細胞を含んでいる点である。そこで $\alpha\beta$ T 細胞と $\gamma\delta$ T 細胞をそれぞれ多く含んだ細胞で癌細胞と自己白血球に対する細胞障害活性を調べたところ $\alpha\beta$ キラー T 細胞は癌細胞を殺すと共に MHC が合うために、かえって自己白血球も殺すことがわかつ

た。一方 $\gamma\delta$ T 細胞が中心の BAK 細胞は自己癌細胞を含めて癌細胞を殺すが、自己正常白血球は殺さないことがわかった。すなわち従来の CTL 療法は自己正常白血球も殺すため副作用の出現が憂慮された。一方 BAK 細胞は正常細胞を殺さないため副作用が無いことが示唆されたため、患者さんの informed consent を得て BAK 療法を開始したわけである。BAK 細胞に含まれる活性化した $\gamma\delta$ T 細胞は抗腫瘍性サイトカインである IFN- γ 並びに TNF- α を産生して抗腫瘍効果を表すことがわかった。従来 $\gamma\delta$ T 細胞は局所免疫には重要な働きをしていることがわかってきたが、大人の末梢血中に 2 ~ 3% しかない $\gamma\delta$ T 細胞が何をしているかわかっていなかった。我々は生体で発生する癌細胞を殺す能力を持った NK 細胞と同様の働きを持ったキラー細胞であることを確かめたことになる。ビーズ法で精製した $\alpha\beta$ T 細胞と $\gamma\delta$ T 細胞を走査電顕で調べて見ると図 1 のように $\gamma\delta$ T 細胞は微絨毛が発達し、癌細胞に接着しやすい細胞のように思えた。

BAK 療法を原発巣を手術で摘出した後、転移巣が多数見つかった 8 名の末期癌患者に 2 週間毎に 1 ヶ月毎に BAK 細胞を投与した結果、現在まで 38, 36, 26, 24, 18, 16, 15, 13 ヶ月外来

に通院し、延命効果が示唆された。一方 CT や MRI の画像上腫瘍の大きさは小さくならず NC で化学療法の範疇では効果なしと言われるところであるが、腫瘍があってもそれを無理矢理縮小させようとせず、“がんと共に生きよう”が我々の目標である。すなわち副作用がないので、QOL がいい状態で外来に通院出来るので、患者さんにとっては好きなことが出来る究極の治療法と考えている。

II. Cure から Care へ

従来の医療は“病氣”を治して、“病人”を治さない憾みがあった。すなわち腫瘍を縮小させようと化学療法や放射線療法を行うが、両療法共癌細胞を殺すが、分裂している正常細胞 (特に骨髄細胞) を殺すため副作用がひどく、患者さんの QOL が悪い状態のまま結局亡くなるが多かった。そこで現在では患者さんの気分の問題まで含めた全人格を考えた治療を行い、QOL がいい状態のままの治療が必要となる。すなわち“cure”から“care”への転換である。

それでは QOL とは何かというと、患者さんの主観の問題、平たく言うと気分の問題である。そのため今迄はその評価の方法がなく免疫療法が低く評

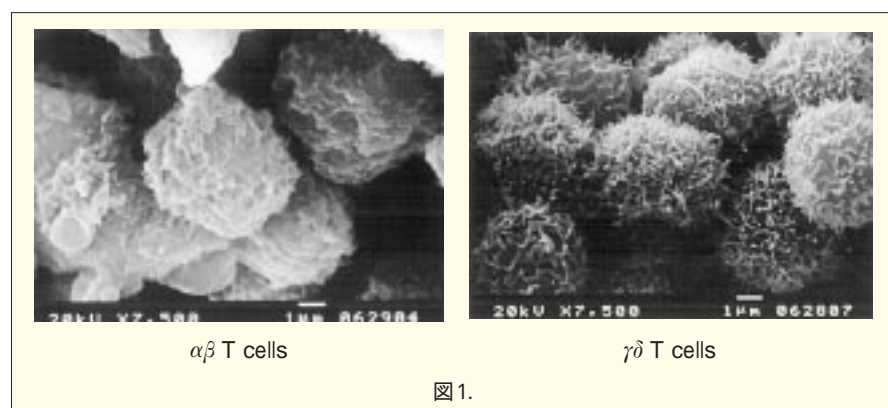


図1.

価されていたことになる。そこで我々はQOLの最も簡単でかつ適格な評価法として、タイの寝仏の顔をモデルにした10段階のFace scale(図2)により、現在の気分に相当する番号を記入してもらった。その結果原発巣手術後、転移巣が見つかったいわゆる末期癌患者にBAK療法を行ったところ1年を経過している中にIAPなどの腫瘍マーカーは徐々に上昇してきても、Face scaleによるQOLは不変又は上昇しており、元気に外来に通院してきていることがわかった。すなわちBAK細胞投与後は2~3週間は気分が良い状態が続くとのことである。それでは何故BAK療法がQOLを良くするかに関して最近の発見をここに述べたいと思う。

従来から精神神経系・免疫系・内分泌系はお互いに密接な関係にあることがわかってきた。マウスを使った実験でマウスに回転ストレスや電気ストレス、心理ストレスを加えると、それだけで腫瘍が大きくなり、その時NK活性という免疫力が低下し、更に血漿ACTHという悪いホルモンが上昇する。この時PSKのような生物製剤を投与するとNK活性は上昇し、ACTHは低下し、腫瘍重量は回復する。すなわち“癌は気から”である。すなわちストレスにうまく対応できれば精神神経系・内分泌系・免疫系の三角関係はい

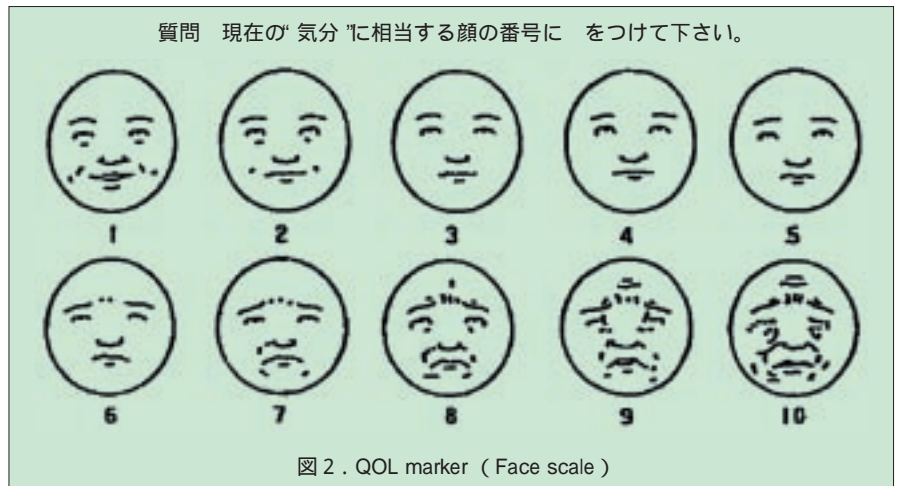


図2. QOL marker (Face scale)

い方向に向い、患者さんの気分というQOLにいい影響を与えることが示唆された。

一方BAK療法で固相化CD3抗体、IL-2、IFN- α 処理でCD56陽性細胞が著明に増加することがわかった(20%から50%へ)。CD56陽性細胞は前述した $\gamma\delta$ T細胞とCD16陽性NK細胞の半分をしめ、MHC非拘束的キラー細胞であることはわかっていたが、CD56とは元々神経細胞の表面に存在が認められた接着因子(N-CAM)として発見されたものである。そこで神経細胞が産生すると思われる脳内ホルモンの1つ β -endorphinを測定してみたところ、CD56陰性細胞は検出限界以下なのに、CD56陽性細胞は 10^6 個当たり8pgを産生していることがわかり、BAK細胞 10^9 細胞当りに換算すると

20ng産生していることがわかった。すなわちCD56陽性細胞は神経細胞であり、免疫細胞であり、かつホルモンを産生する内分泌細胞であることをはじめ確かめ、NIE(neuro-immuno-endocrine)細胞と命名した。すなわちBAK療法はCD56陽性NIE細胞を中心とした療法で、産生された β -endorphinにより鎮痛・鎮静作用によりQOLが良い状態に維持され、かつ β -endorphinはNK活性を増強し、IFN- γ の産生を増強させることがわかってるので、ますます細胞障害活性を増強させ抗腫瘍カスケード反応が働いていることがわかった。すなわちBAK療法はNIE細胞というQOL維持と強力なキラー活性を持った療法で、副作用がなくかつ延命効果もある現在考えられる最も良い癌治療法と思っている。

免疫系ケモカイン

ケモカインは、好中球、好酸球などの白血球系細胞に対する走化因子として見出されてその産生の多様性、並びに作用の多様性が次々と明らかにされています。近年になり免疫担当細胞と言われているリンパ球(T、B細胞)に走化性を示す液性因子も発見され免疫応答網(Immune response network)のさらに巧妙な制御機構が注目され、精力的な研究が始められています。

この度、代表的な免疫系ケモカインを取揃えました。

コードNo.	品名	形状	分子量	主要標的細胞	レセプター	容量	希望納入価格(円)
Human							
058-06581	Exodus-2/SLC, recombinant	凍結乾燥品	12.2kDa	T細胞、B細胞	CCR7	20 μ g	39,000
133-13231	MDC, recombinant	凍結乾燥品	8kDa	活性化T細胞	CCR4	20 μ g	39,000
130-13241	MIP-3 α /LARC, recombinant	凍結乾燥品	8kDa	T細胞、B細胞、樹状細胞	CCR6	20 μ g	39,000
137-13251	MIP-3 β /ELC, recombinant	凍結乾燥品	8.8kDa	T細胞、B細胞	CCR7	20 μ g	39,000
134-13261	MIP-4/PARC, recombinant	凍結乾燥品	7.8kDa	T細胞(CD45RA+)	?	10 μ g	39,000
202-14611	TARC, recombinant	凍結乾燥品	8kDa	CD4+, T細胞	CCR4	20 μ g	39,000
Mouse							
055-06591	Exodus-2/SLC, recombinant	凍結乾燥品	12kDa	T細胞、B細胞	CCR7	20 μ g	39,000

血管新生阻害物質

Angiostatin, Human

生化学用

ヒトの血管新生は、ホメオスタシスを維持するため、正常人は通常容易に形成されないよう調節されています。一方固形がんは、正常細胞ではみられないほどの大量のプラス調節因子(新生因子)を発現し血管新生を促進させ、自己組織に新たな血管を導き、細胞の維持、増殖に必要な酸素、栄養源を獲得しています。さらに、がん組織での血管ネットワークが完成すると、原発巣からがん細胞が遊走し易くなり、

これが血行性転移の要因となっています。

プラスミノーゲンをエラスターゼ処理することによって得られるアンジオスタチンは、生体内ではマクロファージから産生される MMP-12 によっても産生されることが知られており、細胞の過剰な血管新生誘導を制御していると考えられています。腫瘍の周りにできる血管の形成を阻害する作用は、腫瘍に対する栄養源を断ちがん細

胞の増殖・転移を防ぐことができるのではないかという可能性から、がん治療への応用が研究されています。

[参考文献]

- 1) 小野真弓 他: 癌と化学療法, 24(11), 1585(1997).
- 2) Mauceri, H. J. *et al.*: *Nature*, 394, 287 (1998).

543-00941 1mg 照会

KIKKOMAN 生物発光測定用キット

Intelite AB

Intelite AB は、ビオチン化ホタルルシフェラーゼを用いた生物発光酵素免疫測定試薬のキットです。キットにはビオチン化ルシフェラーゼとストレプトアビジンの複合体及び発光基質が含まれます。免疫測定などのビオチン-アビジン系において高感度標識酵素として利用できます。

本キットに使用されているビオチン化ルシフェラーゼは、遺伝子操作技術とタンパク質工学により開発されたもので、高活性と耐熱性を備えています。37で1日間保温しても、ほとんど活性の低下はありません。ビオチン化ルシフェラーゼは予め最適条件で、ストレプトアビジンと複合体を形成させてあります。本キットに含まれる発光基質は、数分間はほぼ一定の発光を持続させます。

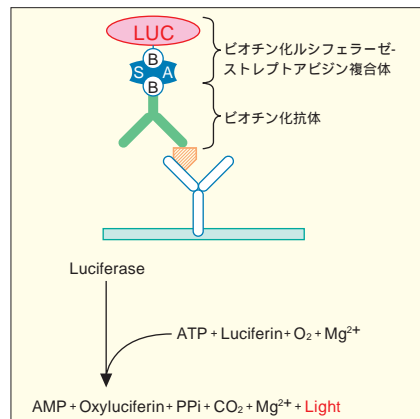
本キットの最大の特長は、標識酵素であるホタルルシフェラーゼが、アルカリホスファターゼやペルオキシダーゼと異なり、手指や生体試料には全く存在せず、免疫測定のバックグラウンドをコンスタントに低く抑えられることです。このため、アルカリホスファターゼやペルオキシダーゼを用いた化学発光免疫測定に比べ、バラツキが少なく、高感度の結果が期待されます。

[測定原理]

ビオチン化された抗体などにストレプトアビジン-ビオチン化ルシフェラーゼ複合体(複合体)が結合します(右図)。結合しなかった複合体を洗浄操作により取除きます。ルシフェリン, ATP, Mgを含む発光基質を添加すると、ルシフェラーゼによる発光反応が進行し、抗原を高感度に測定します。

[参考文献]

- 1) Kajiyama, N. and Nakano, E.: *Biosci. Biotech. Biochem.*, 58, 1170-1171 (1994).
- 2) Tatusmi, H. *et al.*: *Anal. Biochem.*, 243, 176-180 (1996).
- 3) Miyai, K. *et al.*: *Endocrine J.*, 45, 761-766 (1998).

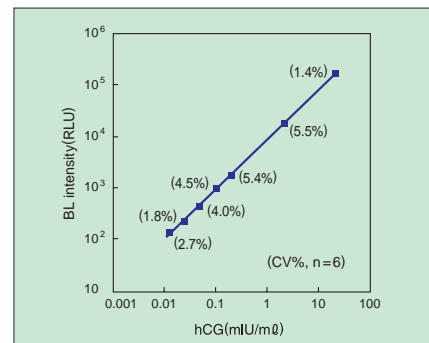


[キット内容] 各1本

- ビオチン化ルシフェラーゼ-ストレプトアビジン複合体(凍結乾燥品、11ml分)
- 発光基質(凍結乾燥品)
- 発光基質溶解液(14ml)

[hCG(ヒト絨毛性ゴナドトロピン)測定の検量線]

(データのご提供: 昭和大学 薬学部教授 前田 昌子先生)



コード No.	品名	容量	希望納入価格(円)
302-06871	インテライト AB	100 回測定用	30,000

骨粗鬆症研究の新しい Tool

Osteoprotegerin(22-202), Human, recombinant

生化学用

骨の代謝は骨を形成する骨芽細胞系と骨を吸収する破骨細胞系の2つの細胞系によって営まれており必要に応じて常に壊されては造られるという活発な再構築(リモデリング)が行われています。骨粗鬆症ではこのリモデリングの不均衡、すなわちバランスが骨吸収に大きく傾くことにより起こるといわれています。腫瘍壊死因子(TNF)受容体のスーパーファミリーに分類され

る本品は骨密度の調節に深い関わりがあり、天然の抗骨吸収剤として注目を集めています。in vivo 実験では骨密度が上昇する事がマウスにより確認されており、また in vitro 実験では破骨細胞の生成を阻止する事が報告されています。

〔形状〕

PBS を含む凍結乾燥品

〔参考文献〕

- 1) D. A. Anderson. *et al.*: *Nature*, 390, 175 (1997).
- 2) Simonet, W. S. *et al.*: *Cell*, 89, 309 (1997).
- 3) William, J. Boyle: *実験医学*, 16, 137 (1998).

157-02121 25 μ g 59,000 円

〔関連商品〕

コード No.	品名	規格	容量	希望納入価格(円)
182-01471	sRANKLigand(OPG Ligand, ODF) Human, recombinant	生化学用	10 μ g	37,000
153-02101	Oncostatin M, Human, recombinant	生化学用	10 μ g	37,000



タンパク質抽出の効率が up!

B-PER / Y-PER / M-PER

組換えタンパク質などの抽出のための試薬です。

従来の方法より、作業効率、回収効率ともに良くなり便利です。



タンパク質抽出試薬

コード No.	メーカーコード	品名	容量	希望納入価格(円)	特長
533-81905	78248	B-PER Bacterial Protein Extraction Reagent	500m ℓ	45,600	バクテリア用のタンパク質抽出試薬です。可溶性タンパク質、封入体両方のタンパク質抽出可能です。トリス塩酸緩衝系に使用されます。
531-81901	78243		165m ℓ	23,800	
520-32721	78260	B-PER II Bacterial Protein Extraction Reagent	250m ℓ	45,600	10m ℓ 以下の少量サンプルのためのバクテリア用タンパク質抽出試薬です。トリス塩酸緩衝系に使用されます。
529-32735	78266	B-PER Bacterial Protein Extraction Reagent (in Phosphate Buffer)	500m ℓ	45,600	バクテリア用タンパク質抽出試薬です。りん酸緩衝系に使用されます。
527-32775	78990	Y-PER Yeast Protein Extraction Reagent	500m ℓ	45,600	酵母菌用のタンパク質抽出試薬です。ガラスビーズ法に比べ抽出効率が良く便利です。
528-32761	78501	M-PER Mammalian Protein Extraction Reagent	250m ℓ	39,900	ほ乳類用のタンパク質抽出試薬です。凍結融解法に比べ抽出効率が良く便利です。

抽出・精製キット(抽出のための B-PER Bacterial Protein Extraction Reagent と各種精製用ツールのセットです。)

コード No.	メーカーコード	品名	容量	希望納入価格(円)	特長
526-32701	78100	B-PER 6xHis Fusion Protein Purification Kit	1Kit	68,400	ヒスチジンタグ融合タンパク質のアフィニティ精製キット(ニッケルキレートカラムとその他試薬セット)
523-32711	78200	B-PER GST Fusion Protein Purification Kit	1Kit	68,400	GST 融合タンパク質のアフィニティ精製キット(グルタチオン固定化カラムとその他試薬セット)
524-32741	78300	B-PER 6xHis Spin Purification Kit	1Kit	68,400	ヒスチジンタグ融合タンパク質のスピンカラム精製キット(ニッケルキレートアガロースとその他試薬セット)
521-32751	78400	B-PER GST Spin Purification Kit	1Kit	68,400	GST 融合タンパク質のスピンカラム精製キット(グルタチオン固定化アガロースとその他試薬セット)

HPLC 法による水中農薬の一斉分析

和光純薬工業株式会社 大阪研究所 上森 仁志

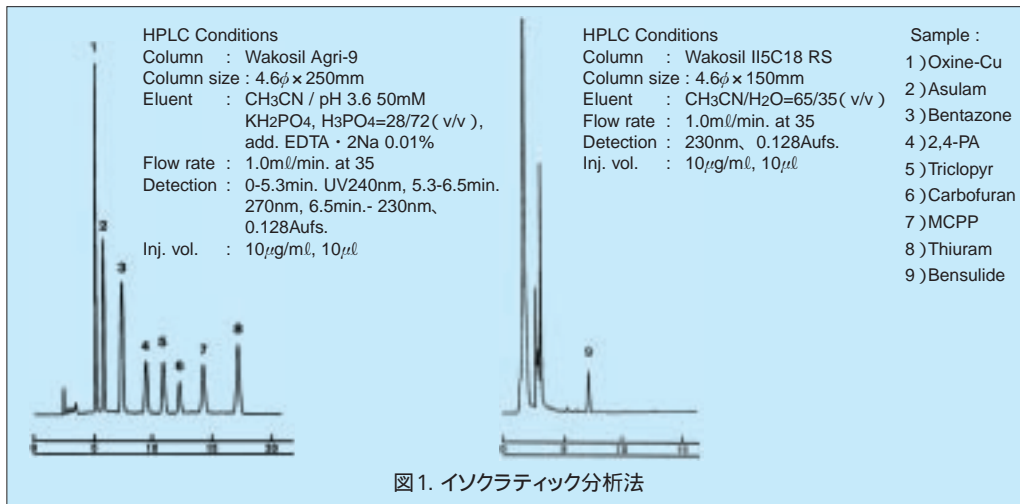
ゴルフ場で使用される農薬による水質汚染を未然に防止するために、平成2年にゴルフ場の排水口における遵守すべき農薬濃度の指針値等を定めた「暫定指導指針」が環境庁より公示され、その指針に基づく水質調査、指導がスタートした。これら農薬の一斉分析にはシアノプロピル型充てん剤が有効であるとの知見を得、ゴルフ場使用農薬分析専用カラムとして「Wakopak Wakosil Agri-9」を開発した。本カラムはイソクラティック法により9種類の農薬を一斉に分析することが可能であったが、一昨年度改定された暫定指導指針により追加されたトリクロピル酸、及び昨年度厚生省より発表された「水道水質に関する見直し」において追加された2,4-PA、ベンタゾン、カルボフランを本分析系に適用させたところ、溶出位置が重なり同時分析が困難であった。そこで、アシュラム、オキシ銅、チウラム、トリクロピル酸、メコプロップ、2,4-PA、ベンタゾン、カルボフランの8種類の農薬とHPLCで測定が行われているベンスリドの分析に焦点を絞り一斉分析条件の検討をイソクラティック法とグラジエント法で行った。標準を添加した河川水を固相抽出カートリッジで前処理後、検討した分析系に適用したところ良好な分離が得られたの

で、その分析例を図1、2に示した。イソクラティック法は、試料由来の夾雑物の妨害を受けることなく8種類の農薬を良好に分離することができ20分以内に測定が可能であった。しかし、保持の大きいベンスリドは溶出が遅れ同時分析が困難であったため、同一前処理試料を別の分析系（ODSカラムで分離）で並行に実施する方法を採用し迅速分析を達成した。グラジエント法は、若干のベースライン変動が認められるものの、9種類の農薬を一斉に分析することが可能であった。両法とも実用性の高い方法と考えているが、どちらの分析系を選択するかは分析者の判断によるところが大きい。

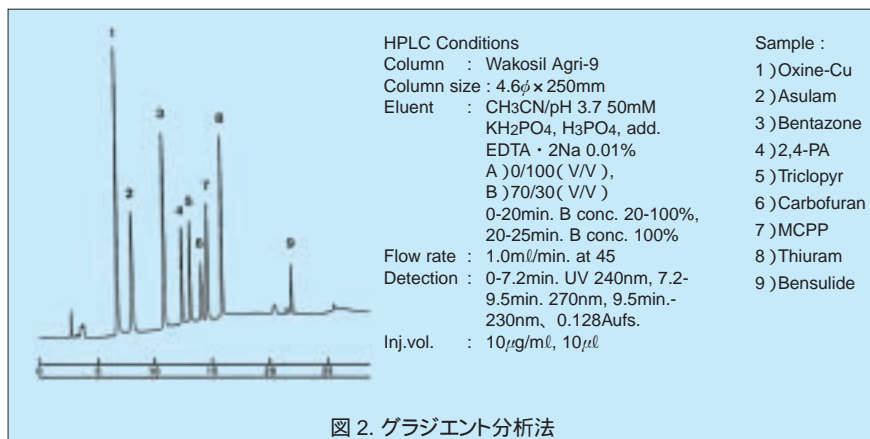
〔関連資料〕

- 1) ゴルフ場使用農薬に係わる暫定指導指針の改定について
平成9年4月24日付環境庁通達
- 2) 水道水質に関する基準の見直しにつ

- いて
- 厚生省ホームページ 報道発表資料
平成10年12月17日付
 - 3) HPLCによる残留農薬の迅速分析について
和光純薬時報, 62(1)(1994)
 - 4) 残留農薬試験用固相抽出カートリッジ Presep-Agri
和光純薬時報, 62(3)(1994)
 - 5) HPLCによるゴルフ場使用農薬の分析
和光純薬時報, 66(2)(1998)
 - 6) シアノプロピルシリカゲルを用いたHPLCによるゴルフ場使用農薬の同時定量
上森, 吉田 他: 分析化学, 44, 443 (1995)
 - 7) HPLC法によるゴルフ場使用農薬の迅速分析と高感度化の検討
上森, 吉田 他: 日本分析化学会第47年会要旨集, P267(1998)
 - 8) 環境分析を支援するHPLC充填剤と分析方法の開発
上森: 第129回液体クロマトグラフィ-研究懇談会要旨集(1998)



試料の前処理法	
Presep-C Agri (200mg)	
コンディショニング	
アセトニトリル	5mL
蒸留水	10mL
検水の注入	
河川水	200mL
流速	10 20mL/min.
通気脱水	10 分間
抽出	
アセトニトリル	2mL
試料抽出液 (全量 2mL)	
HPLC 分析 10μL 注入	
検水の濃縮 (固相抽出カラム使用)	



高性能・低価格を実現した ODS カラム

Wakopak[®] Handy ODS

Wakopak[®] Handy ODS はコストパフォーマンス、使い易さを追求した HPLC 用 ODS カラムです。低価格でありながら、高度な分析に対応できるだけの十分な性能をもっています。

〔特長〕

低価格

プレカラム並みの低価格を実現

高性能

N = 12,000 以上 (4.6 × 150mm),

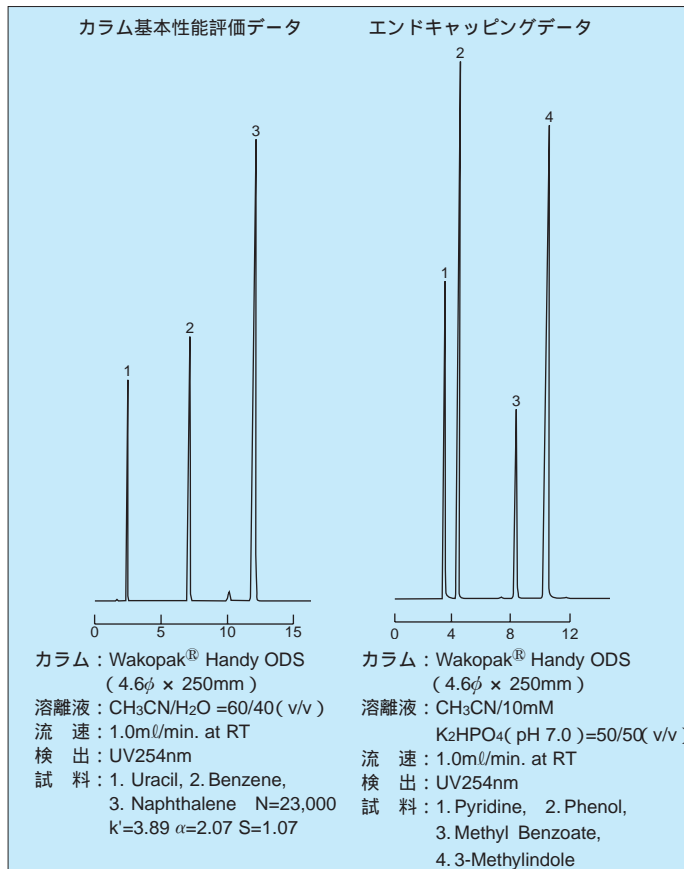
N = 20,000 以上 (4.6 × 250mm)

高純度シリカゲルを使用

カラムサポート体制の充実

バリデーションサポートデータをカラムに添付

常時 3 ロット充てん剤の供給対応



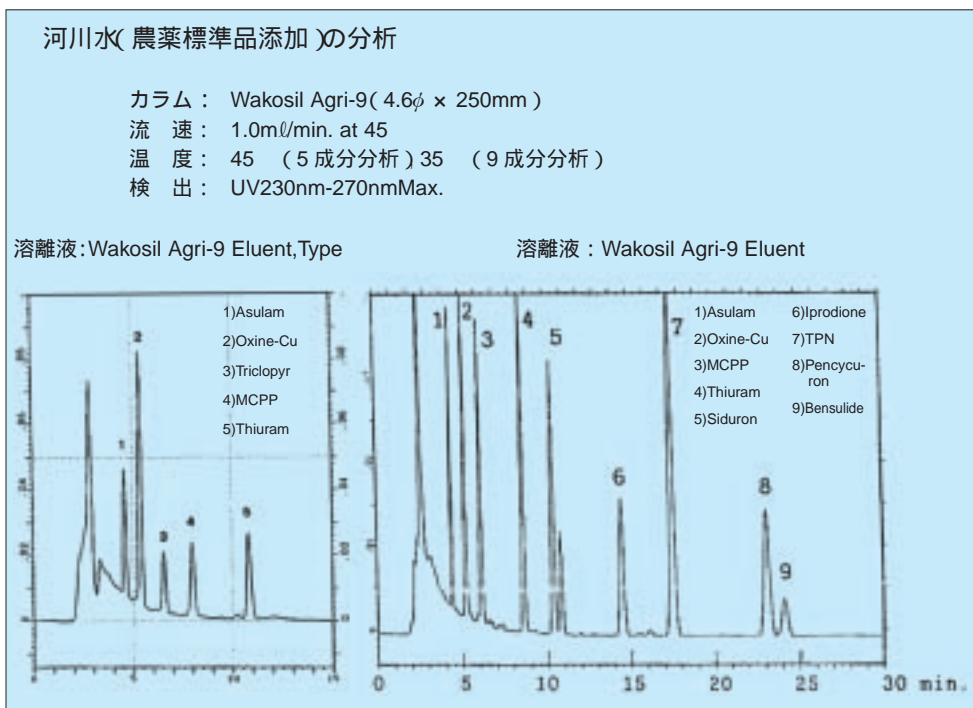
品名	カラムサイズ	カラムタイプ	記号	希望納入価格(円)
ワコーパック Handy ODS	4.6φ × 150mm	ウォーターズ	VGW	25,000
	4.6φ × 250mm		VIW	29,000

残留農薬分析用

ワコーパック Wakosil Agri-9・専用溶離液

残留農薬分析専用カラム「ワコーパック Wakosil Agri-9」は、ワコーシル Agri-9 溶離液 と組み合わせることで、アシュラム、オキシ銅、トリクロピル酸(トリクロピル)、メコプロップ (MCP P)、チウラム (ゴルフ場で使用される農薬による水質汚濁の防止に係る暫定指導指針) を、15 分以内に一斉分析することが可能です。

また、ゴルフ場農薬 9 成分 (アシュラム、オキシ銅、MCP P、チウラム、シデュロン、イプロジオン、TPN [クロロタロニル]、ペンシクロン、 Bensli d [SAP]) の分析には、ワコーシル Agri-9 溶離液がご使用いただけます。



〔次項へ続く〕

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 Agri-9	4.6φ × 150mm	デュボン	ニGD	68,000
		ウォーターズ	ニGW	
	4.6φ × 250mm	デュボン	ニID	74,000
		ウォーターズ	ニIW	

New

コード No.	品名	容量	希望納入価格(円)
237-01631	ワコーシル Agri-9 溶離液、型 (4.6φ × 250mm 用)	1ℓ	6,000
235-01291	ワコーシル Agri-9 溶離液 (4.6φ × 150mm 用)	1ℓ	6,300
238-01281	ワコーシル Agri-9 溶離液 (4.6φ × 250mm 用)	1ℓ	6,300

(関連商品)

コード No.	品名	容量	希望納入価格(円)
160-18401	8種農薬混合標準液 (アシュラム、ベンスリド、イプロジオン、MCPP、ベンシクロン、チウラム、TPN、シデュロン 各 100μg/ml アセトニトリル溶液)	1ml × 5A	25,000
159-01961	オキシシン銅標準液 (50μg/ml メタノール溶液)	1ml × 5A	10,000
202-12911	トリクロピル標準品	200mg	7,000
019-13521	アシュラム標準品	200mg	7,300
025-07671	ベンスリド標準品	200mg	18,700
098-02381	イプロジオン標準品	500mg	18,700
136-10421	MCPP 標準品	200mg	26,000
168-13681	ベンシクロン標準品	500mg	10,500
199-10071	シデュロン標準品	200mg	8,000
204-11371	チウラム標準品	200mg	6,000
200-06581	TPN 標準品	200mg	5,000

海砂(メタノール洗浄品) 425 ~ 750μm(20 ~ 35mesh)

ご好評いただいております海砂にメタノール洗浄品が追加されました。カラムクロマトグラフに使用できます。

New

コード No.	品名	容量	希望納入価格(円)
197-11655	海砂(メタノール洗浄品) 425 ~ 750μm(20 ~ 35mesh)	500g	2,400

(関連商品)

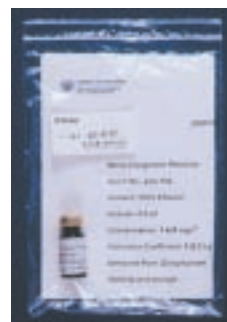
コード No.	品名	容量	希望納入価格(円)
190-11405	海砂、14 ~ 20mesh	500g	1,100
196-08175	海砂、20 ~ 35mesh	500g	1,150
197-11415	海砂、30 ~ 50mesh	500g	1,100
195-11411		5kg	8,000



植物色素標準品

植物プランクトン由来の植物色素標準品です。クロロフィル類は90% アセトンに、カロテノイド類は100% エタノールに溶解され、窒素封入されていますので、HPLC 分析などに便利です。濃度は、0.4 ~ 2.5mg/ℓ でロットによって異なります。

VKI社はデンマークのAcademy of Technical Science(ATV)と提携している水質環境分野の研究機関で、高レベルな研究開発を行っています。



コード No.	品名	容量	希望納入価格(円)
520-31501	19'-Butanoyloxyfucoxanthin	2.5ml	照会
526-31461	19'-Hexanoyloxyfucoxanthin	2.5ml	照会
528-31421	-Carotene	2.5ml	45,000
526-31341	Alloxanthin	2.5ml	48,000
528-31541	Antheraxanthin	2.5ml	照会
527-31511	Aphanizophyll	2.5ml	照会
525-31431	β-Carotene	2.5ml	45,000
523-31351	Canthaxanthin	2.5ml	照会
520-31361	Chlorophyll a	2.5ml	照会
527-31371	Chlorophyll b	2.5ml	照会
524-31381	Chlorophyll c	2.5ml	照会
522-31441	Chlorophyll c ₂	2.5ml	照会

コード No.	品名	容量	希望納入価格(円)
521-31531	Chlorophyll c ₃	2.5ml	照会
521-31391	Diadinoxanthin	2.5ml	照会
529-31451	Echinenone	2.5ml	照会
532-81311	Fucoxanthin	2.5ml	照会
524-31401	Lutein	2.5ml	照会
524-31521	Myxoxanthophyll	2.5ml	照会
523-31471	Neoxanthin	2.5ml	51,000
539-81321	Peridinin	2.5ml	照会
521-31411	Prasinanthin	2.5ml	照会
520-31481	Violaxanthin	2.5ml	照会
527-31491	Zeaxanthin	2.5ml	照会

第 36 話 エンドトキシンと電子線

エンドトキシンの不活性化には、通常 250 以上の温度で乾熱滅菌する方法が用いられています。乾熱滅菌が行えない材料については、オートクレーブや洗浄等の方法が用いられる場合もありますが、エンドキシンの高度な汚染を完全に除くことは困難です。このことから、耐熱性の低いプラスチックなどの材料から、有効にエンドキシンを除去、あるいは不活性化する方法の開発が望まれています。滅菌、ポリマーの改質などに使用されている電子線は、安全性が高く、短時間に高線量の照射が可能であるといった利点があり、各方面への利用が期待されています。今回は、エンドキシンの不活性化に対する電子線の利用の可能性について考えてみましょう。

1967 年に Previte¹⁾は、ガンマ線照射がエンドキシンのマウス致死活性を減少させることを報告しています。しかし、このときウサギ発熱活性の減少は認められていません。その後、Koppensteiner²⁾は、25 KGy のガンマ線照射が 500 ng/ml のエンドキシン溶液の活性を 5 ng/ml まで低下させること、乾燥状態では不活性化の効果が少ないことを、また、Csako³⁾は、米国標準エンドキシンを用いてエンドキシン溶液に対するガンマ線照射の影響を調べ、10 KGy のガンマ線照射でエンドキシンのウサギ発熱活性が約 200 分の 1 に低下し、リムルス試験でも同様の傾向があることを報告しています。一方、Guyomard⁴⁾による電子線及びガンマ線を用いた実験⁴⁾では、リムルス試験及びウサギ発熱試験によるエンドキシン活性に関して、溶液状態の方が乾燥状態より不活性化の程度が大きいこと、電子線よりガンマ線の方が不活性化能が強いことが報告されています。

筆者らは、報告されている照射線量より広い範囲で精製 LPS に電子線照射を行い、その活性変化を調べました⁵⁾。エンドキシンは、LPS 溶液をバイアルに分注した状態(溶液状態)並びに、LPS をバイアル中で凍結乾燥し

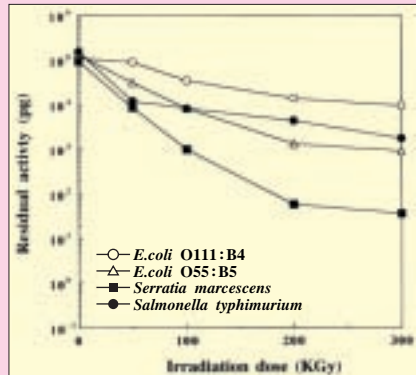


図 1. 電子線照射による乾燥状態エンドトキシンの不活性化

た状態(乾燥状態)と比較しました。電子線照射後、溶液状態試料は希釈後またはそのまま、乾燥状態試料はエンドキシン検出用抽出液(和光純薬)で抽出した後、それぞれのエンドキシン活性を測定しました。その結果、エンドキシン活性は照射電子線量の増加に伴い減少し、乾燥状態より溶液状態の方がより大きいエンドキシンの不活性化が観察されました(図 1, 2)。エンドキシン活性を 1/10 に低下させるのに必要な電子線量は、乾燥状態では 100KGy ~ 300KGy 溶液状態では 50KGy 程度でした。

これらの結果は、Guyomard⁴⁾による実験⁴⁾と同様の傾向と考えられます。このように電子線を照射するときのエンドキシンの状態によって不活性化の程度に違いが認められた原因として、乾燥状態の場合ではエンドキシンそのものに直接電子線が作用するだけであるのに対して、溶液状態では電子線による水の電離作用により生成したヒドロキシラジカルの化学作用が加わり、相乗的にエンドキシンの不活性化が起こった可能性が考えられます。

また、電子線による不活性化の程度は、エンドキシンの種類によっても異なっていました。例えば、乾燥状態で 300KGy の電子線を照射した場合のエンドキシン活性残存率は、*E. coli* O111:B4 由来エンドキシンでは 10%程度であるのに対し、他のエンドキシンでは 10%以下まで減少しました。この原因としては、エンドキシンの由来や、それぞれの試料中のエンド

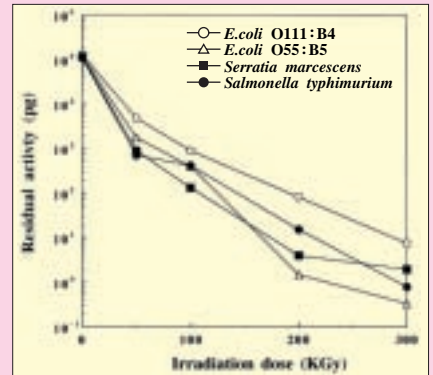


図 2. 電子線照射による溶液状態エンドトキシンの不活性化

トキシンの存在状態や共存物質(蛋白や核酸)の違いも考えられますが、明確な答えを出すにはさらに検討が必要でしょう。

これらの結果から、電子線照射によってエンドキシンを不活性化するためには、通常行われる殺菌目的の照射条件と比較してかなり高線量の照射が必要のようです。高線量の照射では材質への影響が予想されるため、高線量照射に対する耐性を持った材質が必要になります。短時間で大量処理ができ、温度の上昇もある程度コントロールできるといった電子線の利点を利用して、なんとかエンドキシンフリーにできるプラスチック製品を作りたいものです。最近のプラスチック製品の中には、かなりエンドキシンレベルの低い製品があります。初期の汚染量が少なければ、それだけ電子線の照射量は少なくてすむわけですから、エンドキシンフリープラスチック製品の商品化が荒唐無稽というわけではないと思います。

〔参考文献〕

- 1) Previte, J. J. et al. : *J. Bacteriol.*, 93, 1607-1614 (1967)
- 2) Koppensteiner, G. et al. : *Drugs Made Ger.*, 19, 113-123 (1976)
- 3) Csako, G. et al. : *Infect. Immun.*, 41, 190-196 (1983)
- 4) Guyomard, S. et al. : *Radiat. Phys. Chem.*, 31, 679-684 (1988)
- 5) 井尻晴久, 土谷正和: クリーンテクノロジー, 6, 18-20 (1996)

今回は「第 37 話 リムルス試薬の活性化に伴う反応タイムコース」の予定です。

第7話 アポトーシス実行分子:caspase ファミリー

1. 細胞死遺伝子の同定

線虫は体が透明で全ての個体発生がノマルスキー微分干渉顕微鏡下で生きたまま観察できるというめざましい特徴を持っている。線虫の雌雄同体の成虫は959個の細胞から構成されていて、この数に個体差はない。1977年、J. SulstonとH.R. Horvitzは線虫の個体発生を記載した論文で、線虫では1090個の細胞が発生過程で生まれるが、必ず131個の細胞が特定の細胞系譜で特定の発生ステージにおいて失われることを示した。1986年には遺伝的なスクリーニングの結果、全ての細胞死がおきない*ced-3*変異体が分離された¹⁾。

2. 細胞死実行遺伝子 *ced-3*

ced-3 遺伝子のクローニングによって、この遺伝子産物がヒトからクローニングされた新しいシステインプロテアーゼ、インターロイキン-1 β 変換酵素(ICE)と全体にわたってホモロジーがあることが示された²⁾。構造上の類似性はCED-3/ICEがプロテアーゼとしてプログラム細胞死を調節していることを示唆しているが、実際に遺伝子導入実験によってプロテアーゼ活性に依存した細胞死の実行が線虫でも哺乳類でも示されている。

3. caspase ファミリー (カスパーゼファミリー)

線虫ではこのファミリーに属する遺伝子は3種類が知られているが、哺乳類からは現在14種ホモログが同定されている。カスパーゼ(caspase)のcはシステインプロテアーゼを示し、aspaseはP1にアスパラギン酸を要求するというこのファミリーのユニークな基質特異性に由来する³⁾。すべてのカスパーゼはプロエンザイムとして翻訳

される。活性化は自分自身、あるいは他のカスパーゼによってアスパラギン酸残基のあとで限定分解され、プロシーケンスとそれに続いてコードされるP20、P10サブ

ユニットが分離し、P20/P10ヘテロ二量体がホモダイマー-(P20/P10)₂を形成することで活性化される(図1)。基質特異性からカスパーゼは大きく3群に分類され、この基質特異性による分類はカスパーゼの機能的な特性をも反映している⁴⁾。I群はcaspase-1に代表されるサイトカインのプロセッシングと細胞死に、II群はcaspase-3やCED-3に代表される細胞死の実行に、III群はcaspase-8に代表され、カスパーゼの蛋白質分解カスケードの上流に位置し細胞死のシグナルを伝える働きである。I、II、III群のカスパーゼは機能的にある程度相補的であると考えられる。

4. caspase 阻害剤・阻害遺伝子

ウイルスは宿主細胞の増殖、生存を巧みに調節し自らの遺伝子を増やそうとするが、ウイルス遺伝子の中には細胞死を直接制御する遺伝子を持つものがいる。牛痘ウイルスの*crmA*遺伝子はcaspase-1を直接阻害するセルピンに似た蛋白質をコードしている。この遺伝子はウイルスが感染した宿主からのIL-1の分泌を抑えて炎症反応を抑制し、それに加えて感染細胞自身の細胞死をも抑えることによって二重にウイルスの増殖に有利な環境を作っている⁵⁾。パキキュロウイルスが持つ

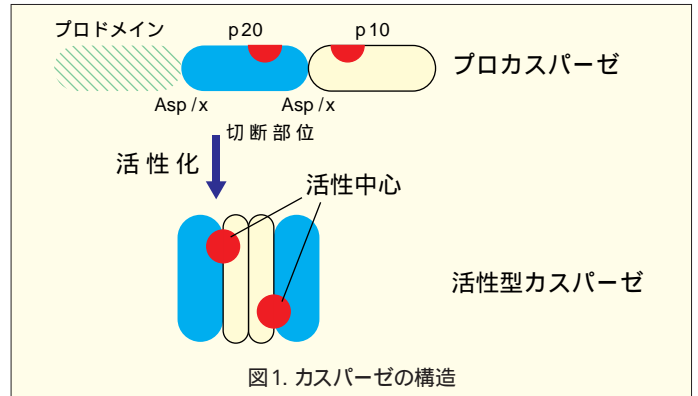


図1. カスパーゼの構造

p35 遺伝子も感染細胞の細胞死抑制効果を持つが、この遺伝子産物はカスパーゼファミリーの競合阻害剤として作用することが明らかにされた⁶⁾。同じくパキキュロウイルスのコードする遺伝子*iap*(inhibitor of apoptosis)は進化的によく保存されていて、哺乳類で同定された*x-iap*は活性型のcaspase-3に結合し基質とはならずその活性を阻害するユニークな分子である⁷⁾。caspaseの至適切断配列を基にテトラペプチドのアルデヒド型阻害剤を初めとする多くのcaspaseサブファミリーに特異的な阻害剤が合成されている。YVAD-CHOはcaspase-1様活性を阻害し、DEVD-CHOはcaspase-3様活性を特異的に阻害する。benzyl-oxycarbonyl-Asp-CH₂OC(O)-2,6-dichlorobenzene (Z-Asp-CH₂DCB)はより広くcaspaseファミリーを阻害する⁸⁾。

5. caspaseの活性測定及び、活性型caspaseの検出⁹⁾

合成阻害剤と同様に、caspaseの至適切断配列をもつテトラペプチドに蛍光色素を付加したcaspaseサブファミリーに特異的な合成基質が多数利用可能になっている。非可逆的なcaspase阻害剤にビオチンを付加した化合物は、活性型caspaseの活性中心

に共有結合する。この活性型 caspase と基質の複合体を SDS-PAGE で展開して膜に転写後、通常のアビジン-ビオチンの結合をもとにした蛋白質検出系で活性型 caspase の分子量を知ることができる (図2)。caspase は活性化に伴って自己分解されるが、その切断部位特異的な抗体も作製され免疫組織化学的に活性型 caspase の分布を調べることも可能になってきた¹⁰⁾。

6. おわりに

caspase の活性や活性型 caspase の検出によって、アポトーシスシグナルが細胞内で ON になっているかどうかを生化学的に調べることが可能になってきた。さらに、caspase 阻害剤によって細胞死を人為的に操作することも可能になってきており、細胞死の発生や病態での意義を研究することも可能になると思われる¹¹⁾。

[参考文献]

- 1) Ellis HM, Horvitz HR (1986): Genetic control of programmed cell death in the nematode *C. elegans*. *Cell* 44:817-29
- 2) Yuan J, Shaham S, Ledoux S, Ellis HM, Horvitz HR (1993): The *C. elegans* cell death gene *ced-3* encodes a protein similar to mammalian interleukin-1 β -converting enzyme. *Cell* 75:641-52
- 3) Alnemri ES, Livingston DJ, Nicholson DW, Salvesen G, Thornberry NA, Wong WW, Yuan J (1996): Human ICE/CED-3 protease nomenclature. *Cell* 87:171
- 4) Thornberry NA, Rano TA, Peterson EP, Rasper DM, Timkey T, Garcia-Calvo M, Houtzager VM, Nordstrom PA, Roy S, Vaillancourt JP, Chapman KT, Nicholson DW (1997): A combinatorial approach defines specificities of members of the caspase family and granzyme B. Functional relationships established for key mediators of apoptosis. *J Biol Chem*. 272:17907-11
- 5) Ray CA, Black RA, Kronheim SR,

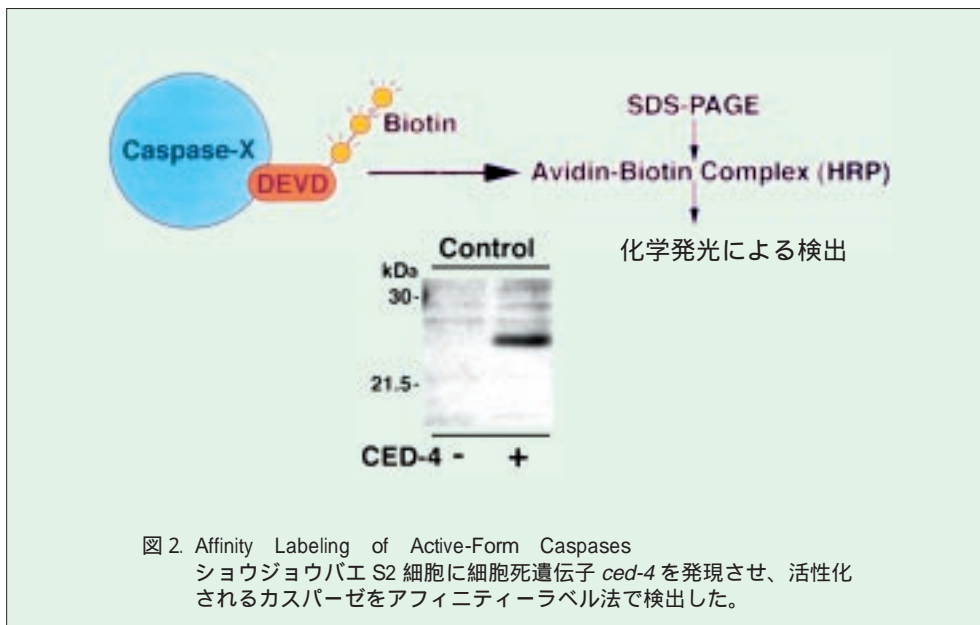


図2. Affinity Labeling of Active-Form Caspases
ショウジョウバエ S2 細胞に細胞死遺伝子 *ced-4* を発現させ、活性化されるカスパーゼをアフィニティーラベル法で検出した。

Greenstreet TA, Sleath PR, Salvesen GS, Pickup DJ (1992): Viral inhibition of inflammation: cowpox virus encodes an inhibitor of the interleukin-1 beta converting enzyme. *Cell* 69:597-604

- 6) Xue D, Horvitz HR (1995): Inhibition of the *Caenorhabditis elegans* cell-death protease CED-3 by a CED-3 cleavage site in baculovirus p35 protein. *Nature* 377:248-51
- 7) Deveraux QL, Takahashi R, Salvesen GS, Reed JC (1997): X-linked IAP is a direct inhibitor of cell-death proteases. *Nature* 388:300-4
- 8) Hisahara S, Shoji S, Okano H, Miura M (1997): ICE/CED-3 family executes oligodendrocyte apoptosis by tumor necrosis factor. *J Neurochem*. 69:10-20

9) Kanuka H, Hisahara S, Sawamoto K, Shoji Si, Okano H, Miura M (1999): Proapoptotic activity of *Caenorhabditis elegans* CED-4 protein in *Drosophila*: implicated mechanisms for caspase activation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 96:145-50

- 10) Kourouk Y, Urase K, Fujita E, Isahara K, Ohsawa Y, Uchiyama Y, Momoi MY, Momoi T (1998): Detection of activated Caspase-3 by a cleavage site-directed antiserum during naturally occurring DRG neurons apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun*. 247:780-4
- 11) Araki T, Saruta T, Ohano H, Miura M (1999): Caspase activity is required for nephrogenesis in the developing mouse metanephros. *Exp. Cell Res*. 248: 423-9.

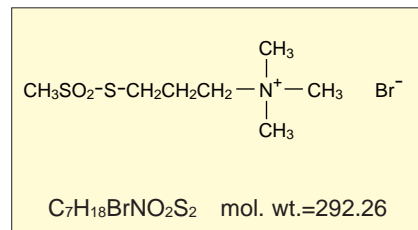
関連商品

コード No.	品名	規格	容量	希望納入価格(円)
094-04061	ICE Inhibitor W-1【Ac-YVAD-CHO】	生化学用	10mg	41,000
091-04071	ICE Inhibitor W-2【Ac-YVAD-CMK】	生化学用	10mg	39,000
095-04133	ICE Inhibitor W-3【Z-ASP-CH ₂ -DCB】	生化学用	100mg	24,000
030-16951	Caspase-3/ CPP32 Chromogenic Substrate 【Ac-DEVD-pNA】	生化学用	5mg	18,000
037-16961	Caspase-3/ CPP32 Inhibitor W-1 【Ac-DEVD-CHO】	生化学用	5mg	20,000
033-16963			25mg	80,000
031-16981	Caspase-3/ CPP32 Inhibitor W-1, Biotin Conjugate 【Biotin-DEVD-CHO】	生化学用	5mg	28,000
037-16983			25mg	112,000
034-16971	Caspase-3/ CPP32 Inhibitor W-3【Z-DEVD-FMK】	生化学用	1mg	50,000
039-17401	Caspase-3, Human, recombinant	生化学用	5 μ g	60,000
036-17411	Caspase-8, Human, recombinant	生化学用	3000units	60,000
010-17331	Anti Human Activated Caspase-3, Rabbit	免疫化学用	100 μ l	35,000
018-17131	Anti Human Activated Caspase-4, Rabbit	免疫化学用	500 μ l	40,000

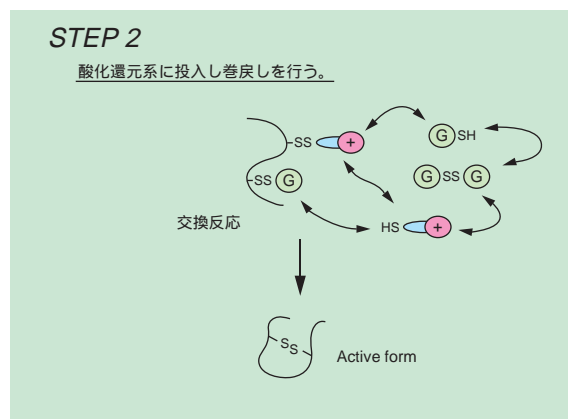
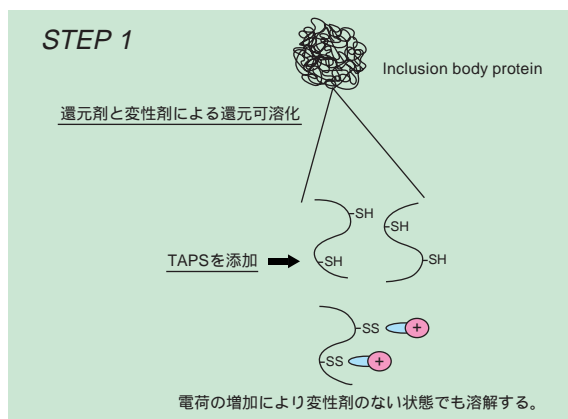
正常タンパク質再構成試薬

TAPS-sulfonate

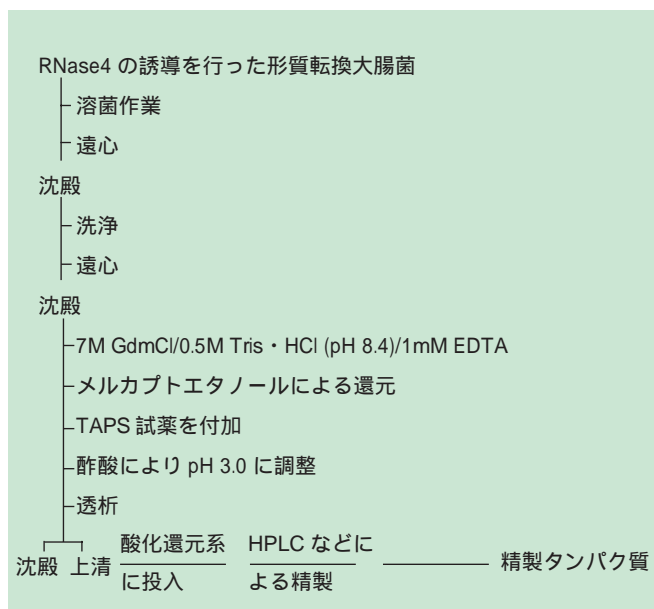
従来高度 S-S タンパク質を組換えプラスミドと一緒に大腸菌で発現させると正常な位置で架橋をしないランダム結合体を形成するため、機能を失ったりインクルージョンボディ（不溶性画分）を形成するなどし、活性型タンパク質を効率よく生産するのに問題がありました。本試薬は 4 級アミンを分子内に有するチオスルホナート化合物で、不溶性画分中に本試薬を添加する事により遊離 SH 基に強力な正電荷を付加します。TAPS-sulfonate により誘導化された変性タンパク質は溶解度が上昇する事により、陽イオン交換や液体クロマトグラフィーなどに応用する事ができるなどの特長があります。



模式図

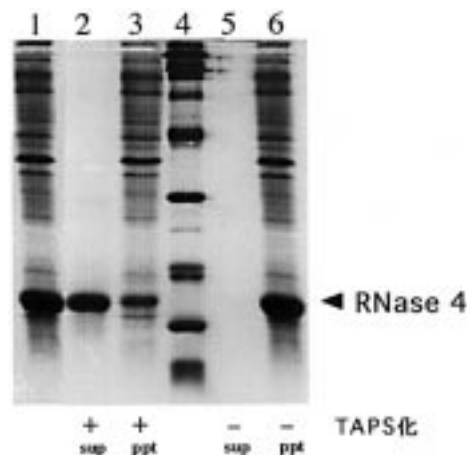


操作法 RNase 4



実用例

RNase4 を TAPS 化後 SDS-PAGE による純度検定



1. インクルージョンボディ
2. 還元 TAPS 化を行った後の精製タンパク質
3. 還元 TAPS 化を行った後の沈殿
4. 分子量マーカー
5. 還元のみで TAPS 化を行わなかった時の上清
6. 還元のみで TAPS 化を行わなかった時の沈殿

〔参考文献〕

- 1) Inoue, M. *et al.* : *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 28, 207-213 (1998)
- 2) Seno M. *et al.* : *Growth Factors*, 15(3), 215-29 (1998)
- 3) Simon, S. *et al.* : *J. Mol. Biol.*, 285, 205-214 (1999)

コード No.	品名	規格	容量	希望納入価格(円)
203-14521	TAPS-sulfonate	生化学用	1g	6,500
209-14523			5g	23,000

オワンクラゲ由来組換え体、蛍光タンパク

rGFP

rBFP

生化学用

発光オワンクラゲの緑色または青色蛍光タンパク質(GFP/BFP)は、約28kdの分子量を持ち、自己環化反応より発色団を形成する事が知られています¹⁾²⁾³⁾。

本品は、オワンクラゲ(*Aequorea victoria*)の蛍光タンパク質に由来したGFP/BFPの発色団の遺伝子を改変して作製した組換え体タンパク質です。

起 源 : *Aequorea victoria* 由来の高性能に変異させたGFPまたはBFP遺伝子を含むプラスミドを大腸菌を用いて発現

形 状 : 20mM Tris-HCl (pH 8.0)

波 長 :

GFP(Ex. 473nm , Em. 509nm)

BFP(Ex. 387nm , Em. 450nm)

[参考文献]

1) Prasher, D. C., Eckenrode, V. K., Ward, W. W. *et al.* : *Gene*, 111, 229 (1992)

2) Cody, C. W., Prasher, D. C., Westler, W. M. *et al.* : *Biochemistry*, 32, 1212 (1993)

3) Heim, R., Prasher, D. C. and Tsien, R. Y. : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91, 12501(1994)

コード No.	品 名	容 量	希望納入価格(円)
545-00901	Green Fluorescent Protein, <i>Aequorea victoria</i> , recombinant, Soln.	25 μ g	14,000
542-00891	Blue Fluorescent Protein, <i>Aequorea victoria</i> , recombinant, Soln.	25 μ g	14,000

[関連商品]

ベクター

コード No.	品 名	容 量	希望納入価格(円)
546-00811	Green Fluorescent Protein Vector pQBI 25 (GFP pQBI 25)	20 μ g	33,000
546-00791	Blue Fluorescent Protein Vector pQBI 50 (BFP pQBI 50)	20 μ g	33,000
540-00831	Green Fluorescent Protein Vector pQBI-pgk (GFP pQBI-pgk)	20 μ g	33,000
547-00841	Green Fluorescent Protein Vector pQBI-pol (GFP pQBI-pol)	20 μ g	33,000
543-00821	Green Fluorescent Protein Vector pQBI 63 (GFP pQBI 63)	20 μ g	33,000
549-00801	Blue Fluorescent Protein Vector pQBI 67 (BFP pQBI 67)	20 μ g	33,000

抗 体

コード No.	品 名	容 量	希望納入価格(円)
542-00771	Anti-Auto Fluorescent Protein, Monoclonal Antibody (Clone: 3E6)	150 μ g	26,000
549-00781	Anti-Auto Fluorescent Protein, Monoclonal Antibody (Clone: 11E5)	150 μ g	26,000

抗体タイプの新規 RNase 阻害剤

Ribonuclease Inhibitor (Antibody)

生化学用

リボヌクレアーゼ(RNase)を抗原としたモノクローナル抗体です。RNase A, RNaseB 及び RNase C に高いアフィニティーを持ち、阻害効果を示します。RNase I, RNase T1, RNase T2 及び RNase H にはアフィニティーが無く阻害効果を示しません。

活 性 : ラベルに表示

形 状 : 20mmol/l HEPES-KOH (pH 7.5), 100mmol/l KCl, 2mM DTT, 0.1mmol/l EDTA, 50%(V/V) Glycerol を含む溶液

542-00911 5,000units 17,000 円



グリア細胞の NO とニューロン死

北海道大学大学院 薬学研究科 野村 靖幸

個体の生命活動を中枢的に統御する脳の機能を演出するのは100数十億個も存在する神経細胞（ニューロン）である。一見複雑であるが整然とかつ合目的に構成されるニューロン・ネットワークが高次の中枢機能を担っている。近年、この脳機能の主役であるニューロンに対するグリア細胞の働きが注目されている。ニューロンの数の約5～10倍も脳組織に存在するグリア細胞は、ニューロンと相互作用し、種々の重要な役割を果たしている。グリア細胞のニューロンへの主な機能としては、次のようなものが知られている。すなわち、グリア細胞の一つで突起を数本有するオリゴデンドログリアは、神経線維に巻きついてミエリン髄鞘を形成し、軸索の電気伝導（跳躍伝導）を効率よく行わせる。また、星型をした大型細胞のアストログリアや、小型で脳マクロファージともいわれ遊走能や喰食能を有するミクログリアは、ニューロンに栄養を与えたり、ニューロン機能に関わる各種代謝物質を取り込んだり分解したり、また侵入する外敵からニューロンを防御し、また健康に生活できるようにその環境を整えたりする。アストログリアやミクログリアは細胞分裂能や移動能を有している。すなわち、内外の刺激（ストレスや外敵侵襲など）に応答し、増殖したり必要な部位に動員されたりして活動する。また、これらの細胞において産生・分泌されるニューロトロフィン（NGF, CNTF, GDNF など）やサイトカイン（IL-1, IL-6 など）がニューロンの増殖、分化、および生死に影響を及ぼすことが分かりつつある。アストログリアとミクログリアの脳機能発現における役割分担など詳細は不明であり、現在活発に研究されている。

脳変性疾患において観察される

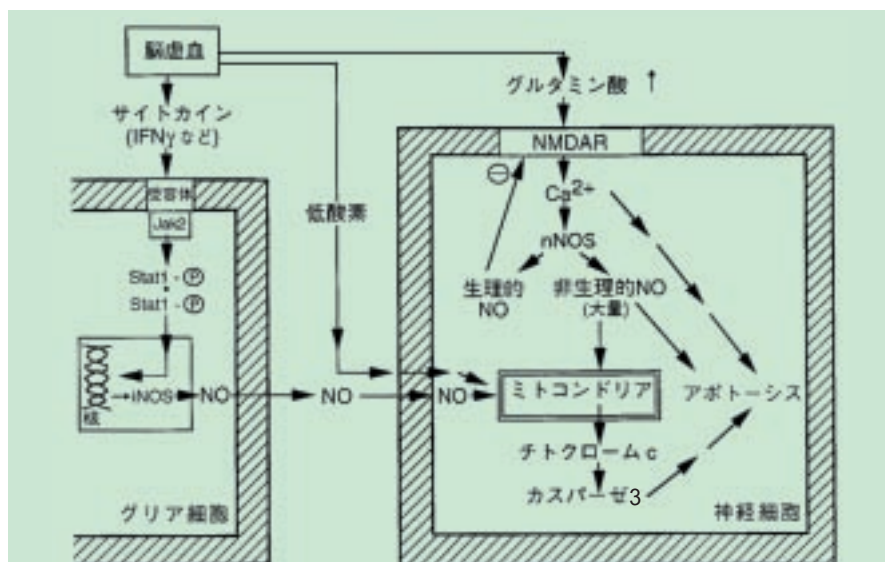


図1. ニューロンのnNOSおよびグリア細胞のiNOSによって産生されたNOのニューロン死抑制/促進の二相作用

NOは、1)ニューロンのNMDA受容体をダウン・レギュレートしてアポトーシスを抑制する一方、2)ミトコンドリアよりチトクロームcを遊離し、それによるcaspase3活性化を介してアポトーシスを促進する。なお、低酸素は直接ニューロンに働き、チトクロームc遊離、caspase3活性化を介してアポトーシスを誘起する経路も考えられる。

CD14: LPS受容体、NMDAR: NMDA受容体。

ニューロンの脱落・変性に、グリア細胞が重要な役割を果たすことが分かってきた。とくに脳血管性痴呆症におけるニューロン死にニューロン由来の一酸化窒素(NO)のみでなく、グリア細胞由来のNOが関わることを示されている。細胞死の様式として、一般に壊死(necrosis)と枯死(apoptosis)がある。細胞膜の破壊、細胞の膨潤と崩壊、自己融解による死であるnecrosisに対して、apoptosisでは、形態的に細胞核の濃縮や核断片化を、また生化学的にはDNA断片化を伴う。またミトコンドリア依存性のアポトーシスの場合、ミトコンドリアから遊離されたチトクロームcにより活性化されたcaspase3(cysteine aspartase 3)という蛋白質分解酵素により、apoptosis関連蛋白質(inhibitor of caspase-

activated DNase, ICADなど)の分解が引き起こされるが、NOや低酸素によってもこのチトクロームc遊離やcaspase3活性化が生じることが分かった¹²⁾(図1)。とくに、虚血/低酸素刺激に伴い、1)アストログリアにおいてサイトカイン(IFN γ やTNF α など)による受容体とチロシンキナーゼ(Jak2型)の活性化、転写因子(Stat1)のリン酸化/2量体形成/核内移行を介して発現する誘導型NOS(iNOS)や、2)過剰に遊離されたグルタミン酸により活性化されたニューロン内NOS(nNOS)が大量にNOを生産させそのNOがニューロンにおける細胞内情報伝達系(チトクロームc遊離、caspase活性化など)を介してアポトーシスを引き起こすようである³⁻⁵⁾。なお、ニューロンにおいてGluにより生理的

に活性化された NMDA 受容体 / チャネルを介し流入した Ca^{2+} 、次いで形成された Ca^{2+} ・カルモジュリンが活性化された nNOS により生理的に産生される NO によっては NMDA 受容体がダウンレギュレートされ、むしろアポトーシスは抑制されることが知られている。また、脳虚血時にアストログリアでは、NO 以外にヘム・オキシゲナーゼ I、ホスホリパーゼ A₂、グルタミン合成酵素などの酵素や、NGF、GDNF、IL-1、IL-6、IL-8 などのサイトカイン、HSP70、GRP78 などのストレス蛋白質なども発現し、ニューロンの生死に影響を及ぼすとともに、グリア細胞自身の生死の制御に関与している⁶⁾。

従来、グリア細胞はニューロンの機能を助け、その死を防御するというサポート的役割が考えられていたが、近年、脳内外におけるストレスの種類、程度などによってはグリア細胞が NO などの細胞障害分子も産生し、ニューロンを障害する可能性も示された。一方、ニューロンが神経伝達物質などを介してグリア細胞の機能に関わることも知られている。脳を健康に保ち、また脳疾患の発症を予防するために、ニューロン・グリア相関、とくにグリア細胞の働きやそのしくみにもっと注目し、その研究を推進することが期待されている。

〔参考文献〕

- 1) Araya, R., Uehara, T. & Nomura, Y. : FEBS Lett. 439, 168 (1998)
- 2) Uehara, T., Kikuchi, Y. & Nomura, Y. : J. Neurochem. 72, 196 (1999)
- 3) 大熊康修, 野村靖幸: 医学の歩み, 186, 783 (1998)
- 4) Nomura, Y. : Neuropathology 19, 1 (1999)
- 5) 野村靖幸: 脳 21, 2, 19 (1999)
- 6) 野村靖幸: Clinical Neuroscience, 印刷中 (1999)

New Products

NO による立体構造変化を認識できる sGC 抗体

Anti soluble Guanylate Cyclase (sGC), Monoclonal Antibody 免疫化学用

血管内皮由来弛緩因子 (EDRF) の本体である事が見出された NO (nitric oxide) の生理作用は多様多岐に渡る事が知られています。その作用標的分子として知られている sGC (可溶性グアニル酸シクラーゼ) は、NO が sGC のヘムに結合すると立体構造が変わり、酵素活性が 100 倍以上に増強され、cGMP の合成を促進します。その結果生じた cGMP が、血管系では血管弛緩をもたらす、神経系では逆行性の神経情報を伝達し、また脳虚血時の神経細胞死を引き起こすことが示唆されています。このように、NO により活性化され、cGMP の産生を促進する sGC の局在及び作用機序を知ることは生理機能や疾患の病因の解明に必須であると考えられます。

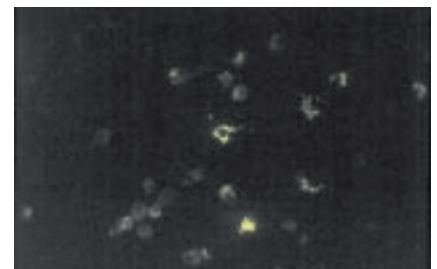
本抗体は、NO により活性化された sGC を強く認識するものであり、NO 研究伸展の手段としてご利用下さい。

免疫原: ウシ肺由来の精製 sGC
 形状: 0.1mol/l Glycine-Tris (pH 7.4)
 濃度: 500µg/ml
 精製法: 硫酸分画及びプロテイン G アフィニティクロマトグラフィにて精製

クローン No.: mAb 3221

サブクラス: IgG₁

特異性: sGC と特異的に反応するだけでなく、NO による sGC の立体構造変化により抗原抗体反応が増強する。sGC の α と β サブユニットの両方を認識する。膜結合型の GC とは反応しない。



ラット小脳初代培養細胞の免疫蛍光染色

種交叉反応性: ラット、ウシ、ヒトと反応する

実用希釈倍数:

ウエスタンブロット 1 : 5,000
(ALP による検出)

蛍光抗体法 1 : 250

019-17801 20µg 30,000 円

for Ultratrace Analysis

超微量分析用 高純度酸、超純水

誘導結合プラズマ質量分析装置(ICP-MS)やフレームレス原子吸光分析装置(FL-AAS)などを用いる超微量金属成分分析(Ultratrace Analysis)においては、分析機器の進歩・普及に伴い、試料の前処理に用いる試薬にも高純度化が求められています。

この度当社では、超微量金属成分分析に安心してご使用頂ける「超微量分析用」規格の高純度酸及び超純水を発売しました。

特長

超高純度

製品中の不純金属を ppt レベルにまで抑えた超高純度試薬です。

ふっ素樹脂(PFA)製容器を採用

ppt レベルの品質を保持するため、充てん前に十分な洗浄を行った PFA 製容器を使用しております(超純水は高密度ポリエチレン容器を使用)。また、クリーンルーム内に設置されたクラス 10 以下のクリーンベンチ内で充てんを行っておりますので安心してご使用頂けます。

分析

ICP-MS、FL-AAS による不純金属分析を実施し、分析結果は製品に添付してあります。

分析例

測定元素	単位	塩酸	超純水
Silver (Ag)	ppt	10	10
Aluminium (Al)	ppt	10	10
Arsenic (As)	ppt	10	10
Barium (Ba)	ppt	10	10
Beryllium (Be)	ppt	10	10
Bismuth (Bi)	ppt	10	10
Calcium (Ca)	ppt	30	10
Cadmium (Cd)	ppt	10	10
Cobalt (Co)	ppt	10	10
Chromium (Cr)	ppt	10	10
Copper (Cu)	ppt	10	10
Iron (Fe)	ppt	30	10
Potassium (K)	ppt	10	10
Lithium (Li)	ppt	10	10

測定元素	単位	塩酸	超純水
Magnesium (Mg)	ppt	10	10
Manganese (Mn)	ppt	10	10
Molybdenum (Mo)	ppt	10	10
Sodium (Na)	ppt	10	10
Nickel (Ni)	ppt	10	10
Lead (Pb)	ppt	10	10
Rubidium (Rb)	ppt	10	10
Rhodium (Rh)	ppt	10	10
Tin (Sn)	ppt	10	10
Strontium (Sr)	ppt	10	10
Thorium (Th)	ppt	10	10
Uranium (U)	ppt	10	10
Tungsten (W)	ppt	10	10
Zinc (Zn)	ppt	10	10

コード No.	品名	濃度	規格	容量	希望納入価格(円)
148-06935	硝酸(1.42)	69%	超微量分析用	500ml	16,000
089-07555	塩酸	36%	超微量分析用	500ml	16,000
198-11825	硫酸	97%	超微量分析用	500ml	18,000
217-01031	超純水	—	超微量分析用	1l	5,000

Tamoxifen Citrate

生化学用

エストロゲンアナログとして開発された本化合物は医薬品として乳がんの予防治療薬として用いられています。また SERM (選択的エストロゲン受容体修飾剤) と呼ばれ、エストロゲン受容体へ選択的に結合する事が知られています。骨や心臓などの組織ではエストロゲン作用を示し、乳房や子宮ではエストロゲンの作用を阻止するという相反する2つの働きを持つ興味深い化合物です。どのようにしてエストロゲン受容体へ選択的に結合するのかメカニズムは分かっていませんが、乳

がんや骨粗鬆症などの疾病に密接な関わりがあるとされています。

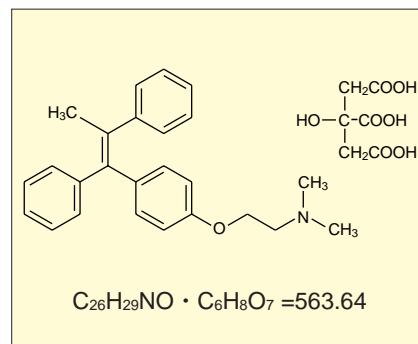
〔規格〕

含量：99.0% 以上

溶 状：メタノールに可溶

〔参考文献〕

- 1) Couillard, S. *et al.* : *Cancer Res.*, 58, 60 (1998)
- 2) Evans, S. E. *et al.* : *Cancer Res.*, 57, 5155 (1997)
- 3) Zhang L. *et al.* : *Oncogene*, 15, 2093 (1997)



209-14361	250mg	3,500 円
205-14363	1g	10,000 円
203-14364	5g	35,000 円
207-14362	25g	100,000 円

アルデヒド分析用

アセトニトリル

大気汚染防止法に基づく、大気中のホルムアルデヒド、アセトアルデヒドの測定方法において、補集管に吸着させた測定対象物質の脱着溶媒として使用されます。

本品はホルムアルデヒド、アセトアルデヒドのブランク物質がほとんどないことを確認しています。

〔規格〕

アルデヒド分析用適合性：試験適合^注
含量 (cGC) : 99.8% 以上

注) 本品中のホルムアルデヒド、アセトアルデヒド含量が各 10ppb 以下であること

コード No.	品 名	規 格	容 量	希望納入価格 (円)
011-17741	アセトニトリル	アルデヒド分析用	200ml	照 会

〔関連商品〕

コード No.	品 名	規 格	容 量	希望納入価格 (円)
012-17391	2 種アルデヒド DNPH 混合標準液 (ホルムアルデヒド、アセトアルデヒド、1-2, 4-DNPH, 各アルデヒドとして 0.1µg/µl in acetonitrile)	大気汚染物質測定 (HPLC) 用	2ml × 5	12,000
018-17491	2 種アルデヒド DNPH 混合標準液 (ホルムアルデヒド、アセトアルデヒド、1-2, 4-DNPH, 各アルデヒドとして 0.1µg/µl in ethyl acetate)	大気汚染物質測定 (GC) 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、プロピオンアルデヒド、ホルムアルデヒド、イソブチルアルデヒド、n-吉草酸アルデヒド、イソ吉草酸アルデヒド、1-2,4-DNPH, 各アルデヒドとして 0.1µg/µl in acetonitrile)	悪臭物質試験 (HPLC) 用	2ml × 5	15,700

内分泌攪乱物質の低濃度を保証!

環境分析用溶媒

環境中に放出されている多くの化学物質が、生体の内分泌を攪乱している可能性が示唆され、それらの化学物質の同定、分析、作用機序の研究が進められています。

この度、フタル酸エステル類、アルキルフェノール類、スチレンダイマー・トリマー等の内分泌攪乱物質濃度を低く抑えた溶媒を商品化しました。内分泌攪乱物質類の分析に安心してお使いいただけます。

〔規格〕

項目	アセトン	アセトニトリル	n-ヘキサン
内分泌攪乱物質分析適合性*	適合	適合	適合
含量 (cGC)	99.8% 以上	99.8% 以上	96.0% 以上

* 内分泌攪乱物質分析適合性試験 *

高分解能 GC/MS を用いて、フタル酸エステル類、アジピン酸 2-エチルヘキシル、アルキルフェノール類、ビスフェノール A、スチレンダイマー・トリマー等の内分泌攪乱物質を測定し、ほとんど存在しない事を確認。

また、1,000 倍濃縮を行い、GC-ECD でハロゲン化有機物がない事を確認。

〔取扱い上の注意〕

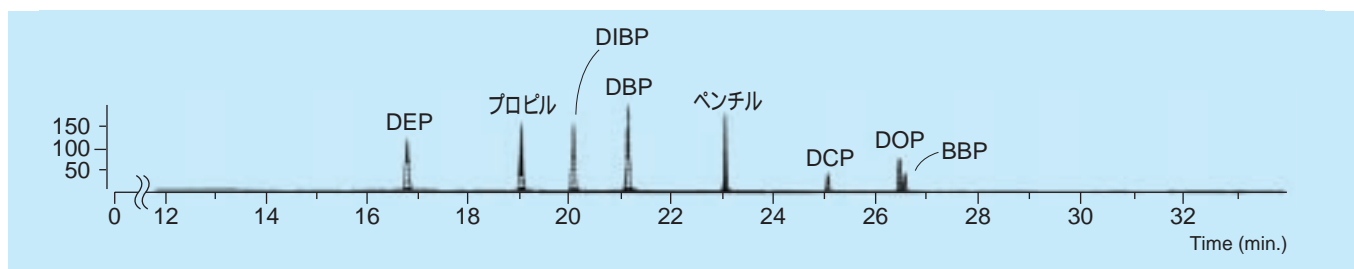
* 本品はアルミキャップを使用しておりますが、お取扱いの際は以下の点に注意してお使い下さい。

- ・ 栓の開閉によっても外気で汚染されるおそれがありますので、開栓後はできるだけ早く全量をご使用下さい。
- ・ 本品の流出箇所を手で触れますと、汚染の原因になります。
- ・ すべてガラス器具を使用して下さい。ポリエチレン、ポリ塩化ビニルのようなプラスチック材質はすべて極微量の溶出成分含有のため汚染の原因になります。

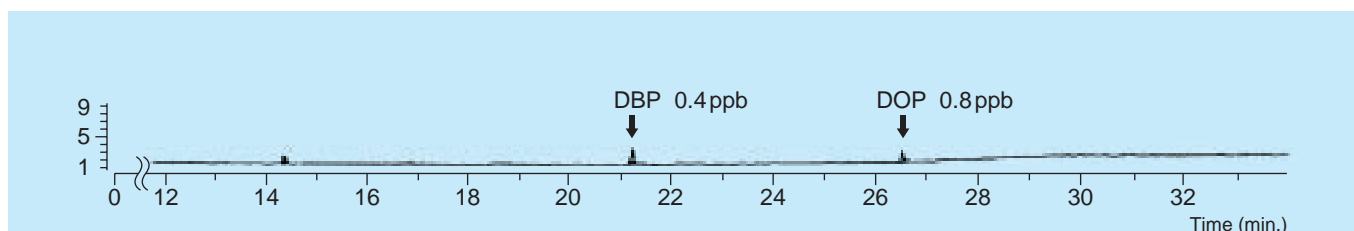
〔内分泌攪乱物質分析適合性の試験例〕

n-ヘキサン中のフタル酸エステル類 分析例 《GC/MS(SIM) で測定》

標準品チャート フタル酸エステル 8種 各 10ppb 添加



製品チャート



コード No.	品名	規格	容量	希望納入価格 (円)
018-17815	Acetone	環境分析用	500ml	1,900
015-17825	Acetonitrile	環境分析用	500ml	2,600
085-07655	n-Hexane	環境分析用	500ml	1,800

環境分析用試薬 重水素化合物標準品

内部標準物質、サロゲート物質としてお使いいただける、重水素化合物標準品を商品化しました。

No.	コード No.	品名	規格	容量	希望納入価格(円)
< スチレンダイマー・トリマー >					
1	041-26811	2,4-Diphenyl-1-butene-d ₅ Std.	環境分析用	5mg	照会
2	048-26821	cis-1,2-Diphenylcyclobutane-d ₅ Std.	環境分析用	5mg	照会
3	045-26831	trans-1,2-Diphenylcyclobutane-d ₅ Std.	環境分析用	5mg	照会
4	205-14581	1,3,5-Triphenylcyclohexane-d ₅ Std.	環境分析用	5mg	照会
5	202-14591	2,4,6-Triphenyl-1-hexene-d ₅ Std.	環境分析用	5mg	照会
< フタル酸エステル類 >					
1	021-13761	Benzyl Butyl Phthalate-d ₄ Std.	環境分析用	50mg	照会
2	025-13801	Bis(2-ethylhexyl) Phthalate-d ₄ Std.	環境分析用	50mg	照会
3	047-26911	Dibutyl Phthalate-d ₄ Std.	環境分析用	50mg	23,000
4	044-26921	Dicyclohexyl Phthalate-d ₄ Std.	環境分析用	50mg	20,000
5	041-26931	Diethyl Phthalate-d ₄ Std.	環境分析用	50mg	照会
6	048-26941	Diisobutyl Phthalate-d ₄ Std.	環境分析用	50mg	照会
7	045-26951	Dimethyl Phthalate-d ₄ Std.	環境分析用	50mg	20,000
8	042-26961	Di-n-octyl Phthalate-d ₄ Std.	環境分析用	50mg	照会
9	049-26971	Di-n-pentyl Phthalate-d ₄ Std.	環境分析用	50mg	照会
< 有機すず化合物 >					
1	207-14661	Tetrabutyltin()-d ₃₆ Std.	環境分析用	50mg	照会
2	204-14671	Tributyltin() Chloride-d ₂₇ Std.	環境分析用	50mg	照会
3	201-14681	Triphenyltin() Chloride-d ₁₅ Std.	環境分析用	50mg	照会
< その他 >					
1	017-17721	Acenaphthene-d ₁₀ Std.	環境分析用	100mg	照会
2	028-13771	Benzophenone-d ₁₀ Std.	環境分析用	100mg	10,000
3	025-13781	Benzo[a]pyrene-d ₁₂ Std.	環境分析用	50mg	照会
4	022-13791	Biphenyl-d ₁₀ Std.	環境分析用	100mg	照会
5	022-13811	Bisphenol A-d ₁₆ Std.	環境分析用	100mg	照会
6	063-03911	Fluoranthene-d ₁₀ Std.	環境分析用	50mg	照会
7	060-03921	Fluorene-d ₁₀ Std.	環境分析用	100mg	18,000
8	140-06951	Naphthalene-d ₈ Std.	環境分析用	1g	照会
9	147-06961	Nitrobenzene-d ₅ Std.	環境分析用	1g	8,000
10	161-19531	Perylene-d ₁₂ Std.	環境分析用	100mg	20,000
11	168-19541	Phenanthrene-d ₁₀ Std.	環境分析用	100mg	15,000
12	200-14651	p-Terphenyl-d ₁₄ Std.	環境分析用	100mg	10,000

〔参考文献〕

第26回日本環境化学会講演会予稿集(1998)

ダイオキシン類分析用溶媒

品目充実

ご好評いただいておりますダイオキシン類分析用溶媒にアセトン、ジエチルエーテル、エタノール、メタノールの4品目を追加販売しました。

ダイオキシン類分析用溶媒は、高分解能GC-MS法で適合試験を行っており、製品中の各4~6塩素化ジベンゾ-パラジオキシン、4~6塩素化ジベンゾフランが1pg/l以下であることを保証します。各種試料中の超微量ダイオキシン類、およびコプラナPCBの高感度分析に安心してご使用いただけます。

〔規格〕アセトン

外観	無色透明の液体
密度(20℃)	0.789 ~ 0.792g/ml
水分	0.3%以下
不揮発物	2ppm以下
ダイオキシン類分析適合性	試験適合
含量	99.8%以上

〔ダイオキシン類分析適合性〕

ダイオキシン	4~6塩素化物	1pg/l以下(1ppq ² 以下)
	7,8塩素化物	5pg/l以下(5ppq以下)
ジベンゾフラン	4~6塩素化物	1pg/l以下(1ppq ² 以下)
	7,8塩素化物	5pg/l以下(5ppq以下)
コプラナPCB ^{*1}		10pg/l以下(10ppq以下)

*1 ノンオルト-Co-PCB(4~6塩素化物)3種類、モノオルト-Co-PCB(5~7塩素化物)8種類およびジオルト-Co-PCB(7塩素化物)2種類

*2 1,000兆分の1

製品には検査報告書を添付しています。

価格はp.36をご参照下さい。

ダイオキシン類分析用

DIOXIN TRAP BEADS

DIOXIN TRAP BEADS は排ガス中のダイオキシン類をサンプリングする際の吸着樹脂(スチレン-ジビニルベンゼン共重合体)です。

本品は洗浄・乾燥処理済でありダイオキシン類の微量分析に最適です。

都市ごみ焼却施設の排出ガス中のダイオキシン補集試験

DIOXIN TRAP BEADS(弊社品)とA社品の各ダイオキシン補集量を試験した。

ごみ焼却施設にて試料採取装置(図1参照:樹脂容量は各155ml)で排ガス試料を採取し、厚生省告示第234号(平成9.12.1公布)廃棄物の処理及び清掃に関する法律施行規則別表第2の規定に基づき分析した。

表1に樹脂1mlあたりの各ダイオキシン補集量を記載します。

DIOXIN TRAP BEADSは十分なダイオキシン補集能をもつことが分かります。

〔物性データ〕

	DIOXIN TRAP BEADS	A 社品
外 観	白色不透明球状	白色不透明球状
比表面積	500m ² /g	320m ² /g
見かけの密度	289g/l	433g/l
気孔率(乾燥状態)	1.6ml/g	0.64ml/g

表 1. 樹脂 1ml あたりの PCDD 補集量(都市ごみ焼却施設)

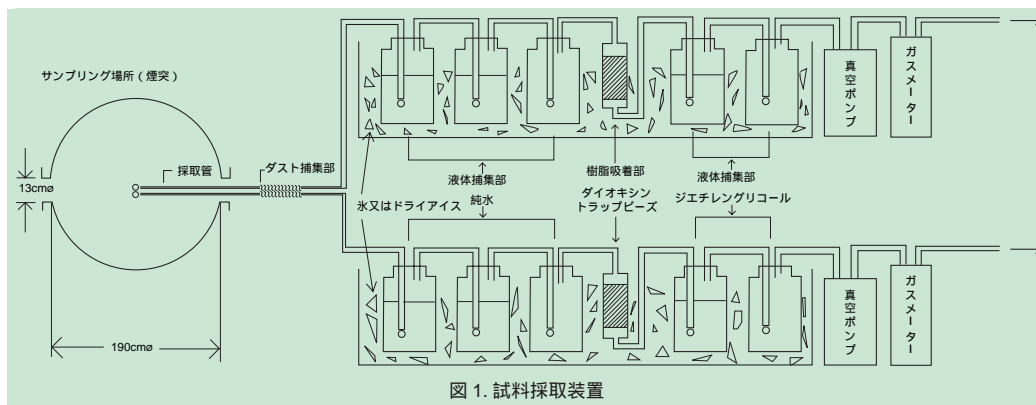
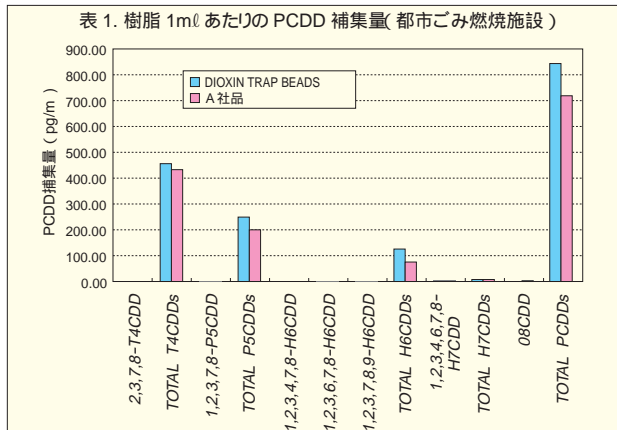


図 1. 試料採取装置

コード No.	品 名	規 格	容 量	希望納入価格(円)
040-27481	DIOXIN TRAP BEADS	ダイオキシン類分析用	200g	25,000

ダイオキシン類分析用溶媒

〔新製品〕

コード No.	品 名	容 量	希望納入価格(円)
010-17831	アセトン	1ℓ	2,900
016-17833		3ℓ	6,900
049-27451	ジエチルエーテル	1ℓ	6,200
050-06661	エタノール	1ℓ	5,000
136-13461	メタノール	1ℓ	2,800
132-13463		3ℓ	6,700

〔既存品〕

コード No.	品 名	容 量	希望納入価格(円)
048-26321	ジクロロメタン	1ℓ	3,500
044-26323		3ℓ	8,800
083-07391	ヘキサン (n-)	1ℓ	2,400
089-07393		3ℓ	6,000
203-14141	トルエン	1ℓ	3,300
209-14143		3ℓ	8,300

製品規格は p.35 をご参照下さい。

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7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)