



高濃度 ----- ブランク

## 共存物質の影響を受けにくいタンパク質の定量キット

### Protein Blot Assay Kit wako

#### タンパク質定量用

タンパク質を効率的に PVDF 膜へプロットさせて、色素の発色によりタンパク質濃度を測定するキットです。

#### 特長

- SDS の共存濃度が 4% まで影響を受けない。
- 定量範囲は 0.2 ~ 20 $\mu$ g まで測定でき、液相法に比べて高感度。
- 必要なサンプル量は 20 $\mu$ l。
- 発色試液はガラス、プラスチック器具への汚染が少ない。
- 測定に必要な試薬、消耗品をセット化、最適化。
- 発色試薬は希釈せずにそのまま使用できる。

#### 内容

- |                    |                        |
|--------------------|------------------------|
|                    | (96 プロット用 / 480 プロット用) |
| ・ PVDF 膜           | 1 枚 / 5 枚              |
| ・ ろ紙               | 4 枚 / 10 枚             |
| ・ プロットング溶液         | 30ml / 150ml           |
| ・ 洗浄液              | 30ml / 150ml           |
| ・ 発色試液             | 60ml / 310ml           |
| ・ BSA 標準液 (2mg/ml) | 200 $\mu$ l / 1ml      |

291-57001	96Blot 用	8,000 円
297-57003	480Blot 用	28,000 円

詳しくは、p.35 をご参照下さい。

#### 目次

化学大家 「高峰謙吉」	芝 哲夫	.....2
総説 「ルイス酸 - 界面活性剤一体型触媒 ~ 水中で有効な反応場を構築するルイス酸触媒 ~」	小林 修、森 雄一郎	.....6
「P $\alpha$ (II) - ハイドロタルサイト - 常圧酸素及び空気下におけるアルコール類の酸化触媒」	西村 貴洋、植村 榮	.....10
「硬組織標本のための樹脂包埋切片作製例」	新田 浩	.....16
「L012 化学発光による好中球活性酸素代謝特性の解析」	今田 伊助、佐藤 秀介、井上 正康	...31
シリーズ < Talking of LAL >		
「第 44 話 試料の希釈液」	土谷 正和	...13
< How to 組織イメージング >		
「第 4 回 非上皮性腫瘍 1)」	石川喜美男、三瓶 接子、宮 哲正、久川 芳三、牛込新一郎	.....18
< 脳科学 - ロメモ >		
「脳の老化と痴呆」	大熊 康修	.....24
テクニカルレポート 「C30 型充てん剤 Wakopak Navi C30-5 の特性」	久保田 守	.....14
新製品フラッシュ プロテインプロットアッセイキットワコー	.....1,35	
セレノメチオニン、RNA マーカーシリーズ	.....5	
トリス(ドデシル硫酸)スカンジウム三水和物	.....9	
パラジウム(II) - ハイドロタルサイト	.....12	
ワコーシル® C-200、C-300、日本製薬(株)ポリペプトン N シリーズ	.....15	
オステオレジン™ 包埋キット、ライカマイクロシステムズ(株)ヒストレジン包埋キット、ヒストレジンプラス包埋キット	.....17	
パソブレップ® 546	.....22	
4-(ジメチルアミノ)スチルベン、イノシトール(1 $\alpha$ ) $\beta$ 脂質代謝関連物質、ANTICANCER 社メチオニナーゼ	.....23	
アミロイド $\beta$ - プロテイン、セクレターゼ阻害剤	.....25	
ORPEGEN Pharma 社 フローサイトメータ用キット	.....26	
エストロゲンレセプター $\beta$ 、ヒト、組換え体、溶液	.....27	
エストロゲン-R ( $\alpha$ ) コンベクタースクリーニングキット	.....28	
ソルビトール脱水素酵素、(株)シバヤギ レビス® インスリン- ラット(U タイプ)	.....30	
L-012、DAB トリス錠	.....34	
分光分析用溶媒	.....36	
Q & A エストロゲン-R ( $\alpha$ ) コンベクタースクリーニングキット	.....28	
お知らせ 組織脱水溶液、低メタノールタイプ専用ディスプレイ	.....22	

# 高峰讓吉 (1854 ~ 1922)

大阪大学名誉教授 芝 哲夫

今年(1900)は高峰讓吉が副腎ホルモンアドレナリンの結晶化を発表した年から100年目に当たる<sup>1)</sup>。その前年1900年7月21日にニューヨークの高峰研究所において、高峰の共同研究者上中(うえなか)啓三によって副腎の止血作用成分アドレナリンが結晶としてはじめて単離された。

高峰讓吉(写真1)は嘉永7年(1854)11月3日越中高岡に加賀藩典医高峰精一の長男として生まれた。慶応元年(1865)12歳の年に加賀藩の選抜生として長崎に留学した<sup>2,3)</sup>(写真2)。明治2年(1869)には、大阪に開校された大阪医学校に移ったが、この年に医学校の近くにオランダ人化学者K.W.ハラタマ Gratamaによって開設された化学学校の舎密局へ英会話や化学の講義の聴講に通った<sup>4)</sup>。ハラタマはその翌年舎密局を去ったが、その後任としてドイツ人化学者H.リッテル Rittelが赴任した。高峰はこの舎密局における化学講義を聴くうちに、医学から転じて化学に志向を変えた。

明治6年(1873)に上京して、工学寮のちの工部大学へ入学し、応用化学を専攻した。明治12年(1879)に卒業して、官費により英国へ留学した。3年の後に帰国した時、留学で習得した技



写真1. 高峰讓吉

術を日本固有の工業の開拓に応用したいと望んで農商務省に入った。この時、高峰は「西洋で発達した工業を企画するならば、その技術に熟練している西洋人を雇えばよい。日本人がそれを行っても勝ち味はない。一方わが国固有の工業はまだ一向に顧みられていないが、近代化学の方法を以てすれば必ず発達する可能性がある。自分は英国で修得した技術を日本独特の工業に応用したい。そこから先人未踏の地を開拓することができれば願ってもない幸いである」と言った<sup>2)</sup>。そして和紙、藍、清酒、人造肥料などのわ

が国独自の産物の製造、醸造事業に取り組んだ<sup>2)</sup>。

明治17年(1884)の米国ニューヨークの万国工業博覧会に、高峰は事務官として出席した。この時南カロライナ州産の磷酸鉍が出品されていたのを見て、

これを輸入して日本の農業に必要な磷酸肥料として使用すべきだと考え、帰国後渋沢栄一や益田孝らを説き伏せて、東京人造肥料会社を設立し、わが国最初の輸入人造肥料を生産した。このニューオルリーズへ出張の折、米国婦人カロライン・ヒッチ Caroline Hitch 嬢と婚約して、3年後に再び渡米して結婚して日本へ連れ帰った<sup>2)</sup>。

この間に高峰はまたエタノール醗酵に従来用いられていた麦芽すなわちモルトに代えて、トウモロコシや小麦のふすまを用いる高峰元麹法を発明した。これは価格も製造時間の点でも画期的な改良法であったので、米国のウイスキー業者の注目するところとなり、明治23年(1890)にシカゴのウイスキートラストの醸造会社より招待されて渡米し、麹製造工場、さらには高峰ファーマメント会社を設立した<sup>2,3)</sup>。この時代に米国に向って日本の技術輸出が行われたという事実は他に例がなく特筆に値する。しかし、事業は必ずしも順調に進まず、モルト業者からの迫害を受けて大きな打撃を蒙った。しかし高峰はそれにも屈せず次の飛躍をはかった。

明治27年(1894)、高峰は麹菌よりもさらに強力な澱粉消化酵素タカジアスターゼの分離製造に成功した<sup>5)</sup>。これは唾液、膵液に匹敵する糖化作用があるとして、消化剤として一躍注目を受けた。3年後にはタカジアスターゼはパーク・デイビス Park Davis 社から製造販売されることになった。明治34年(1901)にはこのタカジアスターゼの日本での製造販売のために三共商会、今日の三共株式会社が発立された。高峰は米国にあって、常に故国の科学技術の発展を願っていた。

1894年に Oliver と Schaefer が副腎中に血圧増加作用を示す物質が分



写真2. 長崎留学時代の高峰讓吉(右から2人目15歳)



泌されることを報告して以来、その作用物質の分離を企てた研究者が少なくなかった。1897年には米国のJ.J. Abelがその物質をエピネフリン epinephrin と名付け、ドイツのO. von Furth はスプラレニン suprarenin と称するものを分離したと報告したが、それらはいずれも単一な純粋物質とはいえなかった<sup>6)</sup>。

高峰は1896年頃よりニューヨークのセントラルパークウエストに高峰化学研究所を開設して、パーク・デビス社の依頼により、この副腎ホルモンの研究に着手した。その場所は132丁目、179丁目、173丁目、106丁目と転々と変っているが、その最初の研究所の位置は475番地の地下室であったといふ(写真3)。

明治33年(1900)2月に日本から上中啓三が高峰研究所に助手として迎えられた。上中は現在の兵庫県西宮市名塩の出身で(写真4)東京帝国大学薬学部専科を出て、長井長義、ついで田原良純の助手を勤め、その腕を買われて高峰の助手に推薦された<sup>7)</sup>。上中はニューヨークに到着後、直ちに副腎ホルモンの単離の実験に取り掛かり、同年7月21日に至って遂にその結晶化にはじめて成功した<sup>8)</sup>(写真5)。結晶は直ちにパーク・デビス社に送られ、「副腎の生理作用を確認す」の返電が来て、高峰と上中を驚喜させた。これは翌1901年にJohns Hopkins大学において高峰によって報告され、同年American Journal of Pharmacy<sup>1)</sup>(写真6)に発表されてアドレナリン adrenalin と命名された<sup>5,9)</sup>。

ある細胞から分泌されて標的細胞に情報を伝達する物質の総称としてホルモンの名が与えられたのはその翌年1902年W. M. BaylissとE. H. Starlingによってであった。高峰、上中のアドレナリンは世界最初のホルモンの結晶化であった。このアドレナリンはその止血作用によって外科手術に重用され、また強心剤、喘息治療薬と

しても実用に供されて、当時「アドレナリンなくして治療なし」とまでいわれた。ボクシング世界チャンピオンのG. タニーは高峰亡き後、その次男エーベン孝に宛てて「アドレナリンは私に絶対に必要で、出血を止め、視力を回復し、呼吸を安らげてくれて、幾度となく敗北を救って勝利に導いてくれた」と感謝の手紙を書き送った。

タカジアスターゼ、アドレナリンの研究の成功は高峰研究所の発展をもたらし、後には、ニュージャージーのクリフトンに新たに実験所を拡張して、日米両国の研究員を増員した。この頃から高峰はドイツの

カイゼルウイルヘルム研究所に匹敵する研究所を日本にも設立すべきで



写真3. ニューヨーク セントラルパークウエスト 475 番地の建物入口

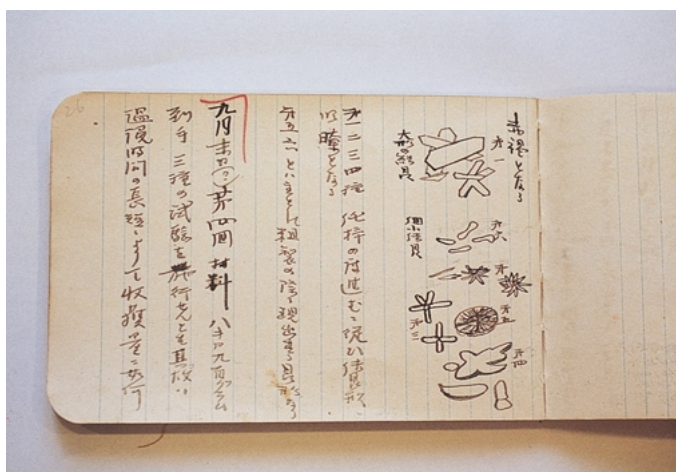


写真5. 上中の実験ノート  
1900年9月19日第3回材料より得られたアドレナリンの結晶形



写真4. 西宮市名塩教行寺にある上中啓三顕彰碑

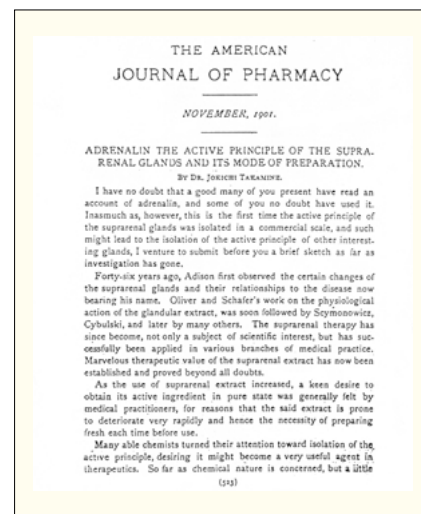


写真6. アドレナリンの報告第一報



あると熱心に考えるようになった。

高峰は大正2年(1913)に日本に帰国した時に、国立科学研究所の創設を渋沢栄一をはじめとして財界、産業界の有力者に力説した。「今日の発明研究は是非とも学理に基いて、その結果が経済上にも利になるものでなければならぬ。そのような主旨に従わぬものは到底世界的に良い発明として歓迎することはできない。この発明研究は基礎から積み上げる研究事業から始める外に途はない」というのがその理念であった<sup>2,10)</sup>。この高峰の提唱が契機になって、大正6年(1917)に誕生したのが、現在の理化学研究所の前身であった。

高峰は常に次のような言葉を口にした。「いつでも欧米の模倣をすることは甚だ面白くない。いかにしてでも日本固有あるいは東洋固有の研究を行い、本邦の産物を世界に広く売り広めて行くというようにならなければ、世界の宝をわが国に吸収することは覚束ない」また「模倣は独創の先駆にほかならない。日本人は必要が生じた時には発明的才能を充分発揮する能力がある。今後何十年も経たぬうちに、日本は世界中で独創的な国になるであろう」と説いた。

高峰は研究家、事業家として生涯の大半を米国で過ごしたが、当時の米国における日本人に対する偏見や処遇を憂慮して、両国の親善のために多くの私財を投じ、その提案により、1905年ニューヨークに日本倶楽部が創設された。これが発展して1914年にはニューヨーク日本人会も組織された。また1914年にはニューヨークから100マイル離れたメリーウォルドパークに豪華な日本邸宅松楓殿をつくり、日米社交の場を提供した<sup>11)</sup>。1912年にはニューヨーク市へ日本の桜2100本を寄贈し、クレモントおよびセントラルパークに植えられた。現在でもサクラパークの名が残っている<sup>2)</sup>。ワシントンの桜は東京市長尾崎行雄が寄贈し

たものであるが、それを斡旋したのは高峰であった。

高峰は日本の工学博士、薬学博士の学位を得て、明治45年(1912)には学士院賞を受賞し、翌年日本学士院会員に任ぜられている。また同じ年、滞米のまま三共株式会社社長にも就任している。大正11年(1922)7月22日、米国において心臓病によって67歳の生涯を終え、ニューヨーク北郊のウッドローン墓地に葬られた(写真7)。なお東京青山墓地にも墓がある。

高峰の出身地金澤においては、昭和25年(1950)に高峰讓吉博士顕彰会が設立されていたが、昨年その50周年を記念して式典が開催され、広坂公園にあった高峰の胸像はふるさと偉人館前庭に移設された。なお高峰の胸像はその生誕地の高岡市の高峰公園にも建っている(写真8)。

#### [参考文献]

- 1) Takamine, J. *Adrenalin Active Principle of the Suprarenal Glands and its Mode of Preparation*. *Amer. J. Pharmacy*, 1901, Nov. 523.
- 2) 『高峰博士の面影』 高峰讓吉博士顕彰会、昭和36年(1961)
- 3) 塩原又策編『高峰博士』大正15年(1926)
- 4) 芝哲夫「ハラタマと日本の化学」*化学史研究*, 18(1), 1(1982)
- 5) Miles Inc. "TAKAMINE Documents from the Dawn of Industrial Biotechnology"(1988)
- 6) 都築洋次郎、山下愛子「アドレナリンの発見史」*科学史研究*, 47, 1(1958)
- 7) 山科撫作「アドレナリンの協力発見者上中啓三氏逝去」*三共往来*, 1月号、昭和35年。



写真7. ニューヨーク ウッドローン墓地にある高峰讓吉墓地



写真8. 高岡市高峰公園にある胸像

- 8) 山下愛子「アドレナリン実験ノート」*科学史研究*, 1966, 143.
- 9) 高峰讓吉「副腎の主成分アドレナリンに就て」*東京化学会誌*, 23, 416(1902)
- 10) 芝哲夫「歴史に学ぶ 明治の日本の化学者」*有機合成化学*, 48(8), 758(1990)
- 11) アグネス・デ・ミル著、山下愛子訳『高峰讓吉伝』雄松堂、(1991)

## タンパク質の高次構造解析に

### セレノメチオニン

近年、タンパク質の高次構造解析では、多波長異常分散法 (MAD 法) が注目されています。これはシンクロトン放射光からの強力な連続 X 線が回折実験に利用できるようになり可能となった解析法です。異常分散効果を示す金属原子を含む結晶の回折データをいくつかの波長で収集し、その強度差から構造を決定します。重原子同型置換法では、ネイティブ結晶のほか誘導体結晶が必要ですが、本法では一つの結晶で構造解析ができるというメリットがあります。

異常分散効果を示す導入原子としては、今のところ、セレン原子が多く報告されています。導入方法には、大腸菌のメチオニン要求株に目的タンパク質の発現ベクターを組み込み、セレノメチオニンを加えたメチオニン制限培地 (LeMaster 培地) で培養する方法があります。しかし、セレンの毒性により大腸菌の増殖が阻害されたり、セレン原子の導入率が低い場合があります。そのため無細胞タンパク質発現系への応用も進められています。無細胞系ではセレンの毒性による影響が無く、セレン原子の導入率も 90% 以上と報告されています。この場合、メチオニンの代わりにセレノメチオニンを供給します。

当社ではこの度、従来より発売しておりました DL 体に加えて L 体を新発売しました。通常タンパク質を構成するアミノ酸は L 体であり、セレノメチオニンも L 体が導入されます。そのため、毒性の強いセレンの使用量が DL 体の半分で済みます。使用量の目安は大腸菌を用いた場合、培地 1ℓ あたり、L 体で 25mg、DL 体で 50mg です。

#### 〔参考文献〕

- 1) W. A. Hendrickson, J. R. Horton and D. M. LeMaster. : *EMBO. J.*, 9(5), 1665(1990)
- 2) D. M. LeMaster and F. M. Richards : *Biochemistry*, 24, 7263(1985)

NEW

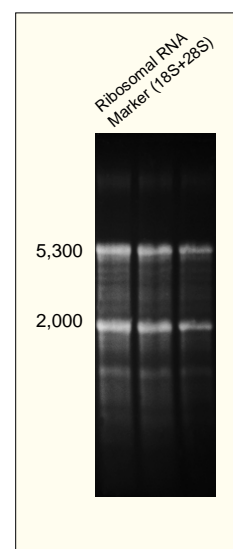
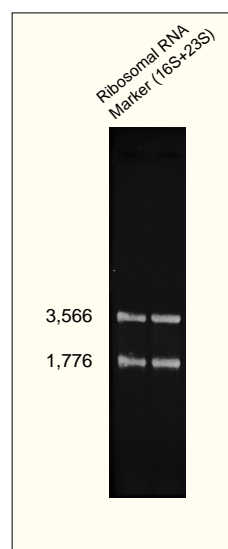
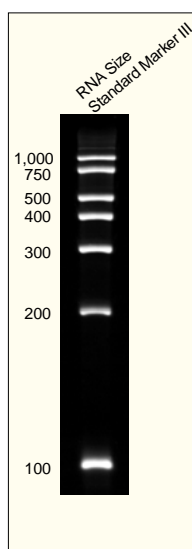
値下げ

コード No.	品名	規格	容量	希望納入価格(円)
191-12351	Seleno-L-methionine	たん白質構造研究用	250mg	6,500
197-12353			1g	18,500
195-12354			5g	74,000
199-12151	Seleno-DL-methionine	生化学用	50mg	2,000
195-12153			500mg	8,000
193-12154			5g	48,000

## 遺伝子研究用試薬

### RNA マーカーシリーズ

	RNA Size Standard Marker (100b ~ 1kb)	Ribosomal RNA Marker( 16S + 23S )	Ribosomal RNA Marker( 18S + 28S )
塩基	100b,200b,300b, 400b,500b,750b, 1kb	1,776b ,3,556b	約 2,000b, 約 5,300b
濃度	約 1mg/ml(ラベルに記載)	1.3mg/ml ~ 1.6mg/ml(実績値ロット毎にラベルに記載)	1.3mg/ml ~ 1.6mg/ml(実績値ロット毎にラベルに記載)
性状	0.1mmol/l EDTA, 二炭酸ジエチル処理済み水溶液	10mmol/l Tris-HCl(pH 8.0) [NaCl, MgCl <sub>2</sub> 含有]	滅菌蒸留水
貯法	-80	-80	-80



コード No.	品名	規格	容量	希望納入価格(円)
545-01621	RNA Size Standard Marker (100b ~ 1kb)	遺伝子研究用	50μg	16,000
548-01731	Ribosomal RNA Marker( 16S + 23S )	遺伝子研究用	2.5mg	14,000
545-01741	Ribosomal RNA Marker( 18S + 28S )	遺伝子研究用	250μg	35,000

その他のマーカーについてもお問合せ下さい。

# ルイス酸 - 界面活性剤一体型触媒

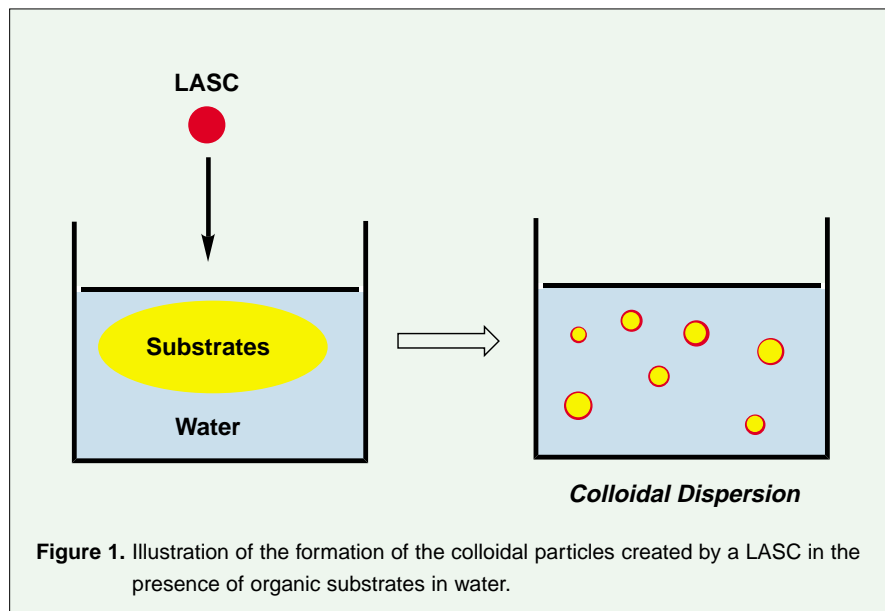
## ～ 水中で有効な反応場を構築するルイス酸触媒 ～

東京大学大学院 薬学系研究科 小林 修、森 雄一郎

### 1. はじめに

有機物質を用いるほとんどの化学反応は、反応溶媒として有機溶媒が必要である。しかしながら、有機溶媒の多くは環境や生体に対して有害であり、その点、水を溶媒として用いることは魅力的である。水には、安全で環境や生体に無害であり、さらには安価であるなどの利点がある。近年、環境へのより一層の配慮が必要となっており、有機溶媒（特に塩化メチレン等のハロゲン化溶媒等）の使用は徐々に制限されてきているが、産学を問わず依然として溶媒は水ではなく有機溶媒が用いられている。水が用いられない理由として、水にはほとんどの有機化合物が溶解しないこと、及び多くの試薬や触媒が水の存在によって容易に加水分解され不活性化してしまうこと、の二点が挙げられる。

筆者らはこれまでに、希土類金属トリフラートが水の存在下でも活性を失うことなく機能するルイス酸であることを見出している。ルイス酸は現代の有機合成に欠かせない触媒であるが、通常用いられるルイス酸は加水分解を受けやすいために、厳密な無水条件下で用いられる。水に安定な希土類金属トリフラートは水溶液中で様々なルイス酸触媒反応を加速することが明らかになったが、当初は反応基質を溶解させるために一定量のテトラヒドロフラン、エタノール、アセトニトリル等の有機溶媒を加えることが必要であった。この溶解性の問題を克服するために筆者らは、界面活性剤を反応系に加えることで溶解性の向上を試みた。界面活性剤を使用する有機反応は既に報告されているが、用いられる界面活性剤の量はほとんどの場合、基質に対して過剰であり、実用的とは言い難い。



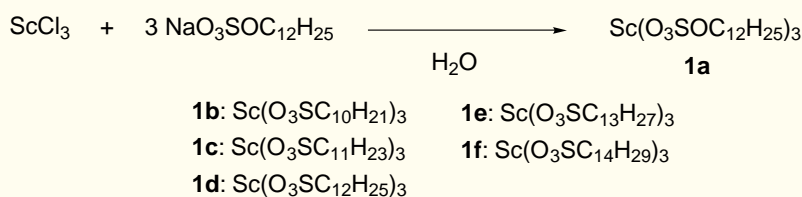
筆者らは、スカンジウムトリフラート ( $\text{Sc}(\text{OTf})_3$ ) を用いるアルデヒドとシリルエノールエーテルのアルドール反応に代表されるルイス酸触媒反応が、アニオン性界面活性剤であるドデシル硫酸ナトリウム (SDS) をごく少量加えることで、有機溶媒を一切用いない水中で大幅に加速されることを見出した<sup>1</sup>。この結果から筆者らは次に、ルイス酸の機能と界面活性剤の機能を組み合わせた触媒として、ドデシル硫酸スカンジウム (scandium tris(dodecyl sulfate)) **1a** を設計、合成した<sup>2,3</sup>。この新しいタイプの「ルイス酸 - 界面活性剤一体型触媒 (Lewis Acid - Surfactant-Combined Catalyst, LASC (ラスク))」は、反応基質を活性化するルイス酸として、また同時に水中において反応場を形成する界面活性剤としても機能する

ことが期待される (Figure 1)。実際に有機溶媒を含まない水中において、LASC を用いてアルドール反応を行ったところ、反応は大きく加速され、LASC が触媒として有効に機能することが明らかになった。以下、LASC を用いた水中でのアルドール反応の詳細、LASC の他のルイス酸反応への応用、及び LASC が水中に構築する反応場 (コロイド粒子) の観察結果について述べる。

### 2. LASC の調製法

LASC は対応する金属塩化物と対応するアニオン性界面活性剤から簡単に調製できる。代表的な LASC である **1a** は、いずれも水溶性である塩化スカンジウム ( $\text{ScCl}_3$ ) とドデシル硫

Scheme 1





酸ナトリウム (SDS) を水中で混合することで白色沈殿として生じる (Scheme 1)。1a の構造は  $^1\text{H}$ 、 $^{13}\text{C}$ 、 $^{45}\text{Sc}$  NMR 及び元素分析によって決定した。他のスカンジウム由来の LASC である 1b-f も、同様に  $\text{ScCl}_3$  と対応するアルカンスルホン酸ナトリウムから調製する。

### 3. LASC を用いる水中での有機合成反応

#### 1) アルドール反応

LASC 1a 及び 1d を、ベンズアルデヒドとシリルエノールエーテル 2 のアルドール反応の触媒として用いた。1a や 1d は水に難溶性であるが、アルデヒドを加えて攪拌もしくは強く振とうすると安定な分散系を生じる (Figure 2)。1a 存在下、室温で 4 時間攪拌すると、生成物 3 が高収率で得られた (Scheme 2)。ここにおいて、一般に水中 (特に酸性条件) で加水分解を受けやすいシリルエノールエーテルを用いても高い収率で反応が進行したことは特筆に値する。

次に、同じアルドール反応を種々のアルカンスルホン酸スカンジウム (1b-f) を用いて行った (Table 1)。ドデシル基を持つ 1d の場合に最も高い収率を与え、これより長いアルキル鎖や短いアルキル鎖を持つものでは収率が低下した。

LASC は、有機溶媒中よりも水中においてより有効に機能する。ベンズア

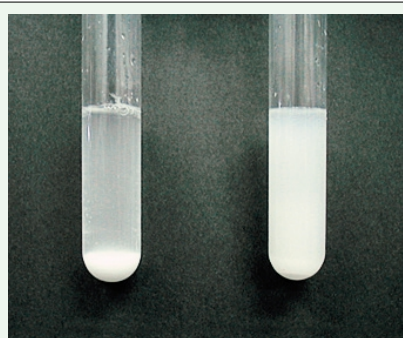


Figure 2. Mixtures of LASC 1d in water (left) and LASC 1d and benzaldehyde (1:10) in water (right).

ルデヒドと 2 のアルドール反応に対する溶媒の効果を調べたところ、水中では高収率で目的物が得られたのに対し、いずれの有機溶媒中においても低収率でしか目的物が得られなかった (Table 2)。この溶媒効果から、LASC を用いるアルドール反応においては水が重要な役割を果たしていること

が明らかになった。一方、無溶媒条件においても、ベンズアルデヒドと 2 のアルドール反応は LASC 1a によって加速された。しかしながら多くの副反応のために収率 (31%) は水を用いた場合 (92%) よりも低下し、水の存在が必須であることが示された。

LASC を用いる本反応系は、種々の

Scheme 2

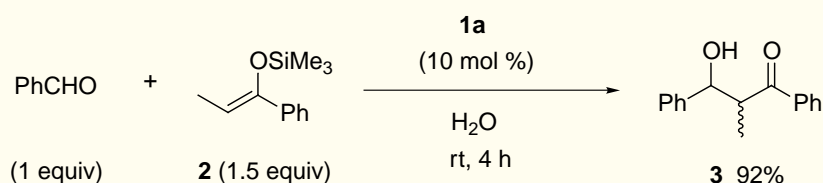


Table 1. Effect of Alkyl Chain Length of LASCs on Aldol Reactions in Water

PhCHO (1 equiv) + 2 (1.5 equiv)	LASC (10 mol %)	3
	H <sub>2</sub> O, rt, 4 h	
LASC		yield (%)
Sc(O <sub>3</sub> SC <sub>10</sub> H <sub>21</sub> ) <sub>3</sub> (1b)		60
Sc(O <sub>3</sub> SC <sub>11</sub> H <sub>23</sub> ) <sub>3</sub> (1c)		68
Sc(O <sub>3</sub> SC <sub>12</sub> H <sub>25</sub> ) <sub>3</sub> (1d)		83
Sc(O <sub>3</sub> SC <sub>13</sub> H <sub>27</sub> ) <sub>3</sub> (1e)		76
Sc(O <sub>3</sub> SC <sub>14</sub> H <sub>29</sub> ) <sub>3</sub> (1f)		19

Table 2. Effect of Solvents on LASC (1a)-Catalyzed Aldol Reactions

PhCHO (1 equiv) + 2 (1.5 equiv)	1a (10 mol %)	3	
	H <sub>2</sub> O, rt, 4 h		
solvent	yield (%)	solvent	yield (%)
H <sub>2</sub> O	92	THF	trace
CH <sub>3</sub> OH	4	Et <sub>2</sub> O	trace
DMF	14	toluene	trace
DMSO	9	hexane	4
CH <sub>3</sub> CN	3	- (neat)	31
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	3		

**Table 3.** LASC (**1a**)-Catalyzed Aldol Reactions in water
$$R^1CHO + R^2\text{C}(\text{OSiMe}_3)\text{C}(\text{R}^3)=\text{C} \xrightarrow[\text{H}_2\text{O, rt, 4 h}]{\text{1a (10 mol \%)}} R^1\text{CH}(\text{OH})\text{C}(\text{R}^2)\text{C}(\text{R}^3)=\text{O}$$

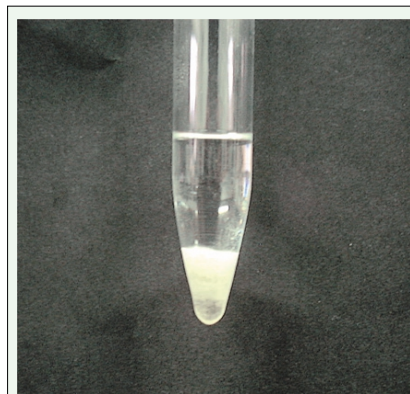
R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	R <sup>3</sup>	product	yield (%)	syn/anti
Ph	Me	Ph	<b>3</b>	92	49/51
Ph(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub>	Me	Ph	<b>4</b>	88	44/56
PhCH=CH	Me	Ph	<b>5</b>	91	40/60
2-Pyridyl	Me	Ph	<b>6</b>	84 <sup>a</sup>	24/76
PhCO	Me	Ph	<b>7</b>	86	66/34
Ph	Me	Et	<b>8</b>	84	78/22
<i>p</i> -ClPh	Me	Et	<b>9</b>	91	79/21
Ph(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub>	Me	Et	<b>10</b>	82 <sup>a</sup>	72/28
PhCH=CH	Me	Et	<b>11</b>	87	71/29
PhCH=CH	(-CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub>		<b>12</b>	85 <sup>a</sup>	52/48
Ph	H	Ph	<b>13</b>	94 <sup>a,b</sup>	
Ph	Me <sub>2</sub>	SEt	<b>14</b>	98	
Ph	Me <sub>2</sub>	OMe	<b>15</b>	80 <sup>a,b</sup>	

<sup>a</sup>1a (20 mol %). <sup>b</sup>Silyl enolate (3 equiv).

基質に対しても適用できる。Table 3 にその例を示す。アルデヒドとしては芳香族のほか脂肪族アルデヒド、 $\alpha, \beta$ -不飽和アルデヒド及び複素環を持つアルデヒドに対しても適用可能である。さらには固体のアルデヒド (*p*-Chlorobenzaldehyde) を用いても反応は円滑に進行した。シリルエノールエーテルとしては、ケトン由来のものほかチオエステルやエステル由来のケテンシリルアセタールも用いることが可能であった。ごく少量の水の存在によっても容易に加水分解することが知られているケテンシリルアセタールがこの条件で反応し得ることは注目すべき点である。また、シクロヘキサノン由来のシリルエノールエーテルも加水分解を受けやすいことが知られており、実際これまでの  $\text{Sc}(\text{OTf})_3/\text{SDS}$  の系はこの基質に対して適用できなかった。しかしながら、本反応系においては反応は円滑に進行し、高い収率 (85%) で目的物を与えた。

さて、これまで述べてきたアルドール反応において、反応の後処理時には粗生成物を抽出するために有機溶媒 (酢酸エチル) を用いている。有機溶媒を加えることで有機相と水相の分離が容易になり、目的物の精製が可能に

なる。しかしながら、環境へ配慮するならば後処理時にも有機溶媒を一切用いないことが望まれる。また一方、LASC の系を大スケール合成に適用するためには、触媒の回収及び再使用が可能であることが重要である。そこで、有機溶媒を用いない後処理及び触媒の回収法について検討したところ、反応後に反応液をそのまま遠心分離することにより、有機溶媒を用いることなく有機相と水相を明確に分離することができた。すなわち、毎分 3500 回転で 20 分間遠心分離することにより、反応液 (白色の懸濁液) は LASC の層を中間層とした三層 (上層・水層、下層・有機層) になった (Figure 3)。ここで、有機層に LASC が溶け込んでい

**Figure 3.** Separated phases after centrifugation of the reaction mixture of the aldol reaction of benzaldehyde with **2** in the presence of **1a**. Upper phase: water, middle phase: **1a**, lower phase: mixture of organic compounds.

ないことが NMR から明らかになった。これらのことは、LASC の回収及び再使用、さらには有機溶媒を用いない精製が理論的には可能であることを示している。

## 2) Mannich 型反応

Mannich 型反応は、様々な医薬品や合成中間体となる  $\beta$ -アミノカルボニル化合物を合成する基本的で有用な反応である。近年、ルイス酸を用いるイミンとシリルエノールエーテルの Mannich 型反応が開発され、さらにはイミンをアルデヒドとアミンから反応系内で調製する三成分 Mannich 型反応も報告されている。

LASC **1a** あるいはドデシル硫酸銅 (copper bis(dodecyl sulfate), **16**) を触媒として用いると、水中でアルデヒ

**Table 4.** Three-Component Mannich-Type Reactions in Water
$$R^1CHO + \text{C}_6\text{H}_4(\text{OMe})(\text{NH}_2) + R^2\text{C}(\text{OSiMe}_3)\text{C}(\text{R}^3)=\text{C} \xrightarrow[\text{H}_2\text{O, rt, 5 h}]{\text{LASC (5 mol \%)}} R^1\text{CH}(\text{NH}-\text{C}_6\text{H}_4(\text{OMe}))\text{C}(\text{R}^2)_2\text{C}(\text{R}^3)=\text{O}$$

R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	R <sup>3</sup>	LASC	product	yield (%)
Ph	H	Ph	<b>16</b>	<b>17</b>	85
Ph	Me	OMe	<b>16</b>	<b>18</b>	90
Ph	Me	OMe	<b>1a</b>	<b>18</b>	72
2-furyl	Me	OMe	<b>16</b>	<b>19</b>	85
PhCH=CH	Me	OMe	<b>16</b>	<b>20</b>	73
(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> CHCH <sub>2</sub>	Me	OMe	<b>16</b>	<b>21</b>	93 <sup>a</sup>

<sup>a</sup>The reaction was carried out at 0 °C.



ド・アミン・シリルエノールエーテルを基質とする三成分 Mannich 型反応が円滑に進行する。この場合 16 の反応加速能は 1a よりも高い。アルデヒドとしてベンズアルデヒド以外にも複素環をもつもの、 $\alpha, \beta$ -不飽和アルデヒド及び脂肪族アルデヒドを用いても高い収率で目的物を与えた (Table 4)。この三成分反応ではまず、水中でアルデヒドとアミンが脱水してイミンが生成する。水中で脱水反応が起こること、及び水に不安定なイミンも速やかに生成してさらにシリルエノールエーテルと反応することは興味深い。また、生成物の窒素上の置換基である *o*-MeOPh 基は容易に脱保護が可能である。

### 3) アリル化反応

LASC は有機金属試薬を用いる反応に対しても適用できる。LASC を用いることによりアリルスズ試薬を用いるアリル化反応が水中で円滑に進行する。アリルスズ試薬としてテトラアリルスズを用いると、ベンズアルデヒドのアリル化が高収率で進行し、対応するホモアリルアルコール 22 を与えた (Scheme 3)。

### 4) Michael 反応<sup>4</sup>

水中でのルイス酸触媒による Michael 反応の例は少なく、まだまだ未開拓の

分野である。LASC 1a を用いると、 $\beta$ -ケトエステルとエノンの Michael 反応が円滑に進行し、目的物を高収率で得ることができた (Scheme 4)。

## 4. 水中における反応場

これら LASC を用いた水中での反応では、反応液はいずれも白色の懸濁液になる。これを光学顕微鏡で観察すると、球状の粒子が確認される。これらはコロイド粒子であり、水中で反応場として機能していると予想される。動的光散乱法によってコロイド粒子の平均直径を測定したところ、1d: ベンズアルデヒド=1:20 (モル比) の場合において約 1.1  $\mu\text{m}$  であった。光学顕微鏡・透過型電子顕微鏡・原子間力顕微鏡を用いて観察を行ったところ、これらの粒子は水中で安定に存在することが明らかになり、動的光散乱法の測定結果とほぼ同程度の大きさの球状粒子として観察された。界面活性剤機能を持つ LASC は、水中で基質を取り囲む形でコロイド粒子を形成しているものと考えられる。LASC を用いる反応では攪拌速度が反応速度に影響を与えることが実験から明らかになっており、このことから反応は LASC が存

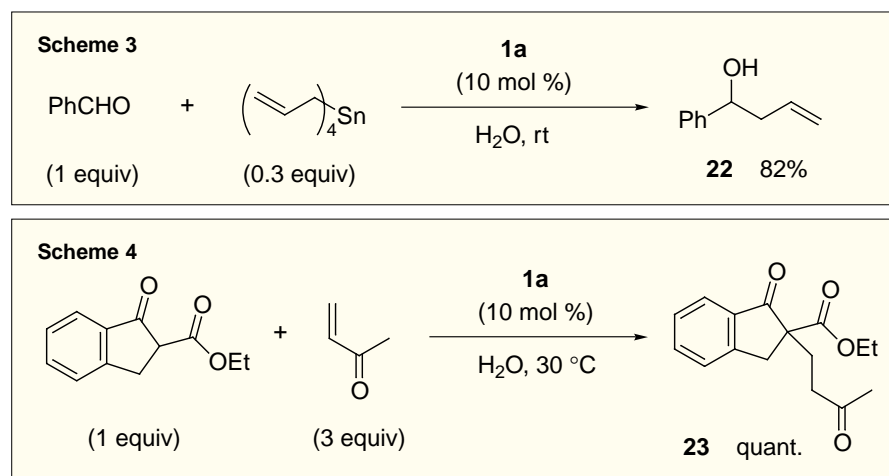
在する水とコロイドの界面付近で進行しているものと予想される。

## 5. おわりに

水中で有効に機能する触媒である「ルイス酸 - 界面活性剤一体型触媒 (LASC)」について概説した。ルイス酸と界面活性剤の両方の機能を持ち合わせたこの新しいルイス酸は、有機溶媒を全く用いない水中において極めて高い触媒活性を示す。ほとんどの有機化合物は水に溶解しないが、界面活性剤としての機能を持ち合わせる LASC は、水に溶解しない反応基質とともに水中で安定なコロイド粒子を形成し、反応を円滑に進行させる。さらにこれら LASC は、有機溶媒を用いずに反応系から除去することが原理的に可能である。ここに紹介した反応以外にも様々なルイス酸触媒反応への適用が可能であると考えられ、また、同じコンセプトに基づけば、ルイス酸以外の触媒と界面活性剤とを組み合わせた触媒の開発も期待できる。このような界面活性剤型触媒は有機溶媒を用いない化学プロセスの発展に寄与するものとして今後の発展が期待される。

### 〔参考文献〕

1. S. Kobayashi, T. Wakabayashi, S. Nagayama, H. Oyamada, *Tetrahedron Lett.* 38, 4559 (1997)
2. S. Kobayashi, T. Wakabayashi, *Tetrahedron Lett.* 39, 5389 (1998)
3. K. Manabe, Y. Mori, T. Wakabayashi, S. Nagayama, S. Kobayashi, *J. Am. Chem. Soc.* 122, 7202 (2000)
4. Y. Mori, K. Kakumoto, K. Manabe, S. Kobayashi, *Tetrahedron Lett.* 41, 3107 (2000)



## 水中で使える、ルイス酸 - 界面活性剤一体型触媒

コード No.	品名	規格	容量	希望納入価格 (円)
194-12341	Scandium Tris( dodecyl sulfate ) Trihydrate	有機合成用	1g	15,000
190-12343			5g	45,000

# Pd(II)-ハイドロタルサイト - 常圧酸素及び空気下におけるアルコール類の酸化触媒

京都大学大学院 工学研究科 物質エネルギー化学専攻 西村 貴洋、植村 榮

## 1. はじめに

近年、"Green Chemistry" や "Sustainable Chemistry" という言葉で表されるように、環境問題に対する関心の高まりから、環境に対する負荷が少なく、経済性の高い、いわゆる環境調和型の有機化学反応の開発が求められている<sup>1)</sup>。例えば、金属触媒を用いた有機化合物の酸化に関しては、副生成物としてそれ自身は水しか排出しない過酸化水素を用いた反応が注目されているが、安全性、経済性を考えると酸素、特に空気を酸化剤として用いることがもっとも理想的である<sup>2)</sup>。また、その触媒が濾過、遠心分離や相分離等によって容易に回収及び再利用できる反応系は工業的にも注目されている。その中でも、均一系触媒を適当な担体に固定化した固体触媒を用いる反応は、触媒の取り扱いの簡便さや触媒の再利用の可能性を有する利点を持つばかりではなく、その性能が対応する均一系触媒よりも選択性や触媒活性において優れている場合があり、学術的にも興味深い<sup>3)</sup>。筆者らは、最近、触媒量の酢酸パラジウム(II)及びピリジン存在下、常圧の酸素雰囲気下で、様々なアルコールが対応するアルデヒドやケトンに効率よく変換されることを見出した<sup>4)</sup>。次いで、この酸化系を触媒の回収および再利用が可能な不均一系触媒に展開することを試みた。その結果、酢酸パラジウム(II)の触媒担体を幾つか検討したところ塩基性粘土鉱物の一種であるハイドロタルサイトが最も適していることを見出し、表題にあるPd(II)-ハイドロタルサイト(以下、Pd(II)-hydrotalcite)を合成し、これが常圧酸素及び空気下におけるアルコール類酸化の有効な触媒となることを明らかにした<sup>5)</sup>。ハイドロタル

サイトは、 $Mg_6Al_2(OH)_6CO_3 \cdot 4H_2O$ の化学構造式を有し、マグネシウムとアルミニウムの水酸化物からなる基本層と、結晶水と炭酸イオンをもつ層間からなる層状構造を持っている<sup>6)</sup>。基本骨格もしくは層間に遷移金属を導入、担持させることも可能であり、種々の遷移金属触媒の担体として利用されている<sup>7)</sup>。

## 2. Pd(II)-hydrotalciteの調製とそれを触媒とするアルコール類の酸素酸化反応

Pd(II)-hydrotalciteは市販の試薬から容易に合成することが出来る。すなわち、酢酸パラジウム(II)を80℃のトルエン中に分散させ、そこにピリジン、次いで市販のハイドロタルサイトを加えて1時間攪拌後、固体を濾取し、ジエチルエーテルによる洗浄、続いて常温で減圧下乾燥させることにより、Pd(II)-hydrotalciteが得られる(eq 1)。用いるパラジウム塩の量を調節することにより、生成物中のPd含量を容易に制御できる。

このPd(II)-hydrotalciteのキャラクタリゼーションにおいて、1) XRD測定

(X線回折測定)でPd塩担持前後のハイドロタルサイトの基本層間隔 $d_{003}$ に変化はほとんど見られないこと、2)元素分析の結果、Pd(II)-hydrotalcite中には0.35 w%(理論値0.45 w%)の窒素が含有されていること、3)TG/MS(熱重量・質量分析)測定より、160℃前後でピリジンが検出されること、などが明らかになった。これらの事実より、Pd(II)-hydrotalcite中でパラジウム(II)はPd(OAc)<sub>2</sub>(py)<sub>2</sub>錯体としてハイドロタルサイト基本層の外表面に存在していると考えられる。詳細は不明であるが、錯体のアセート部分と、ハイドロタルサイトの基本層表面の水酸基とのイオニックな結合により、担持されているのではないかと推測している<sup>8)</sup>。

このPd(II)-hydrotalciteを触媒とするアルコール類の酸化反応をトルエン中、常圧酸素下で行った。その結果、均一触媒系の場合と同様に種々のアルコール類が効率よく対応するアルデヒドやケトンに変換された(Table 1)。さらに、対応する均一系では反応が進行しにくく生成物の幾何異性が大きく失われるゲラニオールとネロールの

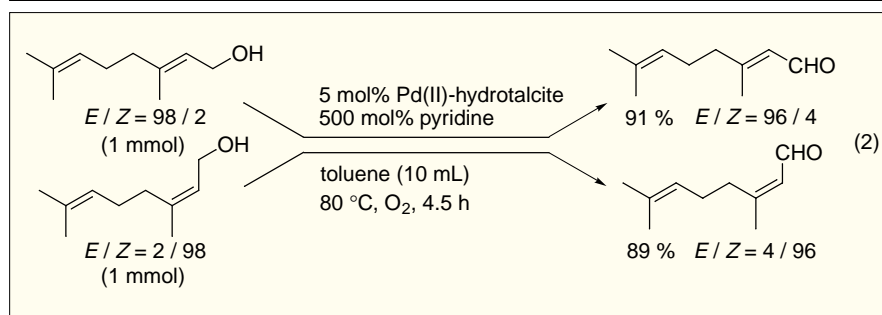
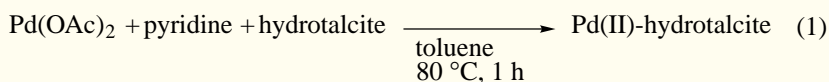
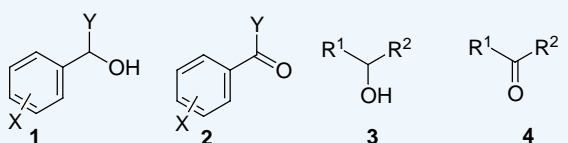




Table 1. Pd(II)-Hydrotalcite-Catalyzed Oxidation of Alcohols under 1 Atm Molecular Oxygen<sup>a</sup>

entry	substrate	product	time (h)	conv. (%)	isolated yield (%)
1	<b>1a</b>	<b>2a</b>	2	100	quant. <sup>b</sup>
2 <sup>c</sup>	<b>1a</b>	<b>2a</b>	12	98	91 <sup>b</sup>
3 <sup>d</sup>	<b>1a</b>	<b>2a</b>	12	94	87 <sup>b</sup>
4	<b>1b</b>	<b>2b</b>	2	98	94
5	<b>1c</b>	<b>2c</b>	2	98	92
6	<b>1d</b>	<b>2d</b>	5	100	97
7	<b>1e</b>	<b>2e</b>	8	96	95
8	<b>1f</b>	<b>2f</b>	2	97	90
9	<b>1g</b>	<b>2g</b>	2	97	93 <sup>b</sup>
10	<b>1h</b>	<b>2h</b>	2	87	84 <sup>b</sup>
11	<b>1i</b>	<b>2i</b>	2	84	69
12 <sup>e</sup>	<b>1j</b>	<b>2j</b>	3	100	quant. <sup>b</sup>
13 <sup>e</sup>	<b>1k</b>	<b>2k</b>	3	98	95
14	<b>3a</b>	<b>4a</b>	6	97	86
15	<b>3b</b>	<b>4b</b>	6	97	85
16 <sup>e</sup>	<b>3c</b>	<b>4c</b>	11	100	93
17 <sup>e</sup>	<b>3d</b>	<b>4d</b>	11	100	92

<sup>a</sup> Reaction conditions; Pd(II)-hydrotalcite (300 mg, 0.05 mmol Pd), alcohol (1.0 mmol), pyridine (0.2 mmol), toluene (10 mL), 80 °C, O<sub>2</sub>. <sup>b</sup> GLC yield. <sup>c</sup> 1 mol % Pd(II)-hydrotalcite, for 12 h. <sup>d</sup> 10 Fold scale reaction using 1 mol % Pd(II)-hydrotalcite for 12 h. <sup>e</sup> Pyridine (1.0 mmol) was used.



<b>1a</b> X: H	Y: H	<b>3a</b> R <sup>1</sup> : CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>10</sub>	R <sup>2</sup> : H
<b>1b</b> X: 4-Me	Y: H	<b>3b</b> R <sup>1</sup> : CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>16</sub>	R <sup>2</sup> : H
<b>1c</b> X: 4-MeO	Y: H	<b>3c</b> R <sup>1</sup> : CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>9</sub>	R <sup>2</sup> : Me
<b>1d</b> X: 3-MeO	Y: H	<b>3d</b> R <sup>1</sup> , R <sup>2</sup> : 4- <i>tert</i> -butylcyclohexyl	
<b>1e</b> X: 2-MeO	Y: H		
<b>1f</b> X: 4-Cl	Y: H		
<b>1g</b> X: 3-Cl	Y: H		
<b>1h</b> X: 2-Cl	Y: H		
<b>1i</b> X: 3-NO <sub>2</sub>	Y: H		
<b>1j</b> X: H	Y: Me		
<b>1k</b> X: H	Y: Et		

酸化反応を検討したところ、その幾何異性を保持したまま、対応するアルデヒドが高収率で得られた (eq 2)。

また、当初の期待通りこの触媒は再利用が可能であり、ベンジルアルコール類を基質とした場合、3 ~ 4 回目の使用においても触媒活性の低下が起こらないことが判明した (Table 2)。

### 3. Pd(II)-hydrotalcite を触媒とするアルコール類の常圧空気下での酸化反応

空気は酸化反応系において安全、クリーン、かつ最も安価な酸化剤として非常に魅力的である。アルコール類

Table 2. Recycling of Pd(II)-Hydrotalcite in the Oxidation of Benzylic Alcohols under 1 Atm Molecular Oxygen<sup>a</sup>

entry	catalyst	substrate	time (h)	number of use	GLC yield (%)
1 <sup>a</sup>	Pd(II)-hydrotalcite	benzyl alcohol	2	first	98
				second	89
				third	77
2 <sup>a</sup>	Pd(II)-hydrotalcite(m)	benzyl alcohol	5	first	96
				second	97
				third	90
3 <sup>b</sup>	Pd(II)-hydrotalcite(m)	4-methoxy benzyl alcohol	5	first	84 <sup>c</sup>
				second	88 <sup>c</sup>
				third	84 <sup>c</sup>
				fourth	85 <sup>c</sup>

<sup>a</sup> Reaction conditions; Pd(II)-hydrotalcite or Pd(II)-hydrotalcite(m) (900mg or 1800 mg, 0.15 mmol Pd), benzyl alcohol (3.0 mmol), pyridine (1.5 mmol), toluene (30 mL), 80 °C, O<sub>2</sub>. <sup>b</sup> Reaction conditions; Pd(II)-hydrotalcite(m) (600 mg, 0.05 mmol Pd), 4-methoxybenzyl alcohol (1.0 mmol), pyridine (0.5mmol), toluene (10 mL), 80 °C, O<sub>2</sub>. <sup>c</sup> Isolated yield (%).

の酸化反応において、分子状酸素を酸化剤とする触媒系は近年報告されてきているものの、空気を酸化剤として用いる触媒系はまだその数が少ない<sup>9)</sup>。その報告例においても、触媒活性を保つために空気の加圧が必要であったり、反応性が高い基質にしか適用されていないなどの問題点が多い。

これらの事実をふまえ、筆者らの見出したパラジウム触媒系を用いて、空気を酸化剤とするアルコール類の酸化反応を試みた。均一系および Pd(II)-hydrotalcite 系を用いて 65 °C でベンジルアルコールの酸化を行ったところ、興味深いことに常圧の空気 (風船) 下でも酸素下と同様に反応が進行した (Table 3)。さらに、均一系に比べ Pd(II)-hydrotalcite を用いた方が良好な結果を与え、3 時間の反応後、ベンズアルデヒドが高収率で得られた (98 %, entry 3)。

その他の一級及び二級のベンジルアルコール類の反応も効率よく進行し、対応するアルデヒドおよびケトンが得

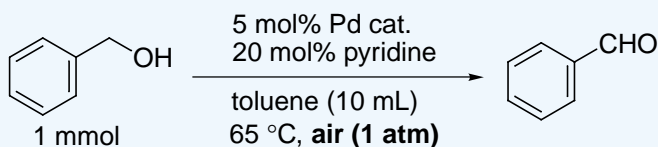
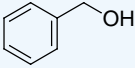
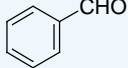
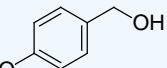
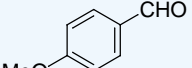
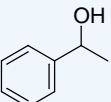
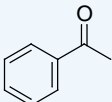
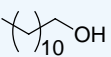

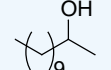

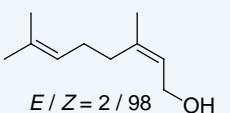
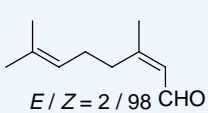
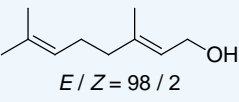
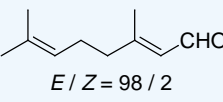


Table 3. Pd-Catalyzed Oxidation of Benzyl Alcohol under 1 Atm Air<sup>a</sup>

entry	Pd-catalyst	conv. (%) <sup>b</sup>	GLC yield (%)
1	Pd(OAc) <sub>2</sub>	80	80
2 <sup>c</sup>	Pd(OAc) <sub>2</sub> / MS3A	81	81
3	Pd(II)-hydrotalcite	first use	98
		second use	90

<sup>a</sup> Reaction conditions: Pd-catalyst (0.05 mmol), benzyl alcohol (1.0 mmol), pyridine (0.2 mmol), toluene (10 mL), air (balloon, 1 atm) at 65 °C for 3 h. <sup>b</sup> Conversion of benzyl alcohol. <sup>c</sup> MS3A (500 mg) was used.

Table 4. Pd(II)-Hydrotalcite-Catalyzed Oxidation of Alcohols under 1 Atm Air<sup>a</sup>

entry	substrate	product	time (h)	conv. (%)	isolated yield (%)
1 <sup>b</sup>			3	98	98
2			3	95	94
3 <sup>c</sup>			30	97	96
4 <sup>c, d</sup>			30	94	91
5 <sup>b</sup>			5	80	75
6			10	91	91
7			20	97	97
8 <sup>e</sup>	 E/Z = 2/98	 E/Z = 2/98	12	97	85
9 <sup>e</sup>	 E/Z = 98/2	 E/Z = 98/2	12	~100	90

<sup>a</sup> Reaction conditions: Pd(II)-hydrotalcite (0.05 mmol: Pd), alcohol (1.0 mmol), pyridine (0.2 mmol), toluene (10 mL), dry air (1 atm). <sup>b</sup> GLC yield. <sup>c</sup> Pd(II)-hydrotalcite (0.01 mmol) was used. <sup>d</sup> 10 Fold scale reaction. <sup>e</sup> Pyridine (5.0 mmol) was used. E/Z ratio was determined by <sup>1</sup>H NMR.

られた (Table 4, entries 1-5)。触媒量を基質に対して 1 mol% に減らした場合でも、反応時間は長くなるものに対応するアルデヒドが定量的に得られた (entry 3)。同様に、一級及び二級の脂肪族アルコールは、高収率で対応するアルデヒドおよびケトンにそれぞれ変換された (entries 6, 7)。いずれの場合にもカルボン酸やエステルなどの副生成物の生成は全く観測されなかった。アリル位アルコールの酸化においては、大過剰のピリジン (通常の 25 倍) の添加を必要としたが、二重結合の酸化や異性化を伴わずに効率よく反応が進行し、対応する生成物が高収率で得られた (entries 8, 9)。

#### 4. おわりに

新しい環境調和型触媒 Pd(II)-hydrotalcite を合成し、アルコール類の酸素酸化反応の触媒として適用した。その結果、種々のアルコール類の酸素酸化反応に適用できることを見出した。またアリルアルコール類の酸化に対しては特に有効であることが判明した。さらに触媒の再利用および酸化剤として常圧空気を使用することが可能であることを示した。ただし、β-位にヘテロ元素 (O, N, S など) を有するアルコール類には適用できない<sup>5b)</sup>。

#### 〔参考文献〕

- (1) Anastas, P. A.; Warner, J. C. *Green Chemistry: Theory and Practice*; Oxford University Press: Oxford, U. K., 1998.
- (2) 例えば、Sato, K.; Aoki, M.; Takagi, J.; Zimmermann, K.; Noyori, R. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 1999, 72, 2287 and references therein.
- (3) 例えば、(a) Balogh, M.; Laszlo, P. *Organic Chemistry Using Clays*, Springer-Verlag: New York, 1993. (b) Augustine, R. L. *Heterogeneous Catalysis for the Synthetic Chemist*; Marcel Dekker: New York, 1996.
- (4) (a) Nishimura, T.; Onoue, T.; Ohe, K.; Uemura, S. *Tetrahedron Lett.* 1998, 39, 6011. (b) Nishimura, T.; Onoue, T.; Ohe, K.; Uemura, S. *J. Org. Chem.* 1999, 64, 6750.
- (5) (a) Nishimura, T.; Kakiuchi, N.; Inoue, M.; Uemura, S. *Chem. Commun.* 2000, 1245. (b) Kakiuchi, N.; Nishimura, T.; Inoue, M.; Uemura, S. *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 2001, 74, 165. (c) Kakiuchi, N.; Maeda, Y.; Nishimura, T.; Uemura, S. *J. Org. Chem.*, 印刷中。
- (6) Cavani, F.; Trifiro, F.; Vaccari, A. *Catal. Today* 1991, 11, 173.
- (7) 例えば、(a) Kaneda, K.; Yamashita, T.; Matsushita, T.; Ebitani, K. *J. Org. Chem.* 1998, 63, 1750. (b) Matsushita, T.; Ebitani, K.; Kaneda, K. *Chem. Commun.* 1999, 265. (c) Tatsumi, T.; Yamamoto, K.; Tajima, H.; Tominaga, H. *Chem. Lett.* 1992, 815.
- (8) Ebitani, K.; Fujie, Y.; Kaneda, K. *Langmuir* 1999, 15, 3557.
- (9) 空気のみを酸化剤とするアルコール酸化については例えば、(a) Hatanaka, T.; Imamoto, T.; Yokoyama, M. *Tetrahedron Lett.* 1983, 23, 2399. (b) Zhang, N.; Mann, C. M.; Shapley, P. A. *J. Am. Chem. Soc.*, 1988, 110, 6591. (c) Dijkman, A.; Arends, I. W. C. E.; Sheldon, R. A. *Chem. Commun.*, 1999, 1591. (d) ten-Brink, G.-J.; Arends, I. W. C. E.; Sheldon, R. A. *Science*, 2000, 287, 1636. (e) Shapley, P. A.; Zhang, N.; Allen, J. L.; Pool, D. H.; Liang, H.-C. *J. Am. Chem. Soc.*, 2000, 122, 1079.

## Pd 含量の異なる 2 種類の Pd- ハイドロタルサイトを取揃えています

コード No.	品名	規格	容量	希望納入価格 (円)
161-20543	Palladium(II)-Hydrotalcite (Pd 1.5%)	有機合成用	5g	20,000
168-20553	Palladium(II)-Hydrotalcite (m) (Pd 0.8%)	有機合成用	10g	20,000



## 第44話 試料の希釈液

エンドトキシンの活性が  $\mu\text{M}$  オーダーの鉄・アルミニウム・カリウムで低下することは、これまでに何度か触れてきました。エンドトキシン試験を実際に行うとき、このような金属イオンの含まれた水や試料を用いたために、見かけのエンドトキシン回収率が低くなり、反応干渉因子試験がうまくいかないことがあります。今回は、この現象の解釈と回避方法について考えてみましょう。

まず、金属イオンによってエンドトキシン活性が低下するという現象 (Talking of LAL 第10話<sup>1)</sup>) についておさらいしてみましょう。80 $\mu\text{M}$  塩化第2鉄溶液を等量のエンドトキシン溶液と混合し、トキシノメーターでエンドトキシンを測定したところ(方法1) その回収率は13.4%でした。ところが、リムルス試薬に50 $\mu\text{l}$ の80 $\mu\text{M}$  塩化第2鉄溶液を添加し、直ちに50 $\mu\text{l}$ のエンドトキシン溶液を添加してエンドトキシンを測定した場合は(方法2) その回収率は88.9%でした。反応液中の構成成分は両測定で同じですから、方法2で回収率が約90%であったことを考えると、試料がリムルス試薬の活性化反応に影響を与えているとは考えられません。すなわち、方法1で回収率が低い現象は、エンドトキシンの活性が低下していると考えられるわけです。同様の結果が塩化アルミニウム、硫酸第1鉄、塩化カリウムで認められましたが、塩化カルシウム、塩化マグネシウムではこのような変化は起こりませんでした。

さて、みなさんは、反応干渉因子試験を行うための測定条件(主に試料の希釈倍率)がなかなか決まらないという経験をお持ちではないでしょうか。このとき、試料がエンドトキシンの活性を変化させている可能性も考えてみる必要があります。方法2でエンドトキシンの添加回収率を調べてみると、意外と低い希釈倍率で影響がないことが確かめられる場合があります。しかし、局方に記載されている

方法は「方法1」と同じ方法なので、「方法2」で反応干渉因子試験を行ってよいかどうかは意見の異なるところです。そこで、何とか「方法2」で決めた測定条件で「方法1」による反応干渉因子試験を成功させる方法を考えてみましょう。

一つ目は、「方法1」で試料にエンドトキシンを添加してから測定するまでの時間を規定する方法です。試料によるエンドトキシン活性の低下は

経時的に起こる場合が多いので、エンドトキシン添加後素早く測定することで、回収率を規格内に納めようという試みです。局方の規格も回収率が50%から200%の間と比較的広がっていますから、この方法でも試験が可能と思われます。この方法のポイントは、「方法2」で試料が試薬の反応に影響を与えない希釈条件を決めておくということです。

二つ目は、適当な緩衝液を用いて試料の希釈を行うことです。筆者らの研究室の高岡が、金属イオンの影響を回避するための緩衝液を検討しています(図1<sup>2)</sup>)。各緩衝液の濃度は、Tris 塩酸緩衝液が25mM、その他の緩衝液は50mMで使用しています。pHは7.4にあわせています。緩衝液を入れない系では、以前の結果と同じく1 $\mu\text{M}$ の鉄・カリウム、10 $\mu\text{M}$ のアルミニウムでエンドトキシン活性は40%以下まで低下しました。リン酸(Phosphate)緩衝液、Tris 塩酸緩衝液、各種グッド緩衝液の中で、どの金属イオンが共存しても50%から200%の回収率を示したものは、リン酸緩衝液とBES緩衝液でした。すなわち、試料の希釈をリン酸緩衝液やBES緩衝液で行うと金属イオンの影響なくエンドトキシン試験ができる可能性があります。実際の試料ではエンドトキシンへの影響がこれらの金属イオンによって起こっているとは限らないので、使用する緩衝液を探し出す

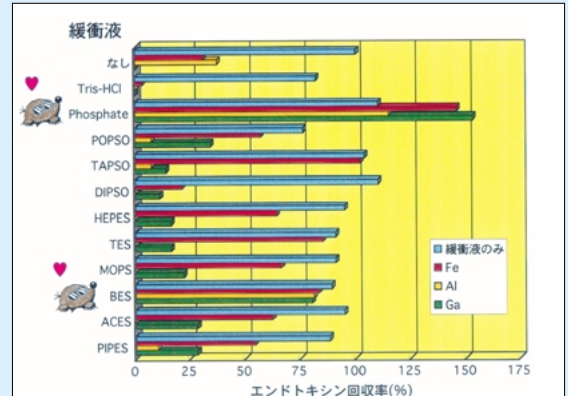


図1. 金属イオンと共存した場合のエンドトキシン活性に対する各種緩衝液の影響

必要があると思いますが、リン酸緩衝液とBES緩衝液はまず試してみる価値があると思います。

今回考えた方法は、局方の反応干渉因子試験に試料を適応させる対症療法的な対策です。試料が標準エンドトキシンの活性を低下させる性質を持つとき、その試料から検出されたエンドトキシン活性をどのように評価するかという疑問は残ります。添加したエンドトキシン活性が、緩衝液を添加しないなら20%まで低下するとしたら、試料中から検出されたエンドトキシン活性は5倍に評価するべきでしょうか。エンドトキシン活性が可逆的に変化すること、標準的なエンドトキシンの存在状態・活性が定められていないことなどを考えると、どちらが正しいかは決められないというのが現状かと思っています。私たちにできることは、測定系への影響が許容できる範囲で測定を実施するということだと思います。

## 〔参考文献〕

- 1) 和光純薬時報 vol.61 No.1, p. 12, 和光純薬 (1993)
- 2) 高岡 文 他: 日本防菌防黴学会第28回年次大会要旨集, p 157 (2001)

今回は「第45話 エンドトキシンに結合する血漿成分」の予定です。

# C30 型充てん剤 Wakopak Navi C30-5 の特性

和光純薬工業株式会社 大阪研究所 久保田 守

逆相系 HPLC 用充てん剤として、その広範囲な適用性と優れた耐久性を併せ持つ C18 (ODS) 型シリカが現在でも話題の中心に君臨するが、C18 より短いアルキル基 (C1、C4、C8 など) や長いアルキル基 (C22、C30 など) が結合された充てん剤も研究及びルーチン分析に使用されている。この中で近年注目されているのが C30 (トリアコンチル基) 型シリカ充てん剤で、国産品も登場しその分離特性、認識能について多くの研究がなされている<sup>1-3</sup>。

C30 (トリアコンチル基) 型シリカ充てん剤は、その長いアルキル鎖が硬直かつ伸びた状態でシリカ表面に結合し、そこから C18 では得られない溶質に対する選択性、形状認識能が出現すると推定されている<sup>4</sup>。とりわけ逆相系での同族体分離において C30 型充てん剤は優れた分離能を示すことが判ってきた<sup>1-3</sup>。その一方で、C30 型充てん剤を水 100% 移動相下で極性化合物の分離を行った場合、その成分保持力において高い再現性が得られたとの報告が

されている<sup>5</sup>。今回、筆者らは C30 型充てん剤である Wakopak Navi C30-5 の選択性、形状認識能評価を行う目的で、Wakopak Navi C18-5 (C18 型充てん剤)、Navi C22-5 (C22 型充てん剤) の各 4.6 × 250mm カラムを用いたカロテノイド標準品及びビタミン E 同族体標準品の比較分析を行った。その時の分析例を図 1、2 に示した。α-、β-カロテンは同一測定条件下において、C18-5 < C22-5 < C30-5 の順で分離度が向上した。ビタミン E の場合、β-、γ-トコフェロールの芳香環に結合するメチル基数が同じであるため、C18、C22 型充てん剤では重複して溶出されたが、C30 型充てん剤では γ が先に溶出して分離が達成された。ビタミン E 分析で Navi C30-5 カラムを用いた場合、移動相にメタノール 100%、またはアセトニトリル 100% で比較検討した結果、後者を用いた分析系で β、γ の分離度が高くなる傾向が得られた。以上、C30 型充てん剤 Wako-pak Navi C30-5 の特性として、

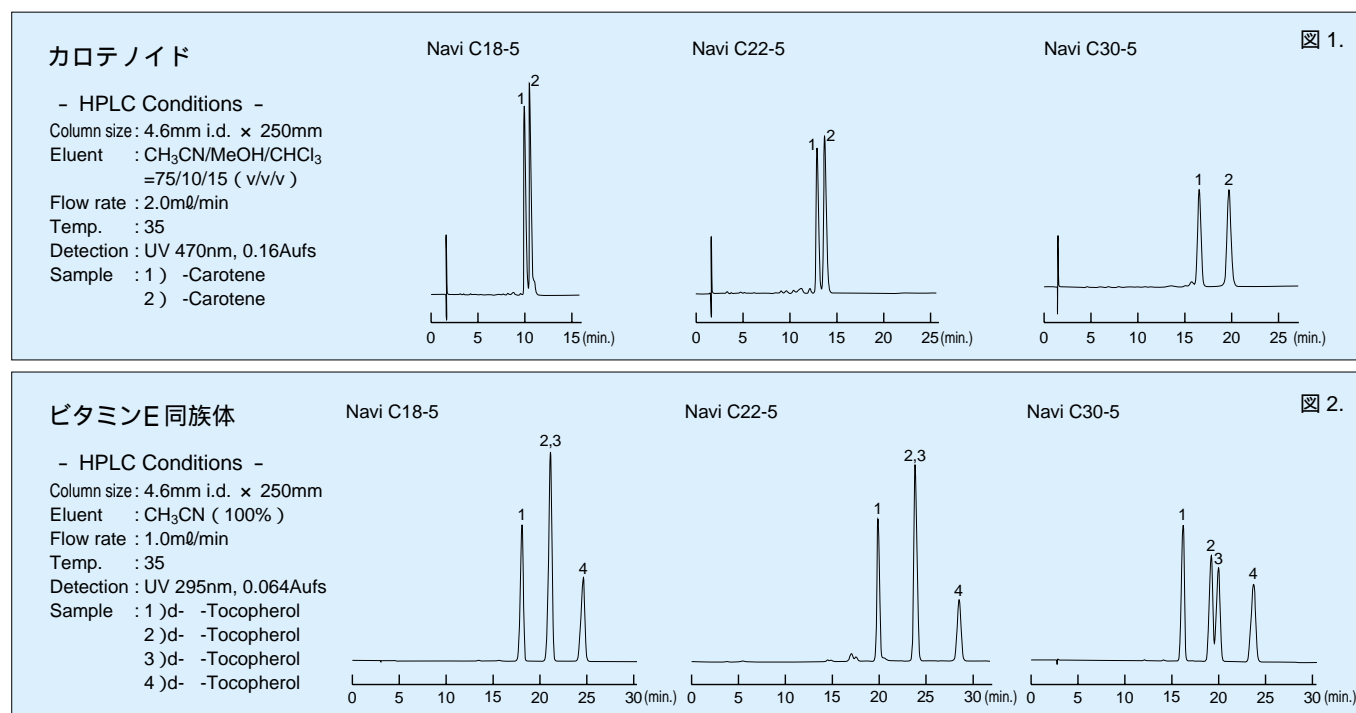
1. 形状認識能が高く、同族体の分離分析に優れている
2. C18、C22 で分離困難な場合でも分離が期待できる

ことが確認できた。なお、Navi C30-5 は官能基がポリメリック型に化学修飾されており、この結合様式の基づく溶出順序の逆転など特異的な挙動を示すことがある。

今後、同族体の高精度な分離分析技術は必要不可欠になってくる。これらの分析に C30 型充てん剤がどこまで貢献できるか、応用データの蓄積が期待される。

## 【参考文献】

1. L.C.Sander, K.E.Sharpless, N.E.Craft, S.A.Wise: *Anal.Chem.*, 66, 1667 (1994)
2. C.Emenhiser, L.C.Sander, S.J.Schwartz: *J.Chromatogr.A*, 707, 205 (1995)
3. M.Pursch, S.Strohschein, H.Händel, K.Albert: *Anal.Chem.*, 68, 4107 (1996)
4. S.Strohschein, M.Pursch, D.Lubda, K.Albert: *Anal.Chem.*, 70, 13 (1998)
5. T.Enami, N.Nagae: *Chromatography*, Vol.19, No.4, 380 (1998)





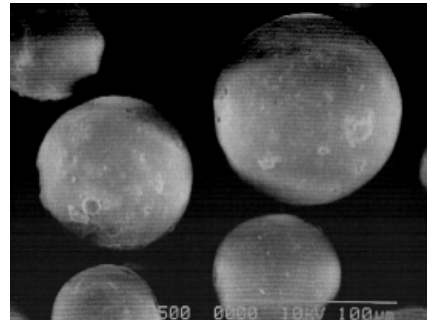
## 中性タイプの分取用球状シリカゲル発売！

### ワコーシル® C-200, C-300

カラムクロマトグラフ用

本品は pH を中性に調整した分取用球状シリカゲルです。

1. 酸性下で不安定な物質など幅広い化合物の分離にご利用いただけます。
2. 破砕状シリカゲルに比べ流動特性にすぐれ、試料のバンドがシャープです。
3. 微粉をできる限りカットしたため、取扱いが容易で高流速での分離分取が可能です。C-300 はフラッシュクロマトグラフィーにも最適です。



〔物性・規格〕

	ワコーシル® C-200	ワコーシル® C-300
細孔径	6nm	
細孔容積	0.75ml/g	
比表面積	475m <sup>2</sup> /g	
外観	白色の微粒	白色の粉末
粒度	64μm 以下:10% 以下	40μm 以下:10% 以下
	64μm ~ 210μm:80% 以上	40μm ~ 64μm:80% 以上
	210μm 以上: 5% 以下	64μm 以上: 5% 以下
沈降容積	1.5 ~ 1.8ml/g	
乾燥減量	5.0% 以上 10.0% 未満	

コード No.	品名	容量	希望納入価格(円)
230-01665	Wakosil® C-200	500g	5,000
238-01661		2kg	15,000
236-01667		10kg	照会
237-01675	Wakosil® C-300	500g	7,000
235-01671		2kg	20,000
233-01677		10kg	照会

## 微生物培養基材 non-animal 由来ポリペプトン

 日本製薬株式会社 **ポリペプトン N シリーズ**

動物由来の原料を使用していません！

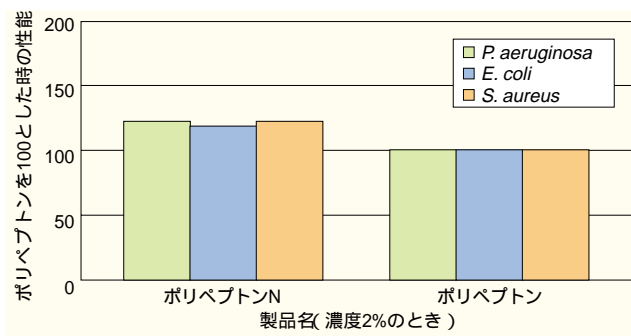
国内生産のため、高品質な製品を安価にお届けします！

細菌培養や発酵工学等で微生物培養基材として従来より日本製薬のポリペプトンをお使い頂いております。しかし、最近の狂牛病(ウシ伝達性海綿状脳症、BSE)の問題から平成12年12月12日厚生省より「ウシ等由来物を原料として製造される医薬品等の品質及び安全性確保について」の通達がなされたことから、培養基材も動物由来の原料を使用していない製品が求められています。

今回、日本製薬では、従来のポリペプトンに代わる、non-animal ポリペプトン「ポリペプトン N」シリーズを製造しました。「ポリペプトン N」シリーズは動物由来の原料を一切使っておりませんので、安心してお使い頂けます。

また、本品は国内で生産しておりますので、高品質保証、安価提供に自信を持ってお勧めします。

〔ポリペプトン N と従来品の菌増殖性能比較試験〕



〔従来品との対応〕

	<b>NEW</b>	従来品
品名	ポリペプトン N	ポリペプトン
原料	大豆	牛乳カゼイン
酵素	微生物由来	豚由来
品名	ポリペプトン NS	ポリペプトン S
原料	大豆	大豆
酵素	植物由来	植物及び豚由来
品名	ポリペプトン NF	ポリペプトン P1
原料	魚肉	豚
酵素	微生物由来	豚由来

コード No.	品名	容量	希望納入価格(円)
393-01481	ポリペプトン N	300g	2,900
391-01487		15kg	照会
398-01497	ポリペプトン NS	10kg	近日発売
391-01507	ポリペプトン NF	10kg	近日発売

# 硬組織標本のための樹脂包埋切片作製例

ライカマイクロシステムズ株式会社 SP グループ アプリケーションスペシャリスト 新田 浩

骨標本における輪切り切片の作製は、通常ある程度厚みのある切断切片を作製後、手研磨や研磨装置により薄片としていく工程がとられる。

ナイフを使用したマイクロームによる薄切では、組織が粉状に砕け散って

しまうため形態観察に利用できないからである。

研磨切片の作製においては、その切片を薄く研磨しようとするほど樹脂の浸透が不十分な個所から欠落してしまうために、使用する樹脂は

浸透性に優れ、さらに硬く重合するものを選択する必要がある。

蛍光観察法においては、どの励起波長でも樹脂自体に目立った自家蛍光は無く、バックグラウンドは暗く抜けて観察が容易である。

〔ウサギ大腿骨輪切り切片の作製(後染色)〕



写真1. ウサギ大腿骨



写真2. 浸透を促すため、標本は適当な個所で切断後10%ホルマリンに入れて固定を行う。



写真3. 固定した標本は、脱水、脱脂、樹脂浸透の各ステップで真空引きを行う。各ステップでは液交換ごとに真空引きを行い、気泡が出なくなるまで続ける必要がある。

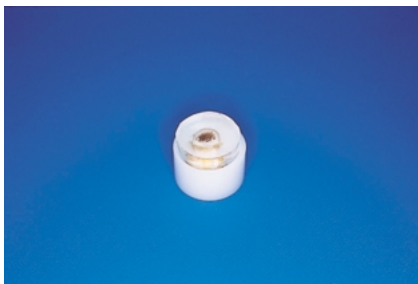


写真4. 密栓したガラス瓶を使用して包埋した後、取り出したブロックを試料台に固定。

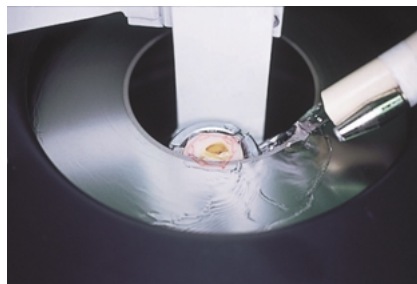


写真5. 研磨薄切装置(ライカSP1600 Sawing microtome)にて、10 $\mu$ m研磨切片を作製。約20分間、ダイヤモンドパウダーが蒸着した内周刃で研磨しながら切片を作製。

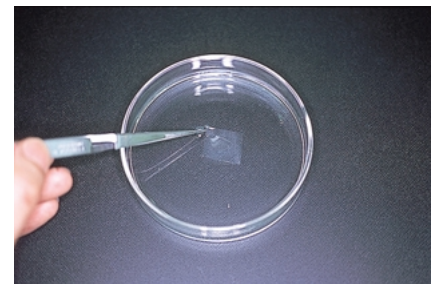


写真6. 10 $\mu$ m研磨切片は、乾燥しないように蒸留水に移動、次の切片作製作業を続ける。

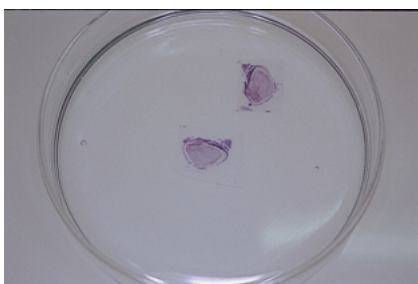


写真7. 切片をトルイジンブルー染色した後、軽く水洗して蒸留水にて色出し。

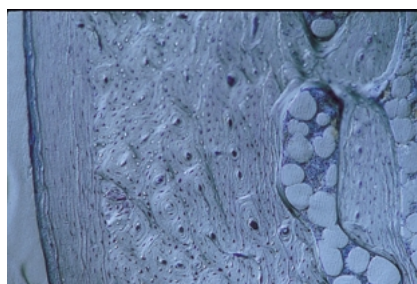


写真8. 水性封入剤にてスライドガラスに切片を封入して、顕微鏡観察。微分干渉装置を併用することによって、骨芽細胞の成長過程をはっきりと観察できる。樹脂の浸透性が高いため、通常研磨切片に見られる細かなひび割れや欠落は見られない。

〔マウス大腿骨輪切り切片の作製(前染色)〕



写真9. 10%ホルマリン固定済みのマウス後ろ足。





写真 10 .ピラヌエバ骨染色液にて前染色を行う。



写真 11 .樹脂包埋ブロックの研磨切片作製。

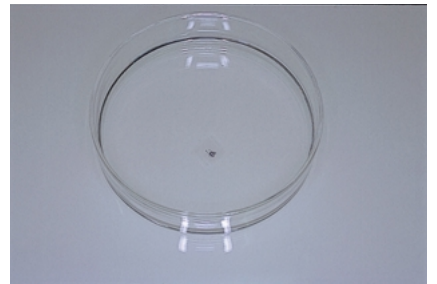


写真 12 .10 $\mu$ mの研磨切片は、乾燥しないように蒸留水に移動、次の切片作製作業を続ける。

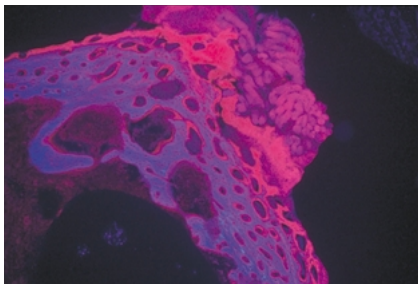


写真 13 .無蛍光グリセリンでスライドガラスに切片を封入して、蛍光顕微鏡観察。UV 励起では、テトラサイクリンが赤く、石灰化骨が青白く明るい色調で確認できる。

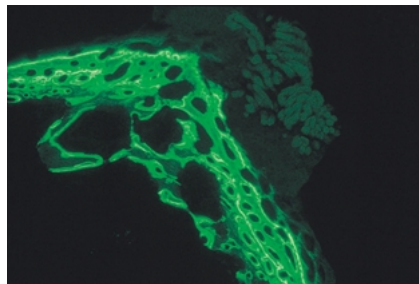


写真 14 .ブルー励起では、テトラサイクリン、カルセイン共に黄緑の二重のラインとして確認できる。

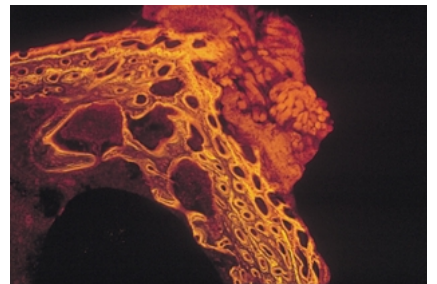


写真 15 .グリーン励起では、テトラサイクリンが黄色に、カルセインが赤いラインとして確認できる。

## ～樹脂包埋システム～

### 非脱灰硬組織用樹脂包埋キット:MMA 樹脂使用

#### オステオレジン™ 包埋キット

〔キット内容〕

- ・樹脂基剤(メタクリル酸メチル, モノマー:MMA) 500ml
- ・重合開始剤(V-601) 1g x 5
- ・脱樹脂剤(1-アセトキシ-2-メトキシエタン:AME) 500ml
- ・コロジオン(10%) 100ml



歯牙・顎骨部(イヌ)  
 (アリザリンレッド:石灰化骨(赤茶色)  
 アルシアンブルー:軟骨(青色)  
 ヘマトキシリン:核(濃青紫色))  
 (x 200)

コード No.	品名	規格	容量	希望納入価格(円)
297-56001	OsteoResin™ Embedding Kit	病理組織包埋用	1キット	20,000



### 一般染色用樹脂包埋キット:GMA 樹脂使用

コード No.	メーカーコード	品名	容量	希望納入価格(円)
630-01341	7022-18500	HistoResin Embedding Kit	1キット	22,000

### 一般染色及び免疫染色用樹脂包埋キット:GMA 樹脂使用

コード No.	メーカーコード	品名	容量	希望納入価格(円)
638-01141	7022-24861	HistoResin Plus Embedding Kit	1キット	34,000

\*詳しくはパンフレットをご請求下さい。

## 第4回 非上皮性腫瘍(1)

KIA 株式会社 ケーアイエー細胞病理研究所 石川喜美男、三瓶 接子  
株式会社 保健科学研究所 宮 哲正、久川 芳三  
京浜予防医学研究所 診断病理センター 牛込新一郎

軟部腫瘍は、線維組織、脂肪組織、血管系組織および筋組織から発生する代表的非上皮性腫瘍である。非上皮性腫瘍とは、腫瘍の中で上皮性組織以外の組織から発生したものをいう。これには、結合組織、脂肪組織、血管、リンパ節、骨・軟骨組織、神経系組織、メラニン産生組織、体腔被覆組織由来の腫瘍が含まれる。これらの中で間葉系組織より発生した悪性腫瘍を特に、肉腫(sarcoma)と呼ぶ。組織学的には上皮性腫瘍が基底膜をもち、結合組織に囲まれた(alveolar nest)と呼ばれる組織集団を作るのに対し、非上皮性腫瘍の多くは胞巣を作らず、腫瘍細胞は血管や結合組織と混在した状態で増殖しているのが特徴である。腫瘍により、結合組織の配列や細胞形態が特徴的なものもある。一般的に腫瘍は、分化度の低い程診断が困難になる。一部例外を除き良性の腫瘍には高分化なものも多く、悪性になるほど低分化を示す傾向にある。組織学的診断はHE染色中心に各種特殊染色、免疫組織化学的検索などを行い、必要に応じて電子顕微鏡学的検索を行う。また、肉眼的検索も重要で、腫瘍の色調、形状、固さ、断面の状態などを詳しく観察することで、ある程度まで診断することが可能なものもある。今回は血管系腫瘍とリンパ管系腫瘍について解説する。

## 血管系の腫瘍

WHO分類で血管系腫瘍は、大きく良性と悪性群に分類されている。良性腫瘍として正常血管に類似した血管成分の増殖性病変である血管腫とグロームス腫瘍および血管周皮腫(外皮腫)に分けられる。

悪性腫瘍は、血管肉腫(悪性血管内皮腫)と悪性血管周皮腫に分けられる。特殊例として、悪性血管内乳頭状血管内皮腫、Kaposi肉腫などがある。また、類上皮血管内皮腫は、低悪性度の血

管肉腫として取り扱われる場合もある。しかし、Enzingerらはさらに実際の悪性度を考慮し、良性、中間群、悪性の3群に分類している。ここでは、代表的な腫瘍について解説する。

## 血管系腫瘍における病理学的検査法

HE染色：最も重要な染色法で、良悪性の診断に用いられる。血管系の特徴として、管腔形成、スリット状の空隙形成をみる。また、一般的に血管肉腫では、HE染色でみると細胞境界が不明瞭である。鑑別診断を行う場合、下記のごとく特殊染色(検査)が用いられる。

エラスチカ・ワンギーソン染色：血管系腫瘍では弾性線維を証明することも重要である。

マッソン染色：血管成分への分化が低い場合、平滑筋肉腫などと鑑別を要する場合もある。平滑筋肉腫では細胞質が赤染する。

鍍銀染色：非上皮性腫瘍を診断鑑別する上で、最も重要な染色法である。血管肉腫では管腔構造を示すことが多く、他の非上皮性腫瘍では一つ一つの腫瘍細胞を細網線維が一般的に取り囲むことが多い。

その他にPAS染色法、アルシアン青などが用いられる。

免疫学的検査法：低分化な血管系腫瘍と他の非上皮性あるいは上皮性との鑑別に用いられる。血管系腫瘍では、第因子やUEA 1、CD31、CD34などが用いられる。

電子顕微鏡学的検査：未分化あるいは低分化な非上皮性腫瘍の場合、光顕レベルでどうしても診断が困難な時がある。電顕で、細胞内構造や細胞間の微細構造を観察することにより、確定診断を容易にする場合がある。非上皮性腫瘍の場合は、多様性を示すので、数ブロックから微細構造や特異性構造を観察し、光顕像との総合的な所見で診断を決定することが重要である。

血管腫：血管内皮細胞由来の良性

腫瘍で、腫瘍内に血管の増生がみられ、皮膚、肝、肺などに発生しやすい。海綿状血管腫、毛細血管腫、若年性血管腫、動静脈型血管腫、肉芽組織型血管腫、筋肉内血管腫、血管腫症、および良性血管内皮腫などに分類される。

グロームス腫瘍：1924年Massonにより、最初に記載された皮下の小結節性腫瘍で、glomangioma、angioneuroma および angioneuromyoma などと呼ばれている。毛細血管の先端にある神経筋血管球に由来し、温度の変化による血流調節しているグロームス細胞の増生と血管成分からなる良性腫瘍である。また腫瘍細胞間質内には、有髄無髄神経線維が多数認めることができる。グロームス腫瘍は、平滑筋細胞起源か、ZimmermanのPericyte由来が考えられ、現在では電顕的に平滑筋細胞起源が有力とされている。

血管肉腫(悪性血管内皮腫)：血管内皮の悪性腫瘍で、血管に富む。頭部の皮膚、下肢の軟部、肝、肺などに発生することが多い。肉眼的に血液に富むので暗赤色に見える。核異型の強い腫瘍細胞が、血管様構造を示し増殖する。免疫染色では、第因子、UEA 1などが陽性を示す。未分化な血管肉腫を電顕でみると細胞質内に小突起のある内腔や飲み込み小腔、Weibel Palade顆粒を認めることが多い。

悪性血管周皮腫：比較的稀な腫瘍で、Zimmermanの提唱した毛細血管や細静脈の壁に存在する平滑筋性の周皮細胞 pericyte 由来の腫瘍とされ組織発生面で、血管内皮腫と異なった腫瘍とされている。

組織学的に、不規則な雄鹿の角のような拡張性血管の周囲に、腔に接して類円形～単紡錐形の腫瘍細胞が数層に並び、鍍銀染色標本では、腫瘍細胞は血管腔を構成する基底膜の外側に存在するのが分かる。しかし同一の腫瘍の中に血管内皮腫との混在をみ



ることがある。

**カポシ肉腫**：四肢や皮下や消化管に見られる血管増殖性病変で、組織学的に腫瘍細胞が血管様に胞巣を作り、結合組織で囲まれ、肉芽腫様に見える。最近では AIDS 患者にみられる。

**リンパ管腫**：血管腫と比較すると少ない。しかし小児には多い腫瘍である。多くはリンパ管の組織奇形で、先天性

である。組織像は、拡張したリンパ管の増殖をみることが多い。内腔面は一層の内皮細胞で覆われている。

**リンパ管肉腫**：慢性的にリンパ液がうっ滞した部分に発生することが多い。組織像は血管肉腫と類似し、ときに鑑別が困難なことが多い。

〔参考文献〕

- 1) 石川栄世, 遠城寺宗知, 牛込新一郎 他: 軟部腫瘍アトラス. 東京文光堂. 第一版第一刷. 1989.
- 2) 三瓶接子, 石川喜美男 他: 血管系の腫瘍. 第 20 回日臨技病理研修会テキスト. 1994.
- 3) 石川喜美男, 三瓶接子 他: 軟部腫瘍の免疫組織化学と電顕像 - 低分化な軟部腫瘍への応用 -. 第 20 回日臨技病理研修会テキスト. 1994.

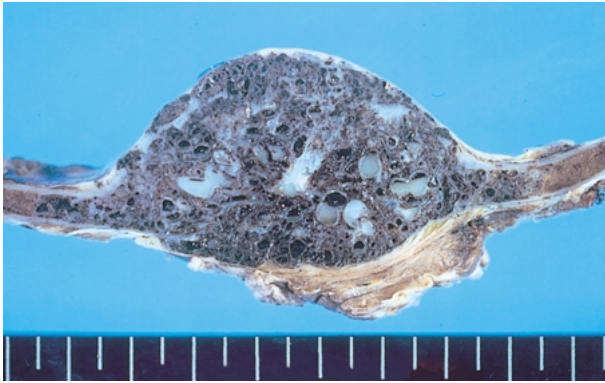


図1. cavernous hemangioma (海綿状血管腫)  
肋骨に発生した血管腫で、病変部は紡錘形に腫大している。粗なスポンジ様構造を呈する。

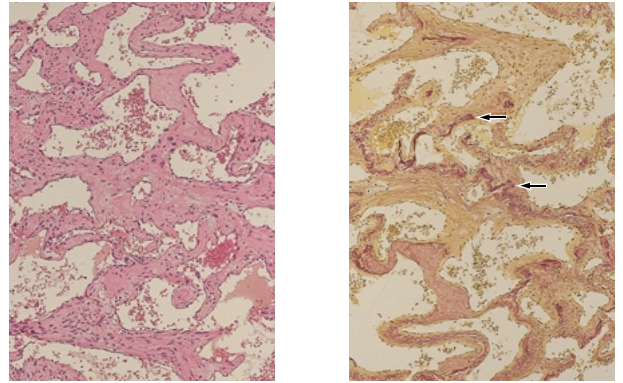


図2. 血管腫 左:HE 染色、右:E・V・G 染色 × 20  
多数の血管が増生しているのがわかる。細胞の核異型は少ない。右では増生した血管には不規則な弾性線維(矢印)が黒紫色を呈している。

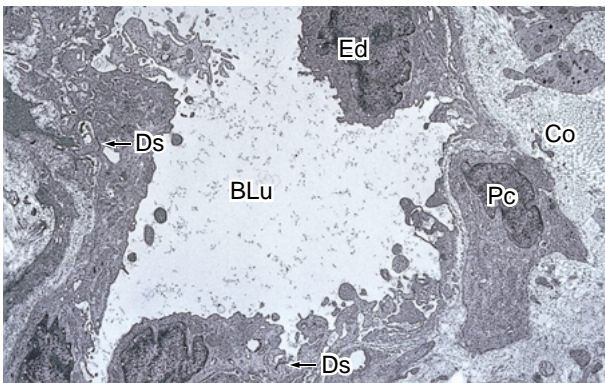


図3. 血管腫 透過型電子顕微鏡像(以下TEM像と略) × 3000  
増生した血管の内皮細胞(Ed)の外周には、基底膜に介して、周皮細胞(Pc)が見られる。BLu:血管内腔、Co:膠原線維、Ds:デイスモゾーム

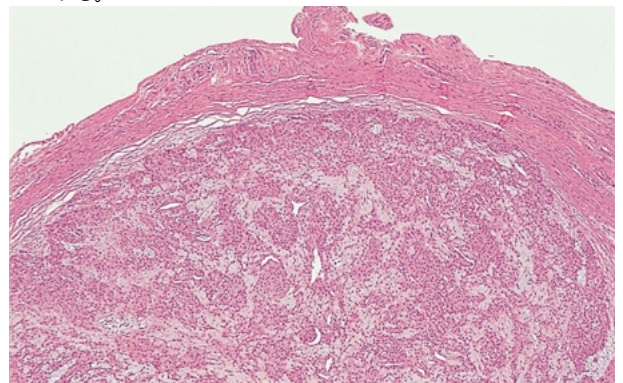


図4. グロームス腫瘍 HE 染色 × 4  
毛細血管の周囲に細胞質が好酸性に染まる細胞が血管周囲性に増殖している。

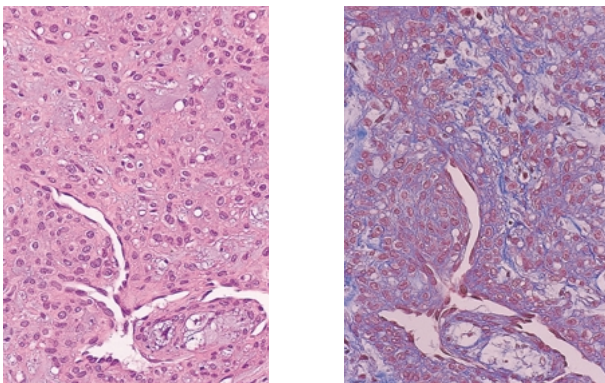


図5. グロームス腫瘍 左:HE 染色、右:マッソントリクローム染色 × 20  
1層の内皮細胞をもった毛細血管の周囲に好酸性の細胞質を有した類円形の細胞が、血管周囲に増殖しているのがわかる。また間質(基質)は、粘液腫状となり、これはアルシアン青染色に染色される。右では、細胞の胞体は淡赤色を示している。

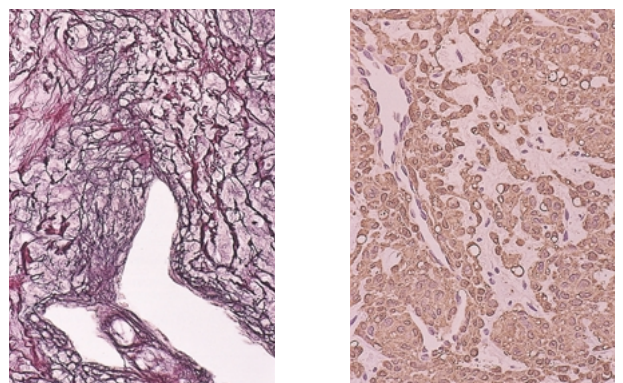


図6. グロームス腫瘍 左:鍍銀染色、右:酵素抗体法(SMA抗体)  
左では褐色の膠原線維の周囲に腫瘍細胞が黒色のちぢれ状の細かい細網線維によって取り囲まれている。右は筋原性マーカー SMA に陽性を示している。



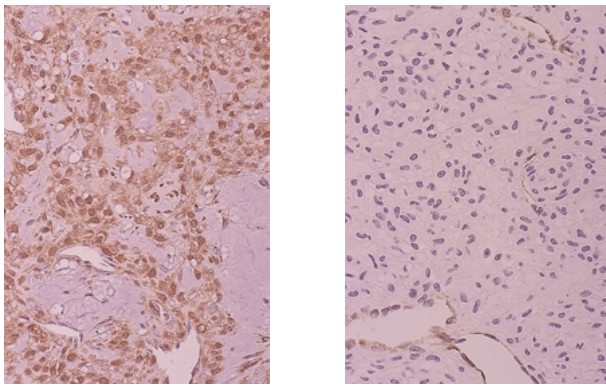


図7. グロームス腫瘍 酵素抗体法(左:NSE、右:第 因子)  
左の神経性マーカー NSE に陽性を示し、右の第 因子では毛細血管の内皮細胞のみが陽性を示している。

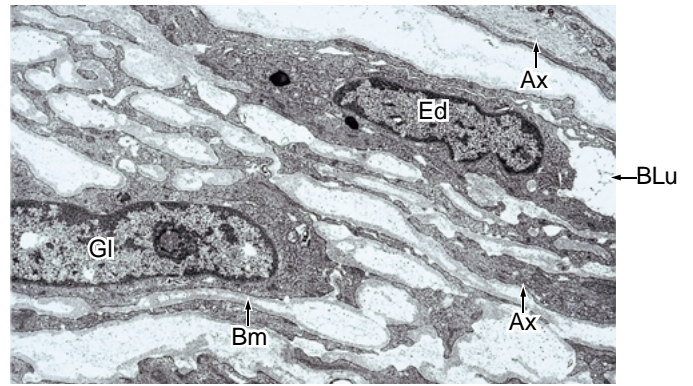


図8. グロームス腫瘍 TEM 像 × 3000  
内皮細胞(Ed)をもった血管(BLu)周囲には、基底膜(Bm)をもった平滑筋細胞に類似したグロームス細胞(GL)がみられる。また、その周囲には基底膜をもったシュワン細胞のシュワン鞘に包まれた無髄神経線維(Ax)がみられる。



図9. Cutaneous angiosarcoma(血管肉腫)  
頭皮の出血性、潰瘍性、浸潤性の病変が特徴的である。(慈恵医大皮膚科症例)

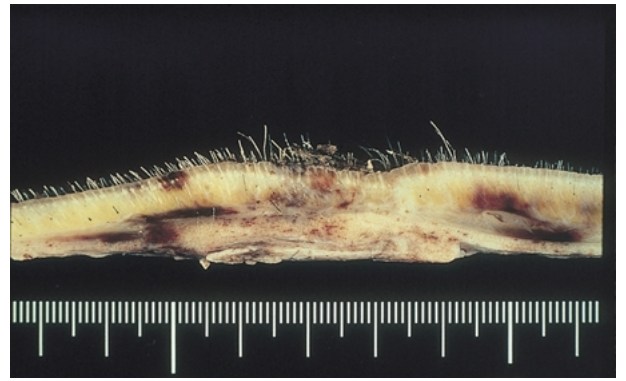


図10. 血管肉腫  
頭皮に発生した血管肉腫の断面で腫瘍が深部まで浸潤しているのがわかる。

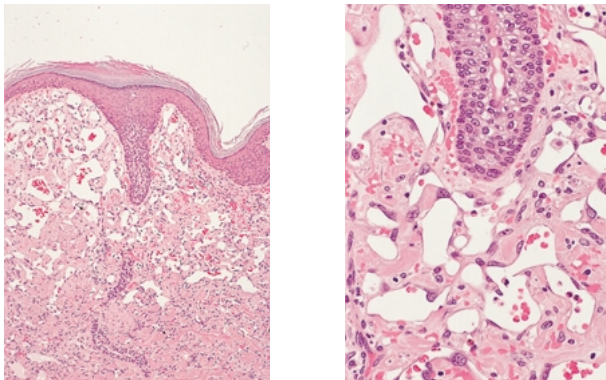


図11. 血管肉腫 HE 染色 左: × 10、右: × 20  
皮下部分では、明瞭な管腔を形成し、肝臓の類洞様に類似した異型網細血管が乳頭状に増生している。しかし深部では管腔が不明瞭である。右はその拡大像である。大小多数の腫大した腫瘍性内皮細胞に覆われた血管腔が肝の類洞様に増生している。

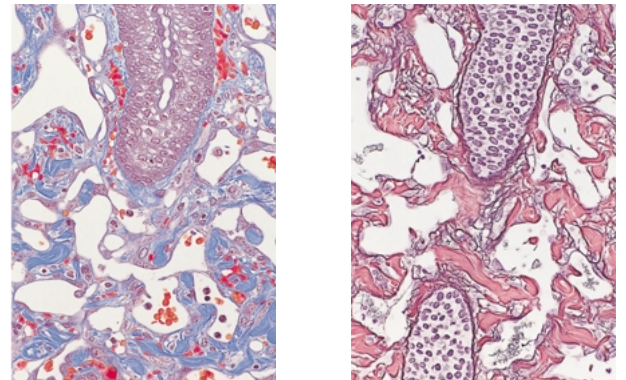


図12. 血管肉腫 左:マッソントリクローム染色、右:鍍銀染色  
マッソントリクローム染色や鍍銀染色では管腔が明瞭である。

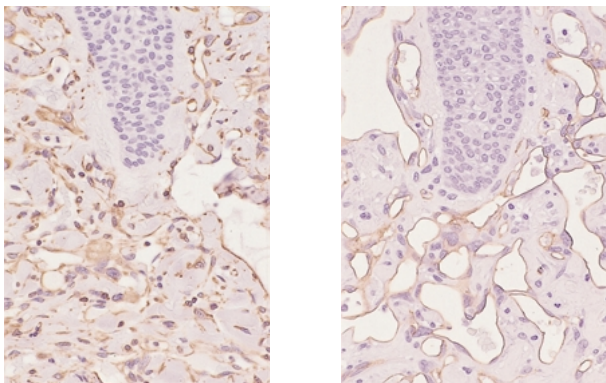


図13. 血管肉腫 酵素抗体法(左:ビメンチン抗体、右:CD34抗体)  
ビメンチン抗体では間質の線維芽細胞と腫瘍細胞のみが陽性を呈し、右の CD34 抗体では腫瘍細胞が褐色陽性を示している。

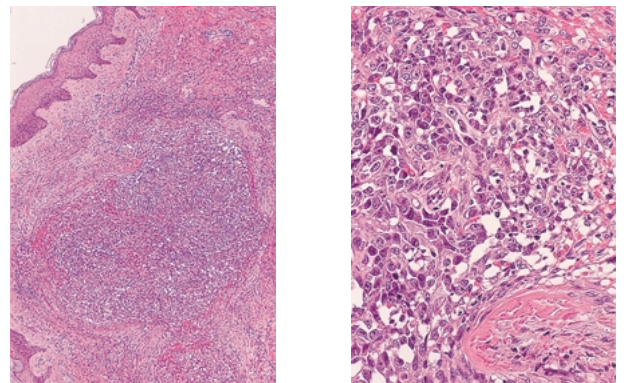


図14. 血管肉腫 HE 染色 左: × 4、右: × 20  
不規則に配列した腫瘍細胞の胞巣は、出血を伴い、結合組織に取り囲まれている。胞巣内は多くの不規則な円形の空隙とヒビ割れ状の空隙が目立つ。腫瘍細胞の胞巣は、皮下組織まで浸潤している。右はその拡大像で、腫瘍細胞は円形～類円形～紡錘形と多核性を示し、腫瘍細胞の間にスリット状の空隙形成や円形の空隙をみる。



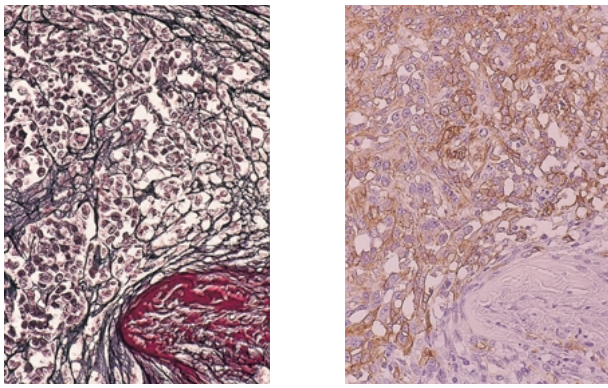


図15. 血管肉腫 左: 鍍銀染色、右: 酵素抗体法( CD34 抗体 )  
左では、腫瘍細胞が黒色の細網線維に取り囲まれた管腔を呈しているのがわかる。右の CD34 抗体では、腫瘍細胞が褐色陽性を示している。

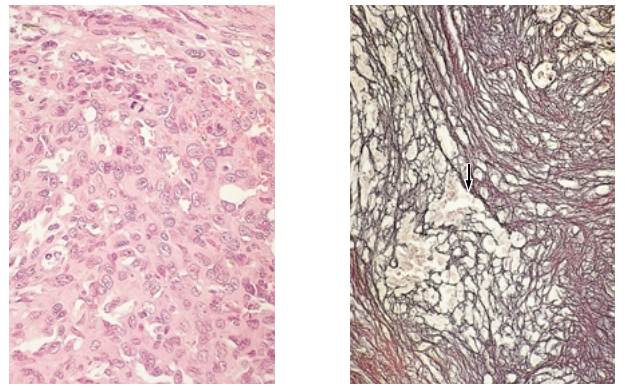


図16. 血管肉腫 左: HE 染色、右: 鍍銀染色 × 20  
低分化な血管肉腫の症例で、細胞境界の不明瞭な腫瘍細胞は核異型が強くみられる。右では、一部管腔様構造( 矢印 )を示しているのがわかる。低分化な部分では1つ1つの腫瘍細胞を細網線維が取り囲んでいる。

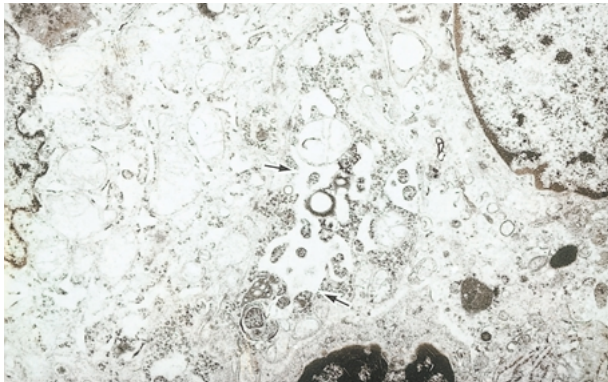


図17. 血管肉腫 TEM 像 × 1500  
腫瘍細胞は、核異型が強く、その細胞質内に小突起をもった内腔様構造( 矢印 )を認める。

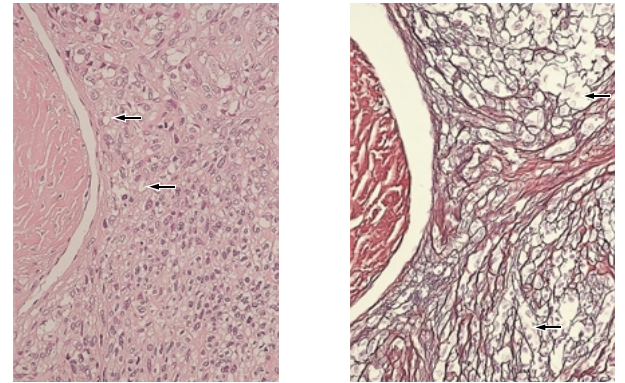


図18. 血管肉腫 左: HE 染色、右: 鍍銀染色 × 20  
前記した症例と比較し、充実に増殖した腫瘍細胞の境界が明瞭である。しかし、腫瘍細胞間にスリット様の空隙形成( 矢印 )を示し、右では一部に管腔様構造( 矢印 )を呈しているのがわかる。

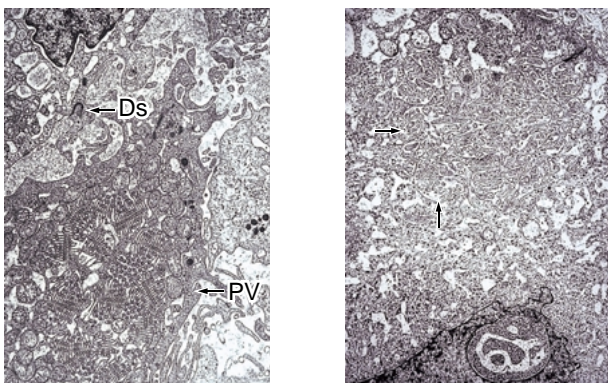


図19. 血管肉腫 TEM 像 左: × 3000、右: × 8000  
左では細胞質内に発達した細胞内小器官と一部のデミゾーム様構造( Ds )や Pinocytotic vesicle( PV )をみる。右では細胞質内には、小突起をもった内腔様構造( 矢印 )がみられ、血管内皮細胞由来の特徴を示している。

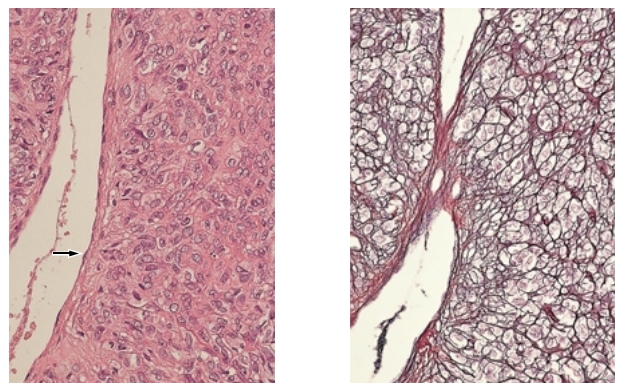


図20. 悪性血管周皮腫 左: HE 染色、右: 鍍銀染色 × 20  
扁平な内皮細胞( 矢印 )をもった血管周囲には、類円形あるいは楕円形の核を有した腫瘍細胞が充実に増殖している。細胞境界は不明瞭で、クロマチンは核膜に偏在している。右は血管肉腫と類似した鍍銀像を示しているが、個々の細胞を取り囲むように細網線維が取り込んでいるのがわかる。管腔様構造を呈しないのが血管肉腫と異なる像を示している。

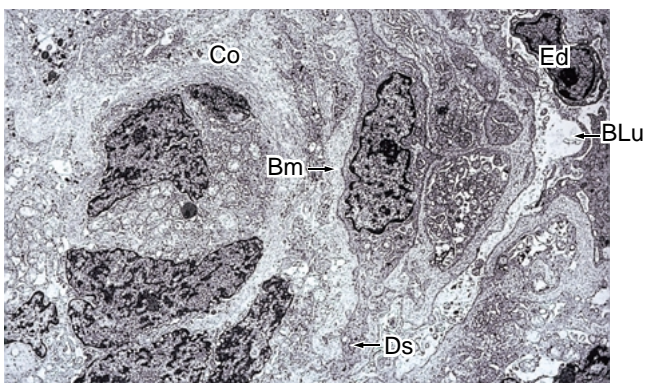


図21. 悪性血管周皮腫 TEM 像 × 1500  
血管腔( BLu )の内面は、1層の内皮細胞( Ed )に覆われ、幼若な腫瘍細胞にはところどころに基底膜( Bm )を認める。しかし、接着様式( Ds )は認められない。また細胞間質には、膠原線維( Co )が見られる。

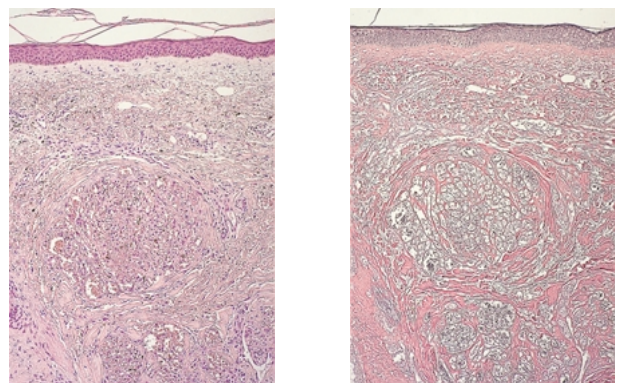


図22. カポジ肉腫 左: HE 染色 × 2、右: 鍍銀染色 × 4  
皮下に発生したもので、島状に増殖した腫瘍細胞は胞巣を作り、周囲は結合組織によって取り囲まれ肉腫様に見える。右では胞巣の中を、膠原線維が走り、多くの管腔様構造を作っている。





図23. Lymphangioma(リンパ管腫)  
小児の頸部に発生したリンパ管腫で、脂肪組織内に海綿状構造が見られる。周囲健全組織との境界は不明瞭である。

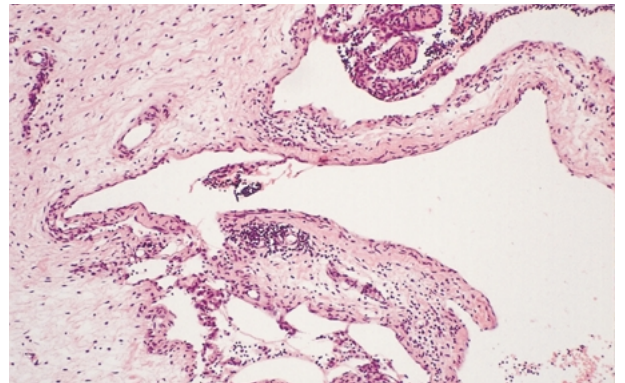


図24. リンパ管腫 HE 染色 × 4  
リンパ管は海綿状に拡張し、内腔面は一層の内皮細胞で覆われている。



図25. Lymphangiosarcoma(リンパ管肉腫)  
大腿部に発生したリンパ管肉腫で、大変稀である。原因不明の浮腫と象皮病変的下肢を伴っていた。(聖マリアンナ医大皮膚科症例)

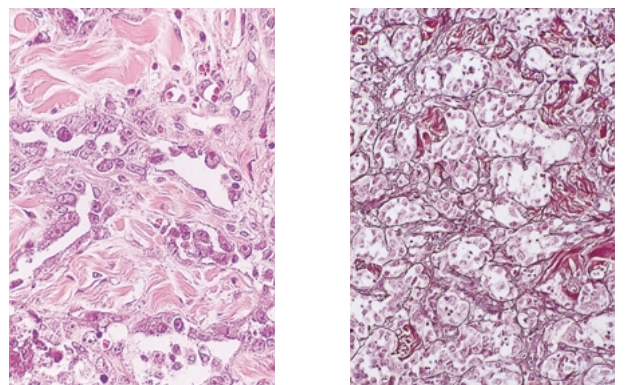


図26. リンパ管肉腫 左:HE 染色、右:鍍銀染色  
左では、ドーム状の腫瘍細胞が円形ないし類円形を呈し、管腔形成をみる。管腔の一部はスリット状を呈し、血管肉腫に類似している。右はその鍍銀像で管腔形成しているのがよくわかる。

## New Products

病理組織包埋用パラフィンに  
低融点タイプ新登場！

### Pathoprep® 546

病理組織包埋用

薄切性・伸展性・浸透性に優れ、かつ低融点のペレット状パラフィンです。免疫染色に優れている上、包埋が難しいと言われるマウス、ラット等の実験小動物の組織包埋に適しています。

融点：54～56

167-20501 2kg × 3 12,000円

詳しくは次号掲載予定です。

## Information

組織脱水溶液，低メタノールタイプ  
便利な専用“ディスペンサー”プレゼントキャンペーンのお知らせ

ご好評頂いています病理標本作製用脱水剤“組織脱水溶液，低メタノールタイプ”を購入後、ご応募された方先着 150 名様にもれなく、専用ディスペンサーを差し上げます。このディスペンサーは 18ℓ 缶の口に簡単に装着でき溶剤の取出しに便利です。この機会にぜひご利用下さい。

〔応募方法〕 専用の応募用紙に必要事項を記入の上、当社まで FAX 下さい。

応募用紙は当社ホームページ

(<http://www.wako-chem.co.jp/siyaku/camindex.htm>)上に掲載しております。

または開発部学術グループまでご請求下さい。

(FAX : (06) 6201-5965)

〔応募期間〕 平成 13 年 7 月～ 12 月末まで

〔対象〕 先着 150 名様



コード No.	品名	規格	容量	希望納入価格(円)
204-15117	組織脱水溶液，低メタノールタイプ (エタノール 89%，メタノール 3%，2-プロパノール 8%)	病理研究用	18ℓ	10,500



## 肝がん、乳がんなどの病態モデル動物作製に

### 4-(Dimethylamino)stilbene

生化学用

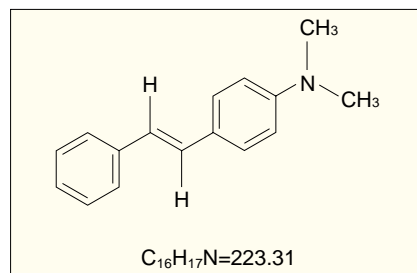
本品は、餌に混ぜることによりラットに肝がんや乳がんを誘発すると報告されています。

〔保存条件〕 遮光保存

〔参考文献〕

Baur, H. and Neumann, H. G.: *Carcinogenesis.*, 1, 877(1980)

043-28191	1g	4,200 円
049-28193	10g	18,000 円



## イノシトールりん脂質代謝関連物質

イノシトールりん脂質は微量ながら速やかに代謝され、細胞内情報伝達に重要な役割を担っています。この代謝回転ではまず、ホスファチジルイノシトール 4,5-二りん酸【PI(4,5)P<sub>2</sub>】がホルモンや神経伝達物質などのアゴニスト刺激で活性化されたホスホリパーゼ C によって分解され、イノシ

トール 1,4,5-三りん酸 (IP<sub>3</sub>) とジアシルグリセロール (DG) の 2 つのセカンドメッセンジャーを産生します。この結果、IP<sub>3</sub> は小胞体からのカルシウムイオンの動員を引き起こし、DG はプロテインキナーゼ C を活性化し、各種生理反応を促します。近年、PI(4,5)P<sub>2</sub> がセカンドメッセンジャーの前駆体だ

けでなく、それ自身細胞骨格制御やタンパク質の機能修飾を引き起こすことが知られ、また 3 位にりん酸が入ったイノシトールりん脂質群の作用ががんとの関連から注目されています。

〔規格〕

凍結乾燥品、合成品

含量: 98% 以上 (NMR)

コード No.	品名	規格	容量	希望納入価格 (円)
542-01491	D- <i>myo</i> -Inositol 1,4-Diphosphate Tetrapotassium Salt 【In(1,4)P <sub>2</sub> 】	生化学用	500μg	48,000
545-01501	D- <i>myo</i> -Inositol 4,5-Diphosphate Tetrapotassium Salt 【In(4,5)P <sub>2</sub> 】	生化学用	200μg	45,000
541-01461	D- <i>myo</i> -Inositol 1,4,5-Triphosphate Hexapotassium Salt 【In(1,4,5)P <sub>3</sub> 】	生化学用	1mg	36,000
544-01451	D- <i>myo</i> -Inositol 1,3,4,5-Tetraphosphate Octapotassium Salt 【In(1,3,4,5)P <sub>4</sub> 】	生化学用	500μg	57,000
545-01481	L-Phosphatidyl-D- <i>myo</i> -Inositol 4-Monophosphate (diC16) 【P(4)P】	生化学用	1mg	25,000
548-01471	L-Phosphatidyl-D- <i>myo</i> -Inositol 4,5-Diphosphate (diC16) 【P(4,5)P <sub>2</sub> 】	生化学用	500μg	30,000

## 細胞周期阻害剤

### ANTICANCER INCORPORATED L-Methioninase, recombinant (rMETase)

§ 細胞中のメチオニンを枯渇させることにより、アポトーシスを誘導することが報告されています。

§ 細胞周期を S 後期 / G<sub>2</sub> 期において可逆的に阻害します。

§ 抗腫瘍作用が報告されています。

§ 死細胞由来の血清や培地中のメチオニンの除去にも有用です。

§ 細胞毒性がなく、*in vivo* での研究が報告されています。

ANTICANCER 社は、メチオニナーゼ遺伝子をクローニングし、大腸菌で発現させた組換え体の大量製造に成功しました。そのためこの度、安価で高純度のメチオニナーゼをご提供できることとなりました。

別名: L-Methionine- $\alpha$ -deamino- $\gamma$ -mercaptomethane-lyase  
 E.C.No.: 4.4.1.11  
 形状: 凍結乾燥品(2% ショ糖、20 mM りん酸カリウム緩衝液 (pH 7.2))  
 起源: *Trichomonas vaginalis* 遺伝子を導入した *E. coli* によって発現  
 ユニット定義: MBTH アッセイにおい

て 1 分間に 1μmol の  $\alpha$ -ケト酪酸を生成する L-メチオニナーゼを 1 ユニットとする。(タンパク質量は Lowery 法にて測定)  
 エンドトキシン含量: 1 EU/mg protein 以下  
 溶解性: 蒸留水 1ml に 30mg L-メチオニナーゼ

〔参考文献〕

- 1) TAN, Y. *et al.*: *Anticancer Res.*, 16, 393(1996)
- 2) TAN, Y. *et al.*: *Anticancer Res.*, 17, 385(1997)
- 3) Hoffman, R. M. *et al.*: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77, 730(1980)

529-51731	10 units	20,000 円
525-51733	100 units	95,000 円



# 脳の老化と痴呆

北海道大学大学院 薬学研究科 薬理学分野 大熊 康修

加齢に伴う脳の老化を考える上で重要なことは、生誕時ヒト脳ではニューロンはすでに分裂を終了した postmitotic cell であるので、典型的な体細胞老化の概念をそのまま外挿することができないことである。一部のニューロンは加齢とともに変性脱落するが、脳部位による差や個人差も大きい。アルツハイマー病(AD)の患者では、前脳基底核のマイネルト核のアセチルコリン(ACh)含有ニューロンがとくに著しく減少する。一方、アストログリア細胞数は加齢とともに増加する。

加齢に伴いシナプス数、樹状突起数の減少、神経伝達物質含量の減少がみられ、神経伝達物質とその細胞内シグナル伝達系の機能も低下する。AChについてはAChとその合成酵素および受容体が加齢にともない減少する<sup>1,2)</sup>。ノルアドレナリン、ドパミン、セロトニンも含量とその受容体も減少する<sup>3)</sup>。さらにホスファチジルイノシトールの生合成と代謝活性の低下、G蛋白質を介する変換効率低下による受容体機能の低下<sup>4)</sup>が認められる。

痴呆の主な症状は記憶障害を中心にした脳高次機能の低下であり、生理的老化と比較すると、痴呆における記憶障害は程度が著しく進行性である。老年期の痴呆の主な原因としてアルツハイマー病(AD)と脳血管性痴呆が占めている。ADは老人斑アミロイド( $\beta$ アミロイド: $A\beta$ )の沈着に続いて、タウ( )蛋白質(微小管を重合させ機能を正常に保つ。)が過剰にリン酸化される過程で不溶化することで神経原線維変化をもたらす、シナプスの減少、神経突起の変性、さらに神経細胞死が起こるために発症すると考えられている(アミロイド仮説)。

その中でも $A\beta$ の沈着はADに特徴的であり、痴呆に至る主要な病態機序

と考えられている。 $A\beta$ は前駆体蛋白質( $\beta$ APP)の細胞外側から膜貫通ドメインの一部までに相当し、細胞外側で $\beta$ セクレターゼによって切断を受け、続いて $\gamma$ セクレターゼによって切断され生成される。 $A\beta$ には42個と40個のアミノ酸からなる $A\beta_{42}$ と $A\beta_{40}$ があるがとくに $A\beta_{42}$ は凝集性が高く、神経毒性も高い。家族性ADの原因遺伝子として、 $\beta$ APPの点突然変異、およびプレセニン(PS)-1とPS-2が発見され<sup>5,6)</sup>、 $A\beta_{42}$ の切り出しを増加させることが分かった。また最近ではPSが $\gamma$ セクレターゼそのものであることが考えられている<sup>7)</sup>。一方、ADの大部分を占める孤発性ADの場合、これらの遺伝子変異はみられない。また、アポリポプロテインEのApoE4アリルがAD発症に高い相関が認められ、 $\beta$ APP代謝に関与すると想定され、ApoE4はAD病発症の普遍的危険因子として考えられている。

脳血管性痴呆はその病因から虚血性と出血性に大別される。虚血性の痴呆では梗塞発作後の痴呆、多発梗塞性痴呆、ピンズワンガー型脳血管性痴呆(進行性で大脳白質の広範な変性が特徴)があり、出血性の痴呆は脳内出血およびくも膜下出血後の痴呆が代表的である。脳血管性痴呆の成因と病態は多様であるが、その危険因子として、高血圧、高脂血症、糖尿病、心疾患などが挙げられている。

老化研究の上で必須とされるモデル動物のうち、老年性痴呆症モデル動物は少ない。老化促進モデルマウス(Senescence Accelerated Mouse, SAM)のSAMP8系は早期に老化徴候を自然発症し、寿命の短縮、記憶・学習機能障害を特徴とする。SAMP8系マウスの海馬において、グルタミン

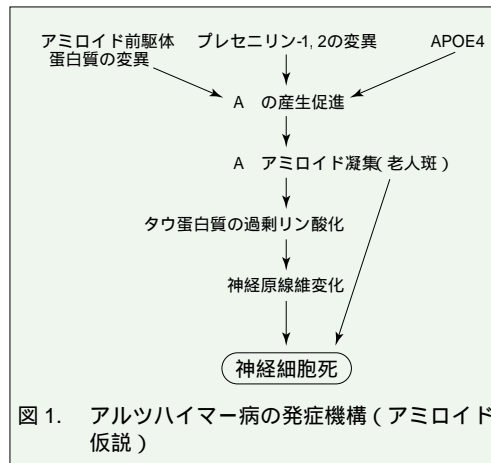


図1. アルツハイマー病の発症機構(アミロイド仮説)

酸(NMDA)受容体/チャネル、ムスカリン性ACh受容体数およびプロテインキナーゼC量が減少し、また脳においてグリア細胞の増加、 $\beta$ APP代謝異常、IL- $1\beta$ などの炎症性サイトカインの発現増加が認められている<sup>8-10)</sup>。AD患者の脳では炎症性サイトカインの発現が高いが、IL- $1\beta$ などのサイトカインは $\beta$ APPの発現増強を介して $A\beta$ の産生を増強すること、逆に $A\beta$ はグリア細胞からのサイトカイン、NO産生を増強し組織障害を惹起するという悪循環により老人斑の形成、神経突起の変性がより進行すると考えられている。またIL- $1\beta$ は海馬における長期増強現象(LTP)を抑制することが報告されており、この点でもSAMP8系は老年性痴呆症の興味深い病態モデルといえる。現在、SAMP8系脳のPS-1、PS-2やAPOEの異常についてさらに検討中でありその結果が待たれる。

## 〔参考文献〕

- 1) DeKosky, S.T., Scheff, S.W. & Markesbery, W.R., Neurology, 35, 1425 (1985)
- 2) Ohnuki, T. & Nomura, Y. Jpn. J. Pharmacol., 57, 483 (1991)
- 3) Wenk, G.L., Pierce, D.J., Struble, R.G., Price, D.L. & Cork, L.C., Neurobiol. Aging, 10, 11 (1989)

- 4)Roth, G.S., Joseph, J.A. & Mason, R.P., *Trens Neurosci.*, 18, 203(1995)
- 5)Sherrington, R., Rogaev, E.I., Liang, Y., Rogaeva, E.A., Levesque, G., Ikeda, M., Chi, H., Lin, C., Li, G., Holman, K. et al., *Nature*, 375, 754 (1995)
- 6)Rogaev, E.I., Sherrington, R., Rogaeva, E.A., Levesque, G., Ikeda, M., Liang, Y., Chi, H., Lin, C., Holman, K., Tsuda, T. et al., *Nature*, 376, 775

- (1995)
- 7)Li, Y.M., Xu, M., Lai, M.T., Huang, Q., Castro, J.L., DiMuzio-Mower, J., Harrison, T., Lellis, C., Nadin, A., Neduvellil, J.G., Register, R.B., Sardana, M.K., Shearman, M.S., Smith, A.L., Shi, X.P., Yin, K.C., Shafer, J.A. & Gardell, S.J., *Nature*, 405, 689 (2000)
- 8)Nomura, Y., Kitamura, Y., Zhao, X.H., Ohnuki, T., Takei, M., Yamanaka, Y.,

- Kitayama, Y. & Nishiya, T., *The SAM Model of Senescence*, ed. by Takeda T., *Excerpta Medica Amsterdam*, pp 83(1994)
- 9)Okuma, Y. & Nomura, Y., *Jpn. J. Pharmacol.*, 78, 399(1998)
- 10)Tha, K.K. Okuma, Y., Miyazaki, H., Murayama, T., Uehara, T., Hatakeyama, R., Hayashi, Y. & Nomura Y., *Brain Res.*, 885, 25 (2000)

## アミロイド - プロテイン

現在、アルツハイマー病の病態要因の一つとして老人斑の形成が関与していると考えられており、この老人斑の主要成分がアミロイドβ-プロテイン(1-40)と(1-42)です。それぞれアミノ酸残基数40と42のペプチドで、神経細胞毒性が強く、凝集し易い性質が

あるのがAβ42、これに遅れて蓄積するのがAβ40と報告されています<sup>1,2)</sup>。またAβの神経細胞毒性は、β構造をとる時に発揮されますが、β構造をとるかどうかは対イオンによる影響が大きく、塩酸塩の場合、スムーズにβ構造を形成すると報告されています<sup>3)</sup>。

### 〔参考文献〕

- 1)Iwatsubo, T., Odaka, A., Suzuki, N. et al. : *Neuron*, 13, 45(1994)
- 2)Iwatsubo, T., Mann, D. M., Odaka, A. et al. : *Ann. Neurol.*, 37, 294(1995)
- 3)金子 勲、久保武一、森本 潔 : *日薬理誌*, 115, 67(2000)

コード No.	品 名	規 格	容 量	希望納入価格(円)
019-18761	Amyloid -Protein(1-40) Trifluoroacetate)	生化学用	1mg	36,000
016-18771	Amyloid -Protein(1-42) Trifluoroacetate)	生化学用	0.5mg	38,000
014-18951	Amyloid -Protein(1-40) Hydrochloride)	生化学用	1mg	48,000
011-18961	Amyloid -Protein(1-42) Hydrochloride)	生化学用	1mg	52,000

### 〔関連商品〕

コード No.	品 名	規 格	容 量	希望納入価格(円)
299-56701	Amyloid -Protein Immunohistostain Kit	免疫組織染色用	50回用	90,000

## アルツハイマー病研究用

### セクレターゼ阻害剤

老人斑の主要成分であるアミロイドβ-プロテインは、その前駆体タンパク質APPがβ-セクレターゼとγ-セクレターゼによって切断されて生じます。β-セクレターゼ阻害剤は、β-セクレターゼの基質ペプチドに基づく阻害剤です。また、γ-セクレターゼ阻害剤、タイプは、γ-セクレターゼの基質ペプチドに基づくジフルオロケトン体の阻害剤です。

### -Secretase Inhibitor

生化学用

外 観：凍結乾燥品

含量(HPLC): 95.0% 以上

メタノール溶状：試験適合

H-Lys-Thr-Glu-Glu-Ile-Ser-Glu-Val-Asn-Sta<sup>\*</sup>-Val-Ala-Glu-Phe-OH

<sup>\*</sup>Sta : 4(S)-amino-3(S)-hydroxy-6-methylheptanoic acid

### 〔参考文献〕

Sinha, S. et al. : *Nature*, 402, 537(1999)

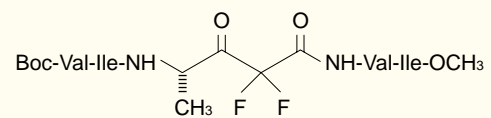
193-12311 1mg 30,000 円

### -Secretase Inhibitor, Type

生化学用

外 観：凍結乾燥粉末

含量(HPLC): 98% 以上



C<sub>33</sub>H<sub>57</sub>N<sub>5</sub>O<sub>9</sub>F<sub>2</sub> = 705.83

### 〔参考文献〕

Wolfe, M. S. et al. : *J. Med. Chem.*, 41, 6(1998)

190-12321 1mg 30,000 円



## 白血球を用いる種々の活性測定キット

ORPEGEN<sup>®</sup> Pharma フローサイトメータ用キット

貪食活性(単球、顆粒球)

### PHAGOTEST

全血中の単球、顆粒球の貪食活性をフローサイトメータで測定するキットです。

#### 〔測定原理〕

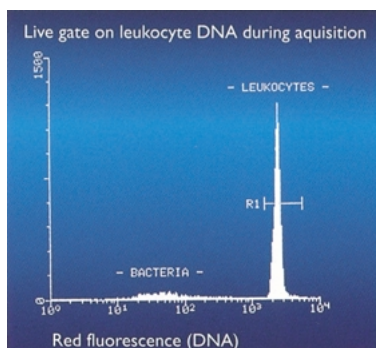
ヘパリン処理した全血に、オプソニン化した FITC 標識の *E.coli* を加え、貪食させた後食作用を止め、吸着されるが不食の *E.coli* を消光させた後、洗浄、溶解し、蛍光強度を求めることにより貪食活性を算出します。

#### 〔キット内容〕

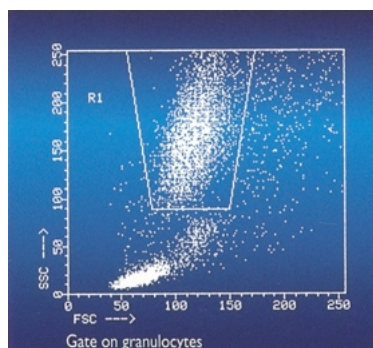
オプソニン化 FITC 標識 <i>E.coli</i> ( $1 \times 10^9/ml$ )	2ml
消光溶液	10ml
DNA 染色溶液	20ml
10 × 溶解溶液	20ml
洗浄溶液(粉末)	1l 用

#### 〔測定〕

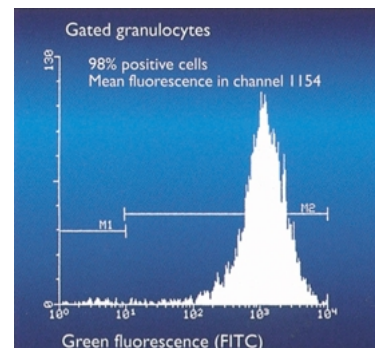
#### 〔データ解析〕



Gating on leukocytes after DNA staining: Discrimination of bacteria, single leukocytes and doublets



Gate on monocytes and granulocytes and determine the percentage of phagocytosing cells and their phagocytic activity (=mean fluorescence = number of bacteria per cell)



500-27971(メーカーコード:10-0100) 100 回用 150,000 円

酸化障害活性(単球、顆粒球)

### BURSTTEST( PHAGOBURST )

白血球の種々の疾病や薬剤の効果を評価するのに改変した酸化障害活性をフローサイトメータで測定するキットです。

#### 〔測定原理〕

白血球をオプソニン化 *E.coli*、fMLP、PMA で刺激した時に発生するスーパーオキシドアニオン、過酸化水素などが非蛍光物質のジヒドロローダミン 123 を酸化し、蛍光物質のローダミン 123 へ変化させる量を測定することにより、白血球の酸化障害活性を測定します。

#### 〔キット内容〕

オプソニン化非標識 <i>E.coli</i> ( $1 \times 10^9/ml$ )	2ml
200 × <i>N</i> -formyl-Met-Leu-Phe( fMLP )	100 $\mu$ l
200 × ホルポール 12- ミリスレート 13- アセテート ( PMA )	100 $\mu$ l
基質(ジヒドロローダミン 123)	12 パイアル
DNA 染色溶液	20ml
10 × 溶解溶液	20ml
洗浄溶液(粉末)	1l 用

507-27981(メーカーコード:10-0200) 100 回用 165,000 円

脱顆粒(好塩基球)

### BASOTEST

全血中の好塩基球のアレルゲンに対して起こる形態変化(脱顆粒)をフローサイトメータで測定するキットです。

#### 〔測定原理〕

ヘパリン処理した全血を、陽性コントロールに走化性ペプチド fMLP を用いてアレルゲンに対して起こる脱顆粒を 2 種類の標識抗体により染色し、フローサイトメータで測定します。

#### 〔キット内容〕

2 色の染色試薬(抗 IgE-PE 標識モノクローナル抗体、抗 gp53-FITC 標識モノクローナル抗体)	2ml
刺激バッファ(粉末)	2ml 用
アレルゲン性草 7 種抽出混合液	200 $\mu$ l
アレルゲン性ダニ 7 種抽出混合液	200 $\mu$ l
200 × <i>N</i> -formyl-Met-Leu-Phe( fMLP )	200 $\mu$ l
10 × 溶解溶液	20ml
洗浄溶液(粉末)	1l 用

504-27991(メーカーコード:10-0500) 100 回用 150,000 円

## LDL レセプター発現(単球)

### LDL-RECEPTOR TEST

家族性高コレステロール血症において、ホモ接合、ヘテロ接合を明確に判別できるキットです。

〔測定原理〕

密度勾配沈降法により単離した単球を自己の血清とリポ蛋白質不含血清の2系列で培養し、LDLレセプターの発現をモノクローナル抗体(ビオチンアビジン法)で染色し、フローサイトメータで測定します。

〔キット内容〕

細胞培養培地	500ml
リポ蛋白質不含血清	5ml
洗浄溶液(粉末)	1l 用
抗 LDLレセプター抗体	1.0ml
抗 マウス IgG、ビオチン標識抗体	2.0ml
ストレプトアビジン-フィコエリスリン+抗 CD14 モノクローナル抗体 FITC 標識	2.0ml
6 穴 培養用プレート	6 枚

501-28001(メーカーコード:10-0300) 50 回用 240,000 円

## 細胞障害活性(NK細胞)

### NK TEST

標的細胞に K562 を用い、NK 細胞の細胞障害活性をフローサイトメータで測定するキットです。

〔測定原理〕

エフェクター細胞と区別できるように染色された K562 標的細胞を用いて、細胞障害試験を行い、死んだ標的細胞を核染色し、フローサイトメータで測定します。

〔キット内容〕(100 回用)

染色済 K562 標的細胞	5 バイアル
Interleukin-2(200U/ml)	5 バイアル(300ml)
調製済培地	5 ボトル(100ml)
DNA 染色溶液	1 ボトル(5ml)

--- (メーカーコード:10-0450) 20 回用 120,000 円

--- (メーカーコード:10-0400) 100 回用 270,000 円

## Estrogen Receptor $\beta$ , Human, recombinant, Solution

生化学用

エストロゲンレセプター  $\beta$  (ER- $\beta$ ) は、53kDa のホルモン誘導型転写因子で、ER- $\alpha$ 、特に DNA 結合領域に高いホモロジーをもちます。本品はバキュロウイルス発現システムを用いていますので、可溶性で機能的にも活性をもちます。内分泌攪乱物質のスクリーニング及び医薬品開発等に有用です。

起 源 : Human estrogen receptor  $\beta$  produced by baculo-virus-infected insect cells  
 形 状 : 10% Glycerol, 50 mmol/l Bis-Tris-Propane(pH 9.0), 400mmol/l KCl, 2mmol/l DTT, 1mmol/l EDTA  
 純 度 : 80% 以上(SDS-PAGE)  
 濃 度 : 1,000 pmol[<sup>3</sup>H]-estradiol bound/ml

比活性 : 5,000 pmol[<sup>3</sup>H]-estradiol bound/mg protein

〔参考文献〕

- 1) Obourn, J. D. *et al.* : *Biochemistry*, 32, 622(1993)
- 2) Brown, M. *et al.* : *J. Biol. Chem.*, 265, 1123(1990)
- 3) Tzukerman, M. T. *et al.* : *Mol. Endocrinol.*, 8, 21(1994)
- 4) Beekman, J. M. *et al.* : *Mol. Endocrinol.*, 7, 126(1993)

コード No.	品 名	規 格	容 量	希望納入価格(円)
547-01681	Estrogen Receptor $\beta$ , Human, recombinant, Solution	生化学用	750 pmol	44,000

〔関連商品〕

コード No.	品 名	規 格	容 量	希望納入価格(円)
541-00621	Estrogen Receptor $\alpha$ , Human, recombinant, Solution	生化学用	750 pmol	50,000
540-01291	Androgen Receptor, Rat, recombinant, Solution	生化学用	750 pmol	50,000

## Estrogen-R( )Competitor Screening Kit

環境分析用

Estrogen-R(α)Competitor Screening Kit は、マイクロプレートに固相化したヒト型エストロゲンレセプター α に対して蛍光標識エストロゲンを用いた競合反応により、検体のレセプター親和性を調べるためのキットです。親和性が強い化合物から弱い化合物まで幅広く、高感度に検出することができ、内分泌攪乱物質の一次スクリーニングや医薬品開発などに有用です。

〔特長〕

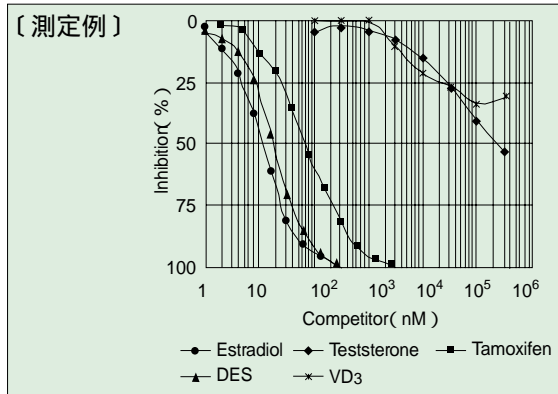
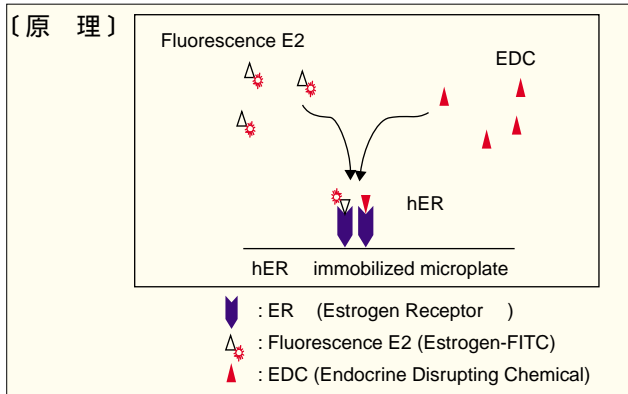
- (1) 蛍光リガンドを用いた競合反応により測定。ERα 固相化プレートで検体と ERα の相互作用を直接測定。
- (2) 96 穴プレートを用いて多検体同時測定が可能。
- (3) 抗原・抗体反応を使用しない簡単な方法で、操作時間は 2.5 ~ 3 時間。
- (4) 測定に必要なすべての試薬が揃っている。

〔キット内容〕

- (1) ERα 固相化ドライマイクロプレート 96wells × 2 枚
- (2) Reaction Solution 11ml × 2 本
- (3) 10 × 洗浄液 20ml × 1 本
- (4) 測定液 20ml × 1 本

〔測定原理〕

検体と蛍光標識エストロゲンを固相化 ER と競合反応させます。蛍光標識エストロゲールと ER との結合は、検体のもつ ER 親和性とその濃度により影響を受け、各検体特有の競合反応曲線を描きます。反応終了後、洗浄液によりフリーの蛍光エストロゲールなどを洗い流し、B/F 分離を行います。最後に、固相化 ER に結合している蛍光エストロゲール量を測定し、それが 50% 置換された時の検体濃度を IC<sub>50</sub> として非標識エストロゲールを比較対照とした各検体の ER 親和性を算出します。



コード No.	品名	規格	容量	希望納入価格(円)
295-56301	Estrogen-R( )Competitor Screening Kit	環境分析用	96 回用 × 2	60,000

## エストロゲン-R( )コンペチタースクリーニングキット Q and A

**Q1:** 検体を DMSO 溶液に溶かすようになっているが、DMSO に溶けない場合はどのようにすればよいですか。

**A1:** 超音波をかけて溶解して下さい。超音波でも溶けない場合は、完全溶解する濃度まで DMSO で希釈して下さい。

また、DMSO 以外の溶媒としては、DMF、メタノール、エタノールを使用した実績があります。DMSO 以外の溶媒を使う場合は、操作ステップ(2)記載の blank の溶媒も合わせて変更して下さい。

検体が完全溶解していない場合は、測定できません。完全溶解する濃度で測定して下さい。

**Q2:** Reaction Solution を加えた後に析出した場合はどうすればよいのですか。

**A2:** 検体濃度を薄くして、析出しない濃度に再度調製して下さい。また、DMSO 溶液に関しては、Reaction Solution に添加する量を 10% まで上げることができます(例えば、Reaction Solution 108μl に対して検体 12μl 添加)。他の溶媒に検体を溶かした場合は 5% をお守り下さい。操作ステップ(2)記載の blank 溶媒(DMSO)の添加量は、検体の添加量に合わせて変更して下さい。

Reaction Solution を加えた後、検体が析出した場合も、測定できません。析出しない濃度で測定して下さい。



**Q3** : 検体がエストロゲンレセプター に親和性があるという判定は何を基準にしていますか。

**A3** : 検体濃度依存の阻害が見られる場合、その検体は親和性があると示唆されます。その親和力は、Estradiolとその物質のIC<sub>50</sub>値を比較し、相対結合親和性(RBA)として表します。

本キットは、あくまでもエストロゲンレセプター  $\alpha$  との親和性を調べるキットであり、内分泌攪乱物質としての評価は、*in vivo* 等その他の生物活性を指標としたアッセイ方法などで総合的に判断して下さい。

**Q4** : 蛍光リーダーで測定した値は、どのように処理すればよいですか。

**A4** : Excel 等の表計算ソフトで処理する事ができます。

**Q5** : 測定に必要な波長は。

**A5** : Fluorescein を使用していますので、励起波長 485 nm、吸収波長 535nm の波長を推奨しています。

**Q6** : フタル酸ジエステル等を検体とした場合、100% ディスプレズメントが見られない場合がありますが、この原因はわかりますか。

**A6** : その検体は、Estradiol の場合とレセプター結合様式が異なっている可能性が示唆されます。ただし、詳細については不明な点が多く、他の解析法による追試をお奨めします。

**Q7** : サンプルの検討は n 幾つで行った方がよいですか。またこのキットのプレート内の CV 値はどのくらいですか。

**A7** : n=2 以上を推奨します。プレート内の CV 値は 7% 以下です。

**Q8** : 最初に添加した検体と最後( 96 番目 )に添加した検体では、反応時間に差が出ると思いますが、問題ありませんか。

**A8** : 反応時間は十分に( 2 時間 )設定されているため、問題ないと思われませんが、操作はなるべく手早く行うことをお奨めします。

**Q9** : ロット間差は有りませんか。

**A9** : エストロゲンレセプター  $\alpha$  の活性がロットによって若干差が有りますので、製造ロットによって活性が幾分変わる場合があります。

**Q10** : <sup>3</sup>H を用いた方法などとの相関性はありますか。

**A10** : 標識リガンドの種類、固相法・液相法など測定法の違いによって各化合物の RBA 値 ( Estradiol との相対結合親和性 ) は若干異なり、相関しない場合もあります。下記に本キットの標準的な IC<sub>50</sub> 値、RBA 値を添付しましたので、他の測定法との相関性検討時に参考にして下さい。

	IC <sub>50</sub>	RBA
Estradiol	11nM	100
DES	18nM	61
Tamoxifen	71nM	15
Testosterone	232 $\mu$ M	0.005
Phenol	6,787 $\mu$ M	0.0002
<i>p</i> -Ethylphenol	411 $\mu$ M	0.003
<i>p</i> - <i>n</i> -Hexylphenol	11 $\mu$ M	0.1
<i>p</i> - <i>n</i> -Nonylphenol	13 $\mu$ M	0.085
BBP	9.5 $\mu$ M	0.116
Bisphenol A	8.4 $\mu$ M	0.131
Methoxychlor	15 $\mu$ M	0.073

**Q11** : 現品説明書にある、Estradiol を用いたスタンダード曲線の横軸の E2 濃度は、DMSO 溶液時の濃度ですか、それとも Reaction Solution に添加した後の最終濃度ですか。

**A11** : 最終濃度です。

**Q12** : 洗浄液の組成は。

**A12** : 10 × 洗浄液の組成は下記の通りです。

400 mM Tris-HCl ( pH 7.5 )

10 mM EDTA

0.5% Polyoxyethylene ( 20 ) Sorbitan Mono-laurate ( Tween20 相当品 )

**Q13** : 下から励起光をあてるプレートリーダーは使用できますか。

**A13** : 使用できません。不透明な白色プレートを使用していますので、励起、検出共に上から行うタイプの蛍光プレートリーダーをご利用下さい。

**Q14** : プレートは分割使用できますか。

**A14** : リムーバブルプレートではありませんので分割できません。また、固相化しているレセプターが失活する恐れがありますので、ER $\alpha$  固相化プレートは一度に使い切ることをお奨めします。

**Q15** : エストロゲンレセプターをコートしたプレートの安定性はどれくらいですか。

**A15** : -20 で 1 年間は確認しています。

## 糖尿病性合併症の研究に 正確なソルビトールの定量に

### Sorbitol Dehydrogenase ( EC 1.1.1.14 )

生化学用

本品はポリオール代謝酵素に係わる重要な酵素であり、D-ソルビトールを基質とし、フルクトースへ分解する微生物由来の基質特異性が高い酵素です。糖尿病の合併症はソルビトールの沈着から起きるといわれています。従来から市販されている酵素ではソル

ビトール以外の糖類とも反応しましたが、本酵素を用いればソルビトールの正確な定量が可能になります。

代表的な糖類であるグルコース、マンニトール、ガラクトース(共に濃度は0.5mol/l)を基質とし単独もしくは混合溶液で反応させた結果、吸光度は

変化せず基質特異性が高いことが証明されています。

合併症の進行するメカニズム研究はもちろんのこと、食品中におけるソルビトールの定量にもお使いいただけます。

199-12391 50units/vial 20,000円

## 高感度ラットインスリン測定 ELISA キット

**Shibayagi**

レビス® インスリン-ラット(Uタイプ)  
絶食時のインスリン濃度が測定可能

シバヤギのインスリン測定キットシリーズに、ラットのインスリン濃度を高感度に測定するレビス® インスリン-ラット(Uタイプ)が加わりました。従来のラットインスリン測定キットの測定範囲は、156pg/ml ~ 10ng/ml でしたが、高感度のキットの測定範囲は25pg/ml ~ 1,500pg/ml で、絶食時のラットインスリン濃度を測定する事ができます。

〔特長〕

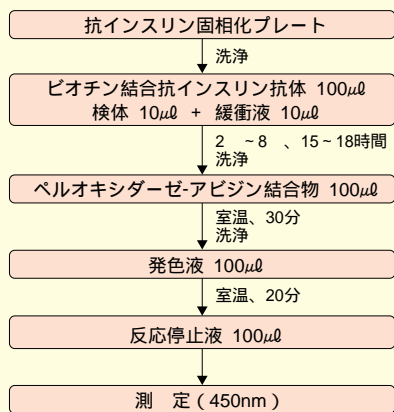
- 高感度(25pg/ml ~ 1,500pg/ml)
- 微量検体で測定可能 必要検体量：血清、血漿 10μl
- 優れた再現性(CV値 5%未満)
- プレートはセパレートタイプ



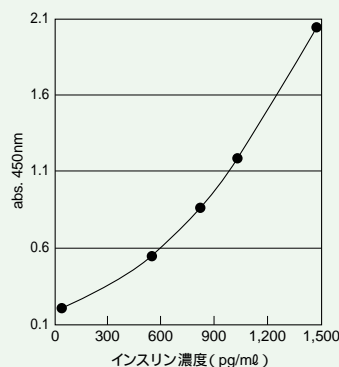
〔キット構成〕

抗インスリン固相化プレート	1枚
標準インスリン溶液(5ng/ml)	500 μl
ビオチン結合抗インスリン抗体	10 μl
緩衝液	60ml
ペルオキシダーゼ-アビジン結合物	20 μl
発色剤(TMB)	12ml
反応停止液	12ml
濃縮洗浄液	50ml

〔操作方法〕



〔標準検量線例〕



左記標準検量線例は正対数表で表示しています。なお、ご使用のイムノリーダーにより検量線の形状が異なる場合があります。

コード No.	メーカーコード	品名	容量	希望納入価格(円)
639-03131	AKRIN-030	レビス® インスリン-ラット(Uタイプ)	96回用	65,000

〔関連商品〕

コード No.	メーカーコード	品名	発色剤	容量	希望納入価格(円)
632-01281	AKRIN-010	レビス® インスリン-ラット	OPD	96回用	45,000
637-01471	AKRIN-010T	レビス® インスリン-ラット-T	TMB	96回用	45,000
639-01291	AKRIN-011	レビス® インスリン-マウス	OPD	96回用	48,000
634-01481	AKRIN-011T	レビス® インスリン-マウス-T	TMB	96回用	48,000
633-01451	AKRIN-012T	レビス® インスリン-イヌ-T	TMB	96回用	51,000
634-02221	AKRIN-014T	レビス® インスリン-サル-T	TMB	96回用	51,000
630-01461	AKRIN-013T	レビス® インスリン-ブタ-T	TMB	96回用	51,000

# L012 化学発光による好中球活性酸素代謝特性の解析

大阪市立大学大学院医学研究科分子病態学講座 今田 伊助、佐藤 英介、井上 正康

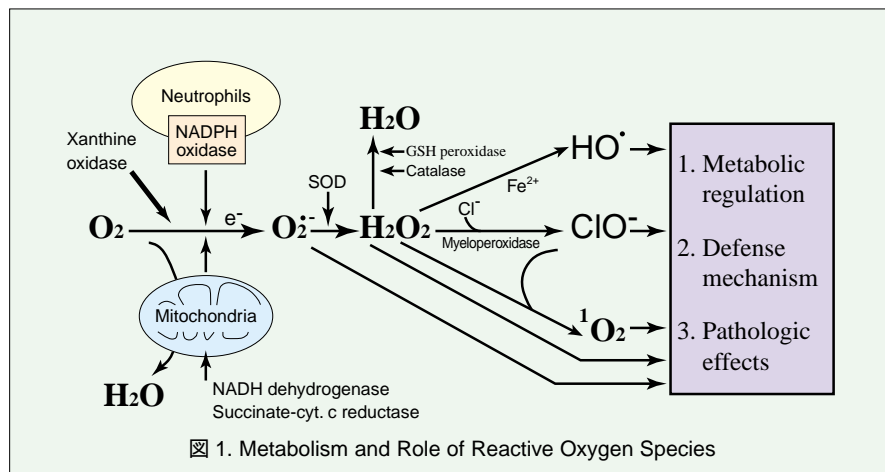
## 要旨

- (1) L012 は、血液などの複雑な生体試料中で産生される活性酸素種の分析に適した高感度化学発光プローブである。
- (2) L012は、 $O_2^-$ 、hypochlorite( $ClO^-$ )、hydroxyl radical( $HO^\cdot$ )などと反応して化学発光を示すが、特に  $HO^\cdot$  による発光強度が強い。
- (3) L012-化学発光法を用い、phorbol ester (PMA) で刺激した高齢者好中球の反応性は若年者のそれより強いが、反応速度は著明に遅いことが判明した。

## 1. はじめに

活性酸素(ROS)代謝の初期産物であるスーパーオキシド( $O_2^-$ )は、ミトコンドリアの電子伝達系、白血球のNADPH オキシダーゼ、血管内皮細胞のキサンチンオキシダーゼなどで酸素の1電子還元により産生される。 $O_2^-$ はスーパーオキシドジスムターゼ(SOD)により過酸化水素( $H_2O_2$ )に代謝され、 $H_2O_2$ は水、 $ClO^-$ 、一重項酸素( $^1O_2$ )あるいは $HO^\cdot$ などに変換される。生体内で産生されたROSは各種病態や老化などに関与するため、その挙動を正確に知る必要がある(図1)。

ROSの分析法としては、電子スピン共鳴スペクトル法(ESR)、分光分析法(比色法)、化学発光法などが用いられている。これらの分析法のうち、操作が簡単な化学発光法は高感度で優れた方法である<sup>2)</sup>。しかし、従来より市販されている化学発光プローブであるルミノールやルシフェリンの類縁体である2-methyl-6-[p-methoxyphenyl]-3,7-dihydroimidazo[1,2-a]pyrazin-3-one



(MCLA)などは、血液をはじめとする生体試料中で産生されるROSに対しては反応性(感度)が低い。このため、血液から顆粒球を分離した後にROS産生を測定する必要があり、血中をはじめとする生体内での反応動態を正確に知ることは困難であった。

## 2. L012

Aramakiら<sup>3)</sup>は、ルミノール類縁体をはじめとする数十種類の化合物を合成し、horseradish peroxidase/ $H_2O_2$ 系で産生されるROSによる化学発光

を調べた。その結果、特に8-amino-5-chloro-7-phenylpyrido [3,4-d] pyridazine-1,4(2H,3H)dione(L012)が極めて強力な化学発光を示すことを見いだした(図2)。L012はルミノールと類似の2,3-dihydro-1,4-pyridopyridazine dione骨格を持つ環状ヒドラジドであり、ROSにより生成したdianionが化学発光を示すと考えられている。

筆者らは、L012と反応して化学発光を示すROSの種類を明らかにするため、cell-freeのROS産生系を用いて解析した。L012存在下に種々のROSを産生させ、化学発光強度をルミノメーター

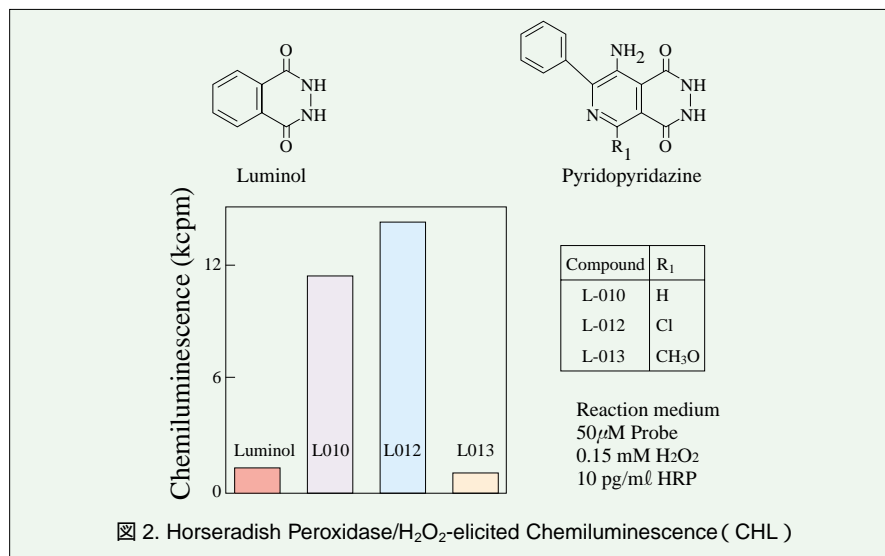


図2. Horseradish Peroxidase/ $H_2O_2$ -elicited Chemiluminescence (CHL)



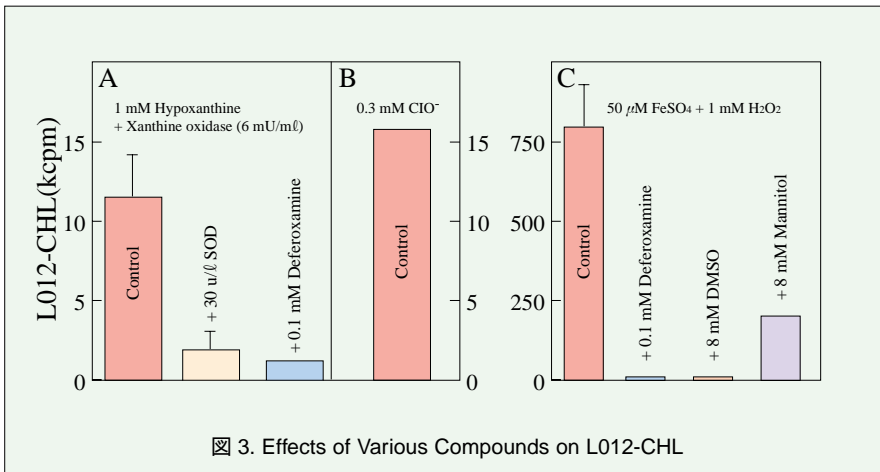


図 3. Effects of Various Compounds on L012-CHL

で測定した。キサンチンオキシダーゼの産生するROSはL012の化学発光を増強し、SODやdeferoxamineにより阻害される(図3)。H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>は好中球中では主にClO<sup>-</sup>に変換されることが知られている。L012はClO<sup>-</sup>とも反応して強い化学発光を示す。さらに、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>はFe(II)存在下でL012の化学発光を強く増強する。本化学発光はdeferoxamine、DMSO、あるいはマニトールにより阻害される。以上の結果から、L012はO<sub>2</sub><sup>-</sup>、ClO<sup>-</sup>及びHO<sup>•</sup>などと反応して強い化学発光を示すことが判明した<sup>4)</sup>。

### 3. 好中球の ROS 産生

L012を用い、成人男子健常人の血液中の好中球による化学発光を調べ

た。血液とL012を37℃で3分間インキュベート後、オプソニン化ゼイモサン(OZ)で刺激すると強い化学発光を示した(図4)。また、PMAもヒト血中でL012の化学発光を強く増加した。同様の条件下では、ルミノールやMCLAの発光強度はL012の1%及び5%程度であり、極めて低い(図5)。

成人男子健常人から口腔内好中球を採取し、そのROS産生を調べた。口腔内好中球は口腔内へ浸潤する間に強くプライミングされており、無刺激状態でも常にROSを産生している。PMAで刺激するとROS産生はさらに約7倍増加した(図6)。これに比べ、ルミノール及びMCLAの発光強度はL012の1%及び10%程度と低い<sup>5)</sup>。

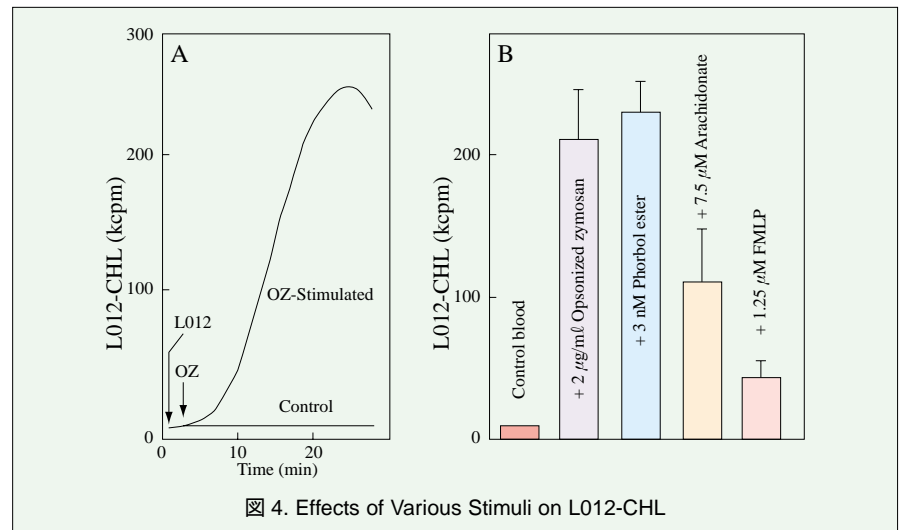


図 4. Effects of Various Stimuli on L012-CHL

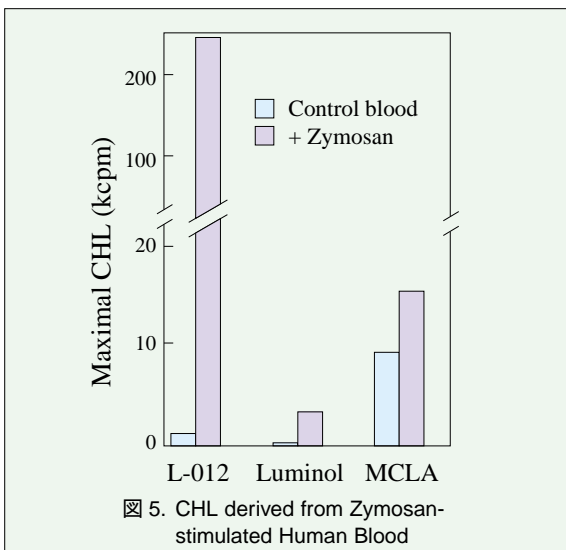


図 5. CHL derived from Zymosan-stimulated Human Blood

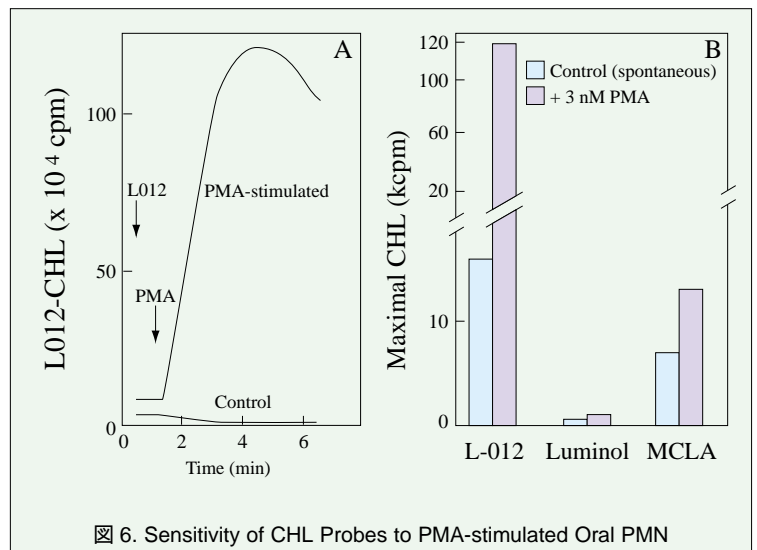


図 6. Sensitivity of CHL Probes to PMA-stimulated Oral PMN

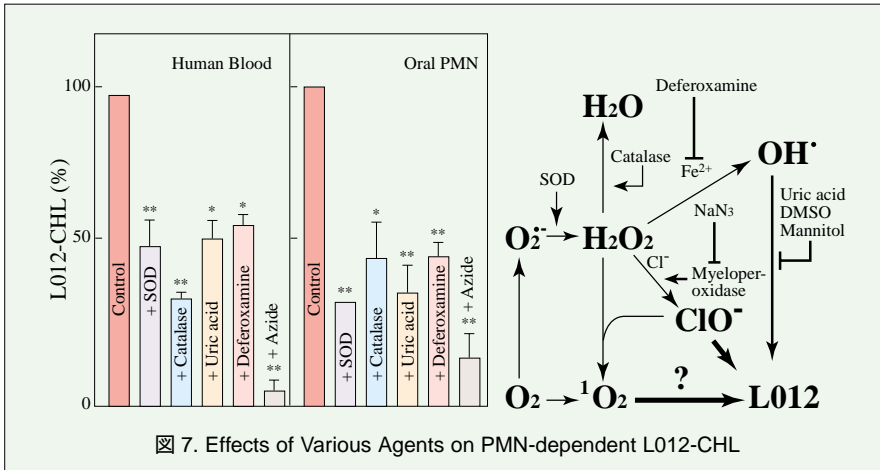


図 7. Effects of Various Agents on PMN-dependent L012-CHL

活性化好中球でL012を発光させるROSの分子種を明らかにするため、O<sub>2</sub><sup>-</sup>刺激した血液中好中球及びPMA刺激した口腔内好中球のL012発光に対する種々の阻害剤の効果を調べた(図7)。ミエロペルオキシダーゼの特異的阻害剤であるアジドはL012の発光を強く阻害した。従って、これらの好中球ではClO<sup>-</sup>がL012発光の主役を担っていることが示唆される。L012の発光強度はdeferoxamineや尿酸でも阻害されることから、HO<sup>·</sup>も関係していることが判明した。他方、アジドや尿酸は<sup>1</sup>O<sub>2</sub>の消去剤でもあることから、本分子種の関与も検討する必要がある<sup>4,5)</sup>。

#### 4. 加齢と好中球のROS産生

感染症による高齢者の死亡率は高い。初期感染防御に重要な好中球の機能低下は感染に対する感受性増加と関係すると考えられる。事実、高齢者では、血中の好中球数は若年者と変わらないが、その貪食能、免疫応答能及び防御能などの低下が示唆されている。感染防御における好中球の最重要機能の一つはROSの産生である。好中球により産生されたROSは細菌の発育を阻害する(図8)。筆者らは、種々の年齢の健常人の口腔内好中球を用い、そのROS産生能と加齢との関係を調べた<sup>5)</sup>。22歳から68歳の9人

の男性から常法により単離した口腔内好中球をL012と3分間インキュベートした後にPMAで刺激し、ROSの産

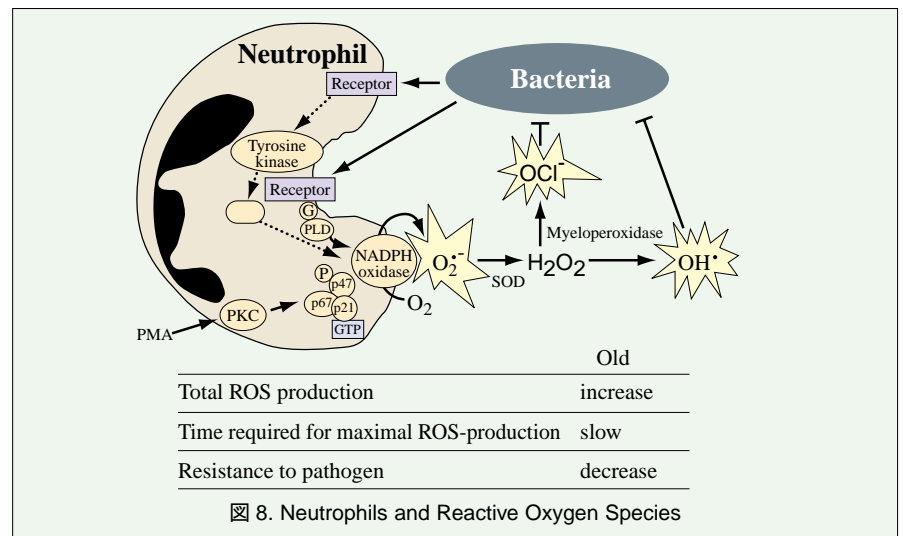


図 8. Neutrophils and Reactive Oxygen Species

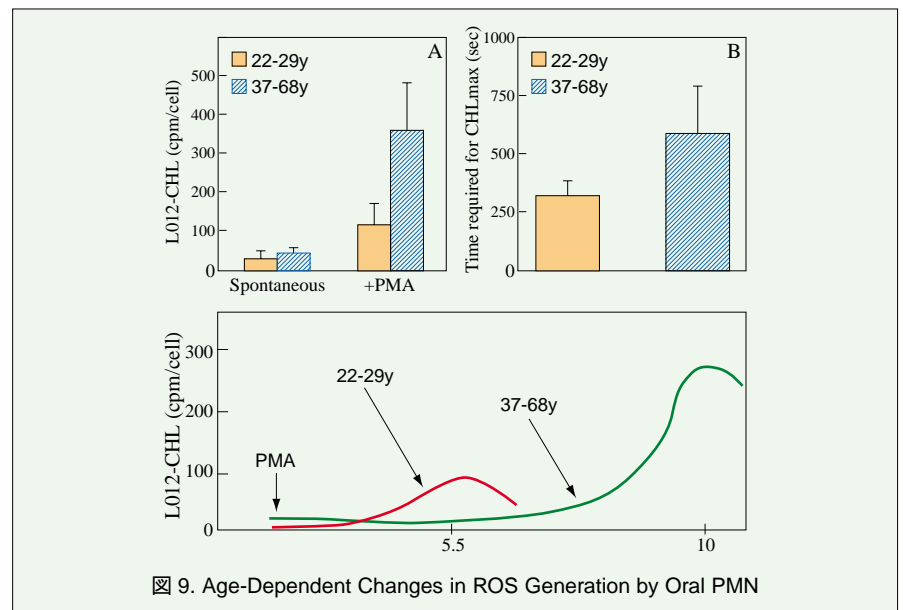


図 9. Age-Dependent Changes in ROS Generation by Oral PMN

生を比較した。その結果、好中球により産生されるROSの最大産生量(ピーク値)は加齢と共に上昇するが(図9)ピークに到達するまでの時間は加齢と共に有意に遅延した。この反応性の遅延と高齢者の感染抵抗性低下との関係を解析することが必要と思われる。

#### 5. おわりに

主に酸化的リン酸化に依存する好気性生物は、その生命維持に莫大な量の酸素を利用している。体内に取り込まれた酸素の一部はROSとして種々の生理作用を示す。本稿では、複雑な生体試料中において、L012が高感度

の化学発光プローブとして利用可能なことを示し、加齢と口腔内好中球 ROS 産生動態との関係を述べた。解析の結果、加齢により好中球の ROS 産生は増大するが、その応答反応速度は著明に遅延することが判明した。同様の傾向は老化促進マウス (SAMP8) の血液好中球をザイモザンで刺激した際にも認められる<sup>6)</sup>。好中球により産生される ROS の種類はリガンドにより異なり<sup>7)</sup>、L012 はこれらの ROS のうち、特に細胞傷害性の強い

$\text{ClO}^-$  や  $\text{HO}^\cdot$  に対してよく発光することから、この方面の研究に有用と思われる。

〔参考文献〕

- 1) 井上正康(編):“活性酸素と病態”, 学会出版センター, 1992.
- 2) 佐野浩亮, 内海英雄, 化学と生物, 37, 328 (1999)
- 3) Y. Aramaki *et al.*, under preparation (Ref. H. Masuya *et al.*, Eur. Patent Appl., 1992, 491477).
- 4) I. Imada, E. F. Sato, M. Miyamoto, Y. Ichimori, Y. Minamiyama, R. Konaka,

- M. Inoue, Anal. Biochem., 271, 53 (1999)
- 5) I. Imada *et al.*, In "Proceeding of Bioluminescence and Chemiluminescence 2000" ed. by L. J. Kricka, John Wiley & Sons, in press.
- 6) 今田伊助, 佐藤英介, 笠原恵美子, 吉良幸美, 宮本政臣, 井上正康, 生化学, 72, 616 (2000) (第73回日本生化学会ポスター)
- 7) R. Takahashi, K. Edashige, E. F. Sato, M. Inoue, T. Matsumoto, K. Utsumi, Arch. Biochem. Biophys., 285, 325 (1991)

活性酸素の測定に

L-012

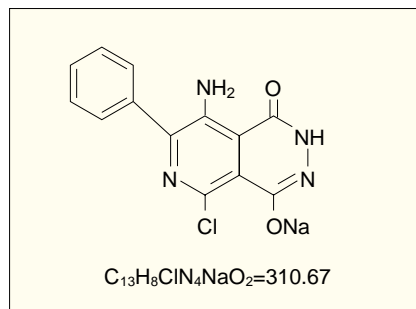
生化学用

L-012 (8-amino-5-chloro-7-phenyl-pyrido[3,4-d]pyridazine-1,4-(2H,3H)dione sodium salt) 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。中性域で高感度に発光するため、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、ハイポクロライトなどの活性酸素の測定に有効です。

大幅値下げ!!

例えば、成人男子健常人血中の好中球による化学発光では、ルミノールの数百倍、MCLA (2-methyl-6-[p-methoxyphenyl]-3,7-dihydroimidazo [1,2-a] pyrazin-3-one) の数十倍の化学発光を示します。

〔保存条件〕 - 20 °C 遮光保存



p.31 の総説をご参照下さい。

120-04891      100mg      15,000 円

DAB 溶液の調製に

DAB TRIS Tablet, pH 7.6

生化学用

Peroxidas( POD) の発色基質である 3,3'-Diaminobenzidine や o-Phenylenediamine は有害性があるため、取扱い易い錠剤タイプの製品が汎用されています。特に当社の錠剤は溶解性が良く、簡単に取出せる PTP 包装を採用しており、従来よりご好評頂いておりましたが、この度さらに使い勝手の良くなった DAB トリス錠が発売となりました

た。本品は DAB の錠剤にトリス緩衝液の成分を含んだ錠剤で、蒸留水に溶解するだけでご使用になれます。

〔特長〕

蒸留水 5ml に溶解するだけで、0.01mol/l トリス塩酸緩衝液, pH 7.6 が調製できます。

PTP 包装ですので簡単に一錠が取出せます。



047-27011      50 錠      8,400 円  
043-27013      100 錠      14,800 円

〔関連商品〕

コード No.	品名	規格	容量	希望納入価格(円)
040-27001	DAB Tablet 5mg/錠	生化学用	50 錠	9,000
046-27003			100 錠	16,000
049-22831	DAB Tablet 10mg/錠	生化学用	50 錠	9,500
045-22833			100 錠	16,500
151-02141	OPD Tablet 2mg/錠	生化学用	50 錠	5,500
157-02143			100 錠	9,000
158-02151	OPD Tablet 5mg/錠	生化学用	50 錠	5,600
154-02153			100 錠	9,200

コード No.	品名	規格	容量	希望納入価格(円)
155-02161	OPD Tablet 10mg/錠	生化学用	50 錠	5,600
151-02163			100 錠	9,200
158-01671	OPD Tablet 13mg/錠	生化学用	50 錠	6,000
154-01673			100 錠	9,800
152-01674	OPD Tablet 30mg/錠	生化学用	2,000 錠	130,000
152-02171			50 錠	6,000
158-02173			100 錠	9,800



## 共存物質の影響を受けにくいタンパク質の定量キット

### Protein Blot Assay Kit wako

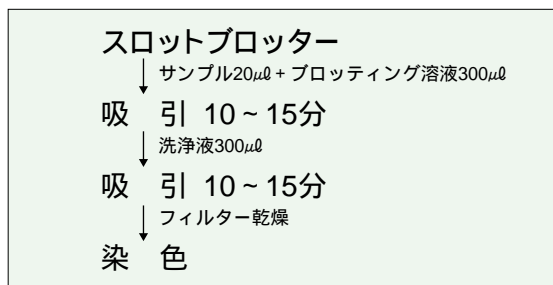
本キットはピロガロールレッド (PR) を色素に用い比色法を基本原理として開発されたピロガロールレッド- モリブデン錯体発色法による測定キットです。特に従来の液相法 (Protein Assay Rapid Kit wako、関連商品参照) に比べて SDS など界面活性剤の影響を受けにくいことが最大の長特です。

#### 〔発色原理〕

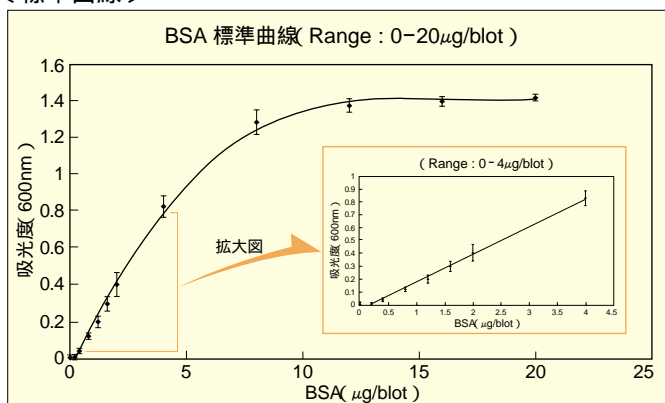
PR がモリブデン酸と結合し、470nm に極大吸収を持つ赤色錯体を形成します。この錯体は酸性下でタンパク質と結合すると波長がシフトし青紫色 (604nm) を呈します。600nm 付近の吸光度を測定する事により、試料中の総タンパク量を求めます。

#### 〔測定原理〕

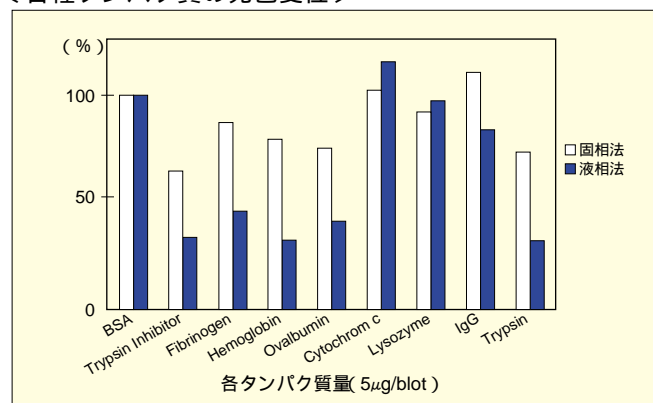
サンプル中のタンパク質を特殊なプロットング溶液を用い、効率的に PVDF 膜へプロットさせます。PVDF 膜を洗浄後、モリブデン酸と結合したピロガロールレッドが PVDF 膜上のタンパク質と錯体を形成し、青紫色 (604nm) を呈します。デンストメーターや CCD カメラにより、色素を読み取り、濃度を測定します。



#### 〔標準曲線〕



#### 〔各種タンパク質の発色変位〕



#### 〔共存物質の影響〕

共存物質の影響を受けない共存物質最大濃度

共存物質	固相法	液相法
Guanidine-HCl	1M	0.5M
Urea	4M	6M
Ammonium Sulfate	1M	1M
KCl	1M	1M
NaCl	1M	4M
MgCl <sub>2</sub>	0.1M	1M
Sodium Azide	1%	0.2%
Glycerol	50%	99%
Glucose	1M	0.5mM
Sucrose	50%	40%
EDTA	0.2M	0.1M
DTT	0.8M	1M

共存物質	固相法	液相法
Mercaptoethanol	2M	1M
Tris	0.5M	2M
HEPES	1M	0.1M
MOPS	1M	0.2M
SDS	4%	0.02%
SLS	2%	
CTAB	0.05%	
CHAPS	1%	
Tween 20	0.05%	0.1%
Tween 80	0.1%	
Triton X-100	2%	0.1%
Brij 35	1%	

コード No.	品名	規格	容量	希望納入価格 (円)
291-57001	Protein Blot Assay Kit wako	タンパク質定量用	96Blot 用	8,000
297-57003			480Blot 用	28,000

#### 〔関連商品〕

コード No.	品名	規格	容量	希望納入価格 (円)
293-56101	Protein Assay Rapid Kit wako	タンパク質定量用	100 回用	4,000
299-56103			400 回用	11,000

## 分光分析用溶媒

低吸光度、蛍光強度を保証した高純度溶媒です。吸光分析を始めとする各種分光分析に安心してご使用頂けます。

〔規格例〕

品名	Dimethyl Sulfoxide	2,2,4-Trimethylpentane
コード No.	045-28335	204-15455
外観	無色透明の液体	無色透明の液体
密度 (20℃)	1.099 ~ 1.103 g/ml	0.690 ~ 0.693g/ml
屈折率 $n_D^{20}$	1.477 ~ 1.480	1.390 ~ 1.393
吸光度	265nm	0.80以下
	270nm	0.45以下
	280nm	0.25以下
	310nm	0.07以下
	350 ~ 400nm	0.01以下
水分	0.1%以下	0.01%以下
蛍光試験	試験適合	試験適合
含量 (cGC)	99.9%以上	99.8%以上



〔品目一覧表〕

コード No.	品名	規格	容量	希望納入価格 (円)
014-19095	Acetone	分光分析用	500ml	2,200
017-19105	Acetonitrile	分光分析用	500ml	4,000
027-14525	Benzene	分光分析用	500ml	2,000
021-14545	1-Butanol	分光分析用	500ml	4,000
024-14535	t-Butyl Methyl Ether	分光分析用	500ml	5,000
038-18495	Chloroform	分光分析用	500ml	2,600
031-18505	Cyclohexane	分光分析用	500ml	3,000
041-28295	1,2-Dichloroethane	分光分析用	500ml	3,500
044-28305	Dichloromethane	分光分析用	500ml	2,300
041-28315	Diethyl Ether	分光分析用	500ml	3,800
048-28325	N,N-Dimethylformamide	分光分析用	500ml	3,100
045-28335	Dimethyl Sulfoxide	分光分析用	500ml	4,800
042-28345	1,4-Dioxane	分光分析用	500ml	4,300
049-28355	Distilled Water	分光分析用	500ml	1,100
052-06925	Ethanol(99.5)	分光分析用	500ml	3,600
059-06935	Ethyl Acetate	分光分析用	500ml	2,900
080-07845	Heptane	分光分析用	500ml	3,800
087-07855	Hexane	分光分析用	500ml	3,000
139-13995	Methanol	分光分析用	500ml	1,400
169-20485	2-Propanol	分光分析用	500ml	2,200
200-15435	Tetrahydrofuran	分光分析用	500ml	4,000
207-15445	Toluene	分光分析用	500ml	2,200
204-15455	2,2,4-Trimethylpentane	分光分析用	500ml	4,000

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。

記載価格は希望納入価格であり消費税等は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(代表)	発行日	2001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	共進社印刷株式会社