

アルツハイマー病等の神経変性疾患の研究に

Phosphorylated Tau Immunohistostain Kit

免疫組織染色用

アルツハイマー病等の痴呆を伴う神経変性疾患では異常にりん酸化されたタウタンパク質の蓄積が見られます。本品は、この異常りん酸化タウタンパク質を特異的に染色する免疫組織染色キットです。

- 特長**
- (1) 神経原線維変化を含むタウタンパク質の異常蓄積病変を高感度で低バックグラウンドに染色できます。
 - (2) ヒトタウタンパク質の 422 番目のりん酸化セリンを特異的に認識する抗体を使用しており、正常タウタンパク質は認識しません。

- キット内容**
- (1) 抗りん酸化タウタンパク質 (pSer-422) , ウサギ 10ml × 1 本
 - (2) ブロッキング用血清 10ml × 1 本
 - (3) 抗ウサギ IgG, ヤギ, ビオチン結合 10ml × 1 本
 - (4) ABC 溶液 (ストレプトアビジン - ビオチン - ペルオキシダーゼ複合体溶液) 10ml × 1 本

299-57301 100 回用 52,000 円

詳しくは、p.31 をご参照下さい。

目次

化学大家
「ウォレス・ヒューム・カロザーズ」
島尾 永康2

総説
「水中の大腸菌群・E.coli 検査試薬 AquaTest」
山縣 文夫11
「実験動物における病理組織標本の作製について」
福田 種男16
「カルシウム受容発光蛋白質イクオリン」
井上 敏24
「神経変性疾患における異常りん酸化タウの蓄積」
長谷川成人28

シリーズ
< Talking of LAL >
「第 45 話 エンドトキシンに結合する血漿成分」
土谷 正和23
< How to 組織イメージング >
「第 5 回 非上皮性腫瘍 (2) 脂肪組織の腫瘍」
石川喜美男、三瓶 接子、宮 哲正、
久川 芳三、牛込新一郎20
< 脳科学—ロメモ— >
「アルツハイマー病の関連タンパク質 APP のりん酸化と代謝制御」 鈴木 利治32
テクニカルレポート
「大気中のアルデヒド、ケトンの HPCL 分析 (その 3)」 吉田貴三子6

新製品フラッシュ
りん酸化タウ免疫組織染色キット1,31
ぬれ張力試験用混合液5
ワコーパック®フルオロフィックス7
HPLC 用酸、18ℓ キャニスター缶包装脱水溶媒8
けいそう土、荷電型、(-) - ヒドロキシくえん酸カルシウム標準品、アルテピリン C9
ダイオキシン類分析用試薬、農薬標準品 ...10
ELMEX AquaTest11
横河全窒素全りん測定装置専用試薬、リバー スクリプト12
RNA ポリメラーゼ RNase 阻害剤 (スーパー) 添加) 100bp DNA ステップラダー13
Invitek 社 核酸抽出・精製キット14
パソプレップ® 546、硫酸アンモニウム飽和溶液19
イクオリン26
PIERCE 社 Seize™ X 免疫沈降キット ...27
アミロイド β- プロテイン免疫組織染色キット ...31
β- グルカン、水溶性、グアノシン 5'- ニりん酸ナトリウム塩33
糖尿病研究用 ELISA キット、アルドース還元酵素 ...34
ソルビトール脱水素酵素、ストレプトゾトシン、スタチン系薬剤、ラットレブチン ELISA キット35
ポリアクリルアミドプレキャストゲル36

ウォレス・ヒューム・カロザース (1896.4.27 ~ 1937.4.29)

科学史家 島尾 永康

小さな田舎の大学で

ウォレス・カロザースは1896年4月27日、アイオワ州バーリントンで生まれた。父は商業学校の教師であった。高校生の頃R・ダンカンの通俗化学書を読んで化学に興味をもち、大学では化学をやりたいと思った。1915年、長老派教会の熱心な信徒だった父は、カロザースをその宗派の建てた大学、ミズーリ州のターキオ・カレッジに入学させた。4年制の大学だが、学生は男女合わせてわずか114名だった。カロザースはドイツの詩とニーチェとクラシック・ドイツ音楽を好んだ。級友から“教授”と呼ばれていた。ただ一人の化学教授、アーサー・パルディーは、Ph.D.を取るためにジョンズ・ホプキンス大学へいっており不在だった。二年生のとき復帰された先生から最新の化学を吸収し、このとき有機化学を勉強し始めた。在学中アメリカが大戦に参戦し、多くの学生が出征したが、カロザースはヨード欠乏地域で成長したため甲状腺腫があり、兵役を免除された。パルディーは東部の大学へ転任したので、化学の教員がいなくなり、カロザースが化学のインストラクターに任命され、卒業が1年遅れた。小さな田舎の大学の卒業生には、産業にも大学にも口がなかった。パルディーはPh.D.の取得を勧め、ジョンズ・ホプキンスでなく、新興のイリノイ大学を薦めた。

イリノイ大学で

1920年、カロザースはイリノイ大学大学院に入学した。教授、助教授、インストラクターなどスタッフ20人、助手約30人の大所帯で、4階建の化学教室の各階はフットボールができるほどの広さがあった。カロザースが師事したロジャー・アダムズ(1889 - 1971)教授はボストン出身で、第6代アメリカ合衆国大統領、ジョン・クインシー・アダムズの子孫である。ハーバードでPh.D.を取



図1. ウォレス・カロザース

得(1912)後、ベルリン・ダーレムでエミール・フィッシャーに師事した。酸化白金や酸化パラジウムの触媒作用を発見した(アダムズ触媒)。それまでアメリカの化学のPh.D.の半数はジョンズ・ホプキンスから出ていたが、アダムズの指導するイリノイ大学は、ジョンズ・ホプキンスをしのぐ勢いとなった。アメリカ化学会会長を務めた(1935)。第一次大戦中は陸軍で化学兵器に関係し、第二次大戦中は国防科学研究委員となり、日本駐軍総司令部化学顧問団団長として、1947年に来日している。カロザースより7歳年長である。(図2)

カロザースは白金触媒上でのアルデヒドの還元の研究によりPh.D.を取得し



図2. デュポン社でカロザースと語り合うアダムズ(左)。かれは38年間イリノイ大学教授、40年間デュポン社の顧問をした。

た(1924)。アゾベンゼン・イミドの構造決定という最初の研究では、ルイスとラングミュアの原子価理論を有機化学にもちこんだ(1923)。アダムズら経験主義者ばかりのイリノイ大学化学教室にあって、ただ一人理論的傾向をもつ異色の存在となった。教員と学生の全員の中であれほどよく化学文献を読んだものではなく、かれほどよくそれを記憶していたものもいなかった。博士号をとる前から、みんなに“博士”と呼ばれていた。かれの化学的名声は急上昇したが、一方、ときおり襲われたうつ病の時期には完全に無意志症の生活だった。卒業後インストラクターとなり、サウス・ダコタ大学でもインストラクターをした。しかしカロザースはシャイで、ショーマンの資質がなく、教師には全く不向きであった。

ハーバード大学で

1926年、アダムズの推薦でカロザースはハーバード大学のインストラクターになった。ハーバードにはE.P. コーラーという60歳代の有機化学の教授がいて、洗練された講義と巧みな実験で知られていた。コーラーが実験の巧妙さを得意としたのに対して、カロザースは実験よりも思索を重ね、熟考するタイプだった。カロザースはインストラクターになったばかりであったが、3歳年長のジェームズ・コナントはすでに教授であり、数年後、40歳の若さでハーバードの総長に選出され、大学行政と国家の科学行政に深くかかわっていく。カロザースがハーバードに来て第二年度の初めに早くも入社を勧めるデュポン社の役員と接触しているのは、イリノイと異なるハーバードの学風やコナントになじみず、ハーバードでの前途の見通しが必ずしも明らかでなかったからであろう。一方、デュポン社ではこの年、研究部長のC. スタインが、利潤の追求のための研究でない、“純粹の”基礎研究のために25万ドルを留保することを



図3. 1925年の夏休みを楽しむカロゼース(左)とマーヴェル(1894~1988)。マーヴェルは67歳までイリノイ大学教授、その後、92歳までアリゾナ大学教授、60年間デュポン社の顧問。合成ゴムに深くかかわった。

重役会に承認させ、それを指導する教授級の化学者を大学から招こうとした。まずアダムズに対してその申し出がなされたが、アダムズは断り、そのあとC.S. マーヴェル(図3)、H. ギルマン、L. フィーザーらもいずれも応じなかった。アダムズとコナントはカロゼースを推薦した。パルディーにいたってはカロゼースこそ百万人に一人の化学者と推奨した。デュポン社はカロゼースの獲得に躍起となった。1928年、カロゼースは自分の好きなことをしてよいといわれ、年俸\$6000で入社を承諾した。ちなみにハーバード第二年目のカロゼースの給料は\$3200、イリノイ大学のアダムズ教授は\$8000であった。カロゼースはデュポン社で高分子の構造とその合成を研究しようと考えた。

デュポン・ド・ヌムール社

経済学者・政治家ピエール・サミュエル・デュポン・ド・ヌムール(ド・ヌムールと領地名をつけたのは1789年、三部会の議員に出たときである)は、近代化学の創始者ラヴォワジエの盟友だったので、その子エリュテール・イレネー(1771 - 1834)は17歳でラヴォワジエが監督・理事をしていた王立火薬工場に入り、ラヴォワジエから親しく火薬製造の教えを受けた(図4)。1799年、デュポン家は蔵書4000冊を持ってアメリカに亡命した。エリュテールはアメリカの火薬の質が悪いのに着目し、1802年、デラウェア州ウィルミントンに火薬工場を設立した。デュポン家は140人

のアイランド人移住者を雇い、緊密な生活集団を結成した。安全管理は厳重をきわめた。工場は互いに一定の距離をおき、一つの工場には一度に2人しか働かせなかった。マッチの使用は厳禁し、金属の発火を恐れて、使用人の衣服のボタンは木製にさせ、靴には釘でなく木くぎを打ち、馬蹄でさえも木製にした。ラヴォワジエへの感謝の念をこめて始めはラヴォワジエ製造所という社名を考えしたが、結局デュポン・ド・ヌムール社と

した。19世紀のアメリカは西部開拓や南北戦争もあって、火薬の需要は無敵だった。デュポン社は世界最大の黒色火薬の製造者となった。火薬職人の数家族が代々デュポン家のために働いた。20世紀になって第一次大戦が起こると、連合国の無煙火薬を一手に引き受けた。1914年に5500人だった従業員は、1918年には55000人になっていた。

第一次大戦以来デュポン社は儲けすぎて当惑した。戦後もなお爆発物で儲けるデュポン家の人々は“火薬人間”とののしられた。1934年、社長ラモット・デュポンは議会上院で厳しく尋問され、戦時中の年間利益が500万ドルから6000万ドルに跳ね上がったのは軍部への過剰請求による不当利得であると裁決された。デュポン社のイメージは最悪となった。まさにこのとき基礎研究室でおこなわれた新しい合成繊維の発見に重役会が飛びついたのは、これによってデュポン社のイメージ・チェンジを図れると考えたからである。デュポン社はすでに1919年以来、火薬専門から多種商品製造へと転換しており、基礎薬品、レーヨン、プラスチック、染料、塗料、フィニッシュ、爆発物、セロファン、合成ゴム、これに新たにナイロン部門が加わってアメリカ最大の化学コンツェルンになった。そのデュポン社のイメージを完全に好転させたのは、絹よりも優れたナイロンを、女性用ストッキングとして大々的に提供したことである。ナイロンの商品化を成功させたのは、ハーバー・ボッシュのアンモニア合成に刺激されて導入した高压化学と化学工学で

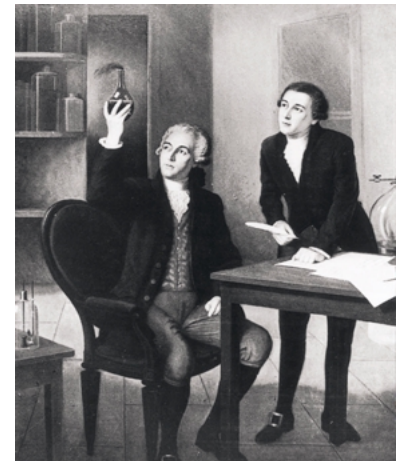


図4. ラヴォワジエの教えを受けるエリュテール・イレネー・デュポン・ド・ヌムール(右)

ある。ナイロンはデュポン社の新しいテクノロジー時代の象徴となった。1938年に1億ドルの絹を日本から輸入し、その3/4をストッキングに消費していたアメリカにとっては経済的な勝利でもあった。第二次大戦時にもデュポン社は、原子爆弾用のプルトニウムを生産したが、非難されるどころか、その技術力はさらに声価を高めた。

デュポン社のカロゼース

入社早々のカロゼースは言う、「研究費は制限なし。好きなだけ使ってよい。私が時間をどう使おうと、どういう計画を立てようと誰も何も聞かない。完全に自由だ」と。さらにポストドクトラルからなる研究チームもついた。チームは1929年に6人だったのが、1932年には13人に増員した。発表の自由もあった。チームの研究結果はすべてカロゼースの名前で発表された。ドイツのヘルマン・シュタウディンガーが、高分子は普通の化学結合で形成される長鎖状の巨大分子であると述べたが、一般に承認されなかった(1920)。カロゼースはその理論の実証を目指し、エミール・フィッシャーが樹立した記録、分子量4200以上のポリマーの合成を目標として出発し、縮重合を徹底的に研究した。1930年、チームの一員A. コリンズがポリクロロブレンのゴム状性質を発見したのが端緒となって、世界最初の合成ゴムを合成した。デュポン社にちなんでデュブレと命名した(1936年にネオブレンと改称)。カロゼースは大学に

未練があった。コナントがハーバードの総長に就任したと聞いて、ハーバードに教授として戻れないかと考えた(1933)。しかしシカゴ大学のハッチンス学長からの化学科の部長就任の申し出は断っている(1935)。

最初に長い合成繊維を引いて興奮したのはチームのJ. ヒルである(1930)。しかし実用になる、優秀な繊維を最初に引いたのは、G. バーチャットである(1935)。その原料のヘキサメチレンジアミンとアジピン酸は、容易に得られるという点でも有望だった。いずれにもCが6個あるので、ポリアミド6-6と呼ばれた。これがデュポン社のナイロンになる。その決定的な実験をしたのはD. コフマンである。この2種の間生成物を200~315で加熱するのがナイロン生成の秘訣で、この温度で分子が重合して長い鎖になる。無色透明なナイロンの小片を溶かして液体とし、小さいノズルから噴出させるとクモの糸のような繊維になり、空中で固まる。引き伸ばすと強度が増す。かねてからカロザースに合成繊維の発見を期待していた化学部長E. ボルトンは、ただちにその商業的生産の検討に入った。カロザースはイギリス、ケンブリッジでの世界初のポリマー科学国際会議に招かれて(9月)シュタウディングラーと会い、その後ドイツの黒い森を一人で歩きまわった。化学的な合成繊維の可能性の発見と、その商品化とは全く別の事業である。かれの留守中、デュポン社では化学者と化学エンジニアを動員して、ポリアミド6-6の生産体制を組んだ(図5)。カ



図5. デュポン社は1940年末までに、デニールの大きさ、撚り、透明度、フィラメントの数の異なる1100種のナイロンを作った。

ロザースの創造的化学者としての活動は終わった。論文62篇、US特許69件。翌年、アメリカ科学アカデミー会員に選出された(1936年4月)。会員293名。うち化学者33名。カロザースはこの会員に選ばれた最初の企業内の有機化学者だった。ボルトンは言う「カロザースほど深く有機化学を読み解いたものを見たことがない」と。(図1)

カロザースは何人かの女性と交際していた。そのうちの一人シルヴィア・ムーア、“並外れた才気と色気と美貌”の女性、ただし既婚、にカロザースは深く心を奪われた。この人が正式の離婚手続きをしたころ、カロザースは新しい家を買ひ、故郷から両親を呼び寄せて同居していた。親思いの行為ではあるが、カロザースは父親に愛情がもてず、母親とはほとんど理解し合えなかったと述べてもいる。これで2年余り続いたシルヴィアとの交際は終わった(1935)。デュポン社の特許課に勤めていた平凡な、知的でない女性、ヘレン・エヴェレット・スウィートマンと結婚した(1936年2月)。友人は誰もがシルヴィアならぬさわしいが、ヘレンとカロザースとは不釣り合いと見た。そしてヘレンに好意をもたなかった。

うつ病とアルコール依存症

カロザースは成人したところから何度もうつ病に悩まされた。イリノイ大学以来の師友、アダムズやマーヴェルらは、ずっとカロザースの気分を見守り続けた。1934年、7月半ばから8月末まで、



図6. 笑顔のカロザースの写真は珍しいという(1934年8月、退院直後)。抱いているのは友人の子供。

会社には告げず突然姿を消した。これが最初で、その後しばしば失踪した。このときはボルティモアの精神科の医院に入院したのち、同僚の田舎の家に寄寓していた(図6)。1936年6月には、妻と会社の人を図ってカロザースを無理にフィラデルフィアの精神病院に入院させたが、アダムズがヨーロッパにいと聞いて、アダムズとアルプスの旅をしたいと医師に申し出て許可を取り、妻や会社には告げず、ニューヨークを出国した。ミュンヘンでアダムズと合流して、2週間ほどチロル・アルプスを歩いたあと、心配している人々のところへふらりと帰還した(9月)。

カロザースの症状は単なるうつ病ではなく、アルコール依存症でもあった。アルコール依存症とうつ病の合併症は、かれの一族の病気だった。カロザースはまがいもなくアルコール依存症で、飲めばもうろう状態になるまで飲んだ。禁酒時代(1920~1933)には密輸酒販売者から入手していた。AA(アルコール中毒者の自主治療協会)はまだほとんど知られておらず、うつ病に対する良い薬もなかった時代に苦しみぬいた。1937年4月29日、フィラデルフィアのホテルで、ずっと持ち歩いてきたシアン化物で自殺した。41歳だった。その7ヵ月後、女兒が生まれた。生涯の一大転機だったデュポン社への入社からわずか7年間ほどの間に、頻発するひどいうつ病に阻まれながら、その合間の短い、輝かしい、きわめて生産的な時期に、高分子化学の理論と合成法に大きく貢献し、合成ゴムと完全に合成的な繊維という二大産業を創始した。デュポン社は、400件の名称から「ナイロン」を選んで(現在、この名称はポリアミド系合成繊維の総称となっている)1938年10月、ニューヨーク万博で発表し、一大宣伝キャンペーンをくりひろげて、空前の商業的成功を収めた。カロザースはその名称も、その製品も見ることにはなかった。

〔主要参考文献〕

Matthew E. Hermes, *Enough for One Lifetime, Wallace Carothers, Inventor of Nylon*, American Chemical Society, 1996.; Susannah Handley, *Nylon. The Story of a Fashion Revolution*, The Johns Hopkins University Press, 1999.; Pap Ndiaye, "Industrial cultures at DuPont," *Chemical Heritage*, 14-1, (1996)

ぬれ張力試験用混合液

ぬれ性とは、フィルム表面に液体が広がる現象をいい、ぬれの程度を表す指数をぬれ張力といいます。プラスチックフィルムに塗装したり、コ-ティングを施したり、またはプラスチックフィルムを接着する場合、プラスチックフィルムがインキ、コ-ティング剤、接着剤などを保持する事が要求されます。この保持する能力を示す尺度としてぬれ張力があります。

ぬれ張力試験方法は、JIS K6768で規定されていましたが、ISO国際規格に整合させるために、ISO8296を基礎に大幅に改正されました。この改正により、試験用混合液の種類が増え、適用範囲がポリエチレン及びポリプロピレンフィルムから、プラスチックフィルム及びシート全般に拡張されました。

従来よりご利用いただいているぬれ指数標準液につきまして、JIS K6768の改正により新たにぬれ張力 22.6 ~ 30.0 及び 56.0 ~ 73.0 の 16 品種を追加し、全商品をリニューアルしぬれ張力試験用混合液として 36 品種の販売を開始しました。

(注意)色調が多少従来製品と異なりますが、より安定な着色剤を使用しており、ご使用上の問題はありません。

コ-ド No.	品 名	ぬれ張力 (23)	規 格	容 量	希望納入価格(円)
		mN/m			
235-01791	ぬれ張力試験用混合液 No.22.6	22.6	ぬれ張力試験用	50ml	2,100
238-01801	ぬれ張力試験用混合液 No.25.4	25.4	ぬれ張力試験用	50ml	2,100
235-01811	ぬれ張力試験用混合液 No.27.3	27.3	ぬれ張力試験用	50ml	2,100
232-01821	ぬれ張力試験用混合液 No.30.0	30.0	ぬれ張力試験用	50ml	2,100
239-01831	ぬれ張力試験用混合液 No.31.0	31.0	ぬれ張力試験用	50ml	2,100
236-01841	ぬれ張力試験用混合液 No.32.0	32.0	ぬれ張力試験用	50ml	2,100
233-01851	ぬれ張力試験用混合液 No.33.0	33.0	ぬれ張力試験用	50ml	2,100
230-01861	ぬれ張力試験用混合液 No.34.0	34.0	ぬれ張力試験用	50ml	2,100
237-01871	ぬれ張力試験用混合液 No.35.0	35.0	ぬれ張力試験用	50ml	2,100
234-01881	ぬれ張力試験用混合液 No.36.0	36.0	ぬれ張力試験用	50ml	2,100
231-01891	ぬれ張力試験用混合液 No.37.0	37.0	ぬれ張力試験用	50ml	2,100
234-01901	ぬれ張力試験用混合液 No.38.0	38.0	ぬれ張力試験用	50ml	2,100
231-01911	ぬれ張力試験用混合液 No.39.0	39.0	ぬれ張力試験用	50ml	2,100
238-01921	ぬれ張力試験用混合液 No.40.0	40.0	ぬれ張力試験用	50ml	2,100
235-01931	ぬれ張力試験用混合液 No.41.0	41.0	ぬれ張力試験用	50ml	2,100
232-01941	ぬれ張力試験用混合液 No.42.0	42.0	ぬれ張力試験用	50ml	2,100
239-01951	ぬれ張力試験用混合液 No.43.0	43.0	ぬれ張力試験用	50ml	2,100
236-01961	ぬれ張力試験用混合液 No.44.0	44.0	ぬれ張力試験用	50ml	2,100
233-01971	ぬれ張力試験用混合液 No.45.0	45.0	ぬれ張力試験用	50ml	2,100
230-01981	ぬれ張力試験用混合液 No.46.0	46.0	ぬれ張力試験用	50ml	2,100
237-01991	ぬれ張力試験用混合液 No.48.0	48.0	ぬれ張力試験用	50ml	2,100
234-02001	ぬれ張力試験用混合液 No.50.0	50.0	ぬれ張力試験用	50ml	2,100
231-02011	ぬれ張力試験用混合液 No.52.0	52.0	ぬれ張力試験用	50ml	2,100
238-02021	ぬれ張力試験用混合液 No.54.0	54.0	ぬれ張力試験用	50ml	2,100
235-02031	ぬれ張力試験用混合液 No.56.0	56.0	ぬれ張力試験用	50ml	2,100
232-02041	ぬれ張力試験用混合液 No.58.0	58.0	ぬれ張力試験用	50ml	2,100
239-02051	ぬれ張力試験用混合液 No.59.0	59.0	ぬれ張力試験用	50ml	2,100
236-02061	ぬれ張力試験用混合液 No.60.0	60.0	ぬれ張力試験用	50ml	2,100
233-02071	ぬれ張力試験用混合液 No.61.0	61.0	ぬれ張力試験用	50ml	2,100
230-02081	ぬれ張力試験用混合液 No.62.0	62.0	ぬれ張力試験用	50ml	2,100
237-02091	ぬれ張力試験用混合液 No.63.0	63.0	ぬれ張力試験用	50ml	2,100
230-02101	ぬれ張力試験用混合液 No.64.0	64.0	ぬれ張力試験用	50ml	2,100
237-02111	ぬれ張力試験用混合液 No.65.0	65.0	ぬれ張力試験用	50ml	2,100
234-02121	ぬれ張力試験用混合液 No.67.0	67.0	ぬれ張力試験用	50ml	2,100
231-02131	ぬれ張力試験用混合液 No.70.0	70.0	ぬれ張力試験用	50ml	2,100
238-02141	ぬれ張力試験用混合液 No.73.0	73.0	ぬれ張力試験用	50ml	2,100

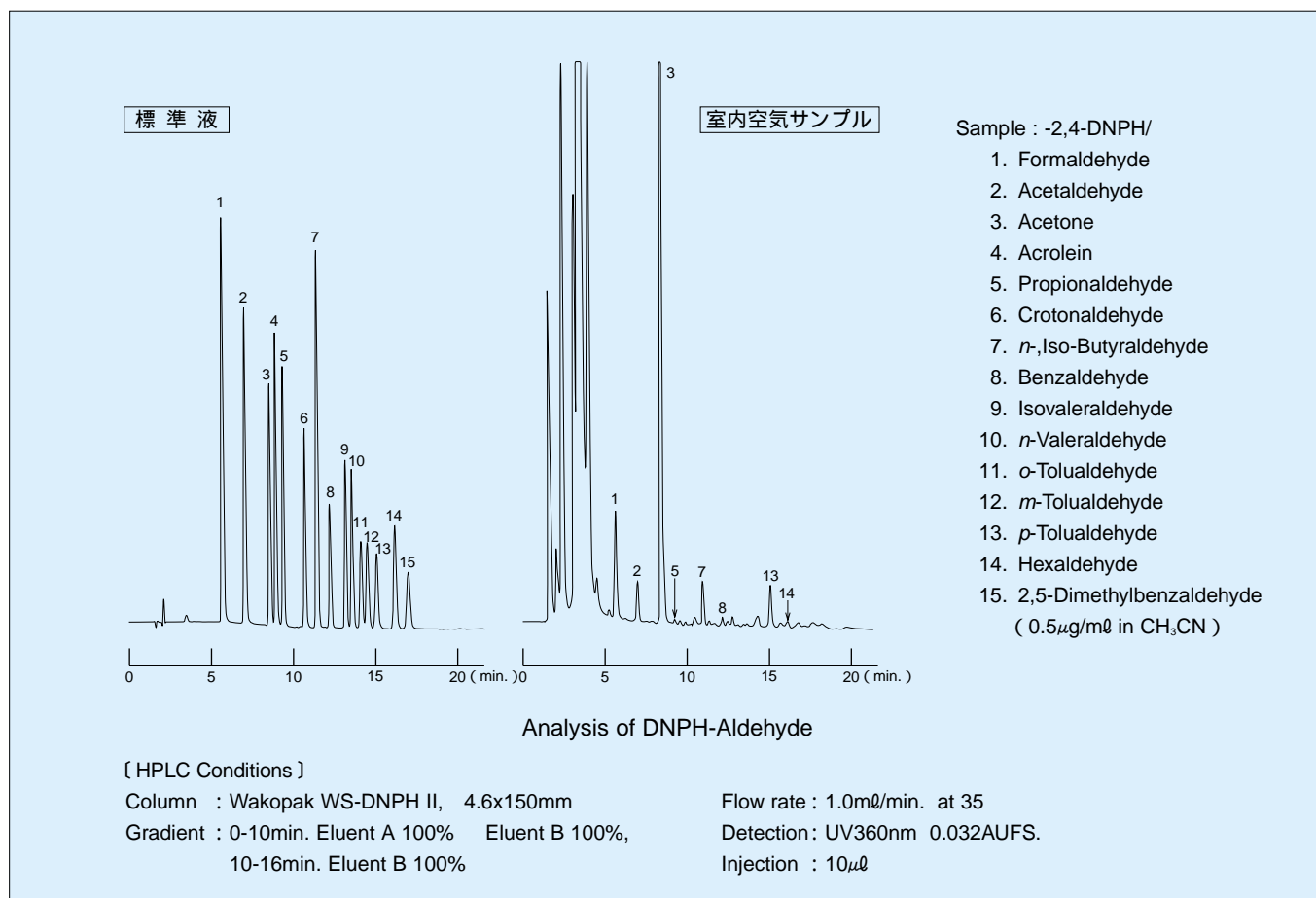
大気中のアルデヒド、ケトンの HPLC 分析(その 3)

和光純薬工業株式会社 クロマトグループ 商品開発担当 吉田貴三子

アルデヒドは有害大気汚染物質として、国内では大気汚染防止法によりホルムアルデヒド及びアセトアルデヒドの2成分が優先取組物質に指定され、また悪臭防止法によりアセトアルデヒド、プロピオンアルデヒド、*n*-ブチルアルデヒド、イソブチルアルデヒド、*n*-パレルアルデヒド、イソパレルアルデヒドの6成分が規制の対象になっています。また米国では、EPA等により15成分の測定法が示され、2,4-ジニトロフェニルヒドラゾン(DNPH)誘導体としてGCまたはHPLCにより分析されています。HPLC分析法は、GC法で必要となるさまざまな前処理操作が不要等の理由から広範に利用されています。筆者らのグループではWakopak WS-II 5C1 8RSを使用した

イソクラティック分析法、Wakopak WS-DNPH カラムと専用溶離液を用いるグラジエント分析システム、を本誌 Vol.66 No.3, No.4 に紹介してきました。グラジエント分析システムは分離が難しいDNPH-*n*-ブチルアルデヒドとDNPH-イソブチルアルデヒドを含む16成分が分離可能という特長を持っていますが、アセトン、アクロレイン、プロピオンアルデヒドのベースライン分離が難しい、分析に時間を要する、の問題を抱えていました。そこで今回、分析時間の短縮と分離の改善を目的に新分析システムの開発を行いました。以下分析例として、16種アルデヒド-DNPH 混合標準液(和光純薬製)及び室内空気をDNPH含浸シリカカートリッジカラムで誘導体化後アセ

トニトリルで溶出したサンプルのクロマトグラムを示しましたが、EPAで規制されている15成分を20分以内に分離することが可能となり、標準物質、実試料とも良好に分離し、試料由来の妨害物の影響も受けませんでした。今回開発した新分析システムは、DNPH-*n*-ブチルアルデヒドとDNPH-イソブチルアルデヒドの分離は達成されないものの、各成分ともベースライン分離が達成されしかも短時間分析が可能となっています。前回までに紹介した方法と測定目的に応じて使い分けいただければ幸いです。



HPLC 用ふっ素化シリコン修飾カラム Wakopak® Fluofix

Wakopak® Fluofix は、含ふっ素化シリコンを高純度球状シリカゲル（純度 99.99%）に修飾した充てん剤 Fluofix を高度な充てん技術によりパッキングされた HPLC 用カラムです。

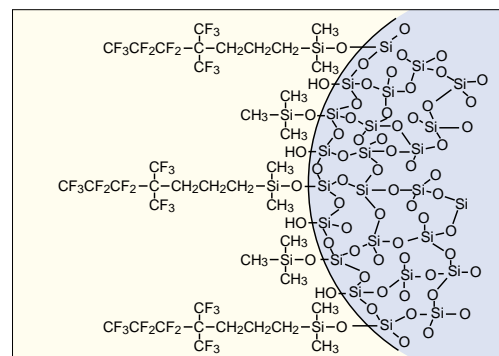
Fluofix は従来から汎用されております炭化水素系修飾充てん剤 C18、C8 等と同様の逆相分離モードを基本としていますが、含ふっ素化シリコンの強力な水 / はつ油性とその分子構造などから、分析試料によって特異的な分離挙動を示します。

* Fluofix 製品は平成 13 年 7 月 1 日より、当社が製造販売権等すべてを(株)ネオスより引き継ぎました。

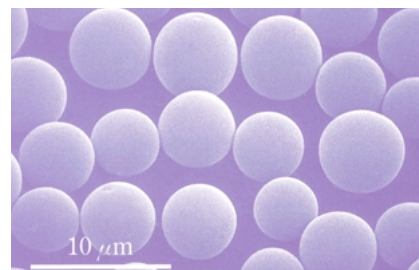
〔特長〕

ユニークな分離特性

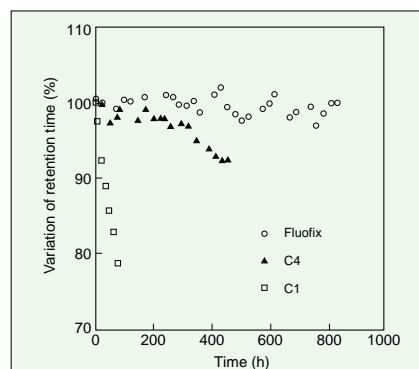
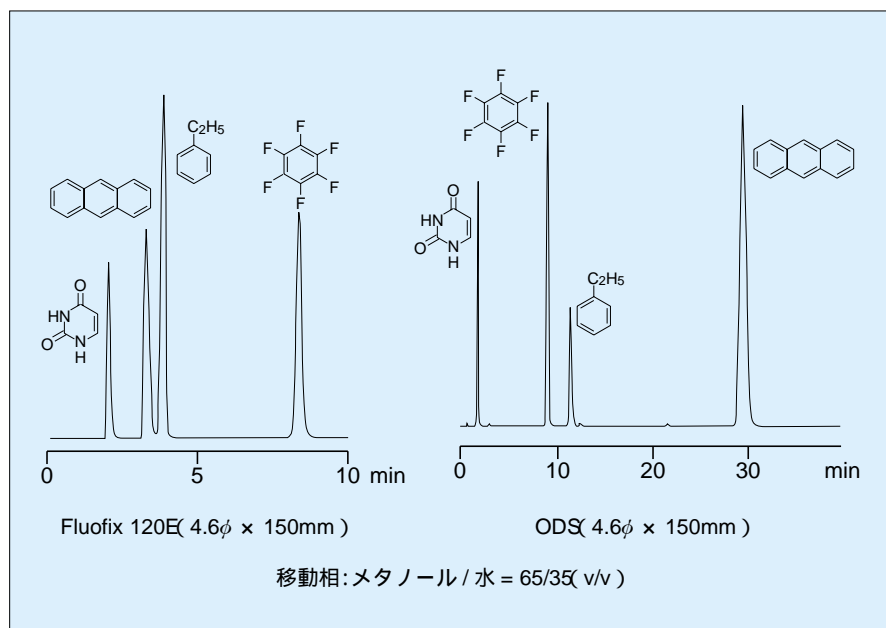
- ・ ふっ素をはじめとするハロゲン原子の認識
- ・ はつ水 / はつ油によるシャープなピーク
- ・ 剛直なフルオロカーボン鎖による構造認識
- ・ 化学的に安定なフルオロカーボンによる高耐久性
卓越した耐久性
- ・ 酸性移動相での長寿命化を実現



ふっ素化シリコン修飾模式図



高純度球状シリカゲル



〔分析条件〕
 移動相：メタノール / 0.1%TFA (pH 2.1) = 60/40 (v/v)
 流速：1ml/min
 温度：40
 サンプル：ヘキサフルオロベンゼン
 インジェクション回数：500回 / 800時間
 酸性条件下で 800 時間後も安定した性能を維持しております。
 C1、C4 カラムと比較すると十分な耐久性を有しております。

充てん剤名	カラムサイズ	接続ジョイント	容量	希望納入価格 (円)
Fluofix 120N (ノンエンドキャップタイプ、シリカ細孔径 12nm)	4.6φ × 150mm	(W)	1本	55,000
	4.6φ × 250mm		1本	69,000
Fluofix 120E (エンドキャップタイプ、シリカ細孔径 12nm)	4.6φ × 150mm	(W)	1本	55,000
	4.6φ × 250mm		1本	69,000
Fluofix 300N (ノンエンドキャップタイプ、シリカ細孔径 30nm)	4.6φ × 150mm	(W)	1本	59,000
	4.6φ × 250mm		1本	73,000
Fluofix 300E (エンドキャップタイプ、シリカ細孔径 30nm)	4.6φ × 150mm	(W)	1本	59,000
	4.6φ × 250mm		1本	73,000

* 上記以外のカラムサイズについては別途お問合せ下さい。

*(W): ウォーターズタイプ

酢酸、ギ酸、りん酸

HPLC 用

本品は低吸光度・蛍光であることを保証しており、HPLC 分析に最適です。

〔規格(りん酸)〕

試験項目	規格値
外 観	無色澄明の液体
吸光度(1 4)	220nm : 0.03 以下 240nm : 0.02 以下 254nm : 0.02 以下 300 ~ 400nm : 0.01 以下
蛍光試験	試験適合
水 溶 状	試験適合
含 量	85.0% 以上

コード No.	品 名	規 格	容 量	希望納入価格(円)
010-19112	Acetic Acid	高速液体クロマトグラフ用	25ml	3,000
063-04192	Formic Acid	高速液体クロマトグラフ用	25ml	照 会
162-20492	Phosphoric Acid	高速液体クロマトグラフ用	25ml	3,000

18ℓ キャニスター缶 大入包装品目追加!!

脱水溶媒

有機合成用

ご好評頂いております、脱水溶媒 18ℓ 大入包装シリーズにアセトニトリル、テトラヒドロフラン(安定剤不含)の二品目を追加しました。

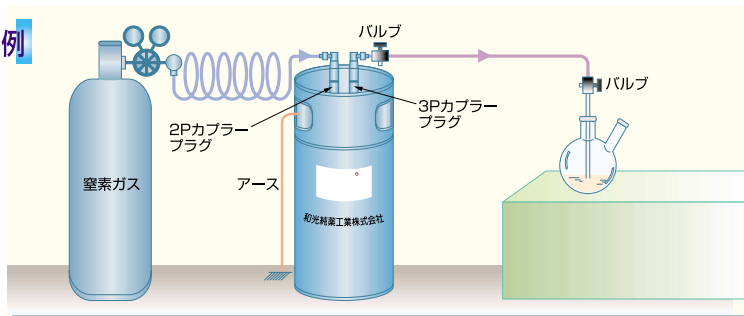
配管に必要な部品も用意しています。当社代理店または当社営業へお問合せ下さい。

〔18ℓ キャニスター缶包装の特色〕

1. 安定した品質 (SUS 密閉容器を使用)
2. 廃棄ピン ゼロ (空容器は回収します)
3. 低価格 (大入包装のため、低価格です)
4. 省スペース (スリム缶を使用、場所を取りません)



配管例



コード No.	品 名	水分含量	容 量	希望納入価格(円)
NEW 019-15547	Acetonitrile, Dehydrated	50ppm 以下	18ℓ	照 会
040-25507	Dichloromethane, Dehydrated	30ppm 以下	18ℓ	照 会
047-25497	Diethyl Ether, Dehydrated	50ppm 以下	18ℓ	照 会
043-25477	N,N-Dimethylformamide, Dehydrated	50ppm 以下	18ℓ	照 会
208-13437	Tetrahydrofuran, Dehydrated(BHT0.03%)	50ppm 以下	18ℓ	照 会
NEW 209-13967	Tetrahydrofuran, Dehydrated(no Stabilizer)	50ppm 以下	18ℓ	照 会
205-13447	Toluene, Dehydrated	30ppm 以下	18ℓ	照 会

* 希望納入価格につきましては、当社代理店または当社営業までお問合せ下さい。*

100ml, 500ml, 3ℓ 包装もございます。ご照会下さい。

けいそう土、荷電型

試料前処理用

本品は、表面にゼータ電位を付加したけいそう土です。けいそう土本来のろ過助剤としての性能に加え、プラスの電荷をもつことにより電気的な吸着力を有することから、エンドトキシン、マイナス電荷の微粒子、微生物などの除去に効果的です。

コード No.	品名	規格	容量	希望納入価格(円)
046-28181	Diatomaceous Earth, Charged	試料前処理用	100g	3,300

〔関連商品〕

粒子径 0.5 ~ 1.5mm の顆粒状けいそう土です。

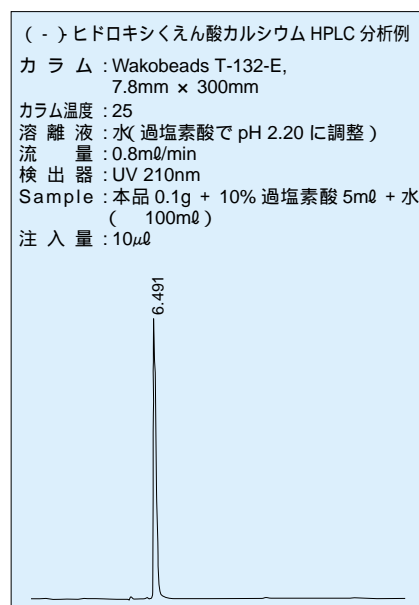
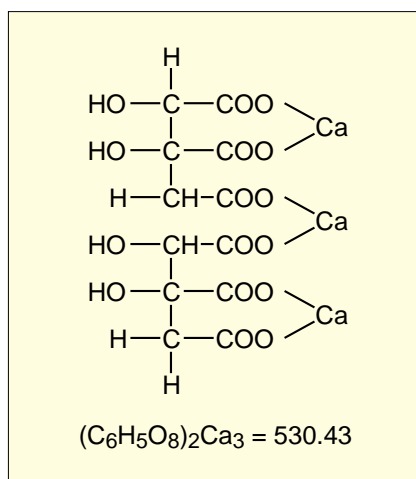
コード No.	品名	規格	容量	希望納入価格(円)
042-28281	Diatomaceous Earth, Granular	試料前処理用	100g	3,200
048-28283			1kg	15,000

食品分析用試薬

(-) ヒドロキシクエン酸カルシウム標準品

栄養補助食品について、医薬品に準じて栄養成分の規格・栄養機能等の表示の基準を定めていくように制度整備が進められています。

(-) ヒドロキシクエン酸(別名: HCA)は肥満予防としてダイエット食品に汎用されているガルシニアエキスの有効成分です。日本健康・栄養食品協会では、ガルシニアエキス食品の規格基準を定め、有効成分である(-)ヒドロキシクエン酸カルシウムを指標としています。



〔規格〕

外観: 白色粉末

含量(HPLC): 98.0% 以上

コード No.	品名【別名】	規格	容量	希望納入価格(円)
084-07821	(-)Hydroxycitric Acid Calcium Salt Standard 【HCA Calcium Salt】	高速液体クロマトグラフ用	200mg	7,000

Artepillin C, from Propolis

生化学用

アルテピリン C は健康食品プロポリス中に含まれる生理活性物質で、抗酸化作用、抗がん作用等が報告されています。

〔規格〕

含量(HPLC): 98.0% 以上

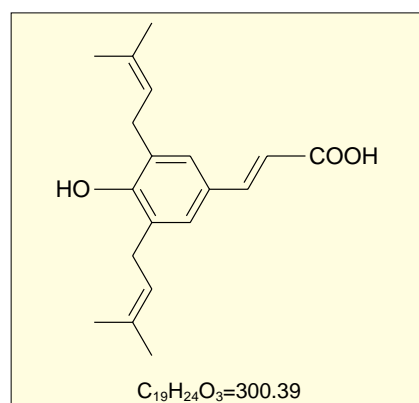
メタノール溶状: 全溶

〔保存条件〕

不活性ガス封入・2 ~ 10 °C 遮光保存

〔参考文献〕

- 1) Hayashi, K., Komura, S., Isaji, N., Ohishi, N. and Yagi, K.: *Chem. Pharm. Bull.*, 47, 1521 (1999)
- 2) Aga, H., Shibuya, T., Sugimoto, T., Kurimoto, M. and Nakajima, S.: *Biosci. Biotech. Biochem.*, 58, 945 (1994)



016-19131	10mg	26,000 円
-----------	------	----------

ダイオキシン類分析用「多層シリカゲルカラム」作製に！ 2品目追加

ワコーゲル DX 硫酸ナトリウム

ダイオキシン類分析の各種マニュアル、ガイドライン、JIS (K0311、K0312) 等に、多層シリカゲルカラムクロマトグラフィによる試料のクリーンアップ法が記載されています。当社では従来より多層カラム用化学修飾シリカゲルを発売しておりましたが、この度、多層カラムに最適なワコーゲル DX(シリカゲル)と硫酸ナトリウムを新発売しました。

本品は、ダイオキシン類分析適合性試験を実施し、ダイオキシン類が低濃度である事を保証した商品です。化学修飾シリカゲルと一緒に「多層シリカゲルカラム」の作製にお使い下さい。

ワコーゲル DX は粒度が 75 ~ 150 μ m のため、カラム目詰まりせずにサンプルを精製する事ができます。ダイオキシン類を保証したシリカゲルですが、ご使用の際には各種分析マニュアルにそってご使用下さい。

〔ダイオキシン類分析適合性試験〕

項目	ワコーゲル DX	硫酸ナトリウム
ダイオキシン(4 ~ 7 塩素化物)	5pg/10g 以下	1pg/10g 以下
ダイオキシン(8 塩素化物)	10pg/10g 以下	5pg/10g 以下
ジベンゾフラン(4 ~ 7 塩素化物)	5pg/10g 以下	1pg/10g 以下
ジベンゾフラン(8 塩素化物)	10pg/10g 以下	5pg/10g 以下
コプラナー PCB ノンオルト(4 ~ 6 塩素化物)、モノオルト(5 ~ 7 塩素化物)	10pg/10g 以下	5pg/10g 以下

コード No.	品名	規格	容量	希望納入価格(円)
238-01781	Wakogel DX(Silica Gel)	ダイオキシン類分析用	100g	6,500
194-12221	Sodium Sulfate	ダイオキシン類分析用	250g	3,400

〔関連商品〕

コード No.	品名	規格	容量	希望納入価格(円)
167-19251	2% Potassium Hydroxide-impregnated Silica Gel	ダイオキシン類分析用	100g	17,000
197-11611	10% Silver Nitrate-impregnated Silica Gel	ダイオキシン類分析用	100g	17,000
191-11631	44% Sulfuric Acid-impregnated Silica Gel	ダイオキシン類分析用	100g	17,000
194-11621	22% Sulfuric Acid-impregnated Silica Gel	ダイオキシン類分析用	100g	17,000

ダイオキシン類分析用溶媒 Nonane

ダイオキシン類を保証したノナンです。分析試料調製に安心してお使い頂けます。

148-07351	2ml × 5	9,500 円
142-07354	100ml	照 会

〔品質保証値〕

ダイオキシン類	4 ~ 7 塩素化物	5fg/ μ l 以下(5ppt 以下)
	8 塩素化物	10fg/ μ l 以下(10ppt 以下)
ジベンゾフラン	4 ~ 7 塩素化物	5fg/ μ l 以下(5ppt 以下)
	8 塩素化物	10fg/ μ l 以下(10ppt 以下)
コプラナー PCB		5fg/ μ l 以下(5ppt 以下)

農薬標準品 追加3品目！

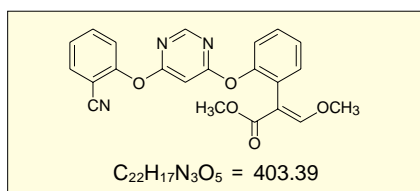
Azoxystrobin Standard

残留農薬試験用

外 観：白色粉末

溶解性(20)：水 0.006g/l、ヘキサン 0.057g/l、オクタン-1-オール 1.4g/l、メタノール 20g/l、アセトン 86g/l、アセトニトリル 340g/l、ジクロロメタン 400g/l

CAS No. : 131860-33-8



019-19001 200mg 15,000 円

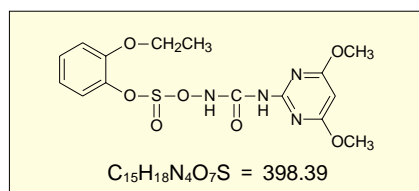
Ethoxysulfuron Standard

残留農薬試験用

外 観：白色粉末

溶解性(20)：水 10.5mg/l、アセトン 36g/l、酢酸エチル 14.1g/l、メタノール 7.7g/l、ジクロロメタン 107g/l、*n*-ヘキサン 0.006g/l、ジメチルスルホキシド > 500g/l、トルエン 2.5g/l

CAS No. : 126801-58-9



054-06821 50mg 14,000 円

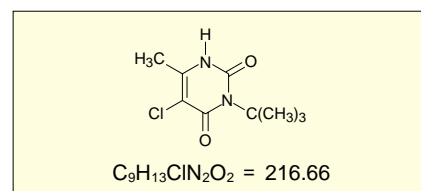
Terbacil Standard

残留農薬試験用

外 観：白色結晶性粉末

溶解性(25)：水 710ppm、ジメチルホルムアミド 33.7g/100g、シクロヘキサン 22.0g/100g、メチルイソブチルケトン 13.8g/100g、ブチルアセテート 9.7g/100g、キシレン 6.5g/100g

CAS No. : 5902-51-2



209-15341 200mg 12,000 円

水中の大腸菌群・E.coli 検査試薬 AquaTest

財団法人 東京顕微鏡院 立川研究所 山縣 文夫

上水(飲料水)が飲用に適当であるか否かの判断基準の一つに大腸菌群の有無があります。水道法には水質基準項目として46項目が定められていますが、最も重視される10項目(省略不可項目)には微生物学的な指標が2つ含まれています。一つは生菌数、もう一つが大腸菌群です。水質基準では大腸菌群は検出されてはならないとされています。一般に大腸菌群とは「グラム陰性、無芽胞の桿菌で、乳糖を分解して酸とガスを産生する好気性または通性嫌気性の菌」と定義されています。これを検査する方法としてLB-BGLB法が長年使われてきています。この方法では最終的に結果が確定するまでに4~7日を要する場合もあり、直ぐにでも結果が必要な場合には大きな問題となります。このため、1992年に特定酵素基質培地法が追加採用されましたが、ここでいう方法とはMMO-MUG法に限定されています。

大腸菌群を構成する細菌はβ-ガラクトシダーゼを共通して産生するため、培地を構成するONPG(ο-ニトロフェニル-β-D-ガラクトピラノシド)を分解して黄色のο-ニトロフェノールを産生します。さらに大腸菌にはβ-グルクロニダーゼが存在するためMUG(4-メチルウンベリフェリル-β-D-グルクロニド)を分解して、青紫色の蛍光を発生します。MMO-MUG法では培地を構成する「ソラニウム」を入手することができないため、我々が培地を自ら作製

することはできませんし、市販品は他の方法に比べてかなり高価です。このため、1993年に上水試験法にこの方法が収載された後も、その迅速性や簡便性に関わらず、従来のLB-BGLBが検査の主流であり続けました。

一方で食品検査などでは大腸菌群の検出にβ-ガラクトシダーゼの基質として、X-GAL(5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリル-β-D-ガラクトピラノシド)を添加した培地が汎用されています。このX-GALと大腸菌検出用のMUGで構成された上水試験用の培地の一つがXM-10です。今年改訂された上水試験法では、XM-10をはじめ4社のX-GAL・MUG法にもとづく特定酵素基質培地が新たに収載されました。

今回、XM-10は組成をさらに改良して損傷を受けている菌の発育支持能力を高めた、AquaTest 10となりました。

図1、2に大腸菌群を構成する代表的な菌、*E. cloacae*と*K. pneumoniae*の標準菌株から調製した菌液での試験結果を示します。菌の濃度はおよそ

10²個/mlですが、菌に損傷を与えるために約0.15mg/lの塩素で0~300秒処理してあります。塩素処理時間の延長にしたがって陽性管数はいずれの培地でも減少しますが、AquaTest 10はMMO-MUGとほぼ同じ挙動を示しました。

また、水道の原水となる河川水5種を用いての検討結果を表1に示します。180秒の塩素処理の前後で各試料2回ずつ測定し、5本法で求めたMPNで表しました。試料により各方法での数値が上下しますが、MMO-MUGと比べて2回の測定がともに1桁以上数値が乖離するケースはなく、この2法で得られる結果に有意差はないと考えられます。

X-GALを基質に用いる培地では、呈色が青色であるためMMO-MUGと異なり試料が持つ背景色の影響を受け難い特徴があります。また、AquaTest 10では大腸菌による蛍光を検出する能力に優れていることが示唆されています。詳しくは次号をご覧ください。

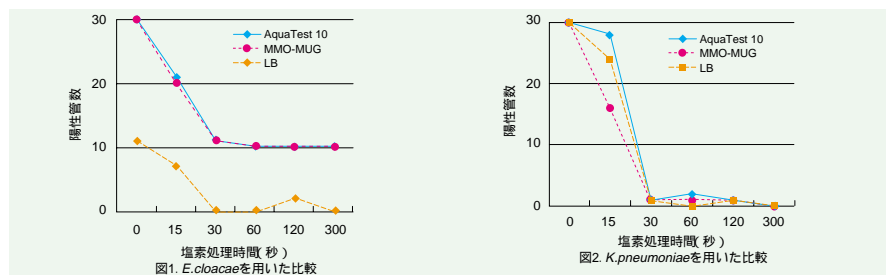


図1、2 *E. cloacae*と*K. pneumoniae*の約10²個/mlの菌液をAquaTest 10、MMO-MUG、LBの各培地30本に10mlずつ投入し、37~24時間後(LBは48時間後)に陽性となった培地数を表す。横軸は菌を約0.15mg/lの濃度の塩素で処理した時間を表す。

表1.5種の河川水を用い、塩素処理180秒の前後について5本法によるMPNを求めた。判定は37~24時間後(LBは48時間後)に行なった。測定は各試料につき2回ずつ行ない、残留遊離塩素濃度はおよそ0.2mg/lに調整した。

試料番号	試料1				試料2				試料3				試料4				試料5			
	塩素処理前		塩素処理後		塩素処理前		塩素処理後		塩素処理前		塩素処理後		塩素処理前		塩素処理後		塩素処理前		塩素処理後	
培地種	1回目	2回目	1回目	2回目	1回目	2回目	1回目	2回目	1回目	2回目	1回目	2回目	1回目	2回目	1回目	2回目	1回目	2回目	1回目	2回目
AquaTest 10	11	22	1.8	1.8	24000	14000	46	13	170	350	22	64	120	24	3.6	4	540	7000	2	24
MMO-MUG	22	14	1.8	1.8	3300	4900	46	130	920	540	540	540	540	350	13	23	79	170	2	6.8
LB	2	1.8	1.8	1.8	49	240	23	13	33	79	33	23	13	1.8	1.8	1.8	7.8	20	1.8	1.8

ELMEX 水中の大腸菌群・E. coli 検査用培地 (XGal-MUG培地(ピルビン酸ナトリウム添加))

コードNo.	メーカーコード	品名	容量	希望納入価格(円)
305-09421	AT-10	AquaTest 10	(10ml用×10本)×20	28,000
302-09431	AT-50	AquaTest 50	(50ml用×10本)×10	40,000

サンプルご希望の方は、資料請求カードにてお申込み下さい。

横河全窒素全りん測定装置専用試薬

従来、閉鎖性の高い海域や、水の循環の悪い湖沼では、富栄養化の防止を目的として、排水中の化学的酸素要求量 (COD) について総量規制が行われてきました。しかし、現在でも赤潮や青潮が発生するなどなお一層の水質改善が求められております。このため、平成 13 年度より実施が予定されている第 5 次総量規制では、COD に加えて全窒素及び全りんの総量が規制される見通しです。

横河 NP1000 及び NP500 全窒素全りん測定装置用試薬は横河電機 株 製 NP1000 全窒素全りん自動測定装置及び NP500 全窒素全りん自動測定装置に最適な専用試薬です。横河 NP1000 専用試薬は簡単な調液をしていただいた後、装置にそのままセットしてご使用いただけます。また、横河 NP500 専用試薬はすべて調液済みの試薬ですので、そのまま装置の試薬専用タンクに移してご使用いただけます。

* 試薬の種類及び使用方法等詳細につきましてはお問合せ下さい。

横河 NP1000 全窒素全りん測定装置用

コ - ド No.	品 名	容 量	希望納入価格(円)
033-18587	キャリア液	20ℓ	9,000
187-01747	反応液 1	10ℓ	8,000
184-01757	反応液 2	10ℓ	8,000
181-01767	反応液 3	20ℓ	16,000
188-01777	反応液 4	19.5ℓ	6,000
162-20637	0.04mol/ℓ ペルオキシソ硫酸カリウム溶液	10ℓ	15,000
019-19165	0.6mol/ℓ L(+) アスコルビン酸溶液	500mℓ	5,000

横河 NP500 全窒素全りん測定装置用

コ - ド No.	品 名	容 量	希望納入価格(円)
143-07421	NP500 A 液	6ℓ	13,000
140-07431	NP500 B 液	1ℓ	3,500
147-07441	NP500 C 液	3ℓ	4,000
144-07451	NP500 D 液	1ℓ	4,000
141-07461	NP500 E 液	1ℓ	5,000
148-07471	NP500 F 液	1ℓ	2,500

〔関連商品〕

コ - ド No.	品 名	内 容	規 格	容 量	希望納入価格(円)
147-07321	窒素標準液 N:1,000mg/ℓ	処方:KNO ₃ in water	排水試験用	50mℓ	3,500
160-19241	りん標準液 P:1,000mg/ℓ	処方:KH ₂ PO ₄ in water	水質試験用	50mℓ	3,700

完全長 cDNA の回収率を向上

ReverScript II [MMLV Reverse Transcriptase, RNaseH⁻]

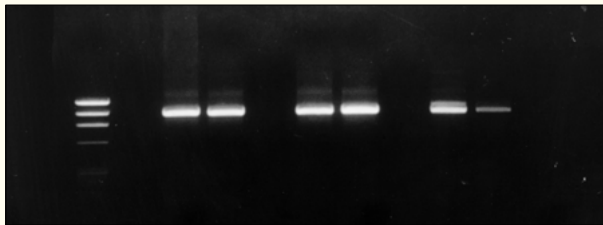
遺伝子研究用

本酵素は *Moloney murine leukemia virus* の RNA 依存性 DNA ポリメラーゼで、遺伝子工学的修飾によりポリメラーゼの最適な機能を保持したまま RNaseH 活性を不活化し、*E. coli* で発現したものです。37-55 の範囲で反応が可能であり、完全長 cDNA の回収率を増加させます。

〔応用例 1: 反応温度の影響〕

マウス腎臓 totalRNA をテンプレートとして、GAPDH (1,041bp) を各反応温度で転写後、PCR を行った。

(42) (50) (55)
M4 本品 A社 本品 A社 本品 A社



1% アガロース

GAPDH: Glyceraldehyde-3-phosphate Dehydrogenase
M4: Marker4 (φX174/HaeIII digest: コード No. 315-00664)

〔応用例 2: 長鎖サンプルの検出〕

マウス腎臓 totalRNA をテンプレートとして、Insulin receptor (3,875 bp)、Insulin like growth factor receptor (8,210 bp) 及び dynein (13,603 bp) 断片の RT-PCR を行った (リバースクリプトの反応温度 42)。

IR IGF IIR M3 dynein M1 M3



0.8% アガロース

IR: Insulin receptor
IGF IIR: Insulin like growth factor II receptor
M1: Marker1 (λ/Hind III digest: コード No. 316-00454)
M3: Marker3 (λ/Hind III + λ/EcoR I digest mixture: コード No. 316-00574)

形 状 : 50mmol/ℓ Tris-HCl (pH 7.5)
200mmol/ℓ NaCl, 0.1mmol/ℓ EDTA, 1mmol/ℓ DTT,
0.1% TritonX-100, 50% Glycerol

活 性 : ラベルに記載

単位の定義 : テンプレートプライマーとして poly(A)・oligo(dT) を用い、37 10 分間に 1nmol の dTTP を酸不溶性画分に取り込ませる酵素量を 1unit とする。

本品には 10 × Reaction Buffer (500μℓ) と 100mmol/ℓ DTT Solution (500 μℓ) が添付されています。

(備考)* 10 × Reaction Buffer の組成
500mmol/ℓ Tris-HCl (pH 8.3)
400mmol/ℓ KCl, 70mmol/ℓ MgCl₂

187-01781 10,000 units 25,000 円

強力な RNase 阻害剤 [RNase Inhibitor, (Super)] を含んだ RNA ポリメラーゼ

SP6 RNA Polymerase with RNase Inhibitor, (Super)

T3 RNA Polymerase with RNase Inhibitor, (Super)

T7 RNA Polymerase with RNase Inhibitor, (Super)

遺伝子研究用

多種の RNase を阻害する RNase 阻害剤 (スーパー) を含む SP6, T3, T7 RNA ポリメラーゼです (阻害効果は下表参照)。RNase 阻害剤 (スーパー) を含んでいるため、RNase のコンタミ等影響を受けずにノーザンハイブリダイゼーション用 RNA プローブ他の作製が可能です。

活性 : 約 20units/ μ l (ロット毎に実測値表示)
 単位の定義 : 37、60 分で不溶性物質中にヌクレオチド三リン酸 1nmol を取込むのに必要な酵素量を 1unit とする。

形状 : 20mmol/l リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.7), 100 mmol/l NaCl, 1mmol/l EDTA, 1.0% CHAPS, 10 mmol/l DTT, 50% グリセロール (v/v), RNase 阻害剤 (スーパー) 0.5 unit/ μ l

コード No.	品名	規格	容量	希望納入価格 (円)
548-01591	SP6 RNA Polymerase with RNase Inhibitor, (Super)	遺伝子研究用	1,000 units	16,000
541-01601	T3 RNA Polymerase with RNase Inhibitor, (Super)	遺伝子研究用	1,000 units	9,000
548-01611	T7 RNA Polymerase with RNase Inhibitor, (Super)	遺伝子研究用	5,000 units	15,000

各商品には 10 × Reaction Buffer 添付

[関連商品]

RNase Inhibitor, (Super)

コード No.	品名	規格	容量	希望納入価格 (円)
543-01301	RNase Inhibitor, (Super)	遺伝子研究用	2,500units	14,000
549-01303			10,000units	36,000

[RNase Inhibitor, (Super) 他の阻害比較]

コード No. 阻害剤名	RNase A	RNase B	RNase C	RNase	RNase T1	RNase T2	RNase H	RNase S	
本品							未確認	×	未確認
189-00761 RNase Inhibitor, Human Placenta		未確認	未確認	×	×	未確認	未確認	未確認	
547-00601, 543-00603 RNase Inhibitor, Human Placenta, recombinant		未確認	未確認	×	×	未確認	未確認	未確認	
542-00911 RNase Inhibitor (Antibody)				×	×	×	×	未確認	

: 阻害効果有り × : 阻害効果無し

(備考) 上記 RNase 以外に RNase , RNase CL , RNase D , RNase P , RNase U2 が知られているが、阻害効果は未確認。

100bp DNA Step Ladder (100-1.5kbp)

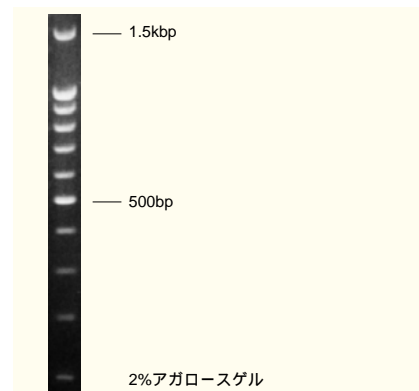
遺伝子研究用

本品は、100, 200, 286, 400, 500, 600, 717, 800, 900, 1.0k, 1.5k 塩基の 11 本のラダーです。2.0% アガロースに添加し、EtBr 等で染色する事によりクリアなバンドを観察する事ができます。特に 500bp のバンドを倍の濃さになるよう調製しています。

性状 : 10mmol/l Tris-HCl (pH 8.0), 1mmol/l EDTA, 100 mmol/l NaCl

* 本品には、6 × Loading Dye (30% Glycerol, 30mmol/l EDTA, 0.03% Bromophenol Blue, 0.03% Xylene Cyanol) が添付されています。

546-01651 30 μ g 14,000 円



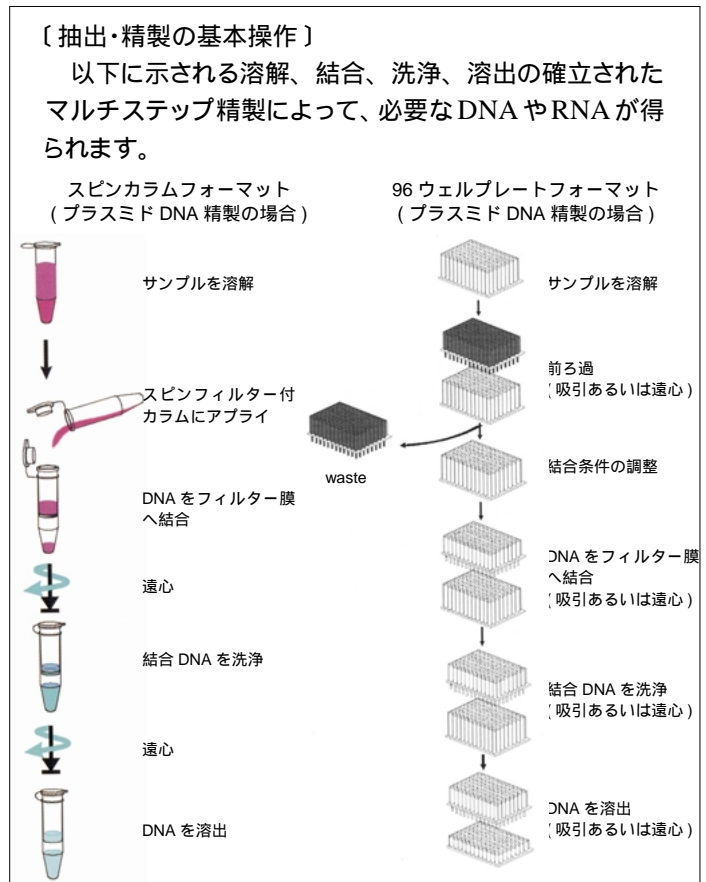
プラスミド DNA・PCR 産物・RNA の精製 , アガロースゲル DNA の回収に

Invitek Invitek 社の安価な高性能核酸抽出・精製キット
Gesellschaft für Biotechnik & Biodesign mbH

Invitek 社が提供する Invisorb™ ACNAE(Anti-Chaotropic Nucleic Acid Extraction)技術は、カオトロピック塩を使用しない新しい核酸抽出法です。血液、組織あるいは糞便のような、複雑な生物サンプルからでも抽出可能で、最適化された条件下で、シリカなどの修飾担体へ核酸を結合させます。また、専用の修飾担体を使い分けることにより、異なる種類の核酸の選択的結合が実現可能になりました。

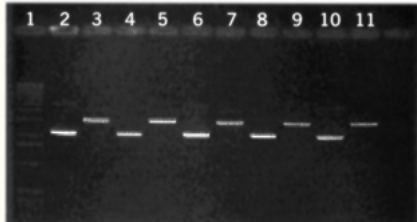
〔特長〕

- スピncラム法、吸引法、バッチ法、96 ウェルプレート法による抽出・精製法
- カオトロピック塩非存在下で、修飾された担体に核酸を結合
- 最適化されたバッファーにより核酸結合の選択性が高い
- 核酸を含むすべてのサンプルから抽出・精製可能
- 短時間で簡単な操作
- 再現性よく高回収率で抽出・精製
- コンタミ物質を完全に除去
- 毒物・有機溶媒非使用の安全な手法
- DNase 消化なしで RNA を精製



製品内容の詳細については、Invitek 社カタログをご覧ください。

〔 Invisorb™ Spin Plasmid Mini Kit を用いたプラスミド DNA の精製 〕



Invisorb™ Spin Plasmid Mini Kit を用いてプラスミド DNA (vector pGEM、 in *E. coli* strain DH5) を精製した後、*Hind* III で消化した。

レーン 1 : 1kbp ラダーマーカー
 レーン 2, 4, 6, 8, 10 : 消化していないプラスミド DNA
 レーン 3, 5, 7, 9, 11 : *Hind* III で消化したプラスミド DNA

制限酵素処理はそれぞれ 1μg のプラスミド DNA を用いて行った。
 消化及び未消化の DNA を、1% TAE アガロースゲル電気泳動により分析した。

コード No.	メーカーコード	品名	包装	希望納入価格(円)	適用サンプル
---------	---------	----	----	-----------	--------

シングルチューブ(スピncラム法/吸引法/バッチ法)
 プラスミド DNA の抽出・精製

プラスミドキット					
504-32423	10101103	Invisorb™ Spin Plasmid Mini Kit	50 回分	9,000	バクテリア培養液 0.5-2.0mℓ
502-32424	10101104		250 回分	33,500	
501-32433	10101202	Invisorb™ Plasmid Midi Kit (Vacuum Format)	24 回分	28,000	バクテリア培養液 (高コピー) 10-25mℓ バクテリア培養液 (低コピー) 100mℓ 別売の Invisorb™ 96 Vacuum Manifold が必要
508-32443	10101302	Invisorb™ Plasmid Maxi Kit (Vacuum Format)	12 回分	18,000	バクテリア培養液 (高コピー) 100mℓ バクテリア培養液 (低コピー) 250mℓ 別売の Invisorb™ 96 Vacuum Manifold が必要

DNA 断片の抽出・精製

PCR 産物精製キット					
505-32453	10202003	Invisorb™ Spin PCRapid Kit	50 回分	10,000	PCR 産物 , 酵素反応液 100μℓ
503-32454	10202004		250 回分	36,000	

ゲル DNA 抽出キット					
502-32463	10201102	Invisorb™ Spin DNA Extraction Kit	50 回分	10,000	TAE/TBE アガロースゲル 400mg
500-32464	10201103		250 回分	36,000	
509-32473	10201002	Invisorb™ DNA Extraction Kit (Batch Format)	100 回分	13,500	TAE/TBE アガロースゲル 400mg
507-32474	10201003		250 回分	23,500	

〔次頁へ続く〕

コード No.	メーカーコード	品名	包装	希望納入価格(円)	適用サンプル
---------	---------	----	----	-----------	--------

ゲノム DNA の抽出・精製

全血キット					
506-32483	10311002	Invisorb™ Spin Blood Mini Kit	50 回分	17,000	新鮮・凍結・乾燥全血,血清,パフィーコート 1-200μl
504-32484	10311003		250 回分	60,000	
503-32493	10311103	Invisorb™ Spin Blood Midi Kit	50 回分	35,000	新鮮・凍結・乾燥全血,血清,パフィーコート 200μl-2ml
501-32494	10311104		250 回分	157,000	
506-32503	10311202	Invisorb™ Spin Blood Maxi Kit	25 回分	35,000	新鮮・凍結・乾燥全血,血清,パフィーコート 1-10ml
504-32504	10311203		50 回分	63,000	
503-32513	10311302	Invisorb™ Blood Giga Kit (Batch Format)	50 回分	54,000	新鮮・凍結・乾燥全血,血清,パフィーコート 5-20ml
501-32514	10311303		100 回分	97,000	
動物組織キット					
500-32523	10321002	Invisorb™ Spin Tissue Mini Kit	50 回分	15,000	新鮮・凍結動物組織,マウスの尾,パラフィン包埋組織 1-40mg
508-32524	10321003		250 回分	67,000	
507-32533	10321102	Invisorb™ Spin Tissue Midi Kit	25 回分	25,000	新鮮・凍結動物組織,マウスの尾,パラフィン包埋組織 30-100mg
505-32534	10321103		50 回分	45,000	
細胞キット					
504-32543	10331003	Invisorb™ Spin Cell Mini Kit	50 回分	15,000	培養細胞,新鮮・凍結酵母,バクテリア 2×10 ⁶ 個 血漿,血清 100μl
502-32544	10331004		250 回分	67,000	
植物組織キット					
501-32553	10371002	Invisorb™ Spin Plant Mini Kit	50 回分	16,000	新鮮・凍結植物組織 100mg(湿重量) 乾燥植物組織 60mg
509-32554	10371003		250 回分	73,500	
508-32563	10371102	Invisorb™ Spin Plant Midi Kit	25 回分	25,000	新鮮・凍結植物組織 500mg(湿重量) 乾燥植物組織 300mg
506-32564	10371103		50 回分	45,000	
食物キット(動物性 & 植物性)					
505-32573	10361002	Invisorb™ Spin Food Kit I	50 回分	17,000	動物性の新鮮・加工・保存食品 40mg
503-32574	10361003		250 回分	67,000	
502-32583	10361102	Invisorb™ Spin Food Kit II	50 回分	22,000	植物性の新鮮・加工・保存食品 40mg
500-32584	10361103		250 回分	73,500	
糞便 DNA キット					
509-32593	10381002	Invisorb™ Spin Stool DNA Kit	50 回分	25,000	新鮮・凍結糞便 200-300mg
507-32594	10381003		250 回分	110,000	
スワブキット					
502-32603	10351002	Invisorb™ Spin Swab Kit	50 回分	17,500	スワブ(口内,鼻内,咽頭,目) 2×10 ⁵ 個細胞 唾液 100μl
500-32604	10351003		250 回分	67,000	
ゲノム DNA キット(組織 & 細胞)					
509-32613	10321202	Invisorb™ Genomic DNA Kit II (Batch Format)	25 回分	9,000	新鮮・凍結動物組織,マウスの尾,パラフィン包埋組織 0.5-40mg
507-32614	10321203		100 回分	25,000	
506-32623	10331102	Invisorb™ Genomic DNA Kit III (Batch Format)	25 回分	9,000	培養細胞,新鮮・凍結酵母,バクテリア 2×10 ⁶ 個 血漿,血清 100μl
504-32624	10331103		100 回分	25,000	
500-32626	10331104		250 回分	50,000	
法医学キット					
503-32633	10341002	Invisorb™ Forensic Kit (Batch Format)	50 回分	22,000	法医学的サンプル(血痕,歯,骨,毛根,精子,チューインガム,切手など)
501-32634	10341003		100 回分	39,500	

ゲノム DNA / Total RNA の並行抽出・精製

細胞 DNA/RNA 並行分離キット					
500-32643	10704002	Invisorb™ TwinSpin Cell Mini Kit	50 回分	29,500	新鮮培養細胞 1×10 ⁶ 個
508-32644	10704003		250 回分	118,000	
507-32653	10703002	Invisorb™ TwinPrep DNA/RNA Kit (Batch Format)	25 回分	14,500	新鮮培養細胞 5×10 ⁶ 個 新鮮動物組織 50mg
505-32654	10703003		50 回分	26,000	

Total RNA の抽出・精製

細胞 RNA キット					
504-32663	10605002	Invisorb™ Spin Cell RNA Mini Kit	50 回分	22,000	新鮮培養細胞 1×10 ⁷ 個 新鮮酵母 1×10 ⁹ 個,バクテリア 5×10 ⁷ 個
502-32664	10605003		250 回分	94,000	
501-32673	10605102	Invisorb™ Spin Cell RNA Midi Kit	25 回分	35,000	新鮮培養細胞 2.5×10 ⁷ -1×10 ⁸ 個 新鮮酵母,バクテリア
植物 RNA キット					
508-32683	10608002	Invisorb™ Spin Plant RNA Mini Kit	25 回分	14,500	新鮮植物組織 100mg 新鮮植物細胞,糸状菌 1×10 ⁷ 個
506-32684	10608003		50 回分	26,500	
RNA キット					
505-32693	10601003	Invisorb™ RNA Kit I (Batch Format)	50 回分	13,000	真核細胞 10 ² -10 ³ 個,酵母,バクテリア 10 ³ -10 ⁴ 個 血漿,血清 100μl,組織 0.5-1mg
503-32694	10601004		100 回分	23,000	
508-32703	10602003	Invisorb™ RNA Kit II (Batch Format)	50 回分	18,000	真核細胞 10 ⁶ -10 ⁸ 個,酵母,バクテリア 10 ⁵ -10 ⁸ 個 血漿,血清 500μl,組織 5mg-1g
506-32704	10602004		100 回分	32,000	
エンテロウイルス RNA キット					
505-32713	10604002	Invisorb™ Enterovirus RNA Kit (Batch Format)	50 回分	25,000	糞便 100mg
503-32714	10604003		100 回分	45,000	

96 ウェルプレート

プラスミドキット / 吸引法					
504-32761	70101102	Invisorb™ Plasmid HTS 96 Kit/V - Starting Kit	2 × 96 回分	98,000	バクテリア培養液 0.5-2.0ml/well
501-32771	70103101		1 × 96 回分	35,000	
507-32773	70103102	Invisorb™ Plasmid HTS 96 Kit/V	2 × 96 回分	60,000	バクテリア培養液 0.5-2.0ml/well 別売の Invisorb™ 96 Vacuum Manifold が必要
505-32774	70103103		4 × 96 回分	108,000	
501-32776	70103104		24 × 96 回分	540,000	
PCR 産物精製キット / 吸引法					
506-32841	70211102	Invisorb™ PCR HTS 96 Kit/V - Starting Kit	2 × 96 回分	87,000	PCR 産物,酵素反応液 200μl
503-32851	70213101		1 × 96 回分	24,000	
509-32853	70213102	Invisorb™ PCR HTS 96 Kit/V	2 × 96 回分	42,000	PCR 産物,酵素反応液 200μl 別売の Invisorb™ 96 Vacuum Manifold が必要
507-32854	70213103		4 × 96 回分	75,000	
503-32856	70213104		24 × 96 回分	375,000	
細胞 RNA キット / 吸引法					
508-32921	70611102	Invisorb™ RNA HTS 96 Kit/V - Starting Kit	2 × 96 回分	98,000	新鮮培養細胞 50-5×10 ⁵ 個
505-32931	70613101		1 × 96 回分	45,000	
501-32933	70613102	Invisorb™ RNA HTS 96 Kit/V	2 × 96 回分	80,000	新鮮培養細胞 50-5×10 ⁵ 個 別売の Invisorb™ 96 Vacuum Manifold が必要
509-32934	70613103		4 × 96 回分	145,000	
505-32936	70613104		24 × 96 回分	790,000	
吸引マニホルド					
504-33001	50102100	Invisorb™ 96 Vacuum Manifold	1 個	56,000	Plasmid Midi Kit, Plasmid Maxi Kit, Plasmid HTS 96 Kit, PCR HTS 96 Kit, RNA HTS 96 Kit に対応

ロボット対応(Beckman Coulter, Canberra Packard, Qiagen 用)及び遠心法 96 ウェルプレートキットにつきましては、当社代理店または当社営業員にお問合せ下さい。

実験動物における病理組織標本の作製について

エーザイ株式会社 薬理安全性研究所 開発安全性研究部 福田 種男

臨床面での病理検査は主に、手術時から予後判断など患者と密接に関係しており、患者個人の診断に供される目的が主である。一方、動物実験における研究は、患者様を初めとする人々の健康・福祉などの為の薬(医薬、薬粧、農薬関連)の開発での貢献が主であり、開発された薬が直接的、間接的に人体に影響を及ぼす以上、動物実験での開発品の安全性を主とする評価は、その信頼性が非常に重要となる。この安全性試験などの評価では、実験中の動物の症状観察、血液や尿などのいわゆる臨床検査および解剖して摘出した多くの臓器による病理検査が総合的に行われ、中でも動物実験の最後の段階である病理検査では、病理観察者による評価が重要となる。実験病理に携わる病理観察者に対しては、日本毒性病理学会による専門家の認定制度があり、人材育成が図られている。一方、実験動物材料での組織標本作製手順は、基本的にはヒト材料での手順と同じであるが、動物実験では、一般に対照群と実験群の比較による評価から、一度に多量の組織標本を、しかも均一な状態で作製する必要がある。正しい病理学的評価を得るためには、“質の高い”組織標本の恒常的な提供が望まれることから、その標本作製に従事する者(病理技術者)の不断の努力が必要である。病理技術者のこうした精進の手助けとして、実験病理組織技術研究会があり、日頃の研究成果を発表したり、病理技術の切実な疑問や問題を提起して解決に向かう場として運営されている。さらに、実験動物の組織標本作製に携わる病理技術者の人材育成として、日本毒性病理学会の後援を得た『実験病理組織技術士』の認定制度がある。

【固定】ヒトの臓器・組織の固定に比

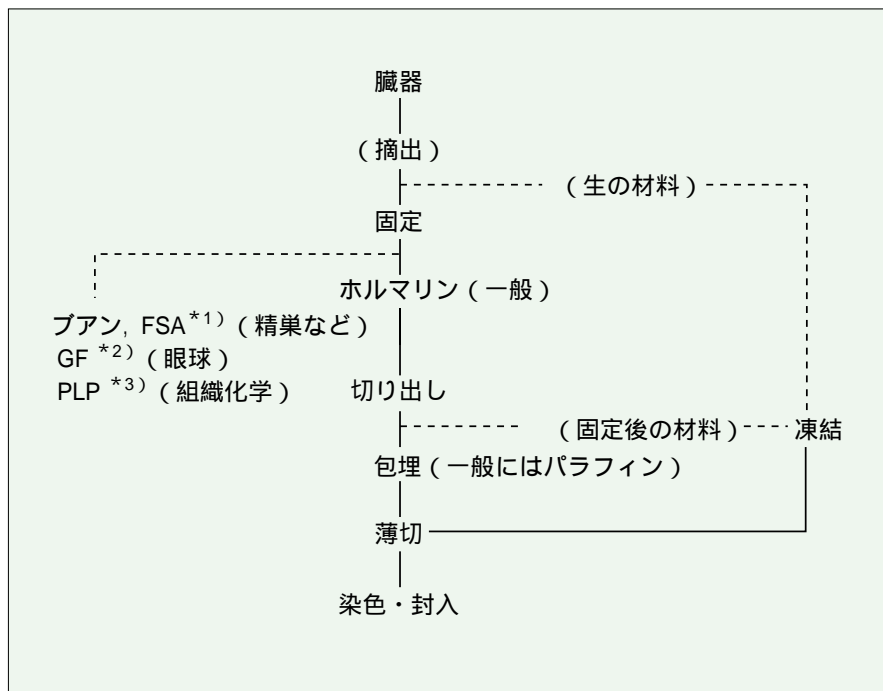


図1. 実験動物における病理組織標本の作製手順

実験動物では組織の自己融解が比較早いので、摘出後は速やかな固定が望まれる。一般には10%中性緩衝ホルマリンが使われるが、精巢および眼球の固定や組織化学(免疫抗体法、in situ hybridizationなど)を目的とする場合は、より良好な組織標本とするため、特殊な固定液が使われる。凍結手順は、目的により未固定材料からと固定材料からの場合がある。

*1) FSA: Formalin, Sucrose, Acetic acid

*2) GF: Glutaraldehyde Formaldehyde

*3) PLP: Periodate-Lysine-Paraformaldehyde

べ、実験動物のそれは小形にも係わらず、往々にして固定不良に成りがちである。これは、組織・細胞および結合組織など間質成分を含めた構成の粗密(一般に実験動物組織は密)さなどから、固定液の浸透性が影響しているのかも知れないが、特に実験動物の場合、その浸透促進策を追求しながら現在に至っている。病理組織標本の良し悪しの要因としては、組織標本作製の全行程の一つ一つが重要であるが、中でも初期固定が最も重要である。従って、臓器に『割』を入れたり、振盪したりして固定液浸透の早期促進に努める必要がある。そのため、固定液の頻繁な交換や、ホルマリン液の濃度を高めたり、アルコール類を含むホルマ

リン液を使用するなど努力がされている。マイクロウェーブを使用した固定促進の報告もされている。

【脱水・脱脂】パラフィン浸透のための臓器・組織の脱水・脱脂剤として、一般には純エタノールの使用が主流であるが、最近、エタノール濃度を下げ、他のアルコールを混合させた病理組織処理専用の脱水剤が数社から市販されており、我々は動物材料において純エタノールとの比較を行ったが、いずれも結果として遜色はなかった。

【包埋】包埋するパラフィン、随分昔は粗雑なものが多く、そのままでは組織への浸透力不足を生じたり、薄切時、パラフィンの粘り不足で本来の切片形成に苦慮し、技師が自分で適当

(経験に裏打ちされた量)に蜜蠟を添加するなど改善のため非常に苦労して調製していた。しかし、最近では組織浸透性に優れたパラフィンが発売されて、手軽に使用できるようになった。

【薄切】薄切では、1本刀で数個のパラフィンブロックを薄切しては数時間研磨するなどの苦労から、替え刃の開発でこれは一変した。1本刀時代に比べ、比較的硬い組織ブロックなどからも、均一な厚さの切片が作製出来るようになったこと、また、マイクローム刀として替え刃の普及により薄切経験の浅い技師でも容易に短時間で切片作製が可能となり、効率的に安定した染色標本が出来るようになった。

【染色】染色液は色素から調製する時代から、調製済み品の普及に代わってきた。ただ、自分達で調製することで自ずと、染色液の各成分の熟知と、各成分が染色目的に果たす役割を把握出来、染色不良の原因追究と対策が講じれる事が多い。市販品で手軽に染色が出来る様になった反面、その染色液の成分と性状の把握が不十分だと、染色不良となった際の解析に苦慮する事がある。最近では多くの市販品が開発・販売されており、随分便利になったが、安易な使用は慎み、保存剤や成分である色素の濃度などを調査して性状を十分に把握し、注意深い使用から本来の美しい染色標本に仕上げることが必要である。実験動物のホルマリン固定材料では、線維系やホルモン分泌細胞などの特殊な染色を行う場合、ピクリン酸系固定液(例えばブアン液)で染色前に媒染処理を行う事がある。ピクリン酸は、組織内タンパクの凝固作用が強く、特に糖タンパクやヒアルロン酸の多い疎性結合組織などの固定に有効である。また、過マンガン酸カリウム液(酸化)とシュウ酸(還元)などを使い染色の前処理をする等の工夫をして綺麗な染色結果を経験している。一般には、染色において動物材料だからといってヒト材料で

の場合と大きく異なる操作はなく、臨床材料での染色方法が多いに参考になっている。

動物実験では、特に新鮮材料の採取が容易であることから、特殊な染色の他、酵素組織化学や免疫組織化学などの研究が導入されることが多い。何れの研究も繊細な組織構造の追求と共に、細胞内の目的とする物質の局在を把握(酵素反応や免疫抗体反応など)するもので、これらの目的物は往々にして構築が崩れやすかったり、微量で溶出しやすいため、局所での完全な保持、即ち固定条件が最も重要である。また、酵素組織化学的染色では、殆どが新鮮材料での凍結切片であり、基質を用いた反応原理であるため、動物材料でも特に問題にはならない。しかし、免疫組織化学的染色(免疫抗体法)において、以前はヒト抗原に対する抗体の市販が殆どで、実験動物に対する抗体の入手は難しく、動物実験での免疫抗体法では、ヒト抗体を使用する場合、実験動物との交差性を確認しながら行ったり、多くの場合は染色を断念するしかなかった。しかし最近では、実験動物に対する抗体も多く開発・市販されだし、反応手技もABC法を基盤とした高精度な改良法や簡易法の開発で、効率的な技術改善がなされ、その結果の判定精度も数段に向上してきた。ただ注意点として、免疫抗体法での判定には、可能な限り陽性対照を準備すべきである。また、正確な反応結果を得るためには、例えばホルマリン系固定の場合、マイクロウェーブやオートクレーブでの反応前処理が有効である場合が多い。更に、パラフィン包埋ブロックの作製においても、熱による抗原の失活を最小限に食い止める努力が必要で、組織への浸透・包埋に使用するパラフィンの融点の低いものの使用が推奨されるが、この場合、薄切時に包埋ブロックを冷却する必要が生じるだろう。

また、非放射性プローブが容易に作

製出来るようになった最近では、組織・細胞の形態を保ちながらmRNAレベルの局在を検索するin situ hybridizationも、動物実験における毒性発現の機序解明上、しばしば用いられるようになってきている。

最後に、最近の環境問題から、ホルマリンやキシレンが注目されているが、病理組織標本作製上、主要な処理液であるだけに代替品も難しく、常用する上で取り扱い者への影響や、使用後の処理方法や処理装置の開発など今後の動向が注目される。

以上、何れにしても実験動物における病理組織標本の作製は、基本的な手技はヒト材料での標本の作製と殆ど同じである。しかし、固定、脱水・脱脂、パラフィン包埋および染色の各処理時間については、動物種や処理数などに相応しての工夫が必要であり、そのノウハウは各施設、技術者各位の経験で行われているのが現状である。

〔参考文献〕

- 1) 水平敏知：マイクロウェーブ固定法，生体の科学 42 1991
- 2) 榎本眞，林裕造，田中寿子：実験動物の病理組織，(株)ソフトサイエンス社，1981
- 3) 田所衛，石川喜美男 他：実践病理組織細胞学カラー図鑑 肉眼像・組織像・細胞像 J HBJ 出版局，1990
- 4) 水口國雄，石川喜美男，三瓶接子 他：組織アトラス～正常と病変～，Medical technology，医歯薬出版(株)
- 5) 前川昭彦，林裕造：毒性試験講座 5 毒性病理学，(株)地人書館 1991
- 6) 伊東信行，林裕造：カラーアトラス実験腫瘍病理組織学，(株)ソフトサイエンス社 1987
- 7) 佐野豊：組織学研究法(第5版)，南山堂，1979
- 8) 日本病理学会編：病理技術マニュアル 3，医歯薬出版(株)，1981
- 9) 野村慎太郎 他：in situ ハイブリダイゼーション，脱アイソトープ実験プロトコール DIC ハイブリダイゼーション，秀潤社 1994
- 10) 阿部寛，古川文夫，尾崎善孝，葛西久芳：実験動物の組織標本作製，Medical Tech. 28(12)，2000
- 11) 阿部寛，古川文夫，尾崎善孝，葛西久芳：実験動物の組織標本作製(1,2,3)，Medical Tech. 29(2,4,5)，2001

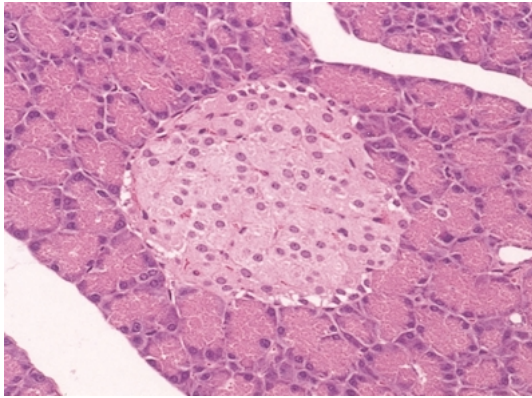


図2. ラット 膵臓
10% リン酸緩衝ホルマリン固定 パラフィン切片 H.E 染色

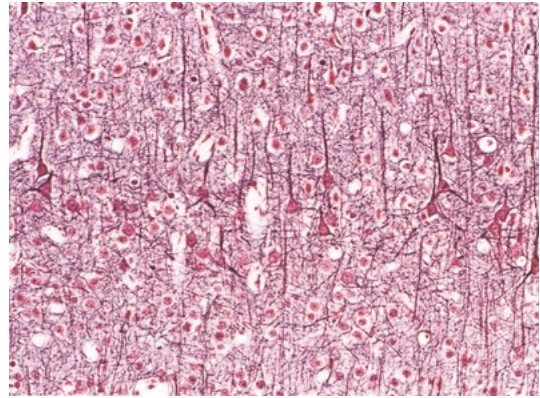


図3. ラット 脳
10% リン酸緩衝ホルマリン固定 パラフィン切片 Bodian 染色

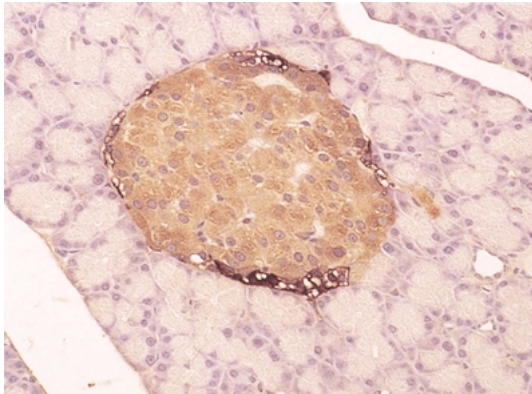


図4. ラット 膵臓(ラ氏島)
10% リン酸緩衝ホルマリン固定 パラフィン切片
免疫抗体二重染色(インスリン・グルカゴン)

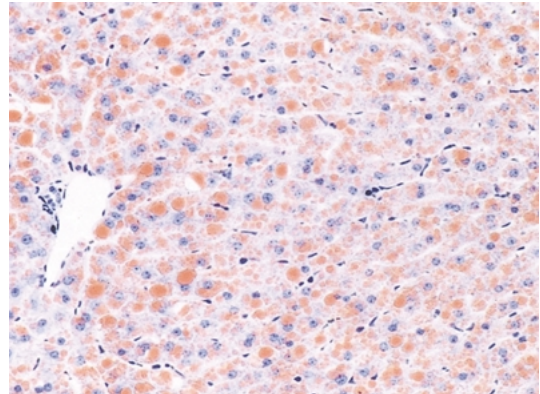


図5. ラット 肝臓
10% リン酸緩衝ホルマリン固定 凍結 Sudan III 染色

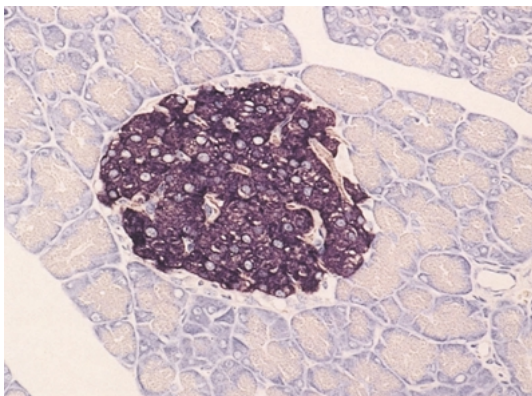


図6. ラット 膵臓(ラ氏島)
10% リン酸緩衝ホルマリン固定 パラフィン切片
in situ hybridization DIG 標識インスリン

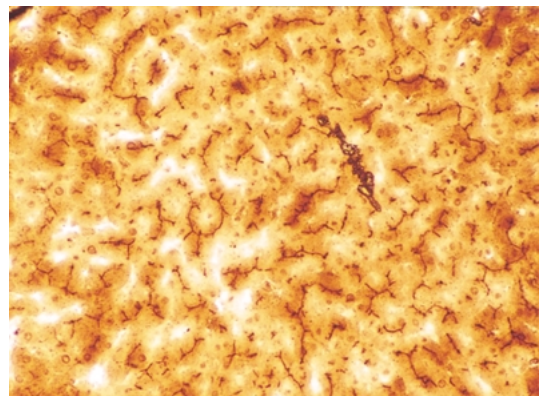


図7. ラット 肝臓(生凍結)
Adenosine Triphosphatase: Wachstein-Meisel 法

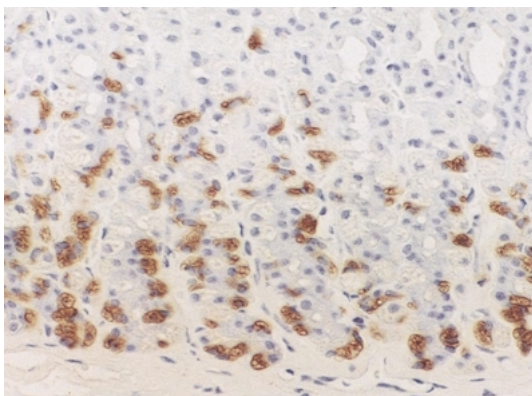


図8. ラット 胃
4%EDCD1^{*4}及び4%PFA^{*5}二重固定 パラフィン切片 ヒスタミン
^{*4}EDCD1:1-ethyl-3-(3-dimethyl-aminopropyl)carbodiimide
^{*5}PFA:Paraformaldehyde

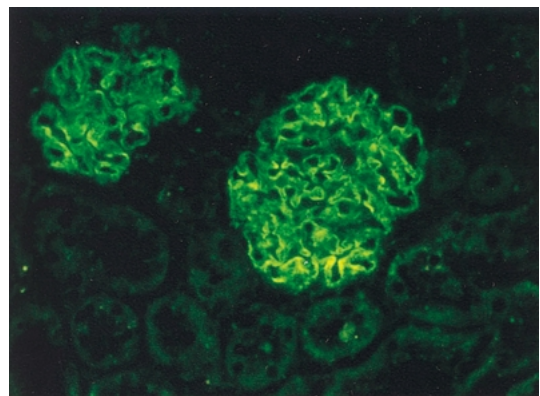


図9. ウサギ 腎臓(糸球体)
生凍結 FITC 標識 蛍光抗体法(IgG)

マウス、ラットの組織包埋に最適！ / 低融点パラフィン Pathoprep® 546

病理組織包埋用

一般に病理組織包埋用パラフィンはタンパク質の熱変性を考慮すると可能な限り融点が低く、組織浸透性の優れたものが良いとされています。新製品パソプレップ® 546は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ペレット状パラフィンで、薄切性・伸展性・浸透性に優れており、且つ低融点(54 ~ 56)です。免疫染色にも使用でき、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

〔溶融条件〕 58 で溶融可能

* パラフィンは浸透過程で溶融状態を保つため、融点以上に加熱されていますが、融点と溶融温度との差はなるべく小さい方が理想です。パソプレップ® 546は融点のわずかプラスの58で完全溶融が可能です。

サンプルご希望の方は資料請求カードにてお申込み下さい。

167-20501 2kg x 3 12,000円

〔関連商品〕

コード No.	品名	融点	規格	容量	希望納入価格(円)
162-18961	Pathoprep® 568	56 ~ 58	病理組織包埋用	500g x 12	13,000
165-19551	Pathoprep® 580	58 ~ 60	病理組織包埋用	2kg x 3	13,000

タンパク質の精製に！

硫酸アンモニウム飽和溶液

生化学用

タンパク質(酵素・抗体)の濃縮や塩析といった精製過程では硫酸アンモニウムが汎用されており、目的に応じてその飽和溶液も使用されています。本品は既に飽和溶液に調製していますので、そのままご使用頂けます。

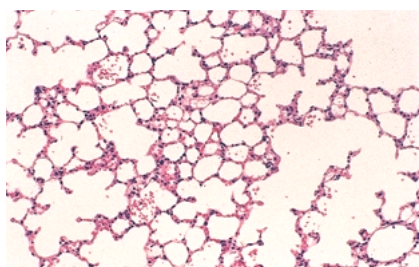
〔特長〕

- ・少量または高濃度のタンパク質溶液の精製に適する。
- ・溶液添加時に細かい濃度コントロールが可能。

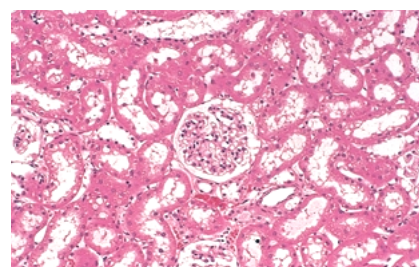
〔組成〕

- ・硫酸アンモニウム(酵素精製用グレードを使用)
- ・1mol/l 水酸化ナトリウム溶液(pH調整用)
- ・イオン交換水

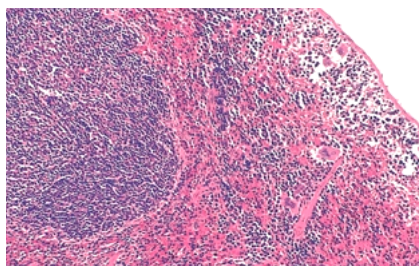
本品は塩析時の硫酸アンモニウム濃度を表す「飽和度」に従い、25において水1lに硫酸アンモニウム767gを溶解したものを飽和度100%すなわち飽和溶液として調製しています。飽和度100%は濃度(重量百分率)換算すると約43%(25)に相当します。(なお、保存温度条件により結晶が析出する場合があります)



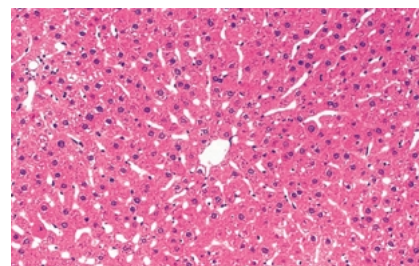
マウス肝臓 (HE 染色) x 10



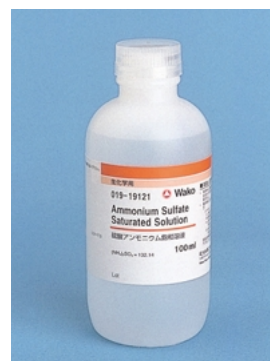
ラット腎臓 (HE 染色) x 10



マウス脾臓 (HE 染色) x 10



ラット肝臓 (HE 染色) x 10



〔規格〕 pH(25): 6 ~ 7

〔参考文献〕

阿南 功一 他編:「基礎生化学実験法 2 抽出・分離・精製」, p60(丸善(株))(1974)

019-19121	100ml	照会
011-19125	500ml	照会

第5回 非上皮性腫瘍(2)

脂肪組織の腫瘍

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

良性腫瘍のものは、脂肪腫といわれ、成熟した脂肪細胞よりなる。一般的に腫瘍細胞の集団は幅の狭い結合組織によって囲まれる。一方悪性のものとして脂肪肉腫があるが、異型性脂肪腫、多形性脂肪腫および悪性線維性組織球腫と鑑別を要するものもある。

脂肪腫: 中高年齢層の肥満女性に多く、若い年齢層には少ない。頸部、背部、肩、大腿、臀部などの成熟した脂肪組織から発生する黄色の結節を作る境界鮮明な良性腫瘍で、全身の皮下脂肪組織に好発する。組織学的には成熟した脂肪細胞から成る腫瘍で異型はない。一般的に結合組織によって分隔されるが、幅の広い結合組織に囲まれる線維性脂肪腫や血管に豊富

な血管脂肪腫などがある。また、稀ではあるが、幼若な脂肪細胞からなる褐色脂肪腫もある。

脂肪肉腫: 軟部腫瘍の悪性の中では、発生頻度の高い腫瘍で、分化の低い脂肪組織の未熟異型細胞の悪性腫瘍である。大腿部や後腹膜に好発し、40歳以降の男性にやや多く発生する。大部分が比較的分化した脂肪組織とともに、未熟な大型濃染性の異型脂肪芽細胞(くもの巣状 spider web cell)を認めることが多い。異型脂肪芽細胞の細胞質は泡沫状に見え、間質は網目状の毛細血管に富み、腫瘍細胞は血管密着し、鍍銀染色ではその構造がよくわかる。しかし、なかには分化した脂肪組織がなく、腫瘍細胞を主体と

する脂肪肉腫があるので、この場合脂肪をズダン やズダン 黒などで証明する必要がある。また、脂肪顆粒の少ない場合、電子顕微鏡学的に確認を要する場合もある。電顕の特徴として基底膜様構造をもった腫瘍細胞は毛細血管に接近して認められることが多く、細胞質内には脂肪滴が見られる。

〔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.
- 4) 田所衛, 石川喜美男, 三瓶接子 他: 実践病理組織細胞学カラー図鑑. HBJ. 1997.

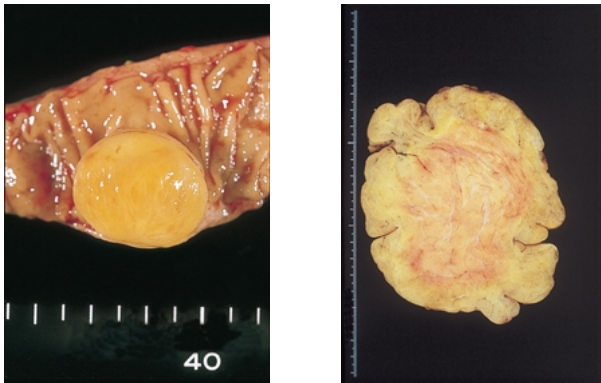


図1. 脂肪腫 肉眼像 ×1
左は消化器、右は、皮下に発生したもので肉眼的に黄色を呈し、薄い被膜で覆われる球状の軟らかい腫瘍である。また、断面は分葉状で光沢があるのも特徴である。



図2. 筋肉内脂肪腫 肉眼像 ×1
分葉状、多結節上の軟らかい腫瘍で菲薄な被膜を有するのが特徴である。

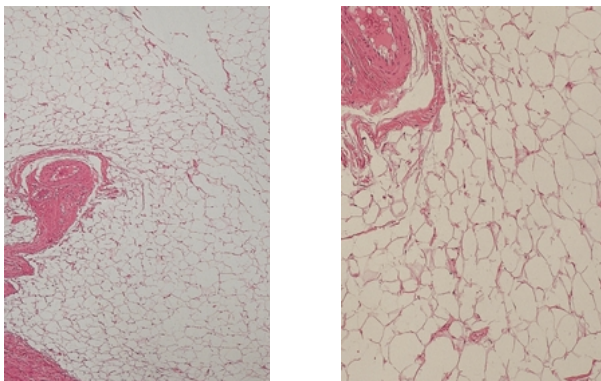


図3. 脂肪腫 H・E 染色 左: ×4, 右: ×10
比較的大きさの揃った成熟した脂肪細胞からなる腫瘍である。右はその拡大像で異型はない。

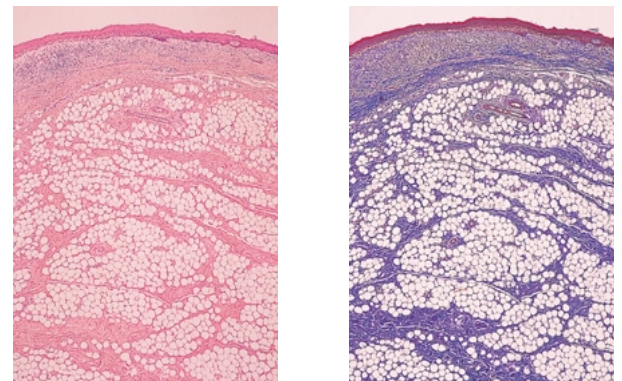


図4. 線維性脂肪腫
左: H・E 染色、右: マッソン・トリクローム染色 ×4
類粘膜に発生した腫瘍で、通常の脂肪腫と同様に成熟した脂肪組織からなる。分葉状に发育した脂肪細胞は幅の広い結合組織で分隔されている。

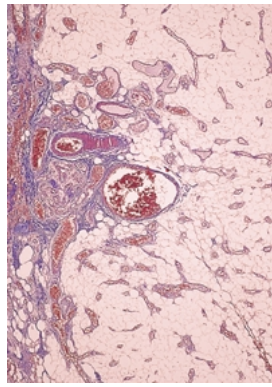
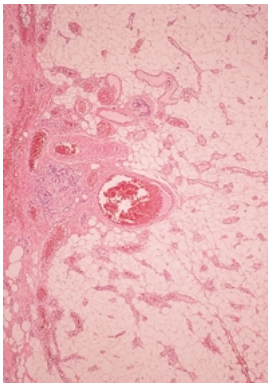


図5. 血管脂肪腫

左:H・E染色、右:マッソン・トリクローム染色 × 4
背部に発生した腫瘍で異型のない成熟脂肪組織の増生と共に、種々の大きさの血管の介在を認める。血管の内皮細胞には異型はない。

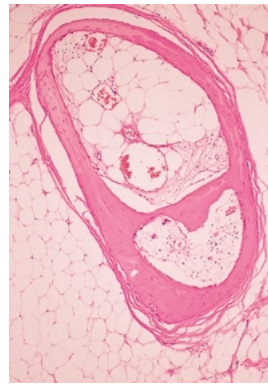


図6. 骨脂肪腫

左:H・E染色、右:マッソン・トリクローム染色 × 10
耳に発生した腫瘍で、成熟型脂肪細胞からなる線維組織内の骨化が見られ、その一部は成熟した骨染に類似した像を示している。

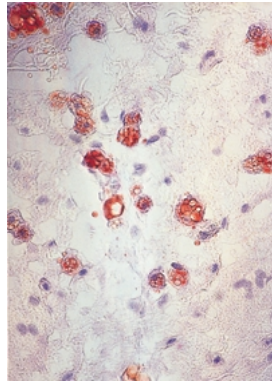
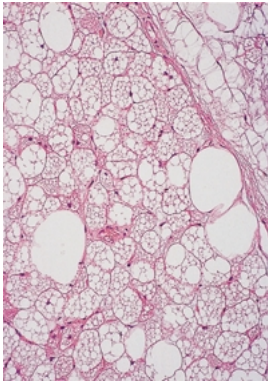


図7. 褐色脂肪腫

左:H・E染色、右:ズダン染色 × 10
肩甲部に発生した腫瘍で分葉状に发育した褐色細胞を認められた。左では、細胞質が泡沫顆粒状を呈し、類円形である。右では、脂肪滴が橙赤色に染まり、野イチゴ状に見える。

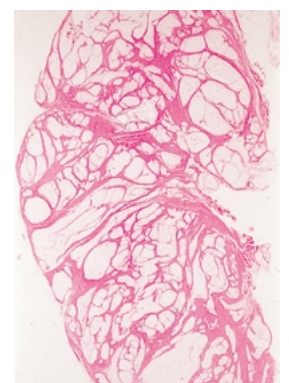


図8. 脂肪芽細胞腫

左:肉眼像 × 1、右:H・E染色 × 1
幼小児に発生する良性脂肪性腫瘍で、結節状、帯黄白色を呈するのが特徴である。
右では、脂肪細胞の集団は種々の幅を持った線維性の結合組織によって分葉状に分隔されている。線維性脂肪腫と類似するが結合組織に厚みがある。

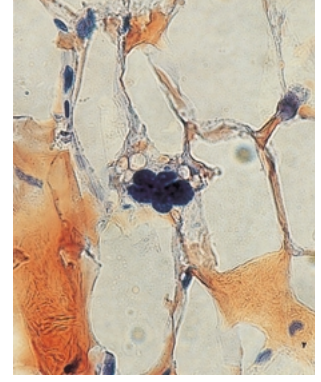
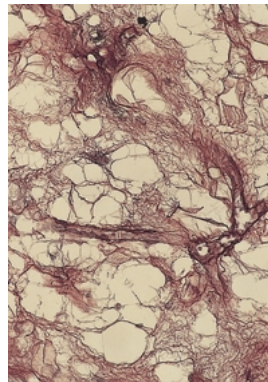
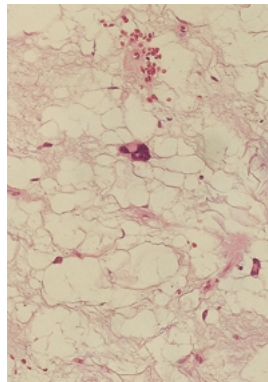
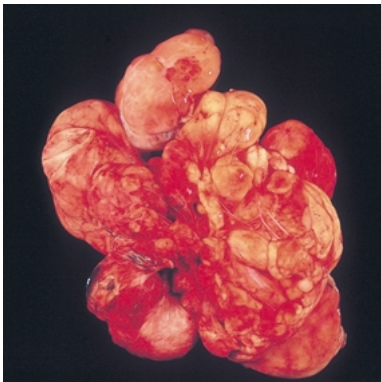


図9. 高分化型脂肪肉腫

肉眼像 × 1
黄色を帯びた腫瘍細胞は、結節状、分葉状で、弾性軟で、出血性のある結節が癒着するように发育しているのが分かる。

図10. 高分化型脂肪肉腫

左:H・E染色、右:鍍銀染色 × 10
大型濃染性の未熟な異型脂肪芽細胞(くもの巣 spider web cell)が比較的分化した脂肪組織の中に認められる。細胞質は泡沫状に見える。右の鍍銀像では脂肪芽細胞から黒色の線維が周囲の血管に伸びているのがわかる。

図11. 高分化型脂肪肉腫

ズダン染色(凍結切片) × 40
大型の濃染核をもった脂肪芽細胞の細胞質には微細な脂肪顆粒が認められる。



図12. 粘液型脂肪肉腫

肉眼像 × 1
一つの腫瘍内に分葉状、多結節状かつ、粘液様変化を特徴とする肉腫である。

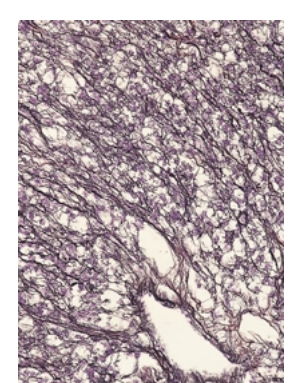
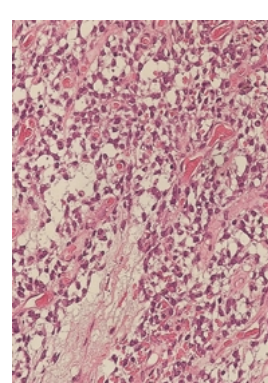


図13. 粘液型脂肪肉腫

左:H・E染色、右:鍍銀染色 × 20
腫瘍細胞の密な部分では、核の濃縮した腫瘍細胞が血管周囲に集まって見える。右では、血管周囲の腫瘍細胞が繊細な細網線維によって囲まれているのがわかる。

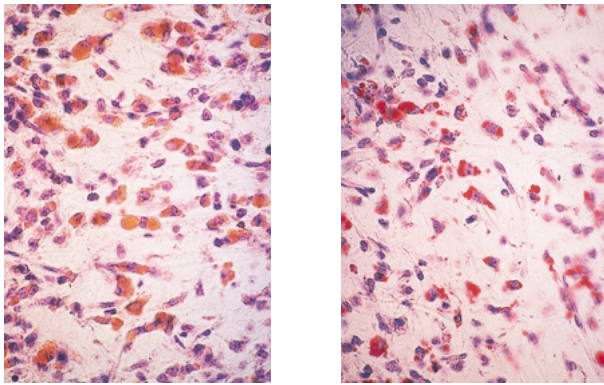


図 14. 粘液型脂肪肉腫 左:ズダン 染色, 右:オイル赤O 染色 × 40
腫瘍細胞の胞体内に橙赤色～赤色に染まった脂肪滴が確認出来る。

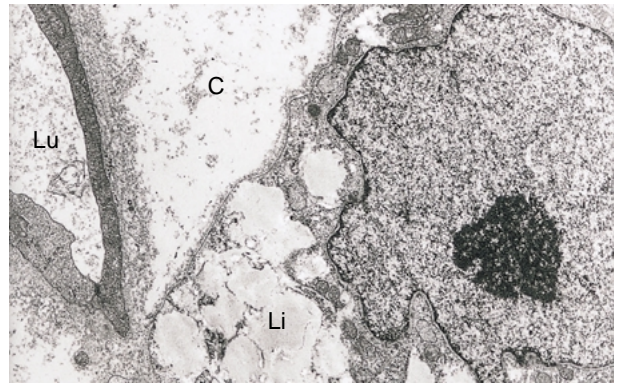


図 15. 粘液型脂肪肉腫 TEM 像 × 5000
脂肪顆粒 (Li) をもった腫瘍細胞は基底膜様構造を示し、毛細血管 (Lu) に近接している。C: 粘液様の基質

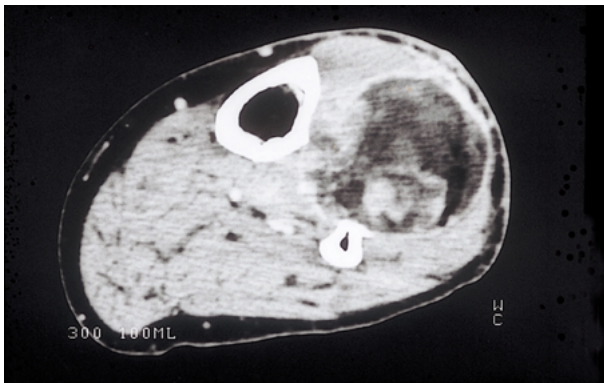


図 16. 多形細胞型脂肪肉腫 肉眼像 × 1
下肢に発生した脂肪肉腫の CT 像で、低信号の腫瘍内に壊死を示唆する所見が見られる。



図 17. 多形細胞型脂肪肉腫 肉眼像 × 1
図 16 と同一症例で、腫瘍細胞の断面は、帯黄灰白色で、分葉状、結節状に発育し、一部に出血性である。右上には、壊死に陥った部分が見られる。

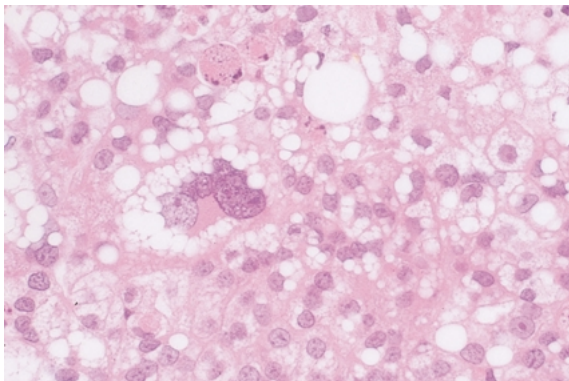


図 18. 多形細胞型脂肪肉腫 H・E 染色 × 40
多核の巨細胞と核の偏在した小円形細胞の増殖をみる。個々の細胞の胞体には、多数の空胞を認める。

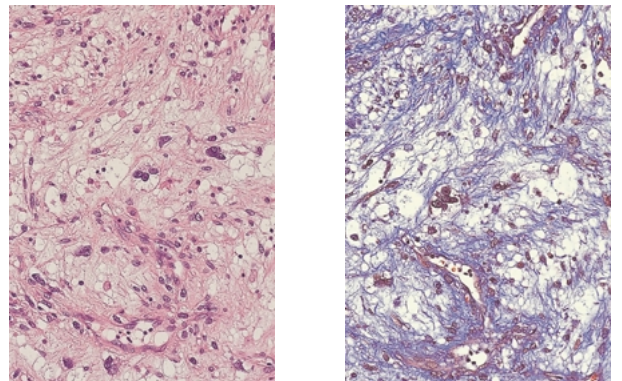


図 19. 多形細胞型脂肪肉腫
左:H・E 染色, 右:マッソン・トリクローム染色 × 20
細い結合組織に囲まれて、クロマチンに富む核の濃染した多核細胞と類円形の細胞を認める。右では、血管周囲に腫瘍細胞が細線維に取り囲まれているのが分かる。

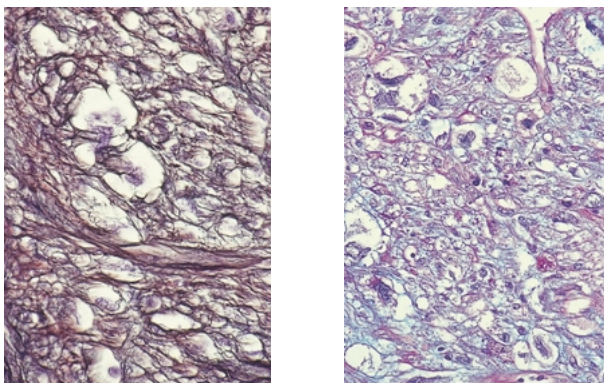


図 20. 多形細胞型脂肪肉腫
左:鍍銀染色, 右:PAS-Alcian blue 重染色 × 40
左では、個々の腫瘍細胞は黒色に染まる嗜銀線維によって取り囲まれ、腫瘍細胞から毛細血管に線維が伸び、この腫瘍の特徴を示している。右では、腫瘍細胞の胞体内が PAS 陽性(赤紫色)に染まり、基質には酸性粘液多糖類を認める。

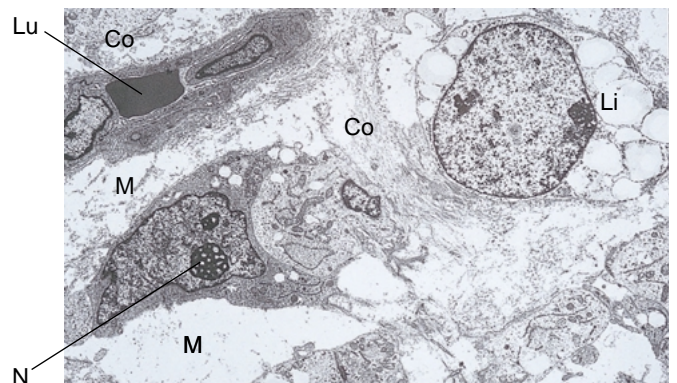


図 21. 多形細胞型脂肪肉腫 TEM 像 × 2000
発達した膠原線維 (Co) と粘液様の基質 (M) の間に脂肪顆粒 (Li) をもった腫瘍細胞が毛細血管 (Lu) に接している。また、糸巻き状の核小体 (N) をもった幼若な腫瘍細胞も認める。

第45話 エンドトキシンに結合する血漿成分

エンドトキシンの生物活性についてはこれまでいろいろな面から取り上げてきました。エンドトキシンの生物活性を考える時、血液中の成分による修飾を考える必要があります。この修飾の一つにエンドトキシンに結合する血漿成分があり、これらの成分はリムルス試験を行う上でも重要になる場合があります。今回は、エンドトキシンに結合する血漿成分について考えてみましょう。

エンドトキシンに結合する血漿成分としては、血清アルブミン、補体成分(C1やC3)、血液凝固系の第XII因子(ハーゲマン因子)、リゾチーム、HDL、LDLなどの正常血漿蛋白、LPS結合蛋白(LBP)、マンノース結合蛋白、免疫グロブリンなど刺激によって産生される蛋白が挙げられます¹⁾。

Levelsらは、4,4-duffluoro-4-bora-3n,4n-diaza-S-indacene (BODIPY-R6G, Molecular Probes Inc., Oreg. USA)で蛍光ラベルした*E. coli* O111:B4由来LPSや7-nitrobenz-2-oxa-1,3 diazole fluoride (NBD-F, Molecular Probes)で蛍光ラベルした*E. coli* J5(Rc)及び*Salmonella servar*

typhimurium Re595由来のLPSを用いて、健康人全血中におけるLPSの蛋白への結合状態を報告しています²⁾。その結果、10人のボランティアの全血において、LPSは、60%(±8%)がHDLに、25%(±7%)がLDLに、12%(±5%)がVLDLに結合していました。分析にはHPLCを用いています。

一方、Vreugdenhilらは、ピオチンでラベルしたLPS及びLBPを用いて、その血液中での分布を調べています³⁾。その結果、血液中のLPS及びLBPはLDL及びVLDLに結合しており、HDLにはほとんど結合していませんでした。また、apoBはLPSとLBP両方に結合する部位を持っており、これがLDLやVLDLとLPS/LBPとの結合に関係していると考えられています。LBP濃度が上がっている敗血症患者の血清でも、LBP/LPSはLDL/VLDLに主に結合していました。分析には、主にアガロース電気泳動とウエスタンブロット法を用いています。

これら2つの論文の結論は乖離しているように思われます。この結果の違いはどこから来ているのでしょうか。LPSのラベル方法が違うからでしょうか。LPSの種類が違うからでしょうか。分離方法や検出方法が違うからでしょうか。筆者がその答えを持っているわけでは、もちろんありません。

LPSが血流中に入るとLBPに結合し、CD14との親和性が上昇し、白血球上のToll Like Receptor 4に受け渡され、細胞内へのシグナル伝達が行われることによりサイトカインなどが発現するという構図は、最近明らかにされつつある重要な成果の一つです。しかし、このメインストリームを修飾する種々の物質が血液中にはあり、エンドトキシンの生物活性の解明にはこれら

の物質の影響もさらに研究が必要でしょう。エンドトキシンが最もよく結合するリポ蛋白はどれかという話一つとっても、LevelsらとVreugdenhilらで意見が異なるようですし、ここにLBPが関わってくるとなるとますます話が複雑になってきます。

エンドトキシンに結合する物質といっても、エンドトキシンの活性に影響を与える物質と与えない物質、特異的に結合する物質と非特異的に結合する物質があります。また、エンドトキシンに特異的に結合するLBPはサイトカインの産生は促進するかもしれませんが、リムルス活性は阻害するとの報告があり、活性の種類によって影響が異なる場合も考えられます。非特異的結合だからといって、活性の修飾を考える上で重要でないとはいえません。この怪人百面相のような多様性がエンドトキシンの魅力でもあるわけですが、エンドトキシンの生物活性を理解するためには、この複雑な構図を一つ一つ明らかにしていかなければなりません。

このエンドトキシン複雑系を解明していくために現在もいろいろな試みがなされており、今後の進展が期待されます。また、そのテーマは意外と身近なところにあるかもしれません。あなたは、LevelsらのHDL派ですか、それとも、VreugdenhilらのLDL派ですか。

〔参考文献〕

- 1) 遠藤重厚、稲田捷也：「エンドトキシンと病体」p. 60(へるす出版(1995))
- 2) Levels, J. H. M. et al.: *Infect. Immun.*, 69, 282(2001)
- 3) Vreugdenhil, A. C. E. et al.: *J. Clin. Invest.*, 107, 225(2001)

次回は「第46話 最近のカプトガ二事情」の予定です。



カルシウム受容発光蛋白質イクオリン (Calcium-activated photoprotein Aequorin)

チッソ株式会社 横浜研究所 井上 敏

1. はじめに

イクオリン (Aequorin)¹ は、微量のカルシウムイオンと特異的に結合し、青色発光する蛋白質 (発光蛋白質 = photoprotein) である。カルシウムイオンに対する感受性の高さから微量カルシウムイオンの検出 / 定量や細胞内カルシウムの動的変化のイメージプローブとして用いられて来た。イクオリンはワシントン州シアトル近郊のフライデーハーバー島近海に棲息する発光オワンクラゲ *Aequorea aequorea* の傘の周辺に存在する発光器 (photocyte) から単離された¹⁾。この発光器には、現在レポーター蛋白として広く用いられている緑色蛍光蛋白質、Green Fluorescent Protein (GFP) も共存している。クラゲの発光は、外部刺激にたいしてイクオリンと GFP の間で Bioluminescence Resonance Energy Transfer (生物発光共鳴エネルギー移動) の結果、緑色の発光 (極大波長 = 509nm) が観察される。1990年以降、発光クラゲの減少に伴い、細胞内カルシウム測定用の高純度天然イクオリンの供給が十分でない状況であったが、現在、遺伝子組換え法による高純度イクオリンの供給が可能となり、またそれを用いた X-線結晶構造解析によりその全体像が明らかとなった²⁾。

2. イクオリンとは

イクオリンは、蛋白質部分であるアポイクオリン (アポ蛋白 = Apoaequorin) と発光基質に相当するセレンテラジン (coelenterazine) と分子状酸素 (O₂) が複合体を形成した状態で存在している。イクオリン分子にカルシウムイオンが結合すると青色の瞬間

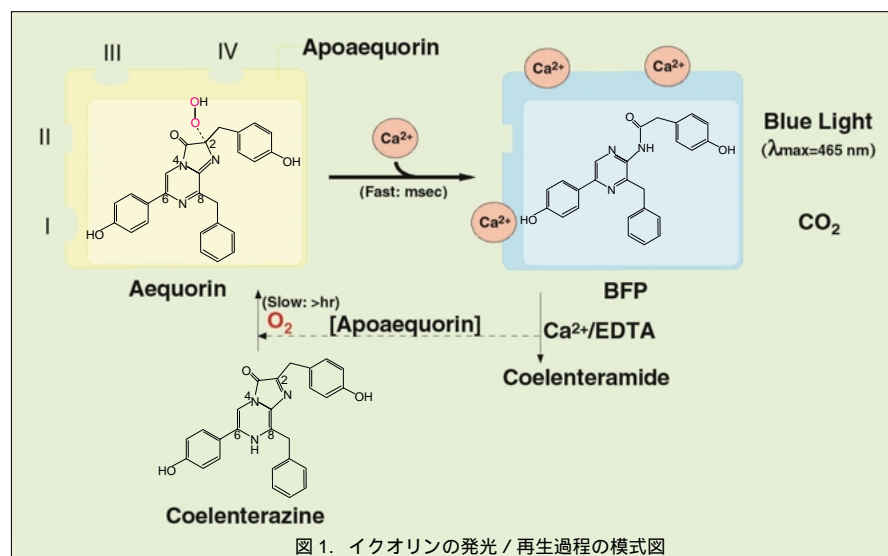
発光を示し、セレンテラジンの酸化物であるセレンテラミド (coelenteramide)、二酸化炭素を生成する。アポイクオリンの一次構造は、筆者らにより 1984 年 cDNA クローニングの結果 (GenBank: L29571)、189 アミノ酸よりなる単純蛋白 (分子量 21,400) であり、カルモジュリンと相同性をもち、カルシウムと特異的に結合するヘリックス-ループ-ヘリックス構造である EF-ハンド構造が 3 ケ所あることが示唆された³⁾。イクオリンの最大のユニークさは、一般に EF-hand 構造型カルシウム結合蛋白質が制御蛋白の役割や生体内でのカルシウムイオンの緩衝的な機能を持つ構造蛋白質でなく、蛋白質自身が酵素的 (触媒的) な役割を担った低分子型 EF-ハンド型蛋白質である。

一方、カルシウムと結合し発光した後のアポイクオリンは、発光能を持つイクオリンへ再生可能である。その再生は、EDTA 等のキレート剤によりカルシウムイオンを除き、還元剤、セレンテラジン、酸素 (O₂) とともに低温でインキュベーションすることにより達成される。この再生過程において、蛋

白質部分であるアポイクオリンが他のルシフェラーゼと同様に O₂ を添加する反応を触媒 (効率の良い反応の場の提供) している。見方を変えると、再生したイクオリン分子は酵素反応過程に生成する酵素-基質複合体 (アポイクオリン-セレンテラジン-O₂ 複合体) 状態で、しかも常温で安定に存在するユニークな蛋白質である。筆者らにより決定された組換えイクオリンの X 線結晶構造解析の結果をもとに、イクオリン発光及び再生過程を模式的にまとめたものが図 1 である (反応直後のカルシウム結合アポイクオリン、セレンテラミドの複合体は青色蛍光能をもつので Blue Fluorescent Protein (BFP) とも呼ばれる)。

3. イクオリン発光と測定

イクオリンの発光は、図 2 に示すように、過剰の Ca²⁺ 溶液を加えると瞬間のスパイク状の発光をしめし、数秒で発光を終了する。これは、他の発光酵素 (ルシフェラーゼ) のように連続的な発光反応と決定的に異なる点である。発光原理は Ca²⁺ がイクオリンの EF-



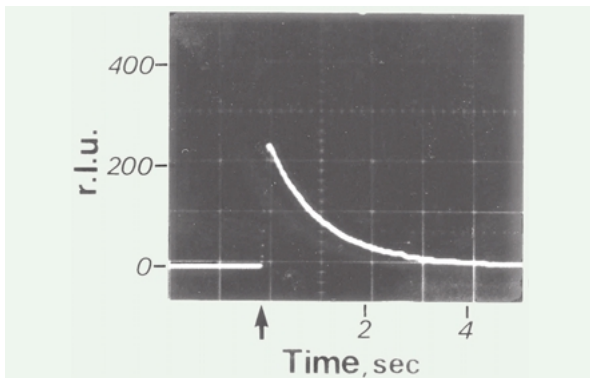


図2. 組換えイクオリンの過剰のカルシウムイオン添加による発光パターン
矢印で過剰のCaCl₂を注入する。

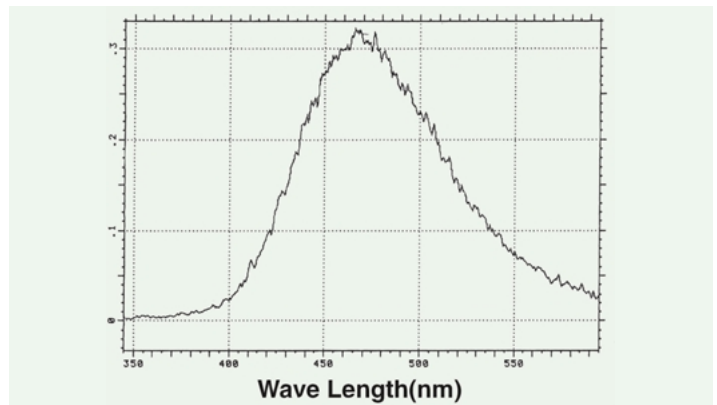


図3. 組換えイクオリンの発光スペクトル

ハンドのループ部分に結合することにより高次構造が変化し、分子内で安定化されていたセレンテラジンのペルオキシドが開裂し発光すると解釈されている。発光強度 (I_{max}) は、 Ca^{2+} 濃度と相関関係があり、既知の Ca^{2+} 濃度に対する発光曲線を作成することにより (10^{-7} - $10^{-4}M$)、目的サンプル溶液の Ca^{2+} 濃度を決定することができる⁴⁾。

一方過剰の Ca^{2+} を添加するのみで、スパイク状の発光反応であることや数秒以内で反応が終了することより、スピーディーな S/N 比の良い解析結果を得ることができる。このことはイクオリン分子をハイスループット検出系での高感度発光分子マーカーとして利用できる可能性をしめしている。イクオリンの検出限界は測定装置の感度にもよるが、1ピコグラム以下である。

発光スペクトルは、図3に示すように極大波長は460-470 nmである。この青色波長領域は、市販のルミノメーターで使用されているバイアルカリ型光電子増倍管 photomultiplier の高吸収特性を示す領域であり、市販ルミノメーターとの相性が良い。一方、イクオリンの発光の立ち上がりが早い(ミリ秒)市販ルミノメーターの中には、イクオリン測定に不都合なものもある。

4. 高純度組換えイクオリンの精製

イクオリン遺伝子(正確にはアポイ

クオリン遺伝子)は、真核、原核細胞内で発現可能である。筆者らは大量に精製するために、大腸菌を宿主として、分泌系の発現系を構築した⁵⁾。もともとイクオリンは細胞質の蛋白と考えられるが、アポイクオリンは分泌系で動物培養細胞系では細胞外へ⁶⁾、大腸菌の場合はペリプラズムに蓄積させることができる⁵⁾。大腸菌での分泌発現では、培養条件によっては培養液中にも産生させることも可能であり、その全発現量は約2g/lである⁷⁾。イクオリンの精製は、アポイクオリンを精製した後イクオリンへと再生する方法^{5,7)}とアポイクオリンをイクオリンへ再生したのち精製する方法⁸⁾が確立しているが、イクオリンの使用目的によってその精製法を考慮している。精製イクオリンの安定性は結晶化の操作過程を考慮すると、精製したイクオリンは一般的な酵素類と同等な取り扱いで十分である。最大の不安定要因(失活)は、操作中での Ca^{2+} のコンタミネーションに起因する。

5. イクオリンの結晶解析からの情報

結晶解析に使用した組換えイクオリンは、アミノ末端の配列が天然イクオリン VKLTS- の代わりに ANSKLTS- ではじまる191アミノ酸残基よりなる^{3,5)}。X線結晶解析は2.3Åの解像度で行い、組換えイクオリンのN-末端の4残基を除く天然イクオリン配列のLeu-3からPro-189の構造を決定した²⁾(PDB:1EJ3)。結晶化イクオリンは2量体を形成しており、2量体の構造は、カルシウム結合4番目のループ部分の153-157残基のずれを除けばほぼ同じであった。図4に示すように、イクオリン分子は球状蛋白であり、発光基質に相当するセレンテラジン-O₂コンプレックス分子(セレンテラジンペルオキシド)は中央に位置している。一

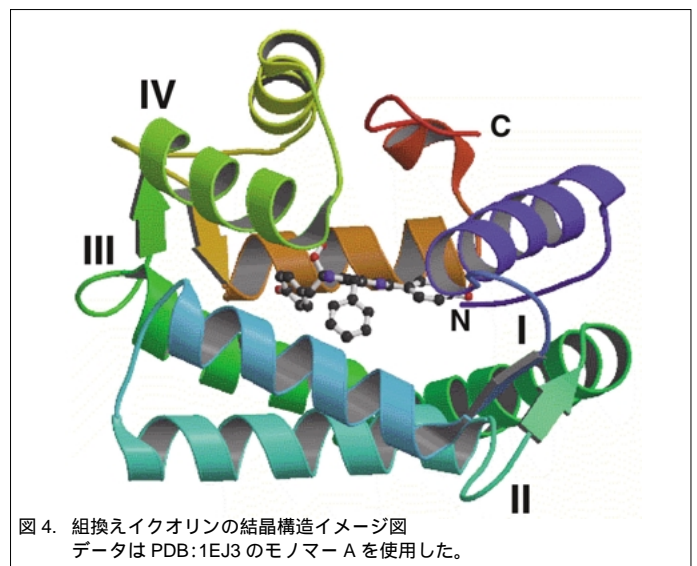


図4. 組換えイクオリンの結晶構造イメージ図
データはPDB:1EJ3のモノマーAを使用した。

方、カルシウム結合のためヘリックス-ループ-ヘリックスの EF-hand 構造は、実際には蛋白質構造中に 4 ケ所見いだされたが、当初から第 2 番目の EF-hand 構造に相当する部分は、ループ部分に置換があり機能していないと推定されている³⁾。イクオリンへのカルシウムの結合個数はカルシウムイオンの滴定により 3 個であることが示され、発光に必要なカルシウムの個数は最低 2 個であることが示唆されている⁹⁾。

有機化学的立場から最も興味深い点は、セレンテラジンペルオキシドの安定化機構である²⁾。イクオリン分子内でのセレンテラジンと酸素のコンプレックスの構造については、すでにセレンテラジンの C2 位の部分にペルオキシド構造が存在する可能性が、¹³C-NMR により示唆されていた。結晶解析の結果は球状アポ蛋白の中央の 600³ の空間に、C2 位に電子密度 55-60% であるが、ペルオキシド構造 (-O-O) 存在を確認した。セレンテラジンペルオキシド分子の間隙は半径 1.4 球状で占められており分子表面から溶媒の影響を受けず、21 個の疎水性残基、3 個のチロシン、2 個のヒスチジン、2 個のスレオニンと 1 個のリジンで覆われている。C2 位のヒドロペルオキシド基の安定化に関与しているアミノ酸残基は、カルボキシ末端近傍

にある 184 番目のチロシンでありフェノール性酸素原子との水素結合により安定化が示唆されている。また、セレンテラジンの C2 位のペルオキシド基の絶対配置は(S)配置であった。これはウミシタケ由来ルシフェラーゼの発光反応過程で生成される発光基質中間体と推定される C2 位ペルオキシドの絶対配置は(R)配置であり¹⁰⁾、立体特異性の異なる点が興味深い。一般に、不斉中心を持たない発光基質セレンテラジンへの C2 位への酸素添加反応は、蛋白質によって正確に制御されていると考えられる。

6. おわりに

イクオリン発見以来、約 40 年にわたって研究が継続してきたのは、その発光に魅せられた研究者に負うところが大きい。筆者が遺伝子単離、精製、構造解析に関する一連の研究に参画できた幸運は、多くの良き共同研究者に恵まれたからである。高純度組換えイクオリンの製造体制が確立したことさらにその高次構造が明らかとなったことで、次の研究の展開の準備ができています。特にイクオリンの産業領域での応用が加速される状況が出てきたことは事実である。

1)「Aequorin」の和名表記について。「イクオリン」_ク「エコーリン」_ク「イコーリン」等が使用されて来たが、和名「イクオリン」を最初に使用したのは、発見者である下村脩博士が「生物発光の謎」(1964:「自然」2巻 47-51)の中であり、それを尊重するのが妥当であると筆者は考える。

〔参考文献〕

- 1) Shimomura, O., Johnson, F.H. & Saiga, Y. : *J. Cell. Comp. Physiol.*, 59, 223 (1962)
- 2) Head, J.F., Inouye, S., Teranishi, K. and Shimomura, O. : *Nature*, 405, 372 (2000)
- 3) Inouye, S., Noguchi, M., Sakaki, Y., Takagi, Y., Miyata, T., Iwanaga, S., Miyata, T. and Tsuji, F.I. : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82, 3154 (1985)
- 4) Blinks, J.R., Wier, W.G., Hess, P. & Prendergast, F.G. : *Prog. Biophys. Mol. Biol.*, 40, 1 (1982)
- 5) Inouye, S., Aoyama, S., Miyata, T., Tsuji, F.I. & Sakaki, Y. : *J. Biochem. (Tokyo)*, 105, 473 (1989)
- 6) Inouye, S. & Tsuji, F.I. : *Anal. Biochem.* 201, 114 (1992)
- 7) Inouye, S., Zenno, S., Sakaki, Y. & Tsuji, F.I. : *Protein Expr. and Purif.*, 2, 122 (1991)
- 8) Shimomura, O. & Inouye, S. : *Protein Expr. and Purif.*, 16, 91 (1999)
- 9) Shimomura, O. & Inouye, S. : *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 221, 77 (1996)
- 10) H. Nakamura, C. Wu, S. Inouye & A. Murai : *J. Am. Chem. Soc.*, 123, 1523 (2001)

カルシウム受容発光タンパク質 Aequorin, recombinant, Solution

生化学用

発光オワンクラゲから単離されたイクオリンは、Ca²⁺と特異的に結合し、青色の発光を示すタンパク質です。微量 Ca²⁺の検出・定量や細胞内カルシウムのイメージングに用いられます。

製法：発光オワンクラゲ(*Aequorea aequorea*)由来の発光タンパク質アポイクオリンを大腸菌で発現させ、イクオリン

へ再生後、精製。

形状：凍結品(10mmol/l Tris-HCl, pH 7.5, 2mmol/l EDTA, 1.2mol/l (NH₄)₂SO₄)
純度：95%以上(SDS-PAGE)

473(1989)

- 3) Inouye, S. et al. : *Protein Expr. Purif.*, 2, 122 (1991)
- 4) Shimomura, O. and Inouye, S. : *Protein Expr. Purif.*, 16, 91 (1999)
- 5) Head, J. F. et al. : *Nature*, 405, 372 (2000)

〔参考文献〕

- 1) Inouye, S. et al. : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82, 3154 (1985)
- 2) Inouye, S. et al. : *J. Biochem.*, 105,

011-19181 50μg 30,000円

ピアス独自の新技术で、目的タンパク質だけを単離！

PIERCE **Seize™ X** 免疫沈降キット

架橋技術と抗体アフィニティークロマトグラフィー技術を組合せた新しい免疫沈降法により、目的タンパク質を効率的に沈降、単離するキットです。従来の免疫沈降法と異なり、目的タンパク質のみを単離できるので、ウェスタンブロットティングによるバンドの確認が必要なくなりました。

〔特長〕

- タンパク質回収率がアップ！
従来法に比べて目的タンパク質の回収率が高くなりました。
- 経済的！
プロテイン G (もしくは A) に架橋させた抗体ビーズは繰り返し約 10 回使用できます。

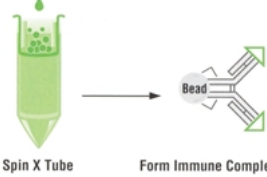
- 抗体のコンタミンなし！
抗体が架橋されているため単離されたタンパク質に、抗体の H 鎖 / L 鎖が混入しません。そのため SDS-PAGE で単一バンドとして検出されます。

〔操作手順〕(要約)

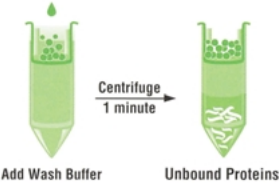
Step 1: プロテイン G (もしくは A) ビーズに抗体を架橋させる (抗体はキットには含まれておりません)。



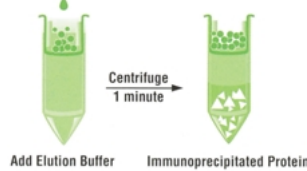
Step 2: 溶解した細胞サンプルを抗体-プロテイン G (もしくは A) ビーズに添加する。



Step 3: 未結合タンパク質を洗浄・除去する。



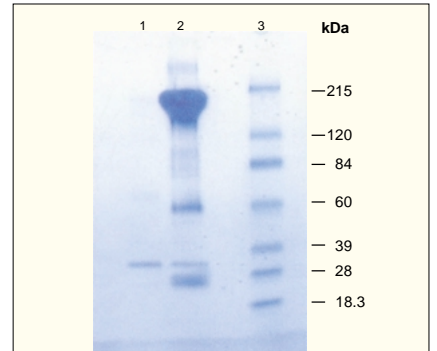
Step 4: 結合タンパク質を溶出する。



Step 5: SDS-PAGE によりタンパク質を分析する。
このとき、単一バンドとして検出される。(データ 1)



Single protein band - no bands from antibody heavy or light chains



データ 1: *E. coli* で発現させた GFP 融合タンパク質を B-PER[®] により細胞から抽出後、ヤギ抗 GFP 抗体を使用して免疫沈降により単離、SDS-PAGE 分析を行った。

- レーン 1: Seize™ X を使用して GFP 融合タンパク質を免疫沈降により単離。単一バンドが検出。
- レーン 2: 従来法を使用して GFP 融合タンパク質を免疫沈降により単離。抗体の H 鎖、L 鎖が含まれている。
- レーン 3: 分子量マーカー (BlueRanger™ Prestained Protein Molecular Weight Markers)

コード No.	メーカーコード	品名	容量	希望納入価格(円)
501-28481	45215	Seize™ X Protein A Immunoprecipitation Kit (内容) ImmunoPure® Plus Immobilized Protein A 1mℓ Binding/ Wash Buffer 1 500mℓ Quenching/Wash Buffer 2 500mℓ Elution Buffer 50mℓ	Sample Loading Buffer 5mℓ DSS Cross-linker 4 x 13.2mg Spin X Cups and Tubes 12本 Collection Tubes 72本	1kit 43,900
504-28471	45210	Seize™ X Protein G Immunoprecipitation Kit (内容) ImmunoPure® Plus Immobilized Protein G 1mℓ Binding/ Wash Buffer 1 500mℓ Quenching/Wash Buffer 2 500mℓ Elution Buffer 50mℓ	Sample Loading Buffer 5mℓ DSS Cross-linker 4 x 13.2mg Spin X Cups and Tubes 12本 Collection Tubes 72本	1kit 49,400
508-28511	45230	Seize™ X Yeast Immunoprecipitation Kit (#45210)+(Y-PER [®] Yeast Protein Extraction Reagent 25mℓ)		1kit 57,000
501-28501	45225	Seize™ X Mammalian Immunoprecipitation Kit (#45210)+(M-PER [®] Mammalian Protein Extraction Reagent 25mℓ)		1kit 57,000
508-28491	45220	Seize™ X Bacterial Immunoprecipitation Kit (#45210)+(B-PER [®] Bacterial Protein Extraction Reagent 25mℓ)		1kit 57,000

〔関連商品〕

コード No.	メーカーコード	品名	容量	希望納入価格(円)
化学発光基質				
536-44191	34080	SuperSignal® West Pico Chemiluminescent Substrate	500mℓ	36,300
532-44193	34079	SuperSignal® West Pico Chemiluminescent Substrate Trial kit	50mℓ	7,300
531-50251	34075	SuperSignal® West Dura Extended Duration Substrate	100mℓ	61,600
537-50253	37071	SuperSignal® West Dura Extended Duration Substrate Trial kit	20mℓ	13,300
534-84551	34095	SuperSignal® West Femto Maximum Sensitivity Substrate	100mℓ	62,500
530-84553	34094	SuperSignal® West Femto Maximum Sensitivity Substrate Trial kit	20mℓ	15,500

コード No.	メーカーコード	品名	容量	希望納入価格(円)
染色試薬 / 分子量マーカー				
527-32915	24590	GelCode® Blue Stain Reagent	500mℓ	10,200
524-79741	26681	BlueRanger™ Prestained Molecular Weight Markers	1 plate (48 well)	17,700
タンパク質抽出試薬				
528-32761	78501	M-PER [®] Mammalian Extraction Reagent	250mℓ	43,900
533-81905	78248	B-PER [®] Bacterial Protein Extraction Reagent	500mℓ	50,500
527-32775	78990	Y-PER [®] Yeast Protein Extraction Reagent	500mℓ	50,500

神経変性疾患における異常リン酸化タウの蓄積

東京都精神医学総合研究所 分子神経生物学研究部門 長谷川成人

はじめに

アルツハイマー病は初老期から老年期にかけて発症する進行性の痴呆症状を主徴とする神経変性疾患である。その病理学的特徴はβアミロイド蛋白からなる老人斑と異常リン酸化タウを主要構成成分とする神経原線維変化(neurofibrillary tangle: NFT)の出現である。老人斑は正常の老化でもかなりの頻度で出現するのに対し、神経原線維変化は痴呆の程度とよく相関し、その本体である異常リン酸化タウの蓄積は細胞の変性と密接な関係があることが示されている。異常リン酸化タウの蓄積病変はアルツハイマー病だけでなく、ピック病(Pick's disease)、皮質基底核変性症(corticobasal degeneration: CBD)、進行性核上性麻痺(progressive supranuclear palsy: PSP)、グアムパーキンソン痴呆複合症、前頭側頭型痴呆など、痴呆

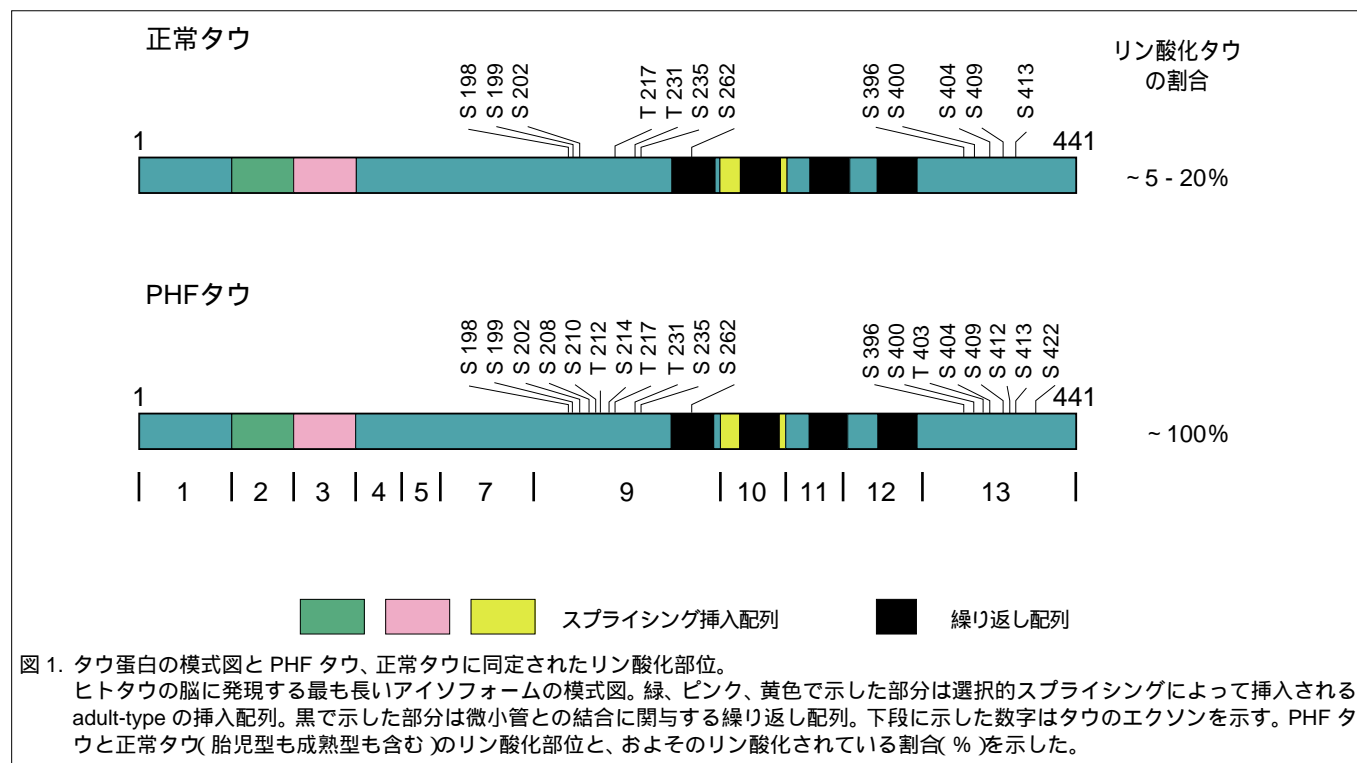
を伴う多くの神経変性疾患にみられる。そのため、タウの蓄積は疾患特異的な病理変化というより二次的変化、神経細胞の変性した後の結果としてとらえられる傾向にあった。しかしながら、1998年に第17番染色体に連鎖するパーキンソニズムを伴う家族性前頭側頭型痴呆(frontotemporal dementia and parkinsonism linked to chromosome 17: FTDP-17)の家系にタウ遺伝子の変異が発見され、タウの異常が神経変性の原因である可能性が考えられるようになって最近注目を集めている。本稿ではアルツハイマー病や他の神経変性疾患における異常リン酸化タウの蓄積について、著者らの仕事を中心に概説し、タウの異常リン酸化とその意味について考察したい。

タウ蛋白と神経原線維変化(NFT)

タウ蛋白は微小管の形成を促進す

る熱に安定な因子として、1975年にWeingartenらによって同定された蛋白質である。1988年にマウス、ヒトのタウのcDNAがクローニングされた。ヒトタウ遺伝子は第17番染色体にひとつ存在するが、選択的スプライシングによって多種類の分子種を発現する。胎児期から幼若期には最も短い分子種が一種類、大人になるとスプライシングによる挿入が加わって6種類のアイソフォームが発現する。C末端側に繰り返し配列があり、この領域を介してチューブリンに結合し、微小管重合促進、安定化に働く(図1)。主に軸索に局在するが、ある割合で細胞内や樹状突起にもリン酸化されて存在する。

1980年代中頃、タウがアルツハイマー病に出現するNFTの構成成分であると考えられるようになり病理生化学的側面からの研究が盛んに行われた。NFTは神経細胞内に蠟燭の炎のような形をした炎型(flame-shaped)



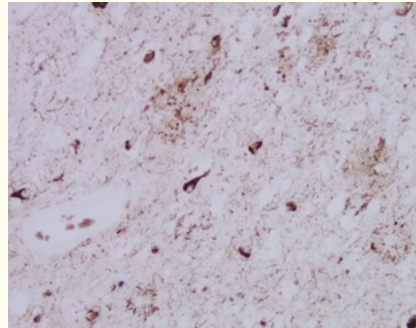
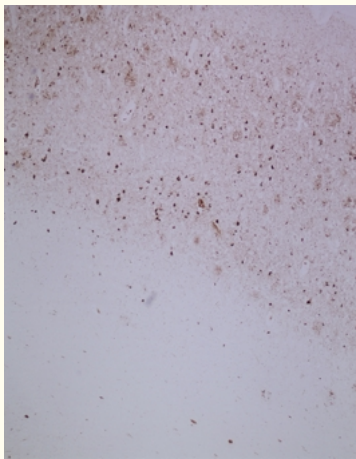


図 2. アルツハイマー病脳組織の抗リン酸化タウ抗体 AP422 による免疫染色。
大脳皮質の 2-3 層、及び 5 層の大形の錐体細胞に炎状や糸玉状の NFT が出現している
像が観察される。同時に NFT に加え、背景をうめるように無数の糸屑様の NT の染色が
観察される。老人斑周囲の変性突起の染色も観察される。A) × 40 倍、B) × 200 倍。

糸巻き状にとぐろをまいたような球型 (globose type) の構造物が出現する変化をさす (図 2)。NFT は正常でも海馬、及び海馬傍回に出現することがあるが、アルツハイマー病では大脳皮質全域にわたって出現し、細胞脱落が見られる連合野の第 3、5 層の大形の錐体細胞に多く見られる。細胞が死滅した後も分解されず残存した細胞外のもは ghost tangle とよばれる。

タウの抗体でアルツハイマー病脳の切片を染色すると細胞内の NFT に加え、背景をうめるように細かい糸屑様の病変 (neuropil threads: NT) や、老人斑の周囲をとりまくように変性した神経突起が染色される (図 2)。これらの変化は、検出感度の高い免疫染色ではじめて明らかとなってきた病変であり、そのほとんどは神経細胞の樹状突起内や軸索内にタウが蓄積しているものである。NFT も NT も電子顕微鏡による観察で、paired helical filament (PHF) とよばれる特異な形態の線維からできていることがわかっている。NFT は細胞体に、NT は樹状突起に形成される PHF の束で、その大きさや太さが異なるものの、構成線維の超微形態は同じであり、生化学的にもタウ蛋白からできている。

PHF を構成する異常リン酸化タウ

では PHF を形成しているタウはどのようなタウか。エピトープが異なる様々なタウの抗体が細胞内の NFT を染めることなどから、全長のタウが PHF として蓄積していることが示されている。一方、細胞が死滅した後も残っている ghost tangle は N 末端側の抗体では染まらず、分解をうけて C 末端側の半分近くのみが残っていると考えられる。In vitro の実験などからも PHF を形成したタウは C 末端側の繰り返し配列部分がプロテアーゼに対して抵抗性をもつことが示されている。また、微小管結合領域のタウの抗体は何も処理をしない PHF や NFT を染めにくく、ギ酸やプロテアーゼ等で処理をすると染色されるようになることから、この部分は線維の中心部に埋もれていると考えられている。

次に蓄積しているタウが何らかの修飾をうけているのかどうか焦点となった。Grundke-Iqbal らは Tau1 という抗体が組織切片をアルカリホスファターゼ処理した場合に限って NFT を染めるようになることを見出し、抗体の認識部位が異常にリン酸化されていることを示した。また、井原らは NFT を精製し、これを抗原に特異抗体

を作製すると、リン酸化タウに対する抗体が得られることを示した。著者は Sarkosyl を使って PHF に富む画分を調製し、それを抗原に特異的なモノクローナル抗体を調製した。得られた二つのモノクローナル抗体の認識部位を決定したところ、ヒトタウの 231 番のトレオニン残基と 396 番のセリン残基のリン酸化を認識することがわかり、これらの部位が PHF 内のタウにおいて高度にリン酸化されていることが示された¹⁾。その後、Sarkosyl を使って PHF を部分精製し、タウの抗体でイムノプロットすると正常のタウよりも電気泳動度の遅いタウが検出されること、その移動度はアルカリホスファターゼの脱リン酸化処理によって変化することが示され、蓄積しているタウは異常にリン酸化されていることが生化学的にも明らかとなった。この異常リン酸化タウは、PHF を構成するタウという意味で PHF タウと呼ばれている。著者は、PHF タウを HPLC で高度に精製し、質量分析とアミノ酸配列分析を行なって正常タウと比較しながら詳細に解析し、PHF タウにおいて 19 箇所部位が高度にリン酸化されていることを明らかにした^{2,3)} (図 1)。

タウは正常でも一部リン酸化されており、特に胎児から幼若期の発達過程でその割合が高いが、PHF タウのリン酸化は質的にも量的にも胎児型タウのリン酸化と異なる高度なリン酸化である。リン酸化の程度は部位によってまちまちであるが、胎児の場合でも全体としておよそ 20% 程度のリン酸化であるのに対し、PHF タウのリン酸化は、100% に近いといつてよい (図 1)。また、質的な違いとしては、Ser422 やモノクローナル抗体 AT100 の認識部位 (Thr212, Ser214) のように胎児型タウにほとんど検出されず、PHF タウにおいて強くリン酸化されている部位がいくつかあるということである^{3,4)}。ただ、正常で全くないということではなく、程度の差が非常に大きいと考える方が自

然である。

タウのリン酸化酵素とリン酸化の意味

タウのリン酸化に関わる酵素としては、これまでの主に *in vitro* の検討から、MAP kinase (mitogen-activated protein kinase)、GSK3 (glycogen synthase kinase 3)、CDK5 (cyclin-dependent kinase 5)、SAPK (stress-activated protein kinase) 等が候補のキナーゼとして考えられている。最近、CDK5 の活性化因子 p25 が AD 脳で増加しているという論文が発表され、AD におけるタウの異常リン酸化機構が明らかになったかと期待されたが、谷口、著者らが、死後経過の短い剖検脳を用いて注意深く解析したところ、AD 脳と対照脳の間で p25 と p35 の比率に違いは認められず、p25 は、死後比較的早い時間に p35 が分解されて生成する死後分解の産物であることが明らかとなった⁵⁾。したがって AD において p35 の分解を介して CDK5 が活性化し、タウが異常リン酸化されるというのは否定的である。

タウの機能は微小管(チューブリン)に結合してその重合を促進すること、また形成した微小管を安定化することであるが、タウがリン酸化されるとその機能は低下する。PHF タウはその異常リン酸化のために、重合促進活性を持たないばかりか、微小管への結合能も失っていることが示されている。タウのリン酸化は病変の初期から見出されること、PHF を構成するタウはそのほとんどが高度にリン酸化されていることを考えると、タウがリン酸化されてから線維化、蓄積がおこると考えるのが自然である。また最近、タウがリン酸化されると、線維化が促進されるという論文も報告されている。したがって AD 脳内では何らかの原因でタウのリン酸化が亢進するような状況があると推察される。

タウ遺伝子の変異とリン酸化

タウの異常は以前から神経細胞死との関係が指摘されていたが、1998 年に家族性を示す前頭側頭型痴呆 (FTDP-17) の患者にタウ遺伝子の変異が発見され、遺伝学的にもタウの異常と神経変性の連鎖が証明された。これまでに、50 をこえる家系から 20 種類以上の変異が報告されている。それらはアミノ酸配列レベルでの変化をおこすミスセンス変異、欠損変異と、アミノ酸配列には影響しないサイレント変異、さらにエクソン 10 に続くイントロン内の変異に大別される。これまでの著者らの検討から、ミスセンス変異の多くは微小管の重合促進能を低下させることが確認されている。また、微小管の重合促進能が低下しないミスセンス変異やサイレント変異、イントロン内の変異は mRNA の選択的スプライシングに影響し、結果として adult-type のアイソフォームの発現の割合を増加させることが明らかになっている。また、FTDP-17 患者すべてにおいてタウの蓄積病変が観察されており、蓄積しているタウは AD の PHF タウと同様に異常にリン酸化されている。このことは、タウ蛋白の機能異常、発現異常がその異常リン酸化、蓄積を導くことを示唆している。FTDP-17 の臨床、病理は多様でタウの蓄積病変が見られる部位や細胞の種類が異なる。アルツハイマー病ではすべてのアイソフォームがリン酸化されて蓄積するのに対し、FTDP-17 は変異によって影響を受ける分子種が主にリン酸化されて蓄積している。また、PSP や CBD、ピック病においても、ある種のアイソフォームが選択的に蓄積していることが示されている。これらの疾患では蓄積するタウの分子種が異なるものの、タウがリン酸化されて蓄積しているという点ではアルツハイマー病と同じであり、なんらかの共通の分子メカニズムが働いてタウが線維化、蓄積してい

るものと考えられる。

おわりに

最近、変異タウを過剰発現するトランスジェニックマウスやショウジョウバエが作製され、線維化したタウの蓄積や神経細胞の脱落が確認されている⁶⁾。これらのモデルはタウの異常リン酸化、線維化機構の解明に重要であるだけでなく、今後、タウの蓄積、神経変性をターゲットとした治療薬のスクリーニングや評価に役に立つものと期待される。

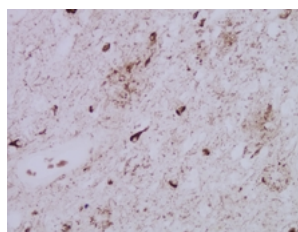
【参考文献】

- 1) Hasegawa M, Watanabe A, Takio K, et al: Characterization of two distinct monoclonal antibodies to paired helical filaments: further evidence for fetal-type phosphorylation of the tau in paired helical filaments. *J Neurochem* 60: 2068-2077, 1993.
- 2) Hasegawa M, Morishima-Kawashima M, Takio K, et al: Protein sequence and mass spectrometric analyses of tau in the Alzheimer's disease brain. *J Biol Chem* 267: 17047-17054, 1992.
- 3) Morishima-Kawashima M, Hasegawa M, Takio K, et al: Proline-directed and non-proline-directed phosphorylation of PHF-tau. *J Biol Chem* 270: 823-829, 1995.
- 4) Hasegawa M, Jakes R, Crowther RA, Lee VMY, Ihara Y and Goedert M.: Characterization of mAb AP422, a novel phosphorylation-dependent monoclonal antibody against tau protein. *FEBS Lett* 384: 25-30, 1996.
- 5) Taniguchi S, Fujita Y, Hayashi S, et al: Calpain-mediated degradation of p35 to p25 in postmortem human and rat brains. *FEBS Lett* 489: 46-50, 2001.
- 6) Lewis J, McGowan E, Rockwood J, et al: Neurofibrillary tangles, amyotrophy and progressive motor disturbance in mice expressing mutant (P301L) tau protein. *Nat Genet* 25: 402-405, 2000.

アルツハイマー病の研究に りん酸化タウ免疫組織染色キット

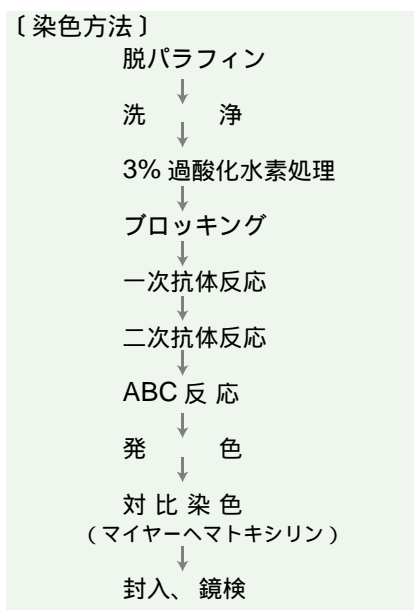
アルツハイマー病脳ではアミロイド斑とならんで神経原線維変化 (neurofibrillary changes) が生じることが知られています。この神経原線維変化は、神経細胞内で neurofibrillary tangles (NFT, 火炎状あるいは糸玉状の線維の塊) や neuropil threads (NT, 糸屑状の構造物) として観察され、細胞死と密接に関連していることが知られています。これらの異常構造物は paired helical filaments (PHF) と呼ばれる線維の束からなり、主成分は異常にりん酸化されたタウタンパク質で、アルツハイマー病だけでなくピック病や皮質基底核変性症、前頭側頭型痴呆 (FTDP-17) など痴呆を伴う多くの神経変性疾患にみられます。本品はこのりん酸化タウタンパク質を特異的に染色する免疫組織染色キットです。

〔表紙写真の説明〕



アルツハイマー病脳組織の抗りん酸化タウ抗体 AP422 による免疫染色。大脳皮質の 2 - 3 層、及び 5 層の大形の錐体細胞に炎状や糸玉状の NFT が出現している像が観察されます。同時に NFT に加え、背景をうめるように無数の糸屑様の NT の染色が観察されます。老人斑周囲の変性突起の染色も観察されます。

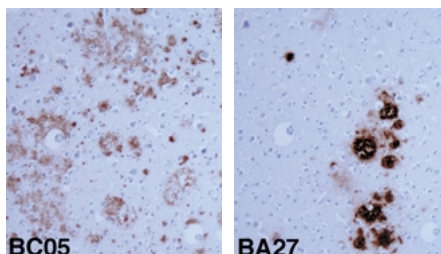
(写真提供: 東京都精神医学総合研究所 分子神経生物学研究部門 長谷川成人先生)



コード No.	品 名	規 格	容 量	希望納入価格(円)
299-57301	Phosphorylated Tau Immunohistostain Kit	免疫組織染色用	100 回用	52,000

アミロイド - プロテイン免疫組織染色キット

アルツハイマー病の代表的な病変である老人斑を構成するアミロイド β -プロテイン ($A\beta$) はアミノ酸数 40 個の $A\beta_{1-40}$ と 42 個の $A\beta_{1-42}$ が主要であると報告されています。本品はこれらの C 末端に特異的なモノクローナル抗体 BA27 と BC05 を組んだ免疫組織染色キットです。



アルツハイマー病脳由来連続切片の染色例

左: Anti A₄₂ (クローン No.: BC05) による A₄₂ の染色
右: Anti A₄₀ (クローン No.: BA27) による A₄₀ の染色

(写真提供: 東京大学大学院薬学系研究科臨床薬学教室 岩坪 威 教授)

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

〔関連商品〕

コード No.	品 名	規 格	容 量	希望納入価格(円)
542-01011	Tau Protein, Human, recombinant, Solution	生化学用	50 μ g	25,000
019-18761	Amyloid β -Protein(1-40) Trifluoroacetate)	生化学用	1mg	36,000
016-18771	Amyloid β -Protein(1-42) Trifluoroacetate)	生化学用	0.5mg	38,000
014-18951	Amyloid β -Protein(1-40) Hydrochloride)	生化学用	1mg	48,000
011-18961	Amyloid β -Protein(1-42) Hydrochloride)	生化学用	1mg	52,000
193-12311	-Secretase Inhibitor (H-Lys-Thr-Glu-Glu-Ile-Ser-Glu-Val-Asn-Sta-Val-Ala-Glu-Phe-OH)	生化学用	1mg	30,000
192-12141	-Secretase Inhibitor, Type	生化学用	1mg	照 会
198-12143	(Z-Leu-Leu-Nle-CHO)		5mg	照 会
190-12321	-Secretase Inhibitor, Type (Substrate-based Difluoroketone)	生化学用	1mg	30,000
182-01591	Roscovitine	生化学用	1mg	6,500
188-01593	(CDK5 Inhibitor)		10mg	34,000

アルツハイマー病の関連タンパク質 APP のリン酸化と代謝制御

北海道大学大学院 薬学研究科 神経科学分野 鈴木 利治

アミロイド前駆体タンパク質 (APP) は、アルツハイマー病 (AD) 患者に特徴的に見いだされる老人斑のタンパク性主成分 β -アミロイド ($A\beta$) の前駆体であり、家族性 AD の原因遺伝子として同定されている¹⁾。 $A\beta$ の生成・分泌・凝集・蓄積は AD 発症機構にかかわると理解されている (アミロイド仮説) が、その詳細な分子機構は未解明な点が多い。APP は生体内で多くの組織に発現しているが、APP の神経細胞特異的な機能・代謝機構を解析することは AD 発症機構を理解する上で重要であると考えられている。

神経細胞における APP 代謝機構の解明を目指す手がかりが、① APP 細胞質ドメインの神経特異的なリン酸化と、② 神経特異的なタンパク質と APP 細胞質ドメインの相互作用である。APP は一回膜貫通型の膜タンパク質であり、ER で生合成後ゴルジ体を経由して細胞膜上に分布するようになる。この分泌過程および細胞膜上からのエンドサイトーシスにより取り込まれた後のエンドソーム内でプロテアーゼ (セクレターゼ) によるプロセッシングを受け、一部の APP から $A\beta$ が生成され細胞外に分泌される (アミロイド生成的代謝)。APP の大部分は $A\beta$ の中央部でプロセッシングされるため $A\beta$ は生成されない (アミロイド非生成的代謝)。アミロイド生成的代謝を受ける APP は少ないが、その割合の増加が神経細胞の変性と関連していると考えられている。家族性アルツハイマー病 (FAD) の原因遺伝子である APP やプレセニリン (PS) の変異は、 $A\beta$ の生成量を増加させる¹⁾。しかしながら原因遺伝子に変異がない場合 (孤発性アルツハイマー病、SAD) では、細胞内 APP 分泌経路の選択・異常等がアミロイド生成的代謝の割合を増加させてい

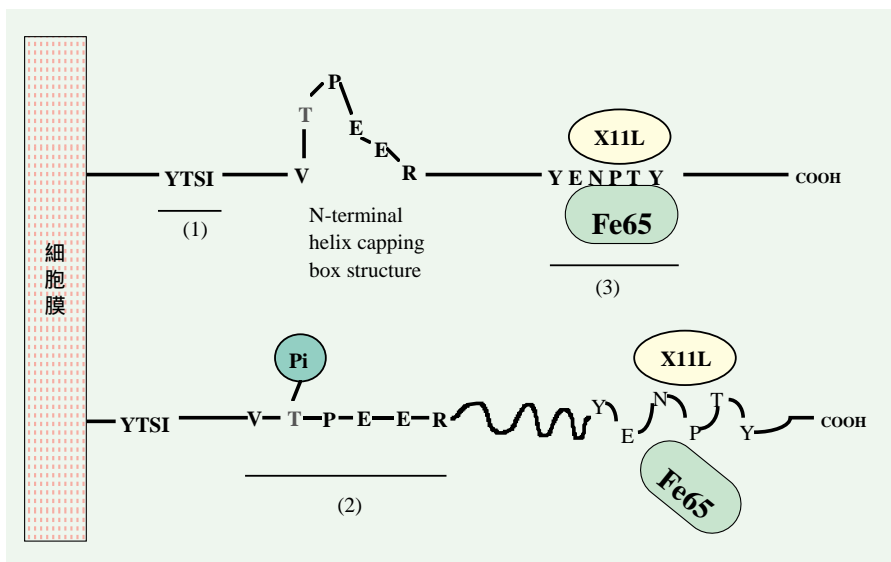


図 1. APP 細胞質ドメインの機能モチーフと結合蛋白質
APP 細胞質ドメインは3つの機能モチーフ(1)-(3)を含む。Piはリン酸基、X11L, Fe65はAPP結合タンパク質である。

ると理解されている。多くの研究者が APP 細胞質ドメインの機能に注目している点はこちらにある。すなわち、細胞内で小胞輸送を受ける APP はその細胞質ドメインが、他のタンパク質と相互作用できる唯一の領域であり、APP 細胞質ドメインと細胞質タンパク質との相互作用が APP の細胞内輸送・代謝・機能を制御している。APP 細胞質ドメインは、3つの機能モチーフを持つ (図 1)。(1) 653-YTSI-656 モチーフ (アミノ酸番号は APP695 アイソフォーム) は、APP の細胞内への取り込み²⁾、または、基底膜へのソーティングシグナルとして報告され、微小管と相互作用可能な PAT1 タンパク質が相互作用を行う³⁾。(2) 667-VTPEER-672 モチーフは、N-terminal

helix capping box 構造を作る⁴⁾。このモチーフ内の Thr668 が APP のリン酸化サイトである。分裂している細胞では、ERに存在するN-型糖鎖修飾を受けたAPP (immature APP [imAPP]) が cdc2 キナーゼにより細胞分裂期に一時的にリン酸化される⁵⁾。その生理機能は明らかではない。神経細胞にお

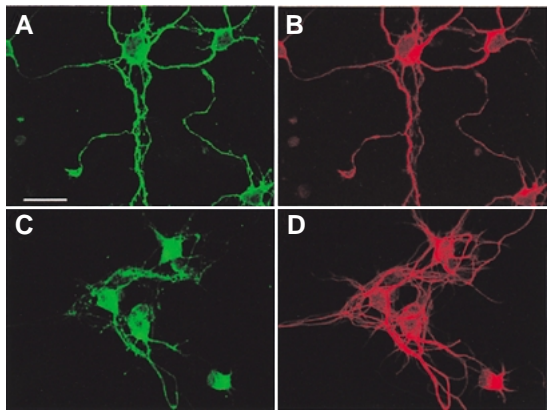


図 2. ラット海馬培養神経細胞におけるリン酸化 APP と APP の分布⁶⁾
A, 抗リン酸化 APP 抗体で染色したもの。細胞膜、神経突起、神経末端にリン酸化 APP の局在が観察できる。C, 抗 APP 抗体による染色。細胞体に APP が多く存在している。B, D は同じ細胞の抗-チューブリン抗体染色。細胞の形態が確認できる。

いては、N-型糖鎖修飾に加えてゴルジ体でO-型糖鎖が付加されたAPP (mature APP [mAPP])が、神経特異的に活性化されるプロテインキナーゼCdk5によってリン酸化され、細胞膜および神経突起に存在するようになる(図2)⁶⁾。神経突起におけるmAPPのリン酸化レベルは神経突起の伸張と共に増加し、リン酸化サイトに変異を導入すると突起の伸張が抑制される⁷⁾。Thr668のリン酸化は、このモチーフの高次構造を変化させるだけでなく、細胞質ドメイン全体の構造変換を引き起こす^{8,9)}。Arg672もAPPのアミロイド非生成的代謝に必要であり、このサイトの変異はアミロイド生成的代謝を増加させる¹⁰⁾。(3)682-YENPTY-687モチーフは、Fe65やX11L等、複数の細胞質タンパク質と相互作用を行う^{11,12)}。APP細胞質ドメインと相互作用しAPPの代謝・Aβの生成を制御している因子のうち、Fe65は、APP細胞質ドメインのリン酸化による構造変換の結果、APPへの結合能が著しく低

下する(図1)⁹⁾。Cdk5は、タウ蛋白質のリン酸化を行いAD患者で観察される神経原繊維変化を引き起こす酵素としても知られており^{13,14)}、Cdk5の活性制御異常がAPPとタウのリン酸化異常を介して神経変性を引き起こしている可能性が考えられている。

[参考文献]

- 1)Price, D., Sisodia, S. S. and Borchelt, D. R. (1998) Science 282, 1079-1083.
- 2)Lai, A., Sisodia, S. S. and Trowbridge, I. S. (1995) J. Biol. Chem. 270, 3565-3573.
- 3)Zheng, P., Eastman, J., Pol, S. V. and Pimplikar, S. (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95, 14745-14750.
- 4)Ramelot, T. A., Gentile, L. N. and Nicholson, L. K. (2000) Biochemistry 39, 2714-2725.
- 5)Suzuki, T., Oishi, M., Marshak, D. R., Czernik, A. J., Nairn, A. C. and Greengard, P. (1994) EMBO J. 13, 1114-1122.
- 6)Iijima, K., Ando, K., Takeda, S., Satoh, Y., Itohara, S., Greengard, P., Kirino, Y., Nairn, A. C. and Suzuki, T. (2000) J. Neurochem. 75, 1085-1091.
- 7)Ando, K., Oishi, M., Takeda, S., Iijima, K., Isohara, T., Nairn, A. C., Kirino, Y., Greengard, P. and Suzuki, T. (1999) J. Neurosci. 19, 4421-4427.
- 8)Ramelot, T. A. and Nicholson, L. K. (2001) J. Mol. Biol. 307, 871-884.
- 9)Ando, K., Iijima, K., Elliott, J. I., Kirino, Y. and Suzuki, T. (2001) J. Biol. Chem. in press [August 21].
- 10)Tomita, S., Kirino, Y. and Suzuki, T. (1998) J. Biol. Chem. 273, 19304-19310.
- 11)Fiore, F., Zambrano, N., Minopoli, G., Donini, V., Duilio, A. and Russo, T. (1995) J. Biol. Chem. 270, 30853-30856.
- 12)Tomita, S., Ozaki, T., Taru, H., Oguchi, S., Takeda, S., Yagi, Y., Sakiyama, S., Kirino, Y. and Suzuki, T. (1999) J. Biol. Chem. 274, 2243-2254.
- 13)Kusakawa, G., Saito, T., Onuki, R., Ishiguro, K., Kishimoto, T. and Hisanaga, S. (2000) J. Biol. Chem. 275 17166-17172.
- 14)Patrick, G. N., Zukerberg, L., Nikolic, M., de la Monte, S., Dikkes, P. and Tsai, L-H. (1999) Nature 402, 615-622.

アルツハイマー病研究用試薬につきましてはp.31をご参照下さい。

-Glucan, Water Soluble

生化学用

β グルカンは、酵母・カビの細胞壁の骨格構造物として、また多くの担子菌子実体(キノコ)の主要な多糖成分

として存在しています。本品は、シイタケ子実体から精製された水溶性のβ-グルカンです。

Source : *Lentinula edodes*

073-04811	10mg	7,000 円
-----------	------	---------

Guanosine 5'-Diphosphate Sodium Salt

生化学用

グアノシン 5'-二リン酸は動物組織中に含まれ、生体内ではATPとGMPからグアニル酸キナーゼにより合成されます。また、ヌクレオシド二リン酸キナーゼによりATPからリン酸を受け

取ってGTPになります。

含 量 : 95.0% 以上(HPLC)

水溶状 : 澄明

貯 法 : 2 ~ 10 保存

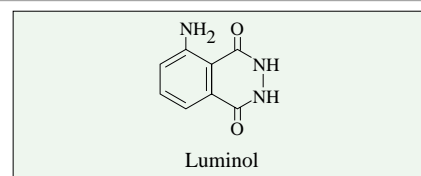
078-04741	50mg	6,000 円
-----------	------	---------

074-04743	100mg	10,000 円
-----------	-------	----------

改 訂

和光純薬時報 Vol.69 No.3 p.31

総説「L-012化学発光による好中球活性化酸素代謝特性の解析」図2のルミノールの構造式は正しくは右図の通りです。



糖尿病研究用 ELISA キット

Rat Glucagon ELISA Kit wako

糖尿病研究用

グルカゴンには膵由来と腸管由来が存在します。膵グルカゴンは主に膵α細胞から分泌されるポリペプチドで、血糖上昇ホルモンとしてインスリンと共に糖代謝調節機構において重要な役割を果たしています。本キットはラット膵グルカゴンを特異的に定量することができます。

〔キット内容〕

- | | |
|--|--------|
| 1) 抗体固定化マイクロプレート
(抗ラット グルカゴン,ウサギ抗体) | 1枚 |
| 2) ラット膵グルカゴン標準品 | 10ng |
| 3) ビオチン化ラット膵グルカゴン | 12ml 用 |
| 4) ストレプトアビジン - HRP 溶液 | 12ml |
| 5) 基質剤 (OPD 錠) | 2錠 |
| 6) 基質溶解液 | 26ml |
| 7) 洗浄原液 | 50ml |
| 8) 緩衝液 (A) | 10ml |
| 9) 緩衝液 (B) | 15ml |
| 10) 反応停止液 | 12ml |
| 11) プレートシール | 4枚 |

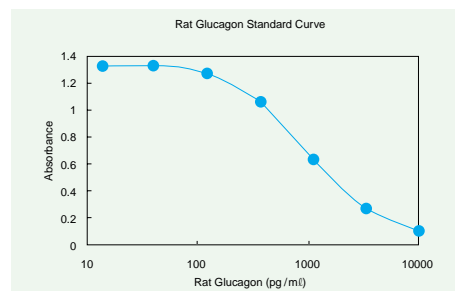
〔性能〕

標準曲線範囲: 50 ~ 10,000pg/ml

測定時間: 約 25.5 時間

検体量: 50μl

特異性: ラット膵グルカゴンを特異的に測定できます。
腸管グルカゴン、GLP-1(グルカゴン様ペプチド)、GLP-2とは反応しません。



297-57101 96 回用 75,000 円

Rat C-Peptide ELISA Kit wako

糖尿病研究用

C-ペプチドは、インスリンの前駆体であるプロインスリンのプロセッシングにより、インスリンとほぼ等モル比で血中に放出されます。血中 C-ペプチド濃度は血中インスリン濃度を反映しており、C-ペプチド濃度の測定はインスリン投与時の膵β細胞機能のモニタリングに有用です。

〔キット内容〕

- | | |
|--------------------------------------|-------|
| 1) 抗体固定化マイクロプレート
(抗ウサギ IgG, ヤギ抗体) | 1枚 |
| 2) ラット C-ペプチド標準品 | 50ng |
| 3) ビオチン化ラット C-ペプチド | 8ml 用 |
| 4) 抗ラット C-ペプチド,ウサギ | 12ml |
| 5) ストレプトアビジン - HRP 溶液 | 12ml |
| 6) 基質剤 (OPD 錠) | 2錠 |
| 7) 基質溶解液 | 24ml |
| 8) 洗浄原液 | 50ml |
| 9) 緩衝液 | 35ml |
| 10) 反応停止液 | 12ml |
| 11) プレートシール | 3枚 |

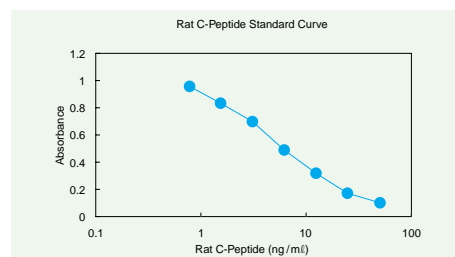
〔性能〕

標準曲線範囲: 1.56 ~ 50 ng/ml

測定時間: 約 5.5 時間

検体量: 50μl

特異性: ラット C-ペプチドを特異的に測定できます。
ヒトをはじめ他の C-ペプチドとは反応しません。



295-57401 96 回用 75,000 円

糖尿病性合併症研究に

Aldose Reductase, Human, recombinant

生化学用

アルドースレダクターゼはグルコースをソルビトールに変換する酵素で、ソルビトールをフルクトースに変換するソルビトールデヒドロゲナーゼとともにグルコース代謝の副路であるポリオール経路を形成しています。アルドースレダクターゼは糖尿病性合併症

の発症への関与が示唆されており、その阻害剤の開発が盛んに行われています。

形状: 5mmol/l DTT、50% グリセリン、50mmol/l リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.0)

分子量: 約 36,000

純度: 95% 以上 (SDS-PAGE)

比活性: 1.5 ± 0.2 units/mg protein

〔参考文献〕

Nishimura, C. *et al.*: *Biochim. Biophys. Acta*, 1078, 171(1991)

547-00581 0.4unit 48,000 円

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

糖尿病モデル作製用

Streptozotocin

生化学用

ストレプトゾトシンは、*Streptomyces achromogenes* から得られる抗生物質で、膵β細胞に対し特異的な細胞毒性をもっており、糖尿病モデル動物の作製に広く用いられています。

外 観：わずかに薄い黄色粉末
溶 解 性：水、エタノール、アセトンに可溶
毒 性：LD₅₀ 264 mg/kg(マウス経口)

549-00281	100mg	3,500円
545-00283	500mg	8,500円
543-00284	1g	15,000円
549-00286	5g	45,000円

スタチン系薬剤 / HMG-CoA レダクターゼ阻害剤

HMG-CoA レダクターゼ阻害剤は、体内でのコレステロール合成に必要な酵素を特異的に抑制し、血液中のコレステロールを低下させます。また、ファネルピロリン酸の産生を抑えることにより、抗がん作用を示すと考えられています。さらに、最近では骨形成の促進も報告されており、その多様な作用に注

目が集まっています。

コード No.	品 名	規 格	容 量	希望納入価格(円)
193-12051	Simvastatin	生化学用	25mg	13,000
199-12053			100mg	39,000
162-19821	Pravastatin Sodium Salt	生化学用	25mg	13,000
168-19823			100mg	39,000
125-04581	Lovastatin	生化学用	25mg	17,000
033-17301	Compactin	生化学用	25mg	19,000

Rat Leptin ELISA Kit wako

肥満研究用

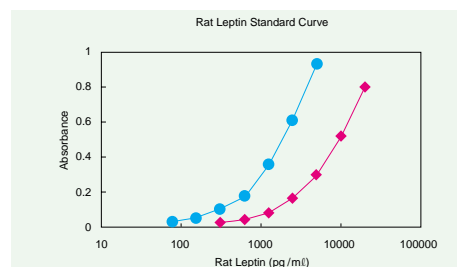
脂肪細胞から分泌されるレプチンは、摂食抑制やエネルギー代謝の増大を介して体脂肪量の調節などを司るホルモンです。レプチンは摂食抑制という生理作用を持ちますが、一般肥満者や肥満モデル動物では脂肪組織でのレプチン遺伝子の発現及び血中レプチン濃度は、逆に亢進していると最近報告されています。

〔キット内容〕

- 1) 抗体固定化マイクロプレート (抗ラットレプチン,モノクローナル抗体) 1枚
- 2) ラットレプチン標準品 20ng
- 3) HRP 標識抗体 (HRP 標識抗ラットレプチン,ウサギ) 6ml
- 4) 基質剤(OPD 錠) 2錠
- 5) 基質溶解液 24ml
- 6) 洗浄原液 50ml
- 7) 緩衝液 20ml
- 8) 反応停止液 12ml
- 9) プレートシール 2枚

〔性能〕

標準曲線範囲：78.1 ~ 5,000 pg/ml(培養上清)
312.5 ~ 20,000 pg/ml(血漿、血清)
測定時間：約 5.5 時間
検体量：10μl または 50μl
特異性：ラットレプチンを特異的に測定できます。
ヒトレプチンとはほとんど反応しません。



297-57601 96 回用 61,000円

タンパク質の電気泳動に

ポリアクリルアミド-プレキャストゲル(7.5%、10%、2-15%、4-20%)

電気泳動用

本品は、ポリアクリルアミドのプレキャストゲルです。ゲル中に SDS (Sodium Dodecylsulfate) が含まれていませんので、Laemmli 法による SDS-PAGE と Native-PAGE の両方に使用できます。

〔特 長〕

分解能が良く、シャープなバンドが得られます。
保存安定性が良く、使用期限は製造日から 12 ヶ月です。

〔仕 様〕

プレートサイズ.....100(H)× 100(W)× 3.2(T)mm
ゲルサイズ.....90(H)× 83(W)× 1(T)mm
ウェル数.....12 ウェル

〔泳動条件(SDS-PAGE)〕

サンプルバッファー：Laemmli 法サンプルバッファー

泳動バッファー：トリス/グリシン/SDS

電荷：200V 定電圧または 50mA 定電流

(200V 定電圧を推奨します)

泳動時間：表 2 参照

染色：CBB 染色、銀染色

〔ゲルの選択〕

SDS-PAGE では表 1 に基づき、サンプルのタンパク質の分子量に応じてゲルを選択下さい。

〔泳動時間〕

Laemmli 法による SDS-PAGE での泳動時間を表 2 に示します。

表 1

ゲル濃度	分子量(SDS-PAGE)
7.5%	5万～20万
10%	3.5万～15万
2-15%	3万～50万
4-20%	1万～20万

注)Native-PAGE ではサンプルの荷電状態により移動度が変わりますので各々のサンプルでご確認下さい。

〔貯 法〕 2～10 (凍結厳禁)・遮光保存

コード No.	品 名	容 量	希望納入価格(円)
163-20721	7.5% Polyacrylamide-precast Gel	10 枚	15,000
166-20711	10% Polyacrylamide-precast Gel	10 枚	15,000
169-20701	2-15% Polyacrylamide-precast Gel	10 枚	15,000
166-20691	4-20% Polyacrylamide-precast Gel	10 枚	15,000

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、医療用等他の用途には用いられません。

コード No. が 54*-***** の商品は、Wako Chemicals USA, Inc. で製造されたものです。

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。



商品のコームは白色です。

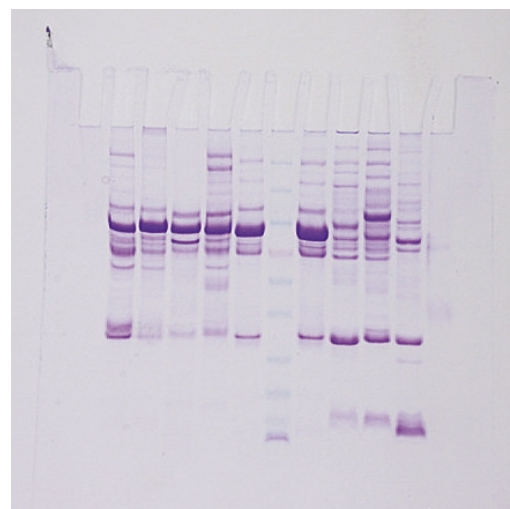


表 2

ゲル濃度 \ 電荷	定電圧		定電流	
	200V	150V	50mA	40mA
7.5%	50分	60分	40分	60分
10%	50分	70分	60分	70分
2-15%	50分	70分	60分	70分
4-20%	50分	80分	60分	80分

注)泳動時間は目安であり、室温・泳動条件により異なります。

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10月15日
発行責任者 岸井松司
編集責任者 大西礼子
印刷所 共進社印刷株式会社