

和光純薬時報

和光純薬工業株式会社

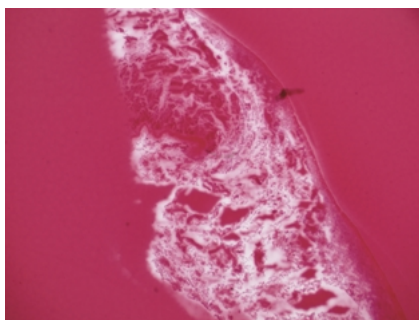
MMP 活性の局在検出法 MMP *in situ* Zymo-Film MMP-PT *in situ* Zymo-Film

MMP *in situ* Zymo-Film には特殊処理されたゼラチンがコートされており、プロテアーゼにより分解されたゼラチンの消化痕を可視化することにより、凍結組織切片や新鮮細胞の MMP (Matrix metalloproteinase) 活性を簡単に検出することができます。がんの浸潤・転移、リウマチ、動脈硬化薬などの研究にご利用下さい。

キット内容	Zymo-Film	50 枚
	Holder	2 個
	Coverfilm	52 枚

- 特長**
- 従来、不可能であった組織中の MMP 活性の局在を検出することができます。
 - MMP *in situ* Zymo-Film は、MMP 類、トリプシンを始めゼラチンを基質とする種々のプロテアーゼ活性を検出することができます。
 - MMP-PT *in situ* Zymo-Film のゼラチン膜には 1,10-フェナントリン (MMP 阻害剤) が含まれており、プロテアーゼ活性が MMP 由来かどうか確認することができます。
 - 他法との組合せにより、MMP の種類を特定することができます。

〔検出例〕 マウス小腸



ビープリッヒ・スカーレット/ヘマトキシリン染色

コード No.	品名	規格	容量	希望納入価格(円)
295-58001	MMP <i>in situ</i> Zymo-Film	生化学用	50 回用	25,000
291-58101	MMP-PT <i>in situ</i> Zymo-Film	生化学用	50 回用	35,000

詳しくは、p.9 をご参照下さい。

目次

化学大家

「ライナス・ポーリング」 島尾 永康2

総説

「In situ zymography 法によるマトリックスメタロプロテアーゼの活性測定」

根守 良一6

「プロテオーム解析」 和田 芳直10

シリーズ

< Talking of LAL >

「第 47 話 エンドトキシン試験の国際調和」

土谷 正和16

< How to 組織イメージング >

「第 7 回 非上皮性腫瘍(4)平滑筋の腫瘍」

石川喜美男、三瓶 接子、宮 哲正、

久川 芳三、牛込新一郎18

< 脳科学一口メモ >

「脳虚血ストレスによるニューロン死惹起機構」

上原 孝、野村 靖幸22

テクニカルレポート

「電気泳動ゲルのネガティブ染色からウエスタン

ブロットイングまで ネガティブゲル染色

MS キットの染色応用例」

河野 直幸13

新製品フラッシュ

MMP *in situ* Zymo-Film、MMP-PT *in situ*

Zymo-Film1,9

CDL 社ビルディングブロック、各種ライブラリ

製品5

ネガティブゲル染色 MS キット、日本油脂(株)

ブロッキング試薬、ヘルオキシダーゼ安定化

試薬12

(株)ニッポンジーンテック CUGA™ シークエン

シングキット14

DNA ステップラダーミックス(80-10kbp)、T7

RNA ポリメラーゼ、組換え体、溶液、ポリ A ポリ

メラーゼ、RNase H、組換え体、溶液.....15

Genzyme Techne 社 マウス OPG、RANKL

ELISA キット17

ビクトリアブルー液20

スルフレチン、フコステロール、グラブリジン ...21

iNOS ウエスタンプロットキットクォー、PARP

ウエスタンプロットキットクォー.....23

BTF 社 イージーステイン C&G FITC、カラー

シード CG-100、イージーシード CG-100...24

環境分析用標準品、ダイオキシン類分析用デ

カン、農薬標準品25

骨形成因子 BMP26

SM 試薬27

残留農薬・PCB 試験用溶媒 5,000 倍濃縮保証

品28

ライナス・ポーリング (1901.2.28 ~ 1994.4.19)

科学史家 島尾 永康

恵まれない環境からの出立

ライナス・ポーリングは1901年2月28日、オレゴン州ポートランドで生まれた。長男で、妹が2人いた。曾祖父はドイツからの移民である。父はセールスマンで、後に薬局を営んだが、ライナスが9歳のとき死去した。病身の母はライナスが高校を出るとすぐ実務について家計を助けることを望んだが、その意に反して、学費の要らないオレゴン農工大学の化学技術課程へ進学した。上級生になったとき、かれの経済状況を知った教授の配慮で、1年間の契約で下級生に定量分析を教えた。その中の一人、エイヴァ・ヘレン・ミラーと後に結婚した(1923)。働きながらの勉学だったが優等卒業だった。教授たちの勧めによって大学院に進むことにした。まだ無名のカリフォルニア工科大学(カルテックと略称される)を選んだ。物理化学者、アーサー・ノイズ(“アーサー王”というニックネームをつけられていた)の指導のもとで次第にアメリカ有数のリサーチ・スクールへと発展していくことになる。ここでは専任のアメリカ人教授以外に、外国からボーア、ゾンマーフェルト、アインシュタイン、デバイ、ランジュヴァンなど有名な学者たちが訪れて講義した。化学志望のポーリングだが、ノイズの熱力学以外すべて物理学を聴いた。X線回折に興味を抱き、「モリブデナイトの結晶構造」(1923)が最初の論文となった。1925年にPh.Dを取得すると、特権的なグッゲンハイム奨学金によって1年半、ヨーロッパに留学した。ミュンヘンのゾンマーフェルトに師事し、そこを拠点として、ボーアや波動力学を発表したばかりのシュレーディンガーに会った。量子物理学の成立の現場に立ち会う留学となった。

化学結合論

1927年にカルテックに戻ると理論化学の助教授として量子力学の講義を始めた。学生は600人、うち大学院生は100人になっていた。ポーリングの講義は有名だった。陽気な、冗談交じりの講義振

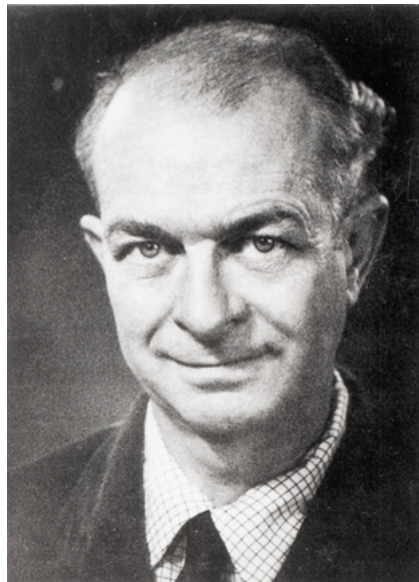


図1. ライナス・ポーリング(60歳代前半)

りで、好んで名演技をやったのけたり、学生を爆笑させたりした。それから約10年間に、雲母や複雑なケイ酸塩など60種の鉱物の構造を解析して、イギリスのL. ブラッグと張り合う専門家となった。当時、複雑な分子のX線回折像からの構造決定は容易でなかった。ポーリングは構造解明のための規則を作り、それにもとづき、想像力を駆使して得意のモデル作りをおこなった。

ポーリングの最大の業績は波動力学を化学結合に応用した原子価結合法である。ヨーロッパのW. ハイトラーとF. ロンドンが、水素分子を初めて量子力学的に論じてポーリングに大きな衝撃を与えた。アメリカ人、J. スレーターも炭素原子の電子の形を扱った。かれらはいずれも物理学者で、化学に詳しくなかった。複雑な分子への波動力学の適用を目指したポーリングは、共鳴概念にもとづく混成軌道という着想を得て、数学ぎらいの化学者にも理解できる、近似的で、半経験主義的な結合理論を展開した。結合の方向性、共有結合の部分的イオン性などの概念も導入した。当時これほど波動力学と化学を結び付けられたのは、両方に精通していたポーリングだけだった。混成軌道を始めて発表した論文「化学結合の本性」(1931)で、アメリカの最

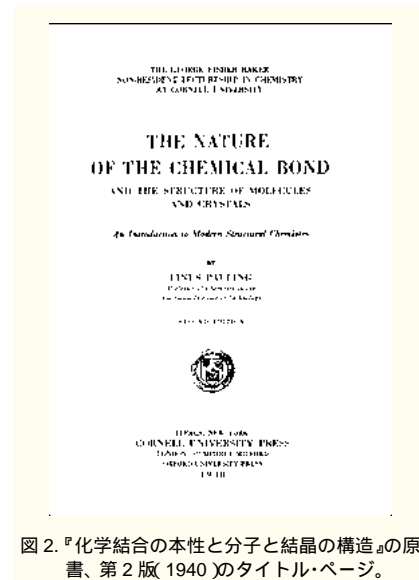


図2. 『化学結合の本性と分子と結晶の構造』の原書、第2版(1940)のタイトルページ。

も有望な若手化学者に与えられるラングミュア賞の最初の受賞者となった。36歳のとき、世界の一流の化学者を招いたコーネル大学のG. F. ベイカー講座に招かれてまとめたのが、古典的名著、『化学結合の本性と分子と結晶の構造』(1939)である(図2)。しかし冷戦時代には、ソ連の化学者たちから、ポーリングの共鳴理論は観念論的で資本主義的であると批判された(1953)。一方、国内では、より複雑な多電子系に適用できるR.S. マリケンの分子軌道法の支持者たちから攻撃された。このような情勢下、1954年、ノーベル化学賞がポーリングの化学結合論に対して与えられた。かれは受賞講演でこれらの論敵に激しく反論し、自己の共鳴理論を擁護した。

分子生物学の開拓

ポーリングが生体分子の形と大きさに注目するようになったきっかけは、鉱物結晶学の研究費申請が通らず、ロックフェラー財団に出した生化学、医学の研究費申請が通ったことである(1934)。ヘモグロビンの磁性性について見事な研究をおこなった。呼吸によって酸素はヘモグロビンと強く共有結合をし、それが動脈血を反磁性にし、静脈血を常磁性にすることを明らかにした(1935)。ヘモグロビンはタンパク質であるから、これよりタ

ンパク質一般に興味をもつようになった。タンパク質分子はらせん状であると早くも指摘し、その形を安定させているのは水素結合と弱い分子間力であり、これらの結合が切れるとタンパク質は変質すると論じた(1936)。

1936年に“アーサー王”ががんになったとき、後継者問題がおきた。かれは年功よりも科学的独創性とそれによって資金を引き寄せる手腕を重視し、性格上の欠点を知りぬいたうえでポーリング以外に後継者はないと考えた。しかしポーリングに反感をもつものも少なくなかったし、学長 R.A. ミリカンは、ノイズの希望ではあるが、ポーリングは部長には若すぎると考えて任命しなかった。そこへ有力な人物が仲介に入った。ロックフェラー財団の科学部長、W. ウィーヴァである。かれはポーリングに特別な関心をもち、すでに多額の研究費を与えて、鉱物からタンパクへとポーリングの興味を転換させていた。ポーリングに分子生物学の発展を期待したのである。ニューヨークからはるばる列車でパサデナにやってきて、学長とポーリングのそれぞれと話し合った。1937年、ポーリングは36歳の若さで年長の同僚たちをさしおいて化学部門の部長に任命された。

ポーリングはロックフェラー医学研究所の K. ランドスタイナーから免疫化学へと導かれ、抗原抗体反応に魅せられた。抗原タンパク質分子がある独特の立体的配列を取り、それが特定の抗体への特異性を与える。したがって抗体分子と抗原分子の相互作用の特異性はそれらの構造の相補性によるのであり、分子の形と構造の相補性こそ分子生物学の中心原理であるとした(1940)。

戦時中は、普通の気体のうち酸素だけが磁石に引かれるという事実を利用して、当時緊急の問題となっていた潜水艦や飛行機中の酸素量の正確な測定器を考案した。戦争末期には鎌状赤血球貧血症という黒人のアメリカ人に多い遺伝病に興味をもった。この患者の血液の細胞が酸素の含有量の少ない静脈血では平たい円盤ではなくて鎌の形になることに気付き、それはその細胞のヘモグロビンのタンパク質部分の遺伝的な変異によっておこることを証明した(1949)。それまで病気の原因が一つの分子の変化にまで辿られたことはなかったので、か

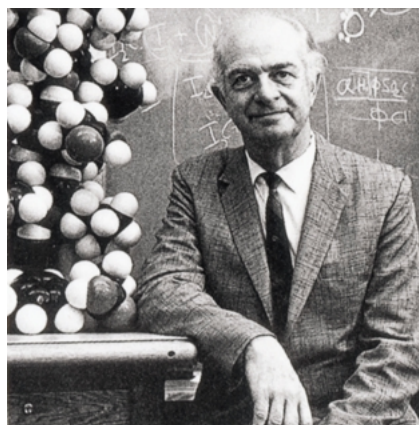


図3. 得意の分子模型とポーリング(カルテクの教室で)。

れはこれを史上初の“分子病”とした。タンパク質には、巻き方がきついらせんと、ゆるいらせんの2つのらせん構造があることを発見した(1951)。らせんは多くのタンパク質の重要な成分であることも明らかにした(図3)。

三重らせん

ポーリングが遺伝子の本体であるDNA分子の構造と取り組んだのはわずか1ヶ月ほどである。かれが発表したのは、3本のひもが燃り合わさり、その中央には磷酸グループが三角形に配置され、種々の塩基が外に向かって突き出しているDNAの三重らせん構造である(コーリと共著、1953年2月)。その直後、ケンブリッジ大学で研究していた25歳のアメリカの生物学者 J.D. ワトソンと、37歳のイギリスの物理学者 F.H. クリックが、DNAの二重らせん構造を発表した。それは構造的に正しいのみならず、DNAの複製機構の発見でもあった。ポーリングは直ちにそれが正しい事を率直に認めた。しかし生体分子はらせん構造であり、その形を保っているのは水素結合であるというポーリングのアイデアと、構造の相補性という、これまたポーリングのアイデアが、ワトソンとクリックの自己複製機能をもつ二重らせん構造の決定の鍵となったことは確かである。モデル作りによる構造決定もポーリングのやり方を入念に真似たのである。女性物理学者ロザリンド・フランクリンの重要な役割も無視できない。彼女が撮った湿潤型のDNA結晶の、精密なX線写真がワトソンらに重要なヒントを与えたのである。DNAに失敗した翌年、ポーリングにノーベル化学賞が与えられた。化学結合

論に対してとなっていたが、らせんの発見までの全業績に対して与えられたのであろう。DNAの失敗はポーリングのプライドを深く傷つけ、生涯これを遺憾とし、その後二度と巨大生体分子の構造を解こうとしなかった。1961年には、ヘモグロビン分子の差異は進化の程度の差異であり、ヘモグロビン分子の変化から進化を迎えるという重要な発見をした。現在これはDNAでおこなわれている。

反核平和運動

ポーリングが政治に関心をもつようになったのは、政治に積極的な、左翼的な家庭の出身である夫人エイヴァの影響である。アメリカ政府が強硬な反共政策を採っていたとき、かれは脅しに屈せず勇気ある発言をした。1949年、アメリカ化学会会長に就任すると、政府の反共政策が有能な教授や若者を大学から追放し、科学から人材を奪っていると、下院の非米活動委員会を公然と非難した。この発言は物議をかもし、FBI(米国連邦捜査局)に共産党員ではないかと調べられた(党員ではなかった)。1945年に日本に原爆が投下されると、科学者は研究だけでなく、社会的責任を自覚しなければならぬと考えた。1952年に水爆実験が始まると、研究そっちのけで反核運動に専心し、水爆実験の死の灰と、放射能バックグラウンドの増加が健康に与える影響を憂慮した。その増加はわずか1%という政府見解を認めはしたが、もし毎年世界中で生まれる150万人の欠陥児のすべてがそれによって生じているとすれば、放置できない問題であると考えた。がんの発病も増加していた。1958年1月、ポーリング夫妻は、49カ国から11000人以上の科学者の署名を集めて、大気圏核実験廃止の請願書を国連事務総長に提出した。実験を無害と主張する科学者、E. テラーとはテレビで公開論争した(2月)、『ノー・モア・ウォー』(1958)という一般向けの書物で、死の灰の危険性を強調した。ノーベル賞受賞者である上に演説の名手で、強い説得力があったポーリングが運動の中心人物となった(次頁 図4)。保守的なカルテク当局はこのような政治活動を喜ばず、かれは21年間務めた化学部門の部長を辞任させられた(1958)。ポーリングは反核平和運動のために、大きな代価を払っ

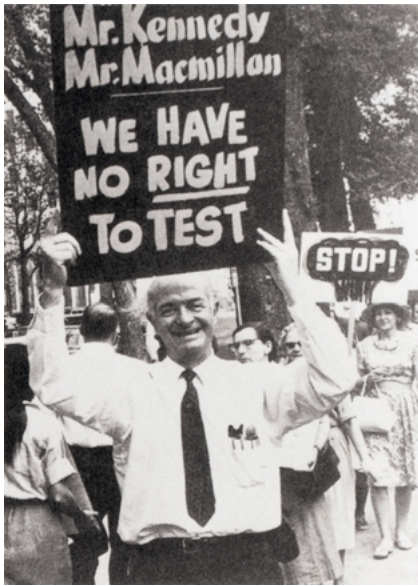


図4. ケネディー大統領に招かれて晩餐会に出席する直前、ホワイトハウス前で核実験反対デモに参加したポーリング(1962)。

た。FBIに24年間も調査された。パスポートは何度も発行を拒否された。マスコミから攻撃された。政府上院で喚問されたときは、投獄の恐れさえあった。政府への研究費申請は何度も拒否された。そして大学の地位を次々に失っていった。

しかしかれの努力はついに実を結び、アメリカとソ連政府が部分的核実験停止条約に調印し、それが発効した1963年10月10日、ポーリングは1962年度のノーベル平和賞を与えられた。単独で二度もノーベル賞を受賞したのはポーリングだけである(図1)。祝福の言葉が世界中からきたが、カルテクの学長はこの受賞には前回の化学賞のときとは打って変わった冷淡な対応を示し、ポーリングはカルテクで急速に孤立していき、ついに32年間在職した教授を辞任して、サンタ・バーバラの民主制研究センターに移った。そこには実験室はなかったの、カリフォルニア大学サンディエゴ校に客員教授として移り(1967)、さらにスタンフォード大学に移ったが(1969)、いずれも学生にベトナム戦争に抗議するよう熱心に説いたので辞任させられた。平和運動への闘志は90歳になっても衰えず、アメリカがイラクとの戦争に突入することに反対する意見広告を、『ニューヨーク・タイムズ』に自費で出した(1991)。

ビタミンC大量摂取の効用

1965年以後、晩年のポーリングがビ

タミンCの大量摂取が、健康を増進し、老化を防ぎ、ある種の病気の薬にもなるという、ゆるがぬ信念をもったのは、それがかつての生体分子の相補性の発見にも匹敵する重要な発見と信じたからである。かれの講演を聞いたI.ストーンという生化学者が、ビタミンCの大量摂取でウィルス性の病気、がん、心臓病を防ぐことができるという手紙をよこした。ポーリングはこの革新的な考えに強い印象を受け、それ以来夫妻は必要量の100倍の3000mgを毎日摂取したところ、健康状態が著しく向上し、風邪を引く回数も激減した。そこでポーリングは論文を『サイエンス』誌に送ったが拒否された。しかし『ビタミンCと風邪』(1970)という一般向けの本はベストセラーとなり、全国でビタミンCの販売量が急増し、1970年代半ばには5000万人が余分のビタミンCを毎日摂取するようになった。しかし栄養学者や医師や科学者の多くは、ポーリングを自分の専門からはみ出した老いぼれのノーベル賞学者、えせ栄養学者、変わり者などと非難した。批判されると、いよいよ頑なに自己の信念に固執し、平和運動で政敵に対して見せた痛烈さで対決した。このような研究に没頭し、おまけにベトナム戦争に抗議するよう学生を説得したので、スタンフォード大学当局は困惑して辞任を勧告した(1972)。

そこで門下生A・ロビンソンとともに、健康問題とビタミンCの効用を専門とするライナス・ポーリング科学・医学研究所を設立して研究を続行した(1973)。ビタミンCの大量投与ががんに効くと主張した、『がんとビタミンC』(1979)もベストセラーとなったが、がん研究で世界的名声をもつメイヨー・クリニックが否定的な論文を発表したのはは落胆した。妻エイヴァは胃がんになったが、医師の薦めた化学療法は受けず、ビタミンCの摂取量を1日10000mgに増やして持ち直したが、1981年に死去した(図5)。

徐々に若い世代の研究者たちが新しい見地からビタミンCを再検討し、抗酸化剤としての能力を研究し始めた。この情勢を見て国立がん研究所がビタミンCの国際会議の開催を後援したのは1990年である。ビタミンCの大量摂取ががんの予防効果があるという臨床例も

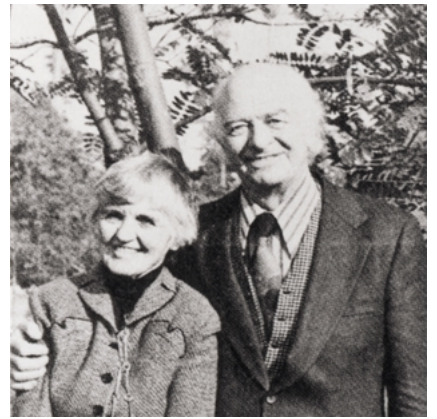


図5. 晩年のポーリング夫妻。夫人に励まされて、ポーリングは世界中で500回以上の核実験反対の講演をした。



図6. 晩年のポーリング(80歳代後半)。

報告され始め、長寿効果も認められた。ポーリングが90歳代になって初めて学界はかれの長年の主張を少しずつ認め始めた。しかし90歳で直腸と前立腺のがんと診断され、手術を受け、ビタミンCの大量摂取もしたが、1994年、93歳で亡くなった(図6)。反核平和運動のゆえに、その世界的名声にもかかわらず次々に大学の地位を失っていったのは、ポーリングの良心と気骨を示すとともに、またそれはアメリカ、とくに冷戦時代のアメリカがどのような国だったかをも示している。

〔主要参考文献〕

T.Hager, *Linus Pauling and the Chemistry of Life*, Oxford University Press, 1998.; T. ゲーツェル, B. ゲーツェル, 石館康平訳, 『ポーリングの生涯』, 朝日新聞社, 1999.; L.K.James, ed. *Nobel Laureates in Chemistry 1901-1992*, American Chemical Society, 1993.; J.D. ワトソン著, 江上不二夫, 中村桂子訳 『二重らせん』 1986.; 村田晃訳, 『ポーリング博士のビタミンC健康法』, 平凡社, 1995。

Chemical Deversity Labs, Inc. (CDL) 社

Chemical Deversity Labs, Inc. ビルディングブロック、各種ライブラリ製品

新開発ビルディングブロックの製品を発売します。特にユニークな構造を有し、従来入手できなかった化合物を多数準備しております。CDL 社は、米国カリフォルニア州 San Diego に本社を置くライブラリ製品のメーカーですが、他社にはできない高度な合成技術を有しております。製品は主に、コンピューターケミストリを駆使して開発されており、その内容は新薬開発を迅速化できるように設計されてます。更に、カスタム合成に対する技術力は高く、是非お試しください。

1. ビルディングブロック製品

約 1,400 ~ 1,800 化合物

〔特長〕

- 臨床応用が報告された構造に関連させた製品
- 既存特許権外に展開できるような構造を採用
- 25g から 100g 程度のバルク生産への対応が可能
- 特注で特定の構造群の提供が可能
- 95-98% 以上の高純度を NMR、HPLC、LC-MS で保証

製品リストは、電子データ (ISIS.base ファイル) フロッピーディスクまたは CD-ROM を準備しておりますのでご請求下さい。
なお製品リストの紙へのハードコピーもご要望の向きに応じて配布します。

納期：当社在庫品.....既納

メーカー在庫品.....2 ~ 8 週間程度

電子データ内容：メーカーコード、構造式、分子式、分子量、clogP(水/オクタノール分配係数)

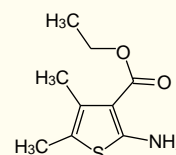
製品例：Ethyl 2-amino-4,5-dimethylthiophene-3-carboxylate

メーカーコード：1530-0169

Formula：C₉H₁₃NO₂S

M.W.：199.273

clogP：1.8929



コンビブロック製品は、当社独占販売です。

各製品	250mg	15,000 円 ~
	1g	50,000 円 ~

2. ライブラリ製品群

- CombiLab 'Probe' Libraries (11 .5 万化合物)
Probe と称するテンプレートになる構造で収集
- International Diversity Collection (17 .4 万化合物)
一般的な内容
- Natural Products (9,836 化合物)
天然物由来の化合物
- Private Heterocyclic Structure (10,000 化合物)
複素環化合物のみの内容

製品リストは、電子データ CD-ROM を準備しておりますのでご請求下さい。

電子データ内容：メーカーコード、構造式、分子式、分子量、clogP(水/オクタノール分配係数)
(化合物名はありません)

ISIS.base と ISIS.draw のソフトが必要です。

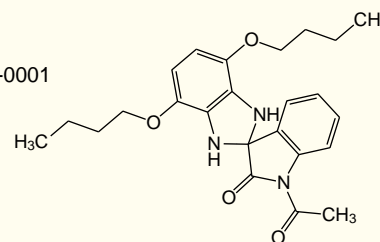
製品例：

メーカーコード：000A-0001

Formula：C₂₄H₂₉N₃O₄

M.W.：423.516

clogP：4.7263



バルク合成：100g 以上のバルクも迅速対応できます。

容量特注：mol 単位表示での分注出荷も特注で対応可能です。

CD-ROM の内容

“ Building Blocks ” (BBlocks_1807.db)

コンビブロック製品

(拡張子 db は以下 ISIS.base ファイル)

“ CombiLab 'Probe' Libraries ”

1. Clab.115837.db (115,837 件のテンプレート製品)

2. CL.213.pdf (adobe)

3. file：CL.Lists-many“.lst”files

4. file：CL.mol-many“.mol”files

“ International Diversity Collection ”

IDC_174467.db

“ Natural Products ”

1. Nat.639.db (639 件の天然由来製品)

2. Semi_Nat_9197.db (9,197 件の準天然由来製品)

“ Principal Heterocyclic Product ”

10000.db (10,000 件の複素環誘導体製品)

In situ zymography 法によるマトリックスメタロプロテアーゼの活性測定

富士写真フイルム株式会社 足柄研究所 根守 良一

はじめに

マトリックスメタロプロテアーゼ (MMP) 類を始め、多種のプロテアーゼ群が生体組織内局所において生理的あるいは病的に機能を発現している。例えば組織の発生や再構築、血管新生、月経時の子宮内膜機能層の脱落、活性化した精子頭部、創傷治癒等の組織の修復、炎症、自己免疫疾患、動脈硬化、刺激による皮膚の老化、腫瘍、歯周病などでの発現が知られている。これらの生理的あるいは病的な現象を理解し対策を立てるためには組織におけるプロテアーゼの働きを理解することが必要であるが、そのためにはプロテアーゼ「活性」の発現状態を知ることが重要と考えられる。

Fig.1 に MMP の例で示すように、ほとんどのプロテアーゼは mRNA から前駆体 (pro) 型のタンパク質として合成されて細胞外に分泌され、その後

一部のペプチドが切り取られることによって活性型のプロテアーゼとなる。さらに組織中には各プロテアーゼに対して阻害作用を持つタンパク質が分布し、活性型のプロテアーゼと結合することにより活性を阻害する。そのため、プロテアーゼ分子に対応する mRNA を検出したり抗体を用いて pro 体のタンパク質を検出したとしても、その量の大小は必ずしも活性の大小に反映されない。活性型プロテアーゼ分子もその阻害タンパク分子も生体内で均一に分布しているわけではなく、それぞれが不均一に局在しているためさらに事情は複雑である。それ故プロテアーゼ活性が組織内で本当に発現しているかどうかを知るためには、組織局所における活性を直接調べなければならない。それを実現する手段としては、レーザーマイクロダイセクションにより組織の微小部分を切り取りホモジナイズして活性を測定するか、

組織の凍結切片を作製して in situ zymography により活性の分布を調べるかの 2 つの手段が考えられるが、空間分解能、感度、簡便性において後者が優れている。このため in situ zymography によるプロテアーゼ活性の測定技術が色々工夫されてきており、本稿ではそれらについて簡単に触れると共に、我々が開発した架橋ゼラチン膜を用いる film in situ zymography 法について基礎データおよび応用例を紹介したい。

In situ zymography 法とは

In situ zymography は、組織の凍結切片や生の細胞を基質薄膜に密着させて反応させることにより組織内のプロテアーゼ活性の局在を調べる方法である。乳癌の凍結切片でのデータ例を Fig.2 に示す(参考文献 9 より)。

実験方法を簡単に Fig.3 に示すが、この方法は操作が簡単であり、また抗体を用いないために動物の種差を気にする必要がなく、病態モデル動物での実験が容易であるという特徴を持つ。

In situ zymography による研究対象となってきたプロテアーゼには MMP 類とセリンプロテアーゼ類 (プラスミノゲンアクティベーターほか) システインプロテアーゼ類があり、カゼイン、コラーゲン、ゼラチンなどの基質薄膜が用いられてきた。基質薄膜の構成としては、蛍光色素で標識したカゼインとアガロースの混合物、オートラジオグラフィー用の写真乳剤、熱架橋したコラーゲン、写真用フィルム (ゼラチンを含む) などが代表例であり、このような技術については別に紹介した¹⁾。しかしながら、これらの論文で用いられている基質薄膜は (写真用フィルムをのぞいて) 研究者の手作りであ

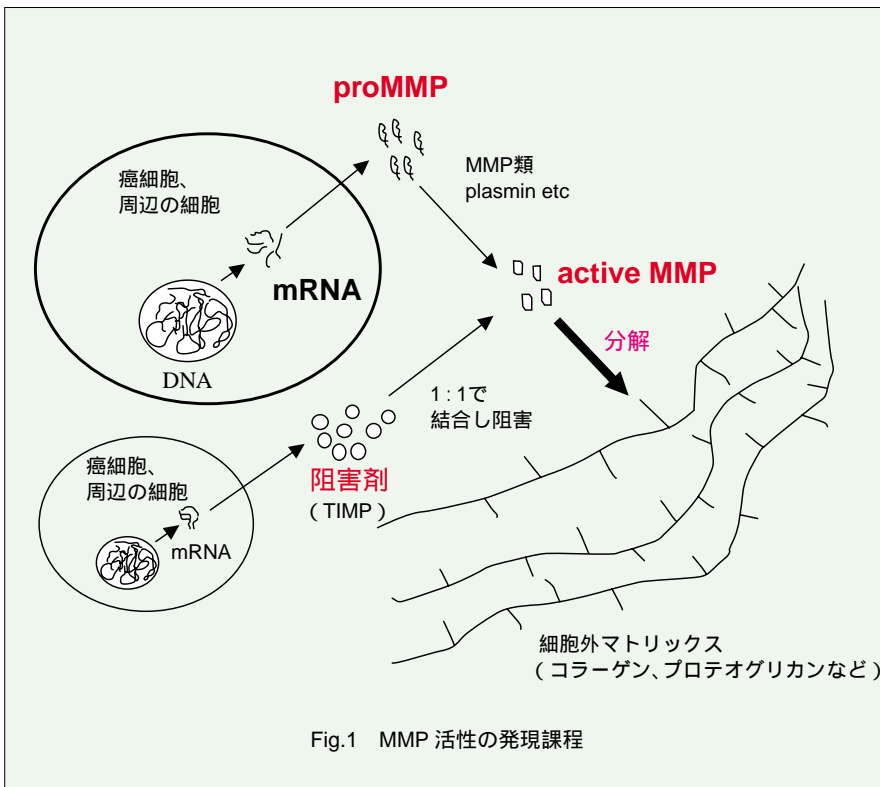


Fig.1 MMP 活性の発現課程

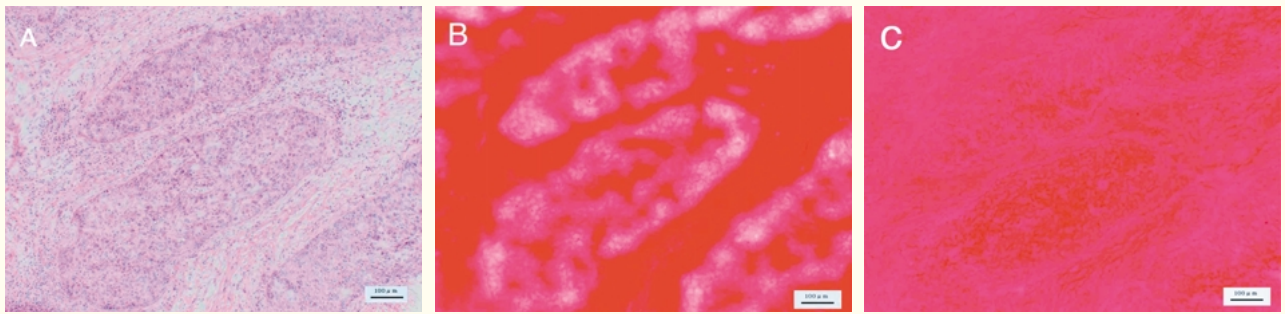


Fig.2 乳癌のFIZデータ(A)HE染色、(B)FIZ-GN、(C)FIZ-GI

切片の貼り付け

インキュベーション、染色

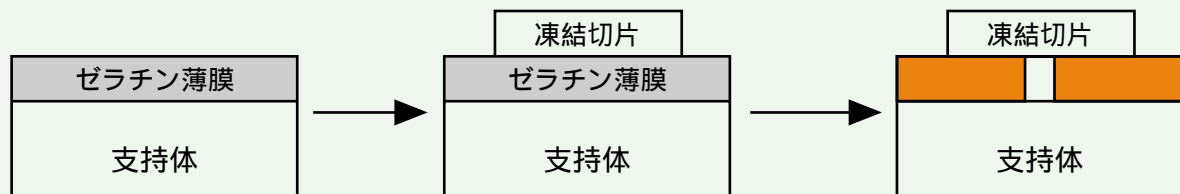


Fig.3 FIZを用いた実験の流れ

り、膜厚や膜質を再現良く作製することが難しく、in situ zymography法の普及のネックとなっていた。

Film in situ zymography (FIZ) 法

In situ zymographyが実用的な研究手段となるためには、一定の品質(膜厚、膜質)を持つ基質薄膜が必要である。写真用フィルムはゼラチンを含む品質のコントロールされた薄膜であるが、ハロゲン化銀ほか多種類の化合物を含むため一部のプロテアーゼの活性を阻害するという問題がある。そこで我々はゼラチンと架橋剤のみから成り、生体組織のプロテアーゼ活性測定に適した膜質を持つ安定した品質の薄膜の作製を試みた。

支持体としてはポリエステル(PET)フィルムを用い、ゼラチンと架橋剤を含む薄膜を約7ミクロンの厚さで均一に塗布した。このフィルム(FIZ-GNと呼ぶ)の架橋ゼラチン層は各種のMMPを始めいくつかのセリンプロテアーゼ、システインプロテアーゼ類により分解される。

また、ゼラチン膜にMMP阻害剤である1,10-phenanthrolineを含むフィルム(FIZ-GIと呼ぶ)も作製しFIZ-GNと比較することによりMMP活性であるかどうかの判断が出来るようにした。

FIZ-GNフィルムの基本的な性質として各種のMMPに対する感受性をFig.4に示す。

この他にもデータは示さないがFIZ-GNはMMP-1, 13等ゼラチナーゼ(MMP-2,-9)以外のMMP類によっても分解される。またFIZ-GNのゼラチン膜は、トリプシン、キモトリプシン、

プラスミン、エラスターゼ、カテプシン-Gなど多くのセリンプロテアーゼ類、およびカテプシン-B,-H,-Lなどのシステインプロテアーゼ類によっても分解を受ける。そのためFIZ-GNは広範囲なプロテアーゼの活性検出に用いることができる。

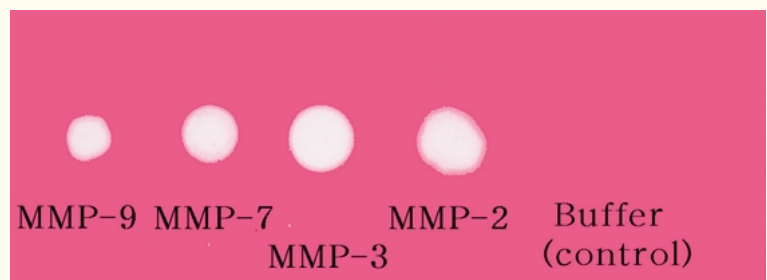


Fig.4 各種活性型MMP溶液によるFIZ-GNの分解(酵素濃度はそれぞれ異なるため分解強度の比較は意味がない)

Film in situ zymography (FIZ)の応用例

FIZ-GNは電気泳動におけるプレキャストゲルと同様に、サンプルさえあれば簡単に実験できるというのが一つの特徴であるが、それ以上に重要なことは、性能の揃ったフィルムが多量に使えるためにサンプル間のプロテアーゼ活性の比較が容易に出来るということである。例えば同種の癌の症例間における活性の比較、原発巣と転移巣の活性の比較なども可能であり、さらに他施設のデータや論文データとの比較も実験条件を合わせれば可能である。

FIZ-GNのデータを含む論文は現在13報が掲載されている。研究対象としては各種の腫瘍(脳²、甲状腺³、食道^{4,5}、卵巣^{6,7,8}、乳⁹、肝臓¹⁰)、関節リウマチ¹¹、子宮腺筋症¹²、牛の卵胞¹³などであり、MMP活性の検出に应用されている。また、担癌マウスにMMP阻害剤を経口投与し、癌におけるMMP活性の変動(薬効)を経時的に測定することに成功した¹⁴。この例も均質なゼラチン薄膜によって初めて可能になったものであり、更に、MMP活性を画像解析により定量的に取り扱って成功した例でもある。

多くの場合はMMP活性の強さと、癌などの悪性度との関係を探るという方針に基づいて研究されているが、違った観点からFIZのデータを解釈している例としては、一つはMMP活性の主な発現場所が癌巣にあるか癌と間質の境界にあるか、それとも間質にあるかによって組織型との対応を見出したり⁷、またGNとGIフィルムのデータを比較することによりMMPがプロテアーゼ活性の主役である症例と非MMPがプロテアーゼ活性の主役である症例に分類し、その分類と癌の性質との関連を調べようとする試み¹⁵もあり今後が注目される。

おわりに

FIZフィルムにより組織におけるゼラチナーゼ活性を簡便に再現良く測定できるようになり、他の研究方法(免疫染色、mRNA検出、ゼラチンザイモグラフィー)と組み合わせて用いることにより、発現しているプロテアーゼ種とその活性が研究できるようになった。

FIZ-GNはゼラチンを基質として用いているため、前述したように多種のプロテアーゼの活性研究に用いることが出来るが、逆に言うと、例えばMMPを調べようとする場合にセリンプロテアーゼ等の活性が発現している臓器ではそれらが測定を妨害することになり、阻害剤を用いて対策を行なう必要がある。必要な阻害剤の種類や量は臓器によって異なると考えられ研究者はその使用条件の確立を行なう必要があるが、その過程において対象試料に発現するゼラチナーゼの種類について全体像を把握することができる。この新しい手法を用いて、今後プロテアーゼに関する研究がさらに進むことが期待される。

[参考文献]

- 1 根守良一、立川哲彦: In situ zymography: マトリックスメタロプロテアーゼ活性検出法, 組織培養工学 25 (9): 29-32, 1999
- 2 Nakada M, Nakamura H, et. al.: Expression and tissue localization of membrane-types 1,2,3 matrix metalloproteinases in human astrocytic tumors. Am. J. Pathol. 154:417-428, 1999.
- 3 Nakamura H, Ueno H, et. al.: Enhanced production and activation of progelatinase A mediated by membrane-type 1 matrix metalloproteinase in human papillary thyroid carcinomas. Cancer Res. 59: 467-473, 1999.
- 4 Ohashi K, Nemoto T, et. al.: Increased expression of matrix metalloproteinases 7, 9 and membrane type 1-matrix metalloproteinase in the esophageal squamous cell carcinomas. Cancer 88:2201-9, 2000
- 5 Koyama H, Iwata H, et. al.: Gelatinolytic activity of matrix metalloproteinase-2 and -9 in oesophageal carcinoma; a study using in situ zymography. Eur J Cancer, 36 (16): 2164-70, Oct 2000
- 6 Furuya M, Ishikura H, et. al.: Expression of matrix metalloproteinases and related tissue inhibitors in the cyst fluid of ovarian mucinous neoplasms. Gynecologic Oncology, 78: 106-112, 2000
- 7 Furuya M, Ishikura H, et. al.: Clarification of the active gelatinolytic sites in human ovarian neoplasms using in situ zymography. Human Pathology, Vol.32 (2): 111-115, February 2001
- 8 Lengyel E, Schmalfeldt B, et. al.: Expression of latent matrix metalloproteinase 9 (MMP-9) predicts survival in advanced ovarian cancer. Gynecol Oncol. 82(2): 291-8, Aug 2001
- 9 Iwata H, Yamamoto M, et. al.: The localization of gelatinolytic activity can be detected in breast cancer tissues by Film in situ zymography. Breast Cancer, vol.8, No2: 163-168, April 2001
- 10 Kaneyoshi T, Nakatsukasa H, et. al.: Actual invasive potential of human hepatocellular carcinoma revealed by in situ gelatin zymography. Clin Cancer Res. 7 (12): 4027-32, Dec 2001
- 11 Yamanaka H, Makino K, et. al.: Expression and tissue Localization of membrane-types 1, 2 and 3 matrix metalloproteinases in rheumatoid arthritis. Laboratory Investigation 80 (5): 677-687, 2000
- 12 伊東宏絵、井坂恵一ほか: 子宮腺筋症における子宮内膜の侵入とゼラチナーゼ(MMP-2、9)との関連性についての検討. 日本産婦人科学会雑誌、Vol.52, No.6, 795-802, 2000
- 13 M.A.M. Yahia Khandoker, Kei Imai, et. al.: Role of gelatinase on follicular atresia in the bovine ovary. Biology of Reproduction, 65: 726-732, 2001
- 14 Ikeda M, Maekawa R, et. al.: Inhibition of gelatinolytic activity in tumor tissue by synthetic matrix metalloproteinase inhibitor: Implication of Film in situ zymography. Clinical Cancer Research, 6: 3290-3296, August 2000
- 15 高橋美穂、杉浦剛ほか: Film in situ zymography (FIZ)を用いた細胞外基質分解酵素局在解析の口腔扁平上皮癌悪性度診断への応用、第10回日本がん転移学会総会、2A12, 2001

MMP 活性の局在検出法

MMP *in situ* Zymo-Film

MMP *in situ* Zymo-Film には特殊処理されたゼラチンがコートされています。MMP (Matrix metalloproteinase) を始め、トリプシン、キモトリプシン、エラスターゼなど種々のプロテアーゼにより分解されたゼラチンの消化痕を可視化することにより、凍結組織切片や新鮮細胞のプロテアーゼ活性を簡単に検出することができます。

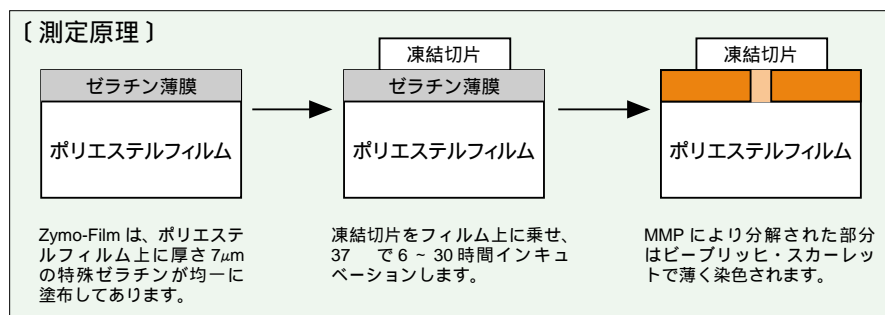
MMP-PT *in situ* Zymo-Film

MMP-PT *in situ* Zymo-Film のゼラチン膜には 1,10- フェナントロリン (MMP 阻害剤) が含まれており、プロテアーゼ活性が、MMP 由来かどうか確認することができます。

〔使用法〕

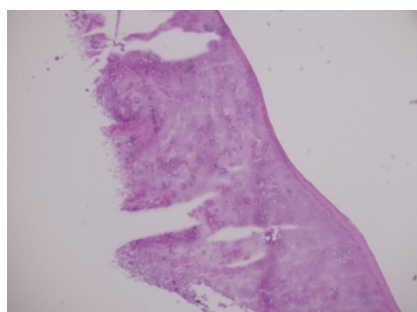


〔測定原理〕

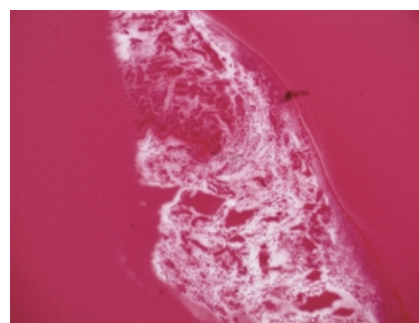


〔検出例〕

マウス小腸



HE 染色



MMP *in situ* Zymo-Film
ビーブリッヒ・スカーレット /
ヘマトキシリン染色

コード No.	品名	規格	容量	希望納入価格 (円)
295-58001	MMP <i>in situ</i> Zymo-Film	生化学用	50 回用	25,000
291-58101	MMP-PT <i>in situ</i> Zymo-Film	生化学用	50 回用	35,000

〔関連商品〕

コード No.	品名	規格	容量	希望納入価格 (円)
021-14861	Biebrich Scarlet Stain Solution	病理研究用	200ml	照会
131-09665	Mayer's Hematoxylin Solution	病理研究用	500ml	4,200

プロテオーム解析

大阪府立母子保健総合医療センター研究所 和田 芳直

プロテオームという語が頻りに登場するようになった。しかし、「プロテオームって何?」と聞かれて、明解に答えることのできる人は意外に少ない。この総説では、そのあたりから、プロテオーム解析の基本であるタンパクの網羅的同定法の現状まで、歴史的なことも踏まえて述べる。

1. プロテオームの定義

配偶子に含まれる染色体あるいは遺伝子の全体をゲノム genome と呼ぶが、これに対する発現産物であるタンパクに対応する語として、1995年にシドニーのマッカーリー大学の Keith Williams とその学生であった Marc Wilkins によって造られたのがプロテオーム proteome である。生物の機能はタンパク分子が担っている。この造語の背景には、ゲノム解読の次にタンパクについても同様に網羅的な作業が必要になるという状況があった。プロテオームの定義は "entire organism's protein complement" 「生命体のタンパクの総体」であるが、時には対象を細胞に限定して「細胞内に発現しているタンパクの総体」と解釈することもある。概ね「興味の対象となるユニット(個体、臓器、組織、細胞、小器官など)に発現しているタンパク全体」と読めばよい。

genomics が「ゲノム学」であるから、proteomics は「プロテオーム学」で、タンパクの大規模解析 (large-scale analysis) の意味である。遺伝子の機能を研究する「機能ゲノム学 (functional genomics)」という語があるが、機能するのはタンパクであるから、proteomics との区別は不明確で、多くの場合、proteomics は functional genomics を含んでいるようである。他に、structural genomics は X 線結

晶解析や NMR によるタンパクの (大規模) 構造解析のことであるが、これも広い意味では proteomics であり、いずれもゲノム情報をもとにタンパクの構造・機能解析を行う学問として genomics に形容詞をつけたのであるが、それらは proteomics という語が普及・定着するまでに広まった語といえる。

2. なぜプロテオームか?

ゲノムが解読され、その中に書かれている遺伝子を推定できても、あるいは実際に EST (expressed sequence tag) などによって、それらが mRNA に転写されていることがわかって、実際にタンパクに翻訳されているかどうかはわからない。選択的スプライシングでひとつの遺伝子から複数種の産物ができていることもある。RNA editing などという特殊な編集もあり得る。また、多くのタンパクは糖鎖や脂質などが付加する翻訳後修飾がないと機能を持ち得ない。そして、動的な機能に関わるタンパク質のリン酸化。まだまだある。ゲノムが解読されても、産物としてのタンパクが細胞内のどこに局在するのか、あるいは組織の中での局在、機能単位がタンパク複合体の場合にはその構成分子を同定しなければならぬ。刺激や病気によるタンパク質の量的・質的变化など。これらすべてが proteomics の対象である。

3. 二次元電気泳動

プロテオームの考え方はずっと以前からある。最もわかりやすい例として挙げられるのが二次元電気泳動。一次元目に等電点電気泳動、二次元目に SDS ゲル電気泳動 (不連続緩衝液使用) を用いる方法を Patrick O'Farrell が発表したのが 1975 年で、

以後、二次元電気泳動は 1000 から 3000 にも及ぶ多数のタンパクを分離する方法として広く用いられてきた。展開されたタンパクスポットを検出する方法も高感度な銀染色が使われるようになり、ナノグラムレベルの分析ができるようになった。しかし、高い再現性のもとに、一定の条件下での X, Y 値によってタンパクを性格付けてカタログを作ることは困難であった。また、検出できても配列解析が難しいことも普及を妨げた。当時、タンパクをゲルから溶出してエドマン分解などを行うのに必要な量はクマジーブルー染色の感度と同じレベルであった。後に、PVDF などの膜に転写して直接 N 末端からの配列解析を行うことで若干の進歩はあったが、根本的な解決にはならなかった。

4. 質量分析 - プロテオーム解析のブレークスルー

この限界に対するブレークスルーは質量分析によってもたらされた。

質量分析が生命科学に本格的に踏み込んでいわゆるバイオマススペクトロメトリー (biological mass spectrometry) が始まったのは 1980 年ごろである。それまではガスクロマトグラフィー (GC) の拡張検出器 (advanced detector) としての使い方で、GC-MS として薬物や代謝物など小分子に対して用いられていた。1970 年代になってペプチドのイオン (正しくはプロトン付加分子イオン) の質量を測定できるイオン化法 (フィールド脱着法 field desorption、高速電子衝突法 fast atom bombardment など) サンプル分子を分解させることなく気体状のイオンにできるいわゆるソフトイオン化法) が開発され、また、生成したイオンをガスと衝突させることで分解し (衝突

誘起解離 collision-induced dissociation, CID) 生成したイオン(プロダクトイオン)の質量からアミノ酸配列の情報を得るといった質量分析特有の手法も MIT の Klaus Biemann らによって練り上げられた。これらのイオン化法を用いて分析できるペプチドのサイズはせいぜい 3000 ダルトン程度まで、実用検出感度もピコモルレベルと、胸を張れるほどではなかった。しかし、複数のペプチドを含む試料であってもそこに含まれるペプチドの質量を一挙に知ることができるのは大きな長所で、ペプチド混合物に対する質量分析はやがて peptide mass mapping あるいは peptide mass fingerprinting と呼ばれるようになった。余談であるが、1970 年代後半からの 20 年間はイオン化法や質量分離法についての技術的な開発が数年ごとに発表され、質量分析学は実にエキサイティングであった。こうした技術開発の展開が鈍ったところにポストゲノム時代の幕開けがあり、質量分析は注目され、普及したのである。

1980 年代の後半に入ってさらに重要なイオン化法が登場した。ミュンスター大学の Franz Hillenkamp らによって開発されたマトリックス支援レーザー脱離イオン化法(matrix-assisted laser desorption/ionization, MALDI) とエール大学の John Fenn らによって開発されたエレクトロスプレーイオン化法(electrospray ionization, ESI)である。現在の主流であるこれら第 2 世代ソフトイオン化法によってはじめて分子量数万のタンパク質の分子イオンを検出し、正確にその質量を測定できるようになった。ESI は液体を試料とするので、液体クロマトグラフィーとのオンライン接続による連続分析が可能で、また、ナノスプレー nanospray と呼ばれる微量試料導入によって試料濃度を高く保ったままで分析でき、一層の微量高感度化が実現された。さらに、ESI では持続的にイオンを生成できるので、試料に含まれる個々のペプチドを選んでの

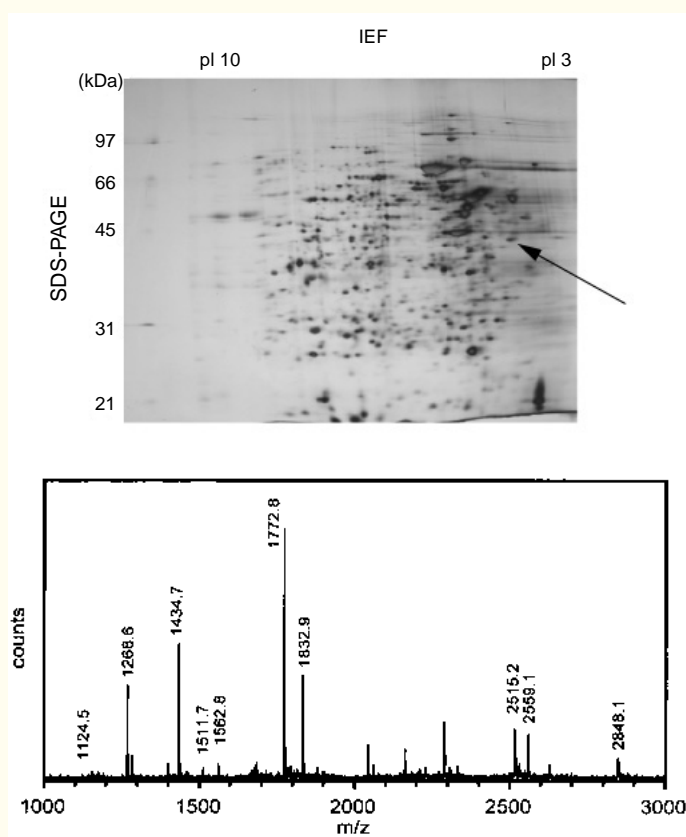
CID が容易であることや、また、共有結合によらない複合体を検出できるなどの特徴がある。一方、MALDI は技術的な修練がなくともフェムトモルレベルあるいはそれ以上の高感度でペプチドの質量を知ることができ、質量分析を普及させるのに貢献している。

5. インゲル消化とライブラリーサーチ

二次元電気泳動法は、上に述べたように、目的とするタンパク群を視覚化することで、分析対象の全体像を把握することに適した方法である。染色したゲルのスポットを切り出して、タンパクをゲル内にあるままで酵素消化し、生成したペプチドをゲルから溶出させる方法をインゲル消化法 in-gel digestion という。これは以前から使われていたのであるが、EMBL の Matthias Mann らによってゲル電気泳

動法(一次元あるいは二次元)と質量分析を結び手法として確立された。データベース上にあるタンパクに由来する予想ペプチド質量に対し、測定によって得られた複数のペプチド質量を検索することにより、もとのタンパクを推定することができる。さらに、質量分析においてそれぞれのペプチドを選択して CID 解析を行い、得られた配列情報(部分的なものでもよい)を加えれば、同定は確かなものとなる。以上の操作を多数のスポットについてオートマチックに行うロボットも開発され、効率的で網羅的な同定が行われつつある。

以上、プロテオームの基盤のひとつであるタンパク同定について概説した。二次元電気泳動の技術的修練と高額機器である質量分析計というハードルはあるが、自らの研究をプロテオームの視点から見つめ直せば、大きな展開を得られる可能性がある。



マウス精巣タンパクの二次元電気泳動、銀染色(上図)。矢印で示したスポットをインゲル消化して得られたペプチドの MALDI マススペクトル(下図)。マススペクトルに記入した質量から testis-specific gene A2 を同定した。

6. 関連する文献と URL

(二次元電気泳動のデータベース)

<http://kr.expasy.org/ch2d>

あるいはその中の

<http://kr.expasy.org/cgi-bin/map1>

(質量分析の専門用語にたじろいでいる方に)

“マスペクトロメトリーってなあに”
日本質量分析学会出版委員会編、国

際文献印刷社、2001; “マスペクトロメトリー関係用語集” 日本質量分析学会出版委員会編、国際文献印刷社、2001. これらの書籍についての情報は日本質量分析学会

<http://www.soc.nii.ac.jp/mass>

(インゲル消化法)

Shevchenko Aら, Anal Chem. 68: 850-8, 1996; 拙著, “プロテオーム基本技術 - インゲル消化法 - ” J Mass

Spectrom Soc Jpn. 49:241-243, 2001

(peptide mass fingerprintのためのデータベース検索)

<http://www.matrix-science.com>

の MASCOT;

<http://prospector.ucsf.edu> の MS-Digest など

New Products

Negative Gel Stain MS Kit

電気泳動用

本品は SDS-PAGE 後のタンパク質バンドを短時間で高感度にネガティブ染色するキットです。プロッティング前の分離チェックの他、タンパク質が染色色素による修飾を受けませんので質量分析に有効です。

〔特長〕

1. 10分で染色、さらに10分で脱色できる!
2. 染色感度は 3ng!
3. タンパク質バンドが色素による修飾を受けず質量分析に最適!
4. 10ngのサンプルから質量分析可能!

5. 脱色後ウエスタンブロット可能!

〔内容〕

- | | |
|----------|------------|
| 1. 染色液 A | 500ml × 1本 |
| 2. 染色液 B | 500ml × 1本 |
| 3. 脱色液 | 500ml × 1本 |

293-57701 20回用 11,000円

ELISA法に強い味方現る!

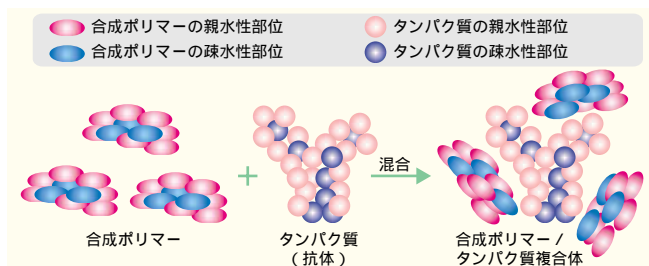


日本油脂の生化学用合成ポリマー試薬

- ブロッキング試薬・ペルオキシダーゼ安定化試薬 新発売 -

親水性部分と疎水性部分をもつ合成ポリマーを使用した本品は、

1. タンパク質と複合体を形成、タンパク質の変性を抑制、安定化します。
2. 固相に生体膜類似構造を形成し、タンパク質や細胞の吸着を抑制します。



〔タンパク質製ブロッキング剤・安定化剤との比較〕

	合成ポリマー製(本品)	タンパク質製
変性	ほとんど変性しない (煮沸、オートクレーブ、凍結・融解、振盪等にも安定)	容易に変性する
感染の危険性	なし	あり
ロット間差	なし	あり

ブロッキング試薬 (BLOCKING REAGENT-N101, N102)

担体への非特異的吸着を抑制

担体に固定化した生理活性物質(抗体等)を安定化

Tween20に対する安定性が高く、非特異的吸着が起こりにくい

N101は安定化能、N102は非特異的吸着抑制能に優れる

液状なので希釈後すぐに使用可能

サンプル希釈液、洗浄液としても使用可能:

洗浄液として用いる場合はイオン交換水等で100倍以上希釈

ペルオキシダーゼ安定化試薬

(PEROXIDASE STABILIZER-H100)

ペルオキシダーゼ活性を安定化

タンパク質溶液の凍結、凍結乾燥に対しても安定化効果を発揮

ペルオキシダーゼ以外のタンパク質の安定化にも効果が期待できる

液状なのですぐに使用可能

コード No.	メーカーコード	品名	容量	希望納入価格(円)
309-09505	S410-03012	Blocking Reagent N101	500ml	6,000
306-09515	S410-03022	Blocking Reagent N102	500ml	6,000
301-09521	S410-04011	Peroxidase Stabilizer H100	100ml	8,000

電気泳動ゲルのネガティブ染色からウエスタンブロッティングまで ネガティブゲル染色 MS キットの染色応用例

和光純薬工業株式会社 試薬研究所 河野 直幸

ポリアクリルアミドゲルを使用した電気泳動は、タンパク質の分離精製に広く用いられています。検出は、通常 CBB 染色、銀染色で行いますが、染色されたタンパク質が不必要な修飾を受けます。一方、ネガティブ染色法はタンパク質が修飾されないで、切り出したタンパク質の MS 解析、ウエスタンブロッティングに有用です。

ネガティブ染色法は、イミダゾールのイミノ基が、種々の金属に置換され難溶性の塩を生成し白濁する事とタンパク質の荷電を原理としています。

今回は、当社のネガティブゲル染色

MS キットを用いた染色例を紹介いたします。

図 1 は、マニュアルに従ってネガティブ染色した染色像です(青紙を背景にして確認しています)。図 2 は、ネガティブ染色したゲルを脱色後ウエスタンブロッティングした染色例です。

泳動後染色しないでウエスタンブロッティングした像(図 3)と遜色ありません。ネガティブ染色時間は、約 10 分ですから泳動像を確認してからウエスタンブロッティングすることに意義があると思われます。

また、染色ゲルを稀 EDTA で処理

することにより染色感度を、上げることができます。図 4 は、図 1 の染色ゲルを 0.05MEDTA3 ナトリウムで染色像を観察しながら浸透処理(脱色)したものです。染色感度が向上しており、微量タンパク質の検出、切り出しに、より有効であると思われます。

図 5 は、染色後、キット成分にある脱色液で完全脱色後、再度染色することを 4 回繰り返し行いましたが、初回の染色像と同じ感度が得られています。

図 1. ネガティブ染色像

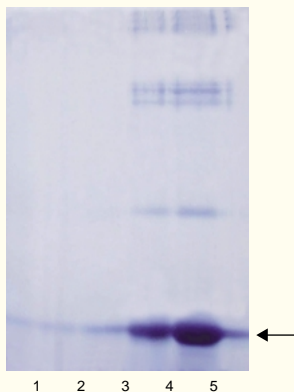


図 3. ウエスタンブロッティング像
(泳動終了後すぐにブロッティング)



図 5. 再染色像

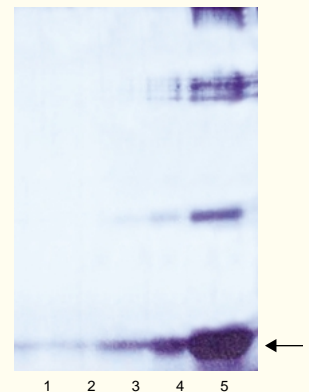
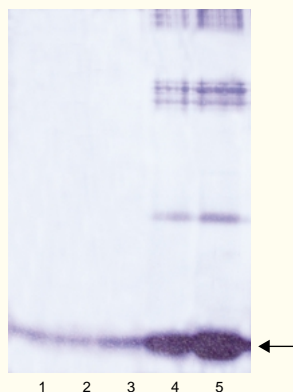


図 2. ウエスタンブロッティング像
(ネガティブ染色して脱色後ブロッティング)



図 4. 高感度化染色像



Lane 1 : 1.25ng(チオレドキシン)
Lane 2 : 2.5ng
Lane 3 : 5ng
Lane 4 : 50ng
Lane 5 : 500ng

今まで解読できなかった鋳型 DNA がありますか...?



CUGA™ シークエンシングとは、RNA 合成を行う際の転写反応を塩基配列決定に応用した「転写シーケンス法」を(株)ニッポンジーンテックで独自に改良、製品化した、画期的なシーケンスシステムです。

〔CUGA™ シークエンシングの主な特長〕

1. PCR 産物を精製することなく、そのままシーケンス反応への持ち込み可能！
PCR 反応後の未反応分の基質を取込まないので、PCR 後の精製は不要です。
2. 従来法では解析困難であった塩基配列に対して比類無いパフォーマンスを発揮！
鋳型 DNA の一本鎖への熱変性が不要なので、酵素反応の障害となる高次構造を形成することなく、シーケンス反応をスムーズに行うことができます。
3. 等温(37℃) 短時間(1時間)での反応可能！
サーマルサイクラー不要で、短時間反応、時間と経費が節約できます。
4. PCR 産物あるいはプロモーター配列を有するベクターを用いた Dual End シークエンス可能！

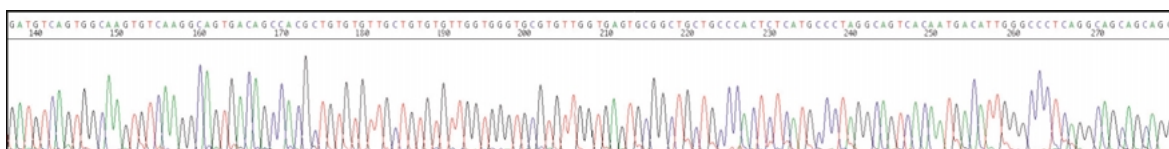
CUGA™ シークエンシングは、原理的には、DNA ポリメラーゼを利用したサンガーらのジデオキシターミネーター法に基づいており、RNA ポリメラーゼを利用することにより、従来のサイクルシーケンス法では解析困難であった鋳型に対して解析が可能となる相互補完的な技術です。しかも、特別に新しい装置を必要とすることなく、従来の DNA シークエンサーを用いて解析することができます。

また、さらに転写シーケンス法の鋳型調製用クローニング用ベクターである pTS1 (現在準備中)を使用すると効率的な塩基配列決定を行うことができます。



〔解析例〕

ヒト遺伝子のシーケンス結果



〔参考文献〕

- 1) Sasaki, N. *et al.* : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95(7), 3455(1998)
- 2) Izawa, M. *et al.* : *J. Biol. Chem.*, 273(23), 14242(1998)
- 3) Tabor, S. *et al.* : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92(14), 6339(1995)

コード No.	品名	容量	希望納入価格(円)
303-10071	CUGA™ 7 シークエンシングキット (ABI PRISM® 377XL DNA Sequencer 対応)	100 反应用	95,000
300-10081	CUGA™ 3 シークエンシングキット (ABI PRISM® 377XL DNA Sequencer 対応)	100 反应用	95,000
307-10091	CUGA™ 7 シークエンシングキット (MegaBACE™ 1000 対応)	500 反应用	400,000
300-10101	CUGA™ 3 シークエンシングキット (MegaBACE™ 1000 対応)	500 反应用	400,000

現在、対応している DNA シークエンサーは、ABI PRISM® 377XL です。それ以前のタイプのシーケンスへの対応はしておりませんので、ご注意ください。

* ABI PRISM® は、米国 Perkin Elmer 社の米国及びその他の国々における登録商標です。
* MegaBACE™ は、Amersham Pharmacia Biotech 社及びその関連会社の商標です。

Wako DNA Step Ladder Mix (80-10kbp)

遺伝子研究用

80bp から 10kbp までの20本(10000, 8000, 6000, 5000, 4000, 3000, 2500, 2000, 1500, 1031, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100, 80)のラダーです。1.0% アガロースに添加し、EtBr 等で染色する事によりクリアーなバンドを観察する事ができます。

形状 : 10mmol/l Tris-HCl (pH 7.6), 10mmol/l EDTA,

0.015% プロモフェノールブルー, 10% グリセロール

添加量 : 20 μ l

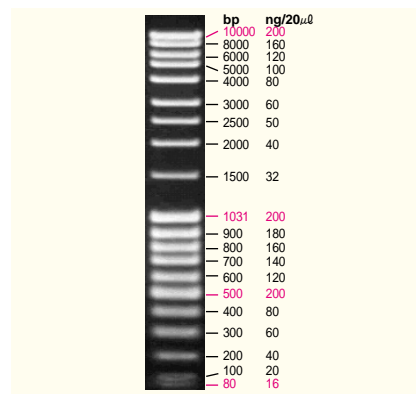
〔貯法〕 -20 保存

本品には 6 x Loading Dye* が添付されています。

*組成

0.09% Bromophenol blue, 60% Glycerol, 60mmol/l EDTA

544-02051 0.5ml x 2 24,000 円



Wako Poly(A) Polymerase Solution

遺伝子研究用

各種のポリリボヌクレオチドの 3' 末端にアデニル残基を重合していく酵素です。一本鎖 RNA はプライマーとして用いることができます。

由来 : 大腸菌

形状 : 25mmol/l Tris-HCl (pH 7.9), 500nmol/l NaCl, 1mmol/l EDTA, 0.1mmol/l

DTT, 50% グリセロール (v/v)

活性 : ラベルに記載

単位の定義 : ATP を基質として、37 pH 7.9 で 10 分間に 1nmol の AMP を tRNA に取込むために必要な酵素量を 1unit とする。

〔貯法〕 -20 保存

〔参考文献〕

- 1) Winter, G. and Brownlee, G. G. : *Nucleic Acids Res.*, 5, 3129 (1978)
- 2) Krug, M. and Berger, S. : *Methods Enzymol.*, 152, 316 (1987)

540-02031 20 units 16,000 円

Wako T7 RNA Polymerase, recombinant, Solution

遺伝子研究用

T7 プロモーター配列を含む二本鎖 DNA を鋳型とし、NTP を基質として、プロモーター下流の鋳型 DNA に相補的な RNA を合成します。

由来 : バクテリオファージ T7 の RNA ポリメラーゼをクローニングし、大腸菌にて発現。

形状 : 20 mmol/l リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.9), 100mmol/l

NaCl, 0.1mmol/l EDTA, 1mmol/l DTT, 50% グリセロール (v/v)

活性 : ラベルに記載

単位の定義 : 37 pH 8.0 で 1 時間に 1nmol の [³H]GMP を不溶性画分に取り込む酵素量を 1unit とする。

〔貯法〕 -20 保存

本品には 10 x Reaction Buffer* が添付されています。

*組成

400mmol/l Tris-HCl (pH 8.0), 80mmol/l MgCl₂, 20 mmol/l Spermidine.

〔参考文献〕

- 1) Tabor, S. and Richardson, C. C. : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82, 1074 (1985)

543-02021 5,000 units 12,000 円

Wako Ribonuclease H [RNase H], recombinant, Solution

遺伝子研究用

本品は、RNA-DNA ハイブリッドの RNA 鎖のみを特異的に分解する酵素です。

由来 : プラスミド pKH11 と pNT 203 を含む大腸菌 HB101

形状 : 25mmol/l Tris-HCl (pH 7.5), 30mmol/l NaCl, 0.5mmol/l EDTA,

5mmol/l 2-メルカプトエタノール, 50% グリセロール

分子量 : 約 21,000

活性 : ラベルに表示

活性の定義 : Poly(rA)-poly(dT) を基質として、30 pH 7.7 で 20 分間に 1nmol の酸可溶性物質を生成する酵素量を 1unit とする。

〔貯法〕 -20 保存

〔参考文献〕

- 1) Vournakis, J. N. et al. : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 72, 2959 (1975)

546-02011 1,000units 16,000 円

第47話 エンドトキシン試験法の国際調和

エンドトキシン試験法が1980年に米国薬局方(USP)に収載にされて以来、各国の局方にエンドトキシン試験法が収載されてきました。わが国でも、日本薬局方(JP、1988年)、JIS(1992年)、生物学的製剤基準(1993年)にエンドトキシン試験法が収載されています。近年、3極の薬局方(USP、欧州薬局方(EP)、JP)の国際調和作業が行われており、エンドトキシン試験法は最終段階に入ったと思われます。今回は、このエンドトキシン試験法の国際調和について考えてみましょう。

国際調和の作業手順は、7つのステージがあります。すなわち、調和対象項目を選定し、担当薬局方を指定するステージ1(Identification)、3薬局方を比較検討し、第一次案を作成するステージ2(Investigation)、第二次案を作成するステージ3(Proposal)、調和案を作成するステージ4(Official Inquiry)、調和案を改訂して合意文書を作成し、調和合意署名を行うステージ5(Consensus)、合意内容を各薬局方へ取り込むステージ6(Adoption)、各薬局方に合意内容が反映されるステージ7(Implementaion)です。

エンドトキシン試験法の国際調和は、1993年にJPが担当薬局方として作業が開始され、1994年に第一次案が、1995年に第二次案が、1996年に調和案が提出されてきました。1997年には合意文書が提出され、3回の改訂を経た後、1999年9月に調和合意署名が行われました。2001年1月にはUSP及びEPが、合意文書に準拠して改正を行っています。JPでも2001年4月に発行された第十四改正日本薬局方(JP14)で、合意文書の内容が取り入れられています。すなわち、エンドトキシン試験法の国際調和は、現在ステージ6ということになります。

合意書の内容を少し見てみましょう。

リムルス試薬は、Limulus Amebocyte Lysateではなくamebocyte lysateとなっています。これは、リムルス試薬の原料となるカプトガニが、アメリカ大陸に生息する*Limulus polyphemus*とアジア大陸に生息する*Tachypleus tridentatus*のどちらでも使用できるようにとの配慮と考えられます。JPでも、13局の「LAL試薬」が「ライセート試薬」に変更されています。このシリーズも「Talking of LAL」から「Talking of AL」に代えた方がよいのか考えてしまいます。

方法としては、ゲル化法と光学的方法(比濁法と比色法)の2つが収載されています。トキシノメーター法は、光学的方法の中の比濁法に分類されます。複数の方法を採用しているため、異なる方法で異なる結果が得られる可能性が考えられます。このような場合は、ゲル化法によって最終の判定を行うことが定められています。

操作方法では、ライセート試薬と試料を等量混合すること、シングルテスト(single test vials)の場合は試料を直接添加することとなっていますが、その容量や試験管サイズの規定は特にありません。これは、これまで内径10mmの試験管に試薬と試料を0.1mlずつ添加しなければならなかった規定がなくなり、試験方法に自由度が出てきたこととなります。

光学的方法では、反応干渉因子試験におけるエンドトキシン回収率の規定が50%から200%に統一されました。これは、ゲル化法の誤差に配慮した結

果かなと考えてしまいます。

その他、従来のJP13やFDAのガイドライン(1987)とは異なる点がいくらか見られますが、詳しくは次回に譲ることにしたいと思います。いずれにしても、エンドトキシン試験法が公式に登場して20年、国際調和に取り組み始めて9年が経過しています。日本でも多くの製剤にエンドトキシン試験法が適用されようとしています。このように、一つの試験法が公式に採用され、広く行き渡り、国際的に統一されて行くには、長い時間が必要であることが判ります。そして、その陰には関係者のたゆまぬ努力があってこそ、国際調和が実現してゆくのだと思います。エンドトキシン試験法は、局方の国際調和合意文書にサインされた最初の項目だと聞いています。この間、国際調和の担当薬局方として努力された方々には、感謝の気持ちでいっぱいです。今後、ステージ7に向けて、私たちも協力していこうではありませんか。

今回は「第48話 エンドトキシン試験法再考」の予定です。





マウス OPG、RANKL ELISA キット

骨のリモデリングには骨を形成する骨芽細胞と、骨を吸収する破骨細胞のバランスが重要な役割を果たします。破骨細胞は、プロ破骨細胞からプレ破骨細胞に分化し、最終的に骨を吸収する機能をもった成熟破骨細胞へと分化します。

この分化の過程で、骨芽細胞上の RANKL は、破骨前駆細胞の RANK と結合し、成熟破骨細胞への分化を促進する因子として知られています。一方、Osteoprotegerin(OPG)は、RANKL に結合することにより、RANKL-RANK の結合を阻害し、成熟破骨細胞の分化を抑制する因子として注目を集めています。

本キットはマウスの RANKL、OPG を ELISA 法により定量するキットです。

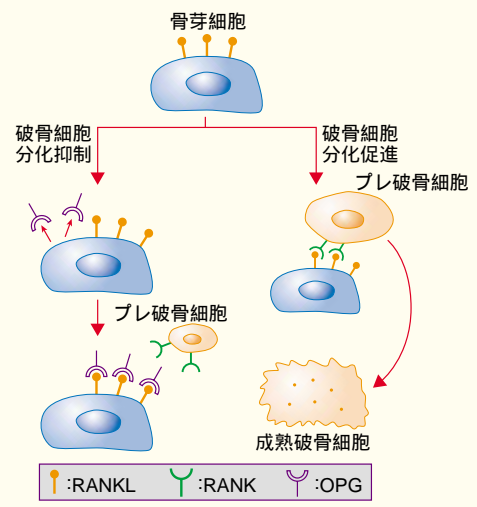
〔特長〕

- 血清、培養上清から測定可能
- 約 5 時間で測定可能
- 優れた再現性(CV 値 < 10%)

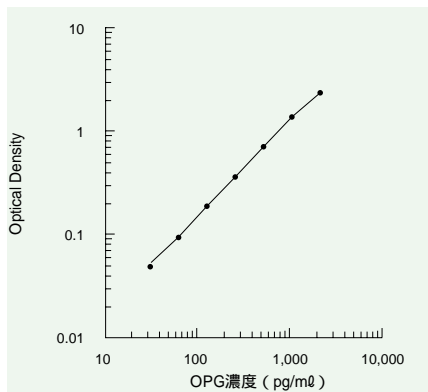
〔キット構成〕

抗マウス抗体固相化プレート	1 枚
23 倍濃縮 HRP 標識抗体	0.7ml
標準品	4.0ng/vial × 3
コントロール	3 本
測定希釈液	12.5ml
標準品希釈液	21ml/vial × 2
25 倍濃縮洗浄液	50ml
発色液 A	12.5ml
発色液 B	12.5ml
反応停止液	23ml

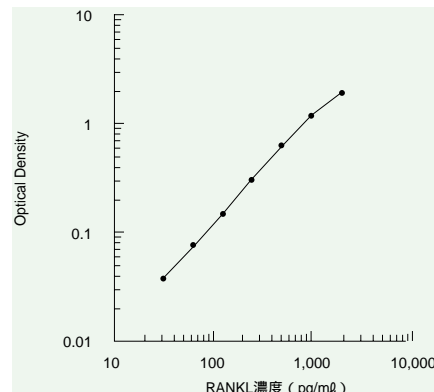
〔成熟破骨細胞への分化モデル〕



〔OPG 検量線〕



〔RANKL 検量線〕



コード No.	メーカーコード	品名	容量	希望納入価格 (円)
503-34551	10047	Mouse OPG AN'ALYZA Immunoassay Kit	96 回用	76,000
500-34561	10040	Mouse RANKL AN'ALYZA Immunoassay Kit	96 回用	76,000

〔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)
303-09721	OP04	TRAP 染色キット	96 ウェル × 10 枚用	30,000
306-09711	CUOC02	破骨前駆細胞培養キット V-2(ラット)	2 バイアル	90,000
302-09713	CUOC01	破骨前駆細胞培養キット V-4(ラット)	4 バイアル	150,000
306-10181	CUOC04	破骨前駆細胞培養キット V-1(マウス)	1 バイアル	90,000
302-10183	CUOC03	破骨前駆細胞培養キット V-2(マウス)	2 バイアル	150,000
300-09731	OP05	象牙質切片(マンモス牙由来)	24 枚	30,000

KIA 株式会社 ケーアイイー細胞病理研究所 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

第7回 非上皮性腫瘍（4）平滑筋の腫瘍

他の腫瘍と同様に良性（平滑筋腫）と悪性（平滑筋肉腫）に分類される。特殊型として類上皮平滑筋腫や類上皮平滑筋肉腫がある。ここでは、平滑筋腫と平滑筋肉腫の組織像を解説する。

1. 平滑筋腫

分化した平滑筋細胞より発生する良性腫瘍で、子宮、消化管に発生しやすい。腫瘍細胞は細胞束となり、膠原線維がこれを取り囲んでいる。細網線維は少ない。

2. 平滑筋肉腫

平滑筋芽細胞より発生する悪性腫瘍で、消化管壁、子宮、後腹膜に発生しやすい。抗酸性胞体をもつ細胞境界明瞭で、核異型の見られる腫瘍細胞を細い細網線維が1つ1つ区画している。これは「箱入り像」と呼ばれ、鍍銀染色を行うと観察されやすい。また、平滑筋肉腫の組織像として、桿状～楕円形の核をもった腫瘍細胞が索状に配列するのも特徴である。鍍銀像では、特徴的な「すだれ様模様」が見られることが多い。しかし、時には、光顕的に前述のような特徴を示さない場合があり、

免疫学的検査法や電顕的な情報がないと診断困難な場合もある。免疫組織学的検査では、デスミン、アクチン、HHF35 および smooth muscle actin (SMA) などが用いられる。電顕的特徴として細胞間の hemidesmosome, pinocytotic vesicle, myofilament が見られ、ときに糖原顆粒が見られることがある。胃腸や腹腔内の場合には、Gastrointestinal stromal tumor (GIST) との鑑別が常に問題となる。GIST の腫瘍細胞は CD34 が陽性である。

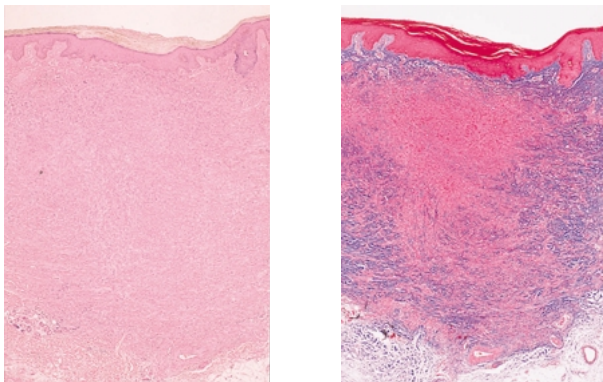


図1. 皮膚平滑筋腫 左:H・E染色、右:マッソン・トリクローム染色 × 4
皮膚真皮に発生した小さな結節状病変で周囲との境界不明瞭である。右では、結節は好酸性に染色され、平滑筋由来の特徴を示している。

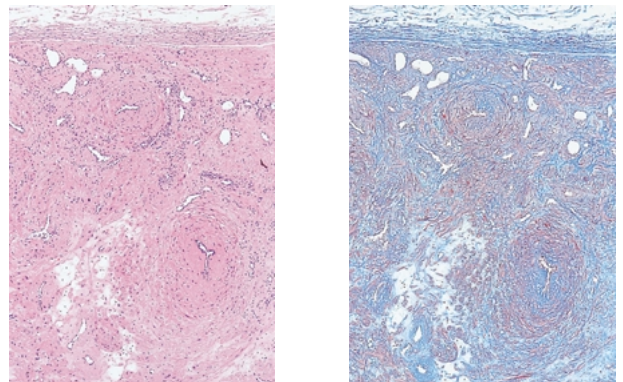


図2. 血管平滑筋腫 左:H・E染色、右:マッソン・トリクローム染色 × 4
中年以降の女性の下肢に好発する。血管壁の平滑筋線維が連続的に増殖しているのがわかる。右では青色の膠原線維に混じって赤く染め出されている平滑筋線維の増殖をみる。

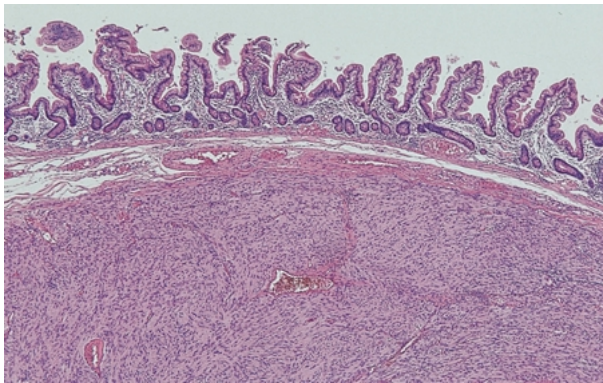


図3. 小腸平滑筋腫 H・E染色 × 10
好酸性の結節状の病変が粘膜下に発生しているのがわかる。

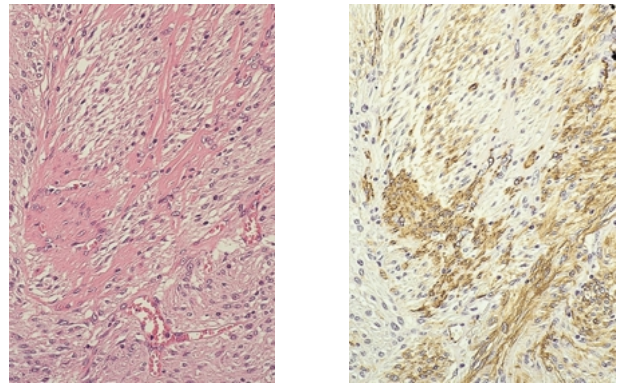


図4. 小腸平滑筋腫(図3の拡大像) × 40
左では、平滑筋細胞が好酸性に染色され、右では平滑筋線維のマーカーである smooth muscle actin (SMA) に陽性を示している。



図5. 平滑筋腫 肉眼像 × 1
平滑筋腫で最も多いのは子宮である。30歳以上の婦人に好発し、過多月経や不正出血の原因となる。ほとんどは子宮体部に発生する。剖面像は光沢のある灰白色で、充実性の渦巻き様模様を呈する境界明瞭な硬い結節を認める。

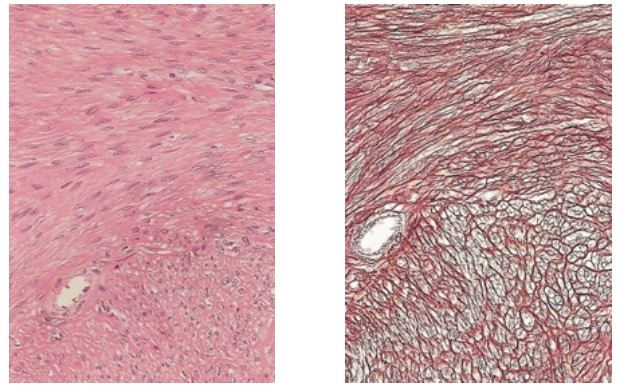


図6. 平滑筋腫(子宮) 左:H・E染色、右:鍍銀染色 × 20
腫瘍細胞が細胞束になるのが特徴的である。縦断面、横断面が良くわかる。右では、縦断面と横断面が明瞭に区画され、膠原線維が主体で、細網線維が少ないのがわかる。これは1つの特徴とされている。

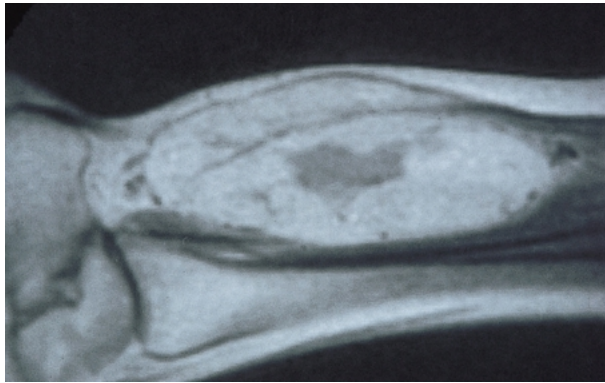


図7. 平滑筋肉腫 MRI像
16才女性の下腿に発生した腫瘍で中心部が壊死に陥っている。

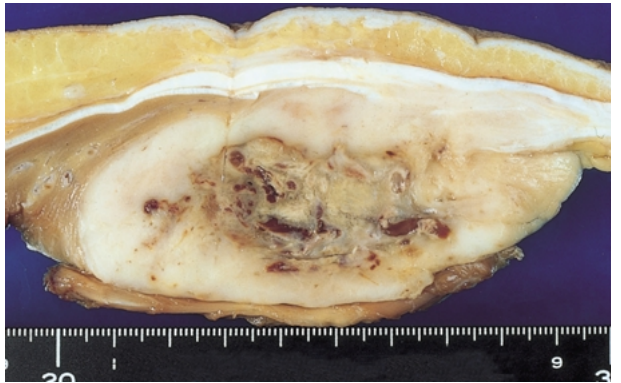


図8. 平滑筋肉腫 肉眼像 × 1
図7の肉眼像で、壊死に陥っている部分が見える。また一部出血している。

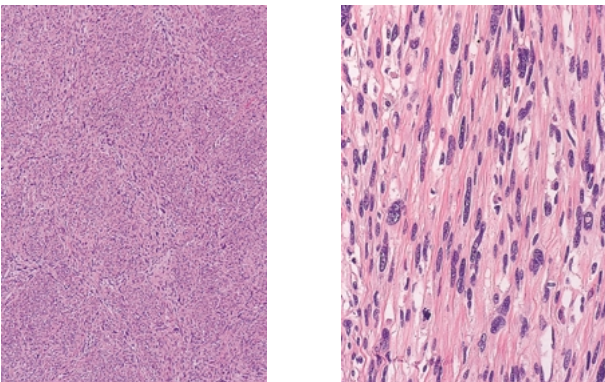


図9. 平滑筋肉腫 H・E染色 左: × 10、右: × 40
好酸性の紡錘形腫瘍細胞の増殖をみる。右では、腫大した細胞核が多型性を示し、核クロマチンは粗大である。一部の核は西洋タバコ状に見える。

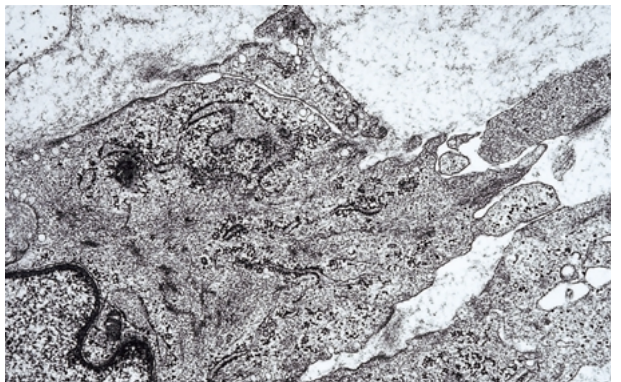


図10. 平滑筋肉腫 TEM像 × 5000
胞体内には、濃縮したdense bodyを伴ったmyofilamentsがみられ、一部に基底膜構造やpinocytotic vesicleをみる。明らかに平滑筋由来の細胞である。

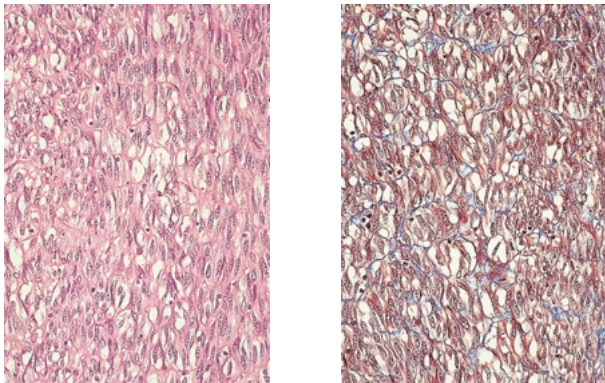


図11. 平滑筋肉腫(後腹膜) 左:H・E染色、右:マッソン・トリクローム染色 × 20
血管軸と垂直に増殖した紡錘形の腫瘍細胞が増殖している。核は桿状~楕円形を示し、柵状に配列している。右では、腫瘍細胞の胞体は赤染している。

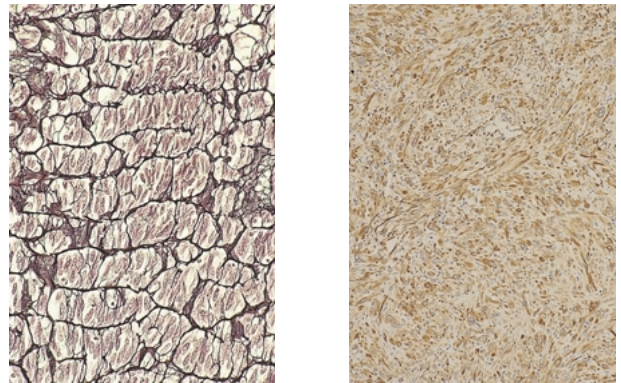


図12. 図11の連続切片 左:鍍銀染色、右:酵素抗体法(SMA抗体) × 20
鍍銀像では、特徴的な「すだれ様模様」を示し、血管軸に垂直に走る膠原線維と腫瘍細胞や血管周囲には細網線維が見られる。右では平滑筋マーカーに対して褐色に陽性を示している。

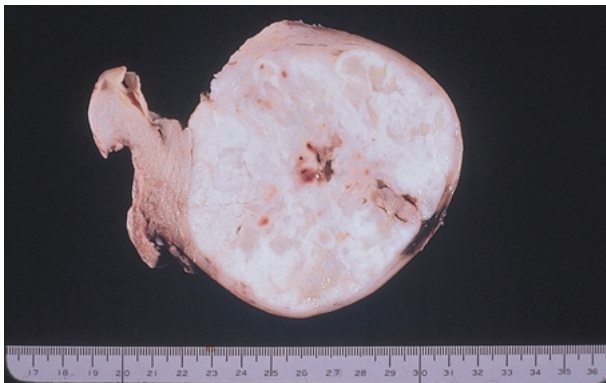


図 13. 平滑筋肉腫 肉眼像 × 1
白色～乳白色で、通常 5～10cm くらいの大きさである。図は子宮に発生したもので、一部出血巣を認める。

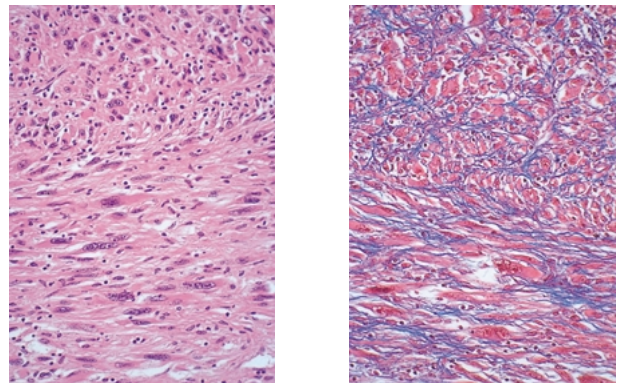


図 14. 平滑筋肉腫 左:H・E染色、右:マッソン・トリクローム染色 × 20
各異形のある腫瘍細胞の胞体は好酸性に染色され、縦断面、横断面の細胞束を形成している。

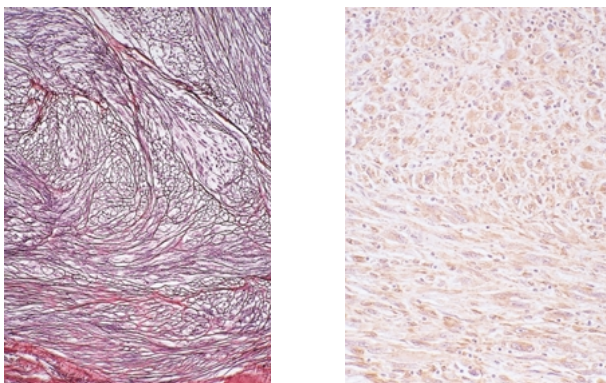


図 15. 平滑筋肉腫 左:鍍銀染色 × 10、右:酵素抗体法(ABC法) × 20
左では、腫瘍細胞の縦断面と横断面がよくわかる。横断面では線維が腫瘍細胞を区画し、「箱入り像」を呈している。右は desmin 抗体で弱陽性を示している。



図 16. 平滑筋肉腫 TEM 像 × 7000
腫瘍細胞の腔体内には dense body を伴う、多数の myofilaments や一部に pinocytotic vesicle を認める。腫瘍細胞の近接した部分には hemidesmosome も見られる。

〔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) 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.
- 3) 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.

●New Products

がんの血管侵襲の同定に

Victoria Blue Solution

病理研究用

血管、皮膚などに見られる弾性線維は、ビクトリアブルー液により特異的に染色されます。特に病理学ではがんの血管侵襲の同定にビクトリアブルー液が使用される他、HBs 抗原の染色^{*1}にも使用されます。

一般にビクトリアブルー液はビクトリアブルーの他、デキストリン、レゾルシン、塩化第二鉄を主な原料としてい

ますが、その調液方法は複雑であり非常に手間がかかります。本品は熟成も含め調製済みですのですぐにお使い頂けます。

*1: HBs 抗原を染色するには前処理として酸化と還元を行う

〔染色態度〕

弾性線維、軟骨基質…………… 青色
核…………… 赤色
背景…………… 淡桃色

〔参考文献〕

嶋志田伸吾, 堤 寛: 「新染色法のすべて」p17 (医歯薬出版株式会社) (1999)

223-01475 500ml 8,000 円

海藻抽出生理活性物質

Fucosterol

生化学用

オキナワモズク (*Cladosiphon okamuranus* Tokida) より抽出・精製しています。褐藻類の主ステロールとして知られており、悪玉コレステロールの低下作用、血栓予防作用、抗腫瘍活性などが確認されています。このような生活習慣病予防研究に有用です。

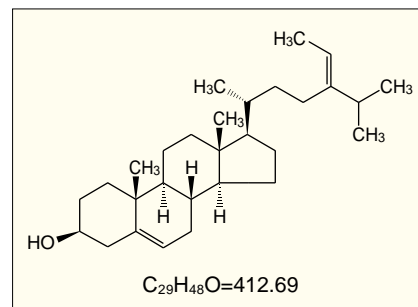
〔規格〕

含量(cGC) : 94.0% 以上

酢酸エチル溶状 : 試験適合

〔参考文献〕

- 1) 伊波匡彦、狩俣栄作、比嘉優子、伊良部忠男、樋口隆一：日本農芸化学会、日本栄養・食糧学会、日本食品科学工学会 西日本支部合同大会 p49(2000)
- 2) 伊波匡彦、友利誠、狩俣栄作、比嘉優子、田村博三、伊良部忠男：マリンバイオテクノロジー学会大会講演要旨集、5, 24(2001)



069-04231	5mg	7,500 円
065-04233	25mg	25,000 円

アルドースレダクターゼ阻害剤

Sulfuretin

生化学用

スルフレチンはオーロン (aurones) 骨格をもつフラボノイドの1つとして古くから知られている化合物ですが、近年アルドースレダクターゼを阻害する作用があることが明らかにされました¹⁾。アルドースレダクターゼ阻害剤は組織内のソルビトール蓄積を抑制することから糖尿病性の神経症、網膜症、腎症などの糖尿病合併症の予防研究に有用とされています。本品は合成品です。

〔規格〕

含量(HPLC) : 95.0% 以上

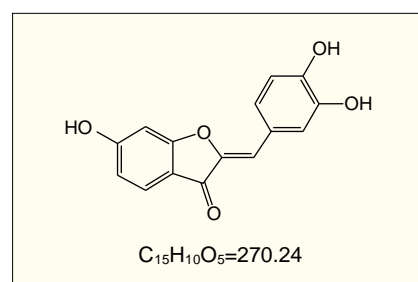
メタノール溶状 : 試験適合

〔参考文献〕

- 1) 高橋英俊、木村賢一、青木健：公開特許公報、平11-130671

195-12491	20mg	20,000 円
-----------	------	----------

〔関連商品〕



コード No.	品名	規格	容量	希望納入価格(円)
547-00581	Aldose Reductase, Human, recombinant	生化学用	0.4unit	48,000

生薬「甘草」成分

Glabridin

生薬試験用

甘草 (*Glycyrrhiza glabra* L.) の成分の1つであるグラブリジン¹⁾は抗菌作用¹⁾、美白作用²⁾をもつ油溶性物質です。抗菌製品、化粧品への用途研究に有用です。

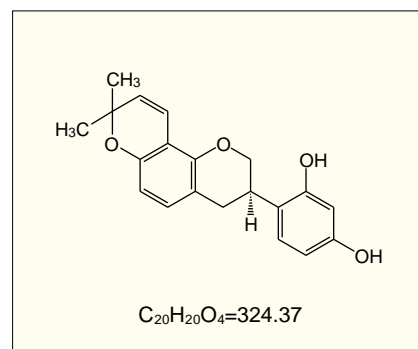
〔規格〕

含量(HPLC) : 97.0% 以上

エタノール溶状 : 試験適合

〔参考文献〕

- 1) Hatano, T., Shintani, Y., Aga, Y., Shiota, S., Tsuchiya, T., Yoshida, T. : *Chem. Pharm. Bull.*, 48(9), 1286 (2000)
- 2) 原本 泉 : 聖マリアンナ医科大学雑誌, 22, 94(1994)
- 3) Kinoshita, T., Kajiyama, K., Hiraga, Y., Takahashi, K., Tamura, Y., Mizutani, K. : *HETEROCYCLES*, 43, 581 (1996)



070-04821	20mg	10,000 円
-----------	------	----------

脳虚血ストレスによるニューロン死惹起機構

北海道大学 大学院薬学研究科 上原 孝、野村 靖幸

一過性の脳虚血ストレスはニューロン選択的な細胞死を惹起することが知られている。齧歯類の血管を閉塞することによる脳虚血モデル動物(2VOまたは4VO)において、海馬CA1ニューロンの選択的な遅延性の細胞死が観察される。

これまで脳虚血に伴うニューロン死惹起機構として、1)グルタミン酸放出によって誘導される経路、2)虚血によって引き起こされるストレス(低酸素や低グルコース)による経路や3)グリア由来因子による経路が提唱されてきた。今回はそれぞれについて概略し、次回ではグリア細胞における防御機構とその候補因子について述べることにする。

脳虚血/再灌流後におこる現象としてはニューロトランスミッターであるグルタミン酸の過剰量の放出が顕著である。適量のグルタミン酸はニューロトランスミッションに関わっているが、過剰量のグルタミン酸が放出されると、NMDA受容体を介して細胞内カルシウム濃度([Ca²⁺]_i)が上昇する。細胞は定常状態において厳密にカルシウム濃度をコントロールしており、NMDA受容体の活性化に伴う過剰な[Ca²⁺]_iの上昇は様々な酵素を活性化し、細胞毒性を示すと推定されている。中でも、カルモデュリンの活性化による一酸化窒素合成酵素(NOS)の活性化が深く関与していることが報告されている¹⁾。つまり、過剰なグルタミン酸放出に伴って多量のNOが合成されて、細胞死が惹起されるというものである²⁾。このNOと細胞死との関連であるが、これには様々な経路が関与していると考えられている。とくに、NOはポリADPリボースポリメラーゼ(PARP)の活性化によるエネルギー枯渇³⁾とミトコンドリア呼吸鎖の抑制ならびに活性酸素種(細胞毒)の産生を引き起こす。また、ミトコンドリアに作

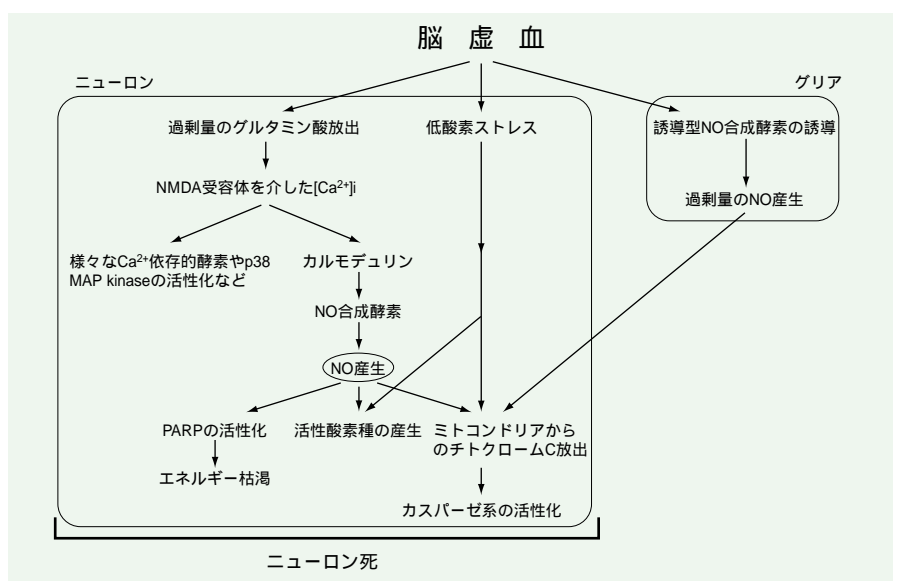
用することによって何らかの機構でアポトーシス開始因子であるチトクロームCが細胞質に放出され、カスパーゼ経路が活性することも報告されている^{4,5)}。

脳虚血・再灌流後に観察される反応としては上記のようなグルタミン酸-NO産生系があるが、脳虚血時に負荷される低酸素状態もストレスとなり、ニューロン死をもたらす原因の一つである。低酸素あるいは無酸素状態では、酸化リン酸化反応が行われないことから、嫌氣的解糖が進むこととなり非生産的なエネルギー産生しか行われない。そのために絶対的なエネルギー不足となる。このような状態は細胞を死に至らしめる原因となる。低酸素ストレスはミトコンドリアからのチトクロームCの遊離を促進させる。この遊離には、ミトコンドリア膜電位の低下を伴うが、因果関係については今のところ明らかにされていない。先に述べたように、チトクロームCの遊離に引き続きカスパーゼの活性化とその基質蛋白質の分解が起こることで、アポトーシスが実行される⁶⁾。

ニューロンを取り巻くグリア細胞も脳虚血によって様々な反応を引き起こす。例えば、炎症性サイトカイン、ケ

モカイン、BDNFやGDNFなどの成長因子が産生される。このように、ニューロンの生存維持に関わる因子が産生される一方で、ニューロン死を誘導する因子(TNF- α など)も産生される。また、詳細な機構は不明であるが(おそらくTNF- α やIL-1 β などの炎症性サイトカインなどが関与している?)、脳虚血時にグリア細胞では誘導型一酸化窒素合成酵素(iNOS)が誘導される。iNOSは恒常型NOS(nNOS)とは異なり、一旦誘導されると刺激の有無にかかわらず大量のNOを産生する。したがって、グリア細胞の近傍に位置するニューロンは長時間高濃度のNOに暴露されることとなり、上記に記した経路でアポトーシスを起こすものと推定されている^{7,8)}。

ニューロンはストレスに対して脆弱であるのに対して、グリアは抵抗性を示すことが知られている。したがって、グリアでは何らかの防御機構が備わっていることが示唆され、その単離・同定が進められている。詳細は次号にて述べるが、熱ショック蛋白質HSPやグルコース飢餓蛋白質GRPなどの分子シャペロンがストレス抵抗性の獲得に関わっていることが報告されている。したがって、これらの蛋白質をニュー



ロンで強制発現させることにより、虚血ストレスによる細胞死を効果的に抑制することが示されている。将来的には、これらの内因性抵抗蛋白質の発現を調節するような薬物が、新規脳梗塞治療薬として開発されることも期待される。

〔参考文献〕

1)Bredt, D. S., Hwang, P. M., and Snyder, S. H. : Nature, 347, 768 (1990)
 2)Dawson, V. L., Dawson, T. M., London, E. D., Bredt, D. S., and Snyder, S. H. : Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88, 6368 (1991)
 3)Eliasson, M. J., Sampei, K., Mandir, A. S., Hurn, P. D., Traystman, R. J., Bao, J., Pieper, A., Wang, Z. Q., Dawson, T. M., Snyder, S. H., and Dawson, V. L. : Nat Med., 3, 1089 (1997)

4)Uehara, T., Kikuchi, Y., and Nomura, Y. : J. Neurochem. 72, 196 (1999)
 5)Moriya, R., Uehara, T., and Nomura, Y. : FEBS Lett. 484, 253 (2000)
 6)Araya, R., Uehara, T., and Nomura, Y. : FEBS Lett. 439, 168 (1998)
 7)Nomura, Y. : Toxicol. Lett. 102, 65 (1998)
 8)Nomura, Y. : Life Sci. 68, 1695 (2001)

iNOS Western Blot Kit wako

プロット用

誘導型一酸化窒素合成酵素 (iNOS) は、サイトカインや細菌の LPS 等の刺激で発現誘導され、NO を発生させます。大量に発生した NO は細菌の感染防御に働くだけでなく、炎症、自己免疫疾患などを誘起させると考えられています。

本品は、一次抗体から発色試薬までウエスタンプロットに必要なすべての試薬が揃っていますので、容易に iNOS の検出を行うことができます。

〔キット構成〕

- 1) Anti iNOS, Monoclonal Antibody 25 μ l
- 2) Anti Mouse IgG (H+L), Horse, Alkaline Phosphatase Conjugated 10 μ l
- 3) Wash Solution (5 \times) 100ml
- 4) Blocking Solution 90ml
- 5) BCIP 70 μ l
- 6) NBT 150 μ l
- 7) Chromogenic Buffer Solution 25ml

〔操作法〕

- 1. ブロッキング..... 室温、30分
- 2. 洗浄..... 1分 \times 3回
- 3. 一次抗体..... 室温、1時間
- 4. 洗浄..... 5分 \times 3回
- 5. 二次抗体..... 室温、30分
- 6. 洗浄..... 5分 \times 3回
- 7. 発色反応..... 1時間～一晩
- 8. 水洗
- 9. 風乾

〔使用例〕

マウスマクロファージ RAW264.7 細胞ライゼートでの iNOS の検出
 RAW264.7 細胞を LPS、IFN- γ で処理後、超音波破砕した。
 1: 分子量マーカー
 2: 20 \times 10⁴ cells/lane
 3: 10 \times 10⁴ cells/lane
 4: iNOS 標品 (コード No. : 148-07111)

299-57801 24 レーン用 35,000 円

〔関連商品〕

コード No.	品名	規格	容量	希望納入価格 (円)
012-18631	Anti Rat iNOS, Monoclonal Antibody	免疫化学用	1ml 用	30,000
015-18621	Anti Rat iNOS Peptide, Rabbit	免疫化学用	500 μ l	20,000
148-07111	Nitric Oxide Synthase Solution, inducible, from Mouse Macrophage	生化学用	50units	15,000
019-18641	Anti Rat nNOS, Monoclonal Antibody	免疫化学用	1ml 用	30,000

PARP Western Blot Kit wako

アポトーシス研究用

アポトーシスの実行過程においては、多くのタンパク質がカスパーゼにより分解されることが知られています。ポリ(ADP-リボース)ポリメラーゼ (PARP) は、カスパーゼ-3 の基質の一つであり、分解により 85k の産物が生成することが知られています。

本品は、一次抗体から発色試薬までウエスタンプロットに必要なすべての試薬が揃っていますので、TUNEL 法やアネキシン 法との組合せにより、容易にアポトーシスの初期判定を行うことができます。

〔キット構成〕

- 1) Anti PARP (C-terminal), Rabbit 40 μ l
- 2) Anti Rabbit IgG (H+L), Goat, Alkaline Phosphatase Conjugated 40 μ l
- 3) Wash Solution (5 \times) 100ml
- 4) Blocking Solution 90ml
- 5) BCIP 70 μ l
- 6) NBT 150 μ l
- 7) Chromogenic Buffer Solution 25ml

〔操作法〕

- 1. ブロッキング..... 37 $^{\circ}$ C、30分 (4 $^{\circ}$ C、一晩)
- 2. 一次抗体..... 室温、1時間
- 3. 洗浄..... 3分 \times 3回
- 4. 二次抗体..... 室温、1時間
- 5. 洗浄..... 3分 \times 3回
- 6. 発色反応..... 1時間～一晩
- 7. 水洗
- 8. 風乾

〔使用例〕

HL60 細胞ライゼートでの PARP 分解産物の検出
 HL60 細胞をアクチノマイシン D によりアポトーシスを誘導した。
 1: 分子量マーカー
 2: HL60 細胞ライゼートの SDS-PAGE
 3: HL60 細胞ライゼート (アポトーシス非誘導) のウエスタンプロット
 4: HL60 細胞ライゼート (アポトーシス誘導) のウエスタンプロット

295-56801 24 レーン用 35,000 円

〔関連商品〕

コード No.	品名	規格	容量	希望納入価格 (円)
019-16821	Anti PARP C-terminus, Rabbit	免疫化学用	100 μ l	53,000
016-16831	Anti PARP, Monoclonal Antibody, Affinity purified	免疫化学用	100 μ g	48,000
168-18821	Poly(ADP-ribose) polymerase, from Bovine Thymus	生化学用	100 μ g	52,000



新規クリプトスポリジウム & ジアルジア検出キット

BTF (Biotechnology Frontiers) Pty Ltd. はオーストラリアのシドニーにその活動拠点を置くバイオテクノロジーの会社です。我々の健康と生活環境を脅かす微生物の検出分野ではより確かな分析法が求められておりましたが BTF 社はクリプトスポリジウムとジアルジアを同時に且つ正確に測定できる試薬(EasyStain C&G FITC)を発売しました。従来の試薬に比較して特異性が高く明確なコントラストでもってより精度の高い検査結果を得ることが可能になりました。併せて微生物の分析分野では初めての IQC(Internal Quality Control)を開発、Quality Assurance System の導入により品質管理をより早く、正確に且つ安価に行うことができるようになりました。

EasyStain C&G FITC

本品はクリプトスポリジウムとジアルジアそれぞれに特異的な抗体の IgG₁ を FITC 標識したものを混合して使用しています。従来は IgM 及び IgG₃ 抗体であったため、藻、バクテリア、無機物の粒子及び酵母などと非特異反応を起すことが認められていましたが IgG₁ 抗体の使用で解決することができました。

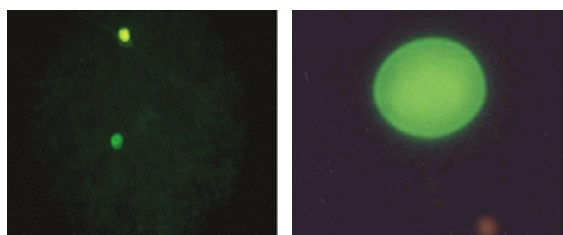
〔キットの特長〕

- 1.モノクローナル IgG₁ 抗体使用により特異反応が高い
- 2.非特異物質(藻、バクテリア、無機物の粒子及び酵母)と反応しない
- 3.試薬調製が不要
- 4.反応条件は室温、20分

〔キットの内容(80回用)〕

- | | |
|--------------------------|--------|
| 1. IgG ₁ 抗体溶液 | 4 ml |
| 2. 洗浄液 | 50 ml |
| 3. マウンティングメEDIUM | 1.5 ml |
| 4. 陽性コントロール | 0.5 ml |
| 5. 検査成績書 | |

〔EasyStain C&G FITC キット使用による検鏡例〕



クリプトスポリジウム
(oocysts)

ジアルジア
(cyst)

ColorSeed C&G

従来のクリプトスポリジウム及びジアルジア測定には濃縮、精製そして検出方法並びに測定操作者の手法により大きくばらつきが見られました。本品は1バイアル中にクリプトスポリジウム及びジアルジアが正確に各々100個蛍光標識された状態に入っています。ColorSeed C&G の導入により測定/検出方法の違い及び測定の個人差を解消、品質管理システムを構築できます。

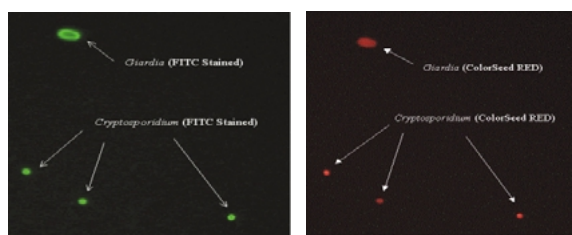
〔コントロールの特長〕

- 1.クリプトスポリジウム及びジアルジア検出の新しい品質管理システムを提供
- 2.1バイアル中に正確に各々100個の蛍光標識されたクリプトスポリジウム及びジアルジアを含む
- 3.添加回収実験及び確認試験に使用
- 4.調製不要、実験室でのコンタミネーションから開放
- 5.γ線照射並びに不活化済なので使い易い

〔コントロールセットの内容〕

1. 約1ml(5ml試験管)×10本
2. 検査成績書

〔ColorSeed C&G の検鏡例〕



FITC による検鏡

Texas Red による検鏡

EasySeed C&G-100

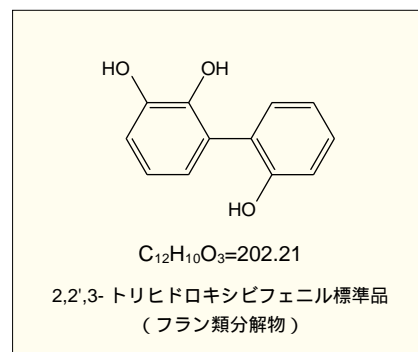
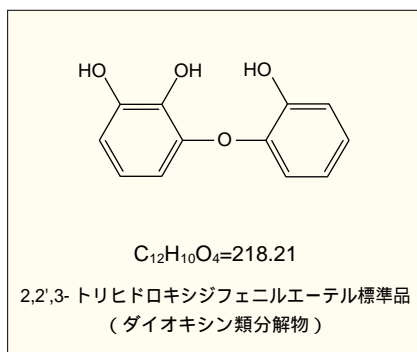
本品1バイアルには正確に各々100個のクリプトスポリジウム及びジアルジアが分注されており、陽性コントロールとして使用されます。製品は試験分析表と共に提供されますので測定捜査中の品質管理パラメーターとしてまたスパイクテスト用のサンプルとして活用できます。

コード No.	メーカーコード	品名	容量	希望納入価格(円)
503-95971	STAIN-FITC	EasyStain C&G FITC	80回用	145,000
506-95961	CS-CG-100	ColorSeed CG-100	10本入	107,000
509-95951	ES-CG-100	EasySeed CG-100	10本入	97,000

環境分析用標準品 2品目追加!

ダイオキシン類による環境汚染は全世界に広がり大きな社会問題になっています。環境中に拡散したダイオキシン類を分解する方法に、熱処理や化学処理等がありますが、土壌や河川中の底泥中に混ざっているダイオキシン類を処理するにはコストがかかり不向きと言われています。

近年、ダイオキシン類処理方法の一つとして、微生物を利用した分解法が検討され、ダイオキシン類を炭素源とする微生物の探索が行われていま



す。本品は、ダイオキシン類分解微生物の探索時に利用される化合物です。

コード No.	品名	規格	容量	希望納入価格(円)
201-15541	2,2',3-Trihydroxydiphenyl Ether Standard	環境分析用	100mg	35,000
208-15551	2,2',3-Trihydroxybiphenyl Standard	環境分析用	100mg	25,000

ダイオキシン類溶媒シリーズ 追加!

Decane

ダイオキシン類分析用

ダイオキシン類を分析する際の試料の溶解や希釈溶媒として使用します。ダイオキシン類が低濃度であることを保証した溶媒です。

[ダイオキシン類分析適合性]

ダイオキシン	4~6 塩素化物	10fg/μl 以下
	7, 8 塩素化物	50fg/μl 以下
ジベンソフラン	4~6 塩素化物	10fg/μl 以下
	7, 8 塩素化物	50fg/μl 以下
コプラナ PCB *		10fg/μl 以下

048-28543	2ml × 5	9,000 円
042-28541	100ml	12,000 円

* ノンオルト-Co-PCB(4~6 塩素化物) 4 種類、モノオルト-Co-PCB(5~7 塩素化物) 8 種類

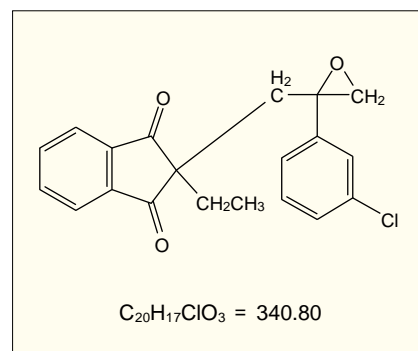
農薬標準品 追加!

Indanofan Standard

残留農薬試験用

外観：白色結晶性粉末～粉末
化学名：(RS)-2-[2-(3-Chlorophenyl)-2,3-epoxypropyl]-2-ethylidan-1,3-dione
溶解性(25℃)：ヘキサン 10.8g/l、ジクロロメタン >500g/l、メタノール 120g/l、水 17.1mg/l

別名：クサストップ A1 キ口粒剤 36
備考：除草剤
m.p. : 61.7
CAS No.: 133220-30-1



098-04841	200mg	20,000 円
-----------	-------	----------

BMP ~ 骨形成因子

BMP(Bone Morphogenetic Protein)は、TGF- β (Transforming Growth Factor- β)スーパーファミリーに属するサイトカインで、骨形成因子として同定され、細胞増殖、分化など様々な機能をもつことが分かってきました。骨形成機構の解明や再生医療の研究にご利用下さい。

Bone Morphogenetic Protein 2, Human, recombinant

生化学用

製 法：大腸菌で発現させた後、再構成し、精製。

形 状：凍結乾燥品(添加剤不含)

生物学的活性：ED₅₀=10 ~ 20nmol/ℓ (250 ~ 500ng/ml)

(2 ~ 4 × 10³ units/mg に相当)

(C2C12 細胞にアルカリホスファターゼを誘導)

〔参考文献〕

1)Kirsch,T. *et al.* : *EMBO J.*, 19, 3314(2000)

2)Kirsch,T. *et al.* : *Nat. Struct. Biol.*, 7, 492(2000)

3)Scheufler,C. *et al.* : *J. Mol. Biol.*, 287, 103(1999)

026-14811	5 μ g	35,000 円
-----------	-----------	----------

Bone Morphogenetic Protein 4, Human, recombinant

生化学用

製 法：大腸菌で発現させた後、再構成し、精製。

形 状：凍結乾燥品(添加剤不含)

生物学的活性：ED₅₀=100 ~ 400ng/ml

(2.5 ~ 10 × 10³ units/mg に相当)

(C2C12 細胞にアルカリホスファターゼを誘導)

023-14821	5 μ g	35,000 円
-----------	-----------	----------

Transforming Growth Factor- 2, Human, recombinant

生化学用

製 法：大腸菌で発現させた後、再構成し、精製。

形 状：凍結乾燥品(添加剤不含)

生物学的活性：ED₅₀=0.05 ~ 0.1 ng/ml

(1 ~ 2 × 10⁷ units/mg に相当)

(ミンク肺細胞株 Mv1Lu(CCL-64) の増殖)

〔参考文献〕

1)Sporn,M.B. *et al.* : *Science*, 233, 532(1986)

2)Meager,A. : *J. Immunol. Methods*, 141, 1(1991)

201-15661	2 μ g	30,000 円
-----------	-----------	----------

〔関連商品〕

コード No.	品 名	規 格	容 量	希望納入価格(円)
014-17971	Activin AB, from Bovine Ovarium	生化学用	2 μ g	30,000
017-17961	Activin A, from Bovine Ovarium	生化学用	2 μ g	30,000
011-17981	Activin B, from Bovine Ovarium	生化学用	2 μ g	30,000
202-14231	Transforming Growth Factor- 1, from Human Platelets	生化学用	2 μ g	40,000
204-14291	Transforming Growth Factor- 1, Human, recombinant	生化学用	2 μ g	49,000
152-02311	Osteogenic Growth Peptide	生化学用	1mg	24,000
157-02121	Osteoprotegerin(22-202), Human, recombinant	生化学用	25 μ g	59,000
182-01471 188-01473	RANK Ligand soluble, Human, recombinant	生化学用	10 μ g 1mg	37,000 照 会
032-17751 038-17753	Calcitonin Acetate, Salmon	生化学用	200 μ g 1mg	7,000 25,000
099-04511	Insulin-Like Growth Factor-I, Human, recombinant	生化学用	100 μ g	37,000
096-04521	Insulin-Like Growth Factor-II, Human, recombinant	生化学用	75 μ g	37,000
133-13611	Macrophage Colony Stimulating Factor, Human, recombinant	生化学用	10 μ g	39,000
014-11491	Anti Human Calcitonin, Rabbit	免疫化学用	100 μ ℓ	14,300
222-01445	Villanueva Bone Stain Solution	病理研究用	500ml	9,500
221-01351	Villanueva Bone Stain Reagent	病理研究用	500mg × 10	15,000
297-56001	Osteoresin Embedding Kit	病理組織包埋用	1kit	20,000

SM 試薬

法医学研究用

SM 試薬はヒト精液中に多量存在する前立腺由来の酸性ホスファターゼ検出試薬として精液の証明に広く用いられています。本試薬は検体に直接滴下する直接呈色反応法、試薬を噴霧する噴霧法、さらに本試薬をクロマト用紙に浸して作成したテストペーパーとして随時使用できる簡易、迅速な精液の検出法として利用できます。



〔キット内容〕

- | | |
|--|----|
| SM 試薬 No.1 (α -Naphthylphosphoric acid) | 1g |
| SM 試薬 No.2 (Diazonium <i>o</i> -dianisidine) | 2g |

〔使用方法〕

SM 試液の調製

- 1) 100ml の 0.2mol/l ぐえん酸緩衝液 (pH 5.0) に SM 試薬 No.1 を 0.2g、No.2 を 0.4g、室温で攪拌しながら溶解します。
- 2) 30分間冷暗室に放置後、沈殿物をろ過して、得られた琥珀色の溶液を遮光瓶に入れ冷蔵庫内に保存します (SM 試液)。

注) この SM 試液は、沈殿が生じてもろ過すれば 1 週間使用できます。しかし、熱や光に不安定であるため、必要量を用時調製することをお勧めします。

〔検出方法〕

1) 直接呈色反応法

検体 (布地の斑痕などは繊維一本を使用) を硫酸パラフィン紙または白色磁製皿に載せ SM 試液を 1 滴滴下すると反応陽性の場合には直ちに鮮やかな紫色に呈色します。検体が体液など液体の場合は小試験管に少量採り少量の左記ぐえん酸緩衝液で希釈し、本試液を滴下して呈色反応を観察します。いずれの場合も対照試験と比較して判定します。

2) 噴霧法

左記緩衝液で 5 倍に希釈した SM 試液をガラス噴霧瓶に入れ検体 (白布地の場合) に噴霧すると精液斑であれば付着部位全体が紫色を呈します。本試液は用時調製して使用します。

3) テストペーパー法

テストペーパーの作製法:

SM 試液にろ紙を浸して直ちに過剰の試液を吸い取らせ、暗室内で風乾し、適当な大きさに切ります。これを着色瓶に入れて冷蔵庫内に保存すれば三週間は使用可能です。

精液の証明法:

検体が布地であれば繊維一本を採取し、テストペーパーに載せ、左記ぐえん酸緩衝液を 1 滴滴下して検体をはさみます。陽性の場合には検体付着個所のテストペーパーは直ちに紫色を呈します。体液または体表面に付着した検体の場合は予め左記緩衝液で湿したテストペーパーの使用をお勧めします。

〔参考文献〕

- 1) 須山弘文: ヒト精液に関する研究 特に法医学的検査法を中心として, 日法医誌, 18(8), 166(1964)
- 2) 澤田英夫、白井弘行他: 直接呈色反応による精液斑検査について, 科学と捜査, 12(1), 55(1959)
- 3) 須山弘文、澤田英夫他: 噴霧法による精液の直接検出法について, 科学警察研究所報告, 12(4), 473(1959)
- 4) 須山弘文、澤田英夫他: テストペーパー法による精液の酸性ホスファターゼの証明について, 科学警察研究所報告, 12(4), 478(1959)

コード No.	品名	規格	容量	希望納入価格 (円)
297-58201	SM Reagent	法医学研究用	500ml 用	8,500

残留農薬・PCB 試験用溶媒 5,000 倍濃縮保証品

現在、当社では残留農薬・PCB 試験用溶媒として 300 倍濃縮保証品と 2,000 倍濃縮保証品を販売しておりますが、このたび残留農薬・PCB 試験用溶媒 2,000 倍濃縮保証品の品質保証を更に充実させて 5,000 倍濃縮保証品として販売します。

年々農薬・PCB などの分析は微量分析に移行してきており、使用される溶媒も厳しい規格試験に合格したものが求められております。5,000 倍濃縮保証品は、1ℓ 包装、3ℓ 包装ともにアルミキャップを採用しておりますので、プラスチックキャップからの微量の汚染もなく、使用できます。



コード No.	品名	規格	容量	希望納入価格(円)
011-19201 017-19203	Acetone 5,000	残留農薬・PCB 試験用	1ℓ 3ℓ	2,300 5,400
013-19401	Acetonitrile 5,000	残留農薬・PCB 試験用	1ℓ	3,200
028-14751	Benzene 5,000	残留農薬・PCB 試験用	1ℓ	2,300
020-14831	t-Butyl Methyl Ether 5,000	残留農薬・PCB 試験用	1ℓ	7,000
033-18641	Chloroform 5,000	残留農薬・PCB 試験用	1ℓ	4,100
036-18631	Cyclohexane 5,000	残留農薬・PCB 試験用	1ℓ	4,000
043-28451 049-28453	Dichloromethane 5,000	残留農薬・PCB 試験用	1ℓ 3ℓ	3,200 7,800
040-28461	Diethyl Ether 5,000	残留農薬・PCB 試験用	1ℓ	5,100
053-07011	Ethanol (99.5) 5,000	残留農薬・PCB 試験用	1ℓ	4,400
052-06981	Ethyl Acetate 5,000	残留農薬・PCB 試験用	1ℓ	2,300
083-07911 089-07913	Hexane 5,000	残留農薬・PCB 試験用	1ℓ 3ℓ	2,100 5,100
132-14161 138-14163	Methanol 5,000	残留農薬・PCB 試験用	1ℓ 3ℓ	2,050 5,250
162-20671	Petroleum Ether 5,000	残留農薬・PCB 試験用	1ℓ	2,700
209-15581 205-15583	Toluene 5,000	残留農薬・PCB 試験用	1ℓ 3ℓ	3,600 7,800

収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 2002年4月15日
発行責任者 金澤 廣 継
編集責任者 大西 礼子
印刷所 共進社印刷株式会社

フリーダイヤル：0120-052-099
フリーアクセス：0120-052-806

E-mail labchem-tec@wako-chem.co.jp
U R L http://www.wako-chem.co.jp