ISSN 1347-4804

October 2002
Vol.70 No.4

# WAKO 和光純薬時報

和光純薬工業株式会社

**Dioxin ELISA Kit *wako***
**ダイオキシン類分析用**

抗ダイオキシンモノクローナル抗体による ELISA 法を用いた生体中のダイオキシン類を測定するスクリーニング用キットです。マイクロプレートリーダーを用いて迅速・簡便かつ低価格に、多検体同時分析が可能です。

**特 長**

① 高感度分析が可能（1 ～ 100pg/assay）
② 標準品として毒性のない 2,7,8-TCDA を使用
③ 低価格（2,400 円／検体　n＝2 で実施し、41 検体測定した場合）
④ 多検体同時分析可能（96 穴マイクロプレート使用）
⑤ 簡便（2 日間で測定終了）

| | | |
|---|---|---|
| **299-59001** | 96 回用 | **98,000 円** |

**詳しくは、p.9 をご参照下さい。**

**目 次**

**化学大家**
「マリー・キュリー」　島尾　永康 ………2
**総 説**
「酵素免疫測定法（ELISA）によるダイオキシンの簡易測定」　奥山　光伸 ………6
「P-glycoprotein と multidrug resistance-associated protein 1 の特異的阻害剤 agosterol A」　秋山　伸一、青木　俊二 ……10
「転写シークエンス技術を利用した解読困難な配列へのアプローチ」　石川　友一 ……14
**シリーズ**
＜ Talking of LAL ＞
「第 49 話 透析療法とエンドトキシン」　土谷 正和 ……17
＜脳科学一口メモ＞
「小胞体ストレスの神経変性疾患への関与」　金子　雅幸、野村　靖幸 ……18
**テクニカルレポート**
「ふっ素化シリコン修飾シリカゲルカラム Fluofix®のユニークな分離特性」　和田　忠昭 ……16
**新製品フラッシュ**
ダイオキシン ELISA キット ワコー …………1,9
アゴステロール A ……………………………13
サイトカイン、ケモカイン …………………20
イデベノン、T-43362、Ras 阻害ペプチド、ゲラニルゲラニルピロりん酸三アンモニウム溶液、ファネシルピロりん酸三アンモニウム溶液、花粉 ………………………………………………22
㈱ホクドー 膵島培養キット…………………23
BFP/GFP ベクター …………………………24
I.F. LAB 社 ビルディングブロック、ライブラリー有機化合物 …………………………………25
ワコーパック ®Pre-Clean4.0、固相抽出カラム ………………………………………………26
㈱エルメックス アクアテスト II ATB-50 …27
ダイオキシン類分析用ジエチレングリコール、環境分析用溶媒 ………………………………28
**試作品案内**
エンドトキシン吸着剤くっつくりん™ …………9
**お知らせ**
第 18 回 Wako ワークショップ開催のご案内 ………………………………………………19
遺伝子工学用試薬カタログ・マニュアル発行、日本分子生物学会セミナー開催のご案内 ………………………………………………25

Wako

# マリー・キュリー (1867.11.7 − 1934.7.4)

科学史家　島尾　永康

## ロシアの支配下の祖国からパリへ

マリー・キュリー（結婚前の名前はマリア・スクロドフスカ）は、1867年11月7日、中学校の物理と数学の教師の父と、女学校の校長だった母の5番目の末子として、ワルシャワで生まれた。当時ポーランドはロシア領だったので、ロシア語を強制された。マリーは早い時期からロシア語、フランス語、ドイツ語、英語を読めるようになった。17歳から自活し、パリ留学の費用を貯めるため、田舎の裕福な家庭に3年半住み込みの家庭教師をした。ワルシャワへ戻ると、祖国の独立を念願して秘密に組織された移動大学の講義で科学に目覚めた。ブンゼンの許で研究した人から化学の手ほどきを受けた。

24歳のとき久しく夢見ていたパリに出た。当時のフランスでは大学に学ぶ女性は少なく、パリ大学（ソルボンヌともいう）の約9000人の学生のうち、女性約250人はほとんどが外国人だった。4年間の大学生活を屋根裏部屋の貧しい下宿で、ルームメートなしの孤独な生活を選び、食費も切り詰めた。1893年、マリーは物理学の学士試験に1番で合格し、翌年、数学の学士試験に2番で合格した。義兄はこれをマリーの生涯の英雄時代と称賛した。

物理学の学士になったマリーはリップマン教授の研究室で、鋼の磁性の研究をした。しかし実験室が手狭で装置や試料を置く場所がなく困っていたので、ポーランド人の物理学教授に相談したところ、紹介されたのがピエール・キュリーだった。

## ピエール・キュリーとの出会い

ピエールの祖父も父も医師だった。パリ・コミューンのとき15歳と12歳だった兄ジャックとピエールは、バリケードの上で負傷した人々を手当てする父を手伝った。3歳半違いの兄弟はかなり性格が異なっており、ジャックは活発で行動的だったがピエールは内省的で、新しい問題にぶつかると、満足的な説明がつくまで執拗にとりついていた。これでは普通

図1. マリー・キュリー（46歳）。

の学校では良い成績を上げられないが、学問的な資質はあると見抜いた父は、ピエールを小学校も中学高校も行かせず家庭で教えた。森や草原や小川につれていって動物や植物の観察をし、実験の面白さを教えた。14歳から良い数学教師をつけたので、数学とくに幾何学は非常に進んだ。結果として独自の英才教育を施したことになり、16歳で大学入学資格試験に合格し、18歳でソルボンヌの理学士になり、理学部の助手に任命された。

21歳で、ピエールはジャックと共同で“ピエゾ電気”を発見した。この発見から水晶板ピエゾ電気計という、微弱電気量を測定できる装置をつくった。23歳でピエールは市立物理化学学校の実験主任になり、ソルボンヌの教授になるまで22年間、研究生活のほとんどをこの学校で過ごした。結晶の対称性の優れた論文を発表し、キュリー型精密天秤を完成し、キュリーの法則とよばれる常磁性体における温度と磁性の関係の研究で博士号を得た。

若くして優れた業績をあげたが、フランスでは認められず、かれを認めたのはつねに外国の学界だった。実力にふさわしい地位を得られなかったのは、一つは大学教授になるために絶対有利な名門校であるエコール・ノルマル（高等師範学校）を出ていなかったことと、今ひとつは人と競争しようという気持ちが全くない性格だったからである（マリー・キュリー著、『ピエール・キュリー伝』）。競争者として勝ち抜いてきたマリーとは正反対の性格だった。研究も急いで発表しなければならない競争の激しい分野は好まず、研究者が少数でゆっくり研究できる分野を好んだ（図2）。

マリーはピエールの人柄に惹かれ、科学上の業績を尊敬していた。ピエールの方は、愛すべき女性であると同時に、仕事の伴侶にもなりうる女性を見出したことを喜び、最初の出会いからわずか数週間後に結婚を申し込んだ。フランスの学界のアウトサイダーであり、パリ・コミューンの支持者の息子だったピエールと、外国からきたマリーはいずれも、生涯、よそ者の意識をもっていた。1895年、ピエールが博士号を取得した年、2人は結婚した。ピエールは36歳、マリーは28歳だった。2人は区役所での式だけで済まし、白いドレスも、指輪も、宗教的儀式も、宴会もなかった。親戚から贈られた新品の2台の自転車で新婚旅行に出かけた（図3）。

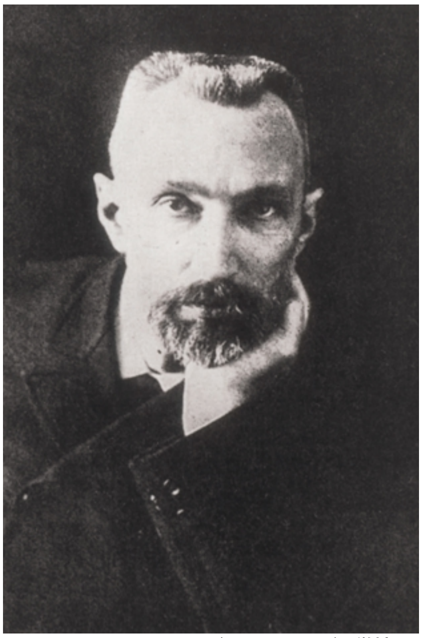


図2. ピエール・キュリー（1859 − 1906）。微妙な実験装置を組み立てるとき、芸術家のような喜びを味わった。

図 3. 自転車で新婚旅行へ。当時、女性はまだ自転車に乗らなかった。マリーはこの点でも先覚者だった。

## ラジウムの発見

1896年、W. K. レントゲンがX線を発見して科学界の大きな注目を惹いた。しかしその数ヶ月後、アンリ・ベックレルが光を通さない黒い紙に包んだウラン化合物が一種の放射線を出すこと、またそれはまわりの空気を帯電させることを発見したが、科学者たちはほとんどこれに注目しなかった。博士論文のテーマを探していたマリーはこの現象を選んだ。空気を帯電させる点に注目し、まず正確な測定が必要だと考えて、イオン化された空気の中を通る微弱電流を、ピエールの作った高感度の電気計とピエゾ電気計で測定した（図4）。これは生涯の方法となった。ウラン化合物の他にトリウム化合物も放射線を出すことが分かった。1898年4月、このような性質を“放射能”と命名した。2種類のウラン鉱石がウランそのものより強い放射能があることから、それらの鉱石の一つ、ピッチブレンドにはウランより強い未知の放射性元素があるに違いないと考えた。そのため分析し、分別結晶を繰り返した。ピエールはほんの数週間と考えて、自分の結晶の成長の研究を中断して、マリーに協力した。研究を始めて半年後、ピッチブレンドから抽出されたビスマスにウランの400倍の強さの新元素が含まれていることを発見し、祖国ポーランドに因んで「ポロニウム」と命名して発表した（7月）。さらに半年後、ピッチブレンドから抽出されたバリウムにウランの900倍の強さの新元素を発見し、これをラジウムと命名した（12月）。

新元素を科学界に承認させるためには、それを分離し、原子量を決定しなければならない。ラジウムの分離のほうがポロニウムより易しいことが分かり、ラジウムに集中した。物理化学学校のA. ドビエルヌも協力した。仕事の役割分担では、新しい放射性物質を探すという面白い仕事はドビエルヌが分担し、かれは1899年にアクチニウムを発見した。ピエールは放射能の物理学的測定、マリーは化学的処理を分担し、結晶作業を数千回おこなった。オーストリア政府の好意で提供された約7トンのピッチブレンドを処理して数ミリグラムのラジウムを抽出するのに4年かかった。膨大な量のピッチブレンドからのラジウム抽出という肉体労働に敢然と挑んだのはマリーであった（イレーヌ・キュリー、「わが母マリー・キュリーの思い出」）。

図 4. マリー・キュリーと放射能測定装置。

この化学的処理は、ガラス屋根で雨漏りもする廃屋でおこなわれた。しかし科学アカデミーから2万フランの研究費も出たから、全く研究費がなかったわけでもない。1902年、純粋の塩化ラジウム0.1デシグラムを抽出した。濃縮された精製物はひとりでに発光し、とくに夜はこの世のものとは思えぬ神秘的な光を放った。ラジウムの新しいスペクトルも確認された。原子量を225と決定（1907年に226.45と再決定）した。放射能はウランの500万倍だった。こうして放射能科学という新しい分野が開かれた。この間マリーの体重は約9キロ減り、ラジウムを素手で扱ったために指先に生涯治らぬ火傷を負った。ピエールは放射線が皮膚に火傷を生じるという研究をした。マリーはそれを知っていたはずであるが、なぜか防御処置を講じなかった。ピエールはラジウムの放射線に医療効果があることを指摘し、キュリー療法（あるいはラジウム療法）の開拓者になった。これはとくにガンに効果を発揮したので、自分たちの発見が人類の幸福に役立つという貴重な確信をもつことができた。このみすぼらしい廃屋で研究に熱中した数年こそ2人の生涯の最も幸福な時代だった（マリー・キュリー、「自伝」）。

ラザフォードとソディは、放射性元素は$\alpha$線と$\beta$線を放出して、原子は崩壊し、元素は別の元素に変換するという大胆な理論で放射能を説明した（1902）。経験主義的なキュリーたちは、容易にはこれを容認しようとはしなかったが、最終的には認め、ラジウムはウランからの生成物と考えるようになった。マリーはポロニウムが捕捉しにくいのは、その半減期が140日と短いからであることも突き止めた。1900年、マリーはセーヴルの女子高等師範学校の講師になった。女高師で初の女性の教師であった。物理実験などやったことのない女高師の学生に、マリーは初めて実験をさせて学生に喜ばれ、パリの実験室にもつれてきた。教え子のあるものは生涯、マリーと親しい関係を保った。実験科学者であり教師であるマリーは二児の母でもあった。1897年にイレーヌが、1904年にエーヴが生まれた。義父ウジェーヌ・キュリーが幼子の面倒を見た。

1903年6月、マリーは「放射性物質の研究」で理学博士になった。フランスで初の女性の博士だった。12月、キュリー夫妻とベックレルに、「放射能に関する共同研究」に対してノーベル物理学賞が与えられた。マリーは衰弱しており、2人がストックホルムに行ったのは1905年6月で、ピエールが受賞講演をした。マリーはノーベル賞を受賞した最初の女性となった。彼女の次に女性のノーベル賞受賞者となったのはマリーの娘のイレーヌで、1935年の化学賞である。ノーベル賞を受賞するとパリ大学もほってはおけず、

1904年、ピエールのために理学部に新しい物理学講座を新設した。1905年、科学アカデミー会員にもなった。ようやくふさわしい地位についたかと思うと突然の死が襲った。

### ピエールの交通事故死

1906年4月、ピエールは雨の日、パリ市内で道路を横断するとき滑って、馬車に轢かれ、頭蓋骨は粉砕された。11年間つねに一緒に暮らし、ほとんど別れてすごしたことのないピエールの突然の死でマリーは人が変わった。快活さを失い、冷たい、無表情な人間になった。政府は未亡人年金を贈ろうとしたが、マリーは断った。

パリ大学はマリーをピエールの後任とするという画期的な決断を下し、1908年、正式にパリ大学教授となった。1906年11月5日のソルボンヌ初の女性の講義には、大衆が殺到して階段教室は超満員となったが、マリーの弱々しい声の、地味な講義は大衆を失望させた。

マリーは公立学校の教育を嫌い、ピエールの父がピエールにしたように、マリーも娘のイレーヌはピエールに似て、じっくり考える性質と見て取り、イレーヌが10歳のとき、同僚の大学教授たちを誘い、かれらの子供たち10人に独自の英才教育をおこなった。マリーは子供の体育を重視し、授業は1日1科目に限った。古典教育は必要なしと考え、科学に重点を置き、フランス語と現代外国語は必要だとした。大抵は家庭の居間でおこなったが、ときにはマリーが物理化学学校の実験室で化学を教え、ジャン・ペランがソルボンヌの実験室で物理を教えた。ポール・ランジュヴァンが数学、コレージュ・ド・フランスの教授アリス・シヤバンヌは英語、ドイツ語、地理、パストゥール研究所のアンリ・ムトンは博物学を教えた。なんとも贅沢な学校だった。これは2年間続いた。イレーヌはこの授業のお蔭で楽々と大学入学資格試験に合格した、とマリーはいう。

### 栄誉とスキャンダルが同時にいたる

1910年末、マリーは友人たちに薦められて、科学アカデミー会員に立候補した。マリーにとって堪えがたかったのは、現会員に儀礼的な戸別訪問をしなければならないという慣習である。マリーは2週間で58人を訪問した。マリーの立候補は、アカデミーに女性を入れるべきか否かという問題をめぐって、大きなセンセーションをまきおこし、女権反対論者や宗教関係者は猛烈な反対運動を展開した。マリー・キュリーは純粋のフランス人でない、ユダヤ系である（事実無根だった）、反宗教的である。したがってアカデミー会員にふさわしくないというのである。ちなみに対立候補はカトリック大学の物理学教授だった。研究も全部ピエールがやったのであって、マリーはかれにくっついてノーベル賞をもらったにすぎないともいわれた。2票の差で落選した（1911年1月）。マリーは二度と科学アカデミーに立候補しなかった。

さらにマリーを深く傷つけることが起こった。ピエールの教え子、ランジュヴァンは永年キュリー家に親しく出入りしていた。かれはエコール・ノルマルに首席で入学し、ケンブリッジ大学にも留学し、37歳でソルボンヌの教授になった（図5）。学者としては迅速に出世したが、家庭生活はもめごとが絶えず、破綻しかけていた。ランジュヴァンもその妻も職人の子であるが、教育の点で両者の間に大きな差が生じていた。彼女は学者の世界を全く理解せず、子供が4人もいるのに産業界からの高給の地位を断ったランジュヴァンを責め立てた。ランジュヴァンへのマリーの同情はいつのまにか恋愛感情に発展していった。マリー44歳、ランジュヴァン39歳である。1911年10月、ヨーロッパとイギリスの一流の物理学者21名が招かれて第一回ソルヴェー会議がブリュッセルでおこなわれ、キュリーもランジュヴァンも参加した。そのころパリの新聞は一斉に、「マダム・キュリーとランジュヴァン氏の情事」と書きたてた。家には投石され、外国女は国へ帰れと罵られた。この事件はマスコミ側とそれに反駁する側との間に、ランジュヴァン自身を含めて、5つの決闘を引き起こした。2人の間柄がどのようなものだったか、第三者には分からない。面白い事に、はるか後になって、マリーの孫娘エレーヌとランジュヴァンの孫ミシェルが結婚している。

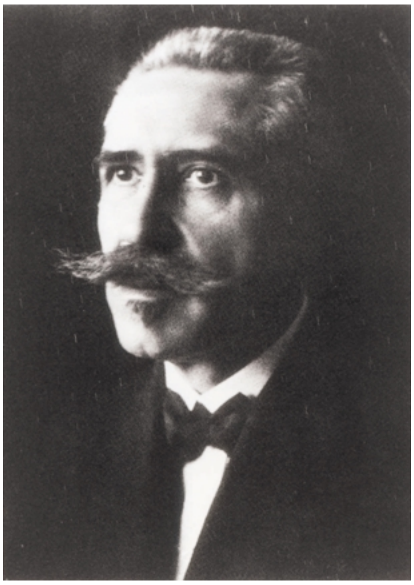


**図5. ポール・ランジュヴァン（1872 − 1946）。フランスの指導的物理学者となる。マリーの現代物理学の理解はかれとの交遊に負うところが大きい。**

このような折も折、スウェーデンから「ラジウム元素とポロニウム元素の発見による化学への貢献」に対してノーベル化学賞を授与するという電報がマリーに届いた。これは実質的に同じ研究に二度目のノーベル賞が単独で与えられたとして、論議を呼んできた。たしかに1903年以後、根本的に新しい発展はなかった。マリーはラジウム原器を作製して度量衡基準局に寄託した。計量の単位名「キュリー」を提案して採択された。『放射能概論』を書いた。しかし際立って重要なものは金属ラジウムの単離（1910）である。それはその他の放射性物質にない物的証拠を示す唯一の元素だった。放射能科学の全体系はラジウム単離の上に構築されているといってよかった。したがってこれに対して与えられたとするのが妥当であろう。

あるノーベル賞委員は、スキャンダルが無実であることが証明されるまで、受賞を断ったらどうかと言ってきた。これに対してマリーは、栄誉は私の科学に対して与えられるのであり、私の個人的行動とかかわりはない。賞はお受けするときっぱりと応答した。マリーは病身をおして出席し、ノーベル賞講演では、いつもより頻繁と一人称を使った。「ラジウム単離は私独りでおこなった。」「私は何度も原子量を独りで確定した」などなど。そこにはピエールの助手的存在でしかなかったと見られてきたことへの強い反発が表れている。

**図 6.　レントゲン車を運転するマリー・キュリー（50 歳）。戦後、マリーは『放射能学と戦争』（1921）を出版した。**

## 第一次大戦中の活躍

“外国女”マリーにとって、大戦はフランスへの忠誠を示す絶好の機会となった。当時民間にはレントゲン装置もいくらか使われていたが、軍には全くなかった。キュリーも医療器具としてのレントゲン装置は使ったことがなかったが、いったん軍の医療施設の欠陥を見出すと、これこそ自分の使命と思い、非常なエネルギーで、赤十字放射線治療班を組織し、寄付を募り、車を集めてレントゲン車に改造し、運転免許をとって自ら運転もし（図 6）、前線に赴いて負傷者の外科手術を助けた。17 歳の娘イレーヌを助手としたが、彼女はまもなく独立して活躍した。20 台のレントゲン車と 200 箇所に設けたレントゲン施設で撮られた写真は 2 年間で 110 万枚に上った。Ｘ線の発見以来、Ｘ線がこれほど実用に使われたことはなかった。イレーヌは戦時中のこの貢献によって政府から表彰されたが、マリーはされなかった。ランジュヴァン事件はまだ忘れられていなかった。

## ラジウム研究所の創設

生涯まともな実験室をもてなかったピエールの夢を、マリーはその死後になって初めて実現した。パリ大学とパストゥール研究所の双方と関連する、2 つの別館からなるラジウム研究所を、ピエール・キュリー通りに設立したのである。放射能に関する物理学・化学部門はマリーを所長とし、放射能と医学・生物学に関する部門は医学者ルゴーを所長として、1914 年 7 月末に完成した（図 1）。

1920 年、アメリカの有力な女性雑誌の女性記者、マリー・メロニーが、マスコミ嫌いのマリーの心を巧みにとらえた。彼女は、アメリカには 50 グラムのラジウムがあるのにキュリーの研究所には 1 グラムしかなく、それも医療用に使われており、キュリー自身は不自由していることや、1 グラムのラジウムが 10 万ドルすることを知った。そこでアメリカの政財界に顔の広いメロニーは、キュリー個人に 1 グラムのラジウムを寄贈する運動を企画し、その見返りにキュリー自身のアメリカ訪問と自伝の原稿を求めた。キュリーはランジュヴァン事件を報道しないという条件をつけてこれを承諾した。マスコミによって痛めつけられたキュリーは、マスコミによって圧倒的な名声をも勝ち取った。ホワイトハウスでアメリカ大統領からラジウム 1 グラムを受け取ったほか、7000 ドルの研究費を寄贈された。

このアメリカ旅行はキュリーの研究所には大きな収穫をもたらし、キュリー自身もこれ以後、大研究機関を管理運営する長老科学者に成長していった。ラジウム研究所のキュリー館はどの研究所よりも多くの女性を受け入れた（図 7）。1931 年には、研究者 37 人のうち 12 人が女性だった。その中の一人、マルグリット・ペレーは、87 番元素フランシウムを発見し、マリーが科学アカデミーに落選して 50 年後に、女性として初の科学アカデミー会員に選ばれた。キュリーの研究所には外国人も多かった。ある年には 14 カ国から 18 人がきていた。キュリーの研究所は放射能と核物理学の分野で、直接間接にフランスのあらゆる研究の中心となっていった。長い間放射線を浴びたので、年齢よりも早く白内障になり、黒板に書いた自分の文字さえ読めなくなっていた。

**図 7.　マリー（54 歳）とイレーヌ（24 歳）。イレーヌ・ジョリオ・キュリー（1897 − 1956）は、1935 年度のノーベル化学賞を受賞。**

キュリー夫妻はラジウム精製に関して何の特許も取らず、その手順を全部公表した。将来のラジウムの経済価値を見通せなかったのかも知れない。もし権利を留保していれば、立派な研究所はわけもなく建てられたであろう。しかしマリーは強調する。自分たちは研究から物質的な利益を引き出そうとは思わなかった。無私無欲で一定の目的にむかう指向が強くて、自分の利益などかまっていられない夢想家も人類には必要なのだ、と（「自伝」）。

1934 年 7 月 4 日、悪性貧血のため亡くなった。67 歳だった。

## パンテオン合祀

1995 年、2 人の遺体はフランスの偉人を合祀する廟であるパンテオンに祀られた。2 人のよそ者は、ついにフランスの国民的英雄となった。ピエールは次の言葉をもらしている、「ぼくたちの選んだ人生は、やはりつらいな。」「贅沢と富を狂気のように追い求めているわれわれの社会では科学の価値なぞ理解されるはずがない」と。そしてノーベル賞講演では次のように述べている。「犯罪人の手に入れば、ラジウムはきわめて危険な物となりかねない。いったい人間は自然の秘密を知って善用できるほど成熟しているのだろうか。このようなことを知ることは人間に有害なのではあるまいかと、いちおう疑ってみることができます。」

### 〔主要参考文献〕

マリー・キュリー、木村彰一訳、「自伝」；イレーヌ・キュリー、内山敏訳、「わが母マリー・キュリーの思い出」、『世界ノンフィクション全集　8』、筑摩書房、1960.：マリー・キュリー、渡辺慧訳、『ピエール・キュリー伝』、白水社、1969.：エーヴ・キュリー、川口篤他訳、『キュリー夫人伝』、白水社、1969.：ウジェニー・コットン、杉捷夫訳、『キュリー家の人々』、岩波新書、1962.：R. リード、木村絹子釈、『キュリー夫人の素顔』、上下、共立出版、1975.：F. ジルー、山口昌子訳、『マリー・キュリー』、新潮社、1981.：S. クイン、田中京子訳、『マリー・キュリー』、みすず書房、1999.：N.Pasachoff, *Marie Curie*, Oxford University Press, 1996.：L.K. James, ed., *Nobel Laureates in Chemistry, 1901-1992*, American Chemical Society, 1993.

# 酵素免疫測定法（ELISA）によるダイオキシンの簡易測定

財団法人　食品薬品安全センター　秦野研究所　奥山　光伸

## 1. はじめに

"Our Stolen Future" が米国で出版された 1996 年以来、内分泌撹乱化学物質による環境や食物の汚染とそれによるヒトの健康影響に対する社会的関心が急速に高まってきた。特にダイオキシン類は、その毒性作用が極微量で発現することが動物実験で示されたことから、ヒトや生態系に及ぼす毒性影響が懸念されている。ダイオキシン類は有機塩素化合物の生産、紙・パルプの脱色や廃棄物の焼却過程などで非意図的に生成される化合物であり、その毒性発現機序や感受性の動物種差など不明な点も少なくないが、ヒトの曝露状況や環境・食物など様々な試料の汚染実態を正確に把握することはこれらの問題を解決する上で極めて重要である。

ダイオキシン類の構造異性体にはその置換塩素数や位置により 75 種のポリ塩化ジベンゾ-*p*-ジオキシン（PCDDs）と 135 種のポリ塩化ジベンゾフラン（PCDFs）がある。しかし、各同族体および異性体の毒性は著しく異なるため、最も毒性の強い 2,3,7,8-TCDD に対する相対毒性、毒性等価係数（TEF）が採用され、その中で毒性の強い 7 種の PCDDs と 10 種の PCDFs およびダイオキシンと同様の生物作用を示す 12 種の共平面性ポリ塩化ビフェニール（Co-PCBs）が測定対象とされている。毒性評価は、これらの実測値に TEF を乗じた値の総和、毒性等価量（TEQ）を用いて行われている。

従来、ダイオキシンの測定には高分解能ガスクロマトグラフィー／マススペクトロメトリー（HRGC/HRMS）が用いられているが、いずれの試料についても長時間にわたる多段階で煩雑なクリーンアップ操作を必要とするため、その測定費用は著しく高価なものとなっている。さらに、わが国では平成 12 年にダイオキシン類対策特別措置法が施行されたことにより、測定対象の種類と試料数は益々増加することが予測されるため、安価で簡便・迅速かつ高感度なダイオキシン測定法の開発が強く求められている。

ダイオキシン類のモニタリングおよびスクリーニング法としての簡易測定法[1,2]には、ダイオキシンに対する特異抗体を用いるイムノアッセイとダイオキシンの結合レセプター（AhR）を用いる測定系があるが、前者には抗原・抗体反応を妨害する脂溶性物質を除去する操作が重要であり、後者には AhR にアゴニスト・アンタゴニストとして作用するダイオキシン類以外の化合物による干渉を避けるための前処理

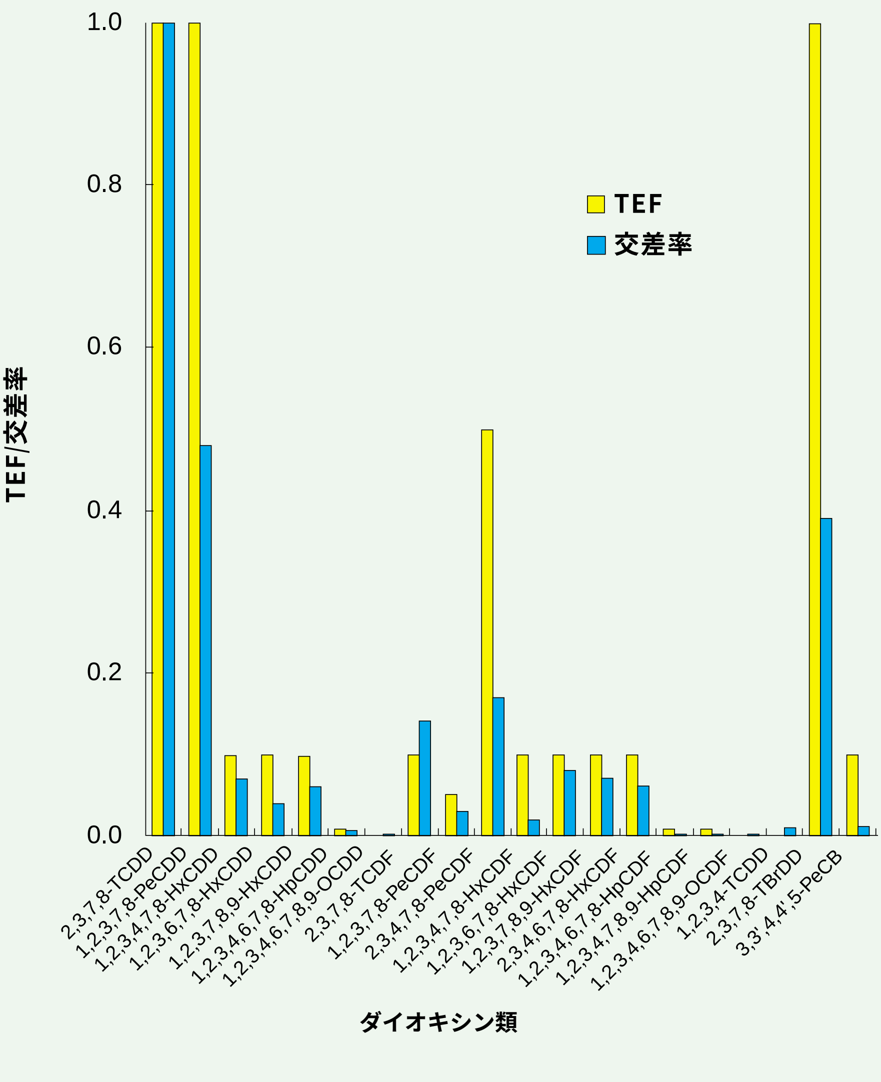



図 1.　TEF とモノクローナル抗体 D9-36 の交差反応性
2,3,7,8-TCDD の交差率を 1 とした

操作が必要である。

ダイオキシン類のイムノアッセイが最初に報告されたのは1979年であり[3)]、その後も連綿と研究が継続されてきたが、生体試料に適用可能な測定感度を有する酵素免疫測定法（ELISA）が開発されるまでに約20年を要した[4)]。我々は厚生労働科学研究の補助により、母乳など生体試料中ダイオキシンのELISAの開発研究を行い、毒性の強いダイオキシン類に親和性の高いモノクローナル抗体（図1）を新たに作製してELISAを構築し[5)]、さらに操作性を簡素化して汎用性の高いキットを完成させた。

## 2. ダイオキシンのELISA

通常、生体および環境中のダイオキシンTEQに占める割合の高い同族体は2,3,7,8-TCDD、1,2,3,7,8-PeCDDおよび2,3,4,7,8-PeCDFである。ダイオキシン類のモニタリングおよびスクリーニング法としてのELISAには、その測定値がTEQと相関することが要求されるため、前記の同族体に親和性の高いモノクローナル抗体（D9-36）を用いて測定系（二次抗体固相・競合法）を構築した。

**原理**：一定量の抗ダイオキシン抗体への結合を、一定量の酵素標識ハプテン抗原と不定量の抗原（標準品または試料）とにより競合させた後、ウェルに固定化した二次抗体で抗ダイオキシン抗体を吸着させ、抗体に結合した酵素活性を測定する。競合法であるため、酵素活性は抗原量に逆比例する。

**前処理法**：試料にエタノールおよび水酸化カリウム（最終濃度：1 mol/L）を加え、室温で2時間攪拌して脂質を加水分解する。*n*-ヘキサンでダイオキシン類を抽出し、濃硫酸でヘキサン層を洗浄する。ヘキサンを蒸留乾固した後、さらに濃硫酸で脂質を完全に分解する。再びヘキサンで抽出し、5%炭酸水素ナトリウムおよび水で洗浄したヘキサン層をダイオキシン吸着剤を充填したガラスカラムに負荷する。ヘキサンでカラムを洗浄後、ベンゼン（またはフルオロベンゼン）／ヘキサン（1:3）混液で溶出する。溶出液にTriton X-100を加えて有機溶媒を乾固した後、残渣を緩衝液で溶解してELISA用試料とする（図2）。

**操作法**：抗原（標準品または試料）溶液に抗ダイオキシン抗体を加えて室温で30分間静置した後にペルオキシダーゼ標識ハプテン抗原を添加し、二次抗体をコーティングした96穴ELISAプレートのウェルに反応混液を注入して冷蔵下で一晩反応させる。ウェルを洗浄し、基質溶液を加えて室温で30分間反応後、停止液を添加して酵素活性を止める。各ウェルの吸光度をマイクロプレートリーダーにより測定し（図3）、検量線から試料中のダイオキシン（2,3,7,8-TCDD）量を算出する。

**検量線**：抗ダイオキシン抗体との親

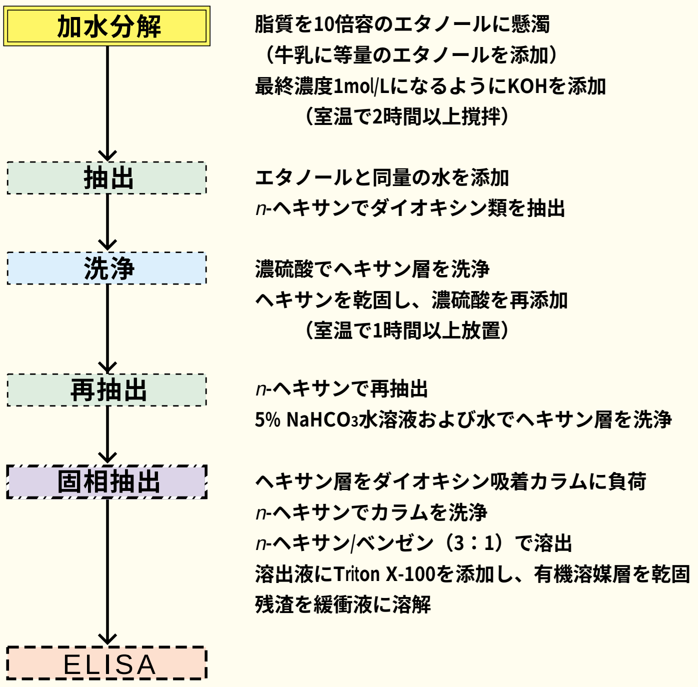



図2.　ELISA用試料の調整法

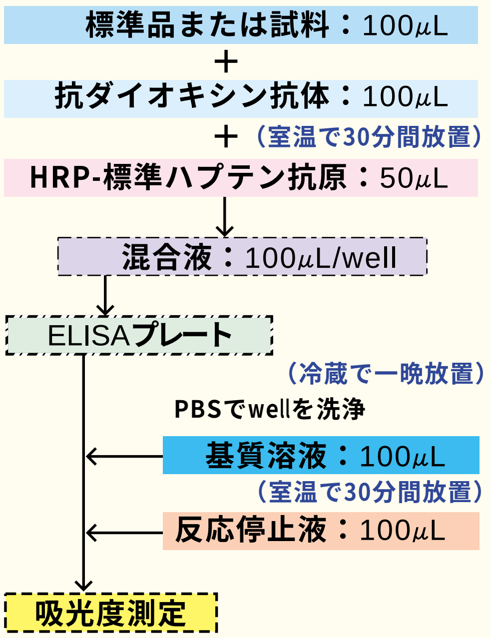



図3.　ELISAの操作手順

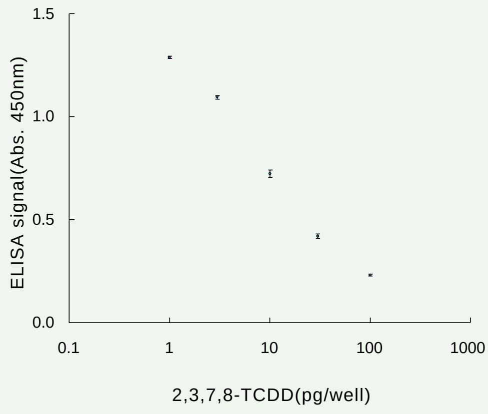



**図 4.　2,3,7,8-TCDD の標準曲線**
**4- パラメーター回帰式**
Y = (A-D)/(1+(X/C)^B)+D
A=1.376, B=1.072, C=9.833, D=0.136
r = 0.999

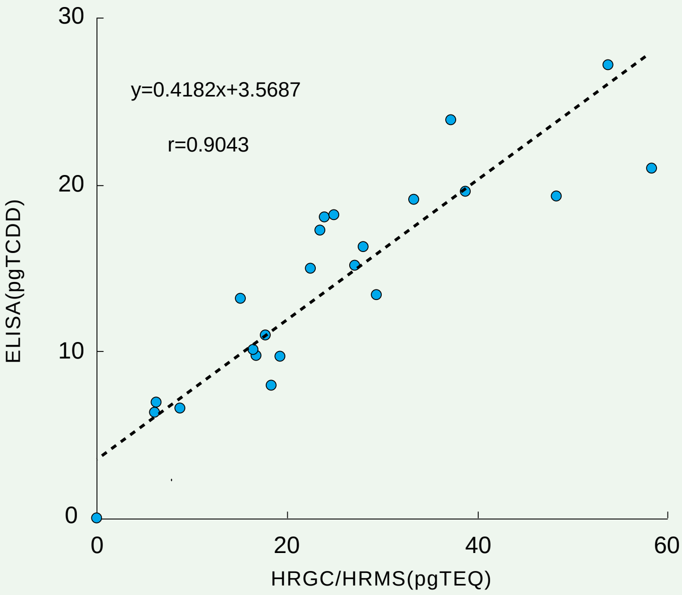



**図 5.　GC/MS および ELISA による脂質中ダイオキシン測定値の相関性**

和性が 2,3,7,8-TCDD と同等で、毒性のほとんどない代理標準品を使用しているため、本 ELISA による測定値は 2,3,7,8-TCDD 等量となる。本 ELISA の測定範囲は 2,3,7,8-TCDD 1 ～ 100 pg/assay であり、4- パラメーター回帰式に精度よく適合する（図 4）。

**GC/MS との相関性**：牛乳またはバターに PCDD/Fs を添加して、前記の処理法に従って精製した試料を ELISA および HRGC/HRMS により測定した。母乳中 TEQ の大部分を占める 3 種の PCDD/Fs（2,3,7,8-TCDD、1,2,3,7,8-PeCDD および 2,3,4,7,8-PeCDF）の本精製法による回収率はほぼ満足できるものであり、また、ELISA 測定値は HRGC/HRMS による TEQ と良好な相関性を示した[6)]（図 5）。

**留意点**：抗原・抗体反応を応用する ELISA は親水性の反応系であるため、ダイオキシン類のような水に難溶性で試験器具に吸着しやすく、かつ超微量（ppt レベル）の化合物を測定するには、界面活性剤や吸着防止剤の使用が必須で、その種類や濃度を適切に設定することが重要となる。また、前処理においてはアルカリや濃硫酸で脂質類を完全に除去した後に固相抽出で精製する必要がある。さらに、ガラス器具・ピペットチップなど使用する用具や実験室・実験台など試験環境に由来するダイオキシン類あるいは非特異的な ELISA の妨害物質を避けるために、器具や作業環境の洗浄・清掃には細心の注意を要する。使用する器具類はアセトンやヘキサンで洗浄し、操作は汚染のない実験室や簡易ドラフト内で行うことが要求される。

## 3. おわりに

ダイオキシン類の分析には、その同族体・異性体の多さと試料中含量の少なさから、抽出・精製の煩雑な GC/MS による測定法が用いられてきた。イムノアッセイはこれを補完する簡易測定法として期待され、20 年以上にわたって研究が継続されてきたが、これまで市販されたものは高濃度試料に適用が限られていた。ダイオキシンのイムノアッセイが困難な理由は、その試料中含量の低さとダイオキシン類本来の物理化学的特性に起因するところが大きく、簡便で収率の良い前処理法が開発されなかったためと考えられる。

ダイオキシン吸着剤を用いる精製法と組み合わせた本 ELISA は、安価で簡便・迅速なダイオキシン類のモニタリングおよびスクリーニング法となることが期待される。

### 〔参考文献〕


1）奥山光伸、松木容彦、中澤裕之：食品衛生学雑誌　第 42 巻（4） J233~238, 2001
2）Behnisch P.A., et al.：Environment International 27, 413-439, 2001
3）Albro P.W., et al.：Toxicol. Appl. Pharmacol. 50, 137~146, 1979
4）Sugawara Y., et al.：Anal. Chem. 70, 1092~1099, 1998
5）Okuyama M., et al.：Organohalogen Compounds, 54, 77~80, 2001
6）Okuyama M., et al.：Organohalogen Compounds, 58, 365 ～ 368, 2002

## New Products

### ダイオキシン ELISA キットワコー

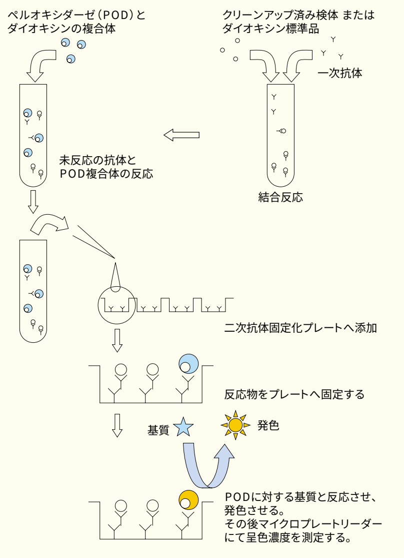
ダイオキシン類を分析する手法として、高分解能 GC/MS 法が採用されています。その一方で、より簡便に多検体を測定したいというニーズがあり、簡易分析法の開発検討が進められています。

本キットは、抗ダイオキシンモノクローナル抗体による ELISA 法を用いた生体中のダイオキシン類を測定するスクリーニング用キットです。マイクロプレートリーダーを用いて、迅速・簡便かつ低価格に、多検体同時分析が可能です。

**〔キット内容〕**

| | |
|---|---|
| 二次抗体固定化プレート | 96 回用×1 枚 |
| 陽性コントロール | 2mℓ 用×1 本 |
| 緩衝液 B | 10mℓ ×1 本 |
| 希釈緩衝液 | 20mℓ ×1 本 |
| 一次抗体 | 200μℓ 用×1 本 |
| 緩衝液 A | 24mℓ ×1 本 |
| ペルオキシダーゼ複合体(凍結乾燥品) | 4mℓ 用×2 本 |
| 試料溶解液 | 5mℓ ×1 本 |
| 濃縮洗浄液(×6) | 50mℓ ×1 本 |
| 基質 | 0.5mℓ ×1 本 |
| くえん酸緩衝液 | 15mℓ ×1 本 |
| 停止液 | 13mℓ ×1 本 |
| プレートシール | 2 枚 |
| 現品説明書 | 1 部 |

**〔原理図〕**




| コード No. | 品　名 | 規　格 | 容　量 | 希望納入価格(円) |
|---|---|---|---|---|
| 299-59001 | Dioxin ELISA Kit *wako* | **ダイオキシン類分析用** | 96 回用 | **98,000** |

## Information

### 試作品のご案内

### エンドトキシン吸着剤
### “くっつくりん™”

“くっつくりん™”は、カブトガニ血球由来のエンドトキシン結合ペプチドをリガンドとした、エンドトキシン除去吸着体です。カラム法またはバッチ法により、タンパク質溶液等の試料からエンドトキシンを除去できます。

**〔特　長〕**

- リガンドは、エンドトキシンと特異的に結合しますから、試料の非特異的吸着は、低いレベルに抑えることができます。
- 広い pH 範囲、高塩濃度でも優れた吸着能力を発揮します。
- エンドトキシンの種類を問わず、高い吸着率が得られます。
- 再生が簡単なので、繰返し使用できます。
- リガンドの結合は極めて安定していますから、リークは無視できます。

**〔使用方法〕**

**カラム法**：“くっつくりん™”をカラムに詰め、適当な緩衝液で平衡化したのちに試料を添加し、1 時間あたりにカラム体積量の 1～10 倍量を流して処理します。

**バッチ法**：試料溶液に 5～10%(v/v)の“くっつくりん™”を加え、1～数時間攪拌したのち、処理液を回収します。

**〔再生方法〕**

カラム法の場合にはカラム体積の約 10 倍量、バッチ法の場合には 10～20 倍量のアルカリ溶液(0.1N NaOH 等)で処理します。

**〔エンドトキシン添加・回収除去例〕**

| 試　料 | エンドトキシン吸着率(%) |
|---|---|
| $H_2O$ | 99.9 |
| 0.5mol/ℓ NaCl | 99.3 |
| 2mol/ℓ NaCl | 99.6 |
| 0.1% HSA<br>※**熱変性させた** HSA | 79.5 |

ご希望の方には、有償にて提供できますので、ご照会下さい。

※“くっつくりん™”はマルハ株式会社の登録商標です。

# P-glycoprotein と multidrug resistance-associated protein 1 の特異的阻害剤　agosterol A

鹿児島大学医学部・腫瘍研　秋山　伸一
大阪大学大学院・薬学研究科　青木　俊二

## はじめに

海洋生物由来の化合物は、その特異な化学構造と生理作用により注目されている。海綿由来のステロイド agosterol A は、がんの多剤耐性に関与する P-glycoprotein（P-gp）と multidrug resistance-associated protein 1（MRP1）の 2 種の ABCトランスポーターを特異的に阻害する。ここでは、agosterol A のこれらトランスポーターに対する阻害作用の詳細について述べる。

## 1. ABC トランスポーターとは

すべての細胞は、外部環境から脂質膜によって隔てられているので、栄養の摂取や老廃物の排泄など、調節された分子の膜透過が細胞の生存に不可欠である。膜輸送は、その基質に対応する特定の膜蛋白質を介して行われており、数種のファミリーに分類することが出来る。ABC（ATP Binding Cassette）トランスポータースーパーファミリーは、これらのファミリーの中でも最大で、大腸菌からヒトまで広範な種に存在し、これまでに 100 種類以上の ABCトランスポーターが確認されている。それらの多くは原核生物に認められているが、CFTR, TAPs, P-gp, MRPs, ALDP, SUR など真核生物での報告も近年増加しており、それらの担う生理的機能についての研究も精力的に進められている。また、嚢胞性繊維症（CFTR）、副腎脳白質ジストロフィー（ALDP）、Dubin-Johnson 症候群（MRP2）、がん多剤耐性（P-gp, MRP1）など ABCトランスポーターの関係する疾病も数多く報告されており、臨床的な問題と関係していることからも注目されている。

## 2. ABC トランスポーターの構造と機能

ABCトランスポーターは、基本的に 4 つの領域からなっている。すなわち、2 つの膜貫通ドメイン（MSD）と 2 つの ATP 結合領域（NBD）であり、多くの真核生物の ABCトランスポーターは、4 つの領域が結合して、1 つのポリペプチドとして発現している。例外的に、後述する MRP1 の様に 3 つの膜貫通ドメインを有するものや、Taps や BCRP の様に 1 つの膜貫通ドメインと 1 つの ATP 結合領域をもつ蛋白質 2 個が複合体となって働くハーフタイプトランスポーターも存在する。ABCトランスポーターは、ATP を加水分解して得られるエネルギーを利用して基質を能動的に膜輸送する。アミノ酸、糖、無機イオン、ペプチド、タンパク質、疎水性有機化合物、グルタチオンおよびグルクロン酸抱合体を輸送する ABCトランスポーターが、これまでに見出されており、基質は多岐にわたる。ABC トランスポーターは、外から基質を取り込み細胞内に基質を蓄積するものと基質を細胞外へ排出するものとがあるが、両方向に基質を輸送するものはこれまでに見つかっていない。ABCトランスポーターが 1 分子の基質を運ぶのに 1 〜 2 分子の ATP が加水分解されることが必要であり、ATP が加水分解されると、ATP 結合領域のコンフォメーションが変化し、ドメイン間の相互作用によりその変化が膜貫通ドメインのコンフォメーションを変化させることで基質が輸送されると考えられているが、その詳細は不明である（Fig. 1）。

## 3. ABC トランスポーターとがん多剤耐性

作用機序も化学構造も異なる数種の抗がん剤に同時に薬剤耐性を獲得した細胞は「多剤耐性がん細胞」と呼ばれ、がん化学療法の大きな障害となっている。がん細胞が多剤耐性を獲

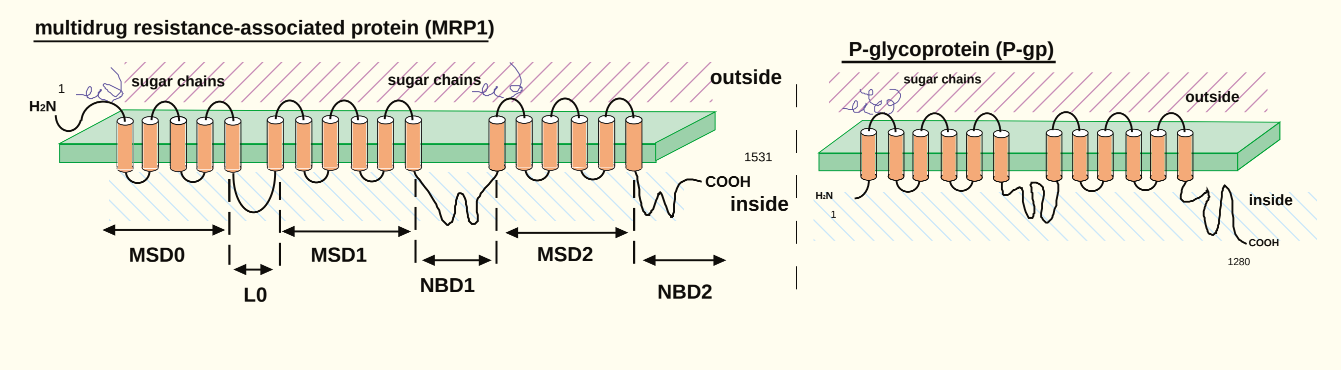



Fig. 1.　Topology of P-glycoprotein and MRP1

得するメカニズムはいくつか知られているが、その一つとして、がん細胞が抗がん剤を細胞外に排出する一種のポンプ機構を有する膜蛋白質を過剰発現し、細胞内の抗がん剤濃度を低く保つことによって耐性を獲得するという機構が注目されている。このポンプ機構を担う膜蛋白質としてABCトランスポータースーパーファミリーに属するP-gp[1)]やMRP1[2)]といった膜蛋白質が見出されている。これらの膜蛋白質は正常組織でも発現しており、生理的にはホルモンなどの分泌や有毒物質の排泄に関わっていると考えられている。一方、これら膜蛋白質を発現する組織由来の腫瘍は、多剤耐性になることが多く、悪性化の過程でもその発現が保たれていることを示している。また、化学療法後に薬剤排出膜蛋白質の発現が上昇する例も、急性白血病、乳がん、神経芽細胞腫、リンパ腫などで認められる。このように、多くの腫瘍が多剤耐性化し、化学療法において大きな問題になっている。

## 4. がん多剤耐性克服物質

Ca拮抗薬verapamilがP-gpの関与する耐性を克服出来ることが報告されて以来[3)]、数多くのP-gpに対する耐性克服物質（P-gpの基質輸送に対する阻害剤）が報告されている。それらの多くは、P-gpの基質結合部位に競合的に結合してその輸送を阻害するものと考えられているが、構造的にはまったく関連性がなく、基質特異性の低いP-gpの性質を反映しているとも言える。一方、MRP1に対する耐性克服物質は、P-gpに比較するとかなり少なく、P-gpに対する耐性克服物質のほとんどは、MRP1の関与する耐性を克服出来ない。ピリジン誘導体PAK-104P[4)]やleukotriene $D_4$（$LTD_4$）受容体拮抗薬として開発されたMK571[5)]が、MRP1の関与する耐性を克服出来る代表的薬物といえる。また、glutathione（GSH）生合成阻害剤であるbuthionine sulfoximine（BSO）も細胞内GSH濃度を低下させることにより、耐性克服作用を示す[6)]。

## 5. Agosterol Aの多剤耐性克服作用[7)]

Agosterol Aは、三重県英虞湾で採集した*Spongia*属の海綿から単離構造決定された、分子内に3個のアセチル基と2個の水酸基を有する高度に酸化されたステロイド化合物である[8)]（Fig. 2）。

まず、P-gpを過剰発現する多剤耐性ヒト咽頭上皮がん細胞KB-C2株およびMRP1を過剰発現するKB-CV60株の2種類の多剤耐性がん細胞を用い[9)]、agosterol Aの多剤耐性克服作用について詳細に検討した。Fig. 3A

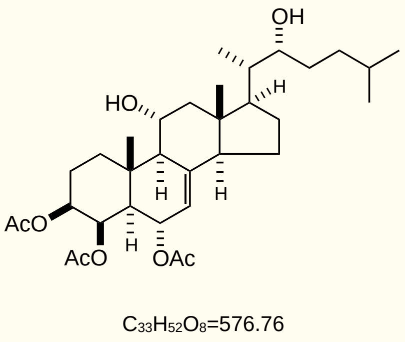



Fig. 2.　Chemical structure of agosterol A.

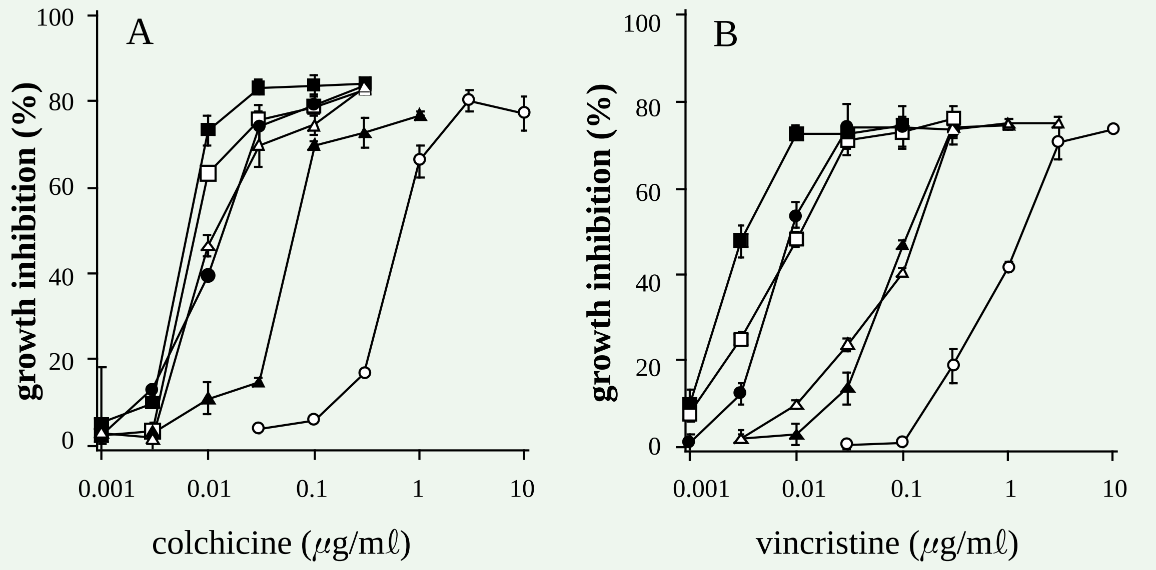



Fig. 3.　Reversal of MDR to colchicine in KB-C2 cells (A) and to vincristine in KB-CV60 cells (B) by agosterol A.　Sensitivity of each cells was measured in the absence or presence of various concentrations of agosterol A and verapamil.　(□): KB-3-1, (○): KB-C2 (A) or KB-CV60 (B), (■): KB-C2 (A) or KB-CV60 (B) + agosterol A (10 μM), (●): KB-C2 (A) or KB-CV60 (B) + agosterol A (3 μM), (▲): KB-C2 (A) or KB-CV60 (B) + agosterol A (1 μM), (△): KB-C2 (A) or KB-CV60 (B) + verapamil (10μM).　Points represent means (±SE) of triplicate determinations.

に示すように、agosterol Aの用量依存的にKB-C2株のcolchicineに対する生育阻害曲線が親株で非耐性株であるKB-3-1株に近づき、agosterol AはKB-C2株のcolchicineに対する耐性を3 $\mu$Mの濃度で完全に克服できることが明らかになった。さらにagosterol Aは、KB-CV60株のvincristine耐性についても3 $\mu$Mの低濃度で完全に克服することができた（Fig. 3B）。またagosterol Aは、10 $\mu$Mの濃度でも今回用いた3種の細胞株に対して全く細胞毒性を示さなかった。

次に、agosterol A存在下での細胞内抗がん剤濃度を測定した。親株で非耐性株であるKB-3-1株への[$^3$H]-vincristine細胞内蓄積濃度を100％とし、耐性株の細胞内抗がん剤濃度を百分率で示した。KB-CV60株での細胞内[$^3$H] vincristine蓄積濃度は親株の約40％まで低下していたが、agosterol Aを作用させると用量依存的に上昇することが明らかになった（Fig. 4A）。また、細胞外への抗がん剤排出に対するagosterol Aの作用を検討した。細胞内の[$^3$H]-vincristine残留量は各サンプルにおける排出時間0分の時の蓄積量を100％とし、ここから各時間経過後の細胞内[$^3$H]vincristine濃度を百分率で表した（Fig. 4B）。耐性株のKB-CV60株では親株のKB-3-1株に比べて速やかにvincristineが排出され、120分経過後の細胞内vincristine残留量は約20％であった。一方、agosterol A（10 $\mu$M）存在下では親株と同程度までvincristineの排出が抑制された。これらの結果から、agosterol Aは多剤耐性がん細胞に過剰発現する薬剤排出膜タンパク質に作用し、その薬剤排出を阻害して細胞内抗がん剤濃度を高めることが示唆された。（Fig. 4にはKB-CV60株での結果を示しているが、KB-C2株でも同様の結果を得ている。）

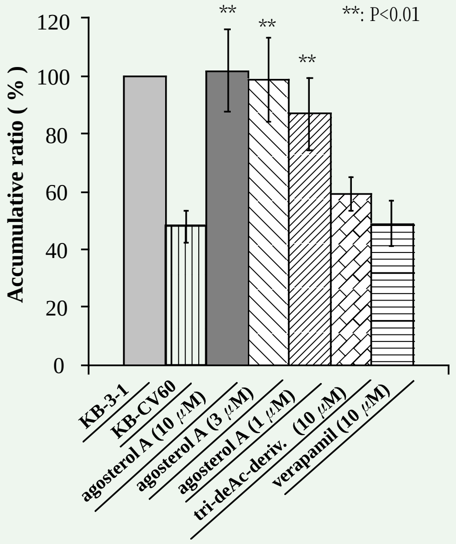



Fig. 4A. Effect of agosterol A on accumulation of vincristine in KB-CV60 cells.

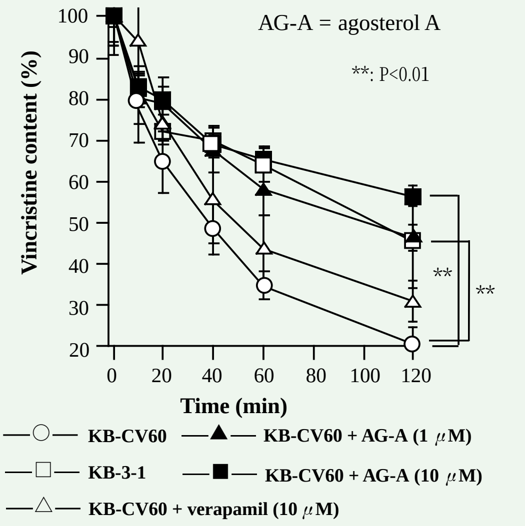



Fig. 4B. Efflux of the accumulated vincristine from KB-3-1 cells and KB-CV60 cells.

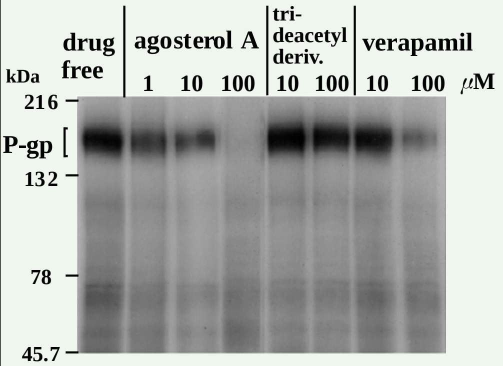



Fig. 5. Inhibition of [$^3$H]azidopine photolabeling to P-gp by agosterol A. Membrane vesicles prepared from KB-C2 were incubated with [$^3$H]azidopine in the presence of agosterol A.

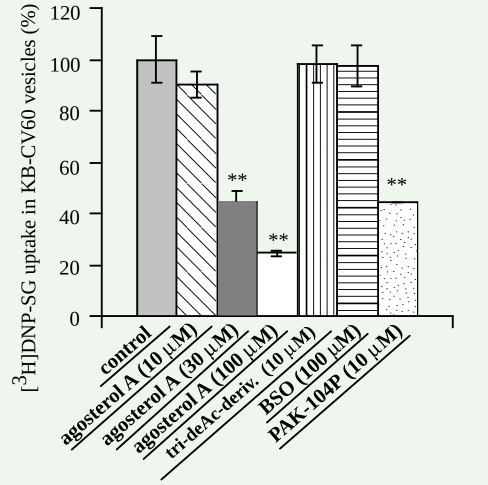



Fig. 6. Effect of agosterol A on ATP-dependent DNP-SG uptake in inside-out membrane vesicles prepared from KB-CV60 cells.

さらに、agosterol Aの薬剤排出膜タンパク質との直接相互作用について検討した。P-gpの基質として知られるazidopineは分子内にアジド基を有しており、光照射により容易にP-gpを標識することができる[10]。そこで、azidopineとP-gpの結合に対するagosterol Aの作用をKB-C2株から調製した膜小胞を用いて検討した。Fig. 5に示すように、[$^3$H]azidopineによって標識される170 kDaのP-gpのバンドがagosterol Aの存在下では用量依存的に減少し、agosterol AはP-gpの基質結合部位に直接結合していることが示唆された。また、KB-CV60株から調製した反転膜小胞を用いて、

MRP1を介した薬物輸送に対するagosterol Aの作用を調べた。ATP存在下でMRP1の基質[$^3$H]DNP-SGを添加し、反転膜小胞内に輸送された[$^3$H]DNP-SG量に対するagosterol Aの作用を検討した[11]。その結果、agosterol Aは用量依存的にDNP-SG輸送量を減少させた(Fig. 6)。これらの結果から、agosterol Aは薬剤排出膜タンパク質に直接作用し、そのポンプ機構を阻害することにより耐性克服作用を示すことが強く示唆された。

## 6. 終わりに

さらに最近、agosterol Aを用いてphotoaffinity probeを合成し、MRP1のGSH依存的な標識に成功しており、MRP1における薬物結合部位やGSHの相互作用部位についての興味深い知見を得ている[12]。Agosterol Aは、P-gpとMRP1を低濃度で特異的に阻害する化合物であり、これまでにP-gpやMRP1の阻害剤として知られている化合物とはまったく異なる構造を有している。天然物から活性化合物をスクリーニングすることで、既存の化合物の構造にとらわれない特異な構造を有する活性物質が得られることは非常に興味深く、これからもバイオプローブとして有用な天然活性物質の発見が望まれる。

〔参考文献〕


1) Gerlach, J. H.; Endicott, J. A.; Juranka, P. F.; Henderson, G.; Sarangi, F.; Deuchars, K. L.; and Ling, V. *Nature* **1986**, 324, 485-489.

2) Cole, S. P. C.; Bhardwaj, G.; Gerlach, J. H.; Mackie, J. E.; Grant, C. E.; Almquist, K. C.; Stewart, A. J.; Kurz, E. U.; Duncan, A. M. V.; and Deeley, R. G. *Science* **1992**, 258, 1650-1654.

3) Tsuruo, T.; Ishida, H.; Tsukagoshi, S.; and Sakurai, Y. *Cancer Res.*, **1981**, 41, 1967-1972.

4) Sumizawa, T.; Chen, Z-S.; Chuman, Y.; Seto, K.; Furukawa, T.; Haraguchi, M.; Tani, A.; Shudo, N.; and Akiyama, S. *Mol. Pharmacol.*, **1997**, 51, 399-405.

5) Gekeler, V.; Ise, W.; Sanders, K. H.; Ulrich, W-R.; and Beck, J. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **1995**, 208, 345-352.

6) Manzano, R. G.; Wright, K. A.; Twentyman, P. R. *Clin. Cancer Res.* **1996**, 2, 1321-1326.

7) a) Aoki, S.; Chen, Z-S.; Higashiyama, K.; Setiawan, A.; Akiyama S.; and Kobayashi, M. *Jpn. J. Cancer Res.*, **2001**, 92, 886-895.
b) Chen, Z-S.; Aoki, S.; Komatsu, M.; Ueda, K.; Sumizawa, T.; Furukawa, T.; Okumura, H.; Ren, X-Q.; Belinsky, M. G.; Lee, K.; Kruh, G. D.; Kobayashi, M.; and Akiyama, S. *Int. J. Cancer*, **2001**, 93, 107-113.

8) a) Aoki, S.; Yoshioka, Y.; Miyamoto, Y.; Higuchi, K.; Setiawan, A.; Murakami, N.; Chen, Z-S.; Sumizawa, T.; Akiyama, S.; and Kobayashi, M. *Tetrahedron Lett.*, **1998**, 39, 6303-6306.
b) Aoki, S.; Setiawan, A.; Yoshioka, Y.; Higuchi, K.; Fudetani, R.; Chen, Z-S.; Sumizawa, T.; Akiyama, S.; and Kobayashi, M. *Tetrahedron*, **1999**, 55, 13965-13972.

9) a) Akiyama, S.; Fojo, A.; Hanover, J. A.; Pastan, I.; and Gottesman, M. M. *Somat. Cell. Mol. Genet.*, **1985**, 11, 117-126.
b) Nagayama, S.; Chen, Z-S.; Kitazono, M.; Takebayashi, Y.; Niwa, K.; Yamada, K.; Tani, A.; Haraguchi, M.; Sumizawa, T.; Furukawa, T.; Aikou, T.; and Akiyama, S. *Cancer Lett.* **1998**, 130, 175-182.

10) Safa, A. R.; Glover, C. J.; Sewell, J. L.; Meyers, M. B.; Biedler, J. L.; and Felsted, R. L. *J. Biol. Chem.* **1987**, 262, 7884-7891.

11) Chu, X-Y.; Kato, Y.; and Sugiyama, Y. *Cancer Res.* **1997**, 57, 1934-1938.

12) Ren, X-Q.; Furukawa, T.; Aoki, S.; Nakajima, T.; Sumizawa, T.; Haraguchi, M.; Kobayashi, M.; and Akiyama, S. *J. Biol. Chem.*, **2001**, 276, 23197-23206.



New Products

## ATP Binding Cassette (ABC)トランスポーターの特異的阻害剤

### Agosterol A
**生化学用**

三重県英虞湾に生息する*Spongia*属の海綿由来のステロイド化合物で、2種のABCトランスポーター(P-glycoprotein、multidrug resistance-associated protein1)を特異的に阻害することが解明されました。その結果、多剤耐性がん細胞上の薬物排出膜タンパク質に作用して薬剤排出を阻害することから、がんの多剤耐性克服物質として注目されています。

**起　源**:海綿(*Spongia* sp.)
**形　状**:白色粉末

| | | |
|---|---|---|
| 016-19511 | 100$\mu$g | 30,000円 |

# 転写シークエンス技術を利用した解読困難な配列へのアプローチ

和光純薬工業株式会社　ゲノム研究所　石川　友一

　広範なゲノム領域や cDNA の塩基配列解析が進む中、2001 年 2 月にはヒト・ゲノムの概要配列が決定されたという報告（Nature、Science 誌）がなされました。このようにヒトゲノムの解読がほぼ完了したとされたのを機に、あらゆる生物種でのゲノム解析プロジェクトが加速している状況にあります。その DNA 塩基配列を決定する手段としては、サンガー法とよばれるシークエンシング技術が一般的に使用され、分子生物学研究における重要な基礎技術の 1 つとなっています。ヒト・ゲノム解析プロジェクトにおいても、塩基配列の構成因子となっているアデニン（A）、グアニン（G）、シトシン（C）、チミン（T）を各々個別の蛍光色素（4 色）で標識、検出する事により、解析データの産出を高度に能率化した手法が主に利用されています。その実績からも、従来技術としてほぼ統一された感のある方法論です。しかしながら、今後の各ゲノムプロジェクトにおける精密な配列決定を行う段階では、この従来技術で解読できなかった配列（ギャップ領域）が大きな問題として残るものと考えられます。その要因として、グアニン・シトシン（GC）含量が高い領域、繰り返し配列が存在する領域などでは、PCR の反応効率が悪い場合や DNA シークエンス反応での解読が困難な事例が起こり易いためです。

　従来のシークエンス技術では、通常は二本鎖として存在する DNA を熱変性させて、一本鎖化するための工程を伴います。その状態から、酵素による DNA の複製反応が始まり、配列決定のための蛍光標識が行われるのです。安定した二本鎖構造を維持する DNA と比べ、一本鎖化された DNA は、構造上の問題から上記の高 GC 含量領域あるいは繰り返し配列領域において、複雑な（例えばヘアピン状の）二次構造を形成し易いと考えられます。DNA の複製反応を司る酵素は、この二次構造を通過する事ができずに、シークエンス解析におけるシグナルの著しい低下が起こります。このような配列を我々は難解読配列と称しています。

　本報告は、筆者等のグループおよび理化学研究所との共同研究により開発した RNA 転写反応による新規シークエンス技術「転写シークエンス技術」を弊社で独自に改良し、従来技術が苦手とする問題を解決すべく研究を進めてきた成果です。従来技術とは視点が異なり、DNA の複製反応ではなく RNA 鎖伸長反応（すなわち RNA 転写反応）を利用する事で、安定した構造である二本鎖 DNA をそのままの状態で鋳型サンプルとして利用する事が可能となります。RNA 鎖合成酵素（RNA ポリメラーゼ）の特性から 37℃での恒温条件下で反応が進行し、DNA を一本鎖化する必要がありません。このため、難解読配列により生じる複雑な二次構造の悪影響を回避する事が可能になったのです。本反応系は、転写反応が RNA ポリメラーゼの認識する特定のプロモーター配列から特異的にスタートし、鋳型配列をコピーしながら伸長していく過程を利用します。リボヌクレオチドおよびその誘導体を基質材料として伸長鎖反応が進行する際に、蛍光標識が行われる事で塩基配列決定が可能となります。図 1 では転写シークエンスの方法論のモデルを従来技術と比較しました。ここで用いるリボヌクレオチド誘導体には蛍光色素を結合させており、また RNA ポリメラーゼによる伸長鎖への取り込みに有利な立体構造を形成しています。RNA ポリメラーゼには、遺伝子工学的な改変が加えられ、シークエンス反応において、より適応した性質を有しています。反応系構築の段階では、その精度と読取り鎖長の向上を目指すための種々詳細な検討を行いました。開発の経過を振り返りますと、A、G、C、T を均一にシグナル検出するバランスを整える過程で、非常に多くの時間が費やされています。その結果、現状のスペックでは 700 塩基程度まで 99% 以上の正確度を提示することが実現できました。

　難解読配列に出会った場合、従来技術ではどのような障害（現象）が観察されるのか？ また、本技術でのアプローチによる優位性はあるのか？ 双

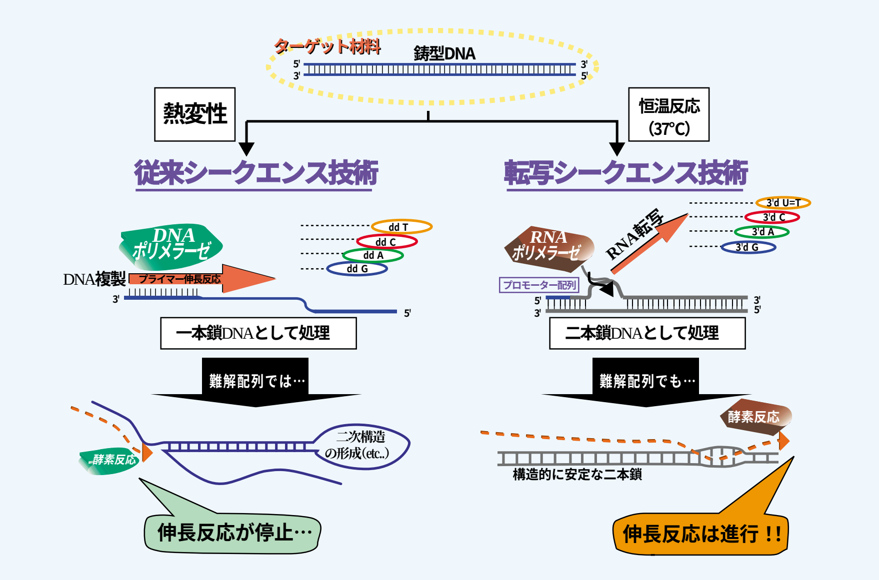



図1. 従来技術と転写シークエンス技術との比較

方の技術での結果を照らし合わせ、実データを元にご報告させて頂きます。図2-図4に示した対象は、かずさDNA研究所 植物遺伝子第一研究室（田畑室長）より実際に依頼を受けた難解読サンプルおよび、マウスゲノム上に存在した難解読配列を抽出したものです。図2[A]に示した解析結果からは、このサンプル配列中に逆向き反復配列（inverted repeat）が存在し、二次構造の形成が予想されます。さらにその二次構造内部に部分的に重複した直列反復配列（direct repeat）が認められます。図2[B]の従来技術の適用では、このような複合的な要因を抱えている問題箇所において伸長反応の停止、すなわち以降のシグナル消失が確認できます。データの比較からも、弊社の転写シークエンス技術の有用性を顕著に提示する事ができます。図3[A]の転写シークエンス技術による波形では、単純反復配列（Simple Sequence Repeat）としてCTの二塩基リピートが認められますが、シグナルの減衰なく均一なピークを示しています。一方、従来技術の方は単純反復配列の読取りを苦手としており、図3[B]の後半部分に差し掛かるとシグナルの大幅な減衰が生じています。従来技術が苦手とする配列の具体例としては、図4に示すようなGの連続（G-run）あるいはCの連続（C-run）も挙げられます。10塩基以上続くようなG-runおよびC-runに直面する場合、図4[B]に認められるような伸長反応の停止が高い確立で生じます。その対処法としてここで提示する転写シークエンス技術（図4[A]）では、問題となる領域のリードスルーと信頼度の高い波形データを表します。

現在までに様々な難解読配列のシークエンスに成功しております。この経験と実績を基にDNA受託シークエンスサービスを始める事に致しました。

終盤に差し掛かったゲノムプロジェクトにおいてこそ、これまでの技術レベルで対応できなかった配列、すなわちギャップとなっている領域がターゲットとして濃縮されてきているものと考えられます。今後SNPsの多型を指標とした医薬や診断への展開を考慮する際、これら未解析部分の存在には留意する必要があります。これらの課題を解決するための転写シークエンシング技術、それと従来技術の併用で異なる手法を組み合わせる事により、他に例を見ない有効な受託サービスを提供できるものと考えます。

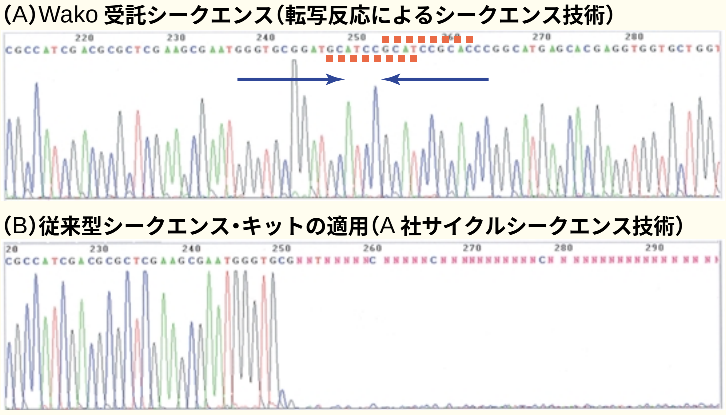



**図2. 二次構造（ヘアピン）形成サンプル**
**鋳型は、ラン藻由来（*Gloeobacter violaceus* PCC 7421）、かずさDNA植物遺伝子第一研究室（田畑室長）より依頼されたサンプル。ABI PRISM 377 DNA Sequencerにて解析。**

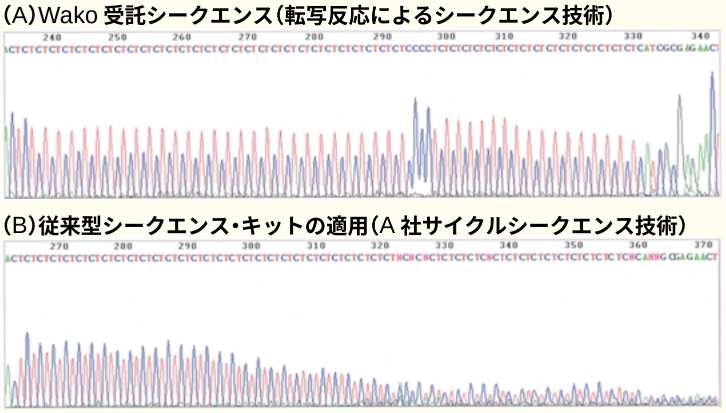



**図3. 単純反復配列（SSR）サンプル**
**鋳型は、ミヤコグサ由来（*Lotus japonicus*）、かずさDNA植物遺伝子第一研究室（田畑室長）より依頼されたサンプル。ABI PRISM 377 DNA Sequencerにて解析。**

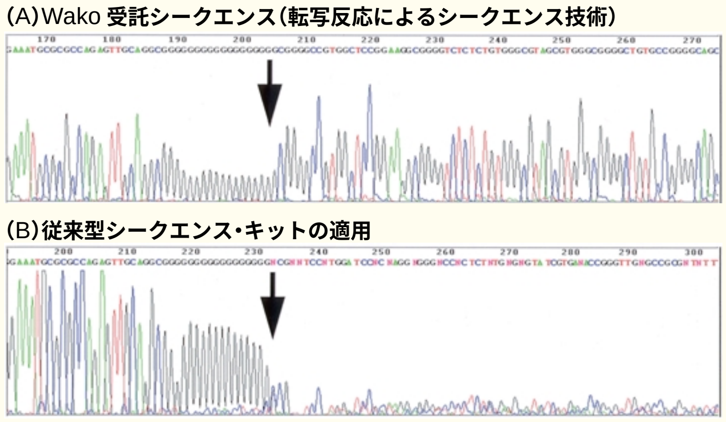



**図4. G-run（18base）サンプル**
**鋳型は、mouse genomic DNAより調製。ABI PRISM 377 DNA Sequencerにて解析。**

Technical Report

# ふっ素化シリコン修飾シリカゲルカラム Fluofix® のユニークな分離特性

和光純薬工業株式会社　試薬営業本部　学術部　和田　忠昭

今日の HPLC 分析の普及は、全多孔性球状シリカゲルを基材とした化学修飾型充てん剤の開発によるものと言っても過言ではありません。その代表的な充てん剤として C18 充てん剤（ODS、オクタデシルシリカゲル）が挙げられます。ODS は多岐にわたる分析に用いられておりますが、その理由としては 1)分析対象物の適応範囲が広い 2)使用できる溶媒種が多く分離至適条件へ導きやすい 3)他の化学修飾型充てん剤に比べ耐久性が高い、等の利便性が考えられます。当社も多様なニーズに応えるべく各種 ODS を上市しています。しかしながら ODS もオールマイティーとは言えず、それを補完する形で C8 や C22、C30 などの炭化水素鎖長の異なる充てん剤や、イオン交換基や極性基など異なる分離機構の修飾基を導入した充てん剤、あるいはこれら異なる機能を併せ持つ複合型充てん剤等、様々な充てん剤が開発、使用されています。

その中で当社は、分岐状ポリフルオロアルキルシランを多孔性球状シリカゲルに化学修飾したふっ素化シリコン修飾シリカゲル充てん剤、フルオフィックス（Fluofix®）を上市し分析の多様性に対応しております。

フルオフィックスは基本的には逆相分配作用を示し、C1、C4 の炭化水素鎖型充てん剤とほぼ同等の保持力を有します。さらに、化学的に安定なフルオロカーボンを有することで従来の炭化水素鎖型充てん剤とは異なったユニークな分離特性を示します。

第一はハロゲン原子の認識性です。フルオフィックスはハロゲン原子を有する化合物、特にふっ素化合物を強く保持します。また類似の構造を持つ化合物では分子内のふっ素の数に依存して保持時間が長くなります。図 1 にクロロフェノール異性体、図 2 にフルオロベンゼンのクロマトグラムを示します。両分析ともハロゲン原子の数が多くなるほど保持は大きくなり、ヘキサフルオロベンゼンの場合、ODS と同程度の保持を示します。

第二は構造認識性です。フルオフィックスは分子の平面認識性が ODS などの炭化水素鎖型充てん剤と異なっています。一般的なモノメリック ODS の場合、図 3 のように嵩高い *o*-terphenyl よりも平面性の高い triphenylene の方が強く保持されますが、フルオフィックスは逆に triphenylene の方が早く溶出します。この特性を利用し *o,m,p* 位など立体構造のわずかに異なる化合物を分離することが可能です。図 4 にキシレノールの分析例を示します。キシレノールはフェノール樹脂原料や有機合成中間体、消毒・防腐剤として用いられる化合物で、6 種類の構造異性体が存在します。従来の炭化水素鎖型充てん剤では異性体分離が困難でしたが、フルオフィックスはメタノール／水の簡単な移動相で分離が可能です。また図 5 はサポニゲンのエピマー分離例です。天然物からの抽出物成分の異性体分離は、各成分の有用性を見出すために必要であり、フルオフィックスはこの様な場合にも威力を発揮します。

第三には、撥水性のみならず撥油性も有している事です。ODS では疎水性相互作用が強すぎるためにブロードなピークを生じる恐れがある場合もシャープなピーク形状が見込めます。

以上の様にフルオフィックスはすぐれたハロゲン原子の認識性とユニークな構造認識性により、ふっ素化合物をはじめ天然物や生体サンプルなど従来の ODS では分離が困難な場合に、より有効な充てん剤であると考えられます。

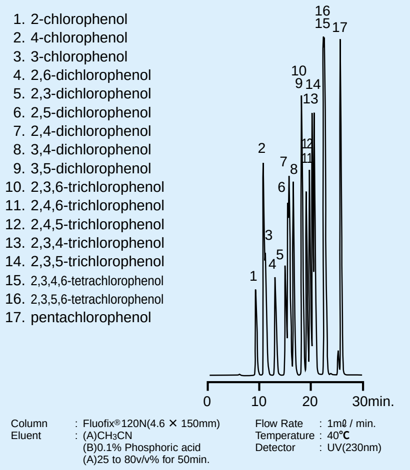



図 1.

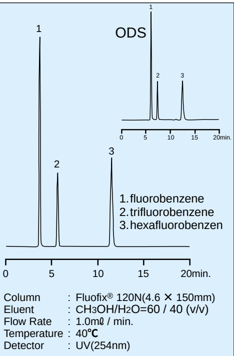



図 2.

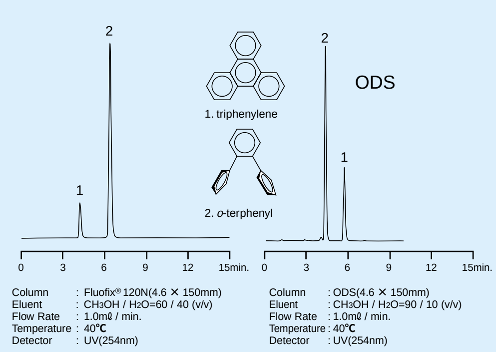



図 3.

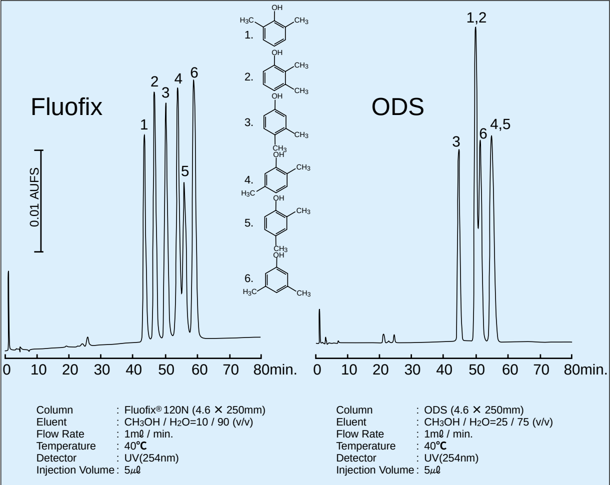



図 4.

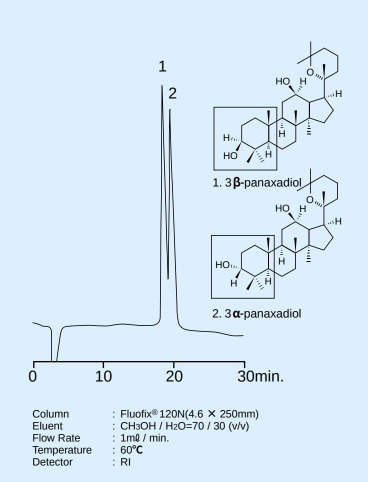



図 5.

和光純薬工業株式会社　土谷　正和

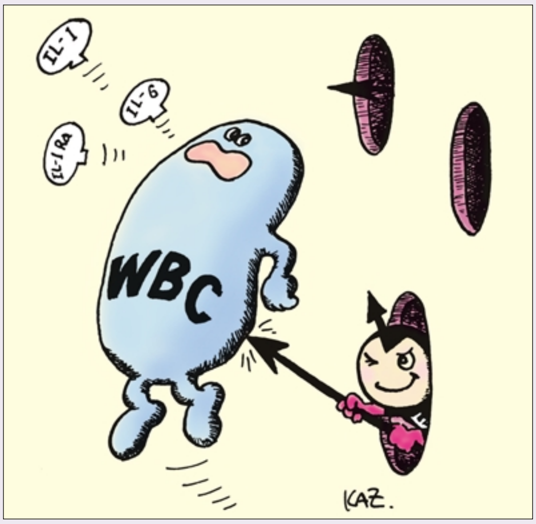
# 第 49 話　透析療法とエンドトキシン

今回のテーマは、透析療法におけるエンドトキシン測定の重要性です。

透析医学会のデータによると、1999 年における日本国内の慢性透析患者数は 197,213 人、透析施設数は 3,220 施設、ペーシェントステーション数は 75,448 台となっています。この約 20 万人の透析患者さんたちは、腎臓移植を受ける以外、一生透析療法を受ける必要があります。透析療法の進歩により、生存率も向上し、25 年以上透析療法を受けている患者数も 2,000 人を超えています。透析療法は長期にわたるため、その副作用も長期間の観察による考察が必要です。

注射用医薬品中のエンドトキシン濃度は 5 EU/kg 以下と定められていますが、これは一時的に投与される医薬品の急性毒性を抑えるための規格と考えることができます。大量の透析液が透析膜を介して血液と接触するにもかかわらず、透析液を血液に直接入れないことから、エンドトキシンの規格値は注射用水程度とされてきました。ところが、透析療法の効率を上げるために、より大きい口径を持つ高性能膜が開発されると、エンドトキシンの逆ろ過の危険性が指摘されるようになり、汚染された透析液による発熱反応が報告されるようになりました[1)]。また、長期透析における副作用の一つである透析アミロイド症の原因物質、$\beta_2$ ミクログロブリンが、透析液のエンドトキシンフリー化で低下することも報告され[2)]、透析液の清浄化への感心が高まっています。汚染透析液を使用した場合の血中エンドトキシンは証明されていないものの、透析液の清浄化、特にエンドトキシン濃度の低減の必要性は、現在広く認められてきたと考えられます。

新しく検討されている透析療法の一つに血液透析ろ過療法（HDF 療法）があります。HDF 療法では、透析液を血液に入れ、増加分をろ過で取り除くもので、従来の透析療法が膜を介した拡散を利用していたのに対し、積極的にろ過を行うことで、血液中の不要物を効率良く除去しようというものです。HDF 用の透析液（補液）中のエンドトキシン濃度は 1 EU/ℓ 未満という規格が、HDF 研究会から提唱されています。筆者らのグループがパイロセップ法で検討したところ、市販の補液は非常にきれいで、検量線の外挿値から、少なくとも 0.005 EU/ℓ 以下と考えられました。さすが、医薬品会社の無エンドトキシン製品製造能力はたいしたものです。しかし、オンライン HDF 療法などでは、通常の透析液をろ過などにより清浄化して補液として使用するため、補液の清浄化を維持することが必要となり、原料となる RO 水をはじめ、工程の管理が重要になってきます。やはり、一旦通常の環境で調液を行うと、微生物の汚染は少々の努力では避けられないようです。




さて、透析液中のエンドトキシンとペプチドグリカンの影響に関する土田らの興味深い報告があります[3)]。すなわち、エンドトキシンやペプチドグリカンの最小構成単位であるムラミルジペプチド（MDP）は、ヒト末梢血単核球（PBMC）のサイトカイン産生を誘導し、PBMC による IL-1$\beta$ や IL-1Ra の産生における相乗効果を示したというものです。この相乗効果は、汚染された透析液で長期間透析を受けていた患者群では有意に低下していました。この結果は汚染された透析液からの何らかの刺激を示唆しており、やはり透析液の清浄化が必要ということなのでしょう。さらに、単独では活性の弱いペプチドグリカンもエンドトキシン活性を増強することから、ペプチドグリカンの管理も必要かもしれません。

エンドトキシンは、多量投与では急性毒性を示しますし、少量の継続的刺激でも様々な影響を与えるようです。さらに、ペプチドグリカンが相乗的に働くとなると、これらを産生する細菌の管理が重要であることはいうまでもありません。もちろん、ペプチドグリカン以外にも生物活性を持った微生物成分があることでしょう。人は、良きにつけ悪しきにつけ、微生物と無関係には生きていけません。この分野に関して、和光の LAL/SLP システムがお役に立てばよいのですが。よい利用方法がございましたら、是非お知らせください。

次回は、第 50 話「エンドトキシン試験のアメリカ事情」の予定です。

〔参考文献〕

1）Steven, M. *et al.* : *J. Am. Soc. Nephrol.*, **2**, 1436（1992）.
2）政金生人 他:「腎と透析別冊 HDF 療法 '98」, p. 107,（東京医学社）（1998）.
3）土田健司 他：防菌防黴誌，**25**, 405（1997）.

# 小胞体ストレスの神経変性疾患への関与

北海道大学・大学院薬学研究科　金子　雅幸，野村　靖幸

小胞体はカルシウムの貯蔵に関するだけでなく、膜蛋白質や分泌蛋白質の成熟にも関わっている。これらの蛋白質はリボソームで合成されると、小胞体膜にあるチャネルを通って小胞体内腔に入り、正常に成熟したものだけが、各細胞内小器官に送られる。すなわち、小胞体は、工場として製品（膜蛋白質や分泌蛋白質）の加工（折りたたみやジスルフィド結合の形成、糖鎖修飾）と品質管理を行い、不良品はその先のライン（ゴルジ装置など）に送らないように制御している。その工場が何らかの障害（この場合、小胞体内のカルシウムの枯渇や糖鎖修飾の阻害、還元剤によるジスルフィド結合の切断、低酸素など）を受けると、不良品の蛋白質が多く作られる。これに対し小胞体は三つの対策を講じる。第1は、生産ラインの停止（リボソームでの蛋白翻訳の停止）、第2は、不良品の修理（小胞体シャペロンによる修復）、そして最後は、修理不可能な不良品の廃棄（小胞体から細胞質への変性蛋白質の排出と、ユビキチン−プロテアソーム系による分解，ER-associated degradation: ERAD）である。そして、不良蛋白質が過剰に小胞体に貯まった状態を小胞体ストレスといい、この状態が続くと細胞はアポトーシスを起こして死に至る。

興味深いことに最近、この小胞体ストレスと神経変性疾患との関係が取りざたされてきている。その一つの例として、プレセニリンの変異による小胞体シャペロンの誘導抑制がある[1]。家族性アルツハイマー病（FAD）にはプレセニリンの変異が多くみられ、凝集性の高いβアミロイドの分泌が亢進していることは有名である。一方、その新しい仮説とは、プレセニリンの変異が小胞体シャペロンの誘導に必要な小胞体膜上の小胞体ストレストランスデューサー（IRE1, ATF6）の抑制を引き起こすというものである。そのために小胞体は不良蛋白質の修復が十分にできずに小胞体ストレスに対して脆弱になり、神経細胞死が惹起されるという機構である。私たちはさらに、ERAD関連遺伝子もIRE1およびATF6によって誘導されることを見いだしている（投稿中）。したがって、プレセニリンの変異はERAD機能の低下を引き起こす可能性も予想される。

また、家族性パーキンソン病の一つ常染色体劣性遺伝性若年性パーキンソン病（AR-JP）でも小胞体ストレスによる神経細胞死が起きている例が報告されている[2]。AR-JPの原因因子として知られているParkinは、ユビキチンリガーゼとして基質蛋白質の認識とユビキチン化に働き、ERADに関与することが報告されている。そして、その基質としてPael受容体が発見され、Parkinの変異によってPael受容体が小胞体へ蓄積し、小胞体ストレスを誘発しているという説が提唱されている。

さらに、小胞体外で蓄積した変性蛋白質が最終的に小胞体ストレスを引き起こすという、例が報告されている[3]。それは、ハンチントン病に代表されるポリグルタミン蛋白質の蓄積である。ポリグルタミン病は、原因遺伝子内におけるCAGの繰り返し塩基の伸長によってポリグルタミンを多く含む不溶

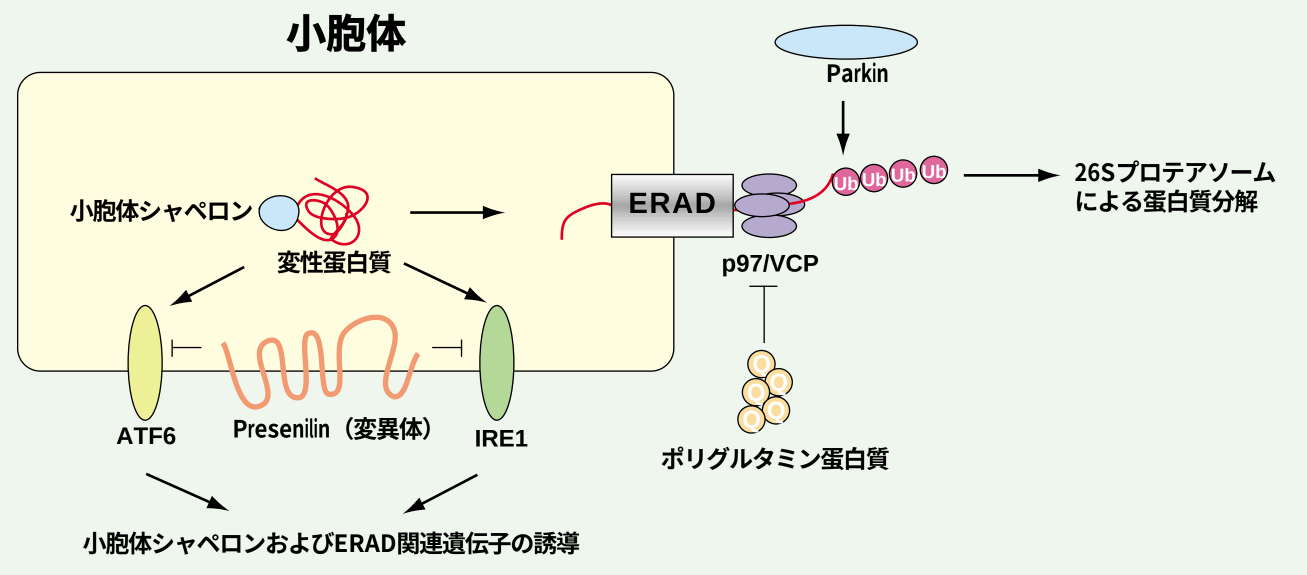



図　小胞体に蓄積した変性蛋白質に対する応答機構と疾患の発症機構

性の蛋白質が生じ、細胞内に蓄積することによって起こる。この蛋白質は主に核に蓄積するが、結果として小胞体に起因するIRE1を介した細胞死を引き起こすことが報告されている。その原因としてERADにおいて小胞体から細胞質に蛋白質を引きずり出すポンプであるp97/VCPをポリグルタミン蛋白質が塞ぎ、小胞体に蛋白質が蓄積して小胞体ストレスが起きるためと推論されている。

一方、神経変性疾患において、変性蛋白質の凝集体が細胞内または細胞外に蓄積しているのがしばしば観察されるが、AR-JPなどでは他のパーキンソン病で見受けられるLewy小体が見られない。ということは、蛋白質凝集体の毒性だけでは神経細胞死の機序は説明できず、上記の小胞体ストレスが関与するメカニズムも視野に入れる必要がある。神経変性疾患に対する治療法は、アルツハイマー病におけるコリンエステラーゼ阻害薬やパーキンソン病におけるL-dopaなど対症療法に終わっている。そのため、その根本的治療法として、老人斑やLewy小体などの「目に見える」蛋白質の蓄積を防ぐ方法が注目されている。しかし、これらの疾患が小胞体ストレスを原因とするものなら、「目に見えない」小胞体ストレスから細胞を守ことが重要になると考えられる。しかしながら、小胞体ストレス応答機構、特にERADに関与する分子はヒトにおいては不明な点が多い。今後、さらに小胞体ストレスと神経変性疾患の関係が明らかになってくると考えられるが、小胞体における分解機構すなわちERADがその鍵を握ると予想される。

**〔参考文献〕**


1) Katayama, T., Imaizumi, K., Sato, N., Miyoshi, K., Kudo, T., Hitomi, J., Morihara, T., Yoneda, T., Gomi, F., Mori, Y., Nakano, Y., Takeda, J., Tsuda, T., Itoyama, Y., Murayama, O., Takashima, A., St.George-Hyslop, P., Takeda, M., and Tohyama, M. (1999) *Nat. Cell Biol.* **8**, 479-485.

2) Imai, Y., Soda, M., Inoue, H., Hattori, N., Mizuno, Y. and Takahashi, R. (2001) *Cell* **105**, 891-902.

3) Nishitoh, H., Matsuzawa, A., Tobiume, K., Saegusa, K., Takeda, K., Inoue, K., Hori, S., Kakizuka, A. and Ichijo, H. (2002) *Genes Dev.* **16**, 1345-1355.


## Information

第18回Wakoワークショップ

### 「糖尿病におけるトランスレーショナルリサーチの展望」

**日　　時**：平成14年11月19日(火) 10：00～17：00

**場　　所**：千里ライフサイエンスセンター　5階ライフホール(大阪府豊中市新千里東町1丁目4番2号)

**総合企画**：神戸大学大学院 医学系研究科 糖尿病代謝・消化器・腎臓内科　春日　雅人 教授

**講演プログラム**：

| | | |
|---|---|---|
| 10：00～ | 開会挨拶 | 和 光 純 薬 |
| 10：05～ | はじめに | 神戸大院・医　春日 雅人 |
| 10：10～ | インスリン分泌の分子機構 | 千葉大院・医　清野　進 |
| 10：50～ | インスリン分泌と糖尿病の発症 | 京都大院・医　清野　裕 |
| 11：30～ | 小胞体ストレスと糖尿病の発症 | 熊 本 大・医　荒木 栄一 |
| 12：10～ | ―― 昼　　食 ―― | |
| 13：10～ | インスリン作用機構と糖尿病の発症 | 神戸大院・医　春日 雅人 |
| 13：50～ | 遺伝素因と糖尿病の発症 | 東京大院・医　門脇　孝 |
| 14：30～ | 肥満と糖尿病の発症 | 大阪大院・医　松澤 佑次 |
| 15：10～ | ―― コーヒーブレイク ―― | |
| 15：30～ | 糖尿病細小血管症の分子機構 | 金沢大院・医　山本　博 |
| 16：10～ | 糖尿病大血管障害の分子機構 | 筑 波 大・医　山田 信博 |
| 16：50～ | おわりに | 神戸大院・医　春日 雅人 |
| 17：00～ | 閉会挨拶 | 和 光 純 薬 |

一般講演は、講演時間30分、質疑応答10分を予定しております。

**申込・連絡先**：和光純薬工業株式会社　試薬営業本部　学術部　ワークショップ係
TEL：06-6203-1788　FAX：06-6201-5964　E-mail：seminar@wako-chem.co.jp

**定　　員**：420名(先着順)

**参 加 費**：無料

## 和光の組換えサイトカイン、ケモカイン製品

当社では新たに33品目のサイトカイン及びケモカインを商品化し、さらに品揃えが充実しました。新規に発見された特色ある品目にも着目しています。この機会に是非ご利用下さい。

**①インターロイキン-1α，ラット，組換え体**
**起源**：Rat interleukin-1*α* cDNA expressed in *E. coli*
**活性**：$ED_{50}$＜0.005ng/mℓ（比活性＞2×$10^9$ units/mgに相当）（マウスD10S細胞の用量依存的増殖）

**②インターロイキン-2，ラット，組換え体**
**起源**：Rat interleukin-2 cDNA expressed in *E. coli*
**活性**：$ED_{50}$＜0.4ng/mℓ（比活性＞2.5×$10^6$ units/mgに相当）（マウスCTLL-2細胞の用量依存的増殖）

**③インターロイキン-3β，ラット，組換え体**
**起源**：Rat interleukin-3*β* cDNA expressed in *E. coli*
**活性**：$ED_{50}$＜10ng/mℓ（比活性＞1.0×$10^5$ units/mgに相当）（マウスMC-9細胞の用量依存的増殖）

**④インターロイキン-10，ラット，組換え体**
**起源**：Rat interleukin-10 cDNA expressed in *E. coli*
**活性**：$ED_{50}$＜10ng/mℓ（抗原特異的T細胞増殖の用量依存的阻害）

**⑤カルジオトロフィン-1，ヒト，組換え体**
**起源**：Human cardiotrophin-1 cDNA expressed in *E. coli*
**活性**：$ED_{50}$＜1.0ng/mℓ（比活性＞1×$10^6$ units/mgに相当）（TF-1細胞の用量依存的増殖）

**⑥ EMAP-Ⅱ，ヒト，組換え体**
**起源**：Human EMAP-Ⅱ cDNA expressed in *E. coli*
**活性**：20～40ng/mℓでヒトMCF-7細胞においてアポトーシスが認められる。

**⑦顆粒球コロニー刺激因子，ヒト，組換え体**
**起源**：Human G-CSF cDNA expressed in *E. coli*
**活性**：$ED_{50}$＜0.1ng/mℓ（比活性＞1×$10^7$ units/mgに相当）（マウスM-NFS-60細胞の用量依存的増殖）

**⑧ケラチノサイト成長因子，ヒト，組換え体**
**起源**：Human KGF cDNA expressed in *E. coli*
**活性**：$ED_{50}$＜10ng/mℓ以下（KGF反応性BaF3細胞のチミジンの取込み）

**⑨可溶性RANKリガント，ヒト，組換え体**
**起源**：Human sRANK ligand cDNA expressed in *E. coli*
**活性**：ヒトPBMC細胞株によるIL-8生産の用量依存的増殖テストにおいて$ED_{50}$が10ng/mℓ以下。

**⑩幹細胞成長因子-α，ヒト，組換え体**
**起源**：Human SCGF-*α* cDNA expressed in *E. coli*
**活性**：$ED_{50}$＜0.1ng/mℓ以下（GM-CSFを含む培地中で生育したTF1細胞の増殖阻害効果）

**⑪幹細胞成長因子-β，ヒト，組換え体**
**起源**：Human SCGF-*β* cDNA expressed in *E. coli*
**活性**：$ED_{50}$＜7ng/mℓ以下（GM-CSFを含む培地中で生育したTF1細胞の増殖阻害効果）

**⑫腫瘍細胞増殖因子-β₂，ヒト，組換え体**
**起源**：Human TGF-$β_2$ cDNA expressed in *E. coli*
**活性**：$ED_{50}$＝0.05～0.1ng/mℓ（比活性1～2×$10^7$units/mgに相当）（ミンク肺MvlLu（CCL-64）の用量依存的増殖）
**備考**：renatured

**⑬可溶性腫瘍壊死因子レセプターⅠ，ヒト，組換え体**
**起源**：Human sTNF receptorⅠ cDNA expressed in *E. coli*
**活性**：$ED_{50}$＝0.05μg/mℓ（0.25ng/mℓのrhTNF-*α*の存在下、マウスL-929細胞においてTNF-*α*による細胞毒性の阻害効果により決定）

**⑭可溶性腫瘍壊死因子レセプターⅡ，ヒト，組換え体**
**起源**：Human sTNF receptorⅡ cDNA expressed in *E. coli*
**活性**：$ED_{50}$＝0.125μg/mℓ（0.25ng/mℓのrhTNF-*α*存在下、マウスL-929細胞においてTNF-*α*による細胞毒性の阻害効果により決定）

**⑮可溶性TRAILレセプター-1，ヒト，組換え体**
**起源**：Human sTRAIL receptor-1 cDNA expressed in *E. coli*
**活性**：ヒトPBMC中、100ng/mℓヒトsTRAIL/Apo2L存在下、本品100ng/mℓでIL-8産生を95%阻害する。

**⑯可溶性TRAILレセプター-2，ヒト，組換え体**
**起源**：Human sTRAIL receptor-2 cDNA expressed in *E. coli*
**活性**：ヒトPBMC中、100ng/mℓヒトsTRAIL/Apo2L存在下、本品1,000ng/mℓでIL-8産生を50%阻害する。

**⑰ TWEAK，ヒト，組換え体**
**起源**：Human TWEAK cDNA expressed in *E. coli*
**活性**：$ED_{50}$＜10ng/mℓ（ヒトPBMCの用量依存的IL-8産生により決定）

**⑱カルジオトロフィン-1，マウス，組換え体**
**起源**：Mouse cardiotrophin-1 cDNA expressed in *E. coli*
**活性**：$ED_{50}$＜1.0ng/mℓ（比活性＞1×$10^6$ units/mgに相当）（TF-1細胞の用量依存的増殖）

**⑲顆粒球コロニー刺激因子，マウス，組換え体**
**起源**：Mouse G-CSF cDNA expressed in *E. coli*
**活性**：$ED_{50}$＜0.05ng/mℓ（比活性＞2×$10^7$ units/mgに相当）（マウスM-NFS-60細胞の用量依存的増殖）

**⑳可溶性RANKリガンド，マウス，組換え体**
**起源**：Mouse sRANK ligand cDNA expressed in *E. coli*
**活性**：5～10ng/mℓでマウスRAW264.7細胞において破骨細胞の形成を誘導する。

**㉑エオタキシン-2，ヒト，組換え体**
**起源**：Human eotaxin-2 cDNA expressed in *E. coli*
**活性**：50～100ng/mℓでヒト末梢血好酸球走化性が認められる。

**㉒エオタキシン-3，ヒト，組換え体**
**起源**：Human eotaxin-3 cDNA expressed in *E. coli*
**活性**：2μg/mℓでヒトCCR3/HEK293細胞走化性の最大活性が認められる。

**㉓ストローマ細胞由来因子-1α，ヒト，組換え体**
**起源**：Human SDF-1*α* cDNA expressed in *E. coli*
**活性**：20～80ng/mℓの濃度で、PHAとIL-2で活性化されたヒト末梢T細胞の走化性により決定される。

**㉔ストローマ細胞由来因子-1β，ヒト，組換え体**
**起源**：Human SDF-1*β* cDNA expressed in *E. coli*
**活性**：20～80ng/mℓの濃度で、PHAとIL-2で活性化されたヒト末梢T細胞の走化性により決定される。

**㉕エオタキシン-2，マウス，組換え体**
**起源**：Mouse eotaxin-2 cDNA expressed in *E. coli*
**活性**：10～100ng/mℓでマウスリンパ球走化性が認められる。

**㉖ストローマ細胞由来因子-1α，マウス，組換え体**
**起源**：Mouse SDF-1*α* cDNA expressed in *E. coli*
**活性**：50～100ng/mℓでヒトPBMCの走化性により決定される。

**㉗ストローマ細胞由来因子-1β，マウス，組換え体**
**起源**：Mouse SDF-1*β* cDNA expressed in *E. coli*
**活性**：50～100ng/mℓでヒト単球の走化性により決定される。

**㉘アルテミン，ヒト，組換え体**
**起源**：Human artemin cDNA expressed in *E. coli*

**㉙毛様体神経栄養因子，ヒト，組換え体**
**起源**：Human CNTF cDNA expressed in *E. coli*
**活性**：$ED_{50}$＜2.0ng/mℓ（比活性＞2×$10^5$ units/mgに相当）

**㉚ミッドカイン，ヒト，組換え体**
**起源**：Human midkine cDNA expressed in *E. coli*
**活性**：0.1～10.0ng/mℓでヒト好中球の走化性が認められる。

**㉛神経成長因子-β，ヒト，組換え体**
**起源**：Human NGF-*β* cDNA expressed in *E. coli*
**活性**：$ED_{50}$＝2.0～5.0ng/mℓ（コリンアセチルトランスフェラーゼ活性の誘導）

**㉜パーセフィン，ヒト，組換え体**
**起源**：Human persephin cDNA expressed in *E. coli*
**活性**：0.1～1.0ng/mℓの濃度でRETりん酸化を誘導する。

**㉝プレイオトロフィン、ヒト、組換え体**
**起源**：Human pleiotrophin cDNA expressed in *E. coli*

※①～㉝共通：
**形状**：凍結乾燥品（キャリアフリー）
**エンドトキシン**：0.1ng/μg（1EU/μg）以下

〔次頁に続く〕

# New Products

## ■インターロイキン

| | コード No. | 品　名 | 規　格 | 容　量 | 希望納入価格(円) |
|---|---|---|---|---|---|
| | **Human** | | | | |
| | 094-04561 | IL-1 α | 生化学用 | 10μg | 39,000 |
| | 095-04611 | IL-1 β | 生化学用 | 10μg | 39,000 |
| | 097-03951 | IL-2 | 生化学用 | 50μg | 39,900 |
| | 092-04621 | IL-3 | 生化学用 | 10μg | 39,000 |
| | 094-03961 | IL-4 | 生化学用 | 10μg | 50,000 |
| | 093-03811 | IL-5 | 生化学用 | 3μg | 52,500 |
| | 099-04631 | IL-6 | 生化学用 | 20μg | 39,000 |
| | 096-04641 | IL-7 | 生化学用 | 10μg | 39,000 |
| | 091-04331 | IL-8(内皮細胞) | 生化学用 | 25μg | 39,000 |
| | 098-04341 | IL-8(単球) | 生化学用 | 25μg | 39,000 |
| | 093-04651 | IL-10 | 生化学用 | 10μg | 39,000 |
| | 090-04281 | IL-11 | 生化学用 | 10μg | 39,000 |
| | 093-04391 | IL-12 | 生化学用 | 5μg | 39,000 |
| | 090-04661 | IL-15 | 生化学用 | 10μg | 39,000 |
| | **Mouse** | | | | |
| | 097-04671 | IL-1 α | 生化学用 | 10μg | 39,000 |
| | 094-04681 | IL-1 β | 生化学用 | 10μg | 39,000 |
| | 090-04421 | IL-2 | 生化学用 | 20μg | 39,000 |
| | 091-03971 | IL-3 | 生化学用 | 10μg | 39,900 |
| | 090-03941 | IL-4 | 生化学用 | 10μg | 50,000 |
| | 097-04431 | IL-6 | 生化学用 | 5μg | 20,000 |
| | 094-04441 | IL-7 | 生化学用 | 5μg | 39,000 |
| | 091-04691 | IL-10 | 生化学用 | 10μg | 39,000 |
| | 096-04401 | IL-12 | 生化学用 | 5μg | 42,000 |
| | **Rat** | | | | |
| New ① | 094-04941 | IL-1 α | 生化学用 | 10μg | 39,000 |
| | 096-04261 | IL-1 β | 生化学用 | 5μg | 39,000 |
| New ② | 091-04951 | IL-2 | 生化学用 | 20μg | 39,000 |
| New ③ | 098-04961 | IL-3 β | 生化学用 | 10μg | 39,000 |
| | 098-04461 | IL-4 | 生化学用 | 10μg | 39,000 |
| | 093-04271 | IL-6 | 生化学用 | 10μg | 39,000 |
| New ④ | 092-04981 | IL-10 | 生化学用 | 10μg | 39,000 |

## ■サイトカイン／成長因子

| | コード No. | 品　名 | 規　格 | 容　量 | 希望納入価格(円) |
|---|---|---|---|---|---|
| | **Human** | | | | |
| New ⑤ | 034-18811 | Cardiotrophin-1 | 生化学用 | 10μg | 39,000 |
| | 057-05211 | EGF | 生化学用 | 100μg | 15,000 |
| New ⑥ | 057-07031 | EMAP-II | 生化学用 | 20μg | 39,000 |
| | 067-04031 | bFGF | 生化学用 | 25μg | 19,500 |
| | 061-04051 | Flt-3L | 生化学用 | 10μg | 39,000 |
| New ⑦ | 074-04841 | G-CSF | 生化学用 | 10μg | 39,000 |
| | 071-04111 | GM-CSF | 生化学用 | 10μg | 39,900 |
| | 080-07781 | HGF | 生化学用 | 1μg | 43,000 |
| | 094-03721 | IFN- γ | 生化学用 | 2,000,000JRU | 68,000 |
| | 099-04511 | IGF- I | 生化学用 | 100μg | 37,000 |
| | 096-04521 | IGF- II | 生化学用 | 75μg | 37,000 |
| New ⑧ | 119-00661 | KGF | 生化学用 | 10μg | 34,000 |
| | 133-13611 | M-CSF | 生化学用 | 10μg | 39,000 |
| | 157-02121 | OPG | 生化学用 | 25μg | 59,000 |
| | 153-02101 | OSM | 生化学用 | 10μg | 37,000 |
| | 163-19731 | PDGF-AA | 生化学用 | 10μg | 39,000 |
| | 160-19741 | PDGF-BB | 生化学用 | 10μg | 39,000 |
| New ⑨ | 182-01471 | sRANKL | 生化学用 | 10μg | 37,000 |
| | 186-01474 | | | 50μg | 照　会 |
| | 188-01473 | | | 1mg | 照　会 |
| | 184-01671 | sRANK Receptor | 生化学用 | 100μg | 37,000 |
| | 190-12201 | SCF | 生化学用 | 10μg | 39,000 |
| New ⑩ | 194-12721 | SCGF-α | 生化学用 | 10μg | 39,000 |
| New ⑪ | 191-12731 | SCGF-β | 生化学用 | 10μg | 39,000 |
| | 204-14291 | TGF- β1 | 生化学用 | 2μg | 49,000 |
| New ⑫ | 201-15661 | TGF- β2 | 生化学用 | 2μg | 30,000 |
| | 203-15263 | TNF-α | 生化学用 | 10μg | 15,000 |
| | 207-15261 | | | 50μg | 39,000 |
| New ⑬ | 205-15681 | sTNF Receptor I | 生化学用 | 20μg | 39,000 |
| New ⑭ | 202-15691 | sTNF Receptor II | 生化学用 | 20μg | 39,000 |
| | 205-14841 | TRAIL/Apo2L | 生化学用 | 50μg | 39,000 |
| New ⑮ | 205-15701 | sTRAIL Receptor-1 | 生化学用 | 50μg | 39,000 |
| New ⑯ | 202-15711 | sTRAIL Receptor-2 | 生化学用 | 50μg | 39,000 |
| New ⑰ | 209-15721 | TWEAK | 生化学用 | 10μg | 39,000 |
| | 223-01311 | VEGF | 生化学用 | 10μg | 35,000 |
| | **Mouse** | | | | |
| New ⑱ | 031-18821 | Cardiotrophin-1 | 生化学用 | 10μg | 39,000 |
| | 057-04111 | EGF | 生化学用 | 100μg | 16,000 |
| New ⑲ | 071-04851 | G-CSF | 生化学用 | 10μg | 39,000 |
| | 073-04671 | GM-CSF | 生化学用 | 10μg | 39,000 |
| | 094-04701 | IFN-γ | 生化学用 | 100μg | 39,000 |
| New ⑳ | 184-01791 | sRANKL | 生化学用 | 10μg | 39,000 |
| | 198-11521 | SCF | 生化学用 | 10μg | 39,000 |
| | 201-13461 | TNF-α | 生化学用 | 20μg | 39,900 |
| | 224-01341 | VEGF | 生化学用 | 5μg | 20,000 |
| | **Rat** | | | | |
| | 069-04091 | bFGF | 生化学用 | 10μg | 19,500 |
| | 087-07791 | HGF | 生化学用 | 1μg | 43,000 |
| | 099-04251 | IFN-γ | 生化学用 | 100μg | 39,000 |
| | 203-14261 | TNF-α | 生化学用 | 20μg | 39,000 |
| | **Bovine** | | | | |
| | 061-02851 | aFGF | 生化学用 | 10μg | 15,700 |
| | 067-02831 | bFGF | 生化学用 | 10μg | 34,000 |

## ■ケモカイン

| | コード No. | 品　名 | 規　格 | 容　量 | 希望納入価格(円) |
|---|---|---|---|---|---|
| | **Human** | | | | |
| | 058-06461 | ENA-78 | 生化学用 | 20μg | 39,000 |
| | 055-06471 | Eotaxin | 生化学用 | 10μg | 39,000 |
| New ㉑ | 054-07041 | Eotaxin-2 | 生化学用 | 20μg | 39,000 |
| New ㉒ | 058-07061 | Eotaxin-3 | 生化学用 | 20μg | 39,000 |
| | 058-06581 | Exodus-2/SLC | 生化学用 | 20μg | 39,000 |
| | 077-04451 | GRO-α | 生化学用 | 25μg | 39,000 |
| | 095-04351 | IP-10 | 生化学用 | 25μg | 39,000 |
| | 137-13011 | MCP-1 | 生化学用 | 20μg | 39,000 |
| | 138-13161 | MCP-3 | 生化学用 | 10μg | 39,000 |
| | 133-13231 | MDC | 生化学用 | 20μg | 39,000 |
| | 138-13041 | MIP-1α | 生化学用 | 20μg | 39,000 |
| | 136-13081 | MIP-1β | 生化学用 | 10μg | 39,000 |
| | 130-13241 | MIP-3α /LARC | 生化学用 | 20μg | 39,000 |
| | 137-13251 | MIP-3β /ELC | 生化学用 | 20μg | 39,000 |
| | 134-13261 | MIP-4/PARC | 生化学用 | 10μg | 39,000 |
| | 167-19751 | PF-4 | 生化学用 | 20μg | 39,000 |
| | 181-01441 | RANTES | 生化学用 | 20μg | 39,000 |
| New ㉓ | 199-12651 | SDF-1α | 生化学用 | 10μg | 39,000 |
| New ㉔ | 193-12671 | SDF-1β | 生化学用 | 10μg | 39,000 |
| | 202-14611 | TARC | 生化学用 | 20μg | 39,000 |
| | **Mouse** | | | | |
| | 052-06481 | Eotaxin | 生化学用 | 10μg | 39,000 |
| New ㉕ | 051-07051 | Eotaxin-2 | 生化学用 | 20μg | 39,000 |
| | 055-06591 | Exodus-2/SLC | 生化学用 | 20μg | 39,000 |
| | 135-13171 | MCP-3 | 生化学用 | 10μg | 39,000 |
| | 185-01461 | RANTES | 生化学用 | 20μg | 39,000 |
| New ㉖ | 196-12661 | SDF-1α | 生化学用 | 10μg | 39,000 |
| New ㉗ | 190-12681 | SDF-1β | 生化学用 | 10μg | 39,000 |
| | **Rat** | | | | |
| | 072-04521 | GRO | 生化学用 | 25μg | 39,000 |
| | 074-04461 | GRO-β | 生化学用 | 25μg | 39,000 |
| | 131-13031 | MCP-1 | 生化学用 | 10μg | 39,000 |
| | 135-13051 | MIP-1α | 生化学用 | 20μg | 39,000 |
| | 188-01451 | RANTES | 生化学用 | 20μg | 39,000 |

## ■神経栄養因子

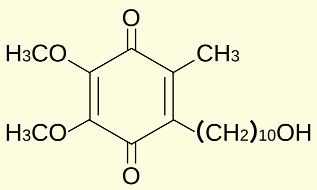
| | コード No. | 品　名 | 規　格 | 容　量 | 希望納入価格(円) |
|---|---|---|---|---|---|
| | **Human** | | | | |
| New ㉘ | 012-19471 | Artemin | 生化学用 | 10μg | 39,000 |
| | 020-12913 | BDNF | 生化学用 | 10μg | 40,000 |
| New ㉙ | 032-18851 | CNTF | 生化学用 | 20μg | 39,000 |
| | 079-04151 | GDNF | 生化学用 | 5μg | 25,000 |
| New ㉚ | 135-14271 | Midkine | 生化学用 | 20μg | 39,000 |
| | 142-06891 | Neurturin | 生化学用 | 10μg | 37,000 |
| New ㉛ | 141-07601 | NGF-β | 生化学用 | 20μg | 39,000 |
| | 145-06641 | NT-3 | 生化学用 | 5μg | 38,000 |
| | 148-06631 | NT-4 | 生化学用 | 5μg | 39,900 |
| New ㉜ | 164-20871 | Persephin | 生化学用 | 20μg | 39,000 |
| New ㉝ | 161-20881 | Pleiotrophin | 生化学用 | 20μg | 39,000 |
| | **Mouse** | | | | |
| | 143-04861 | 2.5S NGF | 生化学用 | 10μg | 15,700 |
| | 147-04641 | 7S NGF | 生化学用 | 100μg | 18,300 |
| | **Rat** | | | | |
| | 034-16351 | CNTF | 生化学用 | 20μg | 42,000 |

## 脳代謝の研究に

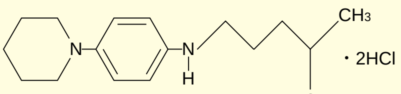
### イデベノン、T-43362

イデベノンは、中枢神経に作用して、脳卒中、脳虚血等に伴う情動障害、四肢麻痺、受動的回避反応障害を改善することが知られています。

T-43362 は、脳内アミン作動性を併有した中枢性抗酸化作用があります。N18-RE-105 細胞のグルタミン酸誘発細胞に対し強い保護作用を示します。また、過酸化脂質生成抑制も示します。




$C_{19}H_{30}O_5$=338.44
Idebenone




$C_{17}H_{28}N_2$•2HCl=333.34
T-43362

〔参考文献〕

大阪府薬剤師会編:「医薬品要覧 第5版」, p282

| コード No. | 品　　名 | 規格 | 容量 | 希望納入価格(円) |
|---|---|---|---|---|
| 096-05001 | Idebenone | 生化学用 | 100mg | 15,000 |
| 203-15741 | T-43362 | 生化学用 | 50mg | 12,000 |

### Ras Inhibitory Peptide

**生化学用**

本品は、guanine nucleotide-releasing factor の活性部位（1149-1158）と同一のアミノ酸配列を持ったペプチドです。がん遺伝子産物 Ras の機能をコントロールしており、Ras の生理活性を阻害します。

182-01731　1mg　**14,000 円**

### Geranylgeranylpyrophosphate Triammonium Salt Solution

**生化学用**

翻訳後修飾の過程で、タンパク質の C 末端部分のシステイン残基に、本品がゲラニルゲラニル転移酵素により修飾されることをゲラニルゲラニル化と言います。このゲラニルゲラニル化により生じるプレニル化タンパク質は、シグナル伝達において重要な役割を果しており、本品を基質とした阻害剤の開発に応用できます。

076-04781　200$\mu$g　**12,000 円**

### Farnesylpyrophosphate Triammonium Salt Solution

**生化学用**

翻訳後修飾の過程で、タンパク質の C 末端部分のシステイン残基に、本品がファルネシル転移酵素により修飾されることをファルネシル化と言います。このファルネシル化により生じるプレニル化タンパク質は、シグナル伝達において重要な役割を果しており、本品を基質とした阻害剤の開発に応用できます。

065-04211　200$\mu$g　**12,000 円**

## 花粉アレルギー研究用

### スギ花粉
### ヒノキ花粉

スギ及びヒノキ由来の花粉の凍結乾燥品です。本品は、アレルギー物質として使用される他、アレルゲンタンパク質の抽出・精製に用いられます。

**形　状**：凍結乾燥品

| コード No. | 品　　名 | 規　格 | 容　量 | 希望納入価格(円) |
|---|---|---|---|---|
| 168-20911 | Pollen, from Sugi | 生化学用 | 1g | 5,000 |
| 165-20921 | Pollen, from Hinoki | 生化学用 | 1g | 12,000 |

## 糖尿病研究に

### Hokudo 膵島培養キット

糖尿病には、膵臓から分泌されるインスリンが深く関与しています。本キットはラット膵臓から膵島のみを分離、培養し、専用メディウムと共にお客様へお送りします。キットの膵島はグルコース依存的にインスリンを分泌します。糖尿病研究、糖尿病治療薬開発にお役立て下さい。

**〔キット構成〕**

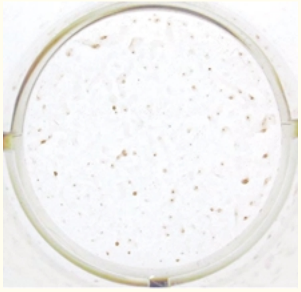
膵島(ランゲルハンス氏島)
　ラット１匹分(数百個)
　　　15mℓ コニカルチューブ×１本
ベーサルメディウム
　0.5mg/mℓ グルコース, 10% FBS 含有
　RPMI1640　　　100mℓ ×１本
グルコース刺激メディウム
　3mg/mℓ グルコース, 10% FBS 含有
　RPMI1640　　　100mℓ ×１本

※膵島はベーサルメディウム（グルコース濃度 0.5mg/mℓ）中に分散された状態で供給します。

**〔操作方法〕**

1) 必要量をプレートもしくは遠心チューブに分注し、ベーサルメディウムを用いて１日間、培養して下さい。
2) グルコース刺激メディウム中に検体を加え、この培養液を用いてメディウム交換し、30 分から 60 分インキュベートして下さい。
3) 培養上清中の、インスリン濃度を測定して下さい。ベーサルメディウムでの培養に対して、通常５倍から 10 倍のインスリン濃度になります。
また、培養上清中のグルカゴンを測定することもできます。

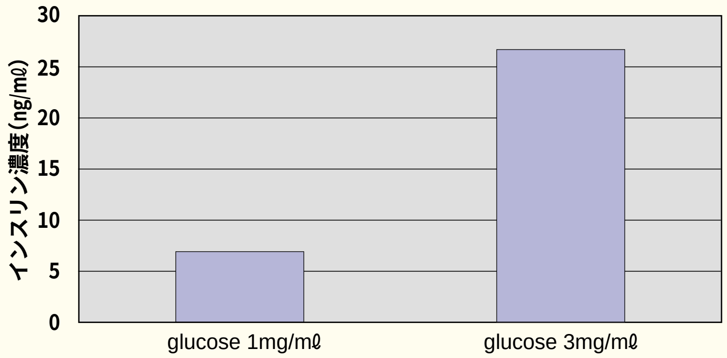
**〔抗ーインスリン抗体染色〕**



膵島を 48well プレートに３日間培養し、ホルマリン固定後、抗- インスリン抗体、HRP 標識二次抗体を用いて染色した。

上写真：48well プレート内の膵島
下写真：拡大図

**〔ラット膵島に対する糖付加試験〕**




24 Well プレートの２Well に、１Well 当たり単離ラット膵島 50 個を加え１日間培養した。
その後、一旦 0.6mg/mℓ glucose 濃度の培養液で 60 分間培養後、一方の Well を 1mg/mℓ glucose 入り培養液に交換し、液に交換し 90 分間、37℃でインキュベートし培養上清を回収し培養液中のインスリン濃度をレビスインスリン・ラット(シバヤギ社製)を用いて測定した。

| コード No. | メーカーコード | 品　名 | 容　量 | 希望納入価格(円) |
|---|---|---|---|---|
| 303-13491 | CUPI01 | Pancreatic islets Culture Kit(1 tube) | 1 キット | 130,000 |

**〔関連製品〕**

| コード No. | 品　名 | 規　格 | 容　量 | 希望納入価格(円) |
|---|---|---|---|---|
| 297-57101 | Rat Glucagon ELISA Kit *wako* | 糖尿病研究用 | 96 回用 | 75,000 |

Shibayagi

| コード No. | メーカーコード | 品　名 | 容　量 | 希望納入価格(円) |
|---|---|---|---|---|
| 632-01281 | AKRIN-010 | Lbis® Insulin-Rat | 96 回用 | 45,000 |
| 637-01471 | AKRIN-010T | Lbis® Insulin-Rat-T | 96 回用 | 45,000 |
| 639-03131 | AKRIN-030 | Lbis® Insulin-Rat U-Type | 96 回用 | 62,000 |

T は発色基質が TMB、U タイプは高感度タイプになります。

## BFP/GFP ベクター　品目追加！

GFP（Green Fluorescent Protein）は、オワンクラゲ（*Aequorea victoria*）由来の緑色蛍光タンパク質です。蛍光を発するのに酸素以外特別な因子を必要とせず、*in vivo* において生理的機能を損なうことがないため、生細胞中でタンパク質の発現や局在を直接観察できます。BFP（Blue Fluorescent Protein）は、GFP を変異させた青色蛍光タンパク質です。

本品は、野生型 BFP/GFP を変異させ、より哺乳動物細胞での発現効率を高めた BFP/GFP ベクターです。

**測定波長：**

BFP　Ex. 384nm　Em. 450nm
（フィルター：Excitation filter 360/40nm Emission filter 460/40nm）

GFP　Ex. 474nm　Em. 509nm
（フィルター：Excitation filter 485/20nm Emission filter 530/30nm）

**形　状**：10mmol/ℓ　Tris-HCl,
1mmol/ℓ EDTA（pH 8.0）

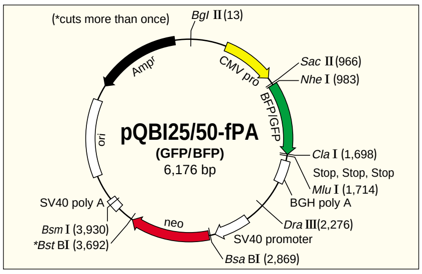
**純　度**：$OD_{260}/OD_{280}$ = 1.7 ～ 1.9

**〔参考文献〕**


1）Stauber, R. H. *et al* : *BioTechniques*, **24**, 462（1998）.
2）WO 97/42320.

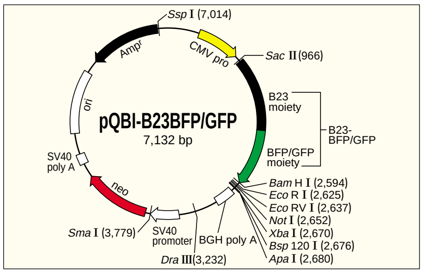

### BFP Vector pQBI 50-fPA、GFP Vector pQBI 25-fPA

*Nhe* I サイトを用いて、PCR 産物のコード配列と BFP/GFP の融合タンパク質を簡単に作るためのベクターです。また、プロモーター領域、BFP/GFP コード配列、poly A シグナル配列の切り出しのための機能的なカセットベクターとしても使用できます。



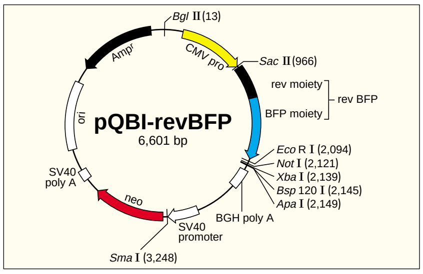

### BFP Vector pQBI-B23BFP、GFP Vector pQBI-B23GFP

哺乳動物細胞中で、核小体由来のりんタンパク質である B23 と BFP/GFP の融合体を高効率に発現することができます。融合タンパク質は核小体に局在します。また、SV40 プロモーターの下流に neo 遺伝子を含んでおり、形質転換された薬剤耐性株を効率よく選択できます。



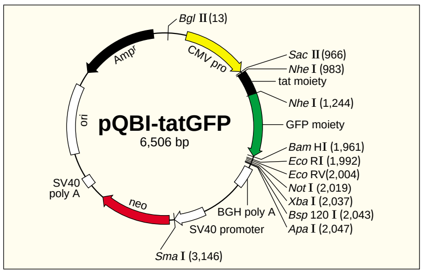

### BFP Vector pQBI-revBFP

哺乳動物細胞中で、HIV 由来の rev タンパク質と BFP の融合体を高効率に発現することができます。rev タンパク質は、核小体から細胞質へのタンパク質の往復を支配していますが、融合タンパク質はほとんど核小体に局在します。また、SV40 プロモーターの下流に neo 遺伝子を含んでおり、形質転換された薬剤耐性株を効率よく選択できます。



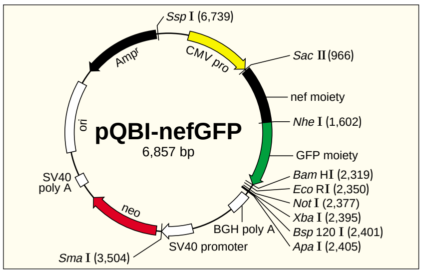

### GFP Vector pQBI-tatGFP

哺乳動物細胞中で、HIV 由来の tat タンパク質と GFP の融合体を高効率に発現することができます。融合タンパク質は核小体及び核に局在します。また、SV40 プロモーターの下流に neo 遺伝子を含んでおり、形質転換された薬剤耐性株を効率よく選択できます。



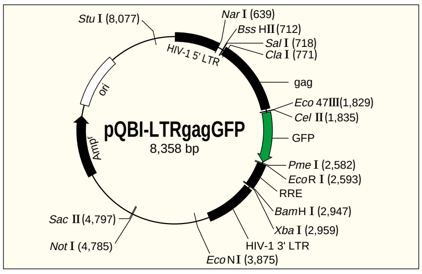

### GFP Vector pQBI-nefGFP

哺乳動物細胞中で、HIV 由来の nef タンパク質と GFP の融合体を高効率に発現することができます。融合タンパク質は核周囲に局在します。また、SV40 プロモーターの下流に neo 遺伝子を含んでおり、形質転換された薬剤耐性株を効率よく選択できます。



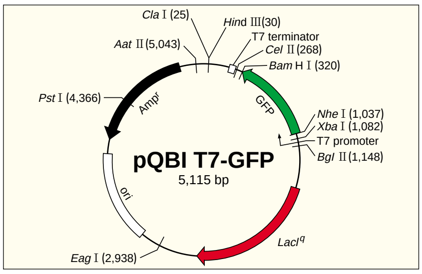

### GFP Vector pQBI-LTRgagGFP

LTR プロモーターの制御により、哺乳動物細胞中で HIV-1 由来の gag タンパク質と GFP の融合体を高効率に発現することができます。発現は機能的な rev タンパク質に依存しています。融合体は、gag と GFP が 18 アミノ酸のスペーサー分、離れているため両方の機能を保持したまま細胞質に局在します。HIV 感染に対する強力な感受性コントロールとして用いられます。また、pQBI-revGFP と co-transfection することで、細胞質を緑色、核小体を青色に染めることができます。




### GFP Vector pQBI-T7

T7 RNA ポリメラーゼを発現している大腸菌内で高効率に GFP を発現します。また、本品はリプレッサータンパク質である *lacI*q 遺伝子を含んでいますので、lac オペロンの発現を最小限度に抑えることができます。pET システムに有用です。




| コード No. | 品　　名 | 規　格 | 容　量 | 希望納入価格(円) |
|---|---|---|---|---|
| 545-02101 | Blue Fluorescent Protein Vector pQBI 50-fPA | 遺伝子研究用 | 20μg | 33,000 |
| 541-02061 | Green Fluorescent Protein Vector pQBI 25-fPA | 遺伝子研究用 | 20μg | 33,000 |
| 544-02171 | Blue Fluorescent Protein Vector pQBI-B23BFP | 遺伝子研究用 | 20μg | 50,000 |
| 548-02191 | Green Fluorescent Protein Vector pQBI-B23GFP | 遺伝子研究用 | 20μg | 50,000 |
| 541-02181 | Blue Fluorescent Protein Vector pQBI-revBFP | 遺伝子研究用 | 20μg | 50,000 |
| 541-02201 | Green Fluorescent Protein Vector pQBI-tatGFP | 遺伝子研究用 | 20μg | 50,000 |
| 548-02211 | Green Fluorescent Protein Vector pQBI-nefGFP | 遺伝子研究用 | 20μg | 50,000 |
| 545-02221 | Green Fluorescent Protein Vector pQBI-LTRgagGFP | 遺伝子研究用 | 20μg | 55,000 |
| 542-02231 | Green Fluorescent Protein Vector pQBI-T7 | 遺伝子研究用 | 20μg | 35,000 |

## I.F. LAB Novel Organic Compounds

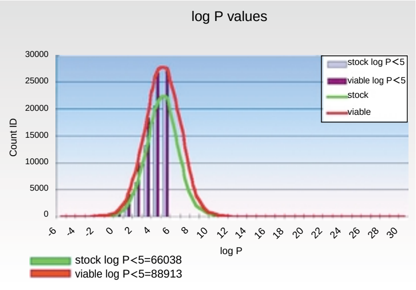
I.F. LAB Ltd. は、世界中の 200 社（製薬企業、農薬企業、バイオテク企業）にスクリーニング用有機化合物を提供しているメーカーです。

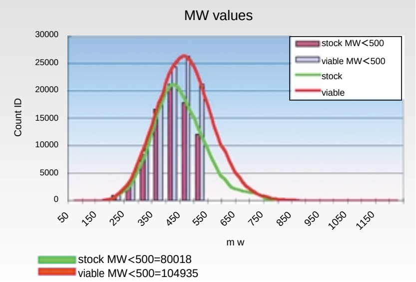
商品は安価で高純度（90% 以上）、評価試験は 400MHz NMR 及び LC/MS にて実施しております。

在庫管理体制も万全で、在庫からの即時納入が可能です。（再合成の場合の納期は 4 週間～ 2 ヵ月）

※ 製品のデータを CD-ROM で提供しますので、資料請求カードにてお問合せ下さい。

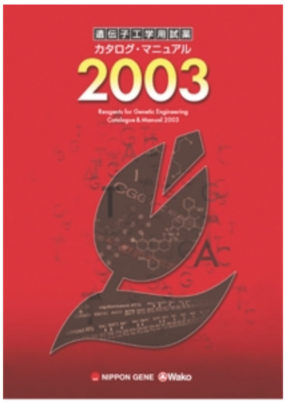
- **Smart Library of Small Molecules**
  厳選された 600 種類のテンプレートを基本骨格とする、18 万件以上の化合物ライブラリ（Stock : 94,000 ; Viable : 90,000）
- **Collection of Building Blocks**
  多様な新規構造を持つ、I.F. LAB 社独自の 2,000 件以上のビルディングブロック
- **Quantity Standards and Formatting**
  秤量は 1 ～ 500mg で 0.1mg 単位の精度を保証し、バイアルやプレートなど様々な形態での納入も可能




## Information

### 遺伝子工学用カタログ･マニュアル　第 13 版　2003 年度版　発行！




- 製品に関するデータをできるだけ多く掲載し、マニュアルもさらに充実
- 定量 PCR 用試薬、GM 検知用試薬、学生実験用キット「Dr. ジーン」を新たに掲載
- プロテオーム解析用試薬を約 70 ページ掲載
- 各機種対応の定量 PCR 用試薬もラインナップ
- RNA抽出試薬「ISOGEN/-LS」に mRNA 精製キットがセットになった「ISOGEN/-LS　Poly(A)$^{+}$ Isolation Pack」を掲載

〔目 次〕

**Buffer**
**PCR**
**Cloning and Modification**
　Restriction Endonuclease
　Modifying Enzyme
　DNA Substrate and Vector
　Other
**Gene Transfer**
**DNA Sequencing**
**Primer**
**Electrophoresis**
　Marker
　Agarose
　Polyacrylamide and Dye
　Apparatus
**DNA Array**
**Hybridization**
**DNA and RNA Extraction**
　Invitek GmbH
**Library**
　Cap Site Technology
　RNA and DNA
　BioChain, Inc.
**DNA and RNA Synthesis**
**Proteome Analysis**
　Protein Extraction
　Protein Purification
　Protein Refolding Reagent
　Protein Analysis
　Two-hybrid System
　Structural Analysis
**Apoptosis**
**Custom Service**
**Biotechnology Educational Kit**
**GMO Detection**
**Others**
**Manuals**
**Appendix**
**Index and Price List**

**第 25 回 日本分子生物学会年会**

## バイオテクノロジーセミナーのご案内

当社では、12 月 11 日よりパシフィコ横浜で開催されます第 25 回日本分子生物学会年会のバイオテクノロジーセミナーで、amaxa 社 Nucleofector™ システムを中心とした遺伝子導入に関するセミナーを行う予定です。是非ふるってご参加下さい。（当日は軽食を用意しております。）

◆**開 催 日**：平成 14 年 12 月 12 日（木）12:00 ～ 13:30
◆**会　　場**：B 会場
◆**演題番号**：BT-2B

※詳しくは資料請求カードにてお問合せ下さい。

# 生体試料前処理用 HPLC カラム

## ワコーパック® Pre-Clean4.0

本品は、粒子径 30μm の親水性逆相型ポリマー系充てん剤を使用した、カートリッジタイプの HPLC 用カラムです。生体試料、血清中の成分・薬物分析における前処理カラムとして使用できます。

〔特　長〕

1. 親水性化合物の保持が大きく、タンパク成分との分離に優れる
2. カラムの劣化が少なく、耐久性に優れる
3. 安価なカートリッジタイプ

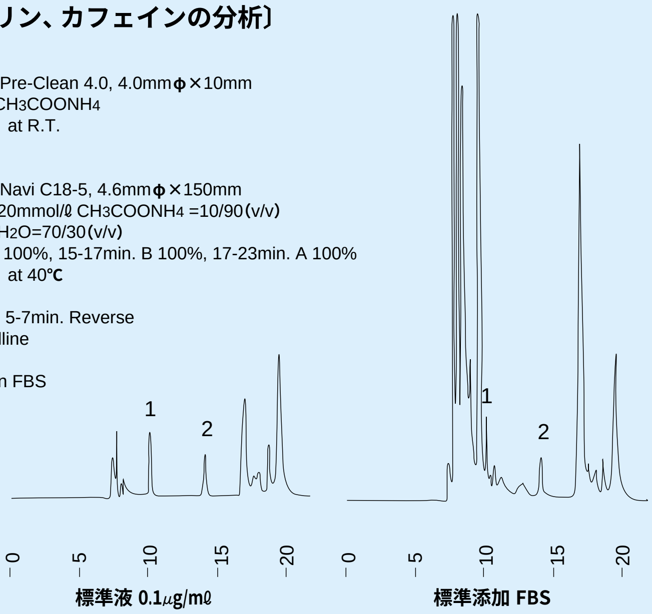
〔参考資料〕

和光純薬時報 Vol.70, No.3, p.14(2002).

〔血清中テオフィリン、カフェインの分析〕

Pretreatment conditions
Column　：Wakopak® Pre-Clean 4.0, 4.0mmφ×10mm
Eluent　：20mmol/ℓ $CH_3COONH_4$
Flow rate　：0.7mℓ/min.　at R.T.

Analytical conditions
Column　：Wakopak® Navi C18-5, 4.6mmφ×150mm
Eluent　：A)$CH_3CN$/20mmol/ℓ $CH_3COONH_4$ =10/90(v/v)
B)$CH_3CN/H_2O$=70/30(v/v)
0-15min. A 100%, 15-17min. B 100%, 17-23min. A 100%
Flow rate　：1.0mℓ/min.　at 40℃
Detection　：UV 270nm
Column switching time：5-7min. Reverse
Sample　：①Theophylline
②Caffein
0.1μg/mℓ　in FBS
Inj.vol.　：100μℓ




| コード No. | 品　名 | 規　格 | 容　量 | 希望納入価格(円) |
|---|---|---|---|---|
| 295-40551 | Wakopak® Pre-Clean4.0(4.0mmφ× 10mm) | HPLC 用 | 2 本 | 36,000 |
| 291-40651 | Wakopak® Pre-Clean Cartridge Holder | HPLC 用 | 1 本 | 18,000 |

# 分析試料前処理用 固相抽出カラム

EU において輸入食品や医薬品・医薬品原料などから抗菌性物質が検出されたことにより、国内でも輸入品の一部についてモニタリング検査の対応が求められています。

これらの分析法にはすでに畜水産中の残留抗生物質の分析と同様な方法が用いられます。今回、その分析法に用いられる前処理用固相カラムなどをご紹介します。

〔固相抽出カラム使用例〕

試　料
　緩衝液・有機溶媒
　遠心操作
↓
C18固相抽出カラム
↓
COOH固相抽出カラム
↓
抗菌活性試験、HPLC試験など

Precep-C

Bakerbond

spe カラムプロセッサー

## ■固相抽出カラム

| コード No. | 品　名 | 規　格 | 容　量 | 希望納入価格(円) |
|---|---|---|---|---|
| 292-32251 | Presep-C C18(ODS) | 試料前処理用 | 0.9g/ 個× 50 個入り | 25,000 |

J.T.Baker Right from the Start.

| コード No. | メーカーコード | 品　名 | 容　量 | 希望納入価格(円) |
|---|---|---|---|---|
| 568-20011 | 7020-1 | Bakerbond オクタデシル(C18) | 1mℓ(100mg)　×　100 本入り | 26,000 |
| 566-20012 | 7020-2 | Bakerbond オクタデシル(C18) | 3mℓ(200mg)　×　50 本入り | 18,300 |
| 564-20013 | 7020-3 | Bakerbond オクタデシル(C18) | 3mℓ(500mg)　×　50 本入り | 20,200 |
| 562-20014 | 7020-6 | Bakerbond オクタデシル(C18) | 6mℓ(500mg)　×　30 本入り | 13,800 |
| 560-20015 | 7020-7 | Bakerbond オクタデシル(C18) | 6mℓ(1,000mg) ×　30 本入り | 19,200 |

〔次頁に続く〕

| コード No. | メーカーコード | 品　名 | 容　量 | 希望納入価格(円) |
|---|---|---|---|---|
| 569-20161 | 7211-1 | Bakerbond カルボン酸(COOH) | 1mℓ(100mg)　×　100 本入り | 34,600 |
| 567-20162 | 7211-3 | | 3mℓ(500mg)　×　50 本入り | 29,900 |

＊その他、各種官能基を結合した固相抽出カラムを取揃えています。お問合せ下さい。

## ■固相抽出カラム減圧システム

| コード No. | メーカーコード | 品　名 | 容　量 | 希望納入価格(円) |
|---|---|---|---|---|
| 569-20281 | 7018-00 | spe-12G カラムプロセッサー(12 本カラム処理用) | 1 台 | 125,000 |
| 566-20291 | 7208-00 | spe-24G カラムプロセッサー(24 本カラム処理用) | 1 台 | 180,000 |

## ELMEX アクアテストⅡ ATB-50

**★上水試験方法収載のピルビン酸添加 X-Gal･MUG 培地**
**★水中の大腸菌群･*E.coli* 及び損傷大腸菌群を 24 時間で検出**
**★試験管の要らない 50mℓ 分包タイプ**
**★安価:250 円 /50mℓ(1 検体)**

### 〔特　長〕

- **水中の大腸菌群と *E. coli* を同時に検査**
  発色及び発光酵素基質を使用しています。
- **損傷菌の判定も、24 時間**
  上水試験方法収載の、ピルビン酸添加 X-Gal･MUG 培地です。
- **試験管は要りません**
  樹脂製バッグに、調製済粉末培地が密封されています。
  バッグを開封して、検水を入れるだけで検査が開始できます。
  面倒な前準備や後作業が無いため、省力効果は抜群です。
- **目視判定が容易**
  樹脂製ボトルや試験管に比べて、発色と発光が明瞭に観察できます。
- **使う人の身になった設計**
  培養後はバッグごとオートクレーブ滅菌し、そのまま廃棄ができます。
  保管場所も、驚くほど省スペースで済みます。

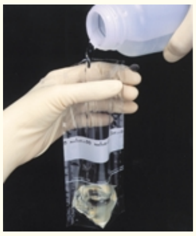
### 〔AquaTest Ⅱ 組成表〕

| | | | |
|---|---|---|---|
| ペプトン | 5.0 g | りん酸水素二カリウム | 4.0 g |
| 塩化ナトリウム | 5.0 g | りん酸二水素カリウム | 1.0 g |
| 硝酸カリウム | 1.0 g | X-Gal | 0.10g |
| ピルビン酸ナトリウム | 1.0 g | MUG | 0.10g |
| ラウリル硫酸ナトリウム | 0.10g | IPTG | 0.10g |

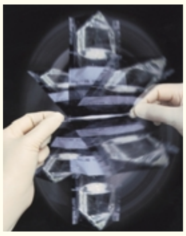
当組成は、2001 年改訂上水試験方法の糞便性指標である大腸菌群及び大腸菌の試験方法として収載された特定酵素基質培地法に基づくものです。

### 〔使用方法〕

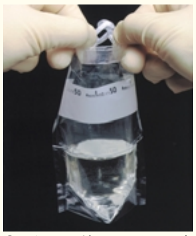
① ノッチ部から、袋を開封します。



② 袋上部のバンド両端を指で持ち、内側に押すようにして袋を開口し、検水 50mℓ を注入します。袋の上から培地を揉みほぐして溶解します。



③ バンド両端を両手で外側に引くように持ち、袋を回転させて巻きつけます。



④ バンド両端をロックして密封します。

⑤ 孵卵器で培養(36 ± 1℃ 24 時間)します。淡黄色の培地が青く変色すれば大腸菌群陽性です。紫外線($\lambda$ = 366nm)を照射して蛍光を発すれば *E.coli* 陽性です。

| コード No. | メーカーコード | 品　名 | 容　量 | 希望納入価格(円) |
|---|---|---|---|---|
| 308-13201 | ATB-50 | AquaTest Ⅱ　ATB-50 | (50mℓ 用× 5 バッグ)× 20 | 25,000 |

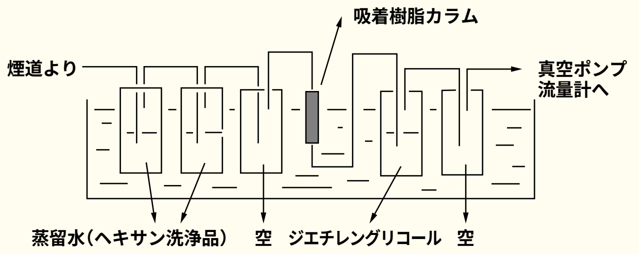
### 〔関連商品〕

| コード No. | メーカーコード | 品　名 | 容　量 | 希望納入価格(円) |
|---|---|---|---|---|
| 307-13411 | ATB-50C | AquaTest Ⅱ ATB-50 用　コンパレータ | 1 本 | 2,000 |
| 309-09441 | BL-02 | ミニブラックライト蛍光ランプ | 1 台 | 5,600 |
| 300-09471 | BL4BLB | ミニブラックライト用交換用ランプ | 1 本 | 1,700 |
| 304-13421 | PXR-01 | 収納ラック | 1 ラック | 5,000 |

## ジエチレングリコール
### ダイオキシン類分析用

ダイオキシン類は、主に産業廃棄物及び焼却場等の排ガスから排出されています。下記に示す装置で排ガス中のダイオキシン類をサンプリングする際に、ジエチレングリコールは使用されます。本品は、ダイオキシン類分析適合性試験を行い、ダイオキシン類が低濃度であることを保証しておりますので、安心してご使用いただけます。

〔排ガス等のダイオキシン類をサンプリングする装置の１例〕




**●ダイオキシン類分析適合性試験**

| | | |
|---|---|---|
| ダイオキシン類 | 4～6 塩素化物 | 5pg/ℓ 以下 |
| | 7, 8 塩素化物 | 25pg/ℓ 以下 |
| ジベンゾフラン | 4～6 塩素化物 | 5pg/ℓ 以下 |
| | 7, 8 塩素化物 | 25pg/ℓ 以下 |
| コプラナー PCB | 2, 3', 4, 4', 5-PCB | 100pg/ℓ 以下 |
| | その他 Co-PCB | 50pg/ℓ 以下 |

| コード No. | 品　名 | 規　格 | 容　量 | 希望納入価格（円） |
|---|---|---|---|---|
| 040-28645 | Diethylene Glycol | ダイオキシン類分析用 | 500mℓ | 3,000 |

〔関連商品〕

| コード No. | 品　名 | 規　格 | 容　量 | 希望納入価格（円） |
|---|---|---|---|---|
| 040-27481 | DIOXIN TRAP BEADS | ダイオキシン類分析用 | 200g | 25,000 |
| 040-28081<br>046-28083 | Distilled Water, Hexane Washed | 残留農薬試験用 | 1ℓ<br>3ℓ | 2,250<br>5,000 |

フリーダイヤル：0120-052-099
フリーファックス：0120-052-806

## 環境分析用溶媒　品目追加！
## Methyl Acetate
### 環境分析用

ご好評いただいている環境分析用溶媒に今回新たに、酢酸メチルを追加しました。

環境分析用溶媒類は、内分泌攪乱化学物質（フタル酸エステル類、アルキルフェノール類等）の濃度を測定し、実用上問題ないとされている低濃度を保証しております。内分泌攪乱物質類の分析に安心してお使いいただけます。

**〔規　格〕**

**含量（cGC）**：98.0％以上

**密度（20℃）**：0.928 ～ 0.935g/mℓ

**内分泌攪乱物質分析適合性**：試験適合

**134-14285**　500mℓ　**4,000 円**

〔関連商品〕

| コード No. | 品　名 | 規　格 | 容　量 | 希望納入価格（円） |
|---|---|---|---|---|
| 018-17815 | Acetone | 環境分析用 | 500mℓ | 1,900 |
| 015-17825 | Acetonitrile | 環境分析用 | 500mℓ | 2,600 |
| 041-28055 | Dichloromethane | 環境分析用 | 500mℓ | 2,600 |
| 043-28375 | Dichloromethane | エストラジオール分析用 | 500mℓ | 2,700 |
| 048-28065 | Diethyl Ether | 環境分析用 | 500mℓ | 4,200 |
| 055-06895 | Ethanol | 環境分析用 | 500mℓ | 4,000 |
| 084-07985 | *n*-Heptane | 環境分析用 | 500mℓ | 4,000 |
| 085-07655 | *n*-Hexane | 環境分析用 | 500mℓ | 1,800 |
| 135-13855 | Methanol | 環境分析用 | 500mℓ | 1,800 |

E-mail　labchem-tec@wako-chem.co.jp
URL　http://www.wako-chem.co.jp

**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、医療用等他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10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