



DOJIN NEWS

ドージンニュース

No.089/1998

Review

電流検出による酸の計測 楠 文代

Topics on Chemistry

臨床化学分析における免疫学的測定法 溝口 誠

連載

試料の前処理12

大倉洋甫



目次

Review

電流検出による酸の計測

東京薬科大学薬学部 楠 文代.....	3
試料の前処理 大倉洋甫.....	8

Topics on Chemistry

臨床化学分析における免疫学的測定法

(株)同仁化学研究所 溝口 誠.....	11
----------------------	----

Commercial

新製品案内

新規水溶性POD基質.....	14
超高感度酸化発色試薬.....	14
分子生物学電気泳動用アガロース.....	15
HPLCによる高感度アルミニウム測定試薬.....	16
環境ホルモン研究関連試薬.....	18
近日発売	
水溶性セレンテラジン.....	19

お知らせ

9thフォーラム・イン・ドージン開催報告.....	20
---------------------------	----

新製品案内

1. **新製品** 新規水溶性POD基質

コード番号	品名	容量	価格(¥)
Request	SAT-3	1g	9,800

2. **新製品** 超高感度酸化発色試薬

コード番号	品名	容量	価格(¥)
Request	TPM-PS	100mg	12,800

3. **新製品** AI測定用試薬

コード番号	品名	容量	価格(¥)
Request	Aluminum detection kit	1kit	45,000

4. **新製品** 分子生物学電気泳動用アガロース

コード番号	品名	容量	価格(¥)
341-07842	Agarose 900	25g	4,000
343-07841		100g	11,000
344-07832	Agarose 1500	25g	4,000
346-07831		100g	11,000
340-07851	Agarose LM200	10g	8,000
346-07853		50g	29,000

5. **新製品** 環境ホルモン研究関連試薬

コード番号	メーカーコード	品名	容量	価格(¥)
303-06161	KH003	コイビテロジェニン ELISA キット (96穴用)		90,000
300-06811	KH004	コイビテロジェニンモノクローナル抗体 (1G2)	100 µg	40,000
304-06831	KH005	マミチヨグビテロジェニンモノクローナル抗体 (3E11)	100 µg	40,000
307-06821	KH007	マダイビテロジェニンモノクローナル抗体 (5A4)	100 µg	40,000



北里柴三郎博士の生家：破傷風の血清治療法の発見でよく知られている、日本が誇る世界的な医学者、北里博士が生まれ、少年の日を過ごした家が、爽やかな風を受けてゆれる小国杉の木立の中に記念館とともに保存されている。

(場所：熊本県小国町北里)

電流検出による酸の計測 Amperometric Determination of Acids



楠 文代
(Fumiyo KUSU)
東京薬科大学 薬学部

Summary

A new method for determining acids was developed based on measurement of reduction prepeak current of 2-methyl-1,4-naphthoquinone (VK₃) in ethanol solution. The instrumentation by voltammetry, flow injection analysis (FIA) with electrochemical detection and High-performance liquid chromatography (HPLC) with electrochemical detection was capable of measuring acids. Prepeak height on the voltammogram obtained in ethanol solution containing acid, 3 mM VK₃ and 38 mM LiClO₄ was found to be linearly related to acid concentration at 8 μM to 6 mM. FIA response was linear between 25 to 1500 pmol of acid. FIA was found not only sensitive, but also to be simple and rapid. Acid values of fats and oils, titrable acidity of coffee, and enzyme activity of lipase were determined. Free fatty acids in a soya bean oil were determined by HPLC using an ODS column, the mobile phase of ethanol-acetonitrile (10:90) mixture, and a VK₃ ethanol solution containing LiClO₄. The present method is practically useful for acid determination of samples in various fields.

1. はじめに

一般的な酸の測定としては、ガラス電極を指示電極とする電位差測定によるpH測定法と、アルカリによる中和滴定法が知られている。しかしながら、前者では酸塩基平衡 ($\text{HA} \rightleftharpoons \text{H}^+ + \text{A}^-$) における H^+ の平衡濃度すなわち酸性度が、また後者は HA と H^+ のそれぞれの平衡濃度の和が測定の対象であって、計測の目的に応じて両者が使い分けられている。狭義の意味で酸の定量とは、後者の総酸濃度の測定を指している。中和滴定は多くの分野で利用されており、終点決定には特に指示薬や電位差測定が繁用されている。中和滴定は、強酸の試料、日本薬局方収載医薬品のような比較的高純度の試料では、高精度に定量できる。しかしながら、低濃度の弱酸、複数の酸を含む試料あるいは着色試料では、指示薬誤差を生じることがある。また、微量の試料を測定対象とする場合、中和滴定法が感度の点で必ずしも満足できる方法とは言い難い。また、アルカリ標準液を用いて滴定により求めた試料溶液の酸度を滴定酸度と呼び、実用的な分析法として知られる。この場合は HA と H^+ の総酸のみならず、試料に含まれる樹脂やタンパク質のような有機物への結合酸、あるいはアルカリによる加水分解を受けるエステル等を含むアルカリ消費物質の総和を表わす量であって、真の酸の濃度を示すものではない。

キノンは水あるいは2-メトキシエタノール中で還元されてヒドロキノンとなるが、酸が共存するとポーログラムに還元前置波を生じる¹⁾。この還元前置波を用いることで、ポーログラフイーにより硝酸、硫酸、酢酸などの微量の酸が定量できることが1960年代に示された^{2,3)}。また1974年高田らはp-ベンゾキノンを用いた電流検出法によりカルボン酸の定量を行った⁴⁾。しかしながら、これらの方法は、実用的計測にその後進展しなかった。そこで我々は、キノンの電解を利用した酸の測定を基にして、従来法の中和滴定の難点を回避でき、かつ信頼性、実用性、汎用性の高い微量酸の新規定量法を開発し、その応用を図った。

2. キノンの還元前置波

一般にキノンは光に対して不安定であり、この傾向は、ベンゾ

キノンで著しい。一方、芳香環数の多いほど還元電位は負電位となり、水溶性に乏しくなる。従って、酸定量法の確立を目的とする本研究では、キノンとしてビタミンK₃ (2-methyl-1,4-naphthoquinone, VK₃)、溶媒としてキノンの溶解度が大きい両性溶媒で、容易に入手できる、エタノールを用いた。ビタミンK₃と微量の酸とが共存する系について、グラッシーカーボン電極を用いて電解を行った。Fig. 1には、38 mM LiClO₄を含むエタノール溶液中で得たVK₃のみ(曲線a)およびVK₃とドコサヘキサエン酸(DHA)共存系(曲線b)のポルタモグラムを示した。曲線aにはキノンからヒドロキノンへの還元反応に基づく明瞭な還元波が見られる。酸が存在する曲線bでは、VK₃の還元波よりもさらに正電位側に新しい波が現れ、これを還元前置波と呼んでいる。同様な現象は、プロモ酢酸、ギ酸、酢酸、ノナン酸、パルミチン酸、オレイン酸、リノール酸、リンゴ酸、クエン酸、クロロゲン酸などの種々の酸の共存時にも見られる。Fig. 2にはそれらの酸の数列を示した。

酸の当量濃度がVK₃濃度の2倍以下の条件下では、還元前置波の波高(i_H)は酸の濃度に比例する(Fig. 3)。また還元前置波は強い酸ほど正側の電位に現れた。この様子を、Fig. 4に還元前置波の半ピーク電位($E_{p/2}$)と水溶液中の酸解離定数 K_a (K_{a1})の関係として示した。従って高級脂肪酸のような弱酸であっても、還元前置波の波高の計測から微量酸の定量が可能である^{5,6)}。

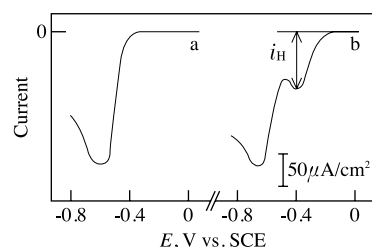


Fig.1 Voltammograms of 3.0 mM VK₃ with (a) 0 M and (b) 2.6 mM DHA obtained in 38 mM LiClO₄ ethanol solution. Working electrode, glassy carbon; scan rate, 5 mV/s. i_H = prepeak height.

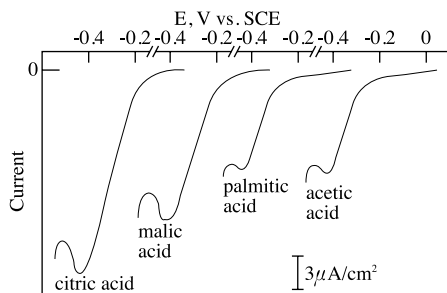


Fig. 2 Prepeaks of VK_3 in the presence of various acids obtained in 38 mM $LiClO_4$ ethanol solution.

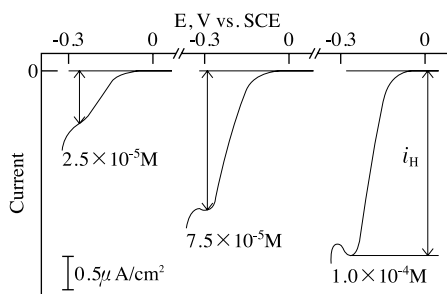


Fig. 3 Prepeaks of VK_3 in the presence of linoleic acid at various concentration obtained in 38 mM $LiClO_4$ ethanol solution.

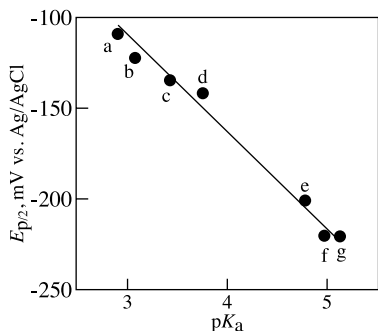


Fig. 4 Relation between half-peak potential and pK_a of acids.

3. 酸の測定装置

酸の測定は、ボルタンメトリーあるいはフロー型電気化学検出を用いて行う。フロー型電気化学検出では、アンペロメトリー検出器を、簡易迅速な自動計測が可能なフローインジェクション分析 (FIA) と分離定量が可能な高速液体クロマトグラフィー (HPLC) の2つのシステムの検出部として組み込み、これにより酸を定量した。

ボルタンメトリーでは、Fig. 5の装置を用いて、作用電極にグラッシーカーボン電極を、電解質溶液として3.0 mM VK_3 を含む38 mM $LiClO_4$ のエタノール溶液を用いて、3電極式電位走査法で行った。初回の測定に先立ち、グラッシーカーボン電極表面をアルミナで研磨後、蒸留水およびエタノールで超音波洗浄してから用いた。測定溶液に酸素が溶存した場合、還元波が生じる可能性がある。38 mM $LiClO_4$ エタノール溶液中で、その $E_{p/2}$ は VK_3 の還元

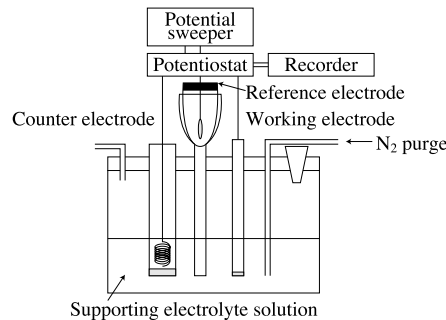


Fig. 5 Instrumental configuration for voltammetry.

波よりもかなり負の電位であるが、 -0.3 V vs SCE 付近の還元前置波の波高測定を精度良く行うには、測定溶液中の除酸素が必要である。 VK_3 に代えて易還元性のキノンを用いると除酸素の操作は省略できる。通常のボルタモグラムの測定では、0 V から -0.4 V vs SCE の電位範囲を5 mV/sの速度で掃引した。リノール酸のボルタンメトリーによる定量では、 $8.0 \times 10^{-6} \sim 6.0 \times 10^{-3}$ Mの範囲において濃度と電流 i_H は良い直線性 ($r = 0.992$) を示し、 1.0×10^{-4} Mの酸濃度で得た i_H の相対標準偏差 (R.S.D.) は、1.1% ($n = 10$) であった^{5,6}。

FIA装置には、Fig. 6のように、内径0.5 mmテフロンチューブ、ポンプ、サンプルインジェクター (5 μ l)、アンペロメトリー検出部からなる一流路系の装置を作製し、キャリアー溶液には VK_3 溶液を用いた。低速用ポンプを用いて流速は0.6 ml/min とした。アンペロメトリー検出セルは、作用電極にグラッシーカーボン、対極にはステンレススチール、参照電極には銀 - 塩化銀電極あるいはSCEから構成し、有効セル容量は数 μ l とした。これにはグラッシーカーボン電極を組み込んだ市販の電気化学検出セルを利用することもできる^{7,8}。リノール酸溶液5 μ l を試料として注入して測定したFIAシグナルの例を、Fig. 7に示した。シグナルの再現性は良好であり (R.S.D. = 1.4%, $n = 10$)、1時間あたり60検体の測定を可能とした。FIAシグナルと酸量の間には、25 ~ 1500 pmolの範囲において良い直線関係 ($r = 0.998$) を得た^{7,8}。

電気化学検出HPLCシステムでは、市販の高速液体クロマトグラフィー (HPLC) 用ポンプ2基を用いて、カラムを用いた分離系と VK_3 溶液の送液系との2流路系とした。概略をFig. 8に示す。高級脂肪酸分離のため、カラムにはODS、溶離液はエタノールとアセトニトリルの混合液、キノン溶液は6 mM VK_3 と76 mM $LiClO_4$ を含むエタノール - アセトニトリル混合液とした。これらの液はデガッサーを用いて除酸素を行って、送液した。検出部分はFIAと同様の構成である⁹。

4. 油脂の酸価測定^{5,12)}

遊離脂肪酸の含量は、酸価と呼ばれる指標で表わされ、油脂の性質や品質を表すために食品、医薬、工業などの分野で重要視されている。酸価は油脂試料1 gを中和するのに要する水酸化カリウムのmg数と定義されており^{10,11)}、従来の測定法は、フェノールフタレインを指示薬とする水酸化カリウムのエタノール液による

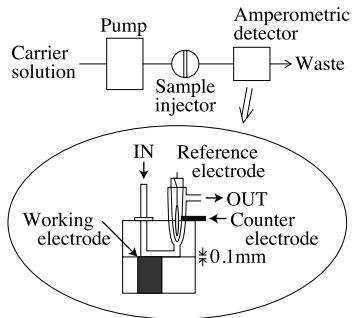


Fig. 6 FIA system with amperometric detection for determining acids.

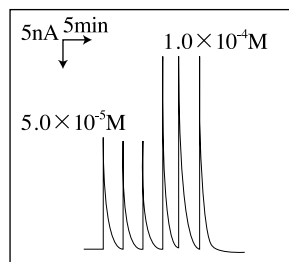


Fig. 7 Flow signals obtained with linoleic acid at -0.33 V vs. Ag/AgCl. Injection volume, 5 μ l; flow rate, 0.6 ml/min; carrier solution, ethanol containing 38 mM LiClO₄ and 3.0 mM VK₃.

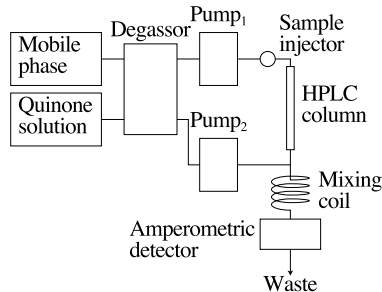


Fig. 8 HPLC system with amperometric detection for determining acids.

中和滴定が用いられてきた。ここではキノンの還元前置波の波高計測から油脂に含まれる微量の遊離脂肪酸を定量し、これより酸価を算出した。

油脂の構成脂肪酸として、植物油中ではパルミチン酸、ステアリン酸、オレイン酸、リノール酸、リノレン酸の高級脂肪酸が、また、魚油については、これらに加えてエイコサペンタエン酸 (EPA) やDHAが多く含まれている。従って油脂中の遊離脂肪酸は、ほとんどがこのような高級脂肪酸である。VK₃ のエタノール溶液にこれらの高級脂肪酸を添加すると、いずれの酸も同一の電位に還元前置波が現れて、単位濃度当たりのピーク高さはほぼ等しい。このため複数の遊離高級脂肪酸が存在しても、ボルタモグラムには一段の還元前置波が得られ、この波高は油脂中の遊離脂肪酸の総濃度に比例する。そこで、ボルタンメトリーおよびFIAにより、油脂の酸価測定を行った。

まず、油脂試料のエタノール溶液をLiClO₄ を支持電解質としたVK₃ を含むエタノール溶液に加えて、除酸素後、0Vから -0.4Vま

で5 mV/sの掃引速度で電位走査してボルタモグラムを測定した。次に、高純度のパルミチン酸あるいはリノール酸を酸の標準液として用いて、電解セル内に添加し、同様にボルタモグラムを測定した。この2つの還元前置波の波高から標準添加法により、油脂の酸価を算出した。

$$\text{酸価} = \frac{I_1 \times C \times V_1 \times 56.11}{(I_2 - I_1) \times V_2 \times W} \quad (1)$$

ここで、 I_1 および I_2 : 試料および酸標準液添加後の還元前置波の電流値 (μ A) V_1 および V_2 : セル内の試料溶液および標準酸の添加後の溶液の体積 (ml) C : 酸標準液の濃度 (mM) W : 油脂試料の採取量 (g) である。

FIAによる油脂酸価の測定では、まず、検出電位 -330 mV vs. Ag/AgCl、流速 0.6 ml/min において、酸標準液を用いた検量線を作成する。油脂の試料はキャリア液と同じ組成のVK₃ エタノール溶液 1 ml に溶解して試料溶液とした。VK₃ エタノール液に混じり合わない油脂の場合、試験管内の両者をミキサーで充分攪拌してエタノール相中に遊離脂肪酸を移行させた後、遠心分離し、その上清を試料溶液とした。FIA装置には5 μ lの試料溶液を注入して、電流のFIAシグナルを記録し、これより遊離脂肪酸の濃度を求めて、酸価に換算した。

FIAおよびボルタンメトリーにより求めた油脂試料の酸価測定例をTable 1 に示す。表には、従来法であるフェノールフタレイン指示薬および電位差法による中和滴定より求めた酸価も示した。測定値はいずれもかなり近い値ではあったが、詳細に検討すると、本法と滴定法の値がほぼ一致する例と、指示薬法の場合に多少の指示薬誤差を生じる例があった。

Fig. 9 に (A) ツバキ油および (B) さんま油を試料として、水酸化カリウムのエタノール溶液で滴定したときの滴定曲線を示した。図中の矢印 a はフェノールフタレイン指示薬法による終点、矢印 b は電位差法による終点、矢印 c はFIAで求めた遊離脂肪酸の量を水酸化カリウムの消費量として換算した点に相当する。ツバキ油では a、b、c の三点が一致した。さんま油の場合は、b と c は一致したが a の指示薬の変色点は電位差滴定曲線の pH 飛躍を過ぎている点であった。このことは、指示薬を用いる従来法では必ずしも適正な当量点を反映していないことがあり、また電位差滴定およびFIAの結果の一致から本法が信頼できる酸価測定法であることを、示すものであろう。精度の点ではFIAが電位差滴定法よりも若干優れていた¹²⁾。

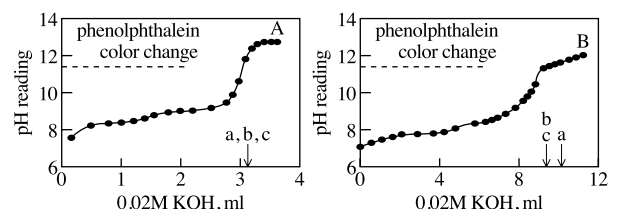


Fig. 9 Potentiometric titration curves for free fatty acids in (A) camellia oil, (B) saury oil. Arrow a indicates the end-point by phenolphthalein color change. Arrow b indicates the potentiometric end-point break. Arrow c shows the volume of 0.02 M KOH corresponding to the acid value determined by FIA.

Table 1 Comparison of the data of acid value of fats and oils obtained by FIA, voltammetry and titration.

Sample	FIA		Voltammetry		Titration			
	Acid value	R.S.D. ^b	Acid value	R.S.D. ^b	Potentiometry		Color Change ^a	
		(%)		(%)	Acid value	R.S.D. ^b	Acid value	R.S.D. ^b
Camellia oil	2.2	1.9	2.2	1.9	2.3	2.0	2.3	2.3
Cacao butter	2.4	2.0	2.3	2.0	2.3	2.7	2.4	4.7
Glycerol monoesterate	0.84	1.0	0.90	1.2	0.90	1.5	1.0	3.7
Mentha oil	0.20	1.3	0.23	2.4	0.20	2.5	0.22	3.4
Corn oil	0.14	0.54	0.13	1.3	0.13	2.4	0.16	4.8

^ausing phenolphthalein indicator

^bn = 5

本法は従来法よりも高感度であるので、試料の必要量について比較してみると、Table 1 ような酸価の小さい試料の場合、従来法では1回の測定当たり20gであるが、ポルタメトリーでは0.5g、FIAでは0.02g程度である。肝油および精製魚油加工品を試料とし、製剤学で安定性を比較的短期に予測するために行われる加速試験として、FIAによる酸価測定を利用した実験を行った。Fig.10には、油脂を40%湿度75%の容器内に保存し、1週間ごとに酸価を測定した結果を示した。この場合には1試料あたり数100mgで測定できたが、もしも従来法であれば200g以上を必要としそれに伴って保存容器も拡大する。このようにFIAを用いると、油脂の安定性を長期に亘って経時的に追跡する場合などには、特に有利である¹²⁾。

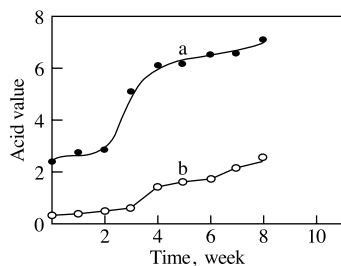


Fig. 10 Effect of time elapsed on acid values of (a) fish oil and (b) cod liver oil. The stability of oils was tested at humidity of 75 % and 40 °C.

5. コーヒーの滴定酸度の測定¹³⁾

コーヒーやジュースなどの飲料には種々の有機酸が含まれており、酸の含量が味や品質の確保に重要な指標であるために、製造過程ではこれらの飲料の品質管理に酸の測定を行っている。酸含量を示すのに一般的に、滴定酸度が用いられており、これは中和滴定法によるアルカリ消費量を表している。ここでは飲料の例としてコーヒーについてFIAによる酸定量を紹介する。

コーヒー豆の細粉と蒸留水からコーヒーメーカーを用いて入れたコーヒーを試料として、これを3 mM VK_3 と38 mM $LiClO_4$ を含むエタノール溶液で40倍に希釈したものを試料液とした。この液5 μ lをFIA装置に注入して、FIAシグナルを測定した。コーヒーには多種類の酸が含まれているので、酸の総濃度を表すFIAシグナルは、次式で表現される。

$$FIA \text{ シグナル} = \sum K_i C_i \quad (2)$$

ここで、 K_i は試料液中に存在する個々の酸の単位濃度当たりの電流値、 C_i は個々の酸の濃度を表す。

従来法の滴定酸度を、試料50 mlを用いて0.1N NaOH でpH 8.2まで滴定したときのアルカリ消費量より求めて、FIAシグナルと比較したところ、21種類のコーヒー試料について両者の相関係数0.90が得られた。FIAは従来法に比べて、約40万分の1の試料で測定が可能であり、測定時間は約10分の1であった。

Fig.11は、pH 測定、滴定、FIAにより、ハワイコナのコーヒー豆の焙煎時間による酸含有量の変化を調べた結果である。一方、それぞれの焙煎時間のコーヒーについて、ヒトの味覚を利用した酸味についての官能テストで追跡すると、官能テストでは焙煎時間14分が一番強い酸味を感じ、以下15、16、0~11分の順に酸味が低下し、0~11分間の酸味は区別がなかった。このような酸味の官能テストの序列は、FIA シグナルおよび滴定酸度の示す序列とよく一致していた。pH から酸味を評価するのは困難と思われるが、FIA シグナルは官能テストの結果とも良い相関を示して酸味評価の指標となり得ることが分かった。FIA は、従来法に比して高感度で簡易・迅速な計測法であり、多くの飲料の酸度測定に有用であろう。

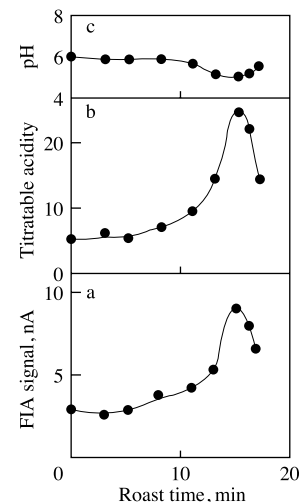


Fig. 11 Effects of roasting time on acidity of coffee extracted using roasted coffee beans (Hawaii Kona).

6. 遊離高級脂肪酸の分離定量⁹⁾

遊離高級脂肪酸の分離定量には、それ自身が発色団を持たないので、プレカラムあるいはポストカラム誘導体化を行いUV検出あるいは蛍光検出HPLCを用いることが多い。電気化学検出HPLCが高感度で選択性に優れ、かつキノンを用いる酸の検出においては誘導体化が不必要な点を考慮すると、本法の電気化学検出HPLCを用いると簡便に高級脂肪酸の分離定量できることが特徴である。

ダイズ油約0.1 ~ 1gを試験管に採り、移動相であるエタノール-アセトニトリル(10:90)液を5 ml添加して溶かして試料溶液とし、この液20 μ lをHPLC装置に注入して、ダイズ油中の遊離高級脂肪酸の分離定量を行った。このときの得られたクロマトグラムを、Fig.12に示す。主な遊離高級脂肪酸は、ダイズ油1gあたりリノール酸 0.51 mol、オレイン酸 0.26 mol、パルミチン酸 0.17 mol、ステアリン酸 0.046 molであった。試料のダイズ油に同等量

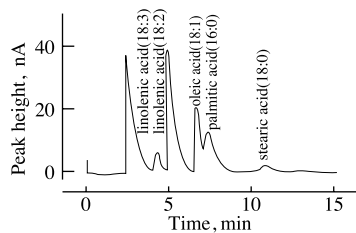


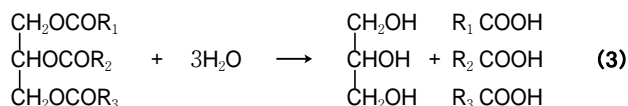
Fig. 12 Chromatogram of soya bean oil. Injection of 20 μ l corresponding 2 mg soya bean oil. HPLC conditions: mobile phase, ethanol-acetonitrile (10:90); quinone solution, 6 mM VK₃ + 76 mM LiClO₄ in ethanol-acetonitrile (10:90); injection volume, 20 μ l; column, LiChrospher 100 RP-18 (250 mm x 4 mm i.d., 5 μ l); flow rate, 1.1 ml/min; applied potential, -415 mV vs. SCE.

の標準リノール酸、オレイン酸、パルミチン酸およびステアリン酸を添加して行った回収実験結果は、90%~98%の良好な回収率を示した。また、R.S.D.は2.5%以下であった。以上のように、本法は試料に移動相を溶かすという簡単な前処理を必要とするだけで、高感度な分離定量が可能であった。

7. 酵素活性測定

FIAは、微量の酸を精度良く測定できるので、酵素反応の結果生じた微量の酸の定量にも適用できるので、血清中のリパーゼの活性測定に用いた。

リパーゼは次式に示すように、基質であるトリグリセリドを加水分解し、脂肪酸を生成する。



オリーブ油15 μ l、水40 μ lおよび0.01 Mリン酸塩緩衝液 (pH 7) 35 μ lを試験管に採り、血清15 μ lを加えて、37、15分間充分かき混ぜながら酵素反応を行い、生じた脂肪酸をエーテルで抽出し、エーテル除去後の残留物を3 mM VK₃と38 mM LiClO₄を含むエタノール溶液 300 μ lに溶かして、この液を検液とした。また、血清を加えた直後にエーテルを加え、検液と同様に調製した溶液を空試験液とした。検液と空試験液 5 μ lをそれぞれFIA装置に注入し、FIAシグナルから活性値を求めた。リパーゼ活性単位は、試料 1 lあたり 1 分間に 1 μ molの脂肪酸を生成する酵素量を 1 U/lと表す。

$$\text{リパーゼ活性値 (U/l)} = \frac{(I_S - I_B) V}{X v t} \quad (4)$$

ここで、 I_S : 検液のFIAシグナル (μ A) I_B : 空試験液のFIAシグナル (μ A)、 X : 酸の標準液 (オレイン酸) 1 MあたりのFIAシグナル (A/M)、 v : 試料採取量 (μ l) V : 全検液量 (μ l) t : 酵素反応時間 (min) である。

市販のコントロール血清を用いて本法と、従来法の一つとして臨床分野で使用されるUV-酵素法により、リパーゼの活性値を測定して比較したところ、両者の相関は0.974であった。試料の量と測定時間の点では従来法が優れていたが、本法はR.S.D. 3%以下で、精度の点で優れていた^{14,15)}。

その他の血清中の酵素活性測定では、コリンエステラーゼの測定も可能であった。基質としてアセチルコリンを用いると真性コリンエステラーゼ、またベンゾイルコリンを用いると真性および偽性コリンエステラーゼの活性測定が行えるので、両者の分別測定にも応用できる¹⁵⁾。

8. おわりに

以上、キノンの電極還元反応を利用した微量の酸の計測について、我々の研究例を紹介した。本法は、キノンとの反応や電極反応への妨害がある際には不都合であるが、従来の中和滴定に比べて感度、精度、自動化などの点で優れた点が多いので、さらに広範な応用が期待できる。また、本測定の基本が電流計測であるので、酸の定量用のセンサー開発も可能である。センサー開発が進展すればさらに実用化が進むであろう。

参考文献

- 1) K. Takamura, Y. Hayakawa, *J. Electroanal. Chem.*, 31, 225 (1971)
- 2) K. Takamura, Y. Hayakawa, *Anal. Chim. Acta.*, 43, 273 (1968)
- 3) J. C. Abbott, J. W. Collat, *Anal. Chem.*, 35, 859 (1963)
- 4) 高田芳矩, 有川喜次郎, *分析化学*, 23, 1522, (1974)
- 5) F. Kusu, T. Fuse, K. Takamura, *J. AOAC Int.*, 77, 1686 (1994)
- 6) 布施哲男, 楠 文代, 高村喜代子, *分析化学*, 44, 29 (1995)
- 7) K. Takamura, T. Fuse, F. Kusu, *Anal. Sci.*, 11, 979 (1995)
- 8) K. Takamura, T. Fuse, F. Kusu, *J. Electroanal. Chem.*, 396, 507 (1995)
- 9) T. Fuse, F. Kusu, K. Takamura, *J. Chromatogr. A*, 764, 177 (1997)
- 10) Official and Tentative Method of the American Oil Chemists' Society, D. Firestone (Ed.) American Oil Chemists' Society, Champaign, IL, Method Cd 3d-63 (1989)
- 11) 日本公定書協会監修: 第十三改正 日本薬局方, 廣川書店, p. B-523 (1996)
- 12) T. Fuse, F. Kusu, K. Takamura, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 15, 1515 (1997)
- 13) T. Fuse, F. Kusu, K. Takamura, *J. Agric. Food Chem.*, 45, 2124 (1997)
- 14) 布施哲男, 楠 文代, 高村喜代子, *分析化学*, 44, 771 (1995)
- 15) K. Takamura, T. Fuse, F. Kusu, *Anal. Sci.*, 12, 343 (1996)

プロフィール

氏名 楠 文代 (Fumiyo KUSU) 49歳
所属 東京薬科大学薬学部第二薬品分析化学教室・教授
〒192-0392 東京都八王子市堀之内1432-1
TEL: 0426-76-4549 FAX: 0426-76-4570
E-mail: kusu@ps.toyaku.ac.jp

出身大学 東京薬科大学薬学部

学位 理学博士

現在の研究テーマ

生体関連物質の分析化学, 電気分析化学

趣味 華道, 雑木林の散策

試料の前処理

12

(株)同仁化学研究所
大倉洋甫

この連載は今回で最終回を迎える。

微量有機化合物の分析における試料の前処理法を概説してきた。主要ターゲットは生体試料中の物質であり、現在最も繁用され、かつここ当分の間なお繁用されるであろうHPLCを最終測定に用いることを念頭においた。

ご参考までに、従來說明した項目とそのドージンニュースにおける所在をあげておこう。

- 1項 はじめに：No.77、11(1995)
- 2項 何のための前処理か：同上
- 3項 サンプリング：No.78、22(1996)
- 4項 前処理法のラインナップ：同上
- 5項 汚染と対策：No.79、12(1996)
- 6項 水づくり：同上
- 7項 液・液抽出：No.81、12(1996)；No.82、19(1996)；
No.83、24(1996)
- 8項 吸着と脱着(固・液抽出、固相抽出を含む)：No.83、24
(1996)；No.84、20(1997)
- 9項 透析：No.85、16(1997)
- 10項 限界濾過：No.86、12(1998)
- 11項 除たんぱく：No.87、10(1998)
- 12項 簡単な分離分析技術利用による荒分け(PC、TLC、LC、
電気泳動の利用)：No.88、7(1998)

13. 試料の濃縮

試料溶液中の目的物質を選択的に濃縮する必要がある場合が多い。

溶液の濃縮を、遠心しながら減圧下に行う遠心減圧濃縮は、突沸による損失や汚染がなく、便利である。減圧遠心機が市販されており、微量容量でも取り扱える。

乾燥空気、窒素、ヘリウムなどのガスを溶液に吹きつけ、溶媒を揮散させる方法もよく使われ、微量試料のときは便利である。

熱不安定生物質の濃縮は凍結乾燥によって行う。勿論これは微量容量でも行える。

濃縮にはまた、固相抽出、荒分け用各種クロマトグラフィー、電気泳動、限外濾過(高分子物質の濃縮に好都合)、微量溶媒による液・液抽出、抽出液の微量溶媒(緩衝液を含む)を用いる逆抽出が役立つ。これらの方法は既に述べた。

試料溶液の濃縮や乾固にロータリエバポレーターを用いる方法が使えるが、微量試料溶液の場合は使用に工夫が必要となる。

14. 誘導体化

言うまでもなく、誘導体化は有機化合物の測定における検出感度と選択性を高めるための主要な前処理の1つである。

これは分離分析において多用され、分析対象物質の分離に好都合で、使用する検出装置に好感度に応答するような誘導体を与える誘導体化試薬や反応によって行う必要がある。

誘導体化では、特定物質に固有の誘導体化を施すことは少ない。特定官能基に選択的な、すなわち、群特異的な誘導体化試薬を使うことが多い。従って易反応性で特徴的かつ好感度検出に有用な各種官能基用の誘導体化試薬が多数開発され、実用されている。このなかで多用されているものについてはキット化されて市販されているものもある。

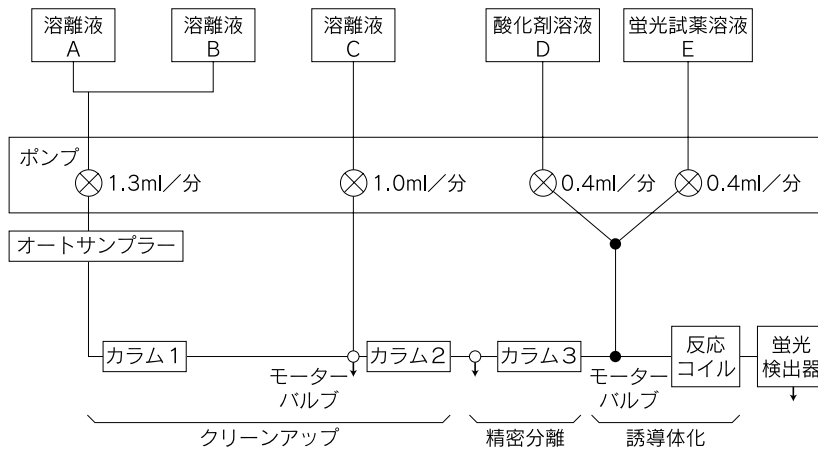
誘導体化は、また、妨害物質の測定への影響を極力減少させる条件を検討して行う。このため、妨害物質や非分析対象物質に対する誘導体化反応の阻害剤や阻害反応条件を検討して利用する。例えば12項で述べたように、アミノ酸が妨害する場合には、 Ni^{2+} 錯体を形成させ、マスキングを行う。

カラムを使う分離分析では、分離前に試料と誘導体化反応に附すプレカラム誘導体化(プレラベル化)と分離後に行うポストカラム誘導体化(ポストラベル化)の2方法の他に、カラム内、特にカラム入口付近で誘導体化を行うオンカラム誘導体化法がある。

プレカラム法は手操作で誘導体化反応が行われることが多く、この場合、生成誘導体が安定であることが要求されるが、反応が迅速であることを要しない。

ポストカラム法とオンカラム法では誘導体化と分離を連続的に行うことがほとんどであるので、誘導体は検出器を通るまで安定であればよいが、誘導体化反応は迅速であることが望ましい。その場合は、誘導体化反応のシステムは自動化HPLCシステムの一部として組み込むことができる。プレカラム法を自動化し、分離を連続的に行う場合もポストカラム法における誘導体化に関する諸要件と同様の要件が求められる。なお、GC及びGC・MS分析では一般にプレカラム法のみが用いられ、極性不揮発性物質を揮発性誘導体に変える。

自動HPLCシステムにおける流路は、コンピューター制御の自動カラムスイッチングにおけるモーターバルブを使用して、その



溶離液 A : 酢酸ナトリウム、過塩素酸ナトリウム及びナトリウムアチドをそれぞれ15mM、15mM及び0.05%含有水溶液
 溶離液 B : 酢酸ナトリウム30mM含有50%アセトニトリル
 溶離液 C : 過塩素酸ナトリウム及びEDTA・2Naをそれぞれ0.2M及び3mM含有5%エタノール水溶液
 酸化剤溶液 D : ヘキサシアノ鉄(III)酸カリウム、しゅう酸カリウム及びほう酸をそれぞれ2mM、10mM及び0.6M含有50%エタノール
 蛍光試薬溶液 E : DPEを60mM含有60%エタノール
 オートサンプラー : 500µlのサンプリング管付き
 カラム 1 : 前処理用; TSK gel Ether-250; 10µm、75×6mm i.d.
 カラム 2 : 前処理用; TSK gel SP-2SW; 10µm、60×4mm i.d.
 カラム 3 : 精密分離用; TSK gel SP-2SW; 10µm、150×6mm i.d.
 反応コイル : 20m×0.5mm i.d.; 90 水浴中
 蛍光検出 : 励起側355nm、発光側470nm

図13-1 生体カテコールアミン自動分析計のフローダイアグラム (ポストカラム蛍光誘導体化HPLCシステム)

切り替えを行う。勿論、手操作によるカラムスイッチングも非ルーチン分析のときは有用である。

HPLCにおいては、紫外可視光吸収基(発色団、UVラベル)、蛍光基(レーザー誘起蛍光、エキシマー蛍光、蛍光偏光解消などにも関与する発蛍光団; 蛍光ラベル)、化学発光基(化学的励起により蛍光を発する化学発光団; 化学発光ラベル)、電極活物質(電極活性団)の目的物質への導入、目的物質の変換が誘導体化としてなされる。

電気化学検出器のうち、ボルタンメトリー検出器や電導度検出器ではなく、クーロメトリー検出器を使うと、ポストカラム誘導体化法における酸化反応器として利用できる。

電気泳動及びキャピラリー電気泳動においても好感度化及び高選択性化のための誘導体化などが研究され、実用されつつある。

ご参考まで、同仁化学研究所が取扱う誘導体化(ラベル化)試薬のリストを本号に収載しておく。

ポストカラム誘導体化を利用した自動化HPLCの例を上げよう。血漿、血清、尿中などのカテコールアミン(アドレナリン、ノルアドレナリン及びドーパミン)を1,2-ジフェニルエチレンジアミン(DPE; 反応式はドージンニュース、No.84、20(1997)参照)によって誘導体化することに基づくもので、これを生体試料の自動前処理と組合せて自動分析計を構成したものである。(T. Iwaeda, K. Kuroki, H. Takahashi, Y. Saitoh, H. Watanabe, Y. Ohkura, to be prepared) 自動分析計のフローダイアグラムを図13-1に示す。

血漿、血清、尿などの生体試料は過塩素酸使用などの適当な方法で除たんぱくする。得た試験液を自動分析計へオートサンプラーを介して導入する。最初にエーテル結合充てん剤を充てんした第1のカラムに、溶離液A(酢酸塩・過塩素酸塩溶液)及びB(酢酸塩含有アセトニトリル)を用いて通す。カテコールアミン及び類似物質以外の成分をカラムスイッチングのモーターバルブの操作により捨てる。次にカテコールアミン含有フラクションをスルホプロピルレジンの強陽イオン交換体を充てんした第2のカ

ラムに溶離液C(過塩素酸塩)を使用して更にクリーンアップする。最後に上記イオン交換体を充てんした第3のカラム(ほぼコンベンショナルサイズ)で溶離液Cを引き続き使用してカテコールアミンを精密分離する。溶出液に自動的に酸化剤溶液D(ヘキサシアノ鉄(III)酸溶液; DPE反応に必要な酸化剤)及び試薬溶液E(DPE溶液)を混合し、反応コイルに導いて蛍光反応を行う。ここで酸化剤の代わりに、クーロメトリー検出器を用いてもよい(H. Nohta et al., J. Chromatogr., 467, 237 (1989))。

上記の操作はすべてコンピューターコントロールされる。カテコールアミンの検出限界は20~40 fmol/注入量(S/N=5)である。血清カテコールアミンのクロマトグラムの例を参考までに図13-2に示す。この自動分析計は更に改良が加えられ、必要な試薬溶液とともに市販されている。なお、DPE反応をプレカラム誘導体化に用いたカテコールアミン分析計も市販されている。

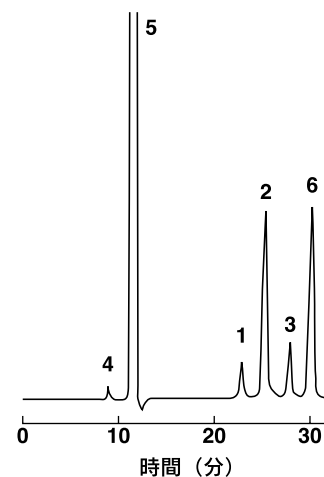


図13-2 正常ヒト血清カテコールアミンのクロマトグラム
 ピーク及び測定濃度 (pmol/ml血清) : 1、アドレナリン(0.53); 2、ノルアドレナリン(1.05); 3、ドーパミン(0.38); 4、5及び6、カテコールアミン代謝物及びカテコール化合物(未同定)

(誘導体化に関する総説、解説が本ニュースの次号以降に掲載される予定である。)

15. その他の方法

LCにおけるクーロメトリー検出器は前項に述べた酸化反応器としてのみならず、妨害物質の酸化還元による不活性化反応器としても活用できる。

共沸混合物形成も必要なら利用することができる。

特に生体試料の場合、共存する妨害物質を特定の酵素を用いる反応によって非妨害物質に変換することも前処理に利用される。

16. おわりに

12回に亘り、主として生体試料をターゲットとする前処理技術を概観した。ここに一括してみると、一昔前からの固相抽出用カートリッジ、微量化に対応した限外濾過器、日本では少し使いにくい事情のある超臨界流体抽出法、溶媒抽出の加圧、加熱による高効率化と微量化、各種高感度高選択的誘導体化試薬、エレクトロニクス・コンピューター利用による処理の自動化などが目ぼしいものである。省力的で低コストの画期的な前処理法の出現を期待する。

本稿で述べた事項は前処理の骨組みに過ぎない。詳細で各論的でかつ理論的な事項は、昨今、いろいろの学会誌が前処理の特集などを載せているので、それらも参照しながら文献をみて欲しい。

最近、ますます超微量分析が要求されるようになった。これは目的物質などによる汚染のない試薬、水を含む溶媒類などを厳しく要求していることになる。

約3年間、本稿におつきあいいただいたかた方に心より厚くお礼申し上げます。内輪で申し訳ないが、同仁化学研究所の本ニュース担当のかた方には深謝する。これらのかた方には、筆者が中国天津に外向していた関係で多大の労力をおかけた。

著者プロフィール

大倉 洋甫 (Yosuke OHKURA)

所属：同仁化学研究所・九州大学名誉教授

昭和28年九州大学医学部薬学科卒、同47年九州大学薬学部教授、平成4年九州大学薬学部長、昭和60年日本分析化学会学会賞受賞。

関連商品

HPLCラベル化剤

アミノ基		容量	価格(¥)
コード番号	品名		
349-03661	FITC (I型)	100mg	2,600
345-03663		1g	13,500
343-03701	NBD-Cl	1g	3,050
342-04751	NBD-F	50mg	11,000
248-04753		100mg	20,300
345-05221	Sulforhodamine 101 acid chloride	10mg	13,600
341-05223		25mg	27,100
342-06711	NIPF	10mg	9,400
340-07091	Phisyl-Cl	10mg	6,450
343-07081	DPS-Cl	10mg	10,200
345-06441	CFSE	25mg	16,650
344-06771	Dimethyl CFSE	25mg	16,650
341-06781	Dichloro CFSE	25mg	16,650
Request	NIR-1	Request	Request
345-05101	DABITC	100mg	3,350
341-05103		1g	17,000
348-05353	DAPDA	500mg	21,200
343-03821	DNBC	1g	3,000
346-03811	SNPA	1g	10,200

SH基		容量	価格(¥)
コード番号	品名		
341-05441	ABD-F	50mg	16,000
347-05443		100mg	25,500
342-04991	SBD-Cl	1g	7,300
348-04993		5g	18,300
349-04761	NAM	50mg	10,100
345-04763		100mg	16,200
342-05111	SBD-F	50mg	13,000
348-05113		100mg	20,400
344-06271	DBPM	10mg	19,550
341-06281	MBPM	10mg	19,550
344-00914	DDD	5g	11,500
Request	NIR-2	Request	Request

アルデヒド基		容量	価格(¥)
コード番号	品名		
344-05551	DDB	50mg	6,450
340-05553		100mg	9,900
342-04491	Fluoral-P	1g	3,850
348-04493		5g	11,200
349-04803	DTAN	100mg	12,800
347-05541	MDB	50mg	6,500
343-05543		100mg	10,200
346-03833	NBHA	500mg	10,200

カルボン酸		容量	価格(¥)
コード番号	品名		
346-05511	Br-DMEQ	10mg	19,000
349-04021	Br-Mmc	100mg	4,300
345-04023		1g	26,200
Request	BHBT	Request	Request
347-03841	NBDI	1g	13,000
341-03981	PBPB	1g	3,350
347-03983		5g	12,600

水酸基		容量	価格(¥)
コード番号	品名		
347-06141	DMEQ-COCl	10mg	19,800
344-06151	OMB-COCl	10mg	27,800

過酸化脂質		容量	価格(¥)
コード番号	品名		
340-07471	DPPP	10mg	8,500
344-05213	DPTBA	1g	12,800

Topics on Chemistry

臨床化学分析における免疫学的測定法

(株)同仁化学研究所 溝口 誠

1. はじめに

臨床検査は病気の診断や治療効果の判断に不可欠な手段である。この臨床検査の中で、人の体液や組織中の成分（酵素を含む）分析を臨床化学検査といい、診断のために行われる検査件数の大部分を占めている。

臨床化学検査には、測定対象成分の量を色素量や発色反応速度として検出定量する方法があり、この方法に用いる試薬を呈色試薬と呼んでいる。

呈色試薬のなかで、無機質分析には、比色分析試薬のキレート生成による呈色を測定するもの、例えば α -クレゾールフタレイン錯体によるカルシウムイオンの分析やバソフェナンスロリン、ニトロソPSAPによる血清鉄の測定がある。また、タンパク分析にはプロモクレゾールグリーン、ヒドロキシアゾ-2-安息香酸などの色素が用いられている。

また、酵素の特異的選択能を利用して血液等の多成分の混合物中から、特定の成分を認識して生じる過酸化水素やNADHを比色定量する方法がある。この方法は、反応が緩和で危険や有害性の試薬を使う必要がない事などから、臨床化学検査の自動化と共に、ここ数十年の間に急速に進歩発展してきたものである。この方法は酵素的測定法と呼ばれ、新トリンダー試薬やテトラソリウム塩が比色定量試薬として用いられている¹⁻⁵⁾。

2. 免疫学的測定法

酵素的測定法を利用した臨床化学分析は、その簡便さから自動化され、大型自動分析機器によって一般検査として行われている。

一方、測定の対象となる生体成分の種類は増え続けており、より高感度の分析や、酵素では認識できない成分の分析に対する要求も高まってきている。新たにその分析が注目されている成分の一部とその測定基準濃度をTableに示す。

Table 新たにその分析が注目されている微量成分

項目	基準値
・ 甲状腺関連項目	
TSH (Thyroid stimulating hormone)	0.3 - 3.5 μ U / ml
T ₃ (Triiodothyronine)	0.8 - 1.8 ng / ml
T ₄ (Thyroxine)	4.6 - 12.6 μ U / ml
・ 産婦人科関連項目 (女性卵胞期)	
LH (luteinizing hormone)	1.8 - 7.6 mIU / ml
FSH (follicle stimulating hormone)	5.2 - 14 mIU / ml
E ₂ (Estradiol)	19 - 255 pg / ml
Progesterone	0.67 ng / ml 以下
Testosterone	0.1 - 0.9 ng / ml
・ 腫瘍マーカー	
AFP (α -fetoprotein)	20 ng / ml 以下
PSA (prostate specific antigen)	11.7 ng / ml 以下
CEA (carcinoembryonic antigen)	5.0 ng / ml 以下
Ferritin	10 - 190 ng / ml
IAP (immunosuppressive acidic protein)	50 - 300 μ g / ml
・ 炎症マーカー	
CRP (C-reactive protein)	350 ng / ml 以下
SAA (serum amyloid A protein)	8 μ g / ml 以下

その他、肝炎関連検査、アレルギー検査、自己免疫検査、感染症検査 など

これらは、これまで酵素的測定法等により測定されてきた生体成分とは異なり、極端に濃度が低い事が特徴である。この場合、

免疫学的測定法、つまり抗体を用いた分析法が用いられる。これは、抗原抗体反応を利用して、抗原となる対象成分を抗体で認識させ、その抗体の量を光学的に検出する方法である。

抗原を認識した微量の抗体を検出するためには、抗体自体を高感度に検出できる化合物で標識しておかなければならない。標識体として蛍光物質や金コロイド等を用いた場合は、抗体に直接それらの標識体を結合させてその蛍光量や吸光度を測定する。一抗体に標識できる標識体の量は限られており、分析対象が微量の場合、検出が困難である。また、放射性物質を標識体として用いるラジオイムノアッセイ (RIA) は、比較的高い感度が得られるが、被曝の恐れがある上、取り扱うには特別な施設が必要である。

そこで、これらの標識体の代わりに、ペルオキシダーゼ (POD)、アルカリフォスファターゼ (ALP) 等の酵素を標識して、基質を加えてやれば、その酵素活性により継続的に反応し、酵素が失活するまで色素を生産し続けるので、一分子の標識体と比べると格段に高い感度を得る事ができる。

この方法はエンザイムイムノアッセイ (以下EIAと略す) と呼ばれ、抗原抗体反応を標識酵素の活性によって定量的に追跡し、抗原あるいは抗体を測定する方法の総称である。非放射性イムノアッセイ法の中では、最も感度の高い方法の一つとされている。

標識酵素としては入手のし易さ、感度の面からPODが全体の約50%を占めており、検出試薬として酸化発色試薬系が多く用いられる。

免疫学的測定法の代表的な反応スキームをFig. 1 に示す。

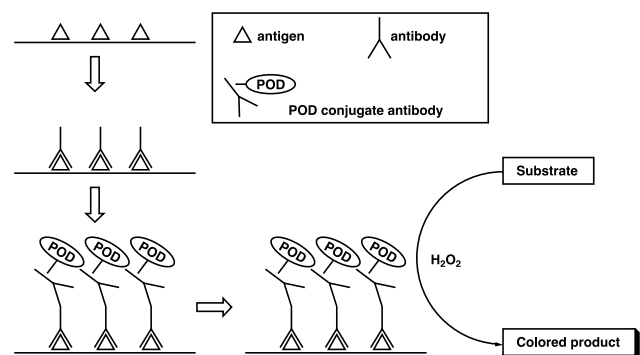


Fig. 1 免疫学的測定法の概要

酵素的測定法において生じた過酸化水素を測定する際は、過剰のPODの存在下、発生する過酸化水素によって色素を生じさせ、プラトーに達した時の吸光度を測定する。しかし、EIAにおいては、POD活性を利用しているため、過剰の過酸化水素の存在下で一定時間に生じる色素の量を測定する。つまり、EIAにおける測定対象は過酸化水素量ではなくPOD活性という事になる。したがって、一定量の過酸化水素で高い吸光度が得られるものより、少量のPODで一定時間により多くの色素を生じる物が、感度の高い呈色試薬といえる。

3. 免疫的測定法で用いられる試薬と問題点

Fig. 2 にEIAで一般的に用いられているPOD発色基質を示す^{6,7)}。

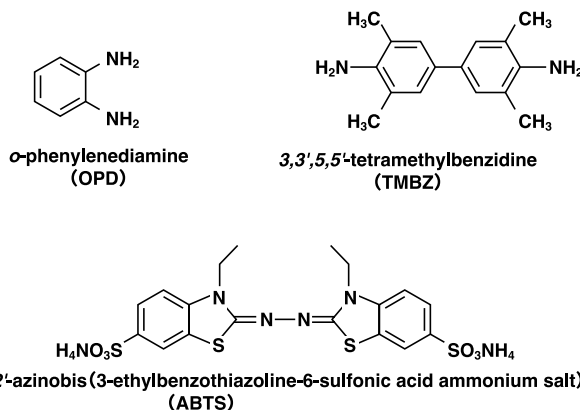


Fig. 2 POD発色基質

これらの試薬は過酸化水素に対するモル吸光係数は余り高くないながらも、一定量のPODによる反応速度は高い。

Fig. 2の中で最もよく使われている試薬はOPDである。しかしこの試薬は溶液状での試薬安定性があまりよくない上、脂溶性の一级ジアミンを持つため、その毒性が心配されている。それに代わるものとして毒性が少ないといわれている基質、3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン (TMBZ) も用いられている⁸⁾。TMBZは、酵素反応が進むにつれて、次第に安定な青色色素を生じ、酵素反応を停止させるために少量の酸を加えると、直ちにモル吸光係数の増加を伴って黄色の色素に変化する。

しかし、これらの試薬についても未だ次に示すような多くの問題点を含んでいる。

1) 緩衝液への溶解性が低い。

EIAではマイクロプレート等を用い、多くの試料を一度に処理する必要がある。その場合、試薬溶液をある程度の期間保存しておかなければならず、試薬の溶解性が悪いと、その間に沈殿を起してしまう場合がある。

通常このような水溶性の低い試薬を用いる時は、試薬の沈殿などを防ぐため界面活性剤等を試薬溶液に添加するが、ピペット操作時に発泡するため操作性が悪くなる。また酵素反応に影響を及ぼす恐れもある。一方、有機溶媒などを添加する方法もあるが、廃液などの問題が生じてくるため好ましくない。

2) 試薬の溶液安定性が低い。

試薬溶液のみの場合であっても、光や溶存酸素などの影響で発色してしまい、バックグラウンドが上昇してしまう。

3) 色素安定性が低い。

酵素反応を終了させた後の色素の安定性が悪く、退色や沈殿を生じてしまう。したがって、一定の測定値を得るには、時間管理を厳格にしなければならない。

4. SAT誘導体の開発⁹⁾

前述したように、EIAにおける比色測定は頻繁に行われている

にもかかわらず、使用されている試薬の種類は少ないのが現状である。また、それらの試薬も前記のような問題を含んでいる。

これらの問題に対していくつかの方法が考えられるが、試薬に水溶性を持たせる事も一つの方法である。発色基質の水溶性を高める事によって操作性も向上し、体内への蓄積性が軽減されると考えられる。

ここでは新規の発色基質SAT誘導体を紹介する。それらの化合物はFig. 3に示す様に、水溶性基としてヒドロキシアシルスルホン酸基 (SAT-3) もしくはアルキルスルホン酸基 (SAT-4, 5)

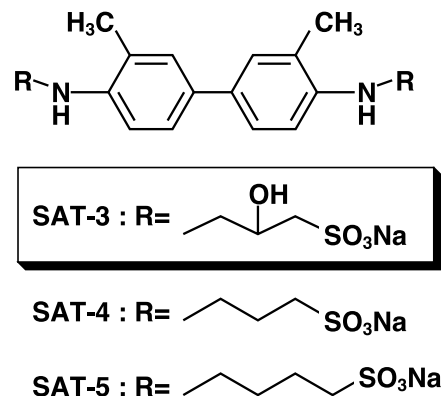


Fig. 3 SAT誘導体

を持っている。

これらSAT誘導体の溶液安定性、感度、溶解度を測定したところ、SAT-3が安定性、感度の面で最も優れていたため、以下SAT-3について説明する。

4.1 SAT-3の性質

Fig. 4にSAT-3の発色後の吸収スペクトルを示す。POD存在下、過酸化水素を1 μM ~ 10 μM加えると670 nm付近に極大吸収を持つ青色色素を生じる。また、硫酸を加えて、酵素反応停止剤添加を再現すると、470 nmに極大吸収が移り、モル吸光係数も増大する。過酸化水素換算でのモル吸光係数は674 nmで約 $7 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ 、474

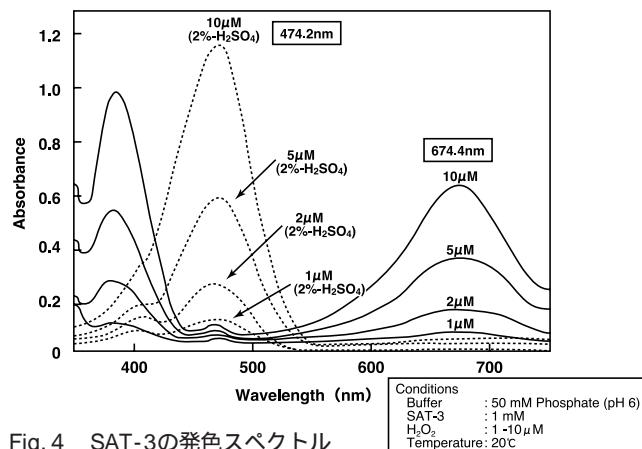


Fig. 4 SAT-3の発色スペクトル

nmで約 $12 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ である。

硫酸添加によって感度の増加を伴った波長のシフトが起こるといふ挙動はTMBZと同様で、同じ発色機構を持つものと思われる。

Fig. 5にSAT-3とOPD、TMBZの反応速度の比較を示す。この場合、各試薬の最適条件で発色反応を行っている。反応の時間変化をみるとSAT-3とOPDは直線的な上昇を示すのに対し、TMBZは20分程度で反応速度が落ちていることがわかる。これは、TMBZがPODを失活させているか、あるいは反応途中で沈殿を生じているためと予想される。

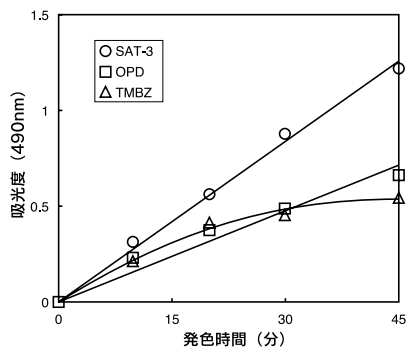


Fig. 5 SAT-3発色反応のタイムコース

条件：
 試薬濃度 10 mM (SAT-3), 6 mM (OPD), 1 mM (TMBZ)
 過酸化水素濃度 3 mM
 POD活性 $1.7 \times 10^{-4} \text{ U/ml}$
 温度 22 °C
 緩衝液 クエン酸-リン酸バッファー
 pH 4.0 (SAT-3), 5.8 (OPD, TMBZ)
 反応停止剤 2N-硫酸

Fig. 6にPOD活性に対する検量線を示す。その結果、SAT-3はOPD、TMBZに対し、約2倍の検出感度を示している事がわかる。この感度の差は反応速度の差を反映しているといえる。

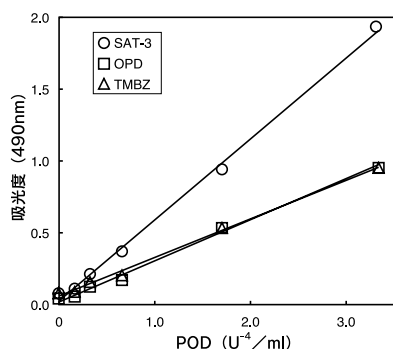


Fig. 6 POD活性に対するSAT-3の吸光度

条件：
 試薬濃度 10 mM (SAT-3), 6 mM (OPD), 1 mM (TMBZ)
 過酸化水素濃度 3 mM
 POD活性 $1.7 \times 10^{-5} - 3.3 \times 10^{-4} \text{ U/ml}$
 温度 22 °C
 緩衝液 クエン酸-リン酸バッファー
 pH 4.0 (SAT-3), 5.8 (OPD, TMBZ)
 反応時間 30分
 反応停止剤 2N-硫酸

4.2 SAT-3の安定性および液状化試薬の構築

前述した様にOPD等、従来の発色基質の溶液は保存しておく、次第に着色してくるため用時調製が必要である。つまり、実験ご

とに試薬の秤量、溶解などの操作を行なわなければならない、時間と労力を必要とする。よって、溶液状のまま保存できる試薬があれば、より簡便な実験が可能となる。

SAT-3溶液は、pH 7付近の中性条件では空気酸化などの影響を受けず、遮光条件で半年以上安定であるので、液状化試薬としての利用が期待できる。しかし、このpHにおけるSAT-3の反応活性は低いので、高い感度を得るには、反応時に試薬溶液を活性の最も高いpH 4付近に調整する事が好ましい。よって、高い感度を持ちつつ、安定性の高い液状化試薬を構築するには今後検討の余地が残されている。

5. おわりに

免疫学的測定法は、以前は煩雑で時間もかかる上、抗体も手に入り難かったため、特別な分析にしか用いられていなかった。しかしながら最近では、EIA用の全自動汎用分析機器や、新規の検体固定化担体も開発され、非常に短時間に多くの分析が行えるようになってきた。また、緊急性、簡便性を重視した簡易分析の開発も行われている。

機器や試薬の発展に伴い、今後、免疫学的測定法を利用した臨床化学分析は、国内外において更に普及するものと思われる。また、測定項目もアレルギーやホルモンの検査など、疾病のマーカーだけにとどまらず増え続けていくものと思われる。

最近では、高感度の分析機器として蛍光、発光または電気化学発光の手法を使った大型の分析装置も開発されている。しかし、比色分析も光源が簡単に装置自体をコンパクトにできる事や、目視で判断できる等の利点を持っている。よって、比色法による高感度の検出が可能となれば、免疫学的測定法はより身近な分析法として普及していく事が期待できる。

新規発色基質SAT-3は、高い水溶性、安定性を有しているなど、従来の発色基質と異なった特性を持っている。これらの特性を活かす事によって、SAT-3を微量分析や簡易分析へ応用する事も可能である。

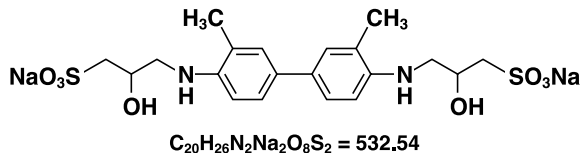
参考文献

- 1) K. Tamaoku, Y. Murao, K. Akiura, Y. Ohkura, *Anal. Chim. Acta.*, 136, 121 (1982)
- 2) K. Tamaoku, K. Ueno, K. Akiura, Y. Ohkura, *Chem. Pharm. Bull.*, 30, 2492 (1982)
- 3) M. Mizoguchi, M. Shiga, K. Sasamoto, *Chem. Pharm. Bull.*, 41, 620 (1993)
- 4) M. Ishiyama, M. Shiga, K. Sasamoto, M. Mizoguchi, P. G. He, *Chem. Pharm. Bull.*, 41, 1118 (1993)
- 5) M. Ishiyama, K. Sasamoto, M. Shiga, Y. Ohkura, K. Ueno, *Analyst (London)*, 120, 113 (1995)
- 6) N. Majkic, I. Berkes, *Clinica Chimica Acta*, 80, 121 (1977)
- 7) R. M. Jaffe, W. Zierdt, *J. Lab. Clin. Med.*, 93, 879 (1979)
- 8) V. R. Holland, B. C. Saunders, F. L. Rose, A. L. Walpole, *Tetrahedron*, 30, 3299 (1974)
- 9) M. Mizoguchi, M. Ishiyama, M. Shiga, K. Sasamoto, *Anal. Commun.*, 35, 179 (1998)

新製品

新規水溶性POD基質

SAT-3

N,N'-Bis (2-hydroxy-3-sulfopropyl)-*o*-tolidine, disodium salt

近年、生体成分の高感度微量分析には、エンザイム免疫アッセイ (EIA法) が用いられています。この方法は非放射免疫アッセイ法の中では最も感度が高い方法です。抗体の標識酵素としてはペルオキシダーゼ、アルカリフォスファターゼ、またはガラクトシダーゼ等が用いられていますが、最も汎用的に用いられているものはペルオキシダーゼ (POD) です。現在、POD活性を測定するため多くの発色試薬が市販されています。しかし、これらの試薬は脂溶性が高いものが多く、変異原性の危険性を持つものも含まれています。よって、より水溶性の高いPOD基質があれば、廃液や人体への曝露の問題も軽減されると思われる。

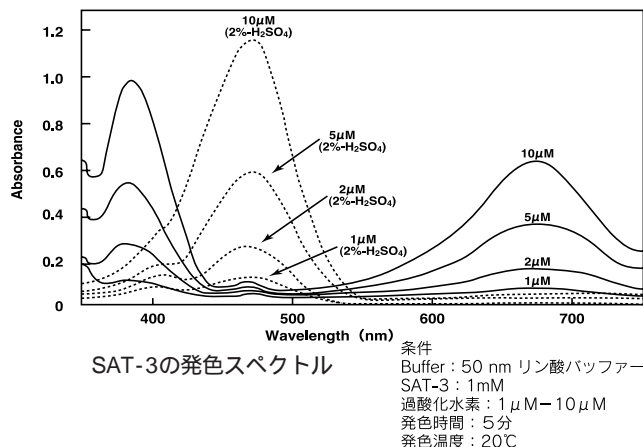
SAT-3は、従来用いられているオルトフェニレンジアミンやTMBZと同じように用いることができ、しかも高い水溶性を持つPOD基質です。

【性状】

白色粉末で、水に30 mM程度の濃度で溶解します。
粉末状態では常温保存で安定です。

【性質】

SAT-3は、TMBZやOPDと同様の挙動を示し、代替品として使用が可能です。

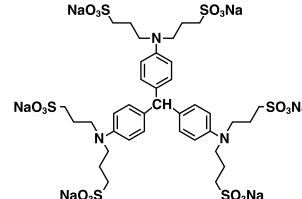


SAT-3の発色後の吸収スペクトルを示す。POD存在下、過酸化水素を1 μM~10 μM 加えていくと670 nm 付近に、極大吸収を持つ色素を生じます。また、硫酸を加えて酵素反応を停止すると、470 nm に極大吸収が移って、モル吸光係数も増大する。過酸化水素換算でのモル吸光係数は674 nm で約 7×10^4 、474 nm で約 12×10^4 です。

新製品

超高感度酸化発色試薬

TPM-PS

N,N,N',N',N'',N''-Hexa (3-sulfopropyl)-4,4',4''-triaminotriphenylmethane, hexasodium salt

酵素的測定法は生体内微量成分の分析の他、環境物質の測定等においても重要な測定法です。この測定法では過酸化水素が重要な反応生成物であり、過酸化水素を高感度に検出することができれば、より微量の成分分析も可能となります。

弊社でも過酸化水素を検出する目的で、各種新トリンダー試薬を市販しています。しかしいずれのものも過酸化水素換算でのモル吸光係数 (H_2O_2 1 モル濃度に対する吸光度) が $2 \times 10^4 \sim 3 \times 10^4$ 程度でなので、測定できる過酸化水素は μM オーダーです。

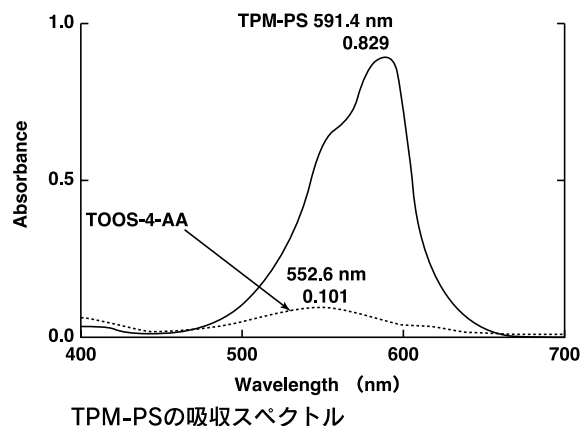
TPM-PSは新トリンダー試薬の5~10倍程度の発色感度を持つため、従来吸光度法では測定できなかった成分に対しても、簡便な比色分析が可能となります。

【性状】

白色~淡青色粉末で、水に100 mM以上の濃度で溶解します。

【性質】

PODの存在下、過酸化水素により酸化され、過酸化水素換算でのモル吸光係数が 16.6×10^4 の青色色素 (591 nm) を生じます。また、高い水溶性を持ち、水に100 mM以上の濃度で溶解します。下図に発色スペクトルをTOOS-4-AA系と比較して示します。



発色方法:

- 3mlの50mM-リン酸バッファー (pH6.0) にTPM-PSを100 μM、PODを3.3U/mlになるように溶解し、25℃で5分プレインキュベートする。
- 水溶液に0.5mM-過酸化水素水溶液を30 μl混和し、25℃で5分プレインキュベートし、吸光度に変化の無いことを確認した後、400~700nmのスペクトルを測定する。

新製品

分子生物学電気泳動用アガロース

Agarose 900

Agarose 1500

Agarose LM200

アガロースゲル電気泳動は、遺伝子操作などの解析には必要不可欠な方法であり、ゲルの支持体であるアガロースは実験内容によって使い分けが必要です。そこで、弊社では実験目的に適したアガロースを使用するために、3種の分子生物学用アガロースを発売します。

Agarose 800

10kb以下のDNAの分析に最も汎用されているアガロースである。1%のアガロースで1～6kbのDNAを分析できると言われています。

Agarose 1500

現在、アガロースゲルが通常の方法で分析し得る範囲はアガロースのポアサイズから考えて20 kb までである言われているが、10数 kb の DNA についてもゲル強度の小さいアガロースゲルを用いると検出前にゲルが崩れてしまう危険性があります。Agarose 1500 はゲル強度が1500 g/cm²であるために、低濃度のゲルでも崩れにくいアガロースです。

Agarose LM200

現在、電気泳動をかけた後、その分離したDNAを次の実験に使用しようとする場合、目的DNAを回収するということが必要になります。方法としては、低融点アガロースを用いる方法、DEAEペーパーなどのイオン交換体を用いて電気泳動的に回収する方法、透析膜の中で電気泳動的に回収する方法などがあり、その中でも低融点アガロースを用いる方法が最も操作性が良く、短時間で回収することができます。

Agarose LM200は融点が67 以下（通常のアガロースは80 以上）と低く、電気泳動分離後のDNA断片の抽出に適しています。

紹介した3種のアガロースはDNase, RNaseが検出されず、核酸（DNA, RNA）の分析及び分離回収に安心して使用できます。

参考文献

J. Sambrook, E. F. Fritsch, T. Maniatis, "Molecular Cloning-A Laboratory Manual, 2nd. Ed." (1989), Cold Spring Harbor Laboratory Press.

コード番号	品名	容量	価格(¥)
341-07842	Agarose 900	25g	4,000
343-07841		100g	11,000
344-07832	Agarose 1500	25g	4,000
346-07831		100g	11,000
340-07851	Agarose LM200	10g	8,000
346-07853		50g	29,000

関連商品

分子生物学用バッファー

遺伝子工学の発展に伴い、数十年前までは極めて特別なものであった核酸を用いた実験も比較的容易に出来るようになってきました。しかし、自然界には核酸を分解する酵素が多く含まれるために、通常の実験で用いるような緩衝液では、目的の核酸を分解させてしまう危険性が潜んでいます。弊社が提供する緩衝液は、濾過滅菌とオートクレーブ処理をすることにより、核酸を分解する酵素（DNase, RNase）の検出されない緩衝液です。またこれらの緩衝液はストック溶液であり、使用時に混合もしくは希釈します。希釈する精製水も必要に応じオートクレーブしたものを使用することをお勧めします。

MESA は RNA の検出やサイズ決定に、TAE、TBE、TPE は DNA の電気泳動に用いる緩衝液です。RNA の取り扱いには特に注意深く行い、希釈する精製水はオートクレーブしたものを使用します。また0.1%二炭酸ジエチルを添加してオートクレーブしたものはRNase を不活性化するといわれており、この精製水は RNA 実験に多く用いられているため、MESA の希釈にもこの精製水を用いることをお勧めします。

SSC、SSPE は Southern hybridization に使用する緩衝液です。Southern hybridization は1975年に Southern によって確立された方法で、アガロースゲルで泳動した DNA 断片をニトロセルロース膜などに吸着させます。プローブを用いて、プローブと同一もしくは類似の塩基配列をもつ部位を同定する方法で、現在、汎用されている方法の一つです。

TE、TNE は電気泳動のゲルや動物組織、細胞より DNA を抽出、精製するのに用いられます。この DNA の抽出、精製は、DNA ライブラリー作成や、より良い Southern hybridization を行うためには、高純度かつ長い DNA を必要とします。しかし、長鎖の DNA は物理学的にも切断されるので取り扱いには慎重に行ってください。

コード番号	品名	容量	価格(¥)
344-07491	10 x MESA (0.4M MOPS, pH7.0, 0.1M Sodium acetate, 10mM EDTA)	1 L	11,800
347-07501	10 x TAE (0.4M Tris-acetate, pH8.3, 10mM EDTA)	1 L	9,800
344-07511	10 x TBE (0.89M Tris-borate, pH8.3, 20mM EDTA)	1 L	9,800
341-07521	10 x TPE (0.8M Tris-phosphate, pH8.0, 20mM EDTA)	1 L	9,800
344-07555	10 x TE (0.1M Tris-HCl, pH8.0, 10mM EDTA)	500ml	7,900
241-07565	10 x TNE (0.1M Tris-HCl, pH8.0, 1.0M Sodium chloride, 10mM EDTA)	500ml	7,900
340-07535	20 x SSC (0.3M Sodium citrate, 3.0M Sodium chloride)	500ml	8,600
347-07545	20 x SSPE (0.2M phosphate buffer, pH7.4, 2.98M sodium chloride, 0.02M EDTA)	500ml	8,600
348-07575	1M Tris-HCl (pH8.00)	500ml	7,900
347-07481	0.5M EDTA (0.5M EDTA, pH8.0)	1 L	9,800

新製品

HPLCによる高感度アルミニウム測定試薬

I 血清中のアルミニウムの測定

現在、医療現場における血清中アルミニウムの測定は、主にフレイムレス原子吸光法が用いられています。しかし、フレイムレス原子吸光法は操作が複雑で、血清のマトリックスの影響によりルーチン測定での測定限界は約10 ppbと、現状では血清中のアルミニウムの正常値を測定するには感度不足でした。これらの課題を解決したのが、このHPLCによるアルミニウム測定システムです。

アルミニウムの神経毒性は、1970年代に人工透析療法の患者に最初に認められました。当時、人工透析療法の患者の中に、透析療法を数ヶ月間続けると、失語症や痴呆症状が現れ、中には死亡する例もありました。これらの患者の脳には、多量のアルミニウムが蓄積し、神経細胞が広い範囲で変性し、死滅していることが報告され、多くの研究の結果はアルミニウムの神経毒性を示しています。また、筋萎縮性硬化症（ALS）では、集団発生した地域の飲料水中のアルミニウムとの関連についても研究がなされています。このほかにも慢性のアルミニウム中毒によって貧血、骨症（骨痛、病的骨折、筋力低下）が認められるとの報告が多数なされ、血清中のアルミニウムの測定は非常に重要です。

HPLCによるアルミニウム測定システムでは、抗体カラムなどの前段カラムとの組み合わせにより、キャリアーたんぱく質毎のAIの分別測定への応用の可能性も報告されています。

《本法の特徴》

- 1) 測定感度が高い。
(測定限界は、試薬ブランクを含む全操作の3SDとして1ppbまで測定可能)
- 2) 高選択性（速度論的識別モードの採用で、鉄、銅、亜鉛など多くの妨害金属のなかから、アルミニウムだけを選択的に測定できる。)
- 3) キレート形成反応が室温で短時間で完了し測定できる。
- 4) クロマトグラフィーにより血清成分とアルミニウム錯体を完全に分離して測定するため、血清成分による測定値への影響を受けにくい。
- 5) 装置が小型であり、原子吸光装置のような局所換気装置やガスの配管等を必要としない。
- 6) 汎用型のHPLCが使用できるため、専用の特殊装置を必要としない。

等が上げられます。

本試薬を用いたHPLC測定系では、だれでも簡単、高感度、短時間で血清中のアルミニウムを測定できます。

II 河川水及び河川水標準物質中のアルミニウムの測定

河川水、湖水、地下水中のアルミニウムの測定は、最近の酸性雨による地殻中のアルミニウムの溶出により重要視されていま

す。ここに紹介するHPLCによる測定法は、アルミニウム、鉄、銅、亜鉛、鉛、ニッケル、コバルト等多数の金属イオンの中から特異的にアルミニウムのピークのみを検出できる方法であり、様々な金属が共存する河川水中からアルミニウムのみを測定する極めて優れた方法です。

さらに、移動相に界面活性剤を添加することによって高感度な蛍光検出を可能にしています。本法の性能試験を行った結果、直線性は少なくとも800 ppbまであり、河川水、湖水、地下水の日常的な分析には問題ない測定範囲です。また、河川より採取した水を試料としたときの同時再現性は、アルミニウムを18 ppb含む試料でCV=1.7% (n=5)、アルミニウムを94 ppb含む試料でCV=1.5% (n=5)と良好でした。

また、原子吸光分析用アルミニウム標準液をキャリブレーターとして測定した結果は、フレイムレス原子吸光法やその他の測定法との値とも一致しました。

このHPLCによる測定系では、前段カラムとの組み合わせで河川水中のフミン酸等の高分子重合体や、各有機物質ごとのアルミニウムの分別測定への対応も可能と考えられます。

III 試薬の内容

- AI 測定用試薬 R-1: キレート試薬液 (8-Quinolinol/HCl)
R-2: キレート形成液 (緩衝液、pH 7.5)
R-3: HPLC溶離液 (界面活性剤含む、pH 7.0)

IV 測定方法

《特徴》

- 1) 測定時間が5～7分程度である(約10検体/時間)
- 2) 濾過操作を省略できる。
- 3) 2ステップの除タンパク、遠心操作が必要である。

《操作方法》

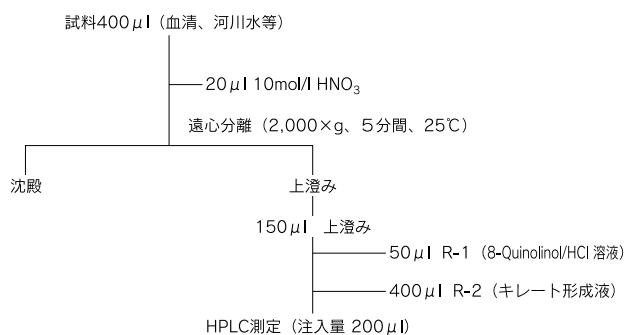
- 1) 試料を1.5 ml 容量のプラスチック容器に400 μl 取る。
- 2) そこに10 mol/l の高純度硝酸をミキサーにて攪拌しながら20 μl 添加する。
- 3) 白濁した試料を2,000 × g (5分) の遠心分離を行う。上澄を除タンパク試料としてその後のキレート形成に用いる。
- 4) 1.5 ml 容量のプラスチック容器に、キレート試液 (R-1) を50 μl を分注する。
- 5) これに、試料 (血清、標準液、盲検液) を150 μl 加え、十分に攪拌する。
- 6) この反応混液に緩衝液 (R-2) を400 μl 加えて室温 (20～25) に10分間放置してアルミニウムと8-キノリノールの1:3錯体を形成させる。
- 7) この反応混液 200 μl をHPLCに注入して、蛍光検出法 (Ex = 370 nm, Em = 504 nm) によってアルミニウム濃度を測定する。

HPLCによる高感度アルミニウム測定試薬

HPLCにて得られたクロマトグラムより、血清試料、標準液、試薬ブランクのそれぞれのピーク面積を計算し、下の式より試料中のアルミニウム濃度を算出する。

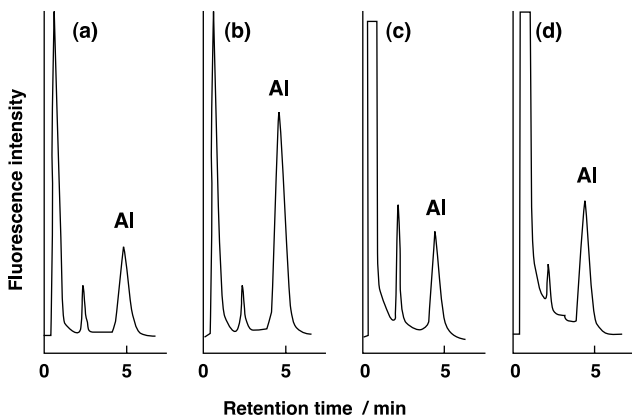
試料中のアルミニウム濃度 =

$$\frac{\text{試料のピーク面積} - \text{試薬ブランクのピーク面積}}{\text{標準液のピーク面積} - \text{試薬ブランクのピーク面積}} \times \text{標準液のアルミニウム濃度}$$



HPLC conditions for aluminum determination

Column : アルミニウム分析専用カラム
(50 mm × 4.6 mm i.d.)
Mobile phase : R-3
Flow rate : 1000 μ l/min.
Temperature : 25
Injection volume : 200 μ l
Fluorescence detection : Ex = 370 nm, Em = 504 nm
Detector : SHIMADZU RF10AXL with 12 μ l cell



(a) 試薬ブランク (0.01 mol/l HNO₃) (b) 13 μg/l Al 標準液
(c) 試料 (血清、1 μg/l Al) (d) 試料 (血清、3 μg/l Al)

V 使用上または取り扱い上の注意

1) 安定な測定を行うため、R-1を数回20 μ lずつ注入してキレー

- ト剤により流路全体を洗浄して測定を開始して下さい。
- 2) 実験器具からのアルミニウムの汚染に十分注意して下さい。
- 3) 器具は0.1Mの硝酸が塩酸で洗浄後、超純水にて洗浄した物をお使い下さい。
- 4) 測定の前後にはキャリブレーションを行って下さい。
- 5) 各試薬は使用後すぐにふたをして、空気中の浮遊粒子によるアルミニウムの汚染を防いでください。
- 6) キレート試薬液 (R-1) は遮光して保存してください。
- 7) HPLC溶離液 (R-3) は、長時間開放系で使用すると揮発性成分が蒸発してアルミニウム錯体の溶出時間が遅くなる場合があります。できるだけ蒸発を防ぐようにして下さい。
- 8) 冷蔵温度が低い場合に、まれにR-2中の緩衝成分が析出することがあります。室温にもどして完全に溶解してご使用ください。再溶解すれば試薬の性能に問題はありません。
- 9) サンプルが血清の場合、ヘパリン以外の抗凝固剤は使用できません。
- 10) 血清検体は感染予防上取り扱いには十分注意して下さい。
- 11) 市販のコントロール血清には、まれにキレート形成反応時に凝固するものがあります。その時は、新たに購入して下さい。
- 12) キャリブレーターには原子吸光用、またはICP用の標準液をご使用下さい。

参考文献

- A. C. Alfrey, G. R. LeGendre, W. D. Kaehny, *New Engl. J. Med.*, 294, 184 (1976)
- J. Walton, C. Tuniz, D. Fink, G. Jacobsen, D. Wilcox, *Neuro Toxicology*, 16, 187 (1995)
- 中澤一, 腎と透析, 36, 1111 (1994)
- D. P. Perl, D. C. Gajdusek, R. M. Garruto, R. T. Yanagihara, C. J. Gibbs, Jr., *Science*, 217, 1053 (1982)
- M. Sato, H. Yoshimura, H. Obi, S. Hatakeyama, E. Kaneko, H. Hoshino, T. Yotsuyanagi, *Chem. Lett.*, 203 (1996)
- M. Sato, H. Yoshimura, T. Shimmura, H. Obi, S. Hatakeyama, E. Kaneko, H. Hoshino, T. Yotsuyanagi, *J. Chromatogr. A*, 789, 361 (1997)
- M. Sato, H. Yoshimura, E. Kaneko, T. Yotsuyanagi, *Biomed. Res. Trace Elements*, 8, 283 (1997)
- S. Nomoto, M. Totsuka, T. Nakabayashi, T. Katsuyama, O. Sugita, *Biomed. Res. Trace Elements*, 8, 245 (1997)
- 佐藤 誠, 芳村 一, 金子恵美子, 四ツ柳隆夫, 日本化学会第74回春季年会 講演予稿集 I, p. 373 (1998)

コード番号	品名	容量	価格(¥)
Request	Aluminum detection kit	1kit	45,000

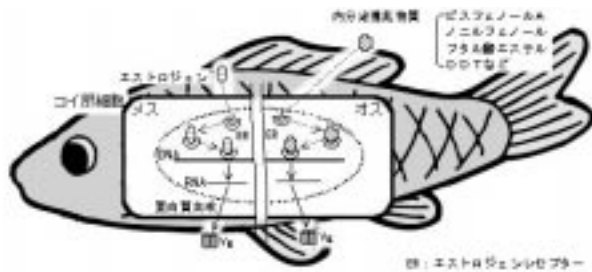
新製品

環境ホルモン研究関連試薬

コイ ビテロジェニン ELISA キット

〔はじめに〕

卵黄蛋白質前駆物質であるビテロジェニン (Vg) は、卵生高等脊椎動物の血中に出現するメス特異蛋白質です。Vgはエストロジェン (女性ホルモン) の作用のもとに通常、卵黄形成期のメス肝臓で合成され、血中を介して卵内に取り込まれ卵黄蛋白質を構成します。また、エストロジェン処理をすることによりオス血中にも誘導される蛋白質であることから、近年、河川などの環境水中にある内分泌攪乱物質のバイオマーカーとして注目されています。本抗体、及びキットはこのVgを測定する際に使用します。特にELISAキットは簡便で世界初の商品です。(環境庁も平成10年5月7日に報告したSPEED 98/JEAの中で唯一、実態調査指標としてこの「ビテロジェニン (Vg)」を挙げています。)



〔測定原理〕

本キットは、コイVgに特異的な2つの抗体を用いたサンドイッチELISA法に基づいています。マイクロプレートには抗コイVg抗体がコートされており、検体及び標準液中のコイVgを結合します。さらに HRP 標識抗コイVg抗体を反応させると、ウェル上に固相化抗体 - 抗原 - 抗体のサンドイッチ型複合体が形成されます。抗体により結合したコイVgは、HRP により触媒される発色反応により定量されます。

〔キット内容〕

- | | |
|--------------------------|------|
| (1) 抗体固相化マイクロプレート | 1枚 |
| (2) コイVg標準液 | 2本 |
| (3) 検体希釈液 | 30mL |
| (4) HRP 標識抗コイVg抗体 | 25μL |
| (5) 基質液 | 15mL |
| (6) OPD (オルトフェニレンジアミン) 錠 | 2錠 |
| (7) 濃縮洗浄液 (×20) | 20mL |
| (8) 反応停止液 | 6mL |

〔キット以外に必要な器具・器材〕

- (1) マイクロプレートリーダー
- (2) マイクロピペット

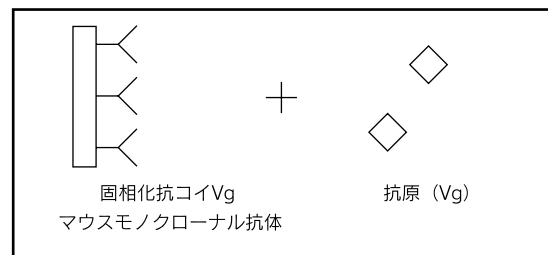
* 本商品は出荷後4週間以内もしくは記載有効期間内にお使い下さい

(3) プレートウォッシャー

ない場合は、説明書内の操作法に従ってマニュアルで洗浄してください。

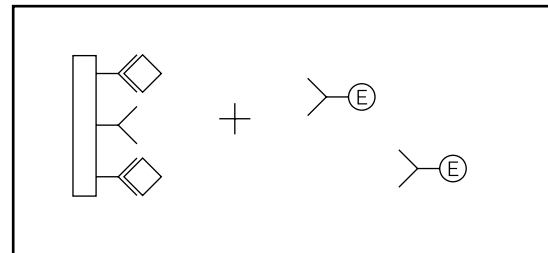
〔測定操作方法〕

STEP 1



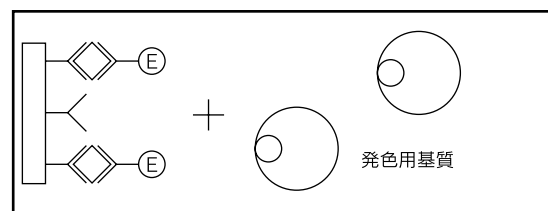
- ・ウェルを洗浄後、ゼロブランクのウェルに検体希釈液を100μL加えます。
- ・ウェルに標準液及び血清を100μLずつ加え、室温で2時間インキュベート後、各ウェルを3回洗浄します。

STEP 2



- ・各ウェルに HRP 標識抗コイVg抗体溶液を100μLずつ加え、室温で1時間インキュベートします。
- ・ウェル内の液を除去後、各ウェルを洗浄液で5回洗浄します。

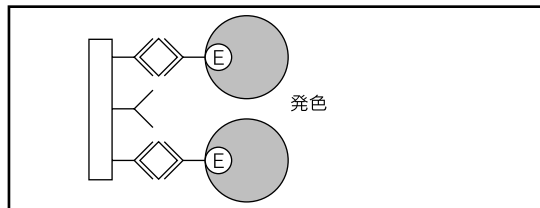
STEP 3



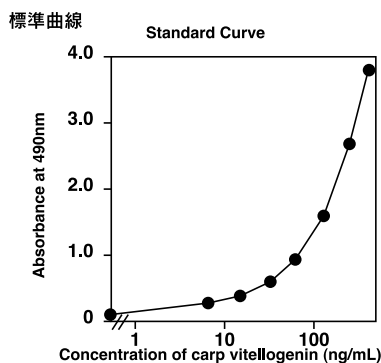
- ・各ウェルに発色液を100μLずつ加え、室温で15分間反応させます。

環境ホルモン研究関連試薬

STEP 4



- ・各ウェルに反応停止液を50 μ Lずつ加え、酵素反応を停止させます。
- ・プレートリーダーで490あるいは492 nmの吸光度を測定します。
- ・標準曲線よりコイVgの濃度を算出します。



〔参考文献〕

- 1) N. Hiramatsu, M. Shimizu, H. Fukada, M. Kitamura, K. Ura, H. Fuda and A. Hara, *Comp. Biochem. Physiol.*, 118C(2), 149-157 (1997)
- 2) N. Hiramatsu and A. Hara, *Comp. Biochem. Physiol.*, 115A(3), 243-251 (1996)
- 3) H. Okumura, A. Hara, F. Saeki, T. Todo, S. Adachi and K. Yamauchi, *Fisheries Science*, 61(2), 283-289 (1995)
- 4) T. Matsubara, T. Wada and A. Hara, *Comp. Biochem. Physiol.*, 109B(4), 545-555 (1994)
- 5) Y. Tao, A. Hara, R. G. Hodson, L. C. Woods III and C. V. Sullivan, *Fish Physiol. Biochem.*, 12(1), 31-46 (1993)
- 6) A. Hara, C. V. Sullivan and W. W. Dickhoff, *Zool. Sci.*, 10(2), 245-256 (1993)

〔関連製品及び価格〕

コード番号	メーカーコード	品名	容量	価格(¥)
303-06161	KH003	コイピテロジェニン ELISA キット (96穴用)		90,000
300-06811	KH004	コイピテロジェニンモノクローナル抗体 (1G2)	100 μ g	40,000
304-06831	KH005	マミチヨビテロジェニンモノクローナル抗体 (3E11)	100 μ g	40,000
307-06821	KH007	マダイピテロジェニンモノクローナル抗体 (5A4)	100 μ g	40,000

近日発売

水溶性セレンテラジン

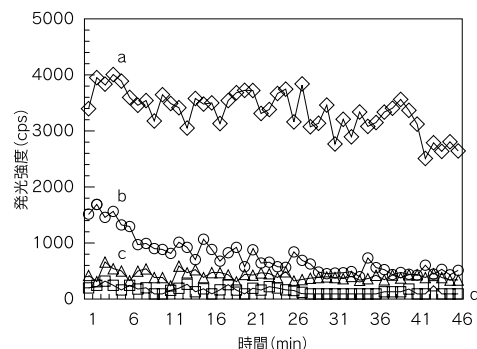
Coelenterazine-WS

セレンテラジンを発光部分としてもつ発光たんぱく質エクオリンは、カルシウムイオンと特異的に結合して発光するため、細胞内カルシウムイオンの発光分析法として広く用いられています。

しかしながら、セレンテラジンは中性 pH における水溶性が低く、また細胞表面へ吸着するなど、細胞系での使用にとって大きな障害になっていました。

今回紹介するCoelenterazine-WSは中性 pH での水溶性が飛躍的に向上しており、種々のバッファーにも容易に溶解します。さらに細胞への導入が容易になることで、エクオリンの発光性能が増すものです¹⁾。

セレンテラジン溶液：Coelenterazine-WS 10 mg を10 mM リン酸バッファー (pH 7.0) 0.1 ml に溶解したものを。



順天堂大・嶋田先生提供

図中 a - d は以下の通り。

- a) セレンテラジン (メタノール溶液) を用いたもの。
- b) Coelenterazine-WS を用いたもの。
- c) Triton X-100 を加え酵母細胞を破壊後、セレンテラジン (メタノール溶液) を加え測定したもの。
- d) Triton X-100 を加え酵母細胞を破壊後、Coelenterazine-WS を加え、測定したもの。

参考文献

- 1) K. Teranishi and O. Shimomura, *Biosci. Biotech. Biochem.*, 61, 1219 (1997).

販売中止のご案内

弊社都合により下記製品の販売を中止いたしましたのでご案内致します。

コード番号	品名	容量
344-05291	Fluostain I	500mg
347-05301	Fluostain II	500mg
345-04121	TAMB	100mg
341-04101	BTAMB	100mg
348-04111	3,5-DiBr-PAMB	100mg
348-07151	S-Methyl-L-thiocitrulline	10mg
346-07191	L-thiocitrulline	10mg

第9回フォーラム・イン・ドージン開催報告

「しのびよる化学汚染と生態系」

- 外因性内分泌攪乱物質（環境ホルモン）から地球温暖化まで -

各地から雪の便りが聞かれる中、「第9回フォーラム・イン・ドージン」が12月4日に開催されました。今年は熊本市の熊本テルサをメイン会場として、前年に引き続き東京会場のタケダ本町ビルにTV会議システムによる中継を行いました。

今回は熊本大学医学部 前田浩教授、長崎大学環境科学部 有園幸司助教授にお世話いただき「しのびよる化学汚染と生態系」をテーマとし、副題を - 外因性内分泌攪乱物質（環境ホルモン）から地球温暖化まで - とし、環境問題に関する幅広い講演・最先端の研究内容を総勢12名の先生方にお話しいただいた。今話題の環境問題に関するテーマだけあって、熊本会場で約350名、東京会場ではほぼ定員の50名の参加者があった。

講演プログラムは以下の通り。（敬省略）

村松 秀（NHK科学番組部）

「番組から見た日本の環境ホルモン研究の動向」

吉成 正（ニューヨーク州立大学）

「グローバルウォーミングと大気組成」

田辺信介（愛媛大学農学部）

「残留性有機汚染物質の生態影響」

長山淳哉（九州大学医療技術短期大学部）

「ダイオキシン類と農薬：ヒトへの影響の可能性」

大嶋雄治（九州大学農学部）

「内分泌攪乱が魚類の繁殖に及ぼす影響」

堀口敏宏（国立環境研究所）

「有機スズ化合物が誘導する海産巻貝類のインボセックス」

大村 実（九州大学医学部）

「トリブチルスズは哺乳動物にとっても内分泌攪乱物質か？」

原 彰彦（北海道大学水産学部）

「外因性内分泌攪乱物質：生体応答(2)

（マーカーとしてのビテロジェニン）」

高田秀重（東京農工大学農学部）

「外因性内分泌攪乱物質：環境計測」

山内兄人（早稲田大学人間科学部）

「性行動と性分化」

岩本晃明（聖マリアンナ医科大学泌尿器科）

「ヒトへの影響 - 精子への影響 - 」

井口泰泉（横浜市立大学理学部）

「外因性内分泌攪乱物質：生体応答（実験内分泌学の見地から）」

セッションⅠは基調講演として、NHK科学番組部の村松氏が「環境ホルモン」という言葉の誕生秘話から、ここ数年のTV番組を通じての環境ホルモン研究の移り変わりについて紹介した。

セッションⅡではグローバル環境汚染をテーマに、まずニューヨーク州立大学の吉成先生が地球温暖化に関し、その原因気体と現状、および今後の温室効果ガスを抑制する対策に関し分かりやすく解説した。愛媛大学の田辺先生は海洋汚染したPCBやPCDDなどの有機塩素化合物が生態、特に海棲哺乳動物へ与える特異な汚染について、九州大学の長山先生はダイオキシン類や農薬がヒトに与える影響、特に母乳による乳幼児への影響の可能性に関し報告した。

セッションⅢでは外因性内分泌攪乱物質をテーマとした講演が行われた。九州大学の長嶋先生は環境ホルモンが魚類に及ぼす影響について、国立環境研究所の堀口先生は有機スズが引き起こす雌雄異常について巻貝を例に紹介し、九州大学の長村先生は有機スズ化合物が哺乳動物に与える影響について講演した。さらに北海道大学の原先生は雌に特異的に見られる蛋白質「ビテロジェニン」に注目した内分泌攪乱物質汚染の検出について、東京農工大学の高田先生はアルキルフェノール類の影響および、その検出について実際の河川のデータなどを基に紹介した。

セッションⅣは環境変化と人への影響をテーマとして、早稲田大学の山内先生が環境ホルモンが性行動に及ぼす影響に関して講演した。聖マリアンナ医科大学の岩本先生はここ数年話題となっている男性の精子減少に関し、内分泌攪乱物質がどのように関わっているのか、また、実際に影響を与えているのかについて報告した。最後に横浜市立大学の井口先生が総括的な内容で、内分泌攪乱物質に関する報告を行った。

セッションⅤでは村松氏の総合司会により、講演者ならびに世話人も含めたパネルディスカッションが行われた。一般の主婦からも質問が出るなど活発な質疑応答がなされ、予定時間を大きく超過する程で、その後のミキサーへと会場を移し、引き続き討議が行なわれた。主催者としては、ご講演いただいた先生方に十分な講演時間をとることが出来ずご迷惑をおかけしたが、通常であれば一日では得られない内容の詰まった講演会であったと感じている。また、今回のフォーラムは東京会場でもより鮮明な画像を見ていただくため、コンピュータ画像を用いたテレビ会議システムで行った。ご講演いただいた先生方のご協力に感謝します。

なお、本講演要旨集の残部が幾分ございますのでご希望の方は弊社マーケティング部までご連絡ください。



ホームページアドレス

URL : <http://www.dojindo.co.jp/>

E-mail : info@dojindo.co.jp

フリーファックス

0120-021557

フリーダイヤル

0120-489548