

# DOJIN NEWS

ドージンニュース

No.087/1998

Review

私達が出会った環境ホルモン研究の先駆者達 井出 剛

Topics on Chemistry

包接認識化合物、カリックスアレーン 大瀬戸文夫

連載

化学者とパソコン通信10 平山直紀・本浄高治

試料の前処理10

大倉洋甫



## 目次

## Review

私達が出会った環境ホルモン研究の先駆者達 (株)クマモト抗体研究所 井出 剛.....	3
化学者とパソコン通信10 平山直紀、本浄高治.....	7
試料の前処理10 大倉洋甫.....	10

## Topics on Chemistry

包接認識化合物、カリックスアレーン (株)同仁化学研究所 大瀬戸 文夫.....	12
---	----

## Commercial

Q & A Cell Counting Kit シリーズ.....	15
新製品案内	
NO関連試薬.....	19
近日発売予定	
水溶性カリックスアレーン.....	14
PKA用蛍光ペプチドプローブ.....	18
機能性キレート試薬.....	19

## お知らせ

総合カタログ(21版)のご案内.....	20
----------------------	----

## 新製品案内

## 1. 新製品 NO関連試薬

コード番号	品名	容量	価格(¥)
345-07801	TFPI	5mg	9,700
342-07791	D-NMMA	10mg	7,200
348-07771	Mn-TBAP	10mg	15,000
345-07781	ODQ	10mg	13,000



石橋で有名な熊本県であるが、県北部の鹿本町に石の「かざぐるま」がある。直径約2 m、1.5 tのみかげ石の羽根がススキの穂がゆれる程度の風(風速3 m)でも回る。(羽根の大きさでは日本一だとか...)まさに「百聞は一見に如かず」で、近くで見る人を圧倒する。  
 (弊社 前田 正靖 撮影)

## 私達が出会った環境ホルモン研究の先駆者達



井出 剛

(Tsuyoshi IDE)

㈱クマモト抗体研究所

### 1. 環境ホルモン(内分泌攪乱物質) : endocrine disruptors

内分泌攪乱物質とは「生体の恒常性、生殖、発生あるいは行動に關する種々の生体内ホルモンの合成、貯蔵、分泌、体内輸送、結合、そしてそのホルモン作用そのもの、あるいはそのクリアランスなどの諸過程を阻害する性質を持つ外来性の物質」と定義されている\*。

しかし、一般的には環境中に放出され、あたかもホルモンのように作用することから「環境ホルモン」と呼ばれている。

もともとは、横浜市立大学理学部 井口泰泉教授やNHK科学番組部ディレクター 村松秀氏らが1997年5月に放映された「サイエンスアイ」の制作過程で造り出された用語であるが、今ではこの用語がマスコミを中心に一人歩きしている。

現在、ビスフェノールA、フタル酸エステル、ノニルフェノールなどをはじめ、確認されているだけでもおよそ70種類以上の合成化学物質が環境ホルモンであると認定されている(世界自然保護基金による)。主な特徴の1つとして「弱いエストロゲン」のような働きをし、ホルモンの作用を模倣し、遺伝子に直接作用することで生殖や性発達を攪乱していることが挙げられるが、スチレン、カドミウム、鉛、水銀など女性ホルモンのような作用を持たないものもある。

環境ホルモンは、生物の自己保存ならびに「種の存続」を脅かす。よって、それによる環境汚染は生物に極めて深刻な影響を及ぼしているといえる。

このため、こうした作用を有する化学物質を早期に見出し、その影響の顕在化を未然に防ぐ対策を緊急に講じることが必要だが、環境ホルモンの環境中濃度の把握や、さまざまな生物への影響に関する研究は世界的に見てもまだまだ乏しく、とりわけ日本周辺における研究はこれまでもほとんど行われていないのが現状である。

\* : 1997年1月 ホワイトハウス科学委員会、スミソン財団共催のワークショップ“内分泌障害性化学物質に関するスミソニアン・ワークショップ”で申し合わされた定義。

### Summary

Endocrine disruptors are chemicals that are considered to act like hormones when they enter into the body, even at a very small amount, and to influence the development of reproductive organs and sexual behaviors. When exposed to these chemicals within the uterine or during an early period of development, testicular atrophy may occur in males, and ovarian malformation in females. In extreme cases, sex reversal may also occur. About 70 kinds of chemicals, including polychlorinated biphenyl (PCB) are suspected as endocrine disruptors. Some investigators have expressed the fear that these chemicals exert their influences beyond generations, unlike carcinogens which directly affect individuals exposed.

キーワード：環境ホルモン(内分泌攪乱物質)、estrogen、ビテロゲニン

### 2. 私達が出会った環境ホルモン研究の先駆者達

#### 2.1 横浜市立大学理学部 井口泰泉教授

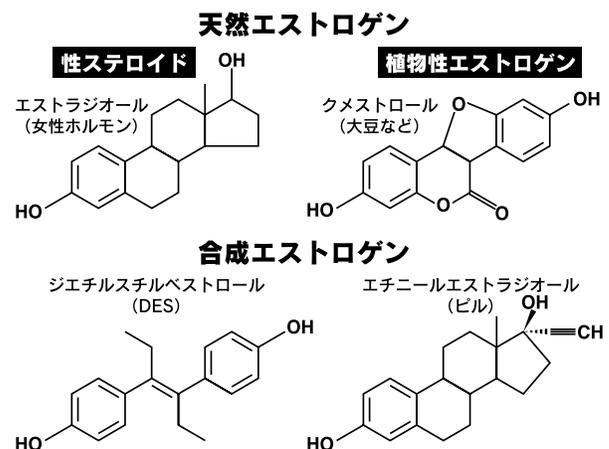
横浜市立大学 井口先生は、流産防止剤であるDESの使用に伴う女兒の膣ガン発生のメカニズムの解明に先駆的な役割を果たしてきた、内分泌攪乱物質に関する研究の第一人者である。

井口先生は「環境ホルモンの問題は決して最近起こったものではない」と言われる。

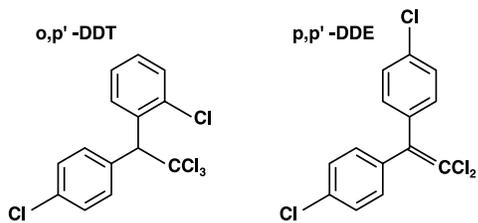
1938年、ロンドンのコートールド生化学研究所のチャールズ・ドッズ博士は、合成エストロゲンの分離に成功し、天然エストロゲン、エストラジオールと同程度の効力があることを科学誌「ネイチャー」に発表した。これがDESと呼ばれる物質である。これを契機にDESは、はじめは更年期症状用に、次に避妊薬として、更に乳ガンや前立腺ガンの治療用として全世界で使用され始めた。また、牧畜農家では、生産効率を上げるためにDESが飼料に混ぜられた。

1950年代に入るとDESは習慣性流産や切迫流産の治療用に用いられた。1953年シカゴ大学のウィリアムズ・ディークマン博士らはDESの処方への無効性を発表したを受け入れられず、結局600万人にもものぼる妊婦たちがDESに曝露され続けた。

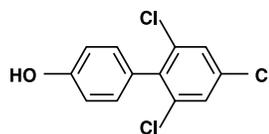
その結果、子供たちが成長するにあたって種々の異常が顕著にな



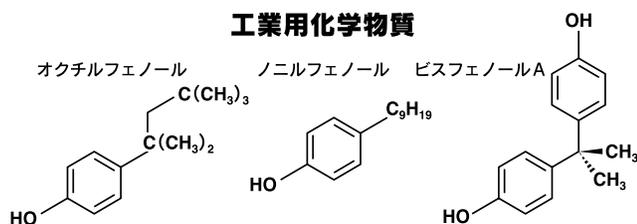
### 殺虫剤類



### PCB類



### 工業用化学物質



ってきた。通常、更年期にしか見られない膣ガンが十代の少女に異常発生し、また子宮、膣、卵管の奇形、未成熟などの異常が多発した。男児では停留精巣、尿道口の下裂、精子数の減少が多発し、ペニスがわずか15ミリの症例や不完全な男性化の症例も報告された。

一方、野生動物の世界においても、環境ホルモンのもたらす影響を知らしめる調査報告が相次いだ。なかでも井口先生と長年の研究パートナーであるフロリダ大学のルイス・ジレット教授らによるフロリダ州アポпка湖のワニの「メス化」に関する調査報告はあまりにも有名である。アポпка湖では1980年から1987年にかけてワニの生息数が異常に減少した。調査を依頼されたジレット教授の報告は、大変ショッキングなものであった。アポпка湖の雄ワニのペニスが正常のワニの1/4~1/2の大きさになっている脱雄性化が起こっている一方で、雌ワニでは卵巣に多くの多卵性濾胞、多核卵が見つかり、超雌性化が起こっていたのである。原因は、湖の近くのタワーケミカル社から流出されたジコホルDDT、DDEの混合物であった。アポпка湖でのワニの急激な減少は、生殖器に異常をきたしたワニが、子孫を次世代に残せなくなったことが原因であった。

また、イギリスの河川では、ノニルフェノールなどの排水によって雌雄両性のローチ（コイの一種）が出現し、ブルーネル大学のジョン・サンプター教授らの実験によって、オスのニジマスもメス化することが明らかになった。

井口先生は「ヒトに見られる生殖異常と野生動物の“メス化”の間には共通のリンクがある」と言われる。「言うまでもなくエストロゲン様化学物質の曝露によって起こる変化である。」

なお、1996年コルボーン博士らによる著作「Our Stolen Future」がアメリカで出版されると、環境ホルモンに対する関心は欧米では一挙に高まった。

日本では国立環境研究所の堀口敏宏主任研究員が1990年から全国でイボニシ（巻き貝）を対象とした環境ホルモンの影響調査を行っている。その結果、96年3月までに調べた全国97の調査地点のうち94地点でほぼ100%のメスにインボセックスと呼ばれる生殖異常が見つかり、輸卵管という雌特有の器官をもつ一方で、雄にしかないはずのペニスと輸精管を併せ持つ両性具有の貝の存在が全国で多数確認された。

この原因はトリブチルスズやトリフェニルスズというある種の有機スズ化合物で、船の底に付着する貝類、海草等を駆除するための船底防汚塗料や養殖用の漁網防汚剤として使われてきた化学物質である。ちなみにトリブチルスズは縦500メートル、横200メートル、深さ10メートルの巨大なプールにわずか1グラム溶けただけでもメスの巻き貝にペニスをつくらせるなど異常を引き起こす、極めて有害性の高い化学物質であることが室内実験の結果、わかってきた。

### 2.2 長崎大学環境科学部 有菌幸司助教授

水域環境では、微量の重金属類、農薬、界面活性剤、漁網防汚剤、船舶塗料等の化学物質によって、水環境のみならず環境汚泥中に蓄積するこれら化学物質の複合毒性が憂慮されている。しかし、従来の機器分析による「水質」の化学的汚染指標のみでは、こうした毒性を評価することは難しい。

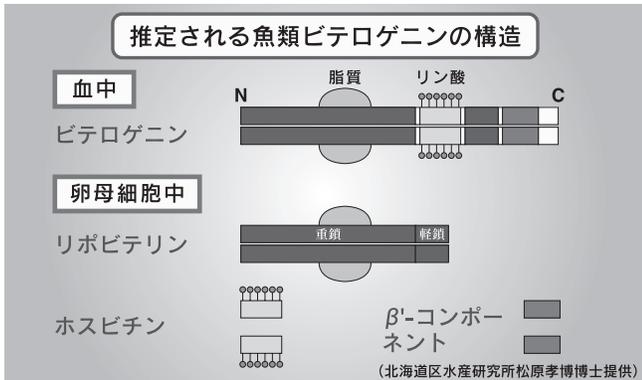
長崎大学 有菌先生は、「魚体」中で環境水に鋭敏に応答する指標が得られ、同時に化学物質の測定値が得られれば、汚染をより正確に把握できると考え、魚類のバイオマーカーとしてシトクロムP450を中心とした薬物（化学物質）代謝酵素や、ヒートショックプロテインとして注目され始めたヘム代謝系酵素のヘムオキシゲナーゼ（HO）、重金属に対する生体防御蛋白であるメタロチオンイン（MT）などを取り上げ、環境変動のアラーム機構の確立を目指されている。最近では薬物代謝酵素活性や酵素蛋白レベルに加えて、mRNAレベルでの分子モニタリング系の確立にも着手されている水域環境トキシコロジー分野における若きオピニオンリーダーである。

1997年4月、この一連の研究成果はノルウェーのベルゲンで開催された「第9回 海洋汚染とバイオマーカーに関する国際シンポジウム」で発表され、注目された。

### 2.3 北海道大学水産学部 原彰彦教授

卵黄蛋白前駆物質であるビテロゲン（Vitellogenin）は、卵生高等脊椎動物の血中に出現するメス特異蛋白である。Vitellogeninはエストロゲ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する。また、エストロゲン処理をすることによりオス血中にも誘導される蛋白である。近年、魚類におけるVitellogeninは早期雌雄判別のマーカー蛋白として用いられるようになってきた一方、河川などの環境水中の環境ホルモンのバイオマーカーとして注目されている。

北海道大学水産学部教授の原彰彦先生は、世界ではじめて魚類



ビテロゲニンの同定、精製に成功し、物理学的性状を明らかにするとともに、ビテロゲニンが卵黄蛋白であるリポビテリン、ホスピチン及びβ'-コンポーネントへ分子解裂することを明らかにされた。また魚類ビテロゲニンに対する抗体を用いて、オスの血液中にメスしか作らないはずのビテロゲニンが環境ホルモンの影響で産生されることに着目し、ビテロゲニンを用いた測定系の研究もされている。

### 3. 共同研究の開始

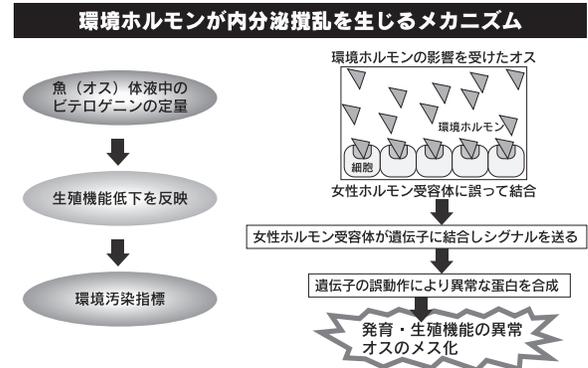
1997年3月17日 17:00より長崎大学 有菌先生の主催により、薬学部隣接の同窓会館1階セミナー室で、横浜市立大学 井口先生の「内分泌攪乱物質」に関する講演が始まった。室内は閑散としていた。一番後方の席に座った私と坂本君(クマモト抗体研究所 主任研究員)を含めても全部で15人程度だった。

この講演の中で井口先生は1) 内分泌攪乱化学物質問題に関する概況、2) 内分泌攪乱化学物質の人への影響、3) 内分泌攪乱を生じるメカニズムについて、そして最後に4) 海外で試みはじめられた最新のレセプターバインディングアッセイ法について述べられた。

私達はここで初めて有菌先生から井口先生を紹介してもらおうと同時に、両先生から環境中のエストロゲンを検出するためのバイオマーカーとして魚類の卵黄前駆物質である「ビテロゲニン」に対する特異抗体の作製と、それを用いての測定系の確立を打診された。これはやれる、やれないではなく、やらなければならないテーマだと私達は考え、2ヶ月後、難産の末、熊本テクノリサーチパークにクマモト抗体研究所を設立して、特異抗体作製のための準備に取りかかった。

また、魚類ビテロゲニン特異抗体を作製するにあたって、何とんでも本分野第一人者である北海道大学 原先生にお会いしたが、それは意外と早く思わぬ場所で実現した。

1997年7月31日、私達は横浜市立大学を訪問して、井口先生に今後の抗体開発の進め方についてアドバイスを頂いた時である。そこへ多摩川河畔で環境ホルモンの魚類への影響解明研究の一環として、帝京大学中村助教授らとコイの生態調査を行われていた原先生が井口教室を訪ねてこられた。(ちなみに、この多摩川でのコイの生態調査はその後も定期的に続けられ、オスの精巣縮小



が3割に達し、と同時にオスからビテロゲニンが検出されたことからマスコミにも大きく取り上げられた。) )

私達は挨拶もそこそこに原先生を取り囲み、ビテロゲニンの性状について質問をし続けた。

この結果、クマモト抗体研究所は内分泌攪乱のメカニズム解明の横浜市立大学井口教室、魚類の薬物代謝酵素研究の長崎大学有菌教室、そして魚類ビテロゲニンの免疫生化学的研究の北海道大学原教室の協力を得て、マダイ、マミチヨグ、コイ、メダカそれぞれのビテロゲニンに対するモノクローナル抗体作製に取り組むことになった。

### 4. 日本における環境ホルモン汚染の反響

NHK番組制作局科学番組部ディレクター村松秀氏は、おそらく日本の報道関係者の中で環境ホルモンによる汚染の事の重大さについて最も早く感知し、かつ番組制作という立場から冷静に実証的にこの問題に取り組んでこられた人物といえる。一度、設立間もないクマモト抗体研究所も来訪され、特異抗体を使用しての環境ホルモンの環境中濃度の把握についての意義などについて丹念にヒアリングをしていかれた。前述の通り1997年5月、6月、村松氏は井口先生らの協力を得て、まず速報というかたちで「サイエンスアイ」という番組の中で環境ホルモンによる汚染の実態を日本で初めて伝えた。

そして11月にNHKスペシャル「生殖異変 - しのびよる環境ホルモン汚染 - 」が放送されるや、全マスコミが競って環境ホルモン問題を一斉に取り上げ、井口先生は毎日のように新聞、テレビに登場することになった。

環境ホルモンの疑いのある主な物質と用途	
有機スズ*	船底塗料
PCB*	電気絶縁体
アトラジン*	殺虫剤・除草剤
アミトール*	
エンドサルファン*	
DDT*	
ヘキサクロロベンゼン*	
ノニルフェノール	界面活性剤
ビスフェノールA	樹脂原料

(注)\*は国内で使用規制のある物質

日本においても環境ホルモンに関する関心がようやく高まったことは大変喜ばしいことではあるが、その一方では眉をひそめなくなるような誤報も飛び交い、今こそ節度ある報道が必要だと思われる。

このような中、村松氏の先のNHKスペシャルの番組が「科学技術庁 科学技術映像祭 内閣総理大臣賞」を受賞した。その報が入るやくまも抗体研究所のスタッフ一同は自分のことのように喜んだ。

あたかもNHKの番組に呼応するかのようには各省庁もこの問題に取り組み始めた。1997年3月、環境庁は「外因性内分泌攪乱化学物質問題に関する研究班」を発足させ、1998年には魚を使ってホルモンの影響を調べるプロジェクトを立ち上げた。(一方、ほぼ同時期に厚生省は日本人の精子数を長期的に調べるプロジェクトを、また通産省は工業界で使える独自の環境ホルモンのテスト方法の開発に乗り出した。)

## 5. 今後の活動と課題

我々の研究成果は、1998年4月1日、日本水産学会春季大会のミニシンポジウム「水産物における内分泌攪乱物質の影響」において、長崎大学 有園先生に「魚類血清タンパク成分への影響 - 定量法の開発と応用 - 」と題して発表していただいた。座長は北海道大学の原先生、そして井口先生はこのシンポジウムの基調講演をされた。会場は満席で立見客は廊下まであふれていた。私達は一年前の長崎大学での井口先生の講演の時と違って、今度は一番後方でつま先立って井口先生の講演や有園先生の講演を聞かなければならなかった。

私達は排水によりもっとも影響を受けやすい「魚類」をターゲットとして環境ホルモンの影響解明に取り組んできたが、言うまでもなくヒトへの影響解明も大きな課題となっている。私達が身近に使用している中でも「環境ホルモンの作用」を持つものが紛れているのも事実である。

本分野における日本の研究者の質は決して世界に引けを取っていない。それどころか、ある分野においてはトップレベルにあるとも言える。それだけに今、この時点から環境ホルモン問題に対して市民、研究者、行政、報道者が一丸となって協力し合い、取り組めばこの問題は必ず解決の方向へと向かうものと信じている。

私達も抗体というものを提供することで、ささやかながらこの



(写真左より) 井出 剛 (株)クマモト抗体研究所  
井口 泰泉 横浜市立大学  
坂本 珠美 (株)クマモト抗体研究所  
中野菜穂子 (株)クマモト抗体研究所

問題に貢献できればと思っている。

現在、定期的に行っている長崎大学水産学部 征矢野助教授らとの有明海における共同野外調査は今後とも続ける方針である。

## 参考文献

- 1) T. Iguchi, H. A. Bern : Transgenerational effects: intrauterine exposure to diethylstilbestrol in humans and the neonatal mouse model. *Comments on Toxicology*, 5: 367-380, 1996.
- 2) Y. Fukazawa, T. Iguchi and H. A. Bern: Mouse anococcygeus muscle : sexual dimorphism and responsiveness to sex hormones. *J. Endocrinol.*, 152: 229-237, 1997.
- 3) N. Nishimura, Y. Fukazawa, H. Uchiyama, T. Iguchi: Effects of estrogenic hormones on early development of *Xenopus laevis*. *J. Exp. Zool.*, 278: 221-233, 1997.
- 4) K. Arizono, S. Sugiura, S. Miyazato, M. Takiguchi and T. Ariyoshi: Studies of DT-diaphorase induction by lead acetate in the liver of rats. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 57(1), 41-46 (1996)
- 5) K. Arizono, M. Yamaguchi, K. Hatano, T. Ariyoshi: Volatile halocarbon compounds induced alterations in the activities of heme and drug metabolizing enzymes and in the contents of hemoproteins and metallothionein in the rats. *Res. Commun. Pharmacol. Toxicol.*, 1(1), 81-90 (1996)
- 6) K. Kawano, T. Baba, Y. Mizukami, K. Arizono and T. Ariyoshi: Acute effect of organotin compounds to red bream and red carp using biological parameters. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 56(5), 774-781 (1996)
- 7) N. Hiramatsu and A. Hara: Relationship between vitellogenin and its related egg yolk proteins in Sakhalin taimen (*Hucho perryi*). *Comp. Biochem. Physiol.*, 115A(3), 243-251 (1996)
- 8) H. Okumura, A. Hara, F. Saeki, T. Todo, S. Adachi and K. Yamaguchi: Development of a sensitive sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for vitellogenin in the Japanese eel, *Anguilla japonica*. *Fish. Sci.*, 61(2), 283-289 (1995)
- 9) H. Chiba, K. Iwatsuki, K. Hayami, A. Hara and K. Yamaguchi: Changes in serum steroid hormones and vitellogenin levels in cultured female European eels *Anguilla anguilla* during artificially induced ovarian development. *J. World Aquac. Soc.*, 25(4), 553-560 (1994)
- 10) K. Ura, A. Hara and K. Yamaguchi: Immunological studies of serum proteins in juvenile masu salmon, *Oncorhynchus masou*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 107B, 225-229 (1994)
- 11) Y. Tao, A. Hara, R. G. Hodson, L. C. Woods III and C. V. Sullivan: Purification, characterization and immunoassay of striped bass (*Morone saxatilis*) vitellogenin. *Fish Physiol. Biochem.*, 12(1), 31-46 (1993)
- 12) A. Hara, C. V. Sullivan and W. W. Dickhoff: Isolation and some characterization of vitellogenin and related egg yolk proteins from coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *Zool. Sci.*, 10(2), 245-256 (1993)

## プロフィール

氏 名 井出 剛 (Tsuyoshi Ide) 37歳

所 属 (株)クマモト抗体研究所 代表取締役社長

〒861-2202 熊本県上益城郡益城町田原2081-10

Tel: 096-289-2310 Fax: 096-289-2313

E-mail: tsuyoshi@po.infobears.or.jp

出身大学 同志社大学法学部政治学科国家学講座

趣 味 読書、郷土歴史資料館めぐり(マンスフェルト、北里柴三郎、リデル・ライト両女史など、熊本の医学発展に寄与した人々の史跡を訪ねること)

# 化学者と パソコン通信 10

金沢大学理学部化学科  
平山直紀・本浄高治

## NetNewsとTelnet

この連載もいよいよ最終回となった。10回というのはそれほど長い連載ではないが、期間的には足掛け4年の月日が経ってしまった。今回は、これまでまだ紹介していないインターネットサービスの中で、比較的重要だと思われるNetNewsとTelnetの2つについて紹介する\*1。

## NetNews

第4回で紹介したように、パソコン通信において情報収集に最も有効な場は電子会議室（フォーラム・SIG）である。なぜなら、そこでは特定分野やテーマに興味を抱くメンバーが集まって意見や情報の交換を行っているからである。つまり、疑問などが生じたときには、その分野に関する電子会議室で発言すれば、他のメンバーから意見や情報などの発言が返ってくるわけである。

これと同じようなサービスが、インターネット上にも存在する。NetNews（ネット・ニュース）\*2と呼ばれるこのサービスでは、発信地や分野ごとに非常に多くのグループ（「ニュースグループ（NewsGroup）」と呼ばれる）が用意されており、その数は数万にも及ぶ。ユーザーは自分の興味あるグループに寄せられた「記事」を読み、自分の意見などを「投稿」というシステムになっている。

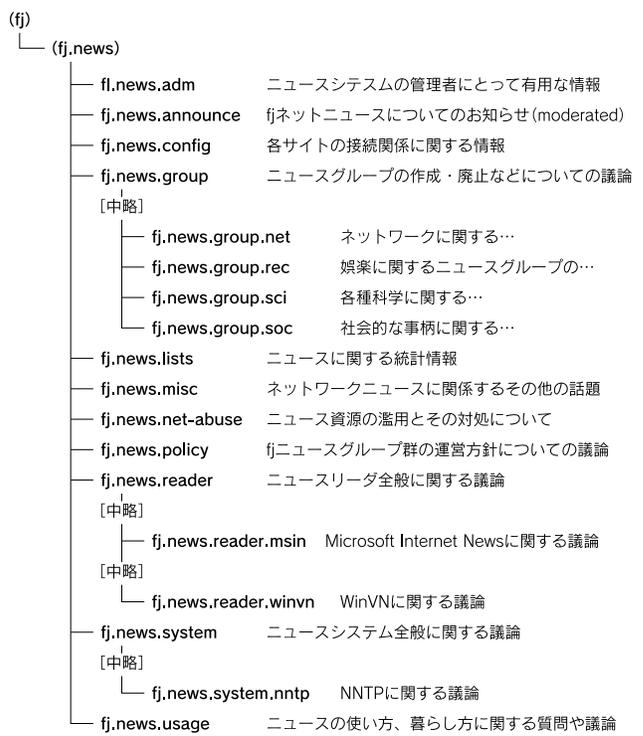
ニュースグループは、ハードディスク内のファイルのような階層構造をとっており、「fj.sci.chem」のようにピリオドで区切られて表示されている\*3。一番前に書かれている最上位の階層（上の場合は「fj」）はトップグループ（あるいはニュースカテゴリ）

表1 NetNewsの主なトップグループ

グループ名	由来・語源	解説
<b>英語を用いるグループ</b>		
bionet.*	biology network	バイオ関連科学技術の話題を扱う "BIOSCI"とも呼ばれる
biz.*	business	ビジネスに関する話題を扱う
comp.*	computer	コンピュータ関連の話題を扱う
news.*	news	NetNews自体に関わる話題を扱う
rec.*	recreation	趣味に関する話題を扱う
sci.*	science	科学全般に関する話題を扱う
soc.*	social issues	社会問題等の話題を扱う
talk.*	talk	主に政治に関する話題を扱う
alt.*	alternative	雑多なテーマを扱う(ジャンルを問わない) 変わったテーマが多い
misc.*	miscellaneous	他のカテゴリーに分類できないような話題を扱う
<b>主として日本語を用いるグループ</b>		
fj.*	from Japan	日本のインターネット初期から存在する 最大規模の日本語NewsGroup 非営利記事に限る
tnn.*	The Network News	1993年発足 IJ(フロンティア) 主宰のNewsGroupの一つ 営利目的記事の投稿も可能
japan.*	Japan	1996年発足 alt.*の日本語版的存在 営利目的記事の投稿も可能

表2 NetNewsに関するグループ群 fj.news.\* の階層構造

注: Visualized Active Newsgroups List of fj [as of 1998/01/19]  
(Itaru Ichikawaさん作) より抜粋し、一部改変したものです。



と呼ばれており、ニュースグループの運営・管理（新しいグループの設置の決定など）は、おおむねトップグループ単位で“グループ群”<sup>\*4</sup>として行われていると考えてよい。参考として、表1に主なトップグループを紹介しておく。また表2には、ニュースグループの階層構造を理解していただくための例として、“fj”の中のNetNewsに関するグループ群（fj.news.\*）の階層構造の抜粋を示す。

NetNewsがフォーラムやSIGと最も異なるのは、「ニュースグループには“管理者”がない」という点である。実際問題として“管理者”もしくはそれに類似した名称の人物は存在するのだが、彼らにはフォーラムやSIGの場合のような「絶対的な権限」が与えられていない<sup>\*5</sup>のである。NetNewsでは伝統的に個人責任が徹底しており、記事内容に関しては投稿者自身が責任を持つことになっている。

さて、NetNewsを利用するためには、利用可能なニュースサーバ<sup>\*6,7</sup>が必要不可欠である。ニュースサーバではあらかじめ特定してあるグループの記事を受信して保管しており<sup>\*8</sup>、ユーザーはこのニュースサーバに接続して記事を読むことになるのだが、そのために必要なのが「ニュースリーダ」と呼ばれるソフトである。Internet Explorer 4.0に含まれている“Outlook Express”<sup>\*9</sup>や、Netscape Communicator 4.0の“Netscape Collabra”<sup>\*10</sup>などを利用してNetNewsを楽しむことも可能であるが、やはり専用のニュースリーダを用意した方が使い勝手がよい。WindowsではシェアウェアのWSNewsやフリーウェアのWinVN-Jなどが、MacintoshではフリーウェアのNewsWatcher<sup>\*11</sup>やNewsAgentなどが代表的である。もちろん、自分から記事を投稿したり、他の人の記事に対するコメント（「フォロー」と呼ばれる）を送る際にもニュースリーダを用いる。さらに、記事の著者に対するコメントを、ニュースリーダから直接E-mailで送ることも可能である<sup>\*12</sup>。

なお、フォーラムやSIGではかなり前の発言まで遡って読むことが可能なのに対し、NetNewsでは通常数週間程度（ニュースサーバにより異なる）で記事が更新されてしまうので、話題についていくためにはある程度こまめに記事をチェックしなければいけない。ただし、過去の記事を保管して公開しているところがあるため、そこでならばバックナンバーを参照することができる<sup>\*13</sup>。

実際にニュースリーダを用いて記事を読んでみると、ヘッダの構造がE-mailと似ていることに気づく<sup>\*14</sup>。宛先は“To:”ではなく“Newsgroups:”となっているが、同一の記事を複数のニュースグループに投稿する場合は、ここにグループ名をカンマ区切りで列挙すればよい<sup>\*15</sup>。その他、記事の特定には“Message-ID”<sup>\*16</sup>が用いられるということも覚えておいてほしい。

NewNewsに投稿する記事に関しては、E-mailと同様の注意（「機種依存文字は使わない」「文章は短く、引用は最小限に」<sup>\*17</sup>「誹謗中傷、ケンカをしない」「Subject:」では日本語（全角文字）を避ける」「半角カナは使わない」）がそのままあてはまる。不特定多数の人が記事を読むことになるので、E-mailの時以上の注意が必要である<sup>\*18</sup>。また、当然の事ながら、英語のニュースグル

表3 化学および関連分野の日本語ニュースグループ

	fj内のグループ	tnn内のグループ
化学関連	fj.sci.chem	tnn.chem
物質科学関連	fj.sci.matter	
材料科学関連	fj.engr.materials	
物理学関連	fj.sci.physics	tnn.physics
医学関連	fj.sci.medical	tnn.medical
生物学関連	fj.sci.bio	tnn.bio
地球科学関連	fj.sci.geo	
環境問題関連	fj.soc.environment	tnn.forum.nature
重油流出事故関連	fj.disaster.oil-spill	

ープへの記事に日本語を使ってはいけない。さらに付け加えておくと、日本語の利用を求めているニュースグループにおいては、「JISコード（ISO-2022-JP）を用いる」ように決められているので、各種設定を間違えないよう気をつけよう<sup>\*19</sup>。

歴史が古く、インターネットに詳しい人たちが好んで利用する傾向にあるNetNewsは、初心者には少々敷居の高いサービス<sup>\*20</sup>かも知れない。しかし、こちらから質問を投稿できるのであるから、上手に使えばかなり有効な情報を得ることが期待できる。日本語を用いることのできるfjとtnnで開設している化学およびその関連分野のニュースグループを表3に紹介しておくので、最初は“Read Only”で雰囲気をつかむように努め、慣れてきたら積極的に利用することをお勧めする。

## Telnet

Telnetは、インターネットに接続されたマシンに外部から接続し、これを遠隔操作で利用するために用いられるものである。このことを実現するためにインターネットが作られたと言っても過言ではないくらい、最もベーシックなインターネット利用法である。

UNIXワークステーションなどは元々Telnetの機能を有しており、“telnet ドメイン名またはIPアドレス”と入力するか、単に“telnet”とだけ入力して画面に“TELNET>”と表示されてから“open ドメイン名またはIPアドレス”と入力することにより、先方へのTelnet接続がなされ、IDおよびパスワードの入力（認証）をすることにより遠隔操作が可能となる<sup>\*21</sup>。

一方、パソコンはそうにはできていないので、パソコンからTelnet接続を行うためには、やはり専用のソフトウェア（Telnetクライアント）<sup>\*22</sup>を用意する必要がある（さしものWWWブラウ

表4 主な商用ネットのTelnet接続先ドメイン名とその際の従量制料金体系の概要

	接続先ドメイン名	従量制料金体系の概要
NIFTY-SERVE	(最初) niftyserve.or.jp (2度目から) r2.niftyserve.or.jp	2400bpsと同じ
BIGLOBE PC-VAN	pcvan.or.jp	2400bpsと9600bpsの間
ASAHIネット	asahi-net.or.jp	同じ(通信速度によらない)
People	people.or.jp	2400bpsと同じ

ザにもこの機能はついていない)。すばらしいことに、Windows95では“TCP/IP”をインストールしたときにもれなく“Telnet”もはいつてくるので、さらなるソフトは不要である<sup>\*23</sup>。Windows3.1の場合は、フリーウェアのTeraTermやシェアウェアの秀Termを利用する人が多い。また、Macintoshの場合はフリーウェアのNCSA Telnet-Jを利用する人が圧倒的に多い。

さて、次に“Telnetを用いて何が出来るか”を紹介しなければならないのだが、UNIXワークステーションの使い方がわからなければTelnet接続してもあまり意味がないし、逆に使い方がわかっている人には今さらTelnetの説明などは必要ないであろう。この連載を読んでいる人にとって比較的有用な使い途の一つとして、インターネット経由でのパソコン通信への接続が考えられる。特にLANが利用できる環境の場合、明らかにTelnetで接続した方が転送速度が速いし、電話代もかからない。おまけに従量制の場合は接続料金まで安い。連載第3回で紹介した主な商用ネットについて、Telnet接続の際の接続先ドメイン名と従量制料金体系の概要を表4に簡単に紹介する<sup>\*24</sup>が、詳細は各ネットの中で確認していただきたい。

その他にも、商用あるいは学術データベースなどには、Telnet接続によって利用するようにできているものが少なくない。WWWが便利になったとはいえ、転送速度などの点ではまだまだテキストベースのものの方が有利であるので、これらの利用方法を知っておけば何かと都合がよいのではないだろうか。

さて、この連載を続けている間にパソコンを取り巻く環境は大きく変化してしまった<sup>\*25</sup>。パソコンのマシンパワーは強力化の一途をたどり、電話回線のデジタル化も想像以上の速さで普及している<sup>\*26</sup>。そして、いわゆる「ネットサーフィン」を快適に行えるだけのハードウェアを簡単に用意できるようになって、インターネットはますます広く浸透してきている<sup>\*27</sup>。その反面、インターネットでは原則として情報にお金がかからないということもあってか、有料サービスが多いパソコン通信は最近少し元気がなくなってきている。

しかし、インターネット上で必要な情報を探すというのは、今日でもなお楽な作業ではない。こういった面では、情報がしっかりと管理されているパソコン通信の方がはるかに便利であると言えるであろう。両方をうまく使い分け、情報の波を上手に泳いでいくことがこれからは必要になってくると思われる。

連載の最後にあたり、本文より脚注の方が長かったり、毎回文体が違ったりするこの怪しげな文章を辛抱強く読み続けて下さった読者の方々に厚くお礼を申し上げます。この連載では、どのテキストにも載っているような情報に全く触れないことがよくある代わりに、表立っては誰も言わないような重要情報を少しでも盛り込むように努めてきたつもりである。化学に携わる方の情報収集のために少しでも役に立てたなら、著者として大変喜ばしい限りである<sup>\*28</sup>。

注

- \* 1 NetNewsとTelnet：両方とも“net”という共通した名前を持っているが、両者に共通の要素はない。単にまだ紹介していないものを一回にまとめただけである。このあたりがいかに最終回らしい。
- \* 2 NetNews：名前だけ見ると報道記事が配信されるかのような、あるいはインターネットのインフォメーションサービスであるかのような印象を受けるが、“news”には「音信、便り」という意味がある。
- \* 3 ニュースグループ名：ピリオドで区切るこの形式は、サーバのドメイン名に似ている。ただし、ニュースグループ名では前に書いてあるのが上位の階層であり、この点では後ほど上位階層であるドメイン名と正反対である（だからハードディスクを引き合いに出しているのである）。
- \* 4 グループ群：グループ群を表記するための方法として、例えば「fj.sys.\*」などのように記す。これで「fj.sys」の中にあるすべてのニュースグループ（fj.sys.macやfj.sys.pc98など）を意味する。当然ご存じだとは思いますが、“\*”は「何でもOK」という意味のワイルドカードである。
- \* 5 「絶対的な権限」が与えられていない：例えば、不穏な記事を強制削除するというような事はNetNewsではまずあり得ない。NetNewsは、ボランティアによって作られたアメリカの草の根ネット“Usenet”を中心として発展してきたものであり、その管理は必要最小限にとどめられている（よく考えてみれば、インターネット自体が“管理”されていないものなのだから、当然と言えば当然である）。ただし、グループ群の運営・管理に関わる情報を提供するようなグループや、特定の情報を提供するためのグループなどでは、例外的に“moderator”と呼ばれる管理者経由でしか投稿できないシステムとなっている（このようなグループは“moderated”と明示されている）。
- \* 6 ニュースサーバ：NNTPサーバとも呼ばれる（NNTPはNetwork News Transfer Protocolの略で、ニュースのやりとりの手順を定めたものである）。E-mailの場合と同様、ニュースはいろいろなところのニュースサーバ間を渡り歩いて送られていく。
- \* 7 利用可能なニュースサーバ：LANに接続されたマシンであればそのLAN上にあるニュースサーバが、ダイヤルアップ接続であれば接続先のプロバイダのニュースサーバが、それぞれ利用可能である。ニュースサーバの場合、通常はID/パスワードによる認証ではなく、接続できるマシンの範囲を制限することでユーザーの限定を行う。E-mailの場合と異なり、ニュース記事は公開されるものであるから、セキュリティに関する問題自体が発生しない（ただし、内容の変更を防ぐため、NNTP以外の手順による利用は通常許されていない）。なお、誰でも使えるオープンニュースサーバや、対価を払って利用できる有料ニュースサーバも、外国には存在するらしい。
- \* 8 ニュースサーバのニュース受信：正しく言うと「決めてあるグループ以外の記事の転送には関与していない」。したがって、ニュースサーバが受信していないグループの記事を読むことはできないし、そのようなグループに記事を投稿することもできない（ちなみに筆者らの利用している金沢大学のニュースサーバは、約8,700のグループからのニュースを受信している）。ニュースグループの内容うんぬん以前の問題として、すべてのニュースグループの記事を一つのサーバで抱え込むことは物理的に不可能である。
- \* 9 Outlook Express：IE3.0では“Internet Mail and News”という名前であったが、大幅に改良されている。
- \* 10 Netscape Collabra：Netscape Navigator 3.0に組み込まれていた“Netscapeメール”と“Netscapeニュース”が、バージョンアップを機に一体化したものである。
- \* 11 NewsWatcher：元々は英語版のソフトであるが、日本語対応に改良されている。ただし、最小限の改良にとどめているもの（NewsWatcher+jp）と、完全日本語化したもの（NewsWatcher-J）との2種類が、別々のグループによって作製されているのでご注意ください。
- \* 12 E-mailによるコメントの発信：もうお気づきだとは思いますが、ニュースリーダでのE-mail利用は“送信”のみである。したがって、ニュースリーダの初期設定画面に「メールサーバ」という欄がある場合、そこに記入するのは「POPサーバ」ではなく「SMTPサーバ」のアドレスである。両サーバが別になっている場合には気をつけていただきたい。
- \* 13 過去の記事の保管：例えばfj.\*の場合、http://www.cs.orst.edu/takikawn/fj/retrieval.htmlに保管場所の一覧が紹介されている。
- \* 14 記事のヘッダ：「記事を投稿する」という行為は「E-mailを送信する」と似ているので、ヘッダが似ているのは当然とも言える。なお、へ

ッダに書いてある内容がE-mailより多くて、架空のものを作りにくいので、見本の掲載は勘弁していただきたい。

- \* 15 同一記事の複数グループへの投稿：正確には「列挙すべき」である。ニュースサーバは記事を後述の“Message-ID”で管理しているので、このようにしておけばニュースサーバに保管される記事は1通で済む（このような投稿のしかたを「クロスポスト」という。ちなみに、別々に投稿するのは「マルチポスト」といい、この世界では大変に嫌われている）。
- \* 16 Message-ID：投稿された記事には、発信元のニュースリーダによって、“識別用文字列@その記事を管理するサーバのドメイン名”という形式のMessage-IDがつけられる。これは記事ごとにすべて異なるので、他の記事を引用するときにも、本文またはヘッダの“References”にMessage-IDが記入してあれば、元の記事を特定できる（「全く知らない人もその記事を読む」ということを忘れてはいけない。フォーラムやSIGと異なり、NetNewsで記事に通し番号を打つことは物理的に不可能である。記事の到着順序もサーバごとに異なる）。
- \* 17 文章は短く：E-mailとは異なり、ネットニュースの記事は「そこらじゅうにばらまかれる」ので、ネットワークの負荷には十分配慮する必要がある。極端な話、文章の訂正ですら「見ればわかるようなもの」ならば投稿してはいけないとまで言われている。
- \* 18 E-mailの時以上の注意：これは盲点なのだが、自分の記事に対してE-mailで送られてきたコメントを、次の記事で引用してはいけない。わざわざE-mailにしているのだから、他人に見せたくない場合だって考えられる。
- \* 19 JISコードの使用：利用しているニュースリーダによっては、他の文字コードでも正しく表示してくれる場合もある。このため、設定を間違っても自分では気づかない（自分のところでは読めてしまう）ことがよくある。何もNetNewsに限ったことではないのだが、気をつけるようにしたいものである。
- \* 20 初心者には敷居の高いサービス：フォーラムやSIGの場合のように「失敗を恐れずにどんどん利用しよう」と明言できないところがツライ。コンピュータの使い手の中には、他の人にも同程度の知識を要求するようなタイプの人もいて、いきなり怒られたりすることも稀にある。
- \* 21 Telnet接続：Telnet接続したマシンから、また別のマシンにTelnet接続することも可能である。
- \* 22 Telnetクライアント：これらのソフトを用いてTelnet接続する時には、「接続」（あるいはこれに類する）コマンドを選択すればよい。そうすると、接続先のサーバ名入力を求めるウィンドウが登場するので、そこに接続先を入力して実行すれば、あとはIDとパスワードの入力により遠隔操作が可能になる。
- \* 23 Windows95用のTelnetクライアント：付属のものでは物足りないと思う方には、フリーウェアのTeraTerm ProやEmTerm、シェアウェアの秀Termなどがおすすめである。
- \* 24 主な商用ネット：第3回の時より数が減っていることにお気づきだろうか？ 実はASCII netは97年8月24日限りで、また日経MIXは97年10月31日かぎりで、それぞれサービスを終了してしまった。淋しい限りである。
- \* 25 パソコンを取り巻く環境の変化：大きな声では言えないが、この連載のタイトルが「化学者とパソコン通信」となっているあたりに変化の激しさが表れている。今から連載を始めるのなら、絶対に「化学者とインターネット」にしていたであろう。
- \* 26 電話回線のデジタル化：第6回に少しかだけ触れた“INSネット64”の人氣は想像以上であった（やるなあ、NTT……）。しかし水を差すようで悪いが、落雷がTA（ターミナルアダプター）を直撃してTAがブツ壊れたという話をときどき目にする。パソコンまでイカしてしまった例もあるようで、この面でも「デジタル恐るべし」である。
- \* 27 インターネットの普及：個人のWebページを持つ人もずいぶん増えてきた。ワープロソフトのなかには、Webページを直接デザインできるものも多くなってきている（完成品をそのままHTML言語に翻訳し、挙句の果てにはアップロードまでできたりもする）。
- \* 28 最後の最後に：「まだ脚注があるのか」とあきれられる方もいるかも知れないが、第1回目からここまで「言わなければいけない」とずっと思っているながら言いつぶれていたことを最後に小声で言って、連載の締めとしたい。

間違っていたら、ごめんね。

# 試料の前処理

## 10

(株) 同仁化学研究所  
大倉洋甫

この連載では、生体試料中などの微量有機化合物分析を主にHPLCで行うときの試料の前処理の方法を概観している。1～6項で基礎的考察、7項で液・液抽出、8項で固相抽出を含む固・液抽出、9項で透析、10項で限外濾過についてお話しした。

### 11. 除たんぱく

試料中にたんぱく質が共存すると、低分子物質の測定妨害となることが多い。この妨害を排除するための伝統的方法の1つが除たんぱく法である。これには除たんぱく剤を使う方法、水と混和可能な有機溶媒による変性法、加熱または冷却による熱変性法などがある。

除たんぱく剤は陽イオン性除たんぱく剤と陰イオン性除たんぱく剤に分類できる。

陽イオン性除たんぱく剤はアルカリ性域で使用する。試料に水酸化ナトリウム液と硫酸亜鉛液を加えて100 に加熱する。水酸化バリウム液と硫酸亜鉛液を使うと加熱は不要となる。ただし水酸化バリウム液の調整と保存がめんどうである。これはSomogyi (ソモジー) 法と言われ、血液中の尿酸、グルタチオン、グルクロン酸などの還元性物質をたんぱく質と共沈させるので、血中の還元糖をその還元力で測定するとき繁用された。水酸化ナトリウムまたは水酸化バリウムに硫酸銅を組み合わせて使う方法も同様に用いられて来た。沈殿たんぱく質は遠心あ



図11-1 4-メトキシベンズアミジン

るいは濾過して除去する。

陰イオン性除たんぱく剤として酸が使用される。また酸性で行われる。実験室でよく使われる過塩素酸は最終濃度が約0.4Mとなるように、通常1～4M溶液として試料に加える。遠心して得た上清中の過剰の酸は濃厚な(5M程度がよく使われる)炭酸カリウム液を加えて難溶性の過塩素酸カリウムとし、遠心除去する。トリクロロ酢酸は通常10%溶液として試料に加え、最終濃度を2～5%とする。上清中の酸が分析を妨害するときはジエチルエーテルで抽出して除く。メタリン酸はアスコルビン酸などの測定などの際の除たんぱくに用いる。スルホサリチル酸は尿中たんぱく質の検出に使用された。

陰イオン性除たんぱく剤として硫酸あるいは硫酸ナトリウムアルミニウム(ミョウバン、水溶液は強酸性)とタングステン酸ナトリウムの組合せも使用されてきた。ミョウバンとの組合せを使う方法は、ミョウバン溶液の調製と取り扱いが容易で、便利である。

牛乳に4～5倍量のアセトンを加えるとたんぱく質のカゼインが変性して沈殿する(因みにその上清を放置するとアセトンラクトースの美しい結晶が析出する)。このように水と混和する有機溶媒のアセトン、アセトニトリル、エタノール、メタノールなどは試料と混和したときの最終濃度が50～80%でたんぱ

く質を沈殿させる。50%エタノールの噴霧で器具の消毒ができることから分かるように、溶媒の最終濃度が低くてもたんぱく質の変性は一般的に起きる。しかし触媒にもよるが、消毒用エタノール濃度(70%)より少し高い溶媒最終濃度(約80%)とするのが無難である。

アセトニトリルで血清を除たんぱくし、還元糖類を測定した例をあげよう。還元糖は水酸化カリウムアルカリ性で4-メトキシベンズアミジン(図11-1)と加熱すると速やかに(100では2～3分で反応終結)蛍光物質を与える。シリカゲルカラムを用いたアセトニトリルとテトラエチレンペンタミン-タウリン水溶液の混液を移動相とする還元糖のHPLCがある。このHPLCにおける検出系に上記の反応を適用したポストカラム蛍光誘導化LCシステムを作った。このシステムに、ヒト血清50μlをアセトニトリル200μlと混合し、1,000×gで10分間遠心して得た上清100μlを注入した。正常ヒト血清で得られるクロマトグラムの例を図11-2に示す。詳細は文献(甲斐雅亮他、分析化学38、568(1989))をご参照戴きたい。

水に難溶のクロロホルムにメタノールを加えた混液はたんぱく質の沈殿と脂質の抽出に用いられて来た。

たんぱく質は等電点のpHで疎水性が最大となり、沈殿し易い。通常試料には多種のたんぱく質が含まれている。これらの等電点を考慮せず、また試薬も使用しないで、これらのたんぱく質を変性沈殿させるには加熱または冷却を行う。加熱は100で数分間行うのが普通である。このとき熱による目的物質の変化に注意が必要である。冷却は試料液が凍結しない適当な温度とし、放置して行う。加熱、冷却いずれの場合も沈殿たんぱく質は遠心分離して除く。

なお、除たんぱくは固相抽出(ドージンニュース No.84 8項c参照) 限外濾過(ドージンニュース No.86 10項参照) あるいはゲル濾過クロマトグラフィー(水系のサイズ排除クロマトグラフィー)によっても微量試料で行うことができる。

また、除たんぱく操作を表面ウシ血清アルブミンコーティング型ODSカラム(自製可能) 内面逆相型ODSカラム(ピンカートンカラム) ゲル濾過用充てん剤の小カラムなどのプレカラム(前処理カラム)を使用して行うHPLCが実用されている。これは生体試料中の生理活性成分や薬物などを自動カラムスイッチング法で省力的かつ迅速にルーチン分析するのに適している。自動化した固相抽出装置とHPLCを結合し、生体試料の微量ルーチン分析に活用することも行われている。

(天津にて)

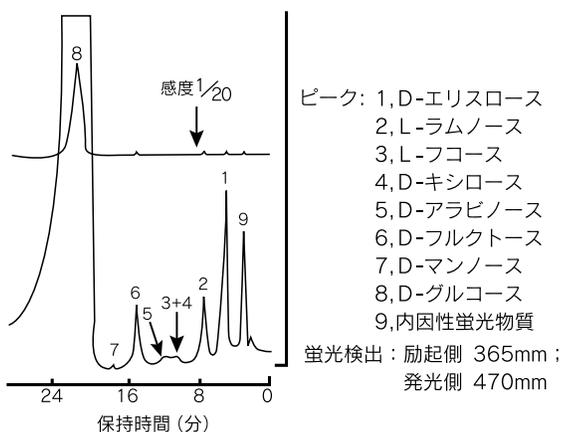


図11-2 正常ヒト血清中還元糖のクロマトグラム

# Topics on Chemistry

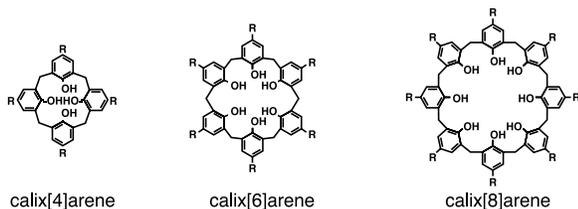
## 包接認識化合物、カリックスアレーン

～キラル認識特性を持つカリックスアレーン誘導体～

(株)同仁化学研究所 大瀬戸文夫

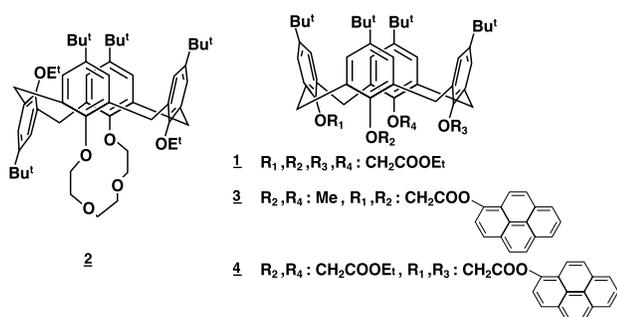
### 【カリックスアレーン誘導体の認識特性】

カリックスアレーンは、フェノールとホルムアルデヒドのアルカリ条件下での縮合反応で合成される大環状化合物であり、合成反応条件（塩基の種類、濃度および温度など）を厳密に調節すれば、高度希釈条件下で行う必要もなく、大きさの異なるものを選択的にかつ大量に合成することが可能である<sup>1)</sup>。



カリックスアレーンは、下端側および上端側にそれぞれフェノール性水酸基および芳香環を持ち、様々な機能性官能基による化学修飾に対して活性である。芳香環の反転によるコンフォメーション異性体が存在し、嵩高い置換基を導入することにより芳香環の反転を抑制し異性体をそれぞれを単離することも可能である。また置換基を位置選択的に導入したレジオ異性体を合成することも比較的容易である。更に、クラウンエーテルなどと比較して分子自由度が低く、したがってゲスト分子に対して「pre-organized」したホスト分子の設計が可能である。

このような理由から、カリックスアレーンはクラウンエーテルやシクロデキストリンとともに包接化合物の基幹物質として数多く利用されるようになった。これまで数多くの研究報告のもとに包接認識特性が明らかとなり、今では「第三の包接化合物」と言われるように超分子化学の中心的な役割を演じる多彩多芸な化合物として注目を集めるようになった<sup>2)</sup>。

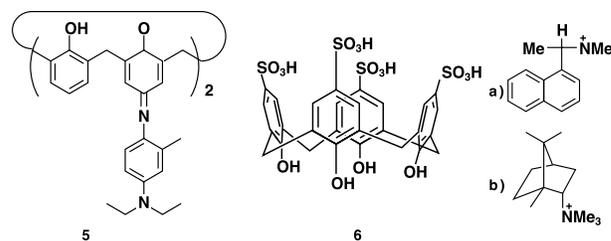


カリックスアレーン誘導体の下端側水酸基には、酢酸エステル(1)あるいはオキシエチレン鎖を基本とした金属イオン包接部位を容易に構築することが可能であり、したがって、それをもとにしたイオン選択性電極用イオノフォアを容易に合成することができる。山本ら<sup>3)</sup>は、カリックスクラウン誘導体を用いて、カリウムに対して実に10万倍に達するナトリウム選択性イオノフォア(2)を開発しており、Backerらもその事実を確認している<sup>4)</sup>。これは、これまでに開発されたナトリウムイオノフォアの中では最も高い選択性を示すものであり、ゲスト分子に大きさを合わせて

「pre-organized」したホスト分子を設計・合成できるカリックスアレーンの利点をうまく利用した結果と言える。

カリックスアレーンは化学修飾に対して活性であり、様々な発色団を容易に導入することが可能である。したがってゲスト分子を認識したことに対する応答も、先に示した膜電位変化ばかりでなく、紫外可視吸光、蛍光および円二色性スペクトルなど様々な方法で読み出すことが可能である。青木ら<sup>5)</sup>、あるいはJinら<sup>6)</sup>はカリックスアレーンにピレニル基を導入した蛍光性カリックス[4]アレーン誘導体を合成し(3, 4)、ナトリウムイオンの蛍光性包接認識化合物としての特性を示した。更に、久保らはカリックスアレーン骨格自体を色素化した、インドアニリン誘導体型カリックスアレーン類を開発し、カルシウムイオン比色認識化合物(5)としての特性を示すことを明らかにした<sup>7)</sup>。

一方、カリックスアレーンは上端側に芳香環を環状に配置した疎水性空孔を持ち、疎水性相互作用、CH-あるいはカチオン-相互作用などにより有機分子をその空孔内に取り込むことができる。また、カリックスアレーンにスルホン酸基を導入して水溶化することが可能であり(6)したがって、水に不溶性の有機分子をその空孔内に捕捉して可溶化することが可能である<sup>8)</sup>。最近では、カリックス[8]アレーンを用いて煤の中からバックミンスターフラーレン(C<sub>60</sub>)のみを抽出精製方法が見い出されている<sup>9)</sup>。このように、カリックスアレーンの有機分子包接認識素子に関しても数多く報告されている。



### 【カリックスアレーンによるキラル識別】

生体膜に存在する無数のレセプターとそれに結合するリガンド、あるいは抗原と抗体の認識反応に代表されるように、生体内には数多くの分子認識機構が存在している。それは、鍵と鍵穴の例で示されるように非常に厳密である。生体機能を模倣する「biomimetic chemistry」や、分析化学、生物化学などの多くの研究分野において、光学活性分子の鏡像体の認識・識別は大変重要なテーマとして取り上げられている。ここでは、カリックスアレーンを用いたキラル認識素子について最近の報文の中から幾つか紹介したい。

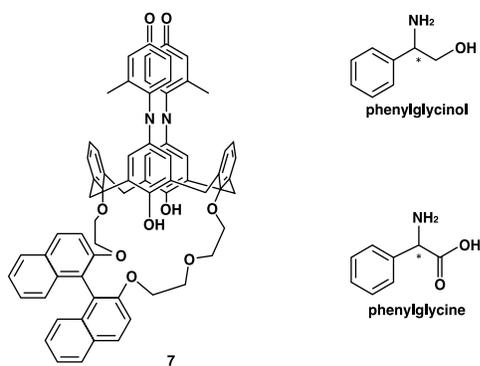
#### 1. 誘起円二色性スペクトルによるキラル認識

アドレナリンなどの神経伝達物質やアミノ酸などに代表される有機アミン類は、生理活性物質として重要な生体成分であり、その多くが不斉炭素を持つキラルな分子である。カリックスアレーンスルホン酸誘導体(6)は、分子不斉のない対称性の高い化合物

物であるが、系内に光学活性アミン類 (a あるいは b) を共存させると、カリックスアレーンの環構造に不斉が生じ、誘起円二色性 (ICD: induced circular dichroism) スペクトルを示すことが諸角らによって明らかにされた<sup>10)</sup>。これは、空孔内に取り込まれた光学活性アミンの側鎖部位とカリックスアレーンの芳香環の立体的反発によって、光学活性アミンの不斉を反映した芳香環のねじれの結果と考えられている。

彼らは更に水溶性カリックスアレーンを用いたアミノ酸およびその誘導体のキラル認識について検討している<sup>11)</sup>。しかしながら、フリーのアミノ酸の場合、光学活性アミン類で生じたようなICDスペクトルは全く認められていない。<sup>1</sup>H-NMRスペクトルにより、そのアミノ酸類とカリックスアレーンとの相互作用を検討してみると、不斉炭素付近のプロトンの化学シフトが高磁場側へほとんどシフトしていないことから、フリーのアミノ酸はカリックスアレーン空孔内に深く取り込まれていないことが分かった。これはアミノ酸が親水性であるためと、アミノ酸のカルボン酸基とカリックスアレーンのスルホン酸基との間の電気的反発のためであろうとしている。一方、カルボン酸をメチルエステル化したアミノ酸類では、その不斉に応じてカリックスアレーンのICDスペクトルが観測されている。この場合も、アミノ酸類の不斉炭素に結合する側鎖の立体配置にしたがってカリックスアレーンの芳香環にねじれが生じることがICDの要因と考えられている。

この水溶性カリックスアレーンは、それ自身は分子不斉を持たない化合物であるが、アミン類あるいはアミノ酸誘導体などのゲスト分子の立体配置に誘起されて光学活性を示すことから、そのゲスト分子の絶対配置、キラリティーを予測する有用なホスト分子であると言える。



## 2. クロモジェニックカリックスアレーンを用いたキラル識別

久保らはインドフェノール誘導体型カリックスアレーン類を用いたクロモジェニックレセプターの開発を精力的に進めており、これまでナトリウムイオン<sup>12)</sup>、カルシウムイオン<sup>7)</sup>あるいはウラニルイオン<sup>13)</sup>の比色認識レセプターを開発している。彼らはこの分子に光学活性を持つ置換基を導入し、分子不斉を色の変化として認識するクロモジェニックカリックスアレーンを開発している<sup>14)</sup>。

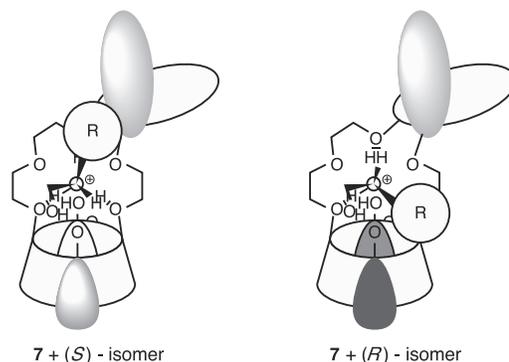


Fig.1

分子の不斉を認識するには、少なくとも3点で相互作用するようホスト分子を設計する必要がある。カリックスアレーンは、その環構造が比較的堅く、したがってゲスト分子の構造に合わせて機能性官能基を立体的に配置したホスト分子を構築することができる。

久保らは、分子の不斉認識情報を効率良く光学的信号に変換処理するために、「dual optical sensory system」という新しい分子設計の概念を提唱している。これはホスト分子に環境のことなる二つの色素単位を導入し、お互いに機能を協調させ、不斉認識信号の増幅を計るというものである。

その分子設計思想をもとに、光学活性ピナフチル基を不斉認識近傍に持つインドアニリン誘導体型カリックス[4]アレーン (7) が合成された。この化合物は、エタノール溶液中515.5nmに吸収 ( $\epsilon = 14,500 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) を持ち赤色を呈しているが、その溶液に光学活性第一アミンである (R)-フェニルグリシノールを添加したところ色調は赤色から青紫色へと変化した。これはインドフェノール誘導体の本来の吸収波長が538 nmにシフトすると共に、インドフェノール水酸基の解離による650 nm付近に新たな吸収が出現したためである。一方、鏡像体である (S)-フェニルグリシノールを添加した場合は650 nm付近のわずかな吸収のみが観測されただけで、538 nmの波長シフトは全く起こらず色調変化はほとんど起こらなかった。この不斉認識応答による色調変化は、肉眼でも識別可能なほどはっきりしたものである。大過剰の (S)-フェニルグリシノール存在下においても、その濃度に全く影響されることなく (R)-フェニルグリシノールの添加量に応じて吸収波長変化が起こることから、たとえR体とS体の混合物であっても正確にR体の濃度を求めることが可能である。

この化合物とゲスト分子との錯体は Fig. 1 のように考えられている。分子の不斉を認識するには少なくとも3点で相互作用する必要があり、この場合クラウンエーテル部位、インドフェノール基およびピナフチル基がそれに関与している。クラウンエーテル部位とインドフェノール部位ではゲスト分子の間で分子間水素結合を形成し、それがゲスト分子のアンカーの役目を果たす。そこでキラル炭素と窒素原子の単結合の回転が固定される結果、ゲ

スト分子側鎖の芳香環とピナフチル基との立体的反発の度合いがエナンチオマーによって違うことからキラル認識が発現したと考えられている。一方、色調の変化は、酸塩基反応によるインドフェノールの脱プロトン化と、ピナフチル基の倒れ込みによる疎水環境の強化に影響されたもう一方の色素の接動の二つが協調変化して達成されたと考えられている。

この化合物はエナンチオ選択的に色調が変化する比色不斉認識素子として機能するばかりでなく、一方の鏡像体のみを選択的に抽出する抽出試薬としての役割も果たす。アミノ酸類は一般的に有機溶媒に不溶であるが、この化合物を用いることで片方の鏡像体のみをエナンチオ選択的に固液抽出することができる。アミノ酸類似体としてフェニルグリシンを選び、結果としてR体のみが抽出されることを明らかにすると共に、エナンチオ選択的比色応答することを確認している<sup>14)</sup>。したがってこの化合物は、比色をもとした光学純度分析試薬としての応用が大いに期待される。

#### 【最後に】

天然には分子不斉を持つ化合物が極めて多量存在し、生体内ではそれぞれ一方の鏡像体を生理活性物質として認識し利用している。それは、地球上に生命が誕生して以来数十億年の長い間に蓄積された蛋白質を中心とした高分子認識素子を用いることにより実現されてきたものである。超分子化学者は、それを分子量数千程度の小分子で実現しようというのである。金属イオンの認識素子においては、すでに天然物を凌駕する選択性を持つものが出てきている。分子認識においても、近い将来天然物に匹敵するほどの選択性をもつものが現れるであろうし、カリックスアレーン誘導体もその一翼を担うであろうとの想像に難くない。

#### 参考文献

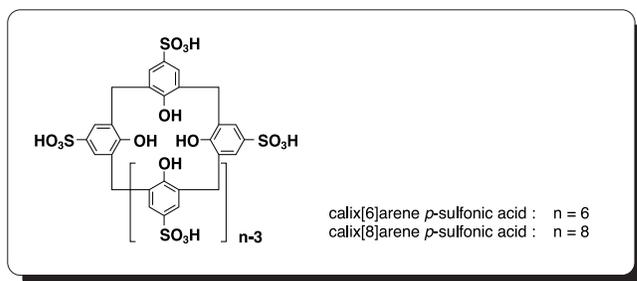
- 1) C. D. Gutsche, Calixarenes, Royal Society of Chemistry, Cambridge, 1989.
- 2) (a) M. Takeshita, S. Shinkai, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **68**, 1088 (1995) (b) V. Bömer, *Angew. Chem. Ed. Engl.*, **34**, 713 (1995) (c) A. Ikeda, S. Shinkai, *Chem. Rev.*, **97**, 1713 (1997)
- 3) H. Yamamoto, S. Shinkai, *Chem. Lett.*, **1994**, 1115.
- 4) E. Backer, *Anal. Chem.*, **69**, 1061 (1997)
- 5) I. Aoki, *et al.*, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **1991**, 1771.
- 6) T. Jin, *et al.*, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **1992**, 499.
- 7) Y. Kubo, *et al.*, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **1993**, 305.
- 8) S. Shinkai, *et al.*, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **60**, 3679 (1987)
- 9) S. Suzuki, *et al.*, *Chem. Lett.*, **1994**, 699.
- 10) T. Morozumi, S. Shinkai, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **1994**, 1219.
- 11) T. Morozumi, S. Shinkai, *Chem. Lett.*, **1994**, 1515.
- 12) Y. Kubo, *et al.*, *Chem. Lett.*, **1991**, 7419.
- 13) Y. Kubo, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **1994**, 1725.
- 14) (a) Y. Kubo, *et al.*, *Nature*, **382**, 522 (1996) (b) Y. Kubo, *Yuki Gosei Kagaku Kyokai Shi*, **55**, 506 (1997) (c) Y. Kubo, *et al.*, *Anal. Sci.*, **14**, 183 (1998)

## 近日発売予定

# 水溶性カリックスアレーン

Calix[6]arene *p*-sulfonic acid

Calix[8]arene *p*-sulfonic acid



カリックスアレーンはフェノールを環状に配置した大環状化合物であり、その特異な構造と、比較的容易に官能基を導入できることから、包接化合物の基幹物質として数多く利用されている。

水溶性カリックスアレーンは芳香環部分にスルホン酸基を導入したもので、水に極めてよく溶け、したがって、環状の芳香環が作り出す疎水場環境を親水性雰囲気中に提供することが可能である。この化合物は筒状構造の両端に酸性プロトン(OH基)と陰イオン基(SO<sub>3</sub><sup>-</sup>基)を並べた構造しており、フェノールブルーなどのような極性分子を包接する場合、疎水性相互作用、水素結合、イオン相互作用などを介して会合しており、水溶液中においてシクロデキストリンと同程度の会合定数を与えることが明らかにされている<sup>1)</sup>。この水溶性カリックスアレーンの水酸基に長鎖アルキル基を導入したものは、更に強い疎水場を形成するため、ゲスト分子に対して非常に大きな会合定数を与える。また、界面活性剤と同様の構造形態を取りながらもミセル様の会合体は形成せず単量体として存在することも大きな特長である<sup>1)</sup>。

諸角らは水溶性カリックスアレーンと光学活性な四級化アンモニウムあるいはアミノ酸誘導体の包接認識について検討している<sup>2,3)</sup>。カリックスアレーンは元来分子不斉を持たない対称性の高い化合物であるが、光学活性ゲスト分子を包接すると、その不斉に影響されカリックスアレーンの環構造に不斉が誘起される。その結果として誘起円二色スペクトルを生じ、その解析からゲスト分子のキラリティーを簡便に読み出すことも可能としている。

ニトロ化カリックスアレーンは、スルホン化カリックスアレーンをニトロ置換することにより達成される。またそこからアミノ体を経てカチオン性の水溶性カリックスアレーンに導くことが可能であるなど、スルホン化カリックスアレーンは機能性材料開発の原料としても利用可能である。

#### 参考文献

- 1) S. Shinkai, S. Mori, H. Koreishi, T. Tsubaki, O. Manabe, *J. Am. Chem. Soc.*, **108**, 2409 (1986)
- 2) T. Morozumi, S. Shinkai, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **1994**, 1219.
- 3) T. Morozumi, S. Shinkai, *Chem. Lett.*, **1994**, 1515.

## Q&amp;A

## Cell Counting Kit-F

## 《キット内容》

試薬溶液 (1 アシストチューブ) 1本  
 ・ Calcein-AM / DMSO溶液

## 《特長》

- 1) 細胞内エステラーゼにより加水分解されて生じたCalceinが生細胞の細胞質全体を染めることでその蛍光を読み取り、生細胞数を測定するものである。蛍光で測定するため高感度に測定できる。
- 2) 細胞にインキュベートするだけで測定できる。
- 3) 浮遊系・付着系の両方の細胞に用いることができる。特に浮遊系細胞では、テトラゾリウム系で感度が低いため、効果の高い方法である。
- 4) HeLa細胞・HL60細胞で、50個から25000個まで測定できる。

## 《細胞増殖測定方法》

- 1) 細胞の準備
  - ・ 対数増殖期にある細胞の懸濁液を遠心分離 (1000 rpm, 5 min) により細胞と培地に分離し、培地を除去する。PBS(-)バッファーで1, 2回細胞を洗浄する。
  - ・ 目的細胞数になるようにPBS(-)バッファーで希釈し、96穴マイクロタイタープレートの各ウェルに100µlずつ播種する。
  - ・ CO<sub>2</sub>インキュベーターで前培養する。
- 2) 試薬準備
  - ・ プレート1枚当たり、試薬溶液20µlを試験管に分取し、PBS(-)バッファー1mlを加える。(50倍希釈)  
(この溶液は用時調製する。調製した溶液はその日のうちに使い切ること。)
- 3) 試薬添加
  - ・ 試薬溶液 (50倍希釈液) を各ウェルに対して10µl加え、よく混和する。
- 4) 発色と測定
  - ・ 室温で30~60分発色させた後、蛍光プレートリーダーで測定する。  
(検出: ex = 485 nm, em = 535 nm)

## 《使用上の注意》

- ・ ブランクが上がる為、測定時にはフェノールレッド、血清は使用できない。
- ・ リンパ球細胞や低細胞数域 (~1000 cells/well) で使用する場合、十分な感度を得るためにルミノプレート (白色) を用いる。
- ・ 500回用で96穴プレート5枚分使用可能。細胞種、細胞数によりさらに感度を必要とする場合、20倍希釈で使用しても良い。この場合200回分となる。試薬溶液がやや濁るので十分に混和して使用すること。

## 《保存上の注意》

キット溶液は-20℃で6か月安定。解凍は外容器のまま室温に放置して行う。残った溶液は直ちに-20℃で凍結して保存する。また、バッファー希釈後の試薬溶液はその日のうちに使いきる。

## Cell Counting Kit

## 《キット内容》

試薬A: WST-1  
 (凍乾品) HEPES  
 溶液B: 1-Methoxy PMS  
 (赤色水溶液)

試薬A、溶液B各1本 / 500回用 (2,500回は500回用の5本組)

## 《特長》

- 1) テトラゾリウム塩およびホルマザンとも高水溶性であるため、MTTアッセイのようなホルマザンの溶解操作が不要である。
- 2) 他の水溶性タイプのテトラゾリウム塩 (XTT、MTS) より高感度である。

## 《細胞増殖測定法》

- 1) 試薬溶液調製法
  - ・ 溶液Bを全量注射器で吸い取り、試薬Aに注入溶解し試薬溶液とする。(試薬Aは真空状態ですのでゴム栓を開けると試薬が飛散する恐れがあります。注射器で溶液Bを注入した後開けて下さい。)
- 2) 測定方法
  - ・ 対数増殖期にある細胞を目的の細胞数になるように計数し、96穴マイクロタイタープレートの各ウェルに100µlずつ播種する。
  - ・ CO<sub>2</sub>インキュベーター内で前培養する。
  - ・ 試薬溶液10µlを各ウェルに加えてよく混和する。
  - ・ CO<sub>2</sub>インキュベーターで1~4時間呈色反応を行う。  
(反応時間は1~4時間、細胞の種類により異なる。)
  - ・ 反応後、マイクロプレートリーダーで測定する。  
(測定波長: 400nm~450nm、参照波長: 600nm以上)

## 《使用上の注意》

- 1) フェノールレッドを含む培地も使用可能。
- 2) 必要に応じて試薬溶液は0.22µmメンブランフィルターで濾過滅菌する。
- 3) 細胞の種類および数により発色感度が異なるため、検討の上使用する。
- 4) 発色が十分でないときは継続して培養し、発色条件を決定する。
- 5) 呈色後、以下の方法で反応を停止することができる。
  - (1) マイクロタイタープレートを4℃に冷却する。
  - (2) 0.1mmol/l HClを10µl添加する。
  - (3) 1w/v% SDSを10µl添加する。
 反応停止後24時間以内に測定する。

## 《保存上の注意》

- ・ Kitは冷蔵保存。試薬A・Bの混合後は、冷蔵で3日間保存可能。3日間で使いきってしまった場合は混合後、適量を分注し冷凍保存すれば1か月は使用可能である。
- ・ 凍結 / 融解は繰り返さないこと。

## Q&A

### Counting Kit-8

#### 《キット内容》

5 ml/バイアル (500回用)

- ・ 5 mmol/l WST- 8
- ・ 0.2 mmol/l 1-Methoxy PMS  
(2500回用は500回用の5本組)

#### 《特長》

- 1) 高感度水溶性ホルマザンを生成する新規テトラゾリウム塩 WST- 8 2-(2-Methoxy-4-nitrophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium, monosodium salt を発色基質として採用しており、従来のCell Counting Kitより高感度に検出が可能である。
- 2) テトラゾリウム塩およびホルマザンとも高水溶性であるため、MTTアッセイのようにホルマザンの溶解操作が不要である。
- 3) 1ボトル溶液タイプであるため、試薬の調製が不要である。
- 4) 他の測定キットより試薬が安定である。

#### 《細胞増殖測定法》

[前頁、Cell Counting Kitの細胞増殖測定方法の2)と同じ操作で行なう。]

(測定波長：450 nm、参照波長：600 nm以上)

#### 《細胞毒性試験方法》

- 1) 対数増殖期にある細胞を5000 cells/wellの濃度になるよう計数し、96穴マイクロタイタープレート各ウェルに100 µlずつ播種する。
- 2) CO<sub>2</sub>インキュベーター内で24時間前培養する。
- 3) 目的の濃度に調製した薬剤を各ウェルに10 µlずつ添加する。
- 4) CO<sub>2</sub>インキュベーター内で48時間培養する。
- 5) Cell Counting Kit- 8 溶液を各ウェルに10 µlずつ添加する。
- 6) CO<sub>2</sub>インキュベーター内で1～4時間呈色反応を行う。
- 7) 反応後、マイクロプレートリーダーで測定する。  
(測定波長：450 nm、参照波長：600 nm以上)

#### 《使用上の注意》

[前頁、Cell Counting Kitの注意点参照]

#### 《保存上の注意》

- ・ キット溶液は-20℃で12か月、4℃で3か月安定。(長期保存は遮光、-20℃保存)
- ・ 解凍は、室温に放置するかまたは37℃以下の温水で行う。
- ・ 解凍後頻繁に使用する場合は、遮光して4℃で保存し、なるべく早く使用する。
- ・ 凍結/融解操作はなるべく行わないこと。

#### 《参考文献》

M. Ishiyama, *et al.*, *Talanta*, 44, 1299 (1997)

### MTT (凍結乾燥品)

#### 《試薬内容》

MTT 25 mg/バイアル (500回用) 1本

#### 《特長》

- 1) 水に簡単に溶けるので、試薬の調製が簡単である。
- 2) 1バイアルあたりMTT 25 mgを測り込んであるため、使用する緩衝溶液または培地を5 ml添加すると、500回分(96穴マイクロタイタープレート5枚分)の試薬溶液が簡単に調製できる。

#### 《細胞増殖測定方法》

##### 1) 試薬溶液調製法

MTT (凍結乾燥品) 1バイアルに5 mlの緩衝溶液および培地を加え、内容物を溶解させる。これで500回分の試薬溶液となる。必要に応じて試薬溶液は0.22 µmメンブランフィルターで濾過滅菌して用いる。

##### 2) 測定方法

- ・ 対数増殖期にある細胞を目的の細胞数になるように計数し、96穴マイクロタイタープレートの各ウェルに100 µlずつ播種する。
- ・ CO<sub>2</sub>インキュベーター内で前培養する。
- ・ 試薬溶液を各ウェルに10 µlずつ添加する。
- ・ CO<sub>2</sub>インキュベーター内で4時間呈色反応を行う。
- ・ 溶解液を100 µl添加しホルマザンを溶解する。
- ・ マイクロプレートリーダーを用い、570 nm (参照波長：650 nm以上)の吸光度を測定する。

#### 《使用上の注意》

- 1) 細胞の種類および数により発色感度が異なるので、十分に検討して使用する。
- 2) 溶解液としては、10% SDS/0.01 mol/l HCl、0.04 mol/l HCl/isopropanol および DMSO を使用する。
- 3) 生成するホルマザン色素の極大吸収波長は570 nm付近にあるので、高感度に測定するためには550～600 nmの波長フィルターを使用した方がいい。

#### 《保存上の注意》

MTT (凍結乾燥品) は-20℃で12か月安定。溶解後水溶液は遮光して-20℃で保存し、なるべく早く使用する。PBS緩衝溶液で溶解した場合、遮光、-20℃で6か月安定。また試薬溶液の凍結/融解操作はなるべく行わないこと。

#### 《参考文献》

- 1) T. Mosmann, *J. Immunol. Methods*, 65, 55-63 (1983)
- 2) D. Gerlier *et al.*, *J. Immunol. Methods*, 94, 57-63 (1986)
- 3) S. P. C. Cole, *Cancer Chemother Pharmacol*, 17, 259-263 (1986)
- 4) M. C. Alley, *et al.*, *Cancer Res.*, 48, 589-601 (1988)

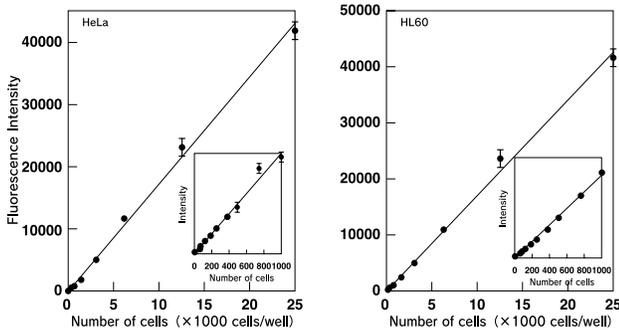
# Q&A

## Cell Counting Kit シリーズの使い分けについて

Q 1) 高感度に測りたい場合は？

A 1) (蛍光プレートリーダーがある場合)

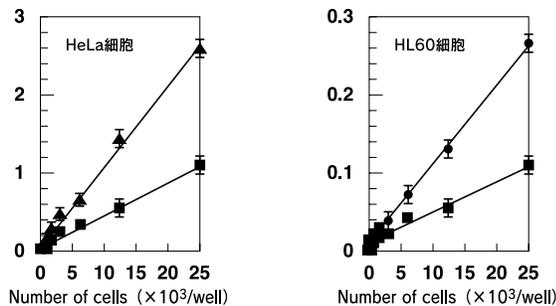
Cell Counting Kit-Fがお勧めです。細胞数約50個から測定ができます。



測定波長:  $\lambda_{ex}$  = 485nm  
 $\lambda_{em}$  = 535nm  
 測定機器: Spectra Fluor (TECAN社)

(蛍光プレートリーダーがない場合)

Cell Counting Kit-8がお勧めです。細胞数約1000個から測定ができます。



使用培地:  
 HeLa細胞: MEM (10%牛胎児血清含有)  
 HL60細胞: RPMI1640 (10%牛胎児血清含有)  
 呈色反応:  
 HeLa細胞: 37°C、5%CO<sub>2</sub>、1時間(■)、2時間(▲)  
 HL60細胞: 37°C、5%CO<sub>2</sub>、1時間(■)、2時間(●)  
 測定波長: 450nm (参照波長650nm)

Q 2) とにかく簡単に測りたい場合は？

A 2) Cell Counting Kit-8がお勧めです。1ボトルタイプで操作が簡単です。

Cell Counting Kit-8による細胞増殖測定方法

細胞の前培養

試薬溶液10  $\mu$ lの添加

呈色反応 (1 ~ 4時間: 細胞の種類により異なります)

マイクロプレートリーダーで測定

(測定波長: 450nm、参照波長: 600nm以上)

Q 3) 報告例が多い方がいいという場合は？

A 3) MTTが最も多く報告されています。最近ではWST-1 assay (Cell Counting Kit) を用いた文献数も増えてきています。

《WST-1 assayに関する参考文献》

- 1) M. Ishiyama, *et al.*, *Chem. Pharm. Bull.*, 41,1118-1122 (1993)
- 2) T. Yano, *et al.*, *Cytotechnology*, 16, 167-178 (1994)
- 3) M. Ishiyama, *et al.*, *In Vitro Toxicology*, 8, 187-189 (1995)
- 4) S. Shirahata, *et al.*, *Biosc. Biotech. Biochem.*, 59, 345-347 (1995)
- 5) K. Teruya, *et al.*, *Biosc. Biotech. Biochem.*, 59, 341-344 (1995)
- 6) T. Iwaki, *et al.*, *Brain Research*, 673, 47-52 (1995)
- 7) S. Q. Liu, *et al.*, *Nature Medicine*, 1, 267-271 (1995)
- 8) T. Takenouchi, *et al.*, *Life Sciences*, 56, 479-484 (1995)
- 9) M. Ishiyama, *et al.*, *Biol. Pharm. Bull.*, 19, 1518-1520 (1996)

Q 4) とにかく安い方がいいという場合は？

A 4) 価格だけで見るとMTTが最も安くなります。しかし、操作性・測定時間・感度面を考慮すると、Cell Counting Kitシリーズはお得なキットと考えることができます。

Q 5) 測定誤差が少ない方がいいという場合は？

A 5) MTTは有機溶媒でホルマゼンを溶解する操作が入るため誤差が生じ易くなります。それに比べるとCell Counting Kitシリーズはどれも操作が簡便で誤差は少なくなります。

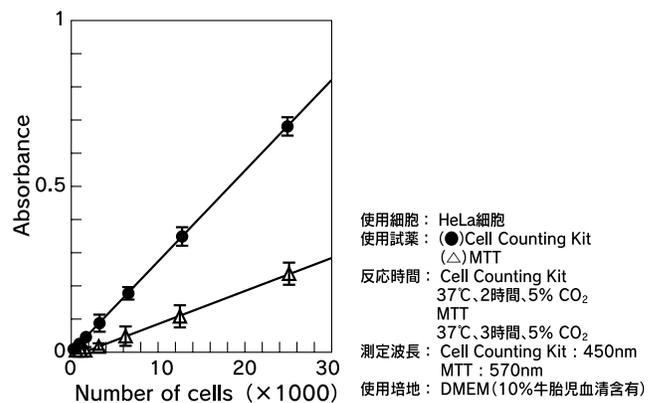


図. Cell Counting Kit とMTTとの比較グラフ

使用細胞: HeLa細胞  
 使用試薬: (●)Cell Counting Kit  
 (△)MTT  
 反応時間: Cell Counting Kit  
 37°C、2時間、5% CO<sub>2</sub>  
 MTT  
 37°C、3時間、5% CO<sub>2</sub>  
 測定波長: Cell Counting Kit: 450nm  
 MTT: 570nm  
 使用培地: DMEM(10%牛胎児血清含有)

## 訂正のご案内

ドージンニュースNo.86において一部誤りがありましたので、以下のように訂正致します。

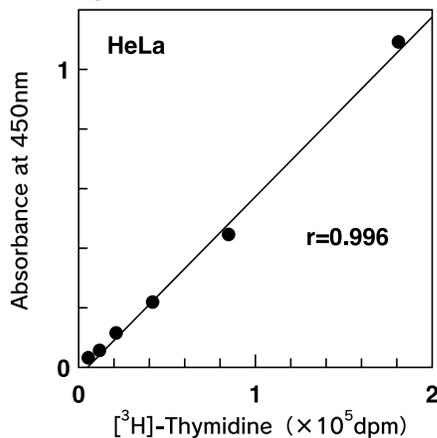
p.21	Cell Counting Kit-F データ
(誤)	(正)
HeLa	HL60
HL60	HeLa

## Q&A

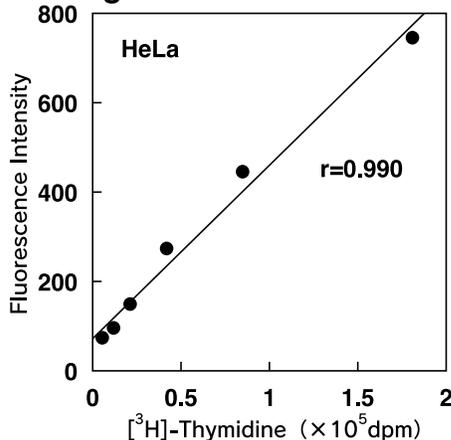
Q 6) [<sup>3</sup>H]-チミジン法の代替として使うことは可能でしょうか？

A 6) 可能です。下記グラフの通り、各Kitとも相関が得られています。RIを使わなくて良いため簡便に使用出来ます。

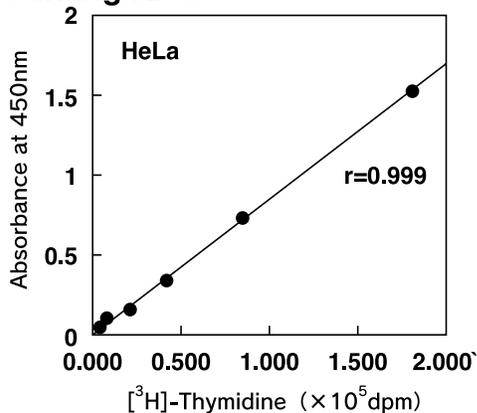
### Cell Counting Kit



### Cell Counting Kit-F



### Cell Counting Kit-8



### 各Kitの性能比較一覧表

	CCK-F	CCK-8	CCK	MTT (凍結乾燥品)
検出	蛍光	可視吸収	可視吸収	可視吸収
波長	λ ex = 490 nm λ em = 515 nm	λ max = 460 nm	λ max = 438 nm	λ max = 570 nm
操作性	○	◎	○	△
感度	◎	○	○	△
試験安定性	○	◎	○	◎
24時間後の細胞生存率	-	90.2	90.1	0

CCK-F : Cell Counting Kit-F  
CCK-8 : Cell Counting Kit-8  
CCK : Cell Counting Kit

コード番号	品名	容量	価格(¥)
347-07741	Cell Counting Kit-F	100回用	4,800
343-07743	Cell Counting Kit-F	500回用	9,800
343-06464	Cell Counting Kit	100回用	3,300
349-06461	Cell Counting Kit	500回用	9,800
345-06463	Cell Counting Kit	2,500回用 (500回用×5本)	29,000
341-07761	Cell Counting Kit-8	100回用	3,700
347-07621	Cell Counting Kit-8	500回用	10,700
343-07623	Cell Counting Kit-8	2,500回用 (500回用×5本)	31,000
344-07631	MTT (凍結乾燥品)	500回用	3,800
340-07633	MTT (凍結乾燥品)	2,500回用 (500回用×5本)	14,500
345-01821	MTT	100mg	1,800
341-01823	MTT	1g	12,000
345-04001	1-Methoxy PMS	100mg	5,200
341-04003	1-Methoxy PMS	1g	35,300
348-01372	HEPES	25g	2,000
345-06681	HEPES Buffer Solution	100ml	9,800

Cell Counting Kitシリーズのプロトコールに関しましては下記の書籍がございます。ご参照下さい。

野村慎太郎、渡邊俊樹監修 “脱アイソトープ実戦プロトコール” 秀潤社 (1998)

### 近日発売予定

PKA (cAMP依存性プロテインキナーゼ)用蛍光性ペプチドプローブ

#### AR II

DLDVPIPGRFDRRVSVAAC-Acrylodan

#### DR II

DLDVPLPAKADRRVSVAAC-DACM

東京薬科大学工藤先生らは、培養細胞内でのPKAの活性化状態をイメージングする蛍光性ペプチドプローブを新たに開発した。このペプチドプローブは培養液に添加するだけで容易に細胞内にロードすることが可能で、PKAの活性化を反映して蛍光強度が変化するものである。近日発売の予定である。

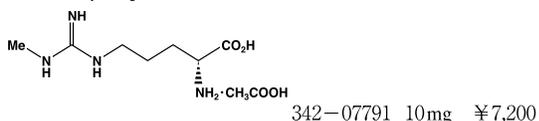
## 新製品

## NO関連試薬

## nNOS選択的NO合成酵素阻害剤

TFPI<sup>1)</sup> S-Ethyl-N-(4-(trifluoromethyl)phenyl)isothiourea, hydrochloride

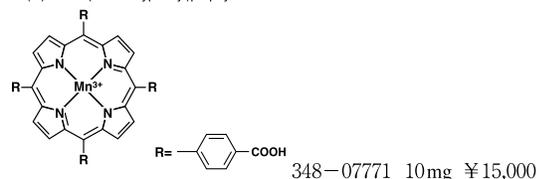
## NO合成酵素阻害剤のネガティブコントロール

D-NMMA<sup>2)</sup>N<sup>ω</sup>-Monomethyl-D-arginine, monoacetate

## パーオキシナイトライト消去剤 (活性酸素種消去剤)

Mn-TBAP<sup>3)</sup>

Mn(III)tetrakis(4-carboxyphenyl)porphyrin



## グアニル酸シクラーゼ阻害剤

ODQ<sup>4)</sup>

1H-[1,2,4]Oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one

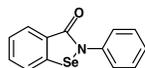


## 製品化予定

## 抗酸化剤

Ebselen<sup>5)</sup>

2-Phenyl-1,2-benzisoseelenazol-3(2H)-one

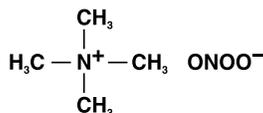


## パーオキシナイトライト

Peroxyxynitrite,

tetramethyl ammonium salt<sup>6)</sup>

N,N,N-Trimethylmethanaminium peroxyxynitrite

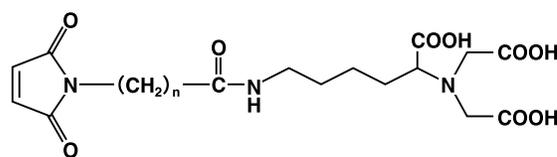


## 参考文献

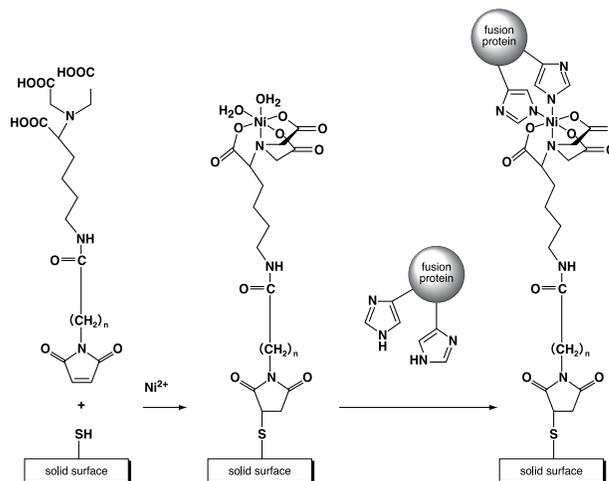
- 1) B. G. Shearer, *et al.*, *J. Med. Chem.*, **40**, 1901 (1997)
- 2) D. D. Rees, *et al.*, *Br. J. Pharmacol.*, **101**, 746 (1990)
- 3) C. Szabo, *et al.*, *FEBS Lett.*, **381**, 82 (1996)  
B. J. Day, *et al.*, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **275**, 1227 (1995)  
K. M. Faulkner, *et al.*, *J. Biol. Chem.*, **269**, 23471 (1994)
- 4) E. Southam, *et al.*, *Br. J. Pharmacol.*, **119**, 527 (1996)  
F. Brunner, *et al.*, *FEBS Lett.*, **376**, 262 (1995)  
J. Garthwaite, *et al.*, *Mol. Pharmacol.*, **48**, 184 (1995)
- 5) N. Ramakrishnan, *et al.*, *Biochem. Pharmacol.*, **51**, 1443 (1996)  
D. A. Dawson, *et al.*, *Neurosci. Lett.*, **185**, 65 (1995)  
J. F. Wang, *et al.*, *Hepatology.*, **5**, 112 (1992)  
M. Mariorino, *et al.*, *Biochem. Pharmacol.*, **37**, 2267 (1988)  
M. J. Parnham, E. Graf, *Biochem. Pharmacol.*, **36**, 3095 (1987)
- 6) D. S. Bohle, *et al.*, *Method Enzymol.*, **269**, 302 (1996)  
D. S. Bohle, *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, **116**, 7423 (1994)

## 近日発売予定

## 機能性キレート試薬

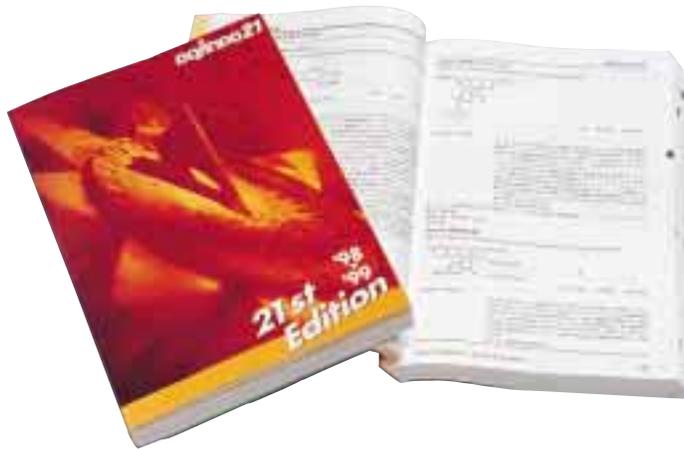
Maleimido-C<sub>3</sub>-NTAMaleimido-C<sub>7</sub>-NTAMaleimido-C<sub>3</sub>-NTA : n=3  
Maleimido-C<sub>7</sub>-NTA : n=7

最近、人工蛋白質の精製や蛋白質を固体表面に並べる“His-tag”という技術が注目されている。官能化された（通常、サクシニミド、チオール、エポキシなどの反応性基をもった）固体表面と反応させ、さらに、Ni(II)を加えて錯形成させる。ここで、Ni(II)の配位座は完全には満たされず、空いた部分には水が配位する。この状態で6個のヒスチジンを末端に発現させた融合蛋白質を加えるとヒスチジン部分がNi(II)に配位するため、固体表面で特異的かつ一定方向に結合されることになる（この結合は強固だが、フリーのヒスチジンやイミダゾール、EDTA等のキレート剤によって可逆的に解離する）。先に小社では末端アミノ基を持ったAB-NTAを発売した。さらに、今回はマレイミド基を官能基としたMaleimido-C<sub>3</sub>-NTA、Maleimido-C<sub>7</sub>-NTAを製品化する。マレイミド基はチオール基と選択的に反応するため、チオール基で官能化された固体表面に結合可能である。



## ご案内

### 総合カタログ第21版（'98-'99年版）が完成しました。



本カタログは三部から成っております。

第一部のプロトコール集には実験の目的別に試薬調製法や使用方法を掲載しております。前版よりも更に倍に増やし、より一層皆様のご研究のお役に立てると確信しております。第二部には小社製品群を用途・機能別に細かく分類して掲載しております。各製品毎にその性質・品質規格・取扱方法・溶解性データを記載しておりますので、特徴がよりわかり易くなっております。尚、本号より参考文献は別ページにまとめて一覧表に致しました。第三部は各種索引を準備しております。アルファベット別、用途・分析対象別、CAS番号別、商品コード番号別にて検索でき、状況に応じて使い分けてください。

本カタログは、試薬の解説、参考文献に出来るだけ新しい例を加えましたので、これまで以上に参考資料としてご利用いただけるものと存じます。

送付ご希望の方は、小社マーケティング部までご請求ください。またCD-ROMカタログも現在準備中です。ご興味ある方は、お問い合わせください。

E-mail: info@dojindo.co.jp 担当: 満田 健一

## お知らせ

1. 電子情報の充実に向けて  
小社では、皆様方へ迅速な情報の提供を目標としております。現在紙版にてお届け致しておりますドージンニュースは、ホームページ上にも掲載致しております。印刷版に比べ、1) 紙資源の保護、2) 検索が容易、3) 省スペース、4) ファイル管理が不要など、大きなメリットが得られております。アドレスは、  
<http://www.dojindo.co.jp/japanese/letterj/index.html>  
です。

2. ドージンニュース読者へ  
今号より電子メールで「ニュース目次」及び「掲載HOME PAGE address」をご案内するサービスを開始致しました。  
これは、ドージンニュース掲載の目次を、E-mailでいち早く、直接皆様にお知らせするサービスです。ご興味ある目次内容がございましたら、ホームページにて詳細をご確認いただけます。  
このサービスをご希望の方は、以下の3つの条件のい

れかをご指定ください。

- 1) E-mailで「目次」及び「掲載HOME PAGE address」のご案内をお送りする。紙版の郵送は不要。
- 2) E-mailで「目次」及び「掲載HOME PAGE address」のご案内をお送りする。紙版の郵送も必要。
- 3) 紙版の郵送のみ必要。  
E-mailでのご案内は不要。

6月末日までにご回答お願い申し上げます。  
紙資源保護の観点からも皆様のご協力をお願い申し上げます。

株式会社同仁化学研究所  
マーケティング部ドージンニュース係

TEL: 0120-489-548  
FAX: 0120-021-557  
E-mail: info@dojindo.co.jp  
担当者: 蒲野 志保

#### ホームページアドレス

URL: <http://www.dojindo.co.jp/>  
E-mail: [info@dojindo.co.jp](mailto:info@dojindo.co.jp)

フリーファックス 0120-021557  
フリーダイヤル 0120-489548