

DOJIN NEWS

No.106
2003

ドージンニュース

Review

生体内蛋白糖化反応におけるクレアチンの影響

宮崎公德

Topics on Chemistry

G6PD 異常症のスクリーニング

川本文彦

連載

ケミストからみたポストゲノム 6

片山佳樹



目次

Review

- 生体内蛋白糖化反応におけるクレアチンの影響
 同仁化学研究所 宮崎公德 1
- ケミストからみたポストゲノム6
 九州大学大学院工学研究院 片山佳樹 12

Topics on Chemistry

- G6PD 異常症のスクリーニング
 名古屋大学大学院医学系研究科 川本文彦 16

Commercial

- 新製品案内
 Total RNA 抽出キット 11
- HTS 用細胞内カルシウム測定キット 19
- 残留塩素測定キット 21
- 近日発売予定
 遺伝子傷害検出抗体 9

試作品案内

- デオキシコール酸（精製品）..... 20

Q&A

- 総グルタチオン測定キット 17

新製品案内

容量、価格は下記ページをご覧ください。

- Get pureRNA kit 11
- Calcium Kit-Fluo 3 20
- 残留塩素測定キット -SBT 法 22
- 残留塩素測定試薬 -SBT 法 22
- 色素液 22
- 検水調整液 22



剣豪・宮本武蔵は晩年の5年間、茶・禅・書・画の日々を熊本で送り、自身の兵法の集大成「五輪書」を執筆しました。参勤交代の大津街道沿いの武蔵塚（熊本市龍田弓削）に、死後も肥後藩主・細川家を守りたいとの遺言で、甲冑をまとった姿で葬られたと伝えられています。大河ドラマでとりあげられたこともあり、熊本市内ゆかりの地の最寄り駅を結び記念乗車券なども発売され、多くの観光客が訪れています。

生体内蛋白糖化反応におけるクレアチンの影響* (Creatine interference in the protein modification as AGE formation)



宮崎 公德
(Kiminori Miyazaki)
同仁化学研究所

[Summary]

Pentosidine, a cross-link structure between lysine and arginine residue, is one of major advanced glycation end products (AGE). It is formed by the reaction of ribose with lysine and arginine. The pentosidine concentration produced by *in vitro* incubation of plasma obtained from uremic patients was reported to be higher than normal plasma, indicating that uremic plasma contains an enhancer(s) for pentosidine formation [Miyata, T. *et al*, (1998) *J. Am. Soc. Nephrol.*, 9:2349-2356]. Since our preliminary study using monoclonal anti-pentosidine antibody identified creatine as the most effective enhancer, the purpose of the present study was to clarify the mechanism by which creatine could contribute to the pentosidine formation. Lysine was incubated with ribose in the presence of creatine and analyzed by reverse phase high performance liquid chromatography. A novel fluorescent peak ($\lambda_{\text{ex/em}}=335/385$ nm) was detected at retention time of 8 min, under which the authentic pentosidine (lysine was incubated with ribose in the presence of arginine under identical conditions) was eluted at a retention time of 12 min. Structural analyses of this compound revealed a pentosidine-like structure in which the arginine residue was replaced by creatine. This novel AGE-structure named here as creatine-derived pentosidine (C-pentosidine) was detected in plasma of patients on hemodialysis. These results indicate that the creatine increases the formation of C-pentosidine but not authentic pentosidine. The basic message from this study is that creatine plays a direct role as a protein modifier in C-pentosidine formation, although the clinical significance of C-pentosidine is still unknown.

キーワード :

advanced glycation end product, AGE-related disorders, creatine, pentosidine, protein modification

1) はじめに

日本の65歳以上の人口は1970年に739万人、高齢化率7.1%であったが、2000年には2,187万人、17.3%となり、この30年間に急速に高齢化が進行している。2001年調査の日本人の平均寿命は、男性78.07才、女性84.93才と世界中で最も長寿国となっている一方で、少子化も進み、すでに65歳以上人口は、0～14歳の年少人口(2000年度1,860万人)を上回っている。今後は更に高齢者数と高齢化率は増加し、2020年には65歳以上人口は3,334万人、高齢化率は26.9%になると予想されている。

平均寿命の上昇は医療の進歩、国民生活の向上、社会保障の充実の成果であるが、このような社会状況において、加齢、生活習慣に係る疾病、特に糖尿病患者の数も増加している。平成5年の調査で糖尿病患者は157万人、平成8年には218万人と言われていたが、現在では約690万人、その疑いを否定できないを含めると1,370万人と推定されており、言い換えれば60才以上の5人に1人、国民の9人に1人の割合で糖尿病の素因を持っている

ということが出来る。このように日本人の生活様式の欧米化や人口の高齢化と共に、糖尿病患者数は著しい増加の一途をたどっている。

糖尿病合併症の発症要因としては、ポリオール経路の亢進、メイラード反応、PKCの活性化、酸化ストレス説などが提唱されているが、病態の発症には、これらが互いに密接に関連して関与していると考えられる。このうちメイラード反応(タンパク糖化反応)は1912年にMaillardがアミノ酸と還元糖を加熱すると黄褐色の色素が生成することを発見したことから命名された。この反応はタンパク質またはアミノ酸のアミノ基と還元糖のカルボニル基が非酵素的に反応し、 Schiff塩基を経由してアマドリ転位生成物に至る前期反応と、さらに酸化、脱水、縮合、環化などを受け、分子間架橋形成や開裂など複雑な反応を経て、蛍光・褐色変化・分子架橋構造を特徴とする後期反応生成物(Advanced Glycation End products, AGE)にいたる2つの段階に大別される(図1)。

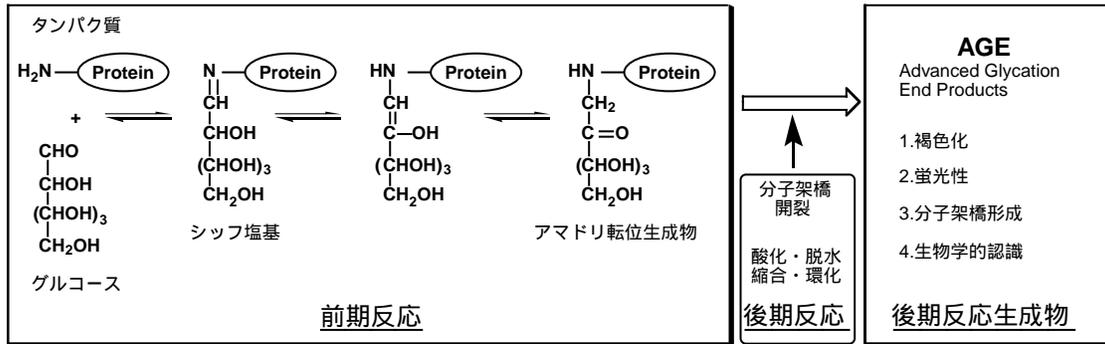


図1 メイラード反応

メイラード反応は当初、食品の香りや、長期保存による栄養価低下に関連した反応であることから食品化学分野での研究が進んでいた。1968年にヘモグロビンβ鎖のN末端バリン残基にグルコースが結合したアマドリ転位産物であるHbA_{1c}が発見され、これが血糖コントロールの指標になると、生体反応としてのメイラード反応が注目されるようになった。

さらに、1984年にAGEの特徴の1つである蛍光性物質が脳硬膜のコラーゲンに加齢に伴って蓄積し、糖尿病患者で有意に高値を示すことが報告され、生体のAGEが注目されるようになった。近年、抗AGE抗体を用いた免疫組織化学的手法によって、種々の生体組織にAGEが蓄積し、この蓄積が加齢や糖尿病合併症や動脈硬化などの加齢関連疾患で有意に増加することが明らかとなった(図2)。

例えば、糖尿病腎症¹⁾や急性腎不全患者²⁾の腎臓や、血管壁の動脈硬化性病巣³⁾、透析性アミロイドーシスでのアミロイド繊維^{4,5)}、光老化した皮膚のアミロイド日光弾力線維症⁶⁾、脳神経の海馬CA4領域⁷⁾など病理的条件下での種々のヒト組織においてAGE修飾タンパクの存在が示され、老化関連疾病の病理においてAGE修飾の関わりの可能性を示唆している。

特に糖尿病が動脈硬化症に対して促進的に作用するメカニズムとしては、LDLのグリケーションの観点から、1)LDLがメイラード反応前期で修飾を受けたglycated-LDLは、LDLと比して、LDL受容体に対するリガンド活性が低下しており、血中消退速度(クリアランス)が遅延し、結果として血中コレステロール値上昇を惹起する。2)LDLが後期反応による修飾を受けAGE-LDLとなり、AGEレセプターのリガンドとして、細胞に直接作用し、泡沫細胞を形成するという2つが考えられている。現在最も受け入れ

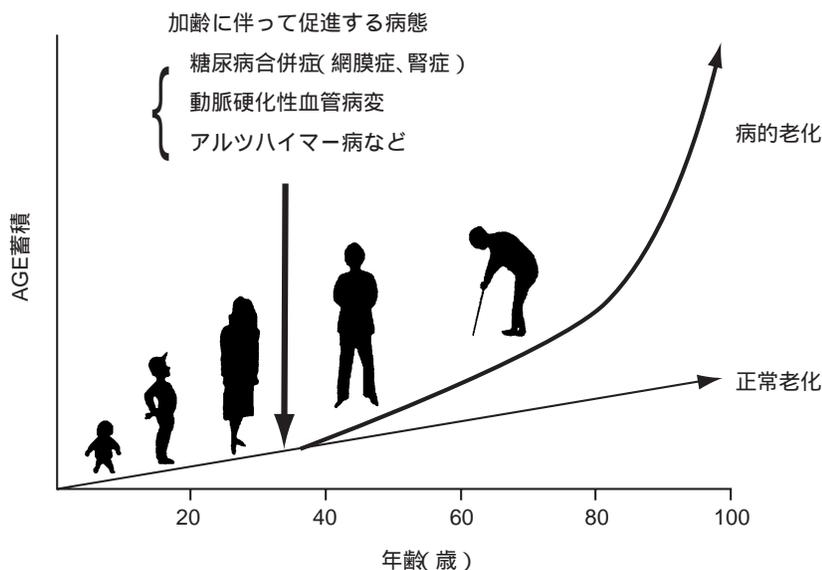


図2 加齢に伴う生体内AGEの蓄積

られているのは、前者の糖化LDLの代謝遅延説であり、LDLが糖化(グリケーション)されるとLDL受容体に対する認識が低下し、クリアランス遅延が起こり血中LDLコレステロールが上昇し、動脈硬化症の発生、進展に促進的に作用するという考え方である。また、動脈硬化症巣のAGE-LDLは、マクロファージスカベンジャー受容体を介してマクロファージに取り込まれ、マクロファージを直接的に泡沫化し、動脈硬化の発症、進展に関与している可能性も示唆されている。

また近年、タンパクだけでなく、核酸、特にグアノシンのアミノ基も還元糖の存在下で非酵素的なグリコシル化を受けることが報告されている⁸⁾。Leeらは高濃度のグルコース6リン酸に暴露したプラスミドを用いたモデル系で感染効率の減少と変異率の増大を示し⁹⁾、さらに糖尿病マウスのtransgenic embryoでの変異率の増大はグルコースレベルの上昇と相関し¹⁰⁾、AGEの形成がDNAの酸化傷害に関与していることを示唆している¹¹⁾。これまでに核酸のAGEとして

N^2 -[1-(1-carboxy)methyl]guanosine (CMG)¹²⁾、
 N^2 -[1-(1-carboxy) ethyl]guanosine (CEG)¹³⁾、
 N^2 -[1-(1-carboxy)ethyl] deoxyguanosine(CEdG)¹⁴⁾、
 N^2 -[2-(1-carboxy-3, 4, 5-trihydroxypentyl)guanosine (CTPG)¹⁵⁾ が知られている。

このようにAGEに関する研究は疾患の病理のみならず、DNAの酸化傷害や遺伝子変異の面からも注目を集めている。

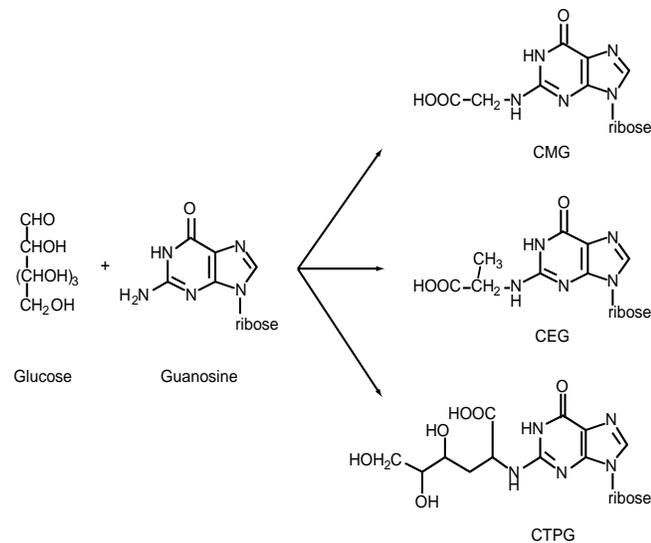


図3 核酸塩基のAGE化^[12,13,15]

2) AGE 構造体について

現在まで生体タンパクに発現するAGEとして図4に挙げた構造体が知られている。これらは大きく2つのグループに大別され、1つは、蛍光性で架橋構造を有するもの(fluorescent/ crosslinked)であり、もう一つは蛍光も架橋性もないもの(non-fluorescent/ non-crosslinked)である。前者に属するものとして、ペントシジン(Pentosidine)、クロスリン(Crossline)、フルオロリンク

(Fluorolink)、ピロピリジン(Pyrrpyridine)、ベスパリージン(Vesperlyisine)、MRX(Maillard Reaction Product X)、GOLD(Glyoxal-derived lysine dimer)、MOLD(Methylglyoxal-derived lysine dimer)、DOLD (3-Deoxyglucosone-derived lysine dimer)、FFIがある。(このうちFFIについては、後に人工産物であることが明らかとなっている。)

後者としては、CML($N^ε$ -(carboxymethyl)lysine)、CEL($N^ε$ -(carboxyethyl)lysine)、ピラリン(Pyrraline)、アルグピリミジン(Argpyrimidine)、メチルグルオキサールイミダゾロン(MG-imidazolones)、3-デオキシグルコソニイミダゾロン(3DG-imidazolones)がある。このうち酸加水分解に対して安定であるPentosidineやCMLなどの構造体は酸加水分解後にHPLCなどの機器分析によって定量可能であるが、大部分の構造体は酸加水分解に対して不安定であり、個々の構造体に特異的な抗体を用いる免疫学的手段によって生体における存在が同定されてきた。

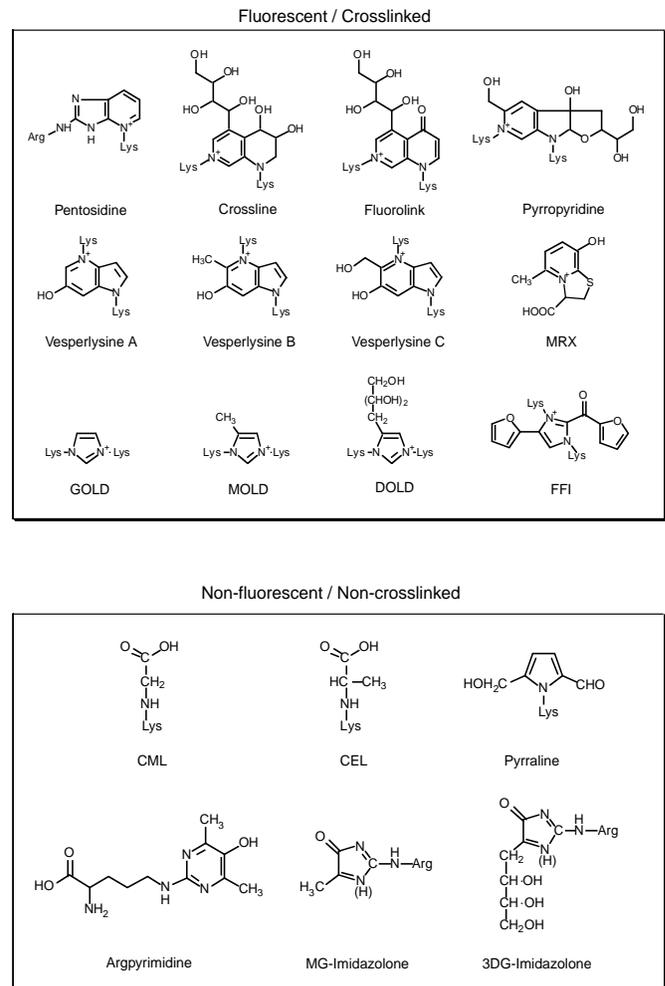


図4 既知のAGE構造体

AGEと細胞の相互作用については、AGEタンパクが網膜血管内皮細胞に対しては血管新生を促進し周皮細胞に対して増殖抑制効果

を示すことが知られている。血管平滑筋細胞はAGEタンパクを取りこみ分解する機能があるが、AGEタンパクによって細胞遊走が誘導され¹⁶⁾、サイトカインの放出、DNAおよびタンパク合成の促進が惹起されるなど、AGEが糖尿病性細小血管障害や粥状動脈硬化の原因の一つであることを示している¹⁷⁾。

Pentosidineは1989年に構造決定されたAGEでリジン残基とアルギニン残基が架橋された蛍光性物質である¹⁸⁾。構造に関与している炭素は5個で五炭糖やビタミンCから容易に生成するが、六炭糖のグルコース、フルクトースなどからも生成する^{19,20)}。Pentosidineは酸加水分解に安定であるので、血漿や組織などタンパク質中のPentosidine含量は、タンパク質を酸加水分解した後、その蛍光性を利用してHPLCで検出定量が可能である。またポリクローナル抗体を用いた免疫化学的な検出も行われている。例えば血漿Pentosidineレベルは加齢^{18,21)}、糖尿病^{22,23)}の発症に相関してヒトの皮膚に蓄積し²⁴⁾、腎疾患²⁵⁻³²⁾、急性リュウマチ性関節炎^{33,34)}で増大することが知られており、さらに加齢や糖尿病の発症に相関して皮膚に蓄積し、糖尿病性腎症では増加することが報告されている^{24,35,36)}。またアルツハイマー病の脳³⁷⁾や海馬CA4領域⁷⁾、糖尿病関連アミロイドーシス⁵⁾によっても蓄積することが見出されている。これらのデータは*in vivo*でPentosidineと病態生理学的過程とが関連する可能性を示唆している。

3) 目的

これまで、代表的なAGEの一つであるN^ε-(carboxymethyl) lysine (CML)を始めとして種々のAGEに対するモノクローナル抗体を用いて、AGE生成と生体内の存在に関する研究が行われてきた。例えばグルコースとBSAをインキュベートして調製したAGE-BSAをマウスに免疫して得られたモノクローナル抗体6D12は主要なAGE構造であるCMLを認識する重要な抗体であるが、その後の研究でこの抗体はCMLの他にN^ε-(carboxyethyl) lysine (CEL)も認識することが明らかとなった³⁸⁾。すなわちBSAをグルコースなどによってAGE化したAGE BSAを用いて免疫した場合、AGE-BSAにはあらゆる構造のAGEが生成しており、たとえモノクローナル抗体作成段階でスクリーニングをしていったとしても、あるAGE構造を特異的に認識するモノクローナル抗体を選択する事は非常に難しい。すなわち構造未知のAGEとの思わぬ交差反応を示す恐れがある。ましてポリクローナル抗体では、特定の構造に特異的な抗体を精製して得ることは非常に難しい。そこで、我々は目的とするAGE構造を化学的に合成し、これをハプテン抗原としてマウスに免疫することで目的抗原を高感度かつ特異的に認識するモノクローナル抗体を作製してきた。Pentosidineに対してはこれまでに有用なモノクローナル抗体が作製されておらず、ポリクローナル抗体による報告に留まっていた^{28,32,37)}。そこで化学的に合成したPentosidineをハプテン抗原として用いて免疫し、モノクローナル抗体を作製する必要がある。

一方でPentosidineの生成過程については、前述のようにペントースと等モルのリジンとアルギニンが架橋した蛍光性AGEであり、疾患に伴う増大がPentosidineの蛍光性を利用したHPLC検出によって報告されている。リジンとアルギニンを用いた*in vitro*の実験においては、Pentosidineの生成量は、CMLに比べて必ず

しも多いとは言えないにも拘わらず、*in vivo*では上述のように加齢や糖尿病合併症に伴って、Pentosidineの蓄積が増大することが知られている。このため、*in vivo*でPentosidineの生成が増大するには、加齢や疾患に関連して増大する何らかの内因性の物質がPentosidine生成を促進しているのではないかと想定された。宮田らは、腎疾患患者のヒト血清を*in vitro*でインキュベートすると、血清中のPentosidine含量は正常血清に比べて高値を示すことを報告しており、腎疾患患者血清中に存在する分子量5,000以下の物質がPentosidine生成促進に寄与しているのではないかと提唱している²⁵⁾。そこで我々はPentosidineに対するモノクローナル抗体を作製し、その抗体を用いてPentosidine生成過程の解析を行った。

まず(1)Pentosidineに対するモノクローナル抗体を作製し、(2)*in vitro*でBSAとリポースをインキュベートしてPentosidineを生成するモデル系を作り、モノクローナル抗Pentosidine抗体を用いた免疫化学的方法とHPLCによって、生成したPentosidineを検出する系を構築した。(3)さらにこの検出系を用いて加齢や疾患で増大すると考えられ、Pentosidine生成に関与する内因性物質の探索を行った。その結果、内因性物質が関与してPentosidine生成の増大をもたらすのではなく、新規なAGE構造体(C-pentosidine)を生成することを見出した。(4)このC-pentosidineを*in vitro*で合成後単離して、構造解析を行い、モノクローナル抗Pentosidine抗体を用いて免疫化学的検討を行った。さらにHPLCによって生成量の時間変化を追跡したところ、同じ条件であればPentosidineよりC-pentosidineの方が、生成速度が速いことが明らかとなった。また(5)透析患者の血漿及び尿サンプル中から、この新規なAGE構造の検出定量を行った。しかしながらこちらは、検出できた試料数が少なく、疾患との因果関係を断定するには至っていない。

このように内因性物質により、Pentosidine類似のC-pentosidineを生成する可能性が示唆され酵素免疫測定法(EIA)によるタンパク中のPentosidine測定に影響を与えている可能性が示唆された。

4) 抗Pentosidine抗体の作製

アルギニン、リジン及びリポースから化学的に合成、単離したPentosidineをWSC、Sulfo-NHSを用いてHSA(ヒト血清アルブミン)に結合し、これを常法に従ってBalb/cマウスに免疫した。脾臓細胞をミエローマ細胞と融合することでハイブリドーマを作製し、ハイブリドーマを移植したマウス腹水からモノクローナル抗Pentosidine抗体を得た。本抗体(Clone#1C12)はPentosidineと強く反応する一方で、Pentosidine生成の出発物質であるL-リジンやL-アルギニンやその類似体であるL-N^ε-メチルアルギニン(L-NMMA)、クレアチン、クレアチニンとは全く反応しなかった(図5)。一方、構造がPentosidineの一部と類似している2-アミノベンズイミダゾール(NH₂-BzIm)は反応したが、同様に類似している臭化N-プロピルピリジニウム(Pr-Pyridinium)は反応しなかった。以上の結果から本抗体はPentosidineと2-アミノベンズイミダゾールの共通構造である、9員環ヘテロ環状構造を認識すると考えられた。

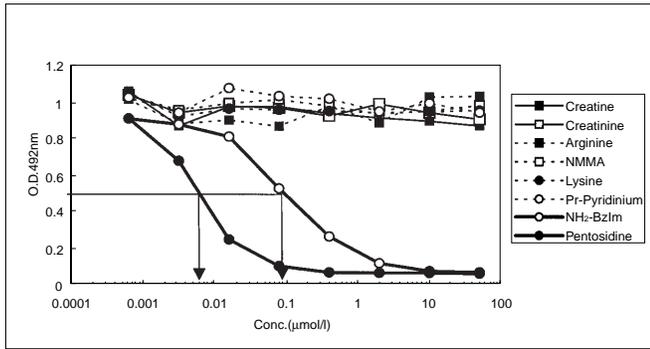


図5 競合法 ELISA によるモノクローナル抗 Pentosidine 抗体の反応性

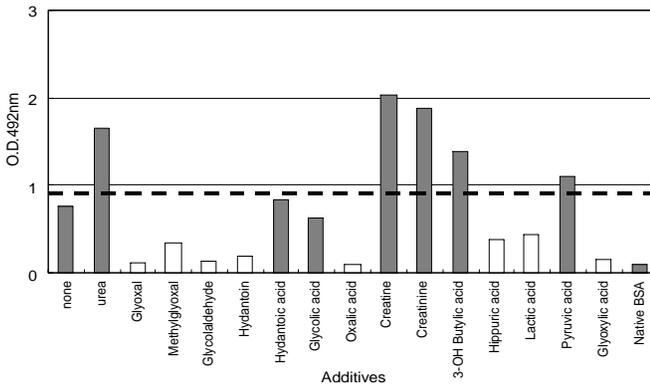


図6 *in vitro*での Pentosidine 生成における各種化合物の効果

5) 抗 Pentosidine モノクローナル抗体を用いた Pentosidine 生成モデル系の評価

BSAをリボースと共にリン酸緩衝液中60 で一定期間インキュベートし *in vitro*で Pentosidine を生成するモデル系を調製、ELISAで Pentosidine 生成量を評価した。図6に示したように、Pentosidine の生成は、インキュベート時にクレアチンなどを添加することで促進された。添加物による Pentosidine 生成増大の理由は、以下の2つの理由が考えられた。1)添加物によってBSA上のリジン、アルギニンとリボースによる Pentosidine 生成が促進されている。2) 添加物が直接 Pentosidine 生成反応に関与し Pentosidine と類似の構造を生成している。2)についてさらに検討したところ、クレアチンとリジン、リボースだけをインキュベートした場合、HPLCで Pentosidine と同じ励起波長 335 nm、蛍光波長 385 nm で検出される蛍光特性を持ち、Pentosidine とは保持時間が異なる成分が検出された(図7)。このことから、クレアチンの Guanidino基がアルギニンのそれと同じように反応して、クレアチンが Pentosidine の骨格に取り込まれた構造体が生成するのではないかと考えた。蛍光特性は化合物の芳香環の骨格に由来するので、この新規な成分の蛍光特性が類似しているということは同じ芳香環構造を有していることを示し、またHPLCのリテンションタイムは分子の極性構造や、分子の大きさに依存するので、この場合Pentosidineよりも幾分極性の高い構造あるいは、分

子量が小さいと考えられた。この成分をクレアチン由来 Pentosidine 類似体として、C-pentosidine と命名した。

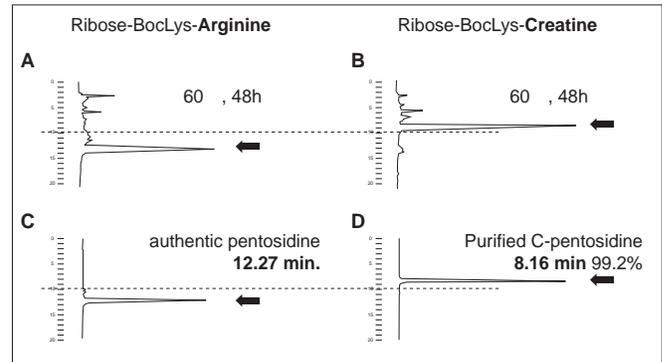


図7 クレアチン由来の Pentosidine 類似体の検出

また図8に示したように抗 Pentosidine 抗体は、競合法 ELISAで C-pentosidine に対して有意に反応性を示した。(C-pentosidine : IC₅₀ = 1 μmol/l、Pentosidine : IC₅₀ = 6 nmol/l) 本抗体はクレアチンやアルギニンのような単純な構造には反応せず、2-アミノベンズイミダゾールのような9員環ヘテロ環状構造を持ったものとは交差反応を示すことから、C-pentosidine が Pentosidine や2-アミノベンズイミダゾール同様に、9員環ヘテロ環状構造を持つことが示唆され、これはNMRやMSによる構造解析の結果と一致した。すなわちC-pentosidine はクレアチンが Pentosidine 構造に取り込まれた構造であることが明らかとなった。

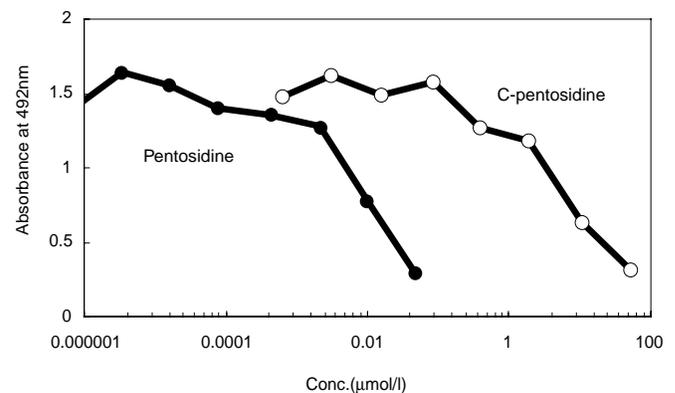


図8 C-pentosidine の抗 Pentosidine 抗体に対する反応性

6) ヒト血漿中及び尿中の C-pentosidine の検出

透析を受けている腎不全患者5名から得た血漿と正常者5名の血漿を加水分解し、HPLCで分析した⁴⁰⁾。メジャーピークは図7に示したそれぞれに特徴的なリテンションタイムから C-pentosidine または Pentosidine と帰属した。我々のHPLCで決

定した Pentosidine の血漿中のレベルは健常者で 0.43 ± 0.20 nmol/ml 透析患者で 1.46 ± 0.85 nmol/ml であった (表 1)。これらの値は伊豆原らが報告した値とほぼ同じである²⁸⁾。さらに健常者及び透析患者の血漿中の C-pentosidine を検出定量した。健常者の血漿 C-pentosidine レベルは無視できるか、現在のシステムでは検出限界以下であるのに対し、透析患者の血漿 C-pentosidine レベルは、健常者よりも顕著に高かった。透析患者での C-pentosidine の最大レベルは 0.38 nmol/ml でこれは透析患者の Pentosidine の値 (1.46 nmol/ml) より小さいが、健常者の Pentosidine のレベル (0.43 ± 0.20 nmol/ml) と同程度であった。

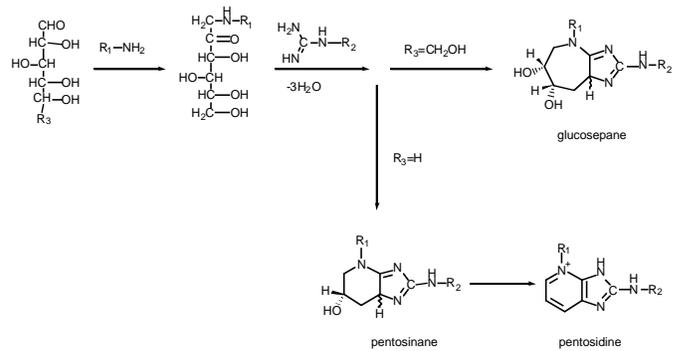


図9 リジン-アルギニン架橋形成の反応経路^[47]

	C-pentosidine (nmol/ml plasma)	Pentosidine (nmol/ml plasma)
Normal subjects (n= 5)	0.06 ± 0.06	0.43 ± 0.20
HD patients (n= 5)	0.19 ± 0.19	1.46 ± 0.85

表 1 ヒト血漿中の Pentosidine、C-pentosidine の検出

7) 生理的条件下での C-pentosidine の生成

リジン、クレアチン、リボースを生理的条件下 (pH 7.4, 37 °C) でインキュベートした場合の C-pentosidine 生成は、リジンとアルギニン、リボースを同一条件で反応させ Pentosidine を生成する場合より速いことが示された。血清あるいは血漿中のクレアチンとアルギニン濃度を各臨床検査会社の基準値⁴¹⁾の平均から算出するとそれぞれ $24 \sim 84$ nmol/ml、 $44 \sim 120$ nmol/ml である。アルギニン濃度は、HPLC によるアミノ酸分析であるから、タンパク中のアルギニンすべての濃度を意味している。これからわかるように、正常な状態では血液の中ではクレアチンとアルギニン濃度は $20 \sim 120$ nmol/ml とほぼ同じ濃度域にある。従って、アルギニンとクレアチンが同濃度であった場合は、クレアチンが反応した C-pentosidine の方が多く生成すると考えられる。

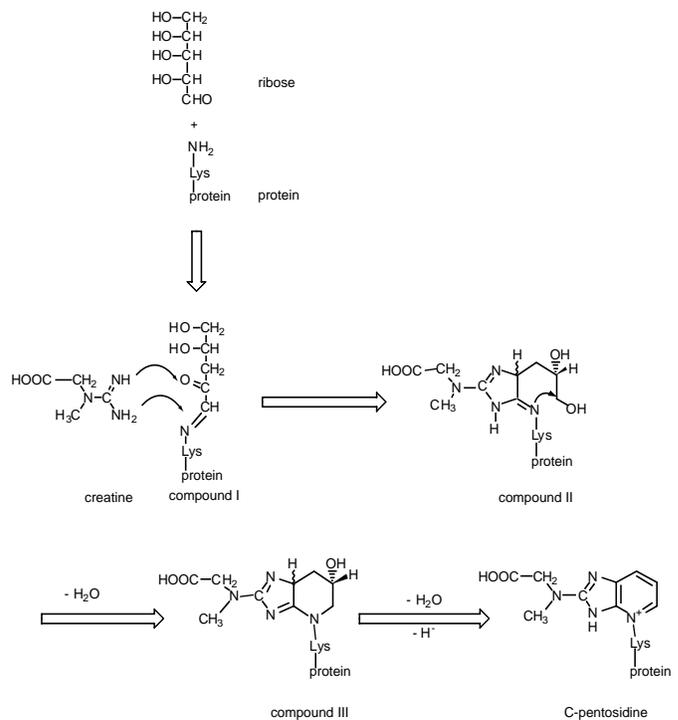


図 10 予想される C-pentosidine の生成経路

8) Pentosidine の生成機構について

C-pentosidine は Pentosidine のアルギニンがクレアチンに置換した構造的類似点を有しているため、その生成機構を考える上では、まず Pentosidine の生成機構を理解する必要がある。最近 Pentosidine の生成機構に関して、興味ある報告がなされた。Lederer らは *n*-butylamine がグリオキサール、メチルグリオキサール、3-デオキシグルコソールと反応して Schiff 塩基を形成し、引き続きそれがクレアチンと反応して、“glucosepane” あるいは “pentosinane” と呼ばれるイミダゾール誘導体を生成し、この pentosinane が酸化されることで Pentosidine が生成することを示している⁴⁴⁻⁴⁷⁾ (図 9)。

Lederer らの仮説を引用して C-pentosidine の生成機構を考えると、図 10 に示したルートを考えることができる。すなわち、メイラード反応の前期段階で、リボースがタンパクのリジン残基と反応し、 Schiff 塩基 (compound I) を形成し、compound I はクレアチンのグアニジノ基と反応し compound II を生成する。これはよく知られた通常の Pentosidine 生成においてアルギニンのグアニジノ基と compound I が反応するのと同様の機構である。次に compound II は環化、脱水素化、縮合反応を受けて compound III を経て C-pentosidine を生成すると考えられる。

以上のようにクレアチンがアルギニンと同様に反応して Pentosidine 類似の AGE 構造である C-pentosidine を生成すると考えるには矛盾がない。特にクレアチンが高値を示す疾患においては、C-pentosidine の生成はより亢進していると考えられ、C-pentosidine が今後、新たな AGE として注目されると期待される。リジンとアルギニン残基の架橋構造である Pentosidine は AGE 構造の一つであり、種々の疾病との関連が報告されている。本研究では 1) リジンとリボース、クレアチンのインキュベーションでは Pentosidine 類似化合物 (C-pentosidine) の生成をもたらした。2) この化合物の構造解析では通常の Pentosidine のアルギニン部分がクレアチンで置換された構造であることが明らかとなった。3) 透析患者血漿で C-pentosidine が検出され、クレアチンがタンパク質の修飾と C-pentosidine の生成を促進していることが明らかとなった。

初めに述べたように宮田らは²⁵⁾腎症患者の血漿中に存在して Pentosidine 生成を増大させる化合物の分子量は 5,000 以下であると提唱している²⁵⁾。この化合物の同定は未知であるが、彼らの知見は本研究の知見と矛盾していない。なぜなら *in vitro* での BSA とリボースによる Pentosidine 生成はクレアチンの存在によって 2.5 倍以上と顕著に増大した。さらに、杉山ら⁴⁸⁾は血漿 Pentosidine レベルが血漿クレアチンレベルと著しく相関していることを報告している。上述の知見と現在の我々の結果は、クレアチンがこの内因性の促進物質かその前駆体の一つであるという考えを示唆している。

クレアチンはクレアチン pathway でグリシンとアルギニンから S-adenosylmethionine によって生じるグアニジノ酢酸のメチル化によって生成する。その 98% は筋に取りこまれ、筋肉内ではクレアチンリン酸に合成されてエネルギー源となっている。クレアチンは血清中には 1 mg/dl (76 nmol/ml) 程度以下しかなく、尿細管で吸収されるので尿中には微量にしか存在しない。しかしその代謝産物であるクレアチニンは腎糸球体から濾過された後、ほとんど再吸収されずに尿中に排出される。そのため腎機能障害、腎不全では血中クレアチニンが高値を示すことが知られている。一方でクレアチンは筋肉で消費されるので、筋ジストロフィー症、筋萎縮性側索硬化症のような筋疾患において、血清、尿中クレアチン値が高値を示すとされている。筋疾患時にクレアチンが高値を示す機序はわかっていないが、筋崩壊や膜の異常に伴う筋肉へのクレアチンの取り込みの異常、筋中への保持の異常などが考えられている。腎機能障害においては、血中クレアチニン値は高値を示すがクレアチンは影響されないと考えられる。今回、腎不全患者の血漿サンプルを用いて血中 C-pentosidine の生成を確認しようとしたが、その検出検体数は少なく、十分な結果を得ることはできなかった。また透析前クレアチニン値は 7.0 ~ 12.6 mg/dl (= 618 ~ 1,113 nmol/ml) と正常の 10 倍もの高値を示していたが、Pentosidine、C-Pentosidine との有意な相関を見出すことができなかった。

正常状態ではクレアチンレベルと、アルギニンレベルは共に 100 nmol/ml 前後であり大きな差がない。従ってこれらの条件下ではクレアチン濃度がさらに高まることで、C-pentosidine は Pentosidine に比較して *in vivo* でもより効率的に生成すると期待

される。我々の *in vitro* の実験は C-pentosidine の生成が Pentosidine の生成よりも速いことを示したが、透析患者での血漿 C-pentosidine レベルは Pentosidine のそれよりも 30% しかない (表 1)。これは、血漿中では Pentosidine の大部分は、血漿タンパクに多量に存在するアルブミンのアルギニン残基とリジン残基から生成すると考えられるので、Pentosidine 類の総量としては、通常の Pentosidine の方が C-pentosidine よりも多量に存在すると考えられる。実際、血漿サンプル中の Pentosidine 類を HPLC で測定した場合にも、通常の Pentosidine の方が顕著に多かった。

血漿 Pentosidine レベルは多くの報告では HPLC 分析^{18,22,25,26,28-30,36,40,48)}とポリクローナル抗 Pentosidine 抗体を用いた ELISA^{5,32)}で決定されている。C-pentosidine の構造は通常の Pentosidine に非常に似ている。事実、C-pentosidine は我々のモノクローナル抗 Pentosidine 抗体によって認識され、また HPLC 分析でのリテンションタイムは通常の Pentosidine のそれと近い。それ故、血漿 Pentosidine レベルは C-pentosidine によって過大評価されている可能性も考えられる。

9) おわりに

加齢や糖尿病に対する AGE の寄与について、AGE が疾病の要因であるのか、あるいは痕跡であるのかを検討する上では、AGE の生成機構の解明が重要である。本研究では C-pentosidine は以下の性質を持つことが明らかとなった。

1) Pentosidine と類似の蛍光特性を持ち、Pentosidine と類似の芳香環構造を持つ。2) Pentosidine とは異なるリテンションタイムを持つ。3) 抗 Pentosidine 抗体に対して反応性をもつ。4) NMR で芳香環領域の構造は Pentosidine と同じである。5) 構造中にクレアチンの *N*-メチル基が存在する。6) これらの結果を支持する構造として提唱した構造は質量分析において、矛盾しない分子量を与えた。したがって、我々はこの分子がクレアチンのグアニジノ基がリジン-リボースと反応して取り込まれた構造であると考えている。

生体内でクレアチンがタンパク質の修飾に関し C-pentosidine の生成を促進することが明らかとなり、AGE が関与する疾病に関する知見が得られた。

* 本研究は熊本大学医学部生化学第二教室 (堀内 正公 教授) において行われた⁴⁹⁾。

参考文献

- 1) Makino, H., Shikata, K., Hironaka, K., Kushiro, M., Yamasaki, Y., Sugimoto, H., Ota, Z., Araki, N. and Horiuchi, S., *Kidney Int.*, **48**, 517, (1995).
- 2) Yamada, K., Miyahara, Y., Hamaguchi, K., Nakayama, M., Nakano, H., Nozaki, O., Miura, Y., Suzuki, S., Tuchida, H., Mimura, N., Araki, N., Horiuchi, S., *Clin. Nephrol.*, **42**, 354 (1994).

- 3) Kume, S., Takeya, M., Mori, T., Araki, N., Suzuki, H., Horiuchi, S., Kodama, T., Miyauchi, Y. and Takahashi, K., *Am. J. Pathol.*, **147**, 654 (1995).
- 4) Miyata, T., Oda, O., Inagi, R., Iida, Y., Araki, N., Yamada, N., Horiuchi, S., Taniguchi, N., Maeda, K. and Kinoshita, T., *J. Clin. Invest.*, **92**, 1243 (1993).
- 5) Miyata, T., Taneda, S., Kawai, R., Ueda, Y., Horiuchi, S., Hara, M., Maeda, K., and Monnier, V. M., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 2353 (1996).
- 6) Mizutani, K., Ono, T., Ikeda, K., Kayashima, K. and Horiuchi, S., *J. Invest. Dermatol.*, **108**, 797 (1997).
- 7) Jono, T., Kimura, T., Takamatsu, J., Nagai, R., Miyazaki, K., Yuzuriha, T., Kitamura, T., Horiuchi, S., Accumulation of imidazolone, pentosidine and N(e)-(carboxymethyl)lysine in *Pathology International*, **52**, 563 (2002).
- 8) Bucala, R., Model, P. and Cerami A., *Proc. Natl. Am. Soc. USA*, **81**, 105 (1984).
- 9) Lee, A. T. and Cerami, A., *Mutat. Res.*, **249**, 125 (1991).
- 10) Lee, A. T., Plump, A., DeSimone, C., Cerami, A. and Bucala, R., *Diabetes* **44**, 20 (1995).
- 11) Lee, A. T., DeSimone, C., Cerami, A. and Bucala, R., *FASEB J.*, **8**, 545 (1994).
- 12) Seidel, W. and Pischetsrieder, M., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **8**, 2017 (1998).
- 13) Larisch, B., Pischetsrieder, M. and Severin, T., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **7**, 2681 (1998).
- 14) Seidel, W. and Pischetsrieder, M., *Cell. Mol. Biol.*, **44**, 1165 (1998).
- 15) Nissl, J., Ochs, S. and Severin, T., *Carbohydr. Res.*, **289**, 55 (1996).
- 16) Higashi, T., Sano, H., Saishoji, T., Ikeda, K., Jinnouchi, Y., Kanzaki, T., Morisaki, N., Rauvala, H., Shichiri, M., Horiuchi, S., *Diabetes*, **46**, 463 (1997).
- 17) 佐野裕之, 堀内正公, 最新内科学大系プロGRESS, **2**, 116 (1997).
- 18) Sell, D.R., and Monnier, V. M., *J. Biol. Chem.*, **264**, 21597 (1989).
- 19) Grandhee, S. K., and Monnier, V. M., *J. Biol. Chem.*, **266**, 11649 (1991).
- 20) Dyer, D.G., Blackedge, J. A., Thorpe, S. R., Baynes J. W., *J. Biol. Chem.* **266** (18): 11654 (1991).
- 21) Chen, J. R., Takahashi, M., Kushida, K., Suzuki, M., Suzuki, K., Horiuchi, K., and Nagano, A., *Anal. Biochem.*, **278**, 99 (2000).
- 22) Daimon, M., Ono, Y., Saito, T., Yamaguchi, H., Hirata, A., Ohnuma, H., Igarashi, M., Eguchi, H., Manaka, H., and Kato, T., *Diabetes Care*, **22**, 877 (1999).
- 23) Weiss, M. F., Rodby, R. A., Justice, A. C., and Hricik, D. E., *Kidney Int.*, **54**, 193 (1998).
- 24) Sell, D. R., Lapolla, A., Odetti, P., Fogarty, J., and Monnier, V. M., *Diabetes*, **41**, 1286 (1992).
- 25) Miyata, T., Ueda, Y., Yamada Y., Izuhara Y., Wada, T., Jadoul, M., Saito, A., Kurokawa, K., and Strihou, C. Y., *J. Am. Soc. Nephrol.*, **9**, 2349 (1998).
- 26) Odetti, P., Fogarty, J., Sell, D.R., and Monnier, V. M., *Diabetes*, **41**, 153 (1992).
- 27) Takahashi, M., Hoshino, H., Kushida, K., Murata, H., Baba, S., and Inoue, T., *Nephron*, **80**, 444 (1998).
- 28) Izuhara, Y., Miyata, T., Ueda, Y., Suzuki, D., Asahi, K., Inagi, R., Sakai, H., and Kurokawa, K., A sensitive and specific ELISA for plasma pentosidine. *Nephrol. Dial. Transplant.*, **14**, 576 (1999).
- 29) Floridi, A., Trizza, V., Paolotti, P., and Lucarelli, C., *J. Chromatogr. A*, **846**, 65 (1999).
- 30) Stein, G., Franke, S., Sperschneider, H., Vienken, J., Ueda, Y., Miyata, T., and Kurokawa, K., *Nephrol. Dial. Transplant.*, **14**, 1606 (1999).
- 31) Jadoul, M., Ueda, Y., Yasuda, Y., Saito, A., Robert, A., Ishida, N., Kurokawa, K., Strihou, C. Y., and Miyata, T., *Kidney Int.*, **55**, 2487 (1999).
- 32) Taneda, S., and Monnier, V. M., *Clin. Chem.*, **40**, 1766 (1994).
- 33) Chen, J. R., Takahashi, M., Suzuki, M., Kushida, K., Miyamoto, S., and Inoue, T., *J. Rheumatol.*, **25**, 2440 (1998).
- 34) Chen, J. R., Takahashi, M., Suzuki, M., Kushida, K., Miyamoto, S., and Inoue, T., *Rheumatology*, **38**, 1275 (1999).
- 35) Dyer, D. G., Dunn, J. A., Thorpe, S. R., Bailie, K. E., Lyons, T. J., McCance, D. R., and Baynes, J. W., *J. Clin. Invest.*, **91**, 2463 (1993).
- 36) McCance, D. R., Dyer, D. G., Dunn, J. A., Karen E. Bailie, Thorpe, S. R., Baynes, J. W., and Lyons, T. J., *J. Clin. Invest.*, **91**, 2470 (1993).
- 37) Smith, M. A., Taneda, S., Richey, P. L., Miyata, S., Yan, S. D., Stern, D., Sayre, L. M., Monnier, V. M., and Perry, G., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**, 5710 (1994).
- 38) Nagai, R., John, T., Miyazaki, K., Horiuchi, S., *Diabetes*, **49** SUPPL 1, A144 (2000).
- 39) Galfre G., Milstein C., *Methods in Enzymol.*, 73(Pt.B), 3 (1981).
- 40) Yoshihara, K., Nakamura, K., Kanai, M., Nagayama, Y., Takahashi, S., Saito, N., and Nagata, M., *Biol. Pharm. Bull.*, **21**, 1005 (1998).
- 41) 河合忠, 水島裕監修「今日の臨床検査2001/2002」(南江堂(東京) 2001) .
- 42) 佐中 孜, 庭山 淳, 塩見智子, 木村伸俊, 西村英樹, 篠部道隆, 樋口千恵子, 中村和徳, 競合ELISA法による血漿Pentosidineの測定法の確立と慢性腎不全患者における血漿Pentosidineの濃度. 腎と透析, **47**, 867(1999).
Sanaka, T., Funaki, T., Tanaka, T., Hoshi, S., Niwayama, J., Taitoh, T., Nishimura, H., Higuchi, C., *Nephron*, **91**, 64 (2002).
- 43) Takahashi, M., Oikawa, M. and Nagano, A., Effect of age and menopause on serum concentration of pentosidine, an advanced glycation end product. *J. Gerontology*, **55**, M137 (2000).
- 44) Lederer, M. O., and Bühler, H. P., *Bioorg. Med. Chem.*, **7**, 1081 (1999).
- 45) Lederer, M. O., Gerum, F., and Severin, T., *Bioorg. Med. Chem.*, **6**, 993 (1998).
- 46) Lederer, M. O., and Klaiber, R. G., *Bioorg. Med. Chem.*, **7**, 2499 (1999).
- 47) Biemel, K. M., Reihl, O., Conrad, J., Lederer, M. O., *J. Biol. Chem.*, **276**, 23405 (2001).
- 48) Sugiyama, S., Miyata, T., Ueda, Y., Tanaka, H., Maeda, K., Kawashima, S., Strihou, C. Y., and Kurokawa, K., *J. Am. Soc. Nephrol.*, **9**, 1681 (1998).
- 49) Miyazaki, K., Nagai, R., Horiuchi, S., *J. Biochemistry*, **132**, 543 (2002).

著者紹介

氏 名：宮崎 公德 (Kiminori Miyazaki)
 年 齢：41 歳
 所 属：株式会社同仁化学研究所 生産技術部
 〒 861-2202
 熊本県上益城郡益城町田原 2025-5
 Tel : 096-286-1515
 Fax : 096-286-1525
 出身校：長崎大学大学院工学研究科 修士課程
 熊本大学大学院医学研究科 博士課程
 学 位：博士 (医学)
 現在の研究テーマ：抗ニトログアノシン抗体の開発
 タンパク糖化反応 (AGE) 関係

近日発売

遺伝子傷害検出抗体

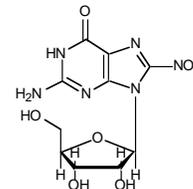
抗ニトログアノシン モノクローナル抗体 (Clone# NO₂G52)
 Anti-Nitroguanosine monoclonal antibody (Clone# NO₂G52)
 50 µg (1mg/ml, 50 µl)

抗ニトログアノシン ポリクローナル抗体
 Anti-Nitroguanosine polyclonal antibody
 50 µg (200 µg/ml, 250 µl)

< 特長 >

- 遺伝子傷害のマーカー
- 高い特異性、免疫組織染色、ELISA で使用可能
- モノクローナル抗体サブタイプ：IgG₁

8-ニトログアノシンは、生体内で血管の弛緩を制御し血圧調節をつかさどっている一酸化窒素 (NO) と、活性酸素 (スーパーオキシドアニオンラジカル) によって生じる過酸化亜硝酸 (パーオキシナイトライト) によって DNA や RNA がニトロ化された核酸です。生体組織が炎症を起した際には、多量の NO が産生され、多くの過酸化亜硝酸が生じグアノシンをニトロ化することが知られています。化学修飾を受けた核酸塩基は、細胞分裂によって遺伝子を複製する際に、翻訳の間違いを引き起こし、本来 G-C の対であった部分が、分裂と共に T-A 対に置き換えられた遺伝子変異を引き起こすと言われており、癌組織中には T A 配列が多く存在することが知られております。これらのことから、8-ニトログアノシンは発癌や遺伝子変異に関与した遺伝子傷害の指標として注目されています。



8-ニトログアノシンの構造

今回、熊本大学 赤池孝章先生らのグループと共同で抗ニトログアノシン抗体を開発致しました。赤池先生らはまず、ポリクローナル抗体を用いて、インフルエンザ感染マウスの肺上皮細胞の炎症を起した場所でニトログアノシンが多量に生成していることを発見しました。ニトログアノシンの局在は抗 iNOS 抗体で染色した iNOS 発現部位と一致し、過剰に産生した NO によってニトログアノシンが生成していることが示唆されました¹⁾。NO がウィルス遺伝子の変異をもたらすことは知られており²⁾、ニトログアノシンが NO 由来の遺伝子変異に関与していることが考えられます。その後、力価の高いモノクローナル抗体で検討を進めると、ニトログアノシンは炎症部位以外にも正常な細胞でも微量ながら生体内に広く存在し、遺伝子傷害の指標としてだけでなく、生体内での酸化還元に関与し、生体機能を調節する因子として作用していることが示唆されました。抗ニトログアノシン抗体を用い

近日発売

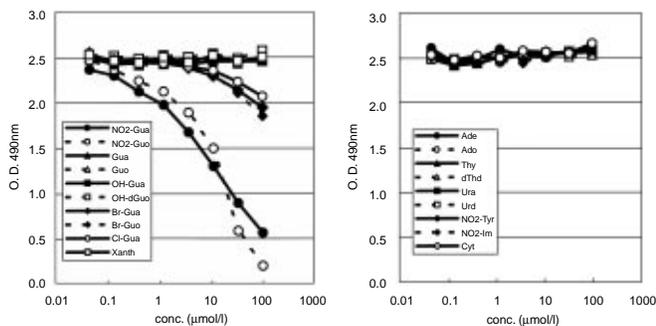
遺伝子傷害検出抗体

ば、細胞内、特にヌクレオチドプールにあるニトログアノシンの存在を免疫組織化学的染色によって、検出することができ、ニトログアノシンの役割や遺伝子傷害や発癌機構の解明に役立つものと期待されています。

モノクローナル抗体 (Clone# NO₂G52)

モノクローナル抗体は、8-ニトログアノシンとその塩基である8-ニトログアニンに強く反応しますが、正常なヌクレオシドや核酸塩基には反応しません。また酸化ストレスのマーカーである8-ヒドロキシグアニン、8-ヒドロキシデオキシグアノシン、3-ニトロチロシンとも交差しない上、構造的に8-ニトログアニンと類似しているキサンチンや2-ニトロイミダゾールとも交差しないなど、抜群の特異性と高力価を有しています。

下図はプレートに固相化した8-ニトログアノシン結合BSA (NO₂-Guo-BSA)と各種の物質に対する、本抗体の反応を競合法ELISAで検定したものです。8-ニトログアノシンと8-ニトログアニンに対してのみ、競合物質の濃度に依存した右下がりの曲線を与え、本抗体が反応していることを示しています。他のヌクレオシド等は反応しないため、競合物質の濃度に関係なく本抗体は固相化したNO₂-Guo-BSAに反応し、ほぼ一定の値を示します。



モノクローナル抗体 NO₂G52 の反応性

用途

- ELISA (1 μg/ml) 免疫組織染色 (10 μg/ml)

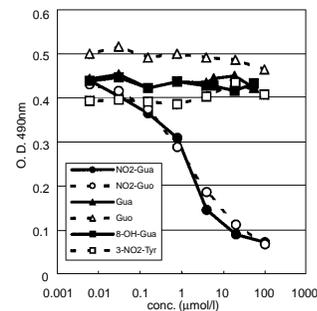
モノクローナル抗体 NO₂G52 の反応性 (IC₅₀ (μmol/l))

- 強く反応する (10 μmol/l)
8-NO₂-Guanosine, 8-NO₂-Guanine
- わずかに交差反応あり (>1mmol/l)
8-Br-Guanosine, 8-Br-Guanine, 8-Cl-Guanine
- 交差反応なし
Guanosine, Guanine, 8-OH-Guanine, 8-OH-deoxyGuanosine, Xanthine, Adenine, Adenosine, Thymine, deoxyThymidine, Uracil, Uridine, 3-NO₂-Tyrosine, 2-NO₂-Imidazole, Cytosine

本抗体はわずかに8-Br-グアノシン、8-Br-グアニン、8-Cl-グアニンと交差反応を示しますが、これはグアニンの8位近傍を正確に認識する力価が高いためと考えられます。8-ニトログアノシン、8-ニトログアニンとの反応性の差は100倍以上ありますので、問題なく使用できます。

ポリクローナル抗体

ポリクローナル抗体も8-ニトログアノシンと8-ニトログアニンにのみ反応し、正常なグアノシン、グアニンには反応しません。また8-ヒドロキシグアニンや、3-ニトロチロシンとも交差しません。ウサギ由来であるためマウスなどげっ歯目の組織染色に適用できます。



ポリクローナル抗体の反応性

用途

- ELISA (5 μg/ml) 免疫組織染色 (10 μg/ml)

ポリクローナル抗体の反応性 (IC₅₀ (μmol/l))

- 強く反応する (10 μmol/l)
8-NO₂-Guanosine, 8-NO₂-Guanine
- 交差反応なし
Guanosine, Guanine, 8-OH-Guanine, 3-NO₂-Tyrosine

組織染色での吸収試験用として8-ニトログアニンも近日発売予定です。予め過剰の8-ニトログアニンで処理した抗体を添加した染色像が陰性であれば、抗体による陽性像は非特異的染色ではなく8-ニトログアノシンまたは8-ニトログアニンを検出していることを意味します。

参考文献

- 1) T. Akaike, S. Okamoto, T. Sawa, J. Yoshitake, F. Tamura, K. Ichimori, K. Miyazaki, K. Sasamoto, and H. Maeda, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100** (2), 685 (2003).
- 2) T. Akaike, S. Fujii, A. Kato, J. Yoshitake, Y. Miyamoto, T. Sawa, S. Okamoto, M. Suga, M. Asakawa, Y. Nagai, and H. Maeda, *FASEB J.*, **14**, 1447 (2000).

新製品

Total RNA 抽出キット

Get pureRNA Kit

<特長>

- ・フェノール、クロロホルム等有害な有機溶媒を使用しない。
- ・高純度な Total RNA を高回収率で抽出できる。
- ・動物細胞、組織および血液からの抽出が可能。
- ・大量サンプルからの抽出が可能。
- ・RT-PCR、ノーザンブロット等に使用できる。

<キット内容>

50 samples	
・ Lysis buffer	13 ml x 2 本
・ Precipitation solution I	13 ml x 1 本
・ Precipitation solution II	8 ml x 1 本
・ DNase	0.55 ml x 1 本
・ DNase dilution buffer	12 ml x 1 本

<保存方法>

本キットは冷蔵 (0 ~ 5) で保存して下さい。

Total RNA 抽出には酸性フェノール法 (AGPC法) が用いられてきましたが、有害な有機溶媒を使用すること、フェノール等のキャリーオーバーにより、下流のアプリケーションを阻害するなどの問題がありました。また、スピナラム法でのキットでは、RNAは水溶液として回収されるため、任意の濃度に調製できないという問題がありました。

Get pureRNA Kit は、溶解液、タンパク除去液および DNase 溶液により構成されており、フェノール、クロロホルム等の有害な有機溶媒を一切使用せず、1時間程度で高純度な Total RNA をペレットとして得ることができます。また、スピナラムやフィルターチューブを用いるキットに比べ、大量のサンプルからでも高純度な RNA の抽出が可能です。本キットは少量の組織や血液、あるいは培養細胞で容易に行えるため、複数のサンプルを処理する際もご使用いただけます。

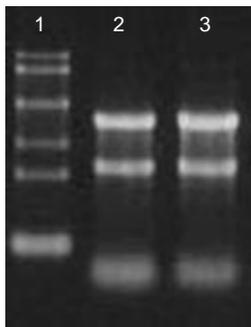


図 1 抽出 Total RNA の電気泳動

Lane 1: RNA Marker
Lane 2: HeLa Total RNA (Run 1)
Lane 3: HeLa Total RNA (Run 2)

1%ホルマリン変性アガロースゲル

品名	容量	価格 (¥)	メーカーコード
Get pureRNA Kit	50 samples	18,000	GK04

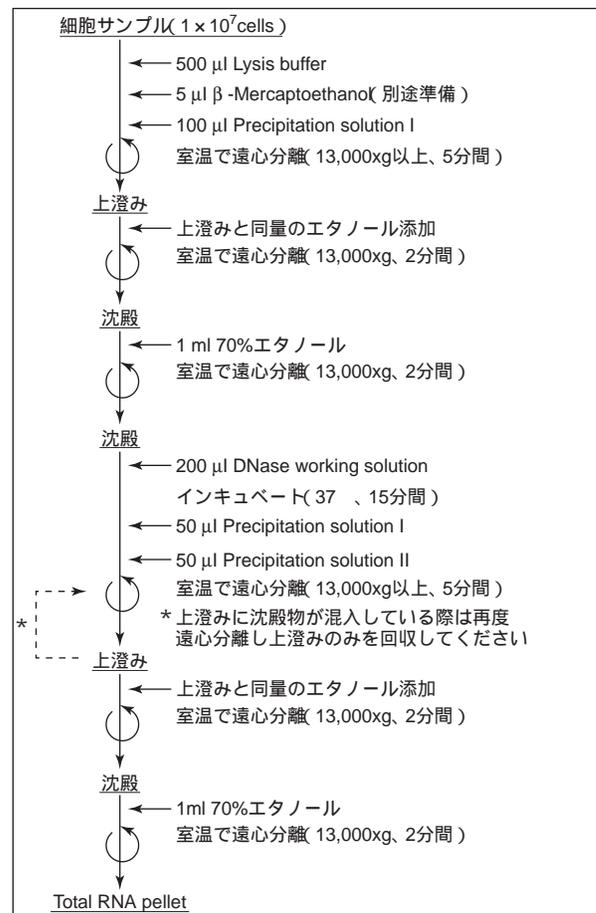
表 1 Total RNA 回収量とその純度

Sample	Recovery (µg)	A ₂₆₀ /A ₂₈₀
HeLa (1 x 10 ⁷ cells)	90 - 150	2.0-2.2
HeLa (1 x 10 ⁸ cells)	800 - 1400	2.0-2.2
Mouse liver (20 mg)	60 - 75	2.0-2.2
Mouse liver (1.0 g)	3800-4400	2.0-2.2
Mouse brain (30 mg)	15 - 25	2.0-2.2
Mouse brain (1.0 g)	700-1000	2.0-2.2
Blood (5 ml)	70 - 120	2.0-2.2

* 上記 A₂₆₀/A₂₈₀ 値は、回収した RNA を TE buffer(10 mmol/l Tris, 1 mmol/l EDTA, pH8.0)に溶解した際の値です。DEPC-treated water に溶解すると、A₂₆₀/A₂₈₀ 値が低く算出される場合があります。
* サンプルサイズにより1キットで可能な抽出回数は異なりますのでご注意ください。細胞 1 x 10⁶ ~ 1 x 10⁷ cells、組織 25 ~ 30 mg、血液 200 µl のとき 50 回抽出できます。

<操作方法>

例) 細胞からの Total RNA 抽出



ケミストからみた ポストゲノム

6

~プロテインアレイ(1)タンパク検出用プロテインアレイ~

九州大学工学研究院応用化学部門

片山佳樹

1. はじめに

ゲノム情報を利用していくためには、遺伝子を取得するだけでは不十分である。遺伝子の機能、言い換えれば遺伝子から発現するタンパクの機能を知ることが不可欠である。ゲノムワイドな視点からタンパク機能を研究する分野をプロテオミクスというが、これがポストゲノム研究の中心課題である。プロテオミクスは、タンパクの量的変化、機能的変化、構造的変化、相互作用、さらにタンパク全体のネットワークの解析など、極めて広範囲なカテゴリーを含む。しかし、遺伝子に比べ、タンパクは極めて複雑な性質を有しており、現状の技術では、アプローチが困難であるのが現状である。ここではまず、プロテオミクス研究の重要なツールとして期待されるプロテインアレイ及びペプチドアレイについて概説し、その内の1つであるタンパク検出用のアレイについてご紹介する。その後、何回かに分けて各タイプのアレイに関しても解説してみたい。

2. プロテインアレイ・ペプチドアレイの分類

(Fig.1)

プロテインアレイは、何を目的とするかで、大きく分けて2つのタイプに分類できる。1つは、これまでDNAアレイを用いて行われてきた遺伝子発現差解析の流れを汲むものである。すなわち、これまでmRNAの量的変化で評価してきたものを、その最終生成物であるタンパクの量的変化で直接見ようとするものである。一方、もう一つのアレイは、調べたいタンパクや薬物などが結合する標的タンパクを探そうとするものである。言い換えれば、タンパク間、タンパク-小分子、タンパク-核酸などの相互作用を直接評価することを目的とするアレイである。Kodadekは、前者をProtein-detection array、後者をProtein-function array、

MacBeathは、前者をQuantitative proteomics、後者をFunctional proteomicsと呼んでいる^{1,2)}。両者は、全く異なるものであり、要求される条件やアプローチ法、現状における問題点も大きく異なるため、別個に考える必要がある。これに対し、ペプチドアレイは、よりコンビナトリアルケミストリーの側面を有し、酵素の基質探しやインヒビターの探索などに用いられる³⁾。

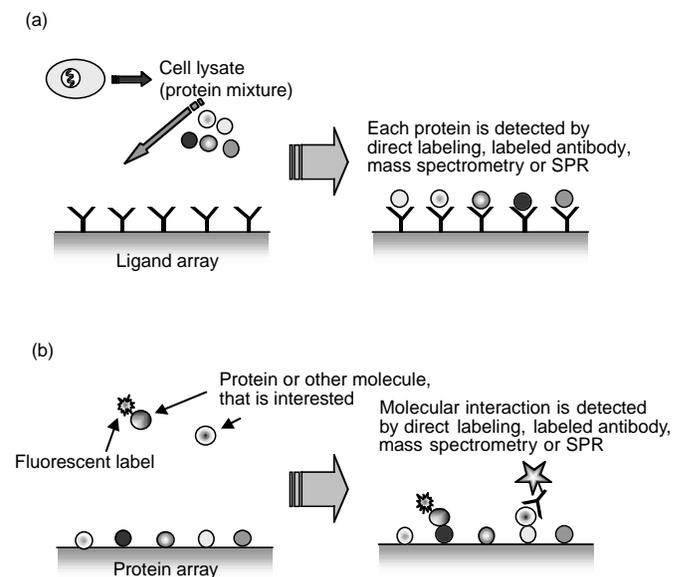


Fig.1 Two major type of protein array

a) Protein array for the detection of protein expression.

b) Protein array for the investigation of protein or ligand function

3. タンパク検出用アレイ

3-1: 背景

DNAアレイの開発は、疾患などにより遺伝子の発現状況がどのように変化するかをゲノムワイドに調べることを初めて可能にした。これにより、種々の疾患に関連すると思われる多くの遺伝子が発見されてきた。この手法は、遺伝子から転写されるmRNAのレベルの変化を正常細胞の状況と直接比較するものである。しかしながら、mRNAの量と、それから翻訳されるタンパクの量には密接な相関が無く、ある場合には20倍以上も異なることが分かってきている⁴⁾。さらに、タンパクは、リン酸化、糖化、アセチル化などの翻訳後修飾や限定分解により、機能の全く異なる状態に変化する。この様な理由から、mRNAレベルでの発現状況のパターンからは、間接的な情報しか得られない。従って、より直接的な情報を得るためには、どうしてもタンパク全体の発現状況(Proteome)を検討する必要がある⁵⁾。この様な目的のために現在、もっともよく用いられる手法は、2次元電気泳動である⁶⁾。この手法は、通常のゲル電気泳動と等電点電気泳動をそれぞれ90度異なる方向に行うことによって、細胞内に発現した全タンパクを

バイアス無しに全て分離、検出しようとするものである。分離されたタンパクのスポットは、銀染色などで可視化し、同定はマスペクトル(TOF-MS等)で行う。ところが、銀染色では感度の問題があることに加え、タンパクの量は、大きいものでは 10^6 倍も異なるため、量的に少ないタンパクは検出が困難である⁷⁾。しかしながら、重要なタンパクには量が少ないものが多い。さらに、ハイスループット化が困難であることや、マスペクトルは定量性の問題があることも欠点である。

一方、全タンパクの発現量変化を見るのではなく、特定の標的タンパクの変化を追跡するのであれば、検出はもっと楽になる。Pawletzらは、laser captured microdissectionにより取得したガン病変部位の溶解液(lysate:すなわち全タンパクの混合物)を、ガラススライドに保持したニトロセルロース膜に3 nl (250-300 μm)づつスポットし、対象タンパクに対する抗体を用いて検出した⁸⁾。検出はELISA法を利用し、蛍光標識抗体、あるいはHRP標識抗体を用いた化学発光法により、リン酸化型ErkやAkt、切断型Caspase-7やPARPの量的変化を計測している。その結果、ガンの進行に伴い、リン酸化Erkは減少し、リン酸化Aktは増加することを見出した。しかしながら、このような手法では、感度が低い(1 ng/ml)ことと、一度に多くの対象を計測できないのが難点である。これに対し、もし基板上に、予め各タンパクを認識して結合するサイトを設けておけば、それぞれの場所にタンパクを捕捉し、最適の検出法に必要なタンパク群の量的変化を直接評価できる。これを可能にするのが本プロテインアレイである。また、DNAアレイでは本質的に不可能な、タンパクの翻訳後修飾の変化を見ることができるのが利点である。一方、本手法では扱えるのが既知タンパクに限られるのが欠点である。

3-2: リガンドの取得

基板上の所定の位置に目的タンパクを捕捉するためには、それらを特異的に認識して結合するリガンドが必要である。そのようなリガンドとして最も可能性の高いものは抗体であろう。Silzelらは、4種のIgGモノクローナル抗体をポリスチレンフィルムにスポットして同時分析を試みた⁹⁾。これが最初の例である。その後、多くの例が報告されており、例えば、Schweitzerらは75種類の抗サイトカイン抗体をアレイ化している¹⁰⁾。しかしながら、もしゲノムワイドなタンパクの量的変化を追跡しようとするなら10万~100万種の抗体が必要であり、この様に多種類の抗体を如何に取得するかが問題である。ある程度網羅的解析をしようとするなら、少なくとも1000種の抗体は欲しいところである。しかしながら、従来の動物やハイブリドーマを用いる手法では、手間と時間がかかりすぎ、現実的ではない。ファージディスプレイを用いる単鎖抗体のスクリーニング¹¹⁾は、将来的に可能性のある手段であるが、如何に結合力と特異性の高い抗体をハイスループットでスクリーニングできるかが今後の課題である。

抗体以外のリガンドとしては、アプタマーがある¹²⁻¹⁴⁾。アプタマーは、核酸やタンパクの一部の配列をランダムに変化させて、特定の分子に結合するものをセクションすることで得られる。抗体よりもセクションが楽で効率がよい。特にDNAやRNAアプタマーの場合は、PCRと結合アッセイを組み合わせることで、高速でのセクションが可能である^{12,13)}が、一方で、それ自身が負

荷電を有しているため、タンパクの表面荷電の影響が大きい。タンパクアプタマーとしては、チオレドキシンを基本とするものがよく知られている。チオレドキシンは、小さく安定であることに加え、ループ部分に配列を種々変化させても全体の構造に影響を及ぼさない領域が存在し、この部分をアプタマーとして利用できる^{14,15)}。アプタマーでは、如何に標的タンパクとの結合力の大きいものを取れるかが鍵である。SomaLogic社は、タンパクに結合後、光照射でタンパクと共有結合するフォトアプタマーの利用を検討している¹⁶⁾。

コンビナトリアルケミストリーにより合成される小分子も、潜在的にはタンパクのリガンドとなりえるが、1つの基本骨格で多種類のタンパクに適應できる一般性を有するとは考えにくい。そのような中で、ペプチドリガンドは、タンパクとの結合力が高いものが得られることが示されており($K_d=10^{-9} \sim 10^{-12}\text{mol/l}$)、リガンドとして使える可能性がある¹⁷⁾。

いずれにしても、実用的な性能を有するリガンドを多種類確保することは、今後の大きな課題である。

3-3: 検出法

タンパク検出用のアレイは、基本的にはイムノアッセイのアナログである。従って、イムノアッセイの利点を有する反面、その欠点も同時に有している。

DNAアレイで行われてきた発現差解析をタンパクレベルで行うには、コントロール細胞と対象細胞でのタンパク存在量を直接比較しなければならない。このような目的のための最も簡単なアプローチは、双方の細胞に存在する全タンパクを、それぞれ異なる蛍光色素で標識するDual color approachである(Fig.2(a))¹⁸⁾。例えば、試料細胞の溶解液に存在するタンパクをCy5、コントロール細胞溶解液に存在するタンパクをCy3で標識して、両者を混合して抗体アレイと反応すると、各タンパクの量的変化が蛍光により評価できるはずである。例えば、146種類の抗体を固定したアレイを用いて、放射線処理細胞と未処理細胞の溶解液をこのアプローチにより比較することで、ストレス応答や細胞周期調節に関するタンパクの発現量変化が評価できた例がある¹⁹⁾。しかし、タンパクは核酸と異なり、PCR法などに対応するサンプル増幅法が無いため、検出シグナルの増幅を行わないこの様な手法では、検出感度が低く($\mu\text{g/ml}$ よりいものでも ng/ml)、発現量が少ないタンパクの検出が困難である。検出シグナルを酵素反応により増幅すると3ケタほど感度の向上が期待できる。タンパクを蛍光標識する代わりにビオチン標識し、抗体アレイに結合後、酵素標識アビジンを用いてシグナルを増感する手法²⁰⁾が報告されている(Fig.2(b))が、Dual color approachが使えないため、直接比較ができない。リンパ球表面の分化抗原に対する抗体アレイにリンパ球そのものを結合させて暗視野顕微鏡で検出するなどの方法(Fig.2(c))²¹⁾もあり、この場合には、細胞内を別の色で標識できるはずであるので面白い。定量性の問題は改善できないが、今後、この手法で2色が使えらる手法の開発が待たれる。しかしながら、タンパクへの直接の標識は、タンパクそのものの性質を変化させる危険性を常に包含している。例えば、リジン残基の側鎖アミノ酸にペプチド結合などで分子を標識すると、タンパク質表面の正電荷を消去することになり、大きな摂動を与えてしまう。

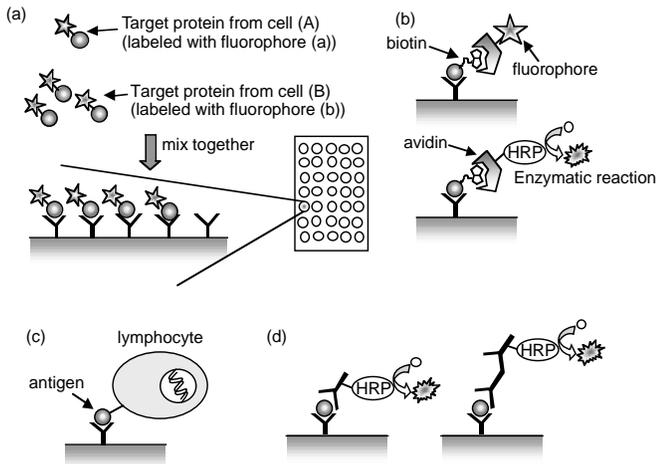


Fig.2 Detection of captured protein on ligand (antibody) array
 a) Dual color approach (Differential analysis of protein expression)
 b) Signal amplification using biotin-avidin system
 c) Non-labeling method for the detection of cellular surface antigens
 d) Sandwich type ELISA detection method

タンパクを標識せずに検出できれば、上記の問題は解決できる。ELISAにおけるサンドイッチ法は、まさにこの条件を満たしている(Fig.2(d))。サンドイッチ法は、標的タンパクを捕捉する固定化抗体と別に、標的タンパクの別のエピトープを認識して結合する2次抗体を用いて検出する手法である。Huangらはメンブレンに抗サイトカイン抗体をアレイ化し、サイトカインを捕捉後、ピオチン標識抗体を介してHRP標識アビジンやCy3標識ストレプトアビジンを用いて、化学発光法や蛍光法で検出している²²⁾。また、Wieseらは96穴マイクロプレートのウェルに64種類の前立腺特異的抗体をアレイ化し、ターゲットを捕捉後、2次抗体を作用させ、さらにHRP標識抗体を結合させて蛍光法によりインターロイキンなどを計測している²³⁾。同じくHRP標識抗体と化学発光法を利用するサンドイッチアッセイを利用して、種々のメンブレンが検討されており、Biotrans (ICN)、MagnaGraph(MSI)、HybondECL(Amersham)などが適しているとの報告がある²⁴⁾。最近、検出シグナル増幅法として酵素のほかに、SNP検出のところでご紹介したSniperアッセイと同じ、DNAのRolling circle amplification²⁵⁾をサンドイッチタイムノアッセイに適用した例もある¹⁰⁾。この手法は、将来的にDual color approachに適用できると面白い。サンドイッチ手法は、一般に2次抗体を用いることで特異性も向上するのでよい方法であるが、各々の標的タンパクに対し、互いに競合しない2種類の抗体が必要となるため、ゲノムワイドでの適用はさらにハードルが高い。また、抗体は多くが糖化されており、また認識部位の面積が大きいいため、本来交互反応性を有するため、DNAアレイのような高い定量性は期待できない。まして、プロテインアレイでは非常に多くのELISAを同時に同じ基板上で行うわけであるから、条件の最適化は解決すべき多くの問題を含んでいる。

タンパク標識無しで標的タンパクを検出するには、ELISA法の

利用のほかに、マスマスペクトルや表面プラズモン共鳴(SPR)があり、抗体を使わない検出法として興味深い。マスマスペクトル法は、直接タンパク質の同定ができるため、有用なツールである。ただし、定量性が無いのが最大の欠点である。質量分析では絶対的な定量性を解決することはできないが、標準サンプルの値と比較することで解決できる。ただし、同一のタンパクは分子量が同じであるので、前述のDual color approachの様に、両者を混合して計測することができない。これを解決したのがICAT法²⁶⁾に代表される同位体タグの利用である。例えば、通常のコホール反応性のピオチン標識剤と、その一部の水素を重水素化したものを、それぞれのサンプルに標識して混合し、検出時に限定分解して質量分析すれば、システインを含む部位の量的変化を比較定量できる。この他にも、片方の細胞を¹⁵Nを含む培地で培養して両者の質量に差を生じさせる手法もある²⁷⁾。この様な同位体タグの利用はこの他にも種々あり、単にタンパク量変化のみではなく、翻訳後修飾の解析などにも利用されている。この辺りの質量分析法のプロテオミクスへの利用に関しては、改めてご紹介する。SPR法は、金基板上に固定化した抗体へのタンパクの結合を、標識無しに検出する手法である²⁸⁾。表面プラズモンは、金属表面の自由電子波の量子化された準位である。もし、基板の裏側から光照射すると、プラズモン吸収の効率は角度依存性がある。この共鳴角は、表面に結合した分子の質量に依存するから、これを利用して表面における分子の結合を検出できる。SPR法は、標識無しで分子の結合を定量できること、kineticsが計測できるなどの利点を有するが、Dual color approachの様な、サンプル間の直接比較ができないこと、結合した分子の直接の同定はできないこと、金のプラズモン波長が長いため、高密度のアレイを作成できないなどの欠点がある。Biacoreでは、将来的には1000サンプルのアレイを開発可能であるとしており¹⁶⁾、将来的には質量分析法との組み合わせなど、期待される手法の一つである。

3-4：タンパク検出用プロテインアレイの解釈の複雑さ

DNAアレイは、配列さえ決まれば、アレイ上の一本鎖リガンドとターゲットは、ほぼ1:1で決まる。しかしながら、タンパクの場合、本来種々のタンパクやその他の分子と相互作用する性質を有している。分泌型のサイトカインなどではよいが、細胞内のタンパクでは、通常、多くのタンパクが多成分の複合体を形成している。もし、基板の抗体に結合するエピトープ部分が、その他のタンパクと複合体に使われている場合、抗体との競争になるため、実際の量より過小評価されてしまう(Fig.3(a))²⁹⁾。一方、もし抗体結合部位が、タンパク複合体形成部位と異なれば、基板上の抗体に標的タンパクが結合した後、これにさらに他のタンパクが会合するかも知れず、その場合、実際の量より過大評価されてしまう(Fig.3(b))。この様な問題は、サンドイッチ法を用いる場合、2種の抗体が関わってくるから尚深刻である。質量分析では、会合するタンパクを同定できるが、ELISA法やSPR法では、この問題を本質的に解決できない恐れがある。

これに加え、抗体には本質的な交互反応性があるため、解析には注意が必要である。また、抗体の標的結合力は、 $\mu\text{mol/l} \sim \text{nmol/l}$ であり、もし、標的タンパクが量的に pmol/l 以下であれば検出できない危険性を伴う。

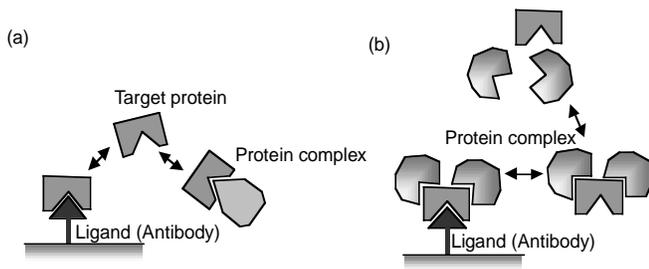


Fig.3 Complexity with interpretation of the data arising from protein array

- If the binding region of the target protein is obscured in the protein complex, the abundance of the target protein would be underestimated.
- If the other proteins interact with the target protein through the regions other than the epitope for the capture ligand, the abundance of the target would be overestimated.

4. おわりに

以上、タンパク検出用のプロテインアレイについて概説した。このタイプのアレイは、これまでDNAアレイで行われてきた発現差解析をより正確に行うためのものである。2次元電気泳動などは異なり、目的に応じた標的群のみの量的変化を直接評価できると、何よりもDNAアレイでは絶対に不可能な翻訳後修飾の様な機能変化を追跡できることが一番の利点である。しかしながら一方で、タンパクは核酸に比べ機能を受け持つ分子であることから分かるように、非常に扱いや解釈の複雑な分子である。従って、プロテインアレイを単純にDNAアレイの延長という風に安易に捉えて開発することはできない。そこにはご紹介したように、これから解決しなければならない、しかも非常に困難なハードルが数多く存在する。例えば、Zyomyx、Somalogic、HTS Biosystems、Phylos、Biacoreなどの各社がいずれも2001年末までにプロテインアレイを上市させることを表明していたにもかかわらず、軒並み製品化が遅れていることから分かる様に、その開発が如何に困難であるかが分かる。現在、プロテインアレイとして製品化されているものは、CIPHERGENのSELDI-MS検出用の低密度型フィルターアッセイ法くらいである³⁰⁾。これは、理想的なタンパク検出用アレイとは言いがたいが、それでも2001年にその売り上げは、1900万ドルとタンパクアレイを待望する市場が如何に大きいものであるかが分かる。潜在市場は、Bioinsightの見積もりでは、2006年に5億ドル、Biacoreの見積もりでは20億ドルともいわれている。今後、リガンドの取得、検出法の改善などがなされ、実用的アレイが開発されれば、診断法を初め多くのDNAアレイの市場は、プロテインアレイに取って代わることが十分に予想できる。次回は、目的タンパクや分子の結合標的タンパクを探索するためのプロテインアレイについてご紹介する。

参考文献

- T. Kodadek, *Chemistry & Biology*, **8**, 105 (2001).
- G. MacBeath, *Nat. Genet. Suppl.*, **32**, 526 (2002).
- たとえば、B. T. Hauseman, J. H. Huh, S. J. Kron, M. Mrksich, *Nat. Biotechnol.*, **20**, 270 (2002).
- S. P. Gygi, Y. Rochon, B. R. Franza, R. Aebersold, *Mol. Cell., Biol.*, **19**, 1720 (1999).
- N. L. Anderson, N. G. Anderson, *Electrophoresis.*, **19**, 1853 (1998).
- たとえば、A. Gorg, C. Obermairner, G. Boguth, A. Harder, B. Scheibe, R. Wildgruber, W. Weiss, *Electrophoresis*, **21**, 1037 (2000).
- E. J. Grayhack, E. M. Phizicky, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **5**, 34 (2001).
- C. P. Paweletz, L. Charboneau, V. E. Bichsel, N. L. Simone, T. Chen, J. W. Gillespie, M. R. Emmert-Buck, M. J. Roth, E. F. Petricoin III, L. A. Liotta, *Oncogene*, **20**, 1981 (2001).
- J. W. Silzel, B. Cercek, C. Dodson, T. Tsay, R. J. Obremski, *Clin. Chem.*, **44**, 2036 (1998).
- B. Schweitzer, S. Roberts, B. Grimwade, W. Shao, M. Wang, Q. Fu, Q. Shu, I. Laroche, Z. Zhou, V. T. Tchernev, J. Christiansen, M. Velleca, S. F. Kingsmore, *Nat. Biotechnol.*, **20**, 359 (2002).
- E. T. Boder, K. S. Mideldort, K. D. Wittrup, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**, 10701 (2000).
- C. Tuerk, L. Gold, *Science*, **249**, 505 (1990).
- J. Hesselberth, M. P. Robertson, S. Jhaveri, A. D. Ellington, *Rev. Mol. Biotechnol.*, **74**, 15 (2000).
- P. Colas, B. Cohen, T. Jessen, I. Grishina, J. McCoy, R. Brent, *Nature*, **380**, 548 (1996).
- E. Fabbrizio, L. LeCam, J. Polanowska, M. Kaczorek, N. Lamb, R. Brent, C. Sardet, *Oncogene*, **18**, 4357 (1999).
- P. Mitchell, *Nat. Biotechnol.*, **20**, 225 (2002).
- Y. Ham, T. Kodadek, *J. Biol. Chem.*, **275**, 14979 (2000).
- B. Haab, M. J. Dunham, P. O. Brown, *Genome Biol.*, **2**, research0004.1-0004.13 (2001).
- A. Sreekumer, M. K. Nyati, S. Varambally, T. R. Barrette, D. Ghosh, T. S. Lawrence, A. M. Chinnaiyan, *Cancer Res.*, **61**, 7585 (2001).
- V. Knezevic, C. Leethanakul, V. E. Bichsel, J. M. Worth, V. V. Prabhu, J. S. Gutkind, L. A. Liotta, P. J. Munson, E. F. Petricoin III, D. B. Krizman, *Proteomics*, **1**, 1271 (2001).
- L. Belov, O. de la Vega, C. G. dos Remedios, S. P. Milligan, R. I. Christopherson, *Cancer Res.*, **61**, 4483 (2001).
- R. Huang, Y. Lin, C. C. Wang, J. Gano, B. Lin, Q. Shi, A. Boynton, J. Burke, R-P. Huang, *Cancer Res.*, **62**, 2806 (2002).
- R. Wiese, Y. Belosludtsev, T. Powdrill, P. Thompson, M. Hogan, *Clin. Chem.* **47**, 1451 (2001).
- R.-P. Huang, *J. Immunol. Methods*, **255**, 1 (2001).
- P. M. Lizardi, X. Huang, Z. Zhu, P. Bray-Ward, D. C. Thomas, D. C. Ward, *Nat. Biotechnol.*, **19**, 225 (1998).
- S. P. Gygi, B. Rist, S. A. Gerber, F. Turecek, M. H. Gelb, R. Aebersold, *Nat. Biotechnol.* **17**, 994 (1999).
- T. P. Conrads, K. Alving, T. D. Veenstra, M. E. Belov, G. A. Anderson, D. J. Anderson, M. S. Lipton, L. Pasa-Tolic, H. R. Udseth, W. B. Chrisler, B. D. Thrall, R. D. Smith, *Anal. Chem.*, **73**, 2132 (2001).
- R. L. Rich, D. G. Myszka, *Curr. Opin. Biotechnol.*, **11**, 54 (2000).
- R. Hyde-DeRuyscher, L. A. Paige, D. J. Christensen, N. Hyde-DeRuyscher, A. Lim, Z. L. Fredericks, J. Kranz, P. Gallant, J. Zhang, S. M. Rocklage, D. M. Fowlkes, P. A. Wendler, P. T. Hamilton, *Chem. Biol.*, **7**, 17 (2000).
- K. Senior, *Mol. Med. Today*, **5**, 326 (1999).

Topics on Chemistry

G6PD 異常症のスクリーニング

地球温暖化の影響により熱帯域が拡大していくにつれ、今まで日本とは無縁とされていたマラリアが、身近な問題としてクローズアップされる日も近いのではないかと思われる。今回は、そのマラリア発生地域に深く関係のあるG6PD異常症およびそのスクリーニング方法に関して紹介したい。

G6PD 異常症 (G6PD Deficiency) とは、グルコース6リン酸脱水素酵素(G6PD)の活性が著しく低いため、酸化作用を防御する還元型グルタチオン(GSH)の補充が不十分となり、ヘモグロビンの変性によるHeinz小体の形成、細胞膜の透過性異常の結果、主として血管内溶血をきたす疾患である。平素は無症状であるが、感染などで薬剤服用後、ヘモグロビン尿を主症状とする溶血発作、黄疸、貧血を呈する。酵素異常による溶血性貧血では最も頻度が高い疾患である。

G6PD の構造を決定する遺伝子はX染色体に存在する。したがって、母親から異常な遺伝子を受け継いだ男児に発症する。女性でもホモ接合であれば発症するが、ヘテロ接合では正常酵素を持った赤血球と異常酵素を有する赤血球が種々の割合で混在するため、全体の活性は個人差が大きく、一般には無症状となる場合が多い。

世界中ではおよそ4億人がG6PDの異常遺伝子を持っているとみなされている。地理的分布に特徴があり、アフリカ、地中海沿岸諸国、東南アジアの頻度が高い。人種的にはクルド系ユダヤ人男性の50%、アフリカのバンツー人の20%、アメリカ黒人の10~15%、ナイジェリア人の20%、北ヨーロッパ白人の0.1%以下など偏りが顕著である。日本における頻度は0.1%以下とみなされている。

本症はマラリアと深い関係にあり、本症の分布とマラリアの流行地域の地理的相関から、この疾患はマラリアの自然淘汰により有利な形質として選択された結果と想像されている。特に、G6PD異常症の熱帯熱マラリア原虫感染に対する抵抗性は、疫学的な相関と人工培養での研究からも推察されている。しかしながら、最近の疫学調査では、G6PD異常症とマラリア感染防止の間には相関がないと結論している報告¹⁾もある。

三日熱マラリア感染の根絶療法薬として、また、熱帯熱マラリアの生殖母体による伝播を防止するための薬としても使用されているものにプリマキンがある。しかし、このプリマキンがG6PD異常症患者に対して溶血性貧血を引き起こす。この溶血性貧血は医学的に重大な問題であり、また、マラリア対策における化学療法活動においても制限を与える結果となっている。従って、マラリア対策プログラムが開始する前に、地域住民のG6PD異常症を前もって把握することが大変重要となっている²⁾。

G6PD異常症の診断には、今日までに多くの方法が発表され、蛍光スポット法^{3,4)}、ホルマザン基質の3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H tetrazolium bromide (MTT) と発色試薬のphenazine methosulfate (PMS) を使ったホルマザン法^{5,6,7)}などが知られている。しかし、いずれの方法でも村落の現場で実際に応用するには種々の問題を抱えている。特に、蛍光スポット法は最も良く知られた方法で、簡便かつ迅速な方法の一つである。しかし、本法は紫外線ランプと電気を必要とすることが主たる欠点である。即ち、多くのマラリア流行地などの辺鄙な地域では電気

名古屋大学大学院医学系研究科 川本 文彦

が供給されておらず、たとえ供給されていても夕方以降のみであることが多い。また、この方法では、片方のX遺伝子のみが異常であるヘテロ接合体の女性(50%前後の活性を有する)のG6PD異常症の検出は極めて難しい⁸⁾。本症は、父親のみならず母親からも子供に伝わる遺伝子疾患であるため、ヘテロ接合体の女性異常者の検出も重要となる。

一方、MTTホルマザン法では、MTTがヘモグロビンと反応するため、これが普及できない主要な問題の原因ともなっている。即ち、血液とMTTを直接反応させないようにするため種々の工夫が行われてきたが、そのために診断キットの作製に多大な時間や研究室的な作業が必要となっている。これらの方法の中では、DEAE-Sephadexを担体とした方法⁷⁾は、全く機器を使用せず、視認で判定する方法で大変優れた方法である。しかし、ゲルの作製に多量の緩衝液と多大な時間を必要とし、10%以下の活性であれば検出が容易であるが、20-50%程度の欠損者の検出は難しい。また、使用されている試薬のPMSが強い光感受性であるため、判定の正確性に問題がある¹⁾。更に、これまでに報告されたホルマザン法を利用したG6PD異常症の診断では、産生されたホルマザンが非水溶性であるため、G6PD活性の定量的測定はかなり難しいという欠点を持つ。

筆者は、新しいホルマザン基質である2-(2-methoxy-4-nitrophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H tetrazolium monosodium salt (WST-8)がヘモグロビンと反応せず、産生されたホルマザンも高度に水溶性であり、MTTとは異なっていることに着目し、G6PD異常症診断への応用を試みた。そしてG6PD酵素で産生されたNADPHの測定に、WST-8を基質として水溶液中で使用することが可能となった (Fig 1)。WST-8のホルマザンは460nmに最大吸収を有し、強い橙色を呈するため発色結果を視認で確認できる。従って、マラリア流行地のような電気が供給されていない地域でも、電気や高価な機器類を一切必要とすることなく、その場で目視による診断ができることになる。更に本法は、MTTホルマザン法では測定できなかった20-50%程度の欠損者に対しても目視で診断できるようになった (Fig 2)。また、電気が供給されている都市部では、ELISAリーダーなどを利用して、少量の試薬で正確な酵素活性を定量的に測定することも可能である (Fig 3)。

このようにWST-8をホルマザン基質として使用することで、簡便かつ高精度のG6PD異常症の診断が可能になった。マラリア発生地域住民のG6PD異常症を本法で診断される日も近い。

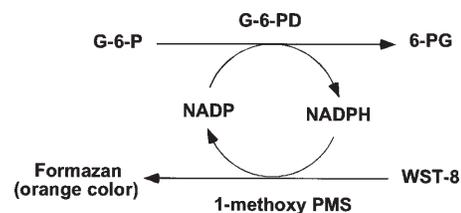


Fig. 1 WST-8を用いたG6PD活性の測定原理

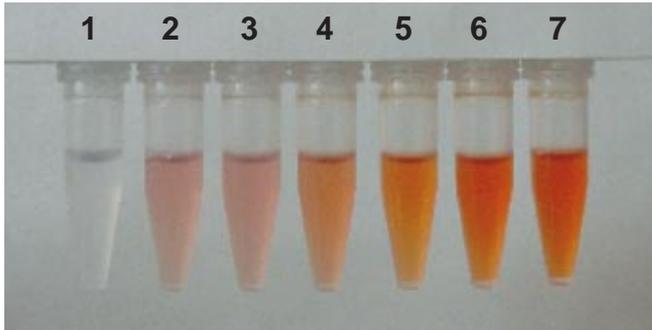


Fig. 2 実際の発色画像

正常血液とG6PD異常症血液を混ぜて得られた種々の酵素活性サンプルを反応チューブに入れてWST-8にて橙色に発色させた。

各々のチューブには5μlの血液を加えている。

1. 血液無添加の陰性対照区
2. 基質を抜いて血液を加えた陰性対照区
3. G6PD 異常症血液
- 4 ~ 6. G6PD 異常症血液と正常血液を3 : 1、1 : 1、1 : 3の割合で混ぜた血液の活性
7. 正常血液

チューブ1~3には橙色の発色は認められない。またチューブ4~5では弱い発色が認められ、陰性対照区(チューブ1~3)と陽性対照区(チューブ7)が容易に区別できる。

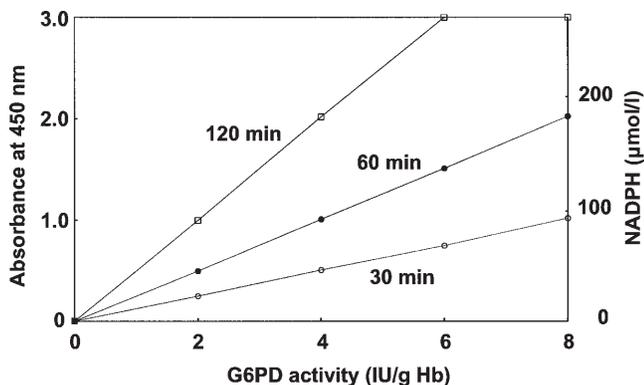


Fig. 3 血液サンプルの発色の時間的増大

Fig.2の血液サンプルのG6PD活性を吸光度計で測定した結果。測定値は5回の繰り返し実験の平均値を示す。室温で30~60分の反応で、吸光度の直線的増加が認められる。

参考文献

- 1) I. S. Tantular, et al., *Tropical Medicine and International Health*, **4**, 245 (1999).
- 2) A. Ishii, et al., *Japanese Journal of Parasitology*, **43**, 312 (1994).
- 3) E. Beutler, *Blood*, **28**, 553 (1966).
- 4) E. Beutler and M. Mitchell, *Blood*, **32**, 816 (1968).
- 5) V. Fairbanks and E. Beutler, *Blood*, **20**, 591 (1962).
- 6) H. Fujii, et al., *Acta Haematologica Japonica*, **47**, 185 (1984).
- 7) A. Hirono, et al., *Japanese Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **26**, 1 (1998).
- 8) A. Pujades, et al., *Int. J. Hematol.*, **69**, 234 (1999).

Q & A

総グルタチオン測定キット

Total Glutathione Quantification Kit

glutathioneは哺乳動物に存在するトリペプチドで、glutathione peroxidase, glutathione-S-transferaseおよびthiol transferase等の酵素基質として関与しています。また、glutathioneは酸素ラジカル捕捉能があり、アスコルビン酸と同様の抗酸化作用が認められています。

glutathioneの定量には化学的方法と酵素的方法がありますが、DTNBを用いる酵素サイクリング法は感度が良く、比較的簡便な方法です。詳しくはカタログ、ホームページのプロトコル「P11 総グルタチオン量を測りたい」をご覧ください。

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

- Q1 測定範囲はどのくらいですか？
 A1 1 ~ 100 μmol/l(但しGSHとして)の濃度範囲で測定可能です。また、0 ~ 25 μmol/lの低濃度域の測定は高感度測定法を用いれば、感度よく測定できます。
- Q2 サンプルが赤血球や血漿の場合、どのくらいの血液が必要でしょうか？
 A2 一つのwellに必要なサンプル量は20 μlになります。単純にn=3にすると20 μl × 3 = 60 μlとなりますが、前処理を行うことを考えた場合 数百 μlは必要となります。
- Q3 サンプル中のglutathione量が多いのですが、サンプルを薄める時はどのようにすればよいでしょうか？
 A3 水か0.5%スルホサリチル酸(SSA)で希釈してください。5%SSAでも調製可能ですが、測定時にはSSA濃度を1%以下にする必要があります。
- Q4 SSAは何のために使うのでしょうか？
 A4 除タンパクとglutathioneの酸化を防ぐために用いています。
- Q5 検体の前処理に使用するSSAは何で溶かせばよいですか？
 A5 純水で調製してください。比較的容易に溶解します。
- Q6 試料中のSSA濃度が高いとどのような影響がみられますか？
 A6 試料のpHが低くなりすぎます。SH基を定量する時に影響を受け、十分に発色しません。
- Q7 substrate working solutionを入れてからの発色が速く、プレート内でかなりのタイムラグが出ます。どうすればよいでしょうか？
 A7 以下の点をご検討下さい。
 • マルチチャンネルピペットを使用する。
 • substrate working solutionを添加する時、低温環境下

Q & A

総グルタチオン測定キット

(例えば低温室)で行い、その後室温で一定時間(例えば10分間)インキュベートする。

- 低温環境下でインキュベート時間を長くして測定する。
- 測定サンプル数を30サンプルより少なくしサンプル間の時間差をなるべく少なくするようにする。
- 高濃度領域ほどタイムラグは大きくなるので希釈したサンプルで測定する。(高感度測定を行うこととなります。)

Q8 DTNBはSH基にのみ反応するのですか？

A8 必ずしもSH基選択的ではありません。SO₃²⁻やS²⁻とも同様の反応をします。また、CN⁻なども妨害しますので、これらのイオンの共存は避けてください。

Q9 他に測定の妨害要因となるものはありますか？

A9 アスコルビン酸、 β -メルカプトエタノール、ジチオスレイトール(DTT)のような還元性物質やシステイン、またSH基と反応するような化合物(マレイミド等)は測定に影響を与えます。

また、アセトンなどの有機溶媒が共存すると吸光度が著しく変化します。その他、Q6のように反応時のpHが低くなると定量に影響を受けます。

Q10 30℃でインキュベーションすることになっていますが、37℃や室温ではだめでしょうか？

A10 glutathione reductaseの至適条件で行っておりますので30℃にしておりますが、測定の際はstandardも同時に測定しますので37℃や室温でも問題はありませぬ。

Q11 キット以外に必要なものはありますか？

A11 プレートリーダー(405 nmもしくは415 nmのフィルター)、96wellプレート、マイクロピペッター、インキュベーション装置、5-スルホサリチル酸(SSA)が必要です。

Q12 キットは開封後、保存できますか？

またどのように保存すればよいでしょうか？

A12 Coenzyme working solutionは溶解後は氷冷保存し、その日の内に使用して下さい。

Substrate working solution, GSH standard solutionは溶解後、-20℃にて保存してください。約2ヶ月使用できます。Enzyme working solutionは希釈後4℃にて保存してください。約2ヶ月使用できます。

Q13 GSHとGSSGを測り分けたい時にはどのようにすればよいのでしょうか？

A13 GSSGを測定する際は、別途GSSG standardと2-vinylpyridineをご購入いただく必要があります。測定方法は次のようになります。

キットを使用してtotal glutathione量を測定する。

試料中のGSHを2-vinylpyridineを使ってマスクする。

の試料中のglutathione量を測定し、GSSG量を求める。同時にGSSG standardを用いた検量線を作成し、その検量線より値を求める。

Total glutathione量から求めた値を差し引きGSH量を算出する。

* 生体中ではGSHが大半でGSSGの量はわずか(1%以下)値としてはかなり低いものとなります。そのため、検量線を作成する際には低濃度のstandardが必要となります。

感度を上げるためには、インキュベーション時間を長く取るなどの工夫が必要となりますが、実際の測定値はかなり低いものとなるため、データのバラツキなどの問題が生じるかもしれません。

Q14 GSSGを測定する際の前処理の時にもSSAは必要でしょうか？

A14 SSAは必要です。これは前処理の段階でGSHがGSSGになるのを防ぐ目的で添加します。

中性以上のpHではGSHは容易にGSSGに酸化されてしまいます。また、中性ではGSH、GSSGともに γ -GTPの基質になりますので酸性条件で取り扱う必要があります。ただし、酸性溶液のままですと2-vinylpyridineによるGSHのマスクの反応性が落ちますので、2-vinylpyridineを添加する際にはtriethanolamineなどで溶液を中性にする必要があります。

この後、再度SSAを添加する必要はありません。そのまま検出反応に使用してください。

Q15 GSHをマスクする物質として2-vinylpyridineとN-ethylmaleimideの2種類を文献で見かけます。どちらの方がよいのでしょうか？

A15 N-ethylmaleimideは、還元型のglutathioneとの反応は非常に速いのですが、ある一定の濃度を超えると、その後のglutathione reductaseを用いた酵素サイクルの反応を阻害するようです。2-vinylpyridineは過剰になってもあまり測定には影響が無いようなので、こちらの方が有用だと思われます。

GSS測定の詳細は下記文献をご参照ください。

- 1) O. W. Griffith, *Anal. Biochem.*, **106**, 207 (1980).
- 2) M. E. Anderson, *Methods in Enzymology*, **113**, 548 (1985).

品名	容量	価格(¥)	メーカーコード
Total Glutathione Quantification Kit	100 tests	25,000	T419

新製品

HTS 用細胞内カルシウム測定キット

Calcium Kit – Fluo 3

特長

- Probenecidや界面活性剤を別添付にしており、任意の濃度に調製可能。
- ハイスループットスクリーニングに用いられる各種蛍光プレートリーダーで測定可能。
- 96穴マイクロプレート、384穴マイクロプレートの両方に対応。

Calcium Kit - Fluo 3 は、細胞内 Ca^{2+} 測定試薬である Fluo 3-AM と、その測定に必要な Buffer 等を組み込んだ大量スクリーニングに最適なキットとなっております。細胞種や添加する薬剤などに応じて、Pluronic F-127 または Cremophor EL (Fluo 3-AM の溶解補助剤) Probenecid (陰イオントランスポーターの阻害剤) の各濃度を任意に設定することが可能です。1キットで2,000アッセイ (96穴プレート20枚分) の測定が可能です。

キット内容

- Fluo 3-AM 1 mg × 1 本
- Dimethylsulfoxide 2 ml × 1 本
- Recording Medium (2 ×) 100 ml × 2 本
- 250 mmol/l Probenecid 2.5 ml × 1 本
- 5% Pluronic F-127 5 ml × 1 本
- 5% Cremophor EL 5 ml × 1 本

* 必要に応じて細胞洗浄用のPBSをご用意下さい。Kitには組み込まれておりません。

測定方法

細胞の培養

- 付着細胞を使用する際は一般に、96穴プレートでは15,000 cells/well、384穴プレートでは5,000 cells/well程度の細胞を、一晚培養して使用することをお勧めします。
- 培養に用いる培地の量は、96穴プレートで100 μ l/well、384穴プレートで25 μ l/wellをお勧めします。

Loading Buffer の調製 (マイクロプレート20枚分)

1. 添付の Dimethylsulfoxide から 1 ml を分取し、Fluo 3-AM 1 本 (1 mg) に加え、よく溶解する。
2. 200 ml スケールの容器を準備する。Recording Medium (2 ×) 100 ml に、測定条件に応じて、任意の量^{*1)}の5% Pluronic F-127 (または5% Cremophor EL) 250 mmol/l Probenecid を添加し、これに全量が200 ml となるように純水を加え、よく混合する (本キットは予め、測定に最適な pH7.4 付近となるよう構成してあります。)
3. Fluo 3-AM の Dimethylsulfoxide 溶液 (1 ml) を添加して、超音波などでよく溶解し、Loading Buffer とする。

^{*1)} 推奨濃度を Probenecid: 1.25 mmol/l、Pluronic F-127: 0.04 % としておりますが、濃度の変更は可能です。Loading

Buffer 200 ml を調製する場合、Probenecid、Pluronic F-127 (またはCremophor EL) のアッセイ時の最終濃度と、添加量の関係は以下ようになります。

250 mmol/l Probenecid の添加量と最終濃度

添加量 (ml)	0.4	0.6	0.8	1.0	1.2
最終濃度 (mmol/l)	0.50	0.75	1.00	1.25	1.50

5 % Pluronic F-127 (または5 % Cremophor EL) の添加量と最終濃度

添加量 (ml)	0.4	0.8	1.2	1.6	2.0
最終濃度 (%)	0.01	0.02	0.03	0.04	0.05

Recording Medium (1 ×) の調製 (マイクロプレート20枚分)

1. 別途、200 ml スケールの容器を準備する。Recording Medium (2 ×) 100 ml に、測定条件に応じて、任意の量^{*2)} 250 mmol/l Probenecid を添加し、これに全量が200 ml となるように純水を加え、よく混合する (本キットは予め、測定に最適な pH7.4 付近となるよう構成してあります。)
2. 37 °C インキュベーター中で加温しておく。

^{*2)} 推奨濃度を Probenecid: 1.25 mmol/l としておりますが、濃度の変更は可能です。Recording Medium (1 ×) 200 ml を調製する場合、Probenecid のアッセイ時の最終濃度と、添加量の関係は以下ようになります。

250 mmol/l Probenecid の添加量と最終濃度

添加量 (ml)	0.4	0.6	0.8	1.0	1.2
最終濃度 (mmol/l)	0.50	0.75	1.00	1.25	1.50

細胞への Fluo 3-AM のロード

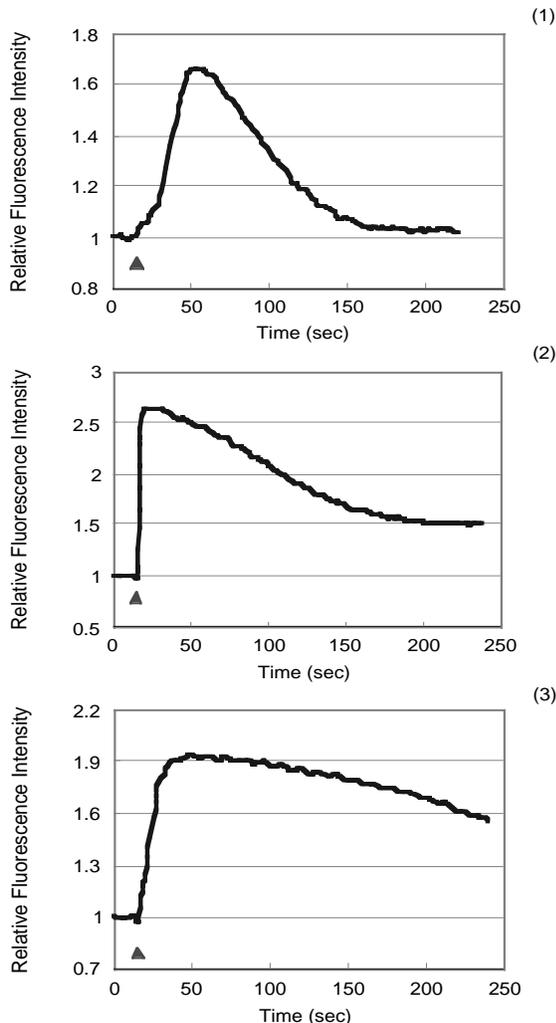
1. 細胞を傷つけないように培地を取り除いた後、96穴プレートで100 μ l/well、384穴プレートで25 μ l/wellのLoading Bufferを、それぞれのwellに加える (必要に応じて、Loading Bufferを添加する前に、37 °C に加温したPBSで細胞を洗浄して下さい)。
2. 37 °C で1時間、インキュベートする。
3. 細胞を傷つけないようにLoading Bufferを取り除き、予め37 °C に加温しておいたRecording Medium (1 ×) を、96穴プレートで100 μ l/well、384穴プレートで25 μ l/wellずつ加える (必要に応じて、Recording Mediumを添加する前に、37 °C に加温したPBSで細胞を洗浄して下さい)。
4. 薬剤添加による蛍光強度変化を、ハイスループットスクリーニング用の各種蛍光プレートリーダーで測定する。

新製品

HTS 用細胞内カルシウム測定キット

注意事項

- 本キットは、冷凍にて保存してください。
- Fluo 3-AM Dimethylsulfoxide 溶液、Loading Buffer 及び Recording Medium は、用時調製してください。
- Fluo 3-AM を Dimethylsulfoxide に溶かした状態で長期保存しますと、Fluo 3-AM が分解する可能性があります。Loading Buffer は、1 回の操作で使い切ることをお勧めします。
- ご購入後、1 年以内にご使用ください。



Calcium Kit-Fluo 3 測定結果

- (1)メラニン凝集ホルモン(MCH) 受容体を発現させた CHO 細胞(チャイニーズハムスター卵巣細胞, 15,000 cells/well) を 10 nmol/l MCH で刺激した。
- (2)orexin B 受容体を発現させた CHO 細胞(チャイニーズハムスター卵巣細胞, 15,000 cells/well) を 10 nmol/l orexin で刺激した。
- (3)SH-SY5Y 細胞(ヒト神経芽腫細胞 15,000 cells/well) を 0.1 μmol/l ionomycin で刺激した。

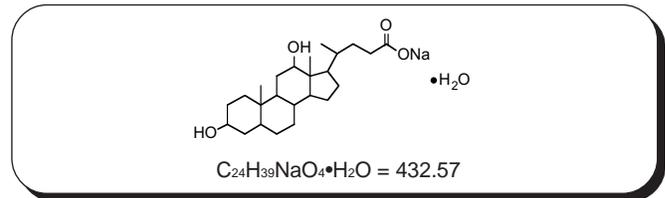
品名	容量	価格(¥)	メーカーコード
Calcium Kit - Fluo 3	2000 assays	65,000	CS21

試作品

膜タンパク質可溶化剤

Sodium deoxycholate (purified)

化学名 Deoxycholic acid, sodium salt, monohydrate



デオキシコール酸ナトリウムはドデシルスルホン酸ナトリウム(SDS) 同様、陰イオン性界面活性剤で、CMC値は5 mmol/lです。本試薬はステロイド環上にも2つの水酸基を持ち、かつ末端にカルボキシル基を持っているため親水性部分が分子の一部に限定されないという特徴を持っています。3つの水酸基を持つコール酸に比べると親水性は弱く、より強い界面活性作用を示します。デオキシコール酸は7分子が会合して小さいミセルを形成するため、透析等によって除去できます。

この応用としては、大腸菌のH⁺輸送性ATPase(F₀F₁)の可溶化に0.35%濃度で用いられた例や、好熱菌PS3のアラニン輸送担体を2%コール酸ナトリウムと1%デオキシコール酸ナトリウムの混合溶液で可溶化した例などがあります。

本品は十分に精製をすることにより、着色を除いたものです。そのまま水に溶かして、膜タンパク質の可溶化、精製に使うことができます。

参考文献

- 1) D. L. Foster, R. H. Fillingame, *J. Biol. Chem.*, **254**, 8230 (1979).
- 2) H. Hirata, N. Sone, M. Yoshida, Y. Kagawa, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **69**, 665 (1976).
- 3) J. C. Norton, S. E. Holt, W. E. Wright, J. W. Shay, *DNA Cell Biol.*, **17**, 217 (1998).
- 4) M. B. Jones, J. C. Garrison, *Anal. Biochem.*, **268**, 126 (1999).

新製品

残留塩素測定キット

残留塩素測定キット-SBT法 残留塩素測定試薬-SBT法

特長

- 検水中の遊離残留塩素と瞬時に反応し、青緑色に発色する。
- 発色試薬は安定な水溶液で、DPD法のように溶解・混和の操作が不要である。
- 感度はDPD法の約2倍を示す。
- 0～2.0 ppmまでの遊離残留塩素を測定できる。

はじめに

古くから水道水およびプール水中の消毒には次亜塩素酸ソーダなどの塩素剤が用いられてきました。わが国では水道法により水道水中の遊離残留塩素濃度は0.1 mg/l(0.1 ppm)以上を維持することが定められており、各水道局などでは常に塩素濃度を監視しています。また、近年公衆浴場等の浴槽水からのレジオネラ菌類による集団感染が問題となっておりますが、塩素剤を用いた浴槽水の殺菌が有効であるために、厚生労働省から浴槽水中の遊離残留塩素濃度を維持・管理するよう指針が出されています。

残留塩素濃度の測定には、安価で操作性の良い吸光光度法が望まれます。N,N-Diethylphenylenediamine (DPD)が測定試薬として汎用されていますが、1) 検水への溶解・混和が煩雑である、2) 溶液状態で不安定などの問題がありました。昨年弊社で開発したSAT-3を用いた残留塩素測定では(Dojin News, No. 100, 10-11 (2001). 参照) DPDに比べより高感度な検出を実現しましたが、溶液中での安定性が十分でなく、とりわけ日光下では次第に着色してしまうという問題がありました。

残留塩素測定キット SBT法は、SAT-3法の問題を解決し試薬溶液の安定性の向上を実現しました。また、点眼瓶による試薬添加および色調比色計の採用などにより、より使いやすいキットとしました。

セット内容

残留塩素測定キット-SBT法

- | | |
|-------------------|----|
| • 検水調整液(白キャップ点眼瓶) | 1本 |
| • 色素液(青キャップ点眼瓶) | 1本 |
| • 色調比色計 | 1式 |
| • 試験管 | 2本 |
| • スポイト | 1本 |

残留塩素測定試薬-SBT法

- | | |
|-------------------|----|
| • 検水調整液(白キャップ点眼瓶) | 1本 |
| • 色素液(青キャップ点眼瓶) | 1本 |

測定手順

1. 試験管の下部のラインまで検水を入れる。
2. 検水調整液(白キャップ点眼瓶)を2滴加え軽くふり混ぜる。
3. 色素液(青キャップ点眼瓶)を1滴加え軽くふり混ぜる。
4. 発色後ただちに色調比色計にセットし、遊離残留塩素濃度を求める。

次亜塩素酸の定量

本キットを用いて次亜塩素酸と反応させた時の吸収スペクトルおよび発色をFig. 1およびFig. 3に示します。水中の次亜塩素酸濃度に応じてSBTの青緑色の発色が強くなります。また、各塩素濃度におけるSBTの675 nmでの吸光度を塩素濃度に対してプロットすると、相関係数 $R^2=0.999$ と良好な直線性を示し、次亜塩素酸濃度の正確な定量が可能です(Fig. 2)。

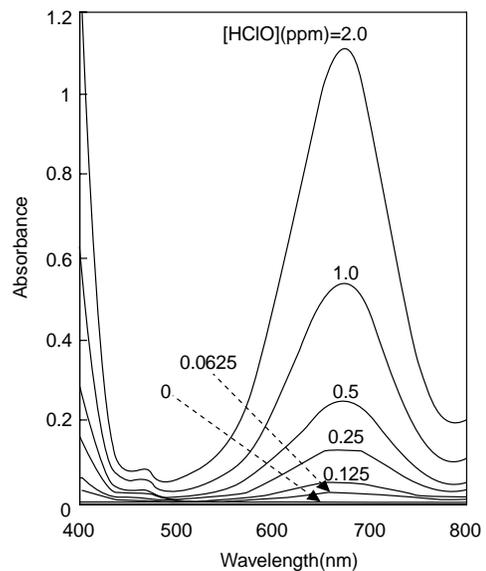


Fig. 1 残留塩素測定キット-SBT法の吸収スペクトル

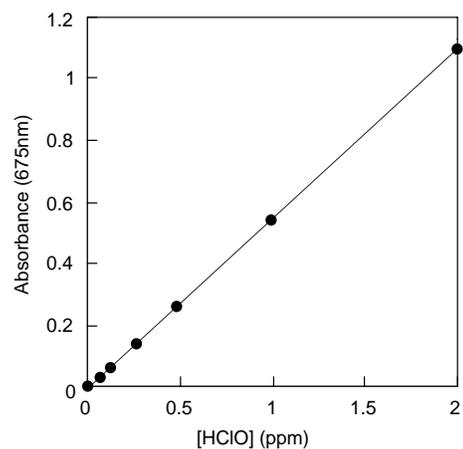


Fig. 2 残留塩素測定キット-SBT法による検量線

残留塩素測定キット-SBT法は水中の次亜塩素酸と反応し青緑色に発色します。その発色強度はDPD法の約2倍であることから、より高感度に遊離塩素を検出することが可能です(Fig. 4)。

新製品

残留塩素測定キット

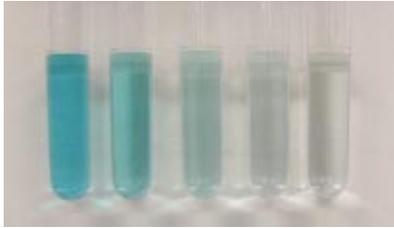


Fig.3 残留塩素測定キット -SBT 法による発色
左より[HClO]=2, 1, 0.5, 0.25, 0.125 ppm

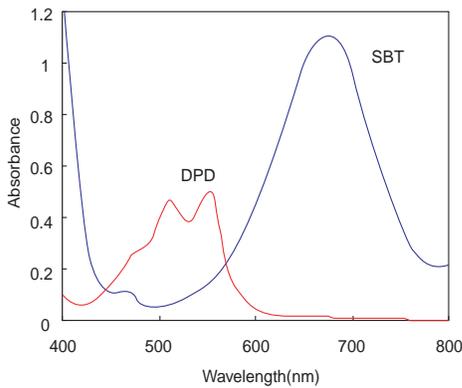


Fig. 4 次亜塩素酸 2 ppm 中における DPD 法および SBT 法の発色スペクトル

< 浴槽水中の残留塩素測定 >

近年、温泉や公衆浴場でレジオネラ菌に感染するケースが多発しています。宮崎県での集団感染では、感染者数が300名近くまで上りそのうち7名が死亡するという衝撃的なケースとなりました。この他、全国各地でレジオネラ菌の感染事例が多数報告され世間を震撼させています。この背景には温泉施設の大型化・近代化に伴い、「循環式」の浴槽が普及してきたことが挙げられ、パイプやタンク、濾過器の清掃・消毒等の衛生管理を怠ったため浴槽中に菌が繁殖し、人体へ影響を及ぼす濃度にまで増殖したためとされています。厚生労働省はこのような事例を受け、レジオネラ症防止対策に関する指針等を各都道府県・政令市首長宛てに度々通達してきました。平成14年10月29日発行の指針では、「浴槽水の消毒に当たっては、塩素系薬剤を使用し、浴槽水中の遊離残留塩素濃度を頻りに測定して、通常1L中0.2ないし0.4mg程度を保ち、かつ、遊離残留塩素濃度は最大1L中1.0mgを超えないよ

う努めるとともに、当該測定結果は検査の日から三年間保管すること」とされています。今後、各自治体での条例化が進み、残留塩素濃度の測定の義務化が予想されます。

残留塩素測定キット -SBT 法は温泉水中の残留塩素測定が可能なキットとして開発いたしました。熊本県内の数ヶ所の源泉から採取した温泉水を用いて、次亜塩素酸の添加回収試験を行った結果をFig.5に示します。いずれの温泉水の場合でも検量線は良好な直線性を示し、その傾きは純水における検量線の傾きとほぼ一致し、100%回収されています。また、残留塩素測定キット -SBT 法は殺菌能力の少ない結合型塩素とは反応しません。このように SBT 法は多種多様な成分が含まれる温泉水においても正確に遊離残留塩素濃度を求めることができます。

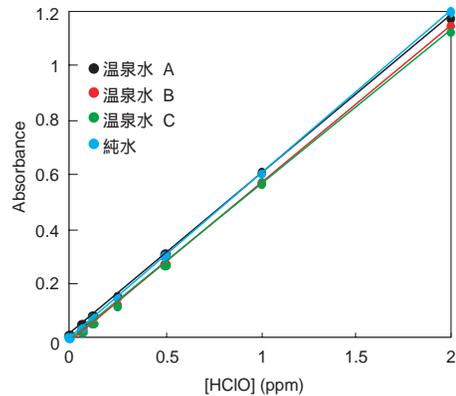


Fig. 5 各温泉水の添加回収試験

本品の総発売元は株式会社同仁グローバルとなりますが、
お問合せは株式会社同仁化学研究所までお願いします。

担当 満田 E-mail:mitsuda@dojindo.co.jp

斉藤 E-mail:motoko@dojindo.co.jp

TEL:096-286-1515 FAX:096-286-1525

品名	容量	価格(¥)	メーカーコード
残留塩素測定キット -SBT 法	set	7,000	ZK01-50
残留塩素測定試薬 -SBT 法	100 回用	1,300	ZK01-60
残留塩素測定試薬 -SBT 法	500 回用	5,000	ZK01-60
色素液	100ml	9,000	ZK01-70
検水調整液	200ml	5,000	ZK01-80

ホームページアドレス
URL : [http:// www.dojindo.co.jp/](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