

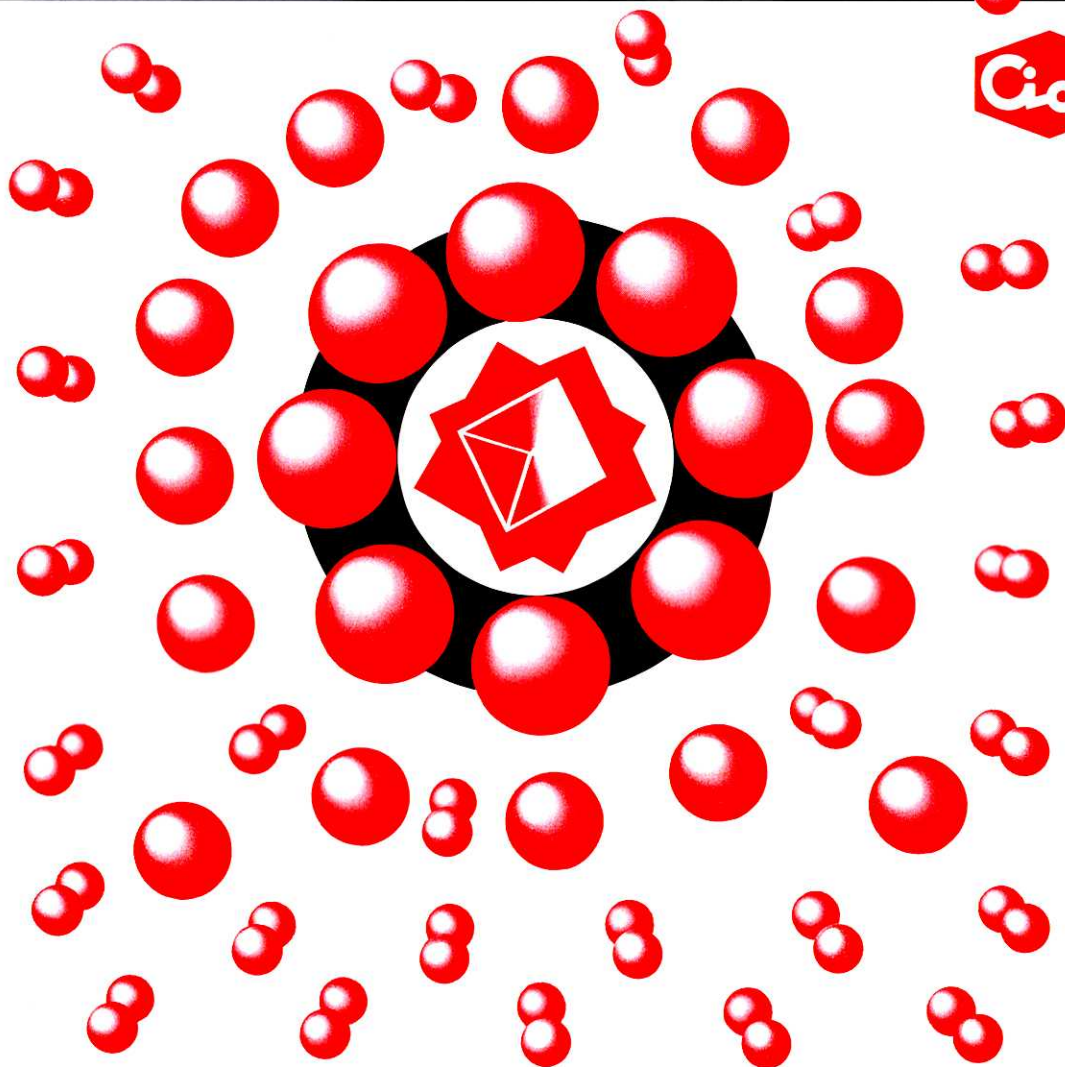
THE

CHEMICAL TIMES

ISSN 0285-2446

KANTO CHEMICAL CO., INC.

2001 No.4 (通巻182号)



目 次

遺伝子情報を医薬品へ(その5).....	坂 田 恒 昭.....	2
バイオベンチャーの創生		
新しい増菌システム「SPRINT」による食品からのサルモネラ迅速検査法	小 澤 一 弘.....	5
	久 保 亮 一	
	笹 波 和 秀	
メンブランフィルター(HLC-DISK)による試料液に分散した油滴の除去と固相抽出	岩 瀬 廣.....	13
高速液体クロマトグラフィーによる超微量シアノコバラミン(ビタミンB ₁₂)の分析法の開発		
粘液とムチン(その2).....	栗 原 誠	20
胃粘液研究用抗ムチンモノクローナル抗体の開発		

編集後記.....		24
-----------	--	----

遺伝子情報を医薬品へ(その5)

バイオベンチャーの創生

塩野義製薬㈱ 創薬研究所 主管研究員 坂 田 恒 昭

今まではゲノム創薬の現状を述べてきたが、本稿では最近盛んに話題になっているベンチャー企業創生、特にバイオベンチャーについて解説する。本邦においては経済が閉塞状態に陥り、小泉首相を始めとして経済構造改革が叫ばれている。その構造改革の担い手の一つがベンチャー企業であることは言うまでもない。今回は遺伝子治療におけるバイオベンチャービジネスの現状と問題点、そして日本の代表的なバイオベンチャー企業であるメドジーンバイオサイエンス株式会社を例に挙げてその役割を述べる。本稿を書くにあたって同社の研究開発部長・小谷 均 副社長のご意見をうかがい、多大なご協力を得た。

3.1 はじめに

遺伝子治療が臨床の場に現れて、10年の歳月が過ぎた。アデノシンデアミネース (ADA) 欠損症における単一性遺伝子疾患に始まり、エイズなどの感染症、ガンへの治療へと移り、近年では循環器疾患を含む生活習慣病にまで適応されるに至った。米国では、多くの臨床試験がアカデミアはもちろんバイオベンチャースポンサーとして実施されてきた。未だ医薬品として発売された製品は存在しないが、この技術は、21世紀の先端医療の中でも中心的医療技術となることは疑う余地はない。遺伝子治療はバイオベンチャーに適したビジネスモデルであり、多くのビジネスチャンスをもたらすであろう。日本においても、遺伝子治療ベンチャーが出現し始め期待されている。世界的なバイオベンチャーの育成に最も大切なことは、事実ハードルとなっている多くの関連法律・規制の改革整備が早急に行われる事とベンチャー精神を持った人材の育成である。我が国にも早く米国型バイオベンチャー企業が育つことを期待する。

3.2 バイオビジネスとしての遺伝子治療領域

バイオテクノロジーによる医薬品製造は80年代初めから本格的にスタートし、20年間にわたるかなり長い期間

での経験が続いてきた。しかし、医薬品が市場に出るまでには約10年から15年という多くの時間と費用が費やされている。95年までの時期は、投資家やウォール街からは、バイオには期待できず、ほとんど製品が出てこないと言われた。とかく情報系 (IT) 産業と比較されがちであり、根本的なビジネス形態に歴然とした違いがあるにもかかわらず、そのように言われつつけてきた経過がある。しかしながら、96-97年にかけて少しずつではあるが製品が市場に出だした。98-99年にはかなりの製品が医薬品として承認され、今度はバイオの黄金時代とも言われるようになり、米国の好景気を支えてきた一因とまでなった。それらと呼応して、遺伝子治療分野も例外なく、92-94年にかけて数多くのベンチャー企業が現れてきた。遺伝子により病気治療ができるという夢の世界にかなりの期待が集まり、95年代に入ると大手製薬企業の参入も進みだした。ノバルティス、RPR、メルク、シュリング・プラウなどがベンチャー企業の買収に乗り出し、自社の傘下に入れたり、または独自の研究体制に突入した。小谷副社長のおられた Genetic Therapy 社が Sandoz に買収された時は、医薬品としての製品も後5-6年出る予定もないにもかかわらず、当局から将来の市場を独占しかねないと、会社にとって非常に大切な特許譲渡権の条件づけ前提で、その買収が承認されたそうである。それほどまでにこの新しい医療への期待が高かった。しかしながら、その後今に至っても医薬品としての製品はなく、フェーズIIIまでに達したプログラムはわずか2例である。この分野でも、他のバイオ医薬品同様の歴史が繰り返されることは疑う余地がない。

対象疾患が冒頭に述べたような広がりを見せたことから、更なるビジネスチャンスが訪れて来ている。遺伝子治療の特徴は、遺伝子機能解析情報を直接治療手段である医薬品とすることができ、さらに開発が従来の医薬品に比べてかなり短時間で終了する事である。それゆえ、コストの削減が期待される。他のバイオビジネスと同様、ベンチャー向きの開発型ベンチャー形態に適している。

3.3 我が国における遺伝子治療産業

日本では、95年に前述のADA欠損症の男子患者への治療で遺伝子治療が開業した。米国から遅れること約5年であった。その実行のためには、アメリカの技術ですべてが実施されざるをえなかった。使用されたレトロベクターの製造、安全性試験、患者モニタリング試験のすべてがアメリカで実施された。即ち、ここ10年来常に言われてきたことであるが、日本には遺伝子治療のためのインフラストラクチャーが皆無であった。その上、遺伝子治療ガイドラインもFDAの持ち込みであり、当局内に遺伝子治療技術等を理解する専門家も数少ないのが現状である。我が国におけるいくつかの分野での基礎的研究はかなり進んでいるものの、それらを産業化するために不可欠なインフラはまったく進んでいないのが現状である。遺伝子治療が21世紀の中心的医療技術・産業となりうるといふ認識があまりにも製薬、バイオ産業界になかった。そこで、アメリカの後追いに終わり、結局慌てて追いつこうとするが、その水は一層大きく開けられてしまうことになる。残念ながら、この分野ほど様々な特許が絡んだ複雑なビジネスはなく、参入が遅れば遅れるほど新規参入しにくい分野もないという事を認識しなければならない。初期に参入した大企業が躊躇し、世界中で何ら製品がない今こそ、画期的な技術シーズによるアイデアで本分野に新たなビジネス拡張を図る戦略が必要となる。

3.4 メドジーン バイオサイエンス株式会社の誕生

日本にもバイオベンチャーが近年出始めてきた。その中で、2,3の遺伝子治療ベンチャーが設立された。メドジーン バイオサイエンス株式会社は、99年12月に大阪大学由来の技術をベースに設立されたキャンパスベンチャーである。事業内容は、図1に示す様にまず、遺伝子治療、核酸医薬を含む遺伝子医薬の研究開発により、それらの医薬品としての商品化を目指す。遺伝子治療として、HGF (Hepatocyte Growth Factor) による血管新生作用を目的とし、末梢性動脈疾患（閉塞性動脈性疾患）と虚血性心疾患への応用がある。核酸医薬としては、転写因子であるNF κ Bのデコイ技術を用いた、炎症及び自己免疫疾患への応用がある。さらに、その事業化の過程で、我が国に欠如しているベクター製造、安全性試験の受託業務にまで発展させることにより、先端医療に不可欠である国内インフラの確立に貢献することを目的としている。また、ビジネスプラットフォームとして開発した画期的な人工ウイルスベクターの事業化を目指している。そのベクターシステムは、遺伝子機能解析、Drug Delivery System (DDS), Drug Discovery (DD) 及び遺伝子治療用ベクターと幅広い有用性をもつ。バイオベンチャーとしてそれらのプログラムを動かすには、既存の製薬企業、化学企業あるいはバイオ企業とそれぞれのプログラムでのビジネス提携が前提条件となる。各プログラムのビジネス価値を最大限にあげ、種々契約金でプロ

メドジーン バイオサイエンス株式会社

MedGene Bioscience Inc.

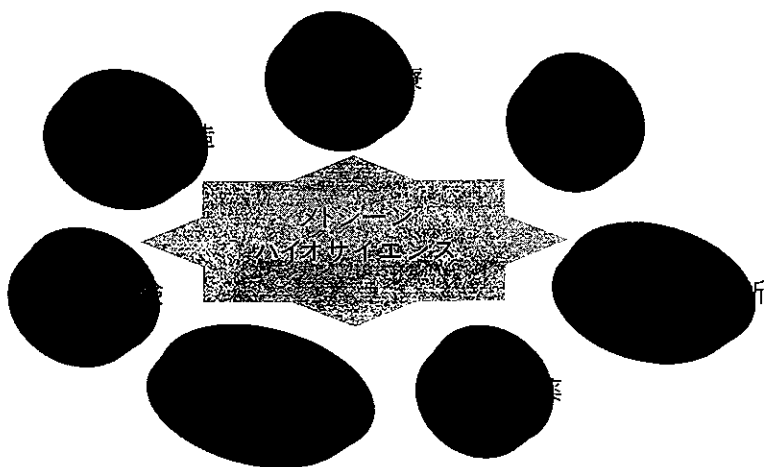


図1. メドジーン バイオサイエンス株式会社

グラムを前進させて会社を成長させていく必要がある。

現在、全世界で展開されている多くの遺伝子治療プログラムの中で、血管新生 (Angiogenesis) の分野は最も注目され、おそらく商品化に向けて最先端を走っている分野と言える。10兆円市場に向けて、各社がそれぞれの違った遺伝子によるプログラムを走らせている現状で、非常に競争の激しい分野である。このような環境下で成功するには、いち早く製品を市場に出すことが必須であり、そのための着実でしかも迅速な動きが急務である。

3.5 バイオベンチャーへの挑戦

バイオ分野は研究開発に多くの比重がかかる分野であり、当然最新のサイエンスを理解する必要がある。製品を市場に出すまでには長時間が必要であり、約10年の年月がかかると言われている。ベンチャーの世界では3年以内に投入資金の回収は困難であり、さらに、ハイリスク・ハイリターンの世界である。人材に関してはIT産業と比べてバイオが分かる専門家が極めて少ないのが現状である。技術研究面での専門家はもちろんのこと、ビジネスサイドでの人材確保、知的財産の確保によるビジネス戦略が重要である。

ベンチャーとしての基本的理念は以下の如くであろう。
1) 能力適応主義で年齢、性別、学歴などは不問、2) 形式にこだわらない組織の柔軟性を持つ、3) 縦割り型マネジメントを極力省き、概して優れたアイデアを含む下からの意見がトップに届くシステムであること、4) それらのアイデアを創造的に取り入れる許容と能力のあるマネジメントであること、5) アイデアによる画期的な勝負であり、物まねと従来日本が行ってきたような外国技術の改良のみでないこと、6) 従来の大企業思考、公務員思考の人間ではなく、高いベンチャー精神を持ち、自己の能力を発揮することに意義を持つ若い人材育成を心がける。

その為に、アメリカ型ストックオプションなどのインセンティブ制度を確立し、貢献度によりその見返りが当然来るような環境にしなければならない。それが人材の流動性を促進し、経済の活発化につながる。日本人が潜在的に持つ、金儲け主義を悪いように受ける環境を変え、裕福になるチャンス (アメリカンドリーム) と同時に人類に貢献するようなビジネスチャンスを持ち得る雰囲気作りが必須である。

日本において、情報系ベンチャーと比較して、バイオベンチャーへの認識はかなり低い。米国でここ数年でおきている爆発的経済上昇ブームの一部はバイオの世界から来ている。確かに一時期、多く他業種の大企業がバイ

オ分野に乗り出し、そのほとんどが失敗に追い込まれ撤退した苦い歴史がある。その時でも、米国では企業家によるベンチャーの立ち上げがひたすら続いていた。そして、ここ3,4年に花開いたという現象がある。ベンチャー立ち上げ時に最初に出くわす問題が、1) 資金不足、2) 人材不足 (人材の非流動性)、3) バイオベンチャーの社会的評価不足などが挙げられる。製薬企業との契約においても、ベンチャー企業はなかなか評価されず、提携条件が欧米に比較してかなり低く過小評価されがちである。多くのベンチャーキャピタルファンドが最近でできたのは大いに喜ばしいことであるが、合計してもバイオに向ける資金は100億円以下であると言われている。多くても一件に5千万円程度の投資額である。日本において何が不足しているのかを表1に示した。特に特許取得に

表1. 先端医療へ向けて我が国に何が足りないのか

1. バイオテクノロジーに対する経済的評価
 - ・飛躍的経済成長をもたらすことへの認識不足
 - ・欧米及びIT産業と比較して関心度が極めて低い
 - ・技術的評価のできる人材の不足
2. 産業化に対する国内インフラの不足
 - ・遺伝子治療用ベクター及び細胞治療用生産施設、委託業者
 - ・安全性試験、品質管理実施施設、委託業者
 - ・バイオ専門の経験豊富な弁理士、弁護士、会計士
3. 特許取得に対する支援体制
 - ・大学のTLOの欠如
 - ・日米間の特許取得制度のギャップ
4. バイオベンチャー (特にキャンパスベンチャー) への育成支援体制の欠如
 - ・大学・研究所由来のシードの発掘
 - ・本来のインキュベーションセンター理念からのズレ
5. 臨床研究のための大型助成金等の支援体制の不備
 - ・産業発展性に対する的確な技術評価とそれに伴う助成金額、支給時期の問題

対する支援体制の欠如により、大学において多くの画期的なシーズが眠ってしまっていることを非常に残念に思う。そして、新聞紙上を毎日のようににぎわしている産官学共同という言葉とは裏腹に、その根本的な関連法律・規制が一向に改善されていないことも大きなギャップと思われる。世界に通用するバイオベンチャーが育成されるためには、現実的にハードルとなっている関連法の改革整備が早急に実施されねばならない。発展性のある有望なバイオベンチャーが育成されることに期待したい。

新しい増菌システム「SPRINT」による食品からのサルモネラ迅速検査法

中部衛生検査センター検査部長 小澤 一 弘
 関東化学株式会社 ライフサイエンス部 久保 亮 一
 笹 浪 和 秀

はじめに

サルモネラによる食中毒は1985年以降に欧米において多発し、わが国においても1989年に急増して以来、食品に対する衛生管理が注目を浴びる中、衰えることなく現在もこの傾向が続いている。一方、サルモネラによる食中毒は主に *Salmonella (choleraesuis subsp. choleraesuis serovar) Enteritidis (SE)* による卵ないしその加工食品によるものが圧倒的であるとされ¹⁾、さらに卵を生で喫食する習慣のあるわが国にあっては、それらのサルモネラ汚染に対する管理体制が重要となってきた。厚生省はこうした実情を鑑み、1998年11月に食品衛生法施行規則及び食品、添加物等の規格基準の一部改定を発して積極的な指導を行なってきた²⁾。

こうした中でサルモネラの食品からの検査法についても欧米をはじめとする様々な機関で検討され、提案されているが近年、国際的な方法に統一化しようとする動きがあり、現在、諸外国の方法を参考にしつつ、わが国としてどのような検査法が最も受け入れられるべきかの検討がなされている³⁾。(Fig.1)

一方、食品中の食中毒原因菌は通常、加工過程などで厳しい環境を経ている為にダメージを受けていることが多く、こうした細菌によっても食中毒が起こりうるとされる⁴⁾。また、こうした細菌においては、選択増菌培地に耐えられない事もあり、細菌の活性を復帰させる前培養過程が必要である(Fig 2)。しかしながら、こうした一連の過程は5～7日の時間を要し、迅速性が要求される食品流通業界の日常検査として必ずしも適当ではない。そこでより迅速かつ信頼性のある検査法の確立が望まれている。

我々は今回、英国 OXOID 社の開発した前培養時間を定法より短縮し、しかも連続的に選択増菌培養までを24時間でできるという新しい増菌システム「SPRINT」(Simple Pre-enrichment Rapid Isolation Novel Technology)を鶏卵検体を用いて検討し、迅速な検査法とすることを試みたのでここに紹介したい⁵⁾⁶⁾。

細菌の増殖過程

一般に、細菌はその生活史において、分裂活動を行なう前の発育段階に相当する誘導期(lag phase)、一定の世代時間を経て分裂増殖し個体数が対数的に増加する対数期(logarithmic phase)、周囲環境の栄養素の減少と代謝物の蓄積によって増殖に抑制がかかる定常期(stationary

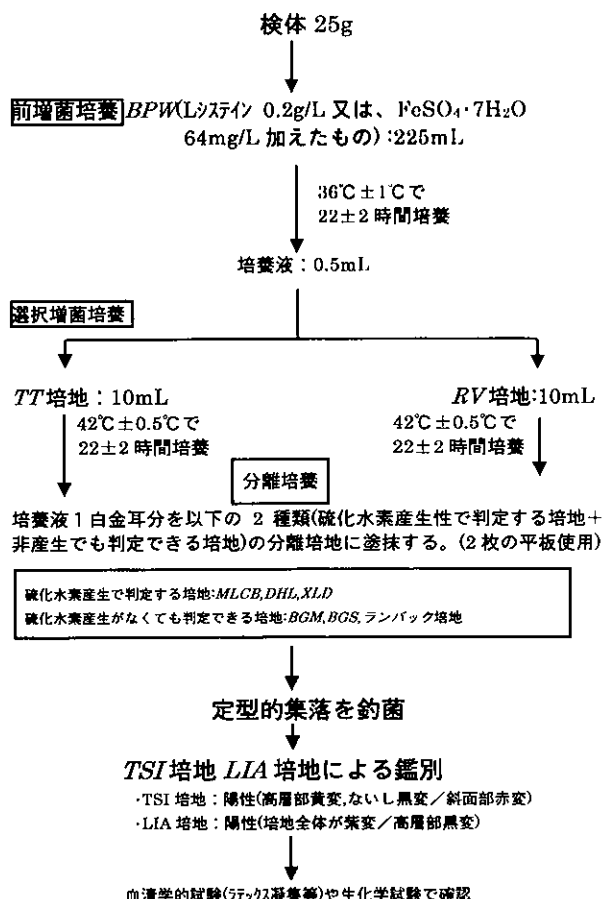


Fig.1: 生衛発第 1674号によるサルモネラ検査法の流れ²⁾

phase) それに死滅菌数が分裂増殖菌数を上回って細菌数が減少する死滅期 (death phase) をもつ⁸⁾。

増菌培養の意義

細菌を検出する場合、予め目的とする細菌数が多く含まれる臨床検体では、検体を直接、分離培地に塗抹して分離培養を行なうことができるが、食品や環境材料の場合は検体中の菌数が少ない為に細菌を増やす、いわゆる増菌培養の過程が必要となる。増菌培養の意義は目的とする細菌を分離培地などで検査可能な数まで増殖させるとともに、共存し競合する細菌の発育を抗生剤などの選択物質で抑制することである。しかしながら、加工や加熱、殺菌処理過程のある食品材料では細菌は損傷を受け

ており、Stephens⁵⁾らの研究によれば、こうした損傷菌が増菌培養に耐えられるまで回復させるためには、あらかじめ非選択培地による18~24時間の前培養が必要とされる。食中毒菌などは損傷していても時間とともに回復し、食中毒を起こす危険性があるため、この前培養時間をいかに短縮し効率よく増殖させるかが重要となってくる。前培養によって回復・増殖した細菌はFig. 2に示すように液体培地で増殖できる細菌総数は決まっており、一定の数になると増殖は抑えられ、これをJameson 効果⁶⁾と呼んでいる。通常の場合はここで前培養を中止し、増菌培地に移し変えることで菌の密度を下げ、競合する細菌を抑制ないし死滅させて目的の細菌の増殖を促している。

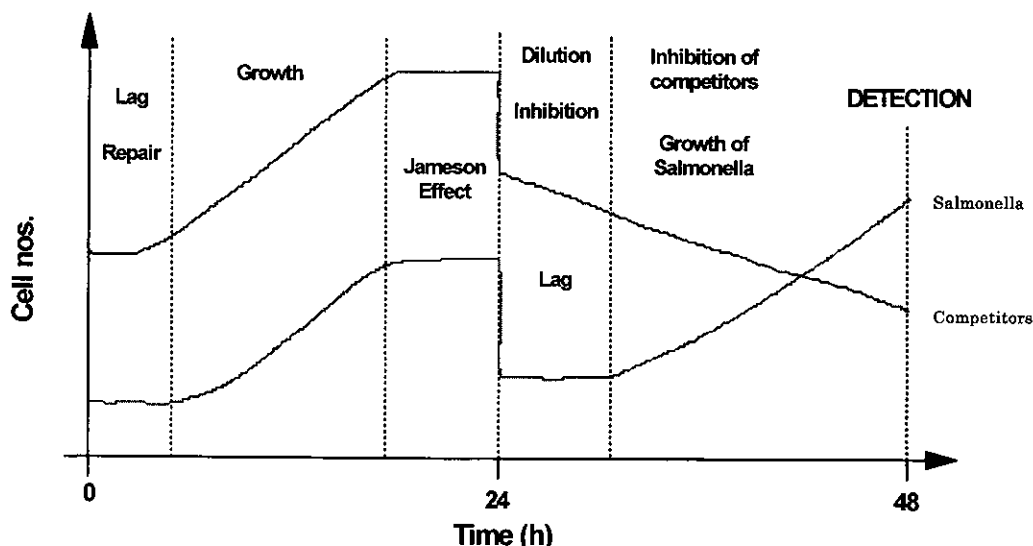


Fig. 2: Principles of pre-enrichment and selective enrichment

前増菌と選択増菌の基礎原理

SPRINT システム

本システムはFig. 3に示すようなキットで、①損傷菌の回復を促すオキシラーゼと呼ばれる酵素⁹⁾を含む特殊なサブプリメント ②時間が経つと選択剤を放出するパルシンカプセル ③専用の増菌培地より成る。原理 (Fig. 4)はまず、検体とともに加えられた専用の増菌培地と回復サブプリメントによって、損傷菌の回復時間は6-7時間に短縮される。最初の段階で同時に加えられるパルシンカプセルは培養中に培地の水を吸収して徐々に膨張し、ついには蓋となっている部分を押し出して開放される。この時、中に含まれているマラカイトグリーンや塩化マグネシウムなどの選択剤が放出されて、培地は連続的に増菌培地に変わる。本選択剤は、ラバポートバシリアディス培地

(RV)¹⁰⁾¹¹⁾を基礎としており、マラカイトグリーンなどの選択成分の比重が重いために沈殿する傾向にあるので、物理的にかき混ぜる事で選択物質を均一にする必要がある。こうした添加剤の効果と連続的に増菌操作を行なうことで、一連の検査過程は検体材料を入れてから増菌が完了するまで24時間に短縮される。検体のサルモネラ以外の細菌による汚染が著しい場合は、こうした競合菌の抑制の目的でノビオシンの添加 (40mg/L) が薦められており、また肉ミンチなどの粘度の高い検体においては、粘性によってパルシンカプセルの開放が阻害されるのを防ぐ目的で、さらにトリプシンの添加 (0.025g/L) が薦められている。(Table. 1)

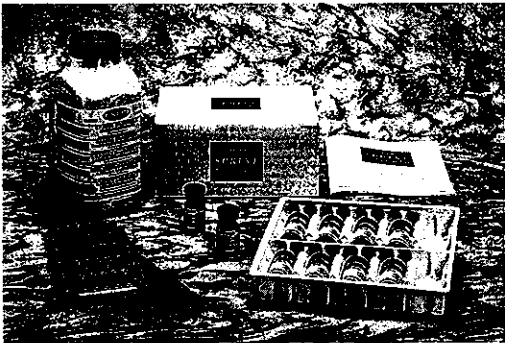
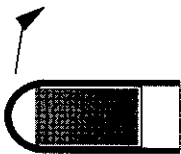


Fig. 3: SPRINT サルモネラシステムの外観



SPRINT 増菌培地に投入された
時限溶解カプセルは周囲から水分
を吸収して膨化する。



膨張に伴い、カプセルの殻が押し
出される。



約 7 時間後、カプセルに含まれてい
た、RV を基本とする選択剤が放出さ
れ、培地を選択増菌培地とする。

Fig. 4：時限溶解カプセルの原理

Table. 1: 検体による SPRINT システムの改善方法

検 体	改 善 操 作	理 由
フルーツジュースや卵白等 pH6.5 以下、もしくは7.5以上 の検体	回復サブリメント及び時限カプセルを入れる 前にストマック袋の pH を 7.0 に調整する。	菌を検出する際の pH による影響を避けることができる。
生鳥肉や牛肉ミンチの様に 多くの雑菌がコンタミしてい ると疑われる食材	225mL の SPRINT 増菌パイオンにノボビオ シンサブリメントを 1 ピン加える。 (最終濃度 約 40mg/L とする)	サルモネラの回復増菌時に 雑菌の増殖を抑えることがで きる。
ヨーグルト	pH を 7.0 に調整し、ノボビオシン サブリメン トを加える。	同 上
ハーブや香辛料及びこれら を多く含む食品	1 : 2, 1 : 50, 1 : 100 等、増菌パイオンに対する 検体の割合を減らす。	検体中に含まれる阻害物質 が希釈される。
鳥肉や粗びき肉	検体を細かくし、ストマッキング操作を行な わない。 検体が凝固した時は、0.025 g/L (5.6mg/225mL) となるようにトリプシンを加える。	時限カプセルの口付近で凝 固するタンパク質を溶解する ことで、選択剤の溶出遅延を 回避する。
チョコレート及び粉末ココ ア	通常の分析を行なう。阻害影響を受けた時は、 増菌パイオンに 5% w/v となるようにカゼイン やミルクパウダーを加える。	ココア中の毒素を中和する 為にカゼインやミルクパウダ ーを加える。

基礎的な検討

生卵にサルモネラ保存菌株を添加した人工汚染検体をつくり、これを SPRINT 及び FDA 等で推奨されている緩衝ペプトン水で増菌した後、増菌液を PCR で検査して、検出成績を比較した。

(材料および方法)

使用菌株：食中毒患者検体から分離した SEO9, O7, O4 の 3 種類の保存株を用いた。

操作の流れについては Fig. 5 に示す。サルモネラ属菌フリーを確認した市販鶏卵を次亜塩素酸溶液に浸漬して

殺菌した後、滅菌精製水で洗浄した後に無菌的に割卵して全卵を集め、均一にストマッキングしてプール検体を作った。この検体 25mL にあらかじめトリプトンソーヤブイオン 10mL で 37℃、1 夜培養した 3 種類の SE 菌液をトリプトンソーヤブイオンで希釈してあらかじめ菌数がだいたい揃うようにしてから、 10^{-6} から 10^{-9} まで 10 倍ずつ段階希釈液をつくり、これを 1mL 添加した。(接種されたサルモネラ菌液の濃度はさらに菌液をトリプトンソーヤカンテン培地に塗抹して菌数を算定し、 10^{-6} 希釈液がほぼ 1000 cfu/mL である事を確認した。)

検体は、SPRINT ならびにペプトン水で増菌して増菌液を直接 PCR の系にかけて、検出を試みた。SPRINT

による増菌では、粘度を下げる目的でトリプシンを添加した。PCR 検査法としては、“One Shot PCR Screening Kit (宝酒造株)”を用いた。これは、378bp の侵入性因子関連遺伝子 (*invA*) を特異的に検出するものである。予備実験において、卵中の成分が PCR に影響することが、わかっていたので DNA 抽出サンプルを 1000 倍に希釈して検出を行なった。

(結果)

数個/25mL のオーダーまで検出が可能であったが卵検体の場合、あらかじめ抽出サンプルを PCR 反応前に希釈するなどの措置がないと検出ができなかった。

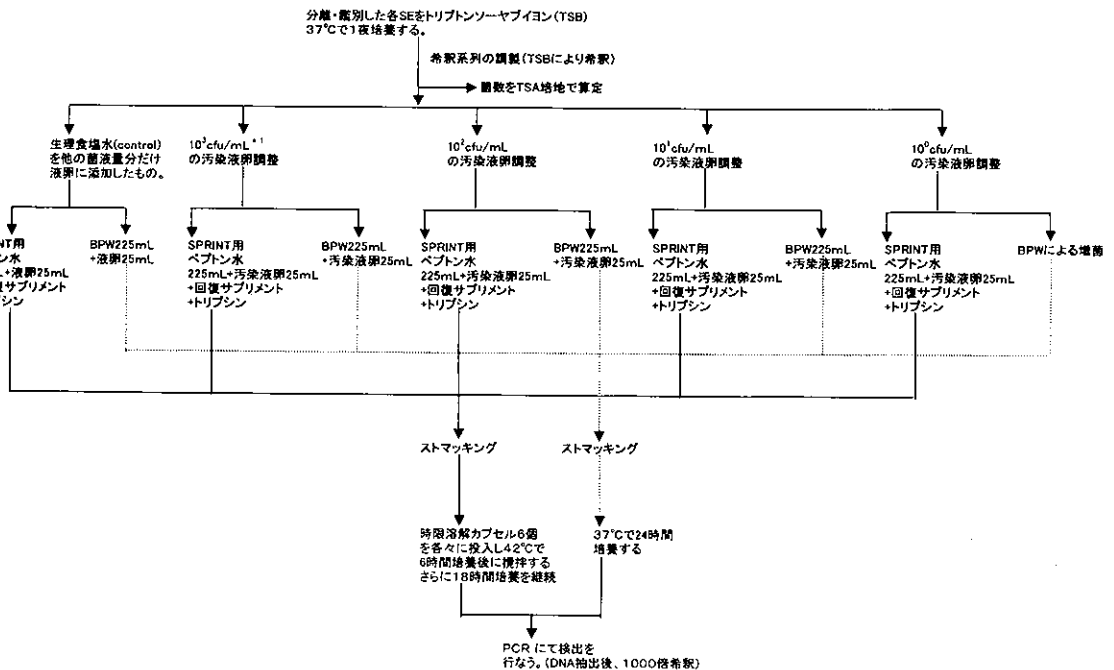


Fig. 5: SPRINT システムの PCR への応用

汚染生卵による応用例

SPRINT システムは、前培養および増菌培養を 24 時間に短縮できるので、増菌プロセスの短縮に有用と思われる。そこで自然汚染卵を用いて、従来の培養法との簡単な比較を行なったのでここに紹介する。厚生省による“卵のサルモネラ検査法”の暫定法²⁾によれば検体を緩衝ペプトン水で前培養し、次いで RV およびテトラチオネート培地 (TT)¹³⁾¹⁴⁾ によって選択増菌し、サルモネラの特徴である硫化水素産生性を指標とする培地と酵素基質などの別の指標による培地で分離培養することになってい

る。これは、RV と TT の選択機構が異なる原理によるものであり、また、サルモネラには硫化水素非産生の株が報告されている事から、配慮がされているものと思われる。我々は SPRINT システムがその組成から、緩衝ペプトン水 → RV の変法と考えて、テトラチオン酸培地による方法と比較検討を行なった。

(材料および方法)

サルモネラの汚染が強く疑われる 20 検体の生卵について、凍結融解を行いサルモネラを損傷させた後、Fig. 6 に示すように SPRINT とトリプシンを添加した系、SPRINT

にノボピオシンおよびトリブシン添加した系および緩衝ペプトン水とテトラチオン酸培地を組み合わせた3つの系で増菌を行った。これをサルモネラの硫化水素産生性を指標とするXLD培地と酵素基質培地であるクロモアガーサルモネラにより分離培養し、検出成績を比較した。分離培地への塗抹は増菌液10 μ Lをマイクロピペットで平板培地上に落とし、これをコンラージ棒で均一に広げて行なった。

XLDおよびMLCBによる分離培養でプレートにサルモネラを疑われるコロニーが発育した場合はラテックス

凝集キット(Oxoid社:FT 203)および、TSI/LIA培地により同定し、そのコロニーの数を算定して半定量的に表した。1平板上に発育のみられないもの(-), 1~20コロニー(+), 21~30コロニー(++), 30コロニー以上を(+++)と区別した。また、サルモネラを疑われるコロニーが分離された検体および培養所見で、サルモネラ以外の細菌の発育が著しく優勢な検体については増菌液中のサルモネラの有無をPCRによってFig. 7に示すような手順で確認した。PCRにおいては、増菌培養成分の影響を避けるために増菌液を1回洗浄して用いた。

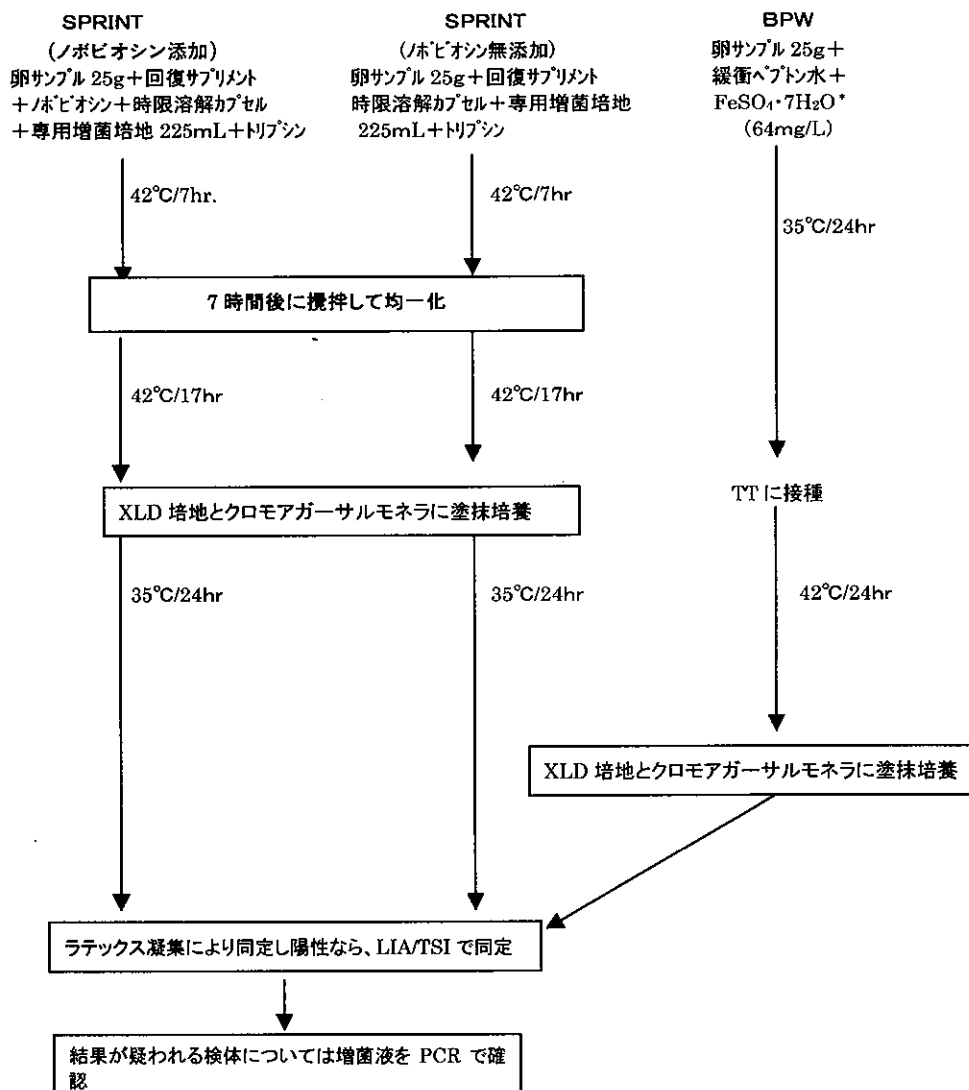


Fig. 6: 自然汚染卵を利用した SPRINT の検出

(結果)

培養法による成績を Table. 2 に、サルモネラの検出された増菌液の PCR 泳動結果を Fig. 8 に示す。3 方法の増菌で、分離培養にてサルモネラの検出された 13 検体と検出されなかった 4 検体については、PCR の結果とも一致がみられた。

検体 5 においては、緩衝ペプトン水と TT の系及びノボビオシン無添加の SPRINT の分離培養所見で XLD 培地、クロモアガーともにサルモネラでない細菌のコロニーが優位に発育しており、サルモネラの典型的なコロニ

ーを見ることはできなかったが、ノボビオシン加 SPRINT による増菌例はサルモネラのコロニーが優位に発育しており、かつ PCR による結果でサルモネラの存在が確認された。検体 12 については、同様に培養法で数個のコロニーしか認められなかったが、PCR によってサルモネラの存在が確認された。また、この検体では BPW-テトラチオン酸による増菌培養の系ではサルモネラの検出ができなかった。

検体 3 および 4 においても、PCR ではきわめて希薄な *invA* のバンドが確認されていたが、培養では検出がされなかった。

(考察)

以上の事から以下のような事が考察される。

- 1) 緩衝ペプトン水で増菌し、TT で増菌する系と RV を基本とした SPRINT システムによる増菌法では、選択性に若干の違いが認められた。
- 2) 培養法による検出では、競合する他の細菌数が多い場合にこれらの細菌によりサルモネラが抑制される傾向にあり、この事は選択増菌培養によって改善できない場合がある。

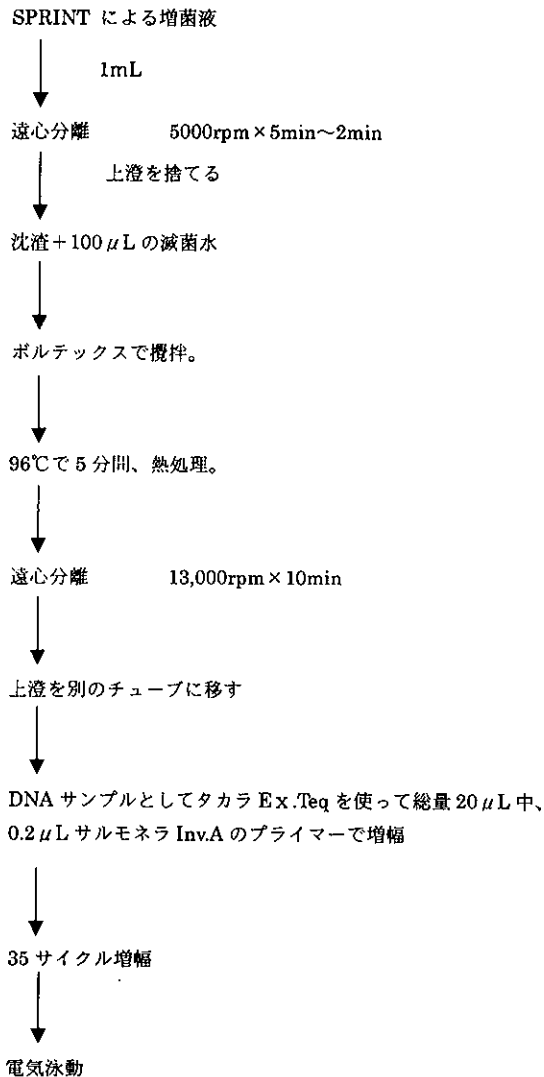
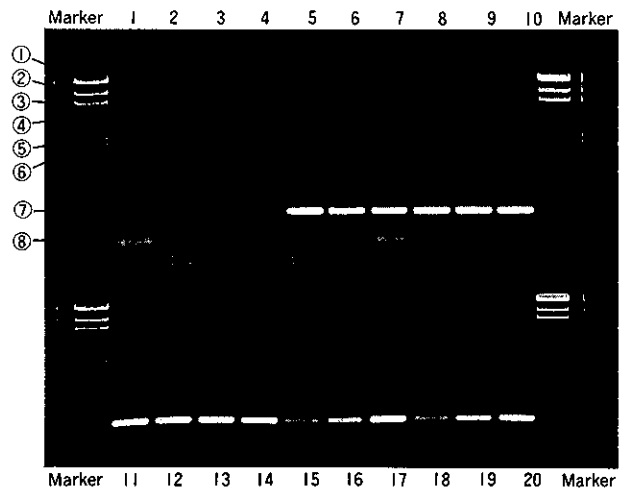


Fig. 7: PCR による SPRINT 増菌液からのサルモネラ検出



上段左より、検体番号 1 ~ 10

下段左より検体番号 11 ~ 20

(増幅 DNA (bp))

- | | |
|---------|---------|
| ① 23130 | ② 9416 |
| ③ 6557 | ④ 4361 |
| ⑤ 2322 | ⑥ 2027 |
| ⑦ 378 | ⑧ プライマー |

(Marker は λ-Hind III で切断したもの)

Fig. 8: PCR による確認 (電気泳動の結果)

- 3) 競合する細菌が多い場合、SPRINTシステムにノボピオシンを添加する事で検出に改善が期待される。
- 4) SPRINTシステムによる増菌とPCRによる検出を組み合わせる系は、迅速で感度の高い検出が期待できる。また、PCRは検体に含まれる2価イオンなどの

阻害物質の影響が見られるとの報告もあるが、我々の検討では一回の洗浄ないしDNA抽出後の希釈を行なうことで、こうした影響を回避できると考えられた。

Table. 2: SPRINTを用いた増菌培養の成績

			検 体 番 号									
前 培 養	選択増菌培養	分 離 培 養	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
SPRINT	SPRINT	XLD	-	-	-	-	-	ND	++	++	+	+
		クロモアガーサルモネラ	-	-	-	-	-	ND	++	++	+	+
SPRINT (ノボピオシン加)	SPRINT (ノボピオシン加)	XLD	-	-	-	-	+++	+++	++	++	+++	+++
		クロモアガーサルモネラ	-	-	-	-	+++	+++	+++	+++	+++	+++
BPW	TT	XLD	-	-	-	-	-	+++	+++	+++	+++	+++
		クロモアガーサルモネラ	-	-	-	-	-	+++	+++	+++	+++	+++

			検 体 番 号									
前 培 養	選択増菌培養	分 離 培 養	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
SPRINT	SPRINT	XLD	+++	2	++	+++	++	+++	+++	++	+	+++
		クロモアガーサルモネラ	+++	+	++	+++	++	+++	+++	++	+	+++
SPRINT (ノボピオシン加)	SPRINT (ノボピオシン加)	XLD	+++	4	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+++
		クロモアガーサルモネラ	+++	3	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+++
BPW	TT	XLD	+++	-	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
		クロモアガーサルモネラ	+++	-	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++

判定指標	-	+	++	+++
コロニー数	0	1~20	20~30	>30

N D = Not Detected

おわりに

サルモネラを始めとする食中毒関連病原菌を食品検体から効率よく検出するには、検体中の細菌が損傷を受けていたり、菌数が少ないために前増菌と増菌という2段階の培養工程を経なければならない。

この事は、検査に多くの時間と労力を要するために、これまで検査法の迅速化が数多く試みられてきたが、その多くは検出系に焦点をおいており、増菌培養の迅速化についての報告はあまり多くみられない。一方、食品の流通は世界的に拡大しており、その流れも極めて速くなっていることから、検査の迅速化と簡便化は急務の課題

となってきた。こうした中で、増菌培養の時間と労力を改善する目的で設計された本システムは2段階増菌を1回の操作で連続的に行うため迅速かつ簡便な検査が期待される。さらにこれまでに開発されているPCRなどの迅速な検出を組み合わせる事で、迅速化が期待できる物と思われる。

謝 辞

本検討におきましては、国立医薬品食品研究所の小沼博隆博士および宮原美知子博士にご指導を賜りましたので、ここに謝意を表します。

参考文献

- 1) 厚生省生活衛生局食品保健課, 平成10年度食中毒発生状況, 食品衛生研究, 49, 90-175(1999).
- 2) 厚生省生活衛生局: 食品衛生法施行規則及び食品・添加物などの企画基準の一部改正, 平成10年11月25日生衛発第1674号(1998).
- 3) FDA Bacteriological Analytical Manual, 8th Edition, Chapter 5 Salmonella, 1995.
- 4) Edel and Kampelmacher E. H., Bull. Wld. Hlth. Org. 48, 167-174(1973).
- 5) P. J. Stephens, J. A. Joynson et. al., The use of an automated growth analyser to measure recovery times of single heated-injured Salmonella cells, Journal of Applied Microbiology, 445-455, 83(1997).
- 6) Jameson, J. E., A discussion of the dynamics of Salmonella enrichment, Journal of Hygiene, Cambridge, 60, 193-207, 1962.
- 7) 村瀬稔, 木股裕子, 仲西寿男, 町垣栄老, 藤原悦朗, 第20回日本食品微生物学会学術総会講演要旨集(平成11年10月, 盛岡), P11.
- 8) 中瀬安清他, 実習微生物学, 27-28, 廣川書店, 1986.
- 9) Doyle M. L., Scantling M. K. et al., A comparison of various media for rapid resuscitation and repair of sub-lethally chlorine sodium hypochlorite-injured *Salmonella typhimurium*. Abstr. P-20, General Meeting of American Society for Microbiology (May 19-23, 1996, New Orleans).
- 10) Vassiliadis, The Rappaport-Vassiliadis (RV) enrichment medium for the isolation of salmonellas: An overview, Journal of Applied Bacteriology, 54, 69-78(1983).
- 11) M. Van Schothorst and A. M. Renaud, Dynamics of salmonella isolation with modified Rappaport's medium (R10).
- 12) Muller L., Un nouveau milieu d'enrichissement pour la recherche du bacille typhique et des paratyphiques, Compt. Rend. Soc. Biol, 89, 434, Paris (1923).
- 13) 坂崎利一, 新細菌培地学講座(下), 10-15, 近代出版, 東京(1978).

S.P.R.I.N.T. Salmonella

特 徴

- ★ 24時間で前増菌と選択増菌培養がワンステップで行えます。
- ★ 高感度(1CFU/25g)の検査を実現します。
- ★ 回復試薬により損傷菌の回復と、2段階増菌における継代ロスがなくなります。
- ★ 前増菌は緩衝ペプトン水を用いていますが、一定時間後にラパポート・バシリアディスを基礎とする選択増菌培地に切り替わります。



製品コード	製品名	包装
710601-2 FT 601	S.P.R.I.N.T.サルモネラ キット	20回
711966-5 CM966	S.P.R.I.N.T.サルモネラ増菌ブイヨン	500g(110回)

Cica 関東化学株式会社

本社 〒103-0023 東京都中央区日本橋本町3-11-5 Tel: 03(3667)8061
 大阪 〒541-0048 大阪市中央区瓦町2-5-1 Tel: 06(6222)3709
 福岡 〒812-0007 福岡市博多区東比恵2-22-3 Tel: 092(414)9361
 e-mail: diag-info@gms.kanto.co.jp http://www.kanto.co.jp

メンブランフィルター (HLC-DISK) による試料液に 分散した油滴の除去と固相抽出

高速液体クロマトグラフィーによる 超微量シアノコバラミン (ビタミン B₁₂) の分析法の開発

味の素株式会社中央研究所 岩 瀬 廣

1. はじめに

共存成分の多い試料中の微量分析対象物質を迅速、簡便に分析するためには、いずれの分析法を用いても、試料調製を適正化することが、きわめて重要である。試料調製法は、主に、下記の目的で行われる。

1. 分析対象物質の分離、精製
2. 分析対象物質の濃縮
3. 分析対象物質を高感度、高選択的に分析するための誘導体化
4. 調製した試料の安定化

食品および医薬品などの試料を水に溶解するとエマルジョンを形成することがある。その場合の試料調製は、容易ではない。従来、試料液中に分散した油滴の除去は、試料水に食塩などの無機塩あるいはアルコールなどを添加し、ヘキサン抽出していた。しかし、この方法は、ヘキサン層（油分）と水層との分離に時間がかかり（30分～1時間）、不安定な分析対象物質はこの間に分解するおそれもある。しかも、ヘキサンの使用は、分析担当者の健康および環境面にも悪い影響を及ぼすおそれがある。

迅速、簡便な分析法である HPLC は、多くの分野で利用され、目的に応じた試料調製法が開発されているが、最近、迅速、簡便な試料調製法として、固相抽出法 (solid-phase extraction (SPE)) が、共存成分との分離、精製、濃縮などに用いられている〔1〕。

食品および医薬品中のビタミン B₁₂ (VB₁₂) は、超微量であるため、HPLC で分析する場合、分離、精製、濃縮する必要がある。そこで、SPE により試料調製後、HPLC で分析しているが〔2～14〕、エマルジョンを形成する食品への適用例はほとんどない。

本報では、エマルジョンを形成する食品中の VB₁₂ (18 ng/g) の分析法の開発について述べる。試料の食品には、水溶性および脂溶性ビタミン、有機酸、アミノ酸、糖、金属イオンおよび植物油 (20 mg/g) など 50 成分が含まれ、

分析試料は水に溶解して用いる。

VB₁₂ と主成分との濃度比は、1 万倍以上で、後に述べるが、SPE で考慮しなければならない植物油との濃度比は、約 10 万倍である。このように共存成分の多い試料中の超微量の VB₁₂ を分離、精製、濃縮する試料調製法を確立することは、きわめて重要である。

植物油を含有する試料中の VB₁₂ を C₁₈ のような逆相系の SPE カートリッジで試料調製する場合、共存する約 10 万倍の植物油が SPE カートリッジに強く保持され、超微量の VB₁₂ を保持する capacity がなくなるので、予め、植物油を除去することが是非必要である。

上記の理由から、分析担当者の健康および環境面も考慮した迅速、簡便な試料調製法の開発に着手した。すなわち、各種メンブランフィルターによる試料液中に分散した油滴の除去の検討を行った。さらに、SPE C₁₈ カートリッジを用いて、ローディング pH、溶離液（アセトニトリル水溶液）および溶出液量と標準品 VB₁₂ の回収率との関係について検討した。次に、標準品 VB₁₂ および試料調製液中の VB₁₂ の安定性を検討した。

本法は、試料液をメンブランフィルター（関東化学製、HLC-DISK 25 (0, 45 μm) (polyvinylidene difluoride) で濾過するだけで、迅速（1 分以内）、簡単に試料液に分散した油滴の除去が可能となった。次に、この液を SPE により試料調製し、HPLC に適用することにより、従来法に比べ、微量の VB₁₂ の迅速、簡便、選択的な分析が可能となった。

なお、最後にメンブランフィルター (HLC-DISK) の種類および用途などを資料として添付した。

2. 試薬、装置および器具

2.1 試薬

- (1) シアノコバラミン (VB₁₂)：国立衛生試験所標準品、日本薬局方標準品。
- (2) アセトニトリル：液体クロマトグラフ用。
- (3) 無水硫酸ナトリウム：試薬特級品。

Determination of trace amount of cyanocobalamin (vitamin B₁₂) in emulsified foods by solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography using membrane filter (HLC-DISK) for the precolumn separation of oily particles

(4) EDTA・2Na・2H₂O：試薬特級品。

(5) KH₂PO₄：試薬特級品。

(6) リン酸：試薬特級品。

2.2 VB₁₂ 標準品の調製法

本品 15mg を正確に褐色メスフラスコに量り、水を加えて 100ml に定容する。この 5ml を正確に量り、水を加えて 50ml に定容する。次に、この溶液の各々 0.5, 1, 2, 3, 4ml を正確に量り、水を加えて 20ml に定容する (3.75, 7.5, 15, 22.5, 30μg/100ml, 冷蔵庫内で 1 週間は安定)。

2.3 溶解液の調製法

無水硫酸ナトリウム 150g および 1mMEDTA・2Na (372mg) を蒸留水に少しずつ攪拌しながら加え、溶液を 1,000ml とする。

2.4 溶離液 (50v/v% アセトニトリル水溶液) の調製： 試薬特級品を用いて調製。

2.5 装置、器具

- (1) 高速液体クロマトグラフ 日立 655A-12 形
- (2) 検出器 日本分光検出器 (UVIDEC 100-IV 形),
- (3) 分光光度計 Shimadzu UV-variable Recording Spectrophotometer UV-2100
- (4) SPE C₁₈ カートリッジ (500mg)：メタノール 5ml で洗浄、水 10ml で洗浄してコンディショニングしてから用いる。
- (5) メンブランフィルター (HLC-DISK 25 (0, 45μm), polyvinyl-difluoride)：関東化学製、

3. 実験方法

3.1 メンブランフィルターによる試料液に分散した油滴の除去の確認

メンブランフィルターで濾過して得られた濾液 (試料液) を波長 650nm で測定した透過度 (T%) が、98% 以上であれば、油滴が除去できたとした。

3.2 試料調製法 (VB₁₂)

試料約 50g を正確に 250ml の褐色メスフラスコに量り、これに溶解液の 15w/v% 硫酸ナトリウム水溶液 (1mMEDTA・2Na 含有) を 200ml 加えて溶解する。次に、溶解液を加えて 250ml に定容する。さらに、メンブランフィルターで濾過し得られた濾液を試料液とする。この試料液 10ml を SPE C₁₈ カートリッジに注入する。次に、水洗後 (2ml × 3 回), 50v/v% アセトニトリル水溶液を通液し、溶出液 10ml を留去後、これに水 0.5ml を正確に加え HPLC 用の試料液とする。

3.3 高速液体クロマトグラフィー操作条件

装置は、日立 655A-12 形、検出器は、可視検出器 (日

本分光検出器 UVIDEC 100-IV 形) を用いた。カラムは、ODS (15x 0.46cm I. D.) を使い、カラム温度 40℃、検出波長 550nm で測定した。移動相は、アセトニトリル-50mMKH₂PO₄ (pH 2.1) (10:90) を使い、流速は、1ml/min に設定し、試料注入量は、200μl で行った。

4. 実験結果および考察

4.1 メンブランフィルターによる試料液に分散した油滴の除去

本実験では、試料 10g を 10w/v% 硫酸ナトリウム水溶液に溶解したものをを用いた。Table 1 には、メンブランフィルターのフィルターの材質、用途 (水系、水系および非水系共用) T (%), relative standard deviation (RSD) および今回の目的の油滴の除去の適否を示した。

検討したメンブランフィルターの材質は、水系用の cellulose acetate, cellulose nitrate, polypropylene お

Table 1.

T (%) value of filtrate obtained by using various membrane filters and suitability for separation of oily particles in nutrient diluted with 10w/v% Na₂SO₄ solution at 650nm

sample; 10g / 100ml				
material of filter	use for	T (%)	RSD (n=3)	suitability
Sample ¹⁾		2.9	3.4	
Filtrate				
cellulose acetate (0.45μm)	A	4.7	2.1	no
cellulose nitrate (0.45μm)	A	9.4	1.1	no
cellulose acetate + nitrate (0.45μm)	A	68.8	0.1	no
polypropylene r (0.45μm)	A	3.3	3.0	no
polypropylene (Chromatodisk (0.2μm))	A	96.4	0.1	yes
acrylic copolymer (0.2μm)	A	78.5	0.1	no
acrylic copolymer (0.45μm)	A	5.5	1.8	no
polytetrafluoroethylene (0.45μm)	B	0.9	6.2	no
polytetrafluoroethylene (0.2μm)	B	28.9	0.3	no
polyvinylidene fluoride (HLC-DISK 25 (0.45μm)) (Kanto kagaku)	B	98.6	0.1	yes

1) before filtration

A: use for aqueous, B: use for both aqueous and nonaqueous

よび acrylic copolymer, および非水系共用の polytetrafluoroethylene および polyvinylidifluoride で、孔径 0.2 または 0.45 μ m である。

(1) 水系メンブランフィルター

cellulose acetate, cellulose nitrate および polypropylene (0.45 μ m) は、油滴除去のメンブランフィルターとしては、不適であった。polypropylene (0.2 μ m) は、後で述べる関東化学製の HLC-DISK ほどではないが、良好であった。しかし、0.45 μ m は、不適であった。

acrylic copolymer (0.2 および 0.45 μ m) は共に、不適であった。実施例がすくないが、孔径は 0.2 μ m の方が、油滴の除去率が良かった。

(2) 水系および非水系共用メンブランフィルター

polytetrafluoroethylene (0.2 μ m および 0.45 μ m) は共に、不適であった。関東化学製の HLC-DISK (polyvinylidifluoride (0.45 μ m)) は、油滴の除去が可能で、検討した中では最もすぐれていた。このメンブランフィルターを用いた油滴の除去は、1 分以内で可能であった。

実験の結果、今回検討した 10 種類のメンブランフィルターの中では、水系・非水系共用の HLC-DISK 25 (0.45 μ m) が最適であったので、以後、これを用いて検討を行った。

4.2 硫酸ナトリウムの濃度と油滴除去との関係

予備検討で、試料液に無機塩が含有されていた方が、油滴が除去されたので、硫酸ナトリウムの濃度と油滴の除去との関係について検討した。硫酸ナトリウムの他に食塩も考慮したが、分析対象物質の中には影響されるおそれのものもあるので、今回、硫酸ナトリウムで検討した。Table 2 に、試料 10 g を各濃度の硫酸ナトリウム水溶液に溶解して、HLC-DISK で濾過する前後の透過率と RSD を示した。

Table 2.

Effect of Na_2SO_4 concentration on the T(%) value of sample and filtrate at 650nm

Na_2SO_4 (w/v %)	sample : 10 g / 100 ml			
	sample ¹⁾		filtrate	
	T (%)	RSD (n=3)	T (%)	RSD (n=3)
0	0.2	0.3 %	65.6	0.2 %
2.5	0.3	0.2	73.5	0.1
5	0.5	0.1	76.5	0.1
10	2.9	1.9	98.6	0.1
15	4.5	1.2	100	0.1
20	6.5	1.5	99.6	0.1

1) before filtration

いずれの試料も、硫酸ナトリウムの濃度が高くなると、透過率も高くなった。試料を 10w/v % 以上の硫酸ナトリウム液に溶解すれば、油滴の除去が可能となることが判った。念のため、15w/v % の硫酸ナトリウム塩を用いることにした。

4.3 試料液の濃度と各分画の濾過液の透過度との関係

試料液の濃度 (10, 15, 20g/100ml) を調製して、各分画 (5ml) の濾過液の透過度との関係について検討を行なった (Table 3)。

いずれの試料でも第 1 および第 2 fraction の濾過液、合計 10ml までは使用できることが判った。

Table 3.

Effect of the nutrient concentration on the T(%) value of filtrate in fraction at 650nm

	Na_2SO_4 : 15g/100ml					
	10g/100ml		15g/100ml		20g/100ml	
	T (%)	RSD (n=3)	T (%)	RSD (n=3)	T (%)	RSD (n=3)
Sample ¹⁾	6.5	1.5 %	0.1	0 %	0.3	0 %
Filtrate						
1 fraction (5ml)	100	0	99.6	0.1	99.6	0.1
2 fraction (5ml)	100	0	99.0	0.1	99.8	0.1
3 fraction (5ml)	95.1	0.1	89.8	0.1	nf ²⁾	

1) before filtration

2) not filtered dueto plug

4.4 メンブランフィルターのロットの違いによる各濾過液の透過度の影響

3 ロットのメンブランフィルターで得た濾過液の透過度について、ロットの違いによる透過度に差異があるかどうかについて検討した (Table 4)。

第 1 および第 2 fraction の濾過液、合計 10ml までは使用することができ、ロットの違いによる透過度の差異は認められなかった

Table 4.

Effect of the different lot number of HLC-DISK 25 (0.45 μ m) membrane filter on the T(%) value of filtrate in fraction at 650nm

fraction (5ml)	sample : 10g/100ml				Na_2SO_4 : 15g/100ml	
	lot A		lot B		lot C	
	T (%)	RSD (n=3)	T (%)	RSD (n=3)	T (%)	RSD (n=3)
1	100	0 %	100	0 %	99.8	0.1 %
2	100	0	99.9	0.1	99.8	0.1
3	95.1	0.1	96.8	0.1	95.8	0.1

4.5 各種食品の油滴の除去

最後に、本法を用いて、各種食品の油滴の除去への可能性についても検討した。念のため、本法とヘキサン抽出後の水溶液の透過度を比較すると、本法で得た方が、良好であった (Table 5)。本法は、一般の食品にも適用できることが判った。

前述したが、本法は、迅速、簡便で、分析担当者の健康および環境にも配慮した方法であり、有利であると考える。

Table 5.

T(%) value at 650nm of sample and filtrate (5ml) in foods obtained by using various membrane filters and aqueous layer extraction with hexane

nutrient	Na ₂ SO ₄ : 15g/100ml					
	present method				hexane extraction	
	sample		filtrate		aqueous layer ¹⁾	
	T(%)	RSD (n=3)	T(%)	RSD (n=3)	T(%)	RSD (n=3)
A (10w/v%) ¹⁾	7.5	1.3%	99.9	0.1%	91.5	0.1%
B (10w/v%)	6.5	1.5	98.3	0.1	97.1	0.1
C (10w/v%)	7.2	1.4	99.1	0.1	93.2	0.1
D (10w/v%)	6.5	1.5	100	0	69.3	0.2
Health food (10w/v%)	32.9	0.4	100	0	88.1	0.1
Mayonase (5w/v%)	0.02	0	98.7	0.1	0.9	11.1
Plant oil (50v/v%)	3.9	2.6	95.3	0.1	— ³⁾	—
Cow's milk (1v/v%)	9.5	1.1	100 ²⁾	0	9.9	1.1
Milk powder (1w/v%)	0.4	0	98.7 ²⁾	0.1	— ³⁾	—

1) concentration

4.6 SPE の検討

SPEを適正化するためには、溶離液、溶出液量およびローディング pH の検討が必要である。以下、これらについて記載する。

4.6.1 溶離液の検討

SPE C₁₈ カートリッジから VB₁₂ を溶出させる溶離液 (アセトニトリル水溶液) の濃度の検討を行った (Table 6)。各アセトニトリル水溶液をカートリッジに通液した (溶出液量; 10ml)。VB₁₂ は 50v/v% アセトニトリル水溶液で定量的に溶出できた。

次に、溶出液量について検討した結果 (Table 7), 10ml が必要であることが判明した。

4.6.2 ローディング pH と VB₁₂ の回収率との関係

一般に、SPE を適用する場合、溶液の pH が回収率に影響することが多い。本実験では 10mM リン酸緩衝液を用いて pH を 2 から 8.5 に調整し、pH と VB₁₂ の回収率との

Table 6.

Effect of acetonitrile concentration on the elution of VB₁₂

eluent		Recovery (%)
acetonitrile-water		
0	100	0
5	95	0
10	90	66.7
15	85	75.5
25	75	87.6
50	50	100
75	25	85.7
100	0	4.7

Standard cyanocobalamin (5 μ g) was injected into the cartridge followed by elution with the 10ml of each acetonitrile solution.

Table 7.

Effect of volume of 50v/v% acetonitrile aqueous solution on the elution of VB₁₂ from the cartridge

fraction (eluate volume; 2ml)		Recovery (%)
1		69.7
2		20.9
3		8.1
4		1.3
5		0

Standard cyanocobalamin (5 μ g) was injected into the cartridge followed by elution with 2ml aliquot of 50v/v% aqueous acetonitrile solution.

Table 8.

Effect of pH value of sample solution on the retention of VB₁₂

loading pH	Recovery (%)
2.0	100
3.0	100
4.5	100
5.5	100
6.0	100
6.8	100
7.5	88.8
8.5	41.7

Standard cyanocobalamin (5 μ g) diluted in 2ml of 10mM potassium phosphate buffer (pH 2 to 8.5) was applied to the cartridge followed by elution with 10ml of 50v/v% aqueous acetonitrile solution.

関係について検討した (Table 8)。検討の結果、VB₁₂ は pH が 2~7 付近で定量的に回収され、pH の依存性が少ないことが判明した。一般に食品の pH は、この範囲内にあるので、さらに pH 調整をする必要がない。

以上の SPE での至適条件を要約すると次のようになる。

1. カートリッジ: SPE C₁₈ (3ml)
2. 溶離液と通液量: 50 v/v% アセトニトリル水溶液で溶出 (溶出液量 10ml)
3. 試料液の pH: pH 2~6.8

4.7 クロマトグラフィー

VB₁₂ は、260, 360 および 550nm 付近に吸収がある。医薬品中の VB₁₂ を分析する際、市販品では入手が困難な Co- α -(5-hydroxybenzimidazolyl)-Co- β -cyanocobamide) を内部標準物質に用いて SPE で分離、精製して HPLC (550nm) で測定している例がある [8]。

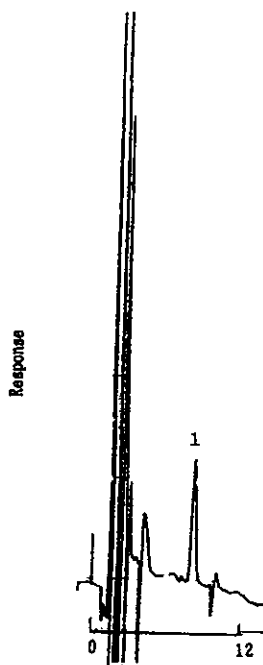


Fig1. Chromatograms of cyanocobalamin in nutrient analyzed by HPLC with visible detection at 550nm after SPE using a membrane filter for the precolumn removal of oily particles. HPLC was carried out on a 15×0.46cm I.D. column ODS (5 μ m) using 50 mM KH₂PO₄ (pH 2.1, adjusted with phosphoric acid)-acetonitrile (90:10, v/v) as the mobile phase, at a flow-rate of 1ml/min at 40°C. Peak 1=cyanocobalamin.

本法では、メンブランフィルターにより油滴を除去して得た濾液を SPE に付し試料調製を行い、文献と同様に HPLC (550nm) で超微量の VB₁₂ を分析した。本法による VB₁₂ のクロマトグラムを Fig.1 に示した。約 12 分で分析でき、Fig.1 から VB₁₂ の検出限界は、約 0.1ng (S/N=3) (注入量; 200 μ l) であった。注入量が 200 μ l と多いのにもかかわらず、VB₁₂ のピークが検出できるのは、分析カラムの先端に VB₁₂ が濃縮されるからであると考えられる。

4.8 定量

検量線は VB₁₂ のピーク高さから求め、原点を通り 30ng までの微量の範囲で直線性が得られた ($y=1.5004x+5.5778$)。

標準品添加法による VB₁₂ の回収率は、90%以上で RSD は 2.7% (n=5) であった (Table 9)。

Table 9.

Recoveries of VB₁₂ added to nutrient¹⁾

(μ g per 100g)		Recovery (%)
Added	Found	
0	1.65	
0.45	2.05	88.8
0.9	2.47	91.1
1.8	3.31	92.2

1) RSD: 2.7% (n=5) with no addition of VB₁₂

5. まとめ

関東化学製の水-非水系共用のメンブランフィルター (HLC-DISK 25 (0, 45 μ m), polyvinylidene fluoride) を用いることにより、試料液に分散した油滴の除去が迅速 (1 分以内)、簡便にできた。SPE および HPLC (550nm) を組み合わせることにより、超微量の VB₁₂ (18ng/g) を約 12 分で測定できた。標準品添加法による VB₁₂ の回収率は、90%以上で、RSD は 2.7% (n=5) であった。また、VB₁₂ の検出限界は、約 0.1ng (S/N=3) (注入量; 200 μ l) であった。

本研究により、試料液中の異物を濾過する目的で使用されてきたメンブランフィルターが、従来は困難であった油滴の除去にも、あらたに適用できることが判明した。

謝 辞

本報の作成にあたり、御助言をいただいた恩師の宮崎元一先生 (金沢大学薬学部名誉教授) に感謝いたします。

References

- 1) N. Simpson., Van Horne, K. C. (Editors) Sorbent Extraction Technology, 2nd Edition, 1993, Varian Sample preparation Products, Harbor City, CA, USA
- 2) E. P. Frenkel, R. L. Kitchen and R. Prough, *J. Chromatogr.*, 174 (1979) 393.
- 3) T. Hattori, N. Asakawa, M. Ueyama, A. Shinoda and Y. Miyake, *Yakugaku Zasshi*, 100(1980) 386.
- 4) D. W. Jacobsen, R. Green, E. V. Quadros and Y. D. Montejano, *Anal. Biochem.*, 120 (1982) 394.
- 5) M. Binder, J. F. Kolhouse, K. C. VanHorne and R. H. Allen, *Anal. Biochem.*, 125 (1982) 253.
- 6) W. B. Whitman and R. S. Wolfe, *Anal. Biochem.*, 137(1984) 261.
- 7) S. H. Ford, J. Gallery, A. Nichols and M. Shambee, *J. Chromatogr.*, 537(1991) 2356.
- 8) C. C. Jansen and J. P. de Kleijn, *J. Chromatogr. Sci.*, 28(1990) 42.
- 9) R. M. Kothari and M. W. Taylor., *J. Chromatogr.*, 247(1982) 187.
- 10) P. Wimalasiri and R. B. H. Wills, *J. Chromatogr.*, 318(1985) 412(13) M. Yoshida and K. Iriyama, *J. Liuid Chromatogr.*, 9 (1985) 177.
- 11) K. Hayakawa and J. Oizumi, *J. Chromatogr.*, 413(1987) 247.
- 12) H. Iwase, *J. Chromatogr.*, 590(1992) 187.
- 13) A. P. De Leenheer, W. E. Lambert and H. J. Nelis, *Modern Chromatographic Abalysis of Vitamins*, Second Edition, p469, 1992, Marcol Dekker Publishing Co., New York, U. S. A.
- 14) H. Iwase and I. Ono. *J. Chromatogr.*, 771 127(1997).

GLP / GMP Validation Support · Certified Quality

分析バリデーションサポート高純度シリカ系ODSカラム

Mighty RP-18 GP

GLP / GMP におけるバリデーションをサポートします。



KANTO Reagents



製品に関する資料をご用意しております。下記までお問い合わせ下さい。

充填剤パッチ間・カラムロット間偏差を厳しい規格として設定し、高精度の充填を行っています。

バリデーションが必要とされるあらゆる分析工程において、安心してご利用いただけます。

常時3パッチの充填剤をご用意しています。

医薬品などの分析法検討の際、充填剤パッチの異なるカラム3本をあらかじめ試験することができます。

充填剤の物性・溶離特性を証明する「Certificate of Analysis」を添付。

酸性、塩基性、金属配位性化合物などの幅広い試料に対して、抜群のピーク形状と高い再現性を約束します。



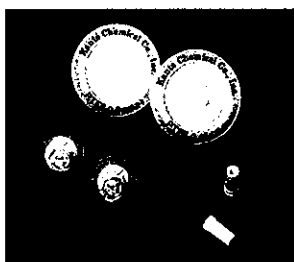
関東化学株式会社 試薬事業本部

〒103-0023 東京都中央区日本橋本町 3-11-5 03(3663)7631
 〒541-0048 大阪市中央区瓦町 2-5-1 06(6222)2796
 〒812-0007 福岡市博多区東比恵 2-22-3 092(414)9361

<< <http://www.kanto.co.jp> E-mail: reag-info@gms.kanto.co.jp >>

HLC-DISK

サンプル前処理ディスク・フィルター



ガードカラムを使っているから、サンプルをフィルターで濾過する必要が無いと考えられていませんか...ガードカラムとフィルターによる濾過の目的は全く別です。HPLC用ディスクフィルター「HLC-DISK」を使用することにより、分析カラムの寿命をのばすだけでなく微粒子が原因となる不規則な圧力変動を防止し、データの正確度と精度の向上につながります。

HLC-DISKシリーズは、高い粒子補正能力と可能な限り不純物の溶出を抑えたメンブレンを採用し、液残量の少ないハウジングデザインでサンプルのロスを最小に抑えています。

サンプルの液性・容量・目的に合わせて4タイプ18種類の中から適切な製品をお選びください。

HLC-DISK 水系

生物学的水溶液や水溶性試料を少ない液残量で確実に濾過します。特にポリスルホンメンブレンの製品はタンパク質吸着性が低く、貴重なタンパク質に対して98%以上の回収を保証いたします。

HLC-DISK イオンクロマト用

イオンクロマト分析のサンプル前処理用として開発した、無機物の溶出が極めて低いメンブレンを使用しています。無機イオン溶出量は0.05 ppm以下を保証しています。

HLC-DISK 溶剤系(非水系)

耐薬品性の高いPTFEメンブレンを使用した疎水性フィルターです。有機溶剤をはじめあらゆる薬品に対応し、オートクレーブ滅菌が可能です。また、ペントフィルターとしてもお使いいただけます。

HLC-DISK 水系/溶剤系 兼用

親水性フッ素樹脂PVDFを使うことで、水系と溶剤系両方のサンプルのろ過が可能。酸やアセトニトリルの濾過に最適で、オールマイティに使用いただける製品です。

HLC-DISKはすべてHPLCによる性能保証済みです。

タイプ	水系					イオンクロマト用(水系)			
製品番号	96900-00	96901-00	96902-00	96903-00	96904-00	96914-00	96915-00	96916-00	96917-00
フィルタ径(mm)	3	13		25		13		25	
孔径(μm)	0.45	0.2	0.45	0.2	0.45	0.2	0.45	0.2	0.45
フィルタ材質	親水性アクリル共重合体			ポリスルホン		親水性ポリスルホン			
ハウジング材質	ポリプロピレン			変性アクリル		ポリプロピレン			
耐圧(max)	5.3kg/cm ² (75 psi)			5.3kg/cm ² (75 psi)		5.3kg/cm ² (75 psi)			
耐熱(max)	80℃			55℃		55℃			
液残量(μl)	<10	<20		<50		<30		<100	
包装単位	100個	100個		100個		100個		100個	
標準価格(円)	10,000	15,000	15,000	20,000	20,000	21,000	21,000	39,000	39,000

タイプ	溶剤系(非水系)					水系/溶剤系 兼用			
製品番号	96905-00	96906-00	96907-00	96908-00	96909-00	96910-00	96911-00	96912-00	96913-00
フィルタ径(mm)	3	13		25		13		25	
孔径(μm)	0.45	0.2	0.45	0.2	0.45	0.2	0.45	0.2	0.45
フィルタ材質	ポリテトラフルオロエチレン (PTFE)					ポリビニルジフルオライド (PVDF)			
ハウジング材質	ポリプロピレン					ポリプロピレン			
耐圧(max)	5.3kg/cm ²	7.0kg/cm ² (100 psi)					3.5kg/cm ² (50 psi)		
耐熱(max)	100℃					100℃			
液残量(μl)	<10	<30		<100		<30		<100	
包装単位	100個	100個		100個		100個		100個	
標準価格(円)	12,000	20,000	20,000	39,800	39,800	19,500	19,500	38,500	38,500

粘液とムチン(その2)

—胃粘液研究用抗ムチンモノクローナル抗体の開発—

関東化学株式会社 技術・開発本部 伊勢原研究所 所長 農学博士 栗原 誠

1. はじめに

前回は、消化管粘膜内で日々多量に産生、分泌されている粘液の多様性と、粘液の性状にはその主要成分であるムチンとよばれる特殊な糖タンパク質が深く関与していることを紹介した¹⁾。本稿では、消化管の中でもことさら機能性に富む“胃”を対象とした粘液研究を概説し、胃粘液研究における抗ムチンモノクローナル抗体の開発意義、並びに、今回我々が作製した抗胃ムチンモノクローナル抗体の特性について述べる。

2. 胃の粘液組織化学

胃における粘液産生は、粘膜の表層部と深層部に局在する粘液細胞によって営まれている。胃粘膜の表面には胃小窩とよばれる小さな凹みがあり、その底に胃腺が開口している(図1)。表層部の粘液細胞は胃粘膜表面と胃小窩を覆い、被蓋上皮細胞(表層粘液細胞: surface mu-

cous cell) とよばれる。深層部の粘液細胞は胃腺の上皮に分布し、腺粘液細胞とよばれているが、噴門部では噴門腺細胞(cardiac gland cell)、胃体部では副細胞(mucous neck cell)、幽門部では幽門腺細胞(pyloric gland cell)と部位ごとに個別の名称が付与されている。胃小窩と胃腺の境界領域を峽部(isthmus)といい、分裂増殖を行なう細胞が集中して増殖細胞帯(generative cell zone)を形成している。胃の粘液細胞はいずれも増殖細胞帯から分化する。

組織化学的にみて、胃粘膜には性状の異なる粘液が部位特異的に存在している。勝山らは粘液を構成する糖部分に特異的な染色法を用い、胃粘膜内に分布する粘液の種類とその性質の違いを明らかにしている²⁾。例えば、胃体部の被蓋上皮細胞は強い過ヨウ素酸－シッフ(PAS)染色陽性を示し、また、ガラクトースオキシダーゼ－シッフ(GOS)反応でも特異的に染色される粘液をもつ。副細

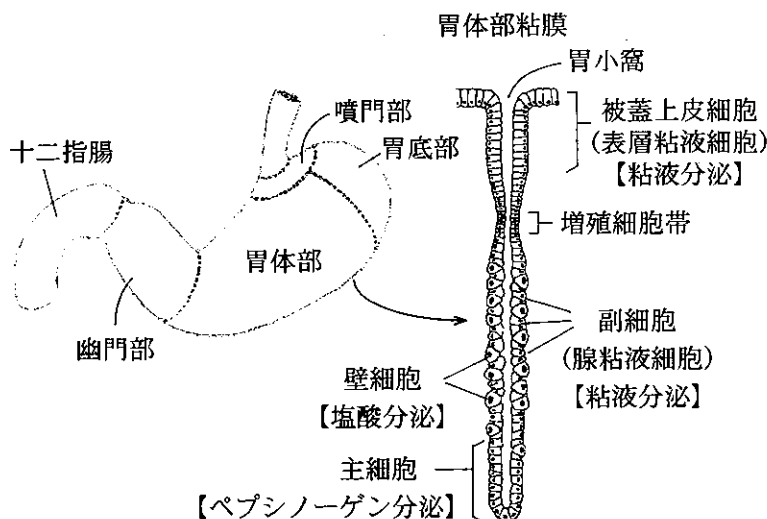


図1. ヒトの胃と胃粘膜の模式図

胞には PAS 染色性は非常に弱い、パラドキシカルコンカナバリリン A 染色 (PCS) で III 型に分類される粘液 (III 型粘液) が特異的に存在する。さらに、ヒト正常胃には少ないが、ラットでは増殖細胞帯の近傍に高鉄ジアミン (HID) 染色陽性のスルホムチンが局在している。胃幽門部では、腺細胞の大部分を占める被蓋上皮細胞は GOS 反応陽性の粘液をもち、腺底部にある幽門腺細胞には副細胞と似て PCS 反応陽性粘液の局在が観察される。

3. 胃粘膜に局在するムチンの性状と変動

胃粘膜の特定の部位で産生されるムチンの性状や制御機構を明らかにしようとする試みが種々なされている。小原らはラット胃粘膜を胃体部と幽門部に分割し、各粘膜から得られたムチンの糖組成を比較した³⁾。彼らは、中心タンパクのセリンまたはトレオニンとの結合部 (糖鎖の還元末端) 以外に存在する N-アセチルガラクトサミン (GalNAc) が幽門部のムチンでは多く、胃体部のムチンではほとんどみられないこと、さらに、非還元末端に GalNAc をもつ A 型の血液型活性糖鎖は幽門部から得られたムチンに多いことを明らかにした。また、小原らは胃体部と幽門部のムチンの高次構造を比較し、前者には 2 種の異なったサブユニットのムチンがあるが、後者にはこのうち 1 種類のタイプしか存在しないことを明らかにしている。小室らは粘液溶解剤と機械的な剥離法を組み合わせ、胃粘膜を粘液ゲル層、表層粘膜層、深部粘膜層の 3 層に分離する「胃粘膜 3 層分離法」を開発し、各層に存在するムチンの個別測定を可能とした⁴⁾。彼らはこの方法でラット胃粘膜を 3 層に分離し、各層におけるムチンの分布を報告している⁵⁾。その結果によれば、胃体部のムチンは粘液ゲル層、表層 (表層粘液細胞)、深層 (副細胞) の各層に大体 10:40:50 の比率で分布しており、PAS 染色では染色強度が弱い副細胞由来のムチンの割合が思いのほか多いことが示された。

胃におけるムチン産生がどのように制御されているかは主に薬剤を用いた動物実験で調べられている。小室らはラット胃におけるムチンの産生、分泌に及ぼす薬剤の影響を検討し、酸分泌促進薬であるテトラガストリンの投与が胃体部の表層と粘液ゲル層のムチン量を増加させることを明らかにした⁶⁾。このことは、テトラガストリン投与によって胃体部表層粘液細胞のムチン産生が亢進したと同時に、ムチンの分泌も盛んになったことを示唆している。また、小島らは同様な手法を用いてムスカリン性アセチルコリン受容体 (M₁ サブタイプ) の拮抗薬であるピレンゼピンの影響を検討し、ピレンゼピンが限定的に胃体部深層のムチン量を増加させることを明らかにし

た⁷⁾。ピレンゼピン投与では副細胞のムチン産生が亢進するが、産生されたムチンは副細胞に蓄積されているものと推察される。一方、市川らはラット胃粘膜を用いた器官培養系を用い、テトラガストリンが胃体部粘膜におけるムチン生合成を顕著に促進するのに対して、幽門粘膜ではほとんど影響を及ぼさないことを明らかにしている⁸⁾。

以上紹介した研究成果は、胃粘膜の部位および層特異的に存在するムチンが生理的に固有の支配を受け、生合成されたものであることを強く示唆している。これらの部位または層で特異的に産生されるムチンは個々に何らかの役割を担って合成、分泌されていると考えるべきであろう。しかしながら、従来の手法では組織染色のように細胞レベルでムチンを同定するといった厳密性を期待することはできず、ムチンの由来を特定することができない。そこでわれわれは、組織化学と生化学の両研究側面から利用でき、かつ、物質の構造を厳密に識別可能なツールを得ることを目的として、抗ムチンモノクローナル抗体の開発に着手した。

4. 抗胃ムチンモノクローナル抗体の作製

対象動物には実験動物として種々の生理学的または病理態生理学的研究に多用されているラットを選定し、ラットの胃からムチンを抽出、精製し、免疫原とした。免疫スケジュールおよび実験成績を表 1 に示す。ミエローマ細胞は Sp2/0-Ag14 と F0 を用いたが、Sp2/0-Ag14の方がクローン出現率は高く、また、高度に免疫した方が成績は良かった。陽性クローンの中には培養初期の段階で死滅してしまうものもあったが、細胞数がある程度確保できたクローンから順に限界希釈法によるクローニングを実施し、最終的に 10 個の樹立細胞株 (established cell) を得ることができた。

5. 抗ムチンモノクローナル抗体の性状

樹立細胞株の培養上清液を採取し、ラット胃精製ムチンとの反応性を ELISA 法で検討した結果、いずれの培養液もムチン 10 ng/well 以上で用量応答性を示し、ラット胃ムチンと反応する抗体であることが確認された (図 2)。各抗体のグロブリンクラスは RGM 23 が IgG_{2b} であったのを除いてすべて IgM であった。各抗体の抗原認識部位 (エпитープ) は、抗体と抗原ムチンとの反応時に同ムチンからアルカリ還元処理して切り出した糖鎖を共存させる competitive ELISA 試験により、RGM 23 以外、すべて糖鎖認識抗体であることが確認された。RGM 23 はムチンオリゴ糖と反応せず、また、抗原をトリブシン処理すると反応性が低下することから、ムチンの naked peptide

表1. 抗ラット胃ムチン抗体産生ハイブリドーマの調製

BALB/c マウス	No.1	No.2	No.3	No.4	No.5	No.6
ムチン(免疫原) 抽出部位	全胃	胃体部	胃体部	胃体部	幽門部	幽門部
免疫スケジュール	2 ips* / 24日間		7 ips* / 196日間		7 ips* / 203日間	
ミエローマ細胞	Sp2/0-Ag14	Sp2/0-Ag14	F0	F0	F0	Sp2/0-Ag14
出現クローン数	32	177	23	22	15	209
陽性クローン数	1	15	0	3	0	10
樹立細胞株数	1	6	0	1	0	2

Figure 1 consists of 11 vertically stacked graphs, each representing a different cell line. The x-axis for all graphs is 'rat gastric mucin (ng/well)' on a logarithmic scale from 0.1 to 1000. The y-axis for all graphs is 'A415nm'. The cell lines and their corresponding y-axis scales are: RGM11 (0.0 to 1.6), RGM21 (0.0 to 0.10), RGM22 (0.0 to 0.30), RGM23 (0.0 to 0.10), RGM24 (0.0 to 0.2), RGM25 (0.0 to 0.04), RGM26 (0.0 to 0.30), RGM31 (0.0 to 0.30), HIK1083 (0.0 to 0.4), and RGM42 (0.0 to 0.4). Each graph shows a baseline absorbance with a sigmoidal increase at higher mucin concentrations.

HIK 1083 と名付けた抗体についてはそのエピトープ構造が解明されている⁹⁾。石原らは HIK 1083 がブタの胃のムチンとも反応することに着目し、大量のブタ胃ムチンから糖鎖を切り出し、HIK 1083 と反応する糖鎖の単離、精製に成功した。NMR 解析の結果、得られた糖鎖は非

$\text{Fuca}\alpha 1\text{-2Gal}\beta 1\text{-4GlcNAc}\beta 1\text{-6}$
 $\text{GlcNAc}\alpha 1\text{-4Gal}\beta 1\text{-3}$

$\text{GlcNAc}\alpha 1\text{-4Gal}\beta 1\text{-4GlcNAc}\beta 1\text{-6}$
 $\text{GlcNAc}\alpha 1\text{-4Gal}\beta 1\text{-3}$

得られた抗体を用いてラット胃粘膜を免疫染色し、各抗体の組織染色性を調べた¹⁰⁾。その結果、相互に全く同じ染色性を示す抗体はなかったが、代表的には胃体部表層と反応する抗体(RGM 21)、胃体部と幽門部の表層と反応する抗体(RGM 24)、幽門部と反応する抗体(RGM 22)、胃体部と幽門部の深層と反応する抗体(HIK 1083)の4グループに大別することができた(図4)。各抗体の組織染色性とその他の特徴を一括して表2に示す。なお、RGM 23を除く9抗体はいずれもホルマリン固定、パラフィン包埋した標本切片を染色可能であった。

上記の組織染色結果は、ラット胃では少なくとも4種

表 2. 抗ラット胃ムチンモノクローナル抗体の分類

群	MAB	特異的染色部位	その他の特徴
I	RGM11	胃体部 表層	galactose oxidase (GO) 感受性
	RGM21	胃体部 表層	GO 感受性
	RGM31	胃体部 表層	GO 感受性、O(H)型赤血球陽性
II	RGM24	胃体部/前庭部 表層	
III	RGM22	前庭部 表層 (深層)	A型赤血球陽性
	RGM25	前庭部 表層 (深層)	
	RGM26	前庭部 表層	A型赤血球陽性
	RGM42	前庭部 表層 (深層)	A型赤血球陽性
IV	HIK1083	胃体部/前庭部 深層	PCSの組織染色性と酷似
V	RGM23	(未特定)	トリプシン感受性

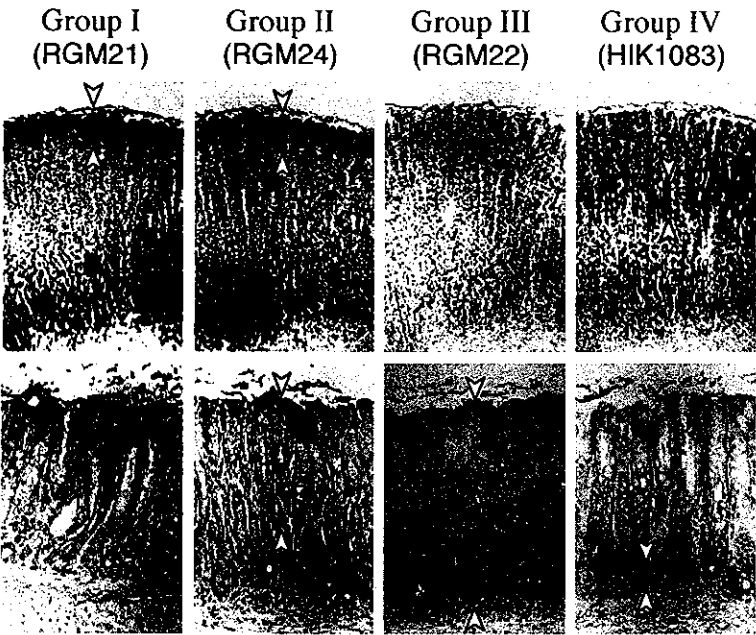


図 4. 抗ムチンモノクローナル抗体を用いて免疫染色したラット胃粘膜の組織像
上段が胃体部粘膜 (倍率: x 100), 下段が幽門部粘膜 (倍率: x 200) である。
矢頭間は抗体が結合して茶色に染色された領域を示す。対比染色はヘマトキシリン染色。

類以上のムチンがそれぞれ特定の粘液産生細胞で合成されていることを雄弁に物語っており、胃ムチンの構造と機能、さらには粘液代謝機構を解明する上でこれらの抗体が有力なツールになり得ることを強く示唆している。事実、そのような観点での抗体の利用も始まっており、既に五艘らは RGM21 と HIK1083 を用いてラット胃の表

層ムチンと深層ムチンを識別し、各ムチン分子の性状を明らかにしている¹¹⁾。また、各抗体が反応する部位は厳密に限定されることから、適当な抗体を選べばラット胃粘膜のマッピングが可能である。Gono らは RGM22 および RGM26 を用いてラット胃の噴門部、胃体部、幽門部の境界を特定し、各部位における内分泌細胞の分布を報

告している¹²⁾。これとは別に市川らは、RGM21とHIK1083を用い、一酸化窒素シンターゼ(NOS)が胃粘膜表層に局在していることを証明している¹³⁾。このように、ラット胃の胃体部、幽門部、および、表層と深層の識別にはRGM21, RGM22, HIK1083が有用である。

このような状況を踏まえ、弊社はラット胃の組織学的研究用試薬としてRGM21, RGM22, HIK1083の販売を開始した。また、ヒトへの交差反応が確認され、病理診断への適用が検討されているHIK1083については別途にM-GGMC-1という製品名で販売を行っている。現在、HIK1083を筆頭に抗体の応用研究が進められているが、その内容は次稿に譲ることとする。

参考文献

- 1) 栗原：粘液とムチン—生化学的にみた消化管粘液の性状—
ibid., 178: 20-24, 2000.
- 2) Katsuyama, T., Ono, K., Nakayama, J., Kanai, M.: Recent advances in mucosubstance histochemistry. in *Gastric Mucus and Mucus Secreting Cells*. (Kawai, K. ed.), pp. 3-18, Excerpta Medica, Amsterdam, 1985.
- 3) Ohara, S., Ishihara, K., Hotta, K.: Comparative study on mucus glycoproteins in rat stomach and duodenum. *Comp. Biochem. Physiol.*, 83B: 273-275, 1986.
- 4) Komuro, Y., Ishihara, K., Ohara, S., Saigenji, K., Hotta, K.: A new method of separation and quantitation of mucus glycoprotein in rat gastric mucus gel layer and its application to mucus secretion induced by 16, 16-dimethyl PGE₂. *Gastroenterol. Jpn.*, 26: 582-587, 1991.
- 5) Komuro, Y., Ishihara, K., Ishii, K., Ota, H., Katsuyama, T., Saigenji, K., Hotta, K.: A separating method for quantifying mucus glycoprotein localized in the different layer of rat gastric mucosa. *Gastroenterol. Jpn.*, 27: 466-472, 1992.
- 6) Komuro, Y., Ishihara, K., Ohara, S., Saigenji, K., Hotta, K.: Effects of tetragastrin on mucus glycoprotein in rat gastric mucosal protection. *Gastroenterol. Jpn.*, 27: 597-603, 1992.
- 7) Kojima, Y., Ishihara, K., Ohara, S., Saigenji, K., Hotta, K.: Effects of the M₁ muscarinic receptor antagonist pirenzepine on gastric mucus glycoprotein in rats with or without ethanol-induced gastric damage. *Scand. J. Gastroenterol.*, 27: 764-768, 1992.
- 8) Ichikawa, T., Ishihara, K., Saigenji, K., Hotta, K.: Stimulation of mucus glycoprotein biosynthesis in rat gastric mucosa by gastrin. *Biochem. Pharmacol.*, 46: 1551-1557, 1993.
- 9) Ishihara, K., Kurihara, M., Goso, Y., Urata, T., Ota, H., Katsuyama, T., Hotta, K.: Peripheral α -linked N-acetylglucosamine on the carbohydrate moiety of mucin derived from mammalian gastric gland mucous cells: epitope recognized by a newly characterized monoclonal antibody. *Biochem. J.*, 318: 409-416, 1996.
- 10) Ishihara, K., Kurihara, M., Goso, Y., Ota, H., Katsuyama, T., Hotta, K.: Establishment of monoclonal antibodies against carbohydrate moiety of gastric mucins distributed in the different sites and layer of rat gastric mucosa. *Glycoconjugate J.*, 13: 857-864, 1996.
- 11) Goso, Y., Ishihara, K., Kurihara, M., Sugaya, T., Hotta, K.: Rat gastric mucins recognized by monoclonal antibodies RGM21 and HIK1083: isolation of mucin species characteristic of the surface and glandular mucosa. *J. Biochem.*, 126: 375-381, 1999.
- 12) Gono, Y., Kusakabe, T., Ichikawa, T., Ishihara, K., Hotta, K., Kawakami, T., Takenaka, T., Sakai, F.: Regional differences in the distribution of gastrin-, somatostatin-, and serotonin-immunoreactive basal granulated cells in the rat stomach: a quantitative analysis using antibodies against protein gene product 9.5 and gastric mucins. *Biomed. Res.*, 19: 101-109, 1998.
- 13) Ichikawa, T., Ishihara, K., Kusakabe, T., Kurihara, M., Kawakami, T., Takenaka, T., Saigenji, K., Hotta, K.: Distinct effects of tetragastrin, histamine, and CCh on rat gastric mucin synthesis and contribution of NO. *Am. J. Physiol.*, 274: G138-G146, 1998.

〔お願い〕 弊誌はご愛読者の皆様に年4回郵送しております。皆様方に確実にお届けするために郵送先の見直しを行っております。「送付先変更又は送付中止」の方のみ、FAX又はEメールで広報室・北原音作まで、ご連絡をお願い申し上げます。FAX 03-3279-5560 E-mail: chemiti-info@gms.kanto.co.jp

〈編集後記〉 旬の味覚を堪能する収穫の秋となりました。景気の回復が一段と厳しいこの時期であります。旬の魚代表「さんまの塩焼き」をおかずに、「新米」をほおばり、デザートに果物代表「赤く熟した甘柿」を食べながら

ら、ちょっぴり贅沢な気分で、秋の夜長を友人、先輩、家族とのコミュニケーションを図り、夏にたまった仕事や遊びの疲れ癒す絶好の機会です。きっと読者の皆様にはワクワクの秋が待っていることでしょう。(三城記)



関東化学株式会社

〒103-0023 東京都中央区日本橋本町3丁目2番8号
電話 (03) 3279-1751 FAX (03) 3279-5560
インターネットホームページ <http://www.kanto.co.jp>
編集責任者 三城 侑三 平成13年10月1日 発行