

10-Hydroxy-12(Z)-Octadecenoic acid の  
ELISA の確立とその生理活性の検討

指導教官 高取健彦 教授  
東京大学大学院医学系研究科  
平成3年4月入学  
第3種博士課程  
社会医学専攻 (法医学)

氏名 山田良広

①

10-Hydroxy-12(Z)-octadecenoic acid の ELISA の確立と  
その生理活性の検討

指導教官 高取健彦 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 3 年 4 月入学

学生証番号 17349

第 3 種博士課程

社会医学専攻 (法医学)

氏名 山田良広

【目次】

I	【緒言】	1 ~ 2
II	【10-OHODA の生合成および精製】	3 ~ 8
III	【抗 10-OHODA 単クローン抗体の作製】	9 ~ 16
IV	【培養マクロファージ産生 10-OHODA の ELISA による検出】	17 ~ 23
V	【10-OHODA の生理活性】	24 ~ 30
VI	【謝辞】	31
VII	【文献】	32 ~ 40

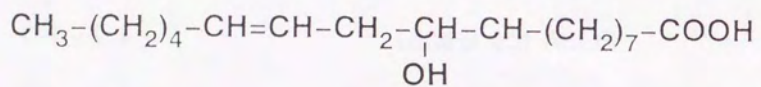


図 1 : 10-OHODA (10-hydroxy-12-octadecenoic acid) の構造

## I 【緒言】

10-hydroxy-12(Z)-octadecenoic acid (10-OHODA) は炭素数 18 で 10-位の炭素に水酸基をもつ不飽和脂肪酸であり (図 1)、異常死体现象の一つである死蠟の成分の中に見出される特異的脂肪酸の一種である [1, 2]。一方、植物のイネにみられる脂肪酸の一つである 9, 10-epoxy-12-octadecenoic acid (leukotoxin, LTx) はヒトの多核白血球中にも存在していることが知られ [3-12]、この多核白血球は死蠟中に存在している化合物と同じ 10-OHODA をも産生していることが明らかにされている [4]。

ロイコトキシシン (LTx) はリノール酸から産生され、末梢血管を拡張させ、血圧を下げることで知られていることから、外傷性ショックの成因の一つとして興味をもたれている。一方、成人呼吸促迫症候群の肺胞洗浄液や熱傷皮膚組織からも LTx が検出され、多核白血球が関連している疾病、例えば心筋梗塞、炎症性疾患や外傷等の病態生理的変化と密接な関わりをもつ可能性が示唆されている [13-24]。

著者は、10-OHODA に注目し、この生理活性の検討を試みた。しかし、この化合物は正常の多核白血球中にはきわめてわずかしき存在していないため、乳酸菌を用いてリノール酸から生合成を行った。10-OHODA の微量定量法を確立する目的で、混合無水物法によって 10-OHODA を牛血清アルブミン (BSA) に結合させて作製した抗原をマウスに免疫し、特異的な抗 10-OHODA 単クローン抗

体の作製に成功した。さらに、その抗体による 10-OHODA の enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) を確立し、抗体の特異性と鋭敏性について検討を加えた。一方、10-OHODA が生体中存在することを確認するため、ヒト由来のマクロファージを高酸素暴露下で培養し、マクロファージが産生する 10-OHODA の存在を、抗 10-OHODA 単クローン抗体を用いた ELISA により確認した。また、10-OHODA の生理活性をみるため、モルモットの摘出心を用いてその循環動態に及ぼす影響を検討し、LTx を始めとする構造的に類似した脂肪酸と 10-OHODA の生理活性を比較検討した。

## II 【10-OHODA の生合成および精製】

### 1. 実験材料および方法

#### 1) 乳酸菌体調製法 [33]

- (1) 供試菌： 実験に用いた *Lactobacillus plantarum* は通性嫌気性、グラム陽性、中等度の桿菌で発酵植物、サイレージ、漬け物、パン種、厩舎、ヒトの口腔・腸管などから分離されている。今回はサイレージから分離した菌株を用いた。
- (2) 菌株の保存法： ブリックス寒天高層培地に培養したものを  $-90^{\circ}\text{C}$  で保存し、使用に際しては融解後、ブリックス寒天高層培地で活性化した。
- (3) 菌体調製法： ブリックス液体培地を1リットルの三角フラスコに750 ml ずつ分注し、 $121^{\circ}\text{C}$  で15分間滅菌したものに、ブリックス液体培地で2回前培養した菌液を、1% になるように接種し、 $32^{\circ}\text{C}$  で24時間静置培養した。菌体の収集は、培養の終了した培養液を、冷却遠心分離器で7000 rpm、15分間遠心し集菌した。

#### [ブリックス培地の組成]

トマトジュース浸出液	400 ml
Neopeptone (Difco)	15 g

Yeast extract (Difco)	6 g	
ブドウ糖	20 g	
NaCl	5 g	
Tween 80	1 g	
可溶性デンプン	0.5 g	
純水	600 ml	pH 6.8

## 2) 10-OHODA の生合成

### (1) 前培養

凍結していた乳酸菌を溶解し、ブリックス寒天高層培地に 32°C で 48 時間刺線培養し、次にブリックス液体培地に白金線で接種し、32°C で 48 時間培養し、さらに 1% ブドウ糖添加トウモロコシ抽出液培地 (リノール酸無添加) で、32°C で 36 時間培養した。培地への接種量は 1%(v/v)とした。

### (2) 本培養

前培養を行った *Lactobacillus plantarum* 培養液 4ml を、0.1% リノール酸(東京化成)を含む 1% ブドウ糖添加トウモロコシ抽出液培地 400 ml 中に入れ、嫌気的な条件で 32°C、4 日間振とう培養した。

## 3) 10-OHODA の分離精製

### (1) 10-OHODA の抽出分離



培養液に NaCl を加えて塩析、分液漏斗を用い、n-ペンタンで3回抽出、2 N 炭酸ナトリウムで酸性部を振り分けた後 2 N 塩酸で pH 2 に調整し、さらに n-ペンタン で抽出、無水硫酸ナトリウムで一晩脱水、濾過、窒素気流下で溶媒留去後、減圧デシケーターで乾燥し抽出物 (3.06 g) を得た。この抽出物の一部を少量のクロロホルムに溶解後、シリカゲル 60HF (Merck, Darmstadt) をコーティングしたガラスプレートにのせ、展開溶媒にベンゼン：アセトン (5:1, v/v) を用いて、室温で薄層クロマトグラフィー (thin-layer chromatography, TLC) を行い、5% メタノール性ヨード液 (w/v) を噴霧し確認したところ基質に使用した多量のリノール酸 ( $R_f$  0.37) と原点のやや上方に薄いスポット ( $R_f$  0.09) が認められた。次に、培養液の n-ペンタン 抽出物からカラムクロマトグラフィーにより 10-OHODA の分離精製を行った。すなわち、シリカゲル (Wakogel C-200) 245 ml を内径 3.8 cm のカラムにベンゼンで充填し、少量のベンゼンで洗いながら抽出物 (3.06 g) を重量し、1% アセトン/ベンゼンで溶出し、200 ml ずつ 14 本分取、TLC でチェックしたところ、フラクション 3 ~ 5 に大量のリノール酸が溶出された。次に、2% アセトン/ベンゼンで溶出し、200 ml ずつ 4 本分取した。この分画には微量のリノール酸が検出された。続いて、5% アセトン/ベンゼンで溶出し、200 ml ずつ 17 本分取した。溶出した脂肪酸を前記の条件で TLC を行ったところフラクション 6~17 に目的とする 10-OHODA が溶出された。このフラクション 6~17 を集め、溶媒を留去後、減圧デシケーター中に一夜放置し、秤量し

た結果 218 mg の脂肪酸が得られた。一方、分離した脂肪酸の一部を、Silica gel HPTLCRP-8F<sub>254S</sub> (Merck, Darmstadt) をコーティングしたガラスプレートにのせ、展開溶媒にメタノール:水 (9 : 1, v/v) を用い逆相 TLC を行い、5% メタノール性ヨード (w/v) を噴霧し確認したところ、Rf 値 0.55 の所に一つのスポットのみが認められた。得られた脂肪酸を窒素下で -80°C に保存した。

## (2) 10-OHODAの同定

単離した脂肪酸の一部を少量のメタノールに溶解し、ジアゾメタンのジエチルエーテル溶液を加えてメチル化後、溶媒を留去し、新たに少量の n-ヘキサンを加え、ガスクロマトグラフィー(GC, GC-6A, SHIMADZU) で分析した。システムおよび分析条件は以下のとおりである。

分析カラム Silicone-OV17 1.5% (2m × 3 mm)

カラム温度 220°C

イオン源温度 250°C

キャリアガス 窒素

流速 40 ml/min

さらに、このメチル化物をガスクロマトグラフィー-マススペクトロメトリー (GC-MS, JMS-Dx 300, 日本電子) で質量分析 (MS) を行った。なお、GC は上記と同一条件で、イオン化電圧 70eV の EI-MS で分析した。

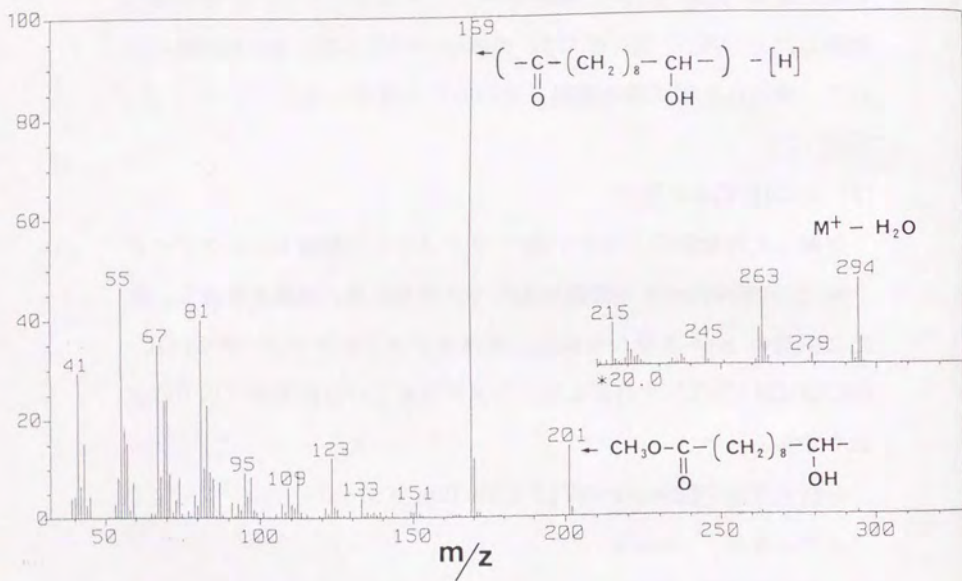


図 2: 10-OHODA のGC-MS

## 2. 結果

最終的に 2.0 g のリノール酸から 218 mg の 10-OHODA が得られた。培養液の n-ペンタン 可溶性酸性部 (抽出物) には多量の未反応のリノール酸が認められたが、カラムクロマトグラフィーにより 5% アセトン/ベンゼンで溶出した画分に目的とする脂肪酸が得られた。また、この分離された脂肪酸を逆相 TLC によって展開したところ、1 つのスポットのみを認めた。この脂肪酸をメチル化後 GC で分析してみると、やはり 1 ピークであることが確認された。

さらに、これを GC-MS に供すると、 $m/z$  294、201 と 169 の特徴的なピークが認められた (図 2)。これらは  $M^+-H_2O$ ,  $CH_3O-CO-(CH_2)_8-CHOH$ , それに base peak (169) は  $m/z$  201-32 から由来していた。以上のような GC-MS の開裂パターンから、この脂肪酸は炭素数 18 個で 10 番目の炭素のところに水酸基が結合している 10-hydroxy-12-octadecenoic acid (10-OHODA) であることが明らかになった。

### 3. 考察

法医学における異常死体现象の一つに死蠟の形成がある。この形成機構に細菌が生成する ハイドロキシ脂肪酸 (hydroxy fatty acid, OHFA) が重要な役割を果たしていることが報告されている [25-29]。この OHFA の一つで リノール酸由来と考えられる 10-OHODA はヒト脂肪中に含まれる リノール酸の含有比に比較して死蠟中に認められることが少ない。これは、微生物が リノール酸を他の化合物に代謝してしまう率が高いためと、リノール酸から ハイドロキシ酸に変換する酵素をもっている微生物が少ないことなどが考えられる [1]。

著者は、この 10-OHODA をリノール酸を基質として乳酸菌を用いて生合成した。同じくリノール酸由来でその作用が注目されている LTx との生理活性の比較検討の実験や、抗10-OHODA 抗体の作製には、かなり大量の 10-OHODA を必要とし、乳酸菌を用いた本法は大量の 10-OHODA を得るのに有用であると考えられる。

### Ⅲ 【抗10-OHODA単クローン抗体の作製】

#### 1. 材料および方法

##### 1) 免疫抗原ならびに固相化抗原の作製

前項で生合成した 10-OHODA のカルボキシル基と坦体タンパク質である牛血清アルブミン (bovine serum albumin, BSA) およびキーホール リンペット ヘモシアニン (keyhole limpet hemocyanin, KLH) のアミノ基とを混合酸無水物法により結合させてそれぞれ免疫抗原および ELISA (後述) 用の固相化抗原とした [31、32]。すなわち、10-OHODA 18 mg を無水ジオキサン 1 ml に溶かし、トリ-N-ブチルアミンを 20  $\mu$ l 加え、攪拌しながらさらに イソブチルクロロカーボネイトを 11  $\mu$ l 加え、溶液を約 10°C に冷却しながら 30-40 分間反応させた。次に、坦体タンパク質 50 mg を蒸留水 3.5 ml に溶かしたものに ジオキサン 1.4 ml を加え、これを攪拌しながら 4°C に保った溶液中に上記の反応溶液を滴下した。滴下反応中、1 N NaOH で pH 7.5-8.5 に保ち、反応後室温でさらに 4 時間攪拌した。反応終了後、溶液を流水中で 24 時間透析を行った。なお、ハプテンである 10-OHODA と坦体タンパク質との結合率を測定するために、予め反応系に [<sup>14</sup>C] リノール酸 (1.5 KBq, specific activity 1.0 Ci/mmol) を加えておいた。得られた 10-OHODA 結合性坦体タンパク質の放射活性から計算して、BSA (M.W. 6,800)

1 モル当たりハプテンの 10-OHODA が約 27 モル、KLH (average M.W. 5,250,000) 1 モル当たり約 1540 モルがそれぞれ結合していることがわかった。

## 2) 感作

免疫抗原を 1 mgタンパク質/ml となるように生食水に溶解し、等量のプロイント完全アジュバント (Difco, USA) を加え、ミセル化した後、2匹の BALB/c マウス (6週令, 雌性) に 250  $\mu$ l (250  $\mu$ g タンパク質) ずつ腹腔内投与した。さらに、免疫抗原を生食水に溶解したものを 1ヵ月ごとに250  $\mu$ l (250  $\mu$ g タンパク質) ずつ腹腔内に投与して、追加免疫を 6ヵ月間行った。最終免疫から 3日後に無菌状態で脾臓を摘出し、細胞融合(後述)を行った。

## 3) 細胞融合 [33]

マウスミエローマ細胞 P3U1 細胞浮遊液と脾臓細胞遊液を細胞数比で 5:1 の割合で混合し、PEG 1500 (Boehringer Mannheim, FRG) を用いて細胞融合を行った。その後、1ウエル当たり脾臓細胞数が  $1 \times 10^5$  個となるように、ペニシリン、ストレプトマイシン、10% FCS (fetal calf serum) 含有 IMDM (Gibco, USA)、に浮遊させ、マイクロプレート (Becton Dickinson, USA) にまき、37°C、95% air 5% CO<sub>2</sub>下でインキュベートした。

## 4) ハイブリドーマの選択培養 [33]

24 時間後に等量の HAT 培地を添加し、37°C、5% CO<sub>2</sub> 下で 14 日間インキュベートした。倒立顕微鏡 (Olympus CK2) で細胞増殖をチェックした後、培養上清を採取し、抗体価を ELISA (後述) により測定し、吸光度が 1.0 以上のものを陽性とした。さらに、抗体産生ウエルの上清に 1  $\mu$ g の 10-OHODA を添加して ELISA を行い、inhibition が確認されたものを選択し、限界希釈法による cloning を 2 回行い、クローンを確立した。また、得られた抗体のサブタイプは Ouchterlony 法によって判定した (The Binding Site, UK)。

#### 5) ELISA [34-36]

- (1) コーティング: 10-OHODA-KLH を 1  $\mu$ g/100  $\mu$ l となるよう 10 mM carbonate buffer (pH 9.6) で希釈した後、100  $\mu$ l ずつ ELISA 用マイクロプレート (Nunc, Denmark) に分注し、4°C で一晩放置した。
- (2) ブロッキング: 抗原液を除去後、10 mM PBS (pH 7.4) で 3 回洗浄し、ウエルをブロッキング液 (1% gelatin PBS, PBSG) で満たし、37°C で 1 時間放置した。
- (3) 一次抗体反応: ブロッキング液を除去し、抗 10-OHODA 単クローン抗体と 10-OHODA あるいは交差反応用のサンプルの混合液を 100  $\mu$ l ずつ添加し、37°C で 2 時間インキュベートした。その後、一次抗体を除去、0.1% PBSG で 3 回洗浄した。
- (4) 二次抗体反応: ビオチン標識ウサギ抗マウス IgG 抗体 (Vector



Lab. USA) の希釈液(6  $\mu$ g を 1 ml の 0.1% PBSG に溶解) を 100  $\mu$ l ずつ添加し、37°C で 1 時間インキュベートした。その後、二次抗体を除去、10 mM トリス塩酸緩衝食水 (Tris-HCl buffered-saline, TBS, pH 7.4) で 3 回洗浄した。

(5) avidin-biotin 複合体 (ABC) 溶液 : 100  $\mu$ l の ABC 溶液 [ABC Kit, (Vector Lab.) から A, B 液それぞれ 5  $\mu$ l ずつを 1ml の TBS に溶解] を添加し、37°C で 30 分間インキュベートした。その後、ABC 溶液を除去、TBS で 3 回洗浄した。

(6) 発色反応 : 基質液 [phenylphosphoric acid disodium salt 100 mg と 4-aminoantipyrine 116 mg を 50 mM carbonate buffer(pH 10.0) 105ml に溶解したもの] を 100  $\mu$ l ずつ添加し、37°C で 30 分間インキュベート後、1.2% potassium ferricyanide 溶液 100  $\mu$ l を加え、発色させた。

(7) 吸光度測定 : microplate reader (Dynatech MR 5000, FRG) で吸光度 (波長 550 nm) を測定した。

#### 6) 抗 10-OHODA 単クローン抗体の力価の検定

上記 ELISA 反応系で、抗 10-OHODA 単クローン抗体を 0.1% PBSG で段階的に希釈し、その力価を検討したところ、320 倍の希釈培養上清で吸光度約 1.0 が得られた。したがって、以後の ELISA には 320 倍に希釈した培養上清を抗 10-OHODA 抗体として使用した。

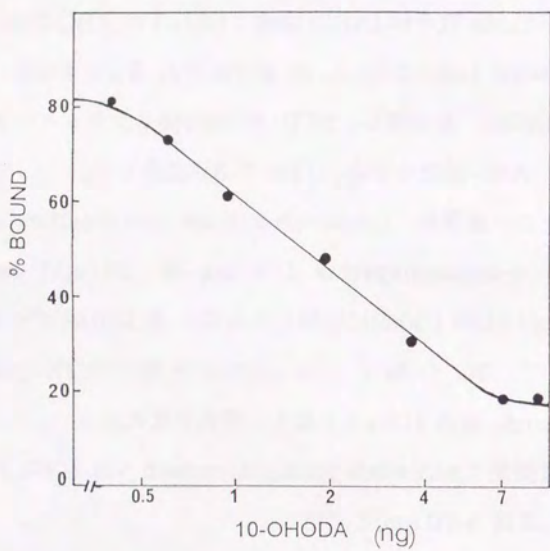


図 3: 固相化抗原に 10-OHODA-KLH を用いた ELISA 系の標準  
曲線

#### 7) 10-OHODA の標準曲線

PBS で希釈した 10-OHODA を 0.5 ng から 8 ng まで段階的に調整した溶液をマイクロプレートの各ウェルに加えて、ELISA を行い、測定標準曲線を作製した。

#### 8) 抗 10-OHODA 単クローン抗体交差反応性

前記の ELISA 反応系で 抗 10-OHODA 単クローン抗体に対する 10-OHODA 構造類似化合物との交差反応性は、抗 10-OHODA 単クローン抗体と 10-OHODA 抗原との結合を 50 % 抑制する量から次式により計算した。なお、本交差反応に用いた 10-hydroxy stearic acid, LTx, 12, 13-epoxy-9(Z)-octadecenoic acid (LTx') および 9, 10-epoxy-stearic acid は当教室で有機合成したものをを用い [25, 30, 57]、その他の脂肪酸は市販のものをを用いた。

$$\text{Cross-reactivity(\%)} = B/A \times 100$$

A : 抗 10-OHODA 単クローン抗体と 10-OHODA-KLH 抗原との結合を 50% 抑制する構造類似化合物の量

B : 同結合を 50% 抑制する 10-OHODA の量

表 1: 10-OHODA およびその類似化合物に対する抗10-OHODA  
単クローン抗体の交差反応性

Analogs	Structure	Crossreactivity(%)
10-Hydroxy- C <sub>18:1</sub>	$\begin{array}{c} -\text{CH}=\text{CH}- \\   \\ -\text{CH}-\text{CH}_2- \\   \\ \text{OH} \end{array}$	100
10-Hydroxy- C <sub>18:0</sub>	$\begin{array}{c} -\text{CH}_2-\text{CH}_2- \\   \\ -\text{CH}-\text{CH}_2- \\   \\ \text{OH} \end{array}$	10.7
LTX	$\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_4-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-\underset{\text{O}}{\underset{\diagup \quad \diagdown}{\text{C}}}-\text{CH}-(\text{CH}_2)_7-\text{COOH}$	0.06
LTX'	$\begin{array}{c} -\text{CH}-\text{CH}- \\   \quad   \\ \text{O} \end{array} \quad -\text{CH}=\text{CH}-$	0.04
9:10-Epoxy- C <sub>18:0</sub>	$-\text{CH}_2-\text{CH}_2- \quad \begin{array}{c} -\text{CH}-\text{CH}- \\   \quad   \\ \text{O} \end{array}$	0.04
Linoleic acid	$-\text{CH}=\text{CH}- \quad -\text{CH}=\text{CH}-$	0.04
Oleic acid	$-\text{CH}_2-\text{CH}_2- \quad -\text{CH}=\text{CH}-$	0.03

## 2. 結果

### 1) 10-OHODA の標準曲線

抗 10-OHODA 単クローン抗体として培養上清を用いた ELISA では、320 倍希釈で使用可能であった。この ELISA 系に 10-OHODA を段階的に調整した溶液を加えていくと、図 2 に示したように 0.7 ng から 7 ng の間で、片対数グラフ上で直線性を示し、定量可能であった。また、少なくとも 0.5 ng の 10-OHODA が測定可能であり、その 50% inhibition は 1.8 ng であった。また、10-OHODA の濃度を 1 ng/ウエルに調整し、n=10 のときの本 ELISA 系における日内変動係数 7.4% であり、その日差変動係数は 9.7% であった。なお、本抗体のサブタイプは IgG<sub>2a</sub> であった。

### 2) 抗 10-OHODA 単クローン抗体の交差反応性

10-OHODA-BSA を免疫抗原として産生された単クローン抗体の特異性を調べるため、10-OHODA と構造が類似する 6 種類の脂肪酸との交差反応性を検討した。表 1 に示したように、本抗体は 10-OHODA の結合率を 100% とすると、10-hydroxy-stearic acid とは 10.7% とやや高い交差反応性を示したが、LTx とは 0.06% と低い反応性しか示さなく、その他の脂肪酸とはほとんど交差反応性を示さなかった。

### 3. 考察

免疫化学の分野にハプテンの概念が導入されて以来、免疫原性をもつ適当な担体タンパク質とハプテンとを結合させて免疫抗原を調製し、これを実験動物に免疫することにより、免疫原性をもたない様々な物質に対する抗体が作製されてきた。例えば、Erlanger ら [31, 32] によってステロイドホルモンとタンパク質との結合法が紹介されてから、様々な薬物をハプテンとしたイムノアッセイが開発された [34-37]。

担体タンパク質としては、ハプテン-血清アルブミン結合体の溶解度が高いという理由から、ウシやヒトの血清アルブミン (BSA、HSA) がよく用いられている。

今回用いた免疫抗原は、10-OHODA のカルボキシル基と BSA のアミノ基とを Erlanger ら [31] の混合無水法により縮合し、BSA 1 モル当たり約 27 モルのハプテンの結合した抗原を作製できた。一般に担体タンパク質中に含まれるハプテンのモル比と作製された抗原の可溶性が、それによって産生される抗体の力価に影響を与えると考えられるが、今回の免疫原では約 27 モル結合しており充分量と考えられた。

一方、免疫して得られた抗体をイムノアッセイに用いようとするとき、交差反応性の少ない特異性が要求される。今回作製した抗 10-OHODA 単クローン抗体は、表 1 に示したように 10-OHODA

に対してきわめて特異性が高い抗体であり、本抗体を用いた ELISA では少なくとも 0.5 ng の 10-OHODA まで定量可能であった。本抗体の交差反応性を検討してみると、10-OHODA に対するそれを 100% とすると、10-hydroxy-stearic acid に対しては 10.7% とやや高い値が得られたが、これは本抗体が 10-hydroxy 部位を強く認識しているばかりでなく、炭素数 12,13-位の二重結合部位をもかなり強く識別していることを示唆している。一方、9,10-epoxy-12(z)-octadecenoic acid (LTx) に対しては、0.06% という低い反応性しかなかったことから、炭素数 10-位の hydroxy 基が本抗体のエピトープとしてきわめて重要な位置を占めているものと考えられる。

なお、放射性同位元素標識 10-OHODA が入手できなかったことから、10-OHODA の担体タンパク質に対する結合度を知るため、代わりに、 $[^{14}\text{C}]$  linoleic acid を使用した。担体タンパク質に結合した 10-OHODA に対して同様に担体タンパク質に結合した  $[^{14}\text{C}]$  linoleic acid はきわめて微量であったため、本抗体の特性にはまったく影響を与えなかった。

#### IV 【培養マクロファージ産生 10-OHODA の ELISA による検出】

##### 1. 材料および方法

###### 1) マクロファージの培養 [38]

急性単球性白血病患者の末梢血から樹立されたヒト急性単球性白血球細胞株 THP-1 [39] を PMA (Phorbol 12-Myristate 13-Acetate, Sigma, USA) 添加下に 95% air、5% CO<sub>2</sub> の気相下で 24 時間培養しマクロファージに分化させた。培養培地は RPMI 1640 培地 (Roswell Park Memorial Institute Tissue Culture Medium 1640) に 10% FCS、カナマイシン(60 μg/ml) を添加したものをを用いた。PMA を DMSO に溶解し 1.6 μM 溶液を作製し、適宜希釈して用いた。

###### 2) マクロファージ機能測定法

###### (1) NBT 法 (細胞化学的染色) による活性酸素の測定 [40]

- ① 0.1 ml 0.1% (w/v) NBT (nitroblue tetrazolium, WAKO, Japan) 含 HEPES-saline-グルコース緩衝液、0.08 ml 細胞浮遊液 そして、0.02ml PBS 混液を 37°C、30-60 分間反応させた。
- ② スライドガラス上にあらかじめマークした約 1.5cm の円内に 1 滴移し、湿潤箱内で 15-30 分間インキュベートした。
- ③ 1% (w/v) パラホルムアルデヒド と 0.02% (w/v) グルタルアル



デヒド含有 PBS (pH 7.4) 固定液中で 30 分インキュベートした。

#### ④ 鏡検

#### (2) マクロファージ貪食能の測定 [41]

- ① 大腸菌 (*Escherichia coli* B, Invitrogen, USA) をトリプチケース  
ソイ培地で 37°C で 2 日間振とう培養した後、遠心して集菌し、  
0.01 M PBS (pH 7.4) で 4 回、さらに蒸留水で 1 回洗浄した。  
最終的に 20 mg の湿重量の菌体が得られた。
- ② 20 mg の大腸菌を 4°C で 0.9% NaCl を含む 0.1 M 重炭酸ナト  
リウム緩衝液 (pH 9.0) 5 ml に浮遊させ、1 mg の fluorescein  
isothiocyanate (FITC, Dojindo, Japan) と 4°C で 30 分間反応さ  
せた。標識細胞を冷 PBS で十分に洗浄した後に蒸留水で洗浄し、  
凍結乾燥させ、使用するまで遮光して -20°C で保存した。
- ③ THP-1 を 24 穴培養プレートに 1 ウェルあたり  $7 \times 10^5$  cells と  
なるようにまき、各濃度 (1.6 nM-1.6  $\mu$ M) の PMA を添加して  
24 時間培養した。
- ④ 蛍光標識された大腸菌を 1  $\mu$ g/ml となるように Krebs-Ringer  
Phosphate buffer (pH 7.4) に浮遊させ、100  $\mu$ l (100 ng) を各  
ウェルに加え、37°C で 2 時間培養細胞に貪食させた。冷 PBS  
で 3 回洗浄した後、各ウェルに 0.2% SDS 含有 25 mM Tris-  
HCl 緩衝液 (pH 8.5) 1ml を加え、37°C で 30 分間インキュベー  
トした。付着細胞が完全に溶解したことを倒立顕微鏡下で確認し  
た後に分光蛍光度計 (Shimadzu RF-540; 励起波長 490 nm, 蛍光

波長 520 nm) で蛍光強度を測定した。また、別に作製した標準曲線より培養細胞が貪食した菌体量を測定した。

### 3) 培養マクロファージにおける 10-OHODA 産生の確認

THP-1 を 2 本の 100 ml カルチャーボトルを用いて低速で攪拌しながら THP-1 を大量に培養した。最終濃度が 160 nM となるように PMA を添加して 24 時間通常気相 (95% air、5% CO<sub>2</sub>) で培養させた後に、1 本は 95% O<sub>2</sub>、5% CO<sub>2</sub> の気相に置換したビニールバッグ中に入れ、ポリシーラーで密封してさらに 24 時間培養した。もう 1 本は通常気相中でさらに 24 時間培養した。細胞数を測定した後に細胞を集め、それぞれ 5 ml の PBS に浮遊させ終濃度 2 mM となるように CaCl<sub>2</sub> を加え、PLA<sub>2</sub>(Phospholipase A<sub>2</sub>, Sigma, USA) 100 単位を添加して 37°C で 2 時間反応させた。少量の 2.5% リン酸溶液で pH を 2-3 に調整し ジエチルエーテル で 2 回抽出し、窒素気流下で溶媒を留去して脂肪酸抽出物を得た。各々の脂肪酸抽出物を試料として、抗 LTx 単クローン抗体 [42] と抗 10-OHODA 単クローン抗体を用いた ELISA を行い、LTx および 10-OHODA 量を測定した。

#### 4. 結果

##### 1) マクロファージ機能測定

THP-1 より分化させたマクロファージの活性酸素産生能は、NBT 法で測定した。PMA 濃度 1.6 nM, 16 nM, 160 nM, 1.6  $\mu$ M で 24 時間培養した細胞群の各々の値はそれぞれ  $61.9 \pm 8.3\%$ 、 $70.2 \pm 2.3\%$ 、 $70.2 \pm 0.4\%$ 、 $68.0 \pm 1.6\%$  (mean  $\pm$  S.D.) であった。また PMA 未添加で培養した THP-1 での値は  $13.2 \pm 2.8\%$  であった。蛍光標識大腸菌を用いた貪食能の測定では、THP-1 に添加した PMA の濃度を 1.6 nM, 16 nM, 160 nM, 1.6  $\mu$ M と変化させ、2 分化させたマクロファージ ( $7 \times 10^5$  cells) に貪食された蛍光標識菌体量を測定することにより行った。これらの各々の蛍光強度は 1.6 nM で  $28.3 \pm 5.7$ 、16 nM で  $28.0 \pm 2.0$ 、160 nM で  $30.0 \pm 0.5$ 、1.6  $\mu$ M で  $26.3 \pm 1.1$  であった。この数値を 蛍光標識大腸菌 31.25 ng から 500 ng まで段階的に加え蛍光強度をそれぞれ測定して得られた標準曲線にあてはめ、貪食された菌体量を求めると、1.6 nM, 16 nM, 160 nM, 1.6  $\mu$ M でそれぞれ、 $146 \pm 60$  ng、 $137 \pm 20$  ng、 $155 \pm 25$  ng、 $117 \pm 5.8$  ng であった。以上の結果より、以下の実験は PMA の終濃度は 160 nM で行った。

##### 2) 高酸素暴露下における培養マクロファージの脂肪酸産生

抗 LTx 単クローン抗体と抗 10-OHODA 単クローン抗体を用い

た ELISA を行ったところ、高酸素暴露を行ったマクロファージからは、LTx 17.4 ng/10<sup>6</sup>cells, 10-OHODA 15.8 pg/10<sup>6</sup>cells が検出された。一方、空気中で培養したマクロファージからは、LTx 5.3 ng/10<sup>6</sup>cells, 10-OHODA 4.7 pg/10<sup>6</sup>cells が検出された。

## 5 考察

マクロファージは、異物貪食時や特定の刺激により急速に酸素を消費し、細胞表層でこれを一電子還元してスーパーオキシドアニオン ( $O_2^-$ ) に変換し、さらに、細胞膜に存在する多くの不飽和脂肪酸はこのラジカルと反応し、細胞障害を引き起こす [48]。一方、細胞膜に存在する PLA<sub>2</sub> の活性化により、アラキドン酸カスケードが作動し、さまざまな代謝産物が遊離することが知らされている [49, 50]。また、この代謝過程でも活性酸素が産生される。炎症局所ではこのようにして産生された物質が、結果的に毛細血管の上皮細胞および組織にダメージを与えることになる [43-47]。マクロファージの起源については、骨髄細胞が分化成熟して血中単球になり、さらにそれが各組織に定着成熟を遂げて、種々の組織マクロファージになるという mononuclear phagocyte system (単核食細胞系) が確立されている。今回、急性単球性白血病患者の末梢血から確立されたヒト急性単球性白血病細胞株である THP-1 を用い、分化誘導物質である PMA (Phorbol 12-Myristate 13-Acetate) 存在下で培養しマクロファージに分化させた。動物から得るプライマリーなマクロファージはヘテロな細胞集団からなるのに比べ、培養細胞はクローン化することにより均一な細胞が得られ、大量の細胞が得られやすいなど多くの利点を持っている。しかし、その一方で生体外で自立増殖しており、正常のマクロファージとは機能的に異

なる面を持っている可能性も否定できない。そこで、THP-1 より分化させたマクロファージが、マクロファージとしての機能を十分に有していることを確認するために、代表的なマクロファージの機能である  $O_2^-$  産生能と貪食能の検査を行った。その結果、いずれも十分な機能を有していた。

著者らは以前、ラットを高酸素下で処理することによって、その肺マクロファージに LTx が存在することを免疫組織化学的に明らかにした [51]。しかしながら、LTx に比べ LTx の代謝産物と考えられる 10-OHODA は生体内における存在量が、極めて微量なため、その存在を LTx のように免疫組織化学的に実証することは不可能であった。そこで大量のマクロファージを得るために、培養細胞を用い、これから脂肪酸を抽出し、ELISA によって 10-OHODA の存在を確認した。すなわち、得られたマクロファージを高酸素下あるいは、空气中で培養し、その各々の細胞から脂肪酸を抽出し、各々の脂肪酸抽出物を試料として、抗 LTx 単クローン抗体と抗 10-OHODA 単クローン抗体を用いた ELISA により LTx および 10-OHODA 量を測定したところいずれの値も酸素暴露群で高値を示した。このことから、マクロファージ内に 10-OHODA が存在していることが明らかにされた。

## V 【10-OHODAの生理活性】

### 1. 材料および方法

#### 1) 標本の作製 [52-56]

雌性モルモット (体重 220~340 g) を一週間予備飼育後、実験に供した。頭を強打失神させ、直ちに心臓を摘出し、Krebs-Henseleit 液中で、右心室より乳頭筋を摘出、約 3 mm の標本を作製した。得られた乳頭筋標本を 95% O<sub>2</sub>+5% CO<sub>2</sub> の混合ガスで酸素化し、30°C に温度を維持した液量 20ml の器官槽に懸垂した。用いた栄養液は Krebs-Henseleit 液でその成分は以下のとおりである。  
NaCl: 119 mM 、 KCl: 4.8 mM 、 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>: 1.2 mM 、  
MgSO<sub>4</sub>·6H<sub>2</sub>O: 1.2 mM 、 CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O: 2.5 mM 、 NaHCO<sub>3</sub>: 24.9 mM 、 Glucose: 10.0 mM 。

標本の下端を電気刺激用のための双極電極を兼ねたフックで固定し、上端を絹糸で張カトランスジューサー (日本光電 SB-1T) に結合した。標本には収縮張力が最大になるように約 0.5 g の静止張力を負荷し、矩形波を電気刺激装置およびアイソレーター (日本光電 S-7272B) から与えた。電氣的に駆動している乳頭筋の収縮は、張カトランスジューサーおよび増幅器 (日本光電 RM-5) を介して熱ペン書きレコーダー (日本電気三栄 BK 21) 上に記録した。標本を 0.5 Hz の頻度で刺激しながら約 1時間器官槽内に懸垂放置した後、負荷

を 0.5 g に再調整し、静止張力の安定を確認してから実験を開始した。また、同一の心臓から得られた標本は、薬物感受性が変化する可能性があるので一薬物一濃度のみとし、さらに実験終了後、標本の張力変化が薬物の直接的作用であることを確かめるため、標本を十分洗浄し張力が薬物の投与前に回復することを確認した。

## 2) 脂肪酸

実験に供した脂肪酸は以下の 3 種類であり、各々についてその生理活性を検討した。

9,10-epoxy-12-octadecenoic acid (LTx)

12,13-epoxy-9-octadecenoic acid (LTx')

10-hydroxy-12-octadecenoic acid (10-OHODA)

なお、10-OHODA は前述の生合成したものを、LTx, LTx' はリノール酸 (Sigma, USA) を過酢酸/酢酸溶液によってエポキシ化し、赤羽の方法 [57] を一部改変して合成し、これらを精製したものをを用いた。

## 3) 脂肪酸溶液の調整

20 ml の栄養液を満たした器官槽内の各脂肪酸の濃度が、 $30\ \mu\text{M}$ 、 $100\ \mu\text{M}$  それに  $300\ \mu\text{M}$  溶液となるように各脂肪酸溶液を調製した。また、脂肪酸を可及的に Krebs-Henseleit 液に溶解させるため、モルモット血清と十分に混和 (10% 溶液) した後、超音波ホモジェナイザー (フナコシ A-10F) で 10 分間乳化して基質液とした [57]。



#### 4) 統計学的検討

得られた諸値は、平均値±標準誤差で表し、各値の有意差の検定には二元配置分散分析を用いた。

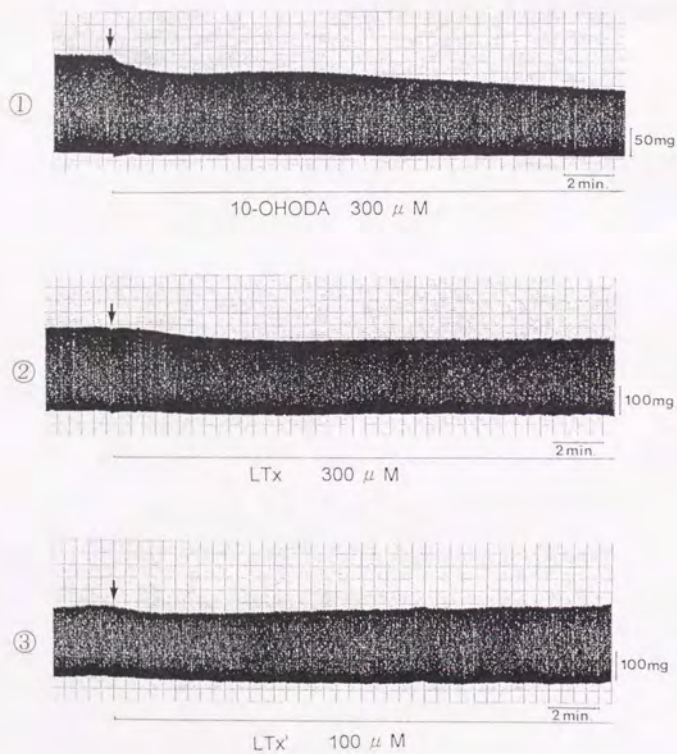


図 4:電気刺激 (0.5 Hz) 応答下モルモット摘出乳頭筋収縮力に対する  
各脂肪酸の効果  
(①:300  $\mu$  M 10-OHODA,②:300  $\mu$  M LTx,③:100  $\mu$  M LTx')

## 2. 結果

3 種類の脂肪酸を  $30\mu\text{M}$ ,  $100\mu\text{M}$ ,  $300\mu\text{M}$  の濃度になるように調整し、それぞれにつき 4 から 8 検体のモルモット摘出心を用いて検討し、投与後 2, 5, 10 分での張力変化を測定した。また、脂肪酸を調整する際に用いたモルモット血清の収縮力に対する直接的な影響を検討するため、最終濃度で 0.1% となるように投与したところ、酸素化するためのガスの影響で泡が発生し、そのため張力変化に多少のノイズが記録されるが、血清の影響と思われる収縮力の変化は認められなかった。右心室乳頭筋標本における 3 種類の脂肪酸の作用を、濃度と作用時間の 2 つの面から検討した。また、収縮力変化の典型例を 3 種類の脂肪酸各々について示した (図 4)。

### 1) 10-OHODA の生理活性

$30\mu\text{M}$  では投与後 2 分で収縮力の減弱を示し、逆に 5 分以降では収縮力の増強を示した。 $100\mu\text{M}$  では投与後 5 分までは減弱を示し、それ以降は増強を示した。 $300\mu\text{M}$  では投与後 10 分まで収縮力の減弱を示し、 $-14.0\pm 12.6\%$  の最大値を示した (図 5-①)。

### 2) LTx の生理活性

すべての濃度、時間で収縮力の減弱を示し、 $300\mu\text{M}$ , 5 分で最大値  $-12.0\pm 9.1\%$  を示した (図 5-②)。

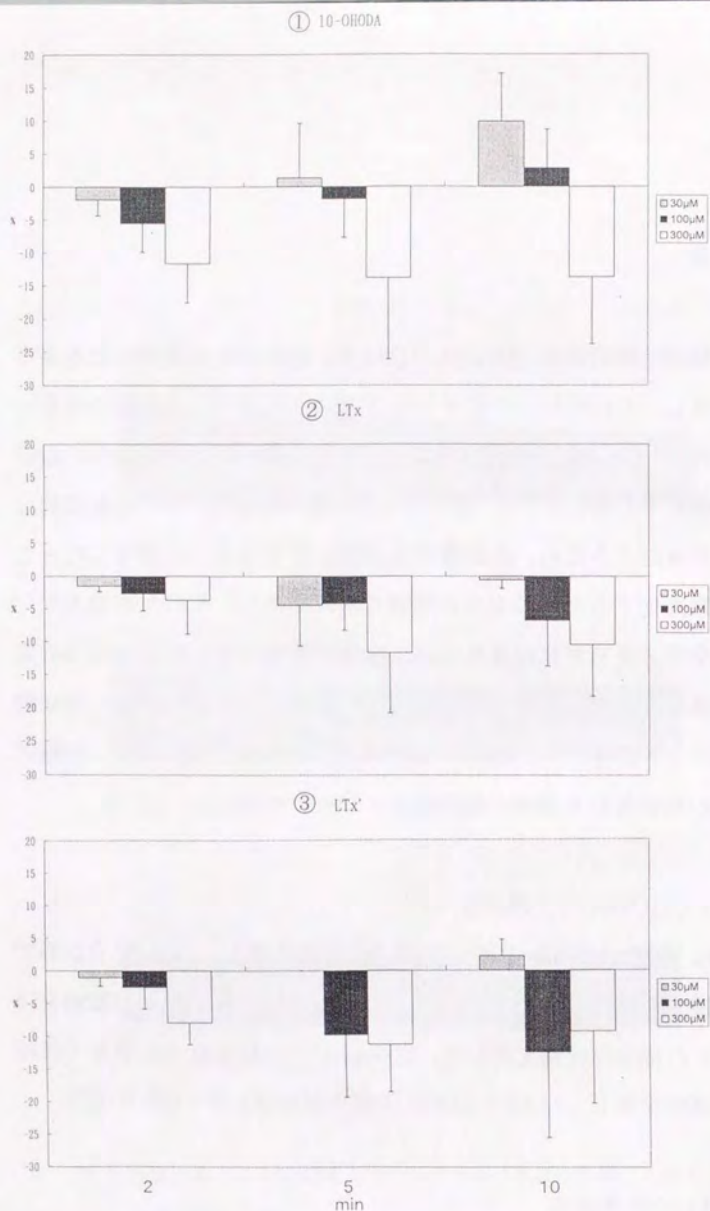


図5:電気刺激応答下モルモット摘出乳頭筋収縮力に対する各脂肪酸の濃度変化の効果 ①:10-OHODA ②: LTx, ③: LTx' の各濃度(30 μM, 100 μM, 300 μM)における投与後2, 5, 10分での影響 各値は平均値±標準誤差(n=4~8)

### 3) LTx' の生理活性

30  $\mu$ M で投与後 5 分以降収縮力の増強を示したが、それ以外の濃度、時間では収縮力の減弱を示し、100  $\mu$ M, 10 分で最大値  $-12.5 \pm 13.0\%$  を示した (図 5-③)。

### 4) 統計学的検討

各脂肪酸投与後 2 分の張力測定値を用いて、二元配置分散分析を行ったところ、摘出乳頭筋にたいする作用において 3 種類の脂肪酸の間に有意差が認められた ( $p < 0.05$ )。また、同様に 3 種類の濃度の間にも有意差が認められた ( $p < 0.01$ )。

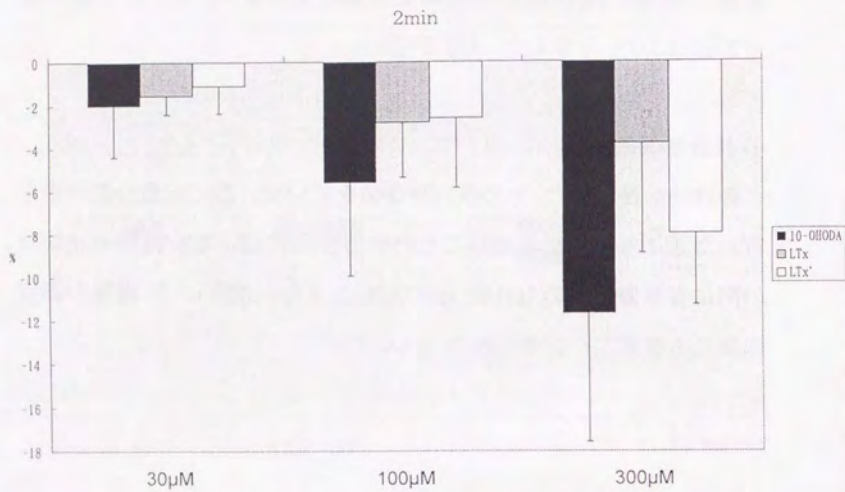


図 6：電気刺激応答下モルモット摘出乳頭筋収縮力に対する投与後 2 分における脂肪酸 (10-OHODA, LTx, LTx') の各濃度 (30 μM, 100 μM, 300 μM) における効果  
各値は平均値±標準誤差 (n=4~8)

### 3. 考察

LTx は成人呼吸促迫症候群の肺胞洗浄液や熱傷皮膚組織からも検出されており、多核白血球が関連している疾患、例えば、心筋梗塞、炎症性疾患や外傷等の病態生理的変化と密接な関わりをもっていることが示唆されている [17,21]。LTx の生理活性については、小澤らのグループが経静脈的にイヌに注入し、心不全 [24] および播種性血管内凝固症候群様 [23] の病態が惹起されることを確認している。赤羽は LTx をモルモットに注入し、動脈圧と心拍数を測定したところ、双方とも激しく変動し、全身に痙攣が発現し、やがて心臓の拍動は停止したと報告している [57]。また、Siegfried らはネコの摘出心臓乳頭筋と摘出頸動脈血管を灌流して、LTx と LTx' を灌流液中に添加して、容量依存性の乳頭筋張力の低下と血管の収縮増強による血管抵抗の上昇を確認している [58]。

10-OHODA の生理活性について報告された例はなく、著者はこれを解明するため、モルモットの摘出心を用いて乳頭筋張力におよぼす作用を検討した。その結果、投与直後(2分)、 $30\mu\text{M}$ 、 $100\mu\text{M}$ 、 $300\mu\text{M}$  のいずれの濃度においても張力の減弱が認められた(図6)。しかし、投与してからの時間が経過するにつれ、すなわち  $30\mu\text{M}$  では5分、 $100\mu\text{M}$  では10分後には逆に張力の増強がみられた。これは、器官槽内を酸素化するための  $95\%\text{O}_2 + 5\%\text{CO}_2$  ガス中の酸素の影響で 10-OHODA の構造になんらかの変

化が生じたためと推測される。事実、低濃度のものほどその変化は早く、逆に 300  $\mu$ M の濃度では 30 分経過しても張力の減弱が認められた。したがって、10-OHODA の真の作用は投与直後の張力変化で判断すべきと考えられる。

リノール酸から代謝されると考えられている LT<sub>x</sub>、LT<sub>x'</sub> との比較では、LT<sub>x</sub> はいずれの濃度と経過時間でも乳頭筋の収縮を減弱させたが (図 4-①)、LT<sub>x'</sub> では 30  $\mu$ M 投与 10 分以降は逆に収縮力を増強させた (図 4-②)。しかし、摘出乳頭筋の収縮力の減弱の程度は、10-OHODA のそれに比較して LT<sub>x</sub>、LT<sub>x'</sub> ではいずれも弱い値を示した。また、10-OHODA 投与後 2 分の時点での摘出乳頭筋収縮力に対する減弱作用は、LT<sub>x</sub>、LT<sub>x'</sub> のそれに対して明らかな有意差を認めた。同様に、10-OHODA の濃度差 (30  $\mu$ M、100  $\mu$ M、300  $\mu$ M) による作用にも有意差を認め、その作用は濃度依存性であった。

従来、多核白血球中にわずかの 10-OHODA が存在していることが報告されている [4] が、今回 著者は、THP-1 から分化させたマクロファージの中にも、きわめてわずかではあるが 10-OHODA が産生されていることを明らかにした。しかし、その産生代謝経路は明らかでない。これまで、LT<sub>x</sub>、LT<sub>x'</sub> の摘出心臓乳頭筋に対する張力低下が示されてきたが、10-OHODA の効果は、LT<sub>x</sub>、LT<sub>x'</sub> のそれらよりも強いことから考えると、10-OHODA は LT<sub>x</sub> と連動して循環系になんらかの影響を与えている可能性がある。



## VI【謝辞】

稿を終えるに臨み、本研究の機会を与えてくださり、終始ご懇篤なるご指導ならびにご校閲を賜った本学 医学部 法医学教室、高取健彦教授に対し深く謝意を表します。

また、本研究を進めるにあたり、ご援助ならびにご教示を賜った本学 法医学教室、長尾正崇講師に対し厚く感謝いたします。

さらに、実験計画から終始望外のご助言、ご配慮を頂いた千葉大学 医学部 薬理学教室、中谷晴昭教授に厚く感謝いたします。

最後に、常に温かい雰囲気でご支援頂いた法医学教室の皆様に心からお礼を申し上げます。

VII 【文献】

1. Takatori, T., Terazawa, K., Nakano, K., and Matsumiya, H. : Identification of 10-hydroxy-12-octadecenoic acid in adipocera. *Forensic Sci Int*, 23, 117-122, 1983.
2. Takatori, T. : Relationship between Postmortem Change and Biological Reaction. *Jpn J Legal Med*, 47, 435-444, 1993. (in Japanese)
3. Ozawa, T., Hayakawa, M., Takamura, T., Sugiyama, S., Suzuki, K., Iwata, M., Taki, F., and Tomita, T. : Biosynthesis of leukotoxin, 9:10-epoxy-12-octadecenoate, by leukocytes in lung lavages of rat after exposure to hyperoxia. *Biochem Biophys Res Commun*. 134, 1071-1078, 1986.
4. Hayakawa, M., Sugiyama, S., Takamura, T., Yokoo, K., Iwata, M., Suzuki, K., Taki, F., Takahashi, S., and Ozawa, T. : Neutrophils biosynthesis leukotoxin, 9:10-epoxy-12-octadecenoate. *Biochem Biophys Res Commun*, 137, 424-430, 1986
5. Sytnyk, I.O. : The leukotoxin of clostridium botulinum. *Mikro Zh*. 31, 633-637. 1969.
6. Fales, W.H., Warner, J.F., and Teresa, G.W. : Effects of fusobacterium necrophorum leukotoxin on rabbit peritoneal macrophages in vitro. *Am J Vet Res*, 38, 491-495, 1977.

7. Tsai,C.C., McArthur,W.P., Baehni,P.C., Hammond,B.F., and Taich-man,N.S. : Extraction and partial characterization of leukotoxin from a plaque derived gram-negative microorganism. *Infect Immun* , 25, 427-439, 1979.
8. Morris,L.J., Holman,R.T., and Fontell,K. : Vicinally unsaturated hydroxy acids in seed oils. *J Am Oil Chem Soc*, 37, 323-327, 1960.
9. Morris,L.J., Holman,R.T., and Fontell,K. : Naturally occurring epoxy acids: I detection and evaluation of epoxy fatty acids by paper, thin-layer, and gas-liquid chromatography. *J Lipid Res*, 2, 68-76, 1961.
10. Morris,L.J., and Holman, R.T. : Naturally occurring epoxy acids: II. detection and measurement of long-chain epoxy acids by near infrared spectrophotometry. *J Lipid Res*, 2, 77-82, 1961.
11. Barford,R.A., Herb,S.F., Luddy,F.E., Magidman,P, and Riemen-schneider,R.W. : Alcoholysis of *Vernonia anthelmintica* a seed oil and isolation of methyl epoxyoleate. *J Am Oil Chem Soc*, 1963, 40, 136-138,1963.
12. Krewson,C.F., and Scott,W.E. : *Vernonia anthelmintica* (L.) willd. extraction of oil or trivernolin from the seed. *J Am Oil Chem Soc*, 41, 422-426, 1964.
13. Ozawa,T., Sugiyama,S., Hayakawa,M., Taki,F., and Hanaki,Y. :

- Neutrophil microsomes biosynthesize linoleat epoxide (9:10-epoxy-12-octadecenoate), a biological active substance. *Biochem Biophys Res Commun*, 152, 1310-1318, 1988.
14. Kato, T., Yamaguchi, Y., and Uyehara, T. : Defense mechanism of the rice plant against rice blast disease. *Naturwissenschaften*, 70, 200-201, 1983.
15. Kato, T., Yamaguchi, Y., Hirano, T., Yokoyama, T., Uyehara, T., Namai, T., Yamanaka, S., and Harada, N. : Unsaturated hydroxy fatty acids, the self defensive substances in rice plant against rice blast disease. *Chem Lett* 1984, 409-412, 1984.
16. Kato, T., Yamaguchi, Y., Uyehara, T., Yokoyama, T., Namai, T., and Yamanaka, S. : Self defensive substance in rice plant against rice blast disease. *Tetrahedron Let* , 24, 4715-4718, 1983.
17. Ozawa, T., Sugiyama, S., Hayakawa, M., Satake, T., Taki, F., Iwata, M., and Taki, M. : Existence of leukotoxin 9:10-epoxy-12-octadecenoate in lung lavages from rats breathing pure oxygen and from patients with the adult respiratory distress syndrome. *Am Rev Respir Dis* 1988, 137, 535-540, 1988.
18. Ozawa, T., Sugiyama, S., Hayakawa, M., and Taki, F. : ARDS and leukotoxin, *Nippon-Kyobu-Shikkan-Gakkai-Zasshi*, 29, 159-164(in Japanese), 1991.
19. Ozawa, T., and Sugiyama, S. : Linoleic cascade and radical

- peroxidation reaction. Nippon-Rinsho. 46, 2161-2166(in Japanese),1988.
- 20.Hayakawa,M., Kosaka,K., Sugiyama,S., Yokoo,K., Aoyama,H., Izawa,Y., and Ozawa, T. : Proposal of leukotoxin, 9:10-epoxy-12-octadecenoate, as a burn toxin. Biochem Int., 21, 573-579.1990.
- 21.Yokoo,K., Hayakawa,M., Sugiyama,S., Ozawa,T., Aoyama,H., Izawa,Y., Kondo,T., and Hayakawa,Y. : A novel uncouple of mitochondrial respiration, 9:10-epoxy-12-octadecenoate, exists in human burned skin, J Clin Biochem Nutr, 1, 121-127,1986
- 22.Ozawa,T., Nishikami,M., Sugiyama,S., Taki,F., Hayakawa,M., and Shinoya,H. : Cytotoxic activity of leukotoxin, a neutrophil-derived fatty acid epoxide, on cultured human cells, Biochem Int, 16, 369-373, 1988.
- 23.Sugiyama,S., Hayakawa,M., Hanaki,Y., Hieda,N., Asai,J., and Ozawa, T. : The role of leukotoxin (9:10-epoxy-12-octadecenoate) in the genesis of coagulation abnormalities. Life Sci. 43: 221-227, 1988.
- 24.Fukushima,A., Hayakawa,M., Sugiyama,S., Ajioka,M., Ito,T., Satake,T., and Ozawa,T. : Cardiovascular effects of leukotoxin (9:10-epoxy-12- octadecenoate) and free fatty acids in dogs. Cardiovasc Res , 22, 213-218,1988
- 25.Takatori,T., and Yamaoka,A. : The mechanism of adipocere

- formation. I. Identification and chemical properties of hydroxy fatty acids in adipocere. *Forensic Sci*, 9, 63-73, 1977.
26. Takatori, T., and Yamaoka, A. : The mechanism of adipocere formation. II. *Forensic Sci Int*, 10, 117-125, 1977.
27. Takatori, T., Ishiguro, N., Tarao, H. and Matsumiya, H. : Microbial production of hydroxy and oxo fatty acids by several microorganisms as a model of adipocere formation. *Forensic Sci Int*, 32, 5-11, 1988.
28. Gotouda, H., Takatori, T., Terazawa, K., Nagao, M., and Tarao, H. : Hydration and dehydrogenation in microbial synthesis of hydroxy and oxo fatty acids. *Forensic Sci Int*, 37, 249-257, 1988.
29. Takatori, T., Gotouda, H., Terazawa, K., Mizukami, K. and Nagao, M. : The mechanism of experimental adipocere formation: Substrate specificity on microbial production of hydroxy and-oxo fatty acid. *Forensic Sci Int*, 35, 277-281, 1987.
30. Akabane, H., Takatori, T., Terazawa, K., and Nagao, M. : Leukotoxin synthesis and its effects on blood pressure of guinea pigs. *Jpn J Clin Chem*, 20 203-209, 1991.
31. Erlanger, B.F., Borek, F., Beiser, S.M., and Liebman, S. : Steroid-protein conjugates: I. Preparation and characterization of conjugates of bovine serum albumin with testosterone and

- with cortisone. *J Biol Chem*, 228, 713-727, 1957.
32. Erlanger, B.F. : Principles and methods for the preparation of drug protein conjugates for immunological studies. *Pharmacol Rev*, 25, 271-280, 1973.
33. Mitsuoka, T. : Nyuusankin no Saikingaku. *Rinshou-Kensa*, 18, 1163-1172, 1974.
34. Takatori, T., Tsutsubuchi, Y., and Kanamori, M. : An ELISA using avidin-biotin complex for the determination of phenobarbital. *Jap J Clin Chem*, 14, 180-184, 1985.
35. Takatori, T., and Tsutsubuchi, Y. : An ELISA using avidin-biotin complex for the determination of ABH group from saliva. *Forensic Sci Int*, 31, 61-68, 1986.
36. Nagao, M. : Production and Toxicological Application of Anti-paraquat Antibodies. *Jpn J Legal Med*, 43, 134-147, 1989.
37. Akabane, H., Nagao, M., Zhang, W-D., Yamada, Y., Oono, T., and Takatori, T. : Production and characterization of antibodies reactive with leukotoxin. *Jpn J Legal Med*, 47, 93-97, 1993.
38. Tsuchiya, S., Kobayashi, Y., Goto, Y., Okumura, H., Nakae, S., Konno, T., and Tada, K. : Induction of Maturation in Cultured Human Monocytic Leukemia Cells by a Phorbol Diester. *Cancer Research*, 42, 1530-1536, 1982.
39. Tsuchiya, S., Yamabe, M., Yamaguchi, Y., Kobayashi, Y., Konno, T., and Tada, K. : Establishment and characterization of

- a human acute monocytic leukemia cell line (THP-1). *Int. J. Cancer*, 26, 171-176, 1980.
40. Tokunaga, T., Yoshida, T., and Akagawa, K. : *Macrophage Jikken Manual*, Koudan-shya, 1992. (in Japanese)
41. Oda, T., and Maeda, H. : A new simple fluorometric assay for phagocytosis. *J Immunol Methods*, 88, 175-183, 1986.
42. Nagao, M., Zhang, W-D., Yamada, Y., Takatori, T., Iwase, H., Iwade, K., and Oono, T. : Production of monoclonal antibody reactive with leukotoxin and its immunohistochemical application. *Forensic Sci Int*, (in press)
43. Freeman, B.A., and Crapo, J.D. : Biology of disease: Free radicals and tissue injury. *Lab Invest*, 47, 412-426, 1982.
44. Fridovich, I. : The biology of oxygen radicals. *Science*, 201, 875-880, 1978.
45. Fridovich, I. : Chemical aspects of superoxide radical and of superoxide dismutases. In *Biochemical and Medical Aspects of Active Oxygen*. University Park Press, Baltimore, pp 3-9, 1977.
46. Halliwell, B. : Oxygen-free radicals in living systems: Dangerous but useful? In *Strategies of Microbial Life in Extreme Environments*. Dahlem Konferenzen, Berlin, pp 159-221, 1979.
47. Halliwell, B. : Superoxide and superoxide-dependent formation of



- hydroxyl radical are important in oxygen toxicity. Trends in Biochem Sci, 7, 270, 1982.
48. Cross, CE., Halliwell, B., Borish, ET., Pryor, WA., Ames, BN., Saul, RL., McCord, JM., and Harman, D. : Oxygen radicals and human disease. Ann Int Med, 107, 526-545, 1987.
49. Kitamura, S. : Arachidonic acid cascade metabolism I various lung diseases. Metab Dis, 27, 811-819, 1990. (in Japanese)
50. M'Rini, C., Pipy, B., Rami, J., and Besombes, J-P. : Arachidonic acid metabolism in alveolar macrophages from actively sensitized guinea-pigs: effects of sensitization and specific allergen. Biochim Biophys Acta, 1213, 46-56, 1994.
51. Zhang, W-D., Nagao, M., Takatori, T., Iwadate, K., Itakura, Y., Yamada, Y., Iwase, H., and Oono, T. : Immunohistochemical dynamics of leukotoxin (9:10-epoxy-12-octadecenoic acid) in lungs of rats. Int J Leg Med, (in press)
52. Nakaya, H., Tohse, N., and Kanno, M. : Electrophysiological derangements induced by lipid peroxidation in cardiac tissue. Am J Physiol, 253, H1089-H1097, 1987.
53. Nakaya, H., Kimura, S., and Kanno, M. : Suppression of Lysophatidyl-choline-Induced Abnormal Automaticity by Verapamil in Canine Purkinje Fibers. Jpn J Pharmacol, 36, 371-378, 1984.
54. Nakaya, H., and Tohse, N. : Electrophysiological effects of acetyl

glyceryl ether phosphorylcholine and long chain acyl carnitine.

Br J Pharmac, 89, 749-757, 1986.

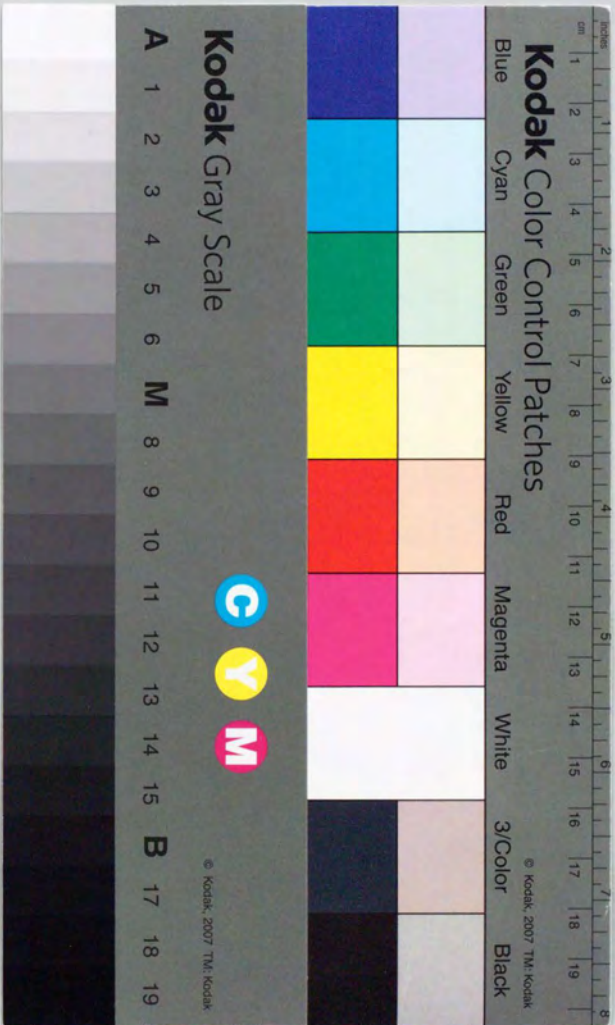
55. Endou, M., Hattori, Y., Nakaya, H., and Kanno, M. : Differential Effects of Somatostatin on Atrial and Ventricular Contractile Responses in Guinea Pig Heart: Influence of Pretreatment with Islet-Activating Protein. *J Pharmacol Exp Ther* 250, 726-733, 1989.

56. Nakaya, H., Takeda, Y., Tohse, N., and Kanno, M. : Mechanism of the Membrane Depolarization Induced by Oxidative Stress in Guinea-pig Ventricular Cells. *J Mol Cell Cardiol*, 24, 523-534, 1992.

57. Akabane, H. : Synthesized leukotoxin: its biological activity and establishment of radioimmunoassay. *Hokkaido-Igaku-Zasshi*, 66, 510-521, 1991. (in Japanese)

58. Siegfried, M.R., Aoki, N., Lefer, A.M., Elisseou, E.M. and Zipkin, R.E. : Direct cardiovascular actions of two metabolites of linoleic acid. *Life Sci*. 46, 427-433, 1990.





# Kodak Color Control Patches

Blue Cyan Green Yellow Red Magenta White 3/Color Black

# Kodak Gray Scale

A 1 2 3 4 5 6 M 8 9 10 11 12 13 14 15 B 17 18 19



© Kodak, 2007 TM, Kodak