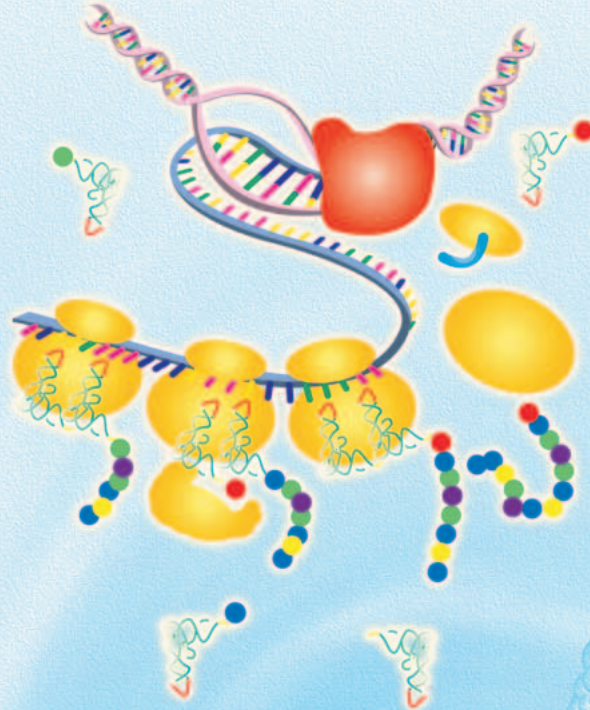


# WAKO

# 和光純薬時報

July 2004  
Vol.72 No.3



## 〔総説〕

### 「再構成蛋白質合成系:PURE system」

上田卓也、清水義宏 …… 2

### 「化学兵器と環境汚染—茨城県神栖町の毒ガス兵器による地下水ヒ素汚染—」

貝瀬利一 …… 5

### 〈テクニカルレポート〉

「陰イオン界面活性剤の簡易分析」 吉田貴三子 …… 9

「内臓脂肪細胞分化誘導系の確立」 平 敏夫 ……10

### 〈Talking of LAL〉

「第56話 再認識されるペプチドグリカン」  
土谷正和 ……13

## 〔化学大家〕

「高松豊吉」

芝 哲夫 ……26

## 〔製品紹介〕

### 環境・分析

DPAA標準品 ……	8
陰イオン界面活性剤標準品 ……	9
ワコーパック® WS AS-Aqua ……	9
農薬混合標準液 ……	14
LC/MS用溶媒 ……	16
ワコーパック® MS-5C18GT ……	16
改正水道法対応水質分析試薬 ……	16
排水試験用試薬 ……	17
日本エンバイロ(株) AP ELISAキット、 AP+APE ELISAキット ……	18
生薬標準品 ……	19
Fluorous社 フルオラス化学関連商品 ……	20

### 細胞生物

(株)ホクドー 腸間膜脂肪細胞培養キット …… 11

### 遺伝子

WakoPURE system ……	4
(株)ニッポンジーン ECOS™ コンピテント <i>E. coli</i> ……	21
Fidelity Systems社の TOPO DNA Polymeraseシリーズ <sup>Data</sup> ……	22

### 生化学

電気泳動槽 スーパーセパレーター™ ……	24
「SuperSep™」のウエスタンブロットにおける 転写効率 <sup>Data</sup> ……	25
ワイドビュー™ ウエスタンサイズマーカー ……	28

### はじめに

ヒトゲノムの配列が決まり、私たちは生命の設計図を手に入れることに成功しつつある。ゲノムプロジェクトの進行を受け、設計図の個々の違いと疾患との関連についてのSNPsなどの研究が、急速に進展している。今後のこうしたポストゲノム時代の研究の中心になるのが、遺伝子から生産される蛋白質の機能と構造の研究である。特にアミノ酸の変異とそれに伴う蛋白質機能の変化の相関を解明することは、蛋白質の機能を改善させる医薬品の開発などのいわゆるテーラーメイド医療において必須の基礎研究である。しかし、こうした蛋白質の研究を進めるためには、まず蛋白質を手に入れなくてはならない。ポストゲノム時代の最重要課題である蛋白質研究の生命線は、蛋白質の生産技術の確立である。

蛋白質を得るための現在の主流の手法は、遺伝子を発現ベクターに挿入し、大腸菌や酵母または培養細胞で生産させる、いわゆる組み換えDNA技術による蛋白質発現システムである。しかし、発現系を用いた蛋白質生産は、クローニング、培養、そして蛋白質の精製といった手のかかるプロセスを経なくてはならず、またホストの細胞に有害な蛋白質は生産できない。こうした問題を抱える細胞を用いた生産システムに代わる生産技術として、無細胞の蛋白質生産システムが注目されている。

### 無細胞蛋白質合成系とは

当然のことであるが、すべての細胞は蛋白質を合成するシステムを持っている。このシステムを細胞から取り出せば、合成したい蛋白質の鋳型となるDNAまたはmRNAを加えるだけで、蛋白質を合成することが可能になる。この細胞を用いない無細胞（セルフリー）のシステムでは、蛋白質の合成を阻害する蛋白質以外は自由に合成でき、また細胞内のプロテアーゼによる分解といった問題も完全に排除できる。こうした点から、セルフリーの蛋白質合成系は理想的なシステムといえるが、蛋白質合成系

は100種類以上の分子が参加する非常に複雑なシステムであり、細胞からそのシステムのみを取り出すことは絶望的とも思われていた。その代替として細胞を破碎し、細胞膜を除去した細胞抽出液を用いたシステムの改良が研究の主流であった。特に、愛媛大学の遠藤教授の開発した小麦の胚芽から調製した抽出液は、合成時間の持続性が長いことから注目されている。こうした細胞を破碎した抽出液の利用は、無細胞で蛋白質の生産が可能であることを示した点で重要な役割を果たしたといえる<sup>1-3)</sup>。しかし、私達はこうした第一世代の無細胞システムは、システム内の構成要素が不明確なために今後の発展性に限界があり、新たな概念に基づく生産システムを構築する必要があると感じていた。これらの点から、私達は困難さを承知の上で、蛋白質合成に関与する因子を高純度に精製し再構築する、いわば第二世代の無細胞蛋白質合成系ともいえるシステムの開発に着手した。

### PURE systemの開発

細胞内において蛋白質はリボソーム上でmRNAの配列に依存したアミノ酸の重合によって進行する。アミノ酸の重合反応自体は単純な脱水重合反応であるが、mRNAの情報を高い精度で翻訳するために、さまざまな蛋白質性の因子がこのプロセスに参加する。原核生物では、翻訳の開始に

は3種類の開始因子(IF)、ペプチド鎖の形成と伸張には3種類の伸長因子(EF)、翻訳の終了にはやはり3種類の解離因子(RF)が必要であり、終結から開始へのリボソームのリサイクルを担う因子(RRF)も存在する。これらの因子に加え、アミノ酸をtRNAへの結合を行うアミノアシルtRNA合成酵素が、二十種類のアミノ酸に対応して必要である。

まず、これらの30種類以上の因子を大腸菌のゲノムからクローニングし、ヒスチジンタグの付加した形で大量発現させた。さらに、ニッケルカラムにより高純度に精製した。また、各々の因子の活性を測定し、すべて天然の因子と遜色のない活性を有することを確認した。これらに加えリボソーム、tRNA画分、RNAポリメラーゼを組み合わせ、鋳型DNAに依存して蛋白質を合成する分子工場の構築を行った。このシステムに蛋白質遺伝子のDNAを添加すると、期待通りの分子量の蛋白質が合成された。このシステムが精製された因子から再構築されていることから、PURE systemと命名した<sup>4,5)</sup>。

PURE systemはどのような蛋白質が合成できるのだろうか? いままでの経験では、大多数の蛋白質(おそらく8割以上)は合成できるようである。PURE systemは原核生物のシステムではあるが、真核生物由来の遺伝子も問題なく合成ができる(図1)。また、図に示したよう10万以上の分子量を持つ蛋白質も合成が可能である。また、マイ

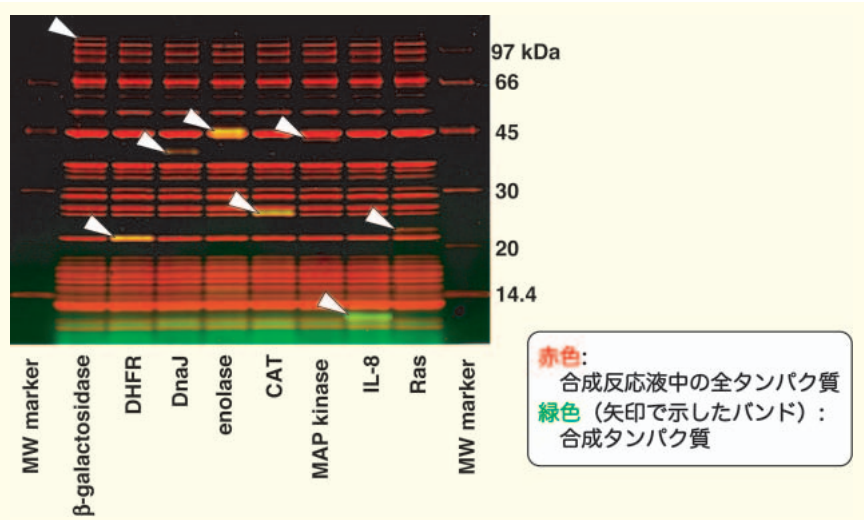


図1.

ナーコドン有する蛋白質も、特に問題は無いようであり、もし翻訳の効率が低下するようなことが起これば、tRNAをさらに添加すれば簡単に解消することができる。

ではPURE systemの合成量はどのようなものであろうか?従来の無細胞蛋白質合成系では、アミノ酸やヌクレオチド3リン酸を、供給するシステムを用いた連続系で合成時間を継続させる必要があった<sup>3,6)</sup>。これは、細胞抽出液に内在性のATPaseやアミノ酸代謝の酵素によって分解されるためである。PURE systemは、こうした蛋白質合成に阻害的に働く夾雑酵素群はまったく含まず、こうした供給システムを必要とせず、バッチシステムで十分である。現在のところ、1mlの反応液で、ジヒドロ葉酸還元酵素(DHFR)などは、バッチシステムで0.1mg程度の合成が1時間で可能であり、10mlで行えばmg単位の蛋白質を合成することが可能である。DHFRの数倍から10倍近い合成量を示す蛋白質もあるために、蛋白質の合成量を支配している要因についての解析を現在進めている。

PURE systemの利点として、スクレアーズを含まない点がある。小麦胚芽や大腸菌のシステムでは、鋳型のDNAやmRNAの分解が大きな問題であり、特にDNAについては、直鎖状のDNAは分解されやすく、PCR産物を鋳型として用いることが不向きなために生体外蛋白質合成系のハイスループット化が困難であった。PURE systemではこれらの鋳型の核酸の分解はほとんどないために、PCRで増幅した遺伝子から直ちに合成が可能である。現在市販されているPURE systemのキットは、PCR用にデザインされており、T7プロモーターを含む5'側プライマーが付属している。ORF部分のプライマーで遺伝子を増幅した後に、これらの付属のプライマーで再度PCRを行えば、ゲノムDNAからでも簡単にPURE system用の鋳型DNAを合成することができる。クローニングなどのステップを省略できるために、多数の蛋白質の合成が行え、ポストゲノム時代のハイスループットな蛋白質の生産が可能になると期待している。

## PURE systemで高純度蛋白質を調製する

蛋白質の機能や構造を解析するためには、合成した蛋白質を精製する必要がある。いかに純度の高い蛋白質標品を調製するかは、解析のための実験の成否や、得られた結果の信頼性を左右する、重要な要因である。細胞を利用した発現系や第一世代の生体外蛋白質合成系では、こうした精製のステップを短時間にするために、目的蛋白質にさまざまなタグ配列を付加し、タグの親和性を利用して精製を行うことがなされている。しかし、こうしたタグ配列の付加による機能低下の可能性もあるため、天然と同じ配列の形で蛋白質を合成し精製ができれば理想的である。

PURE systemに含まれる因子群はすべてヒスチジンタグが付加されているため、蛋白質合成後の反応液をニッケルカラムに通せば、これらの因子は除去される。またリボソ-

ムは分子量が100万以上であるために、限外濾過膜を通せば除くことができる。合成する蛋白質遺伝子には、なにもタグを付加する必要はなく、ゲノム上のアミノ酸配列そのままで蛋白質を合成し、ニッケルカラムと限外濾過を用いれば、直ちに精製が完了する。蛋白質の合成反応の時間も含めて数時間で、精製された蛋白質を得ることが可能である。実際に、DHFRを合成し精製したところ、高純度の蛋白質標品を得ることに成功している(図2)。目的蛋白質はすべて素通りの画分として得られるために吸着と溶出による活性の低下もなく、また精製の各ステップも単純なために、自動化も容易である。今後、ゲノム上の全蛋白質を合成し精製するといった、ゲノムワイドな蛋白質生産を行う予定である。

## 発展型 PURE system

蛋白質は核酸とは違い、合成後にさまざまな加工プロセスを経て機能を持つ蛋白質

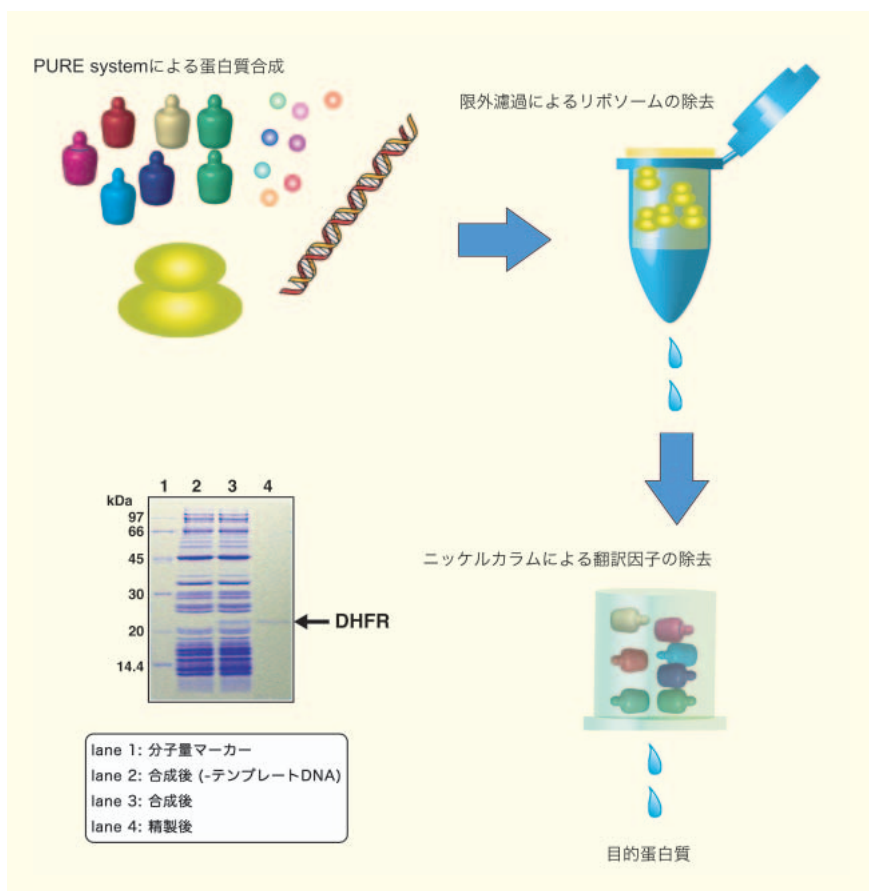


図2.

へと成熟する。蛋白質合成後ただちに起きるのが、三次構造の形成—フォールディング—である。蛋白質が機能を果たすためには、ペプチド鎖が正確に折れ畳まれることが必須である。このフォールディングのプロセスには、さまざまなシャペロンが関与しているとされる。迅速かつ効率に正確な構造を形成するためには、シャペロン共存下での蛋白質合成が望ましい。細胞の抽出液には、内在性のシャペロン群を含むが、PURE systemにはシャペロンはまったく含まれていない。しかし、逆に目的の蛋白質にあったシャペロンを添加することによって、生理活性の高い蛋白質を合成することも可能である。たとえば、動物由来のシャペロンを添加することによって、PURE systemで合成したポリペプチドを真核生物型の蛋白質の構造へと導くことも可能である。

また、こうした蛋白質の成熟過程のひとつに細胞膜への蛋白質の挿入がある。医薬分野においては、膜受容体などの膜に存在する蛋白質を標的とした創薬が重要であり、膜蛋白質の合成法の確立が急務である。私達の研究室では、PURE systemと同様のアプローチで、蛋白質の分泌システムを試験管内で再構築する研究を進めて

いる。現在は、調製した大腸菌の膜画分を含むPURE systemを用いて、分泌蛋白質や膜蛋白質の合成を行っており、合成蛋白質の分泌や膜挿入の観察に成功している。大腸菌の外膜蛋白質であるompAを、大腸菌の膜画分(反転膜小胞)存在下のPURE systemで合成し、小胞内部へ、蛋白質を分泌させることが可能であった。合成されたompA前駆体は、シグナル配列が切断され、小胞内部への移行によるプロテアーゼ耐性となり、膜透過が行われていることが示された。現在は、高等生物の膜蛋白質の合成についての検討を進めている。

## 終わりに

蛋白質は、核酸とは違い機能を果たすために、翻訳後修飾を含めてさまざまな成熟過程を経る必要がある。今までの蛋白質の合成技術の開発は、その生産性の量的側面にのみ注目されてきたが、しかし今後は、高品質の純度の高い蛋白質を作ることが求められるようになるであろう。そのためには、蛋白質の成熟過程をきちんと理解した上で、蛋白質を生産する必要がある。目的の蛋白質の成熟プロセスにあわせたいわばテララー

メイドの蛋白質生産技術の開発が必要となるであろう。PURE systemは、これらの蛋白質の加工システムを含まないシステムであり、ペプチド鎖の合成のみしか行わないシステムである。しかしこのシステムを土台として、細胞内と同様の蛋白質の加工システムを付加していけば、高品質な蛋白質の合成システムを作り上げることができるであろう。このアプローチは、細胞内のシステムを再構築することであり、困難な道ではあるが、プロテオーム研究を支える基盤技術となるものと信じて研究を進めている。

## 【参考文献】

- 1) Sawasaki, T., Ogasawara, T., Morishita, R., Endo, Y.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **99**, 14652(2002).
- 2) Madin, K., Sawasaki, T., Ogasawara, T., Endo, Y.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **97**, 559(2000).
- 3) Spirin, A. S., Baranov, V. I., Ryabova, L. A., Ovodov, S. Y., Alakhov, Y. B.: *Science*, **242**, 1162(1988).
- 4) Ueda, T., Inoue, A., Kaida, M., R., B., Shimizu, Y.: "in Cell-Free Translation System", ed. by Sprin, A. S., Springer-Verlag, Berlin and Heidelberg, pp. 53-60(2002).
- 5) Shimizu, Y., Inoue, A., Tomari, Y., Suzuki, T., Yokogawa, T., Nishikawa, K., Ueda, T.: *Nat. Biotechnol.*, **19**, 751(2001).
- 6) Baranov, V. I., Spirin, A. S.: *Methods Enzymol.*, **217**, 123(1993).

## Products

### 次世代のin vitroタンパク質合成システム



## WakoPURE system

WakoPURE systemは世界初の再構成系無細胞タンパク質合成技術で、転写、翻訳及びエネルギー再生に必要な30種類以上の因子をすべて別々に調製、精製後、再構成しました。それにより従来のタグシステムを逆に利用することができ、目的タンパク質にタグ配列を付加せずに合成、精製ができる画期的なシステムです。

### キット内容

	4回用	16回用
溶 液 A	25 $\mu$ l $\times$ 4本	25 $\mu$ l $\times$ 16本
溶 液 B	10 $\mu$ l $\times$ 4本	10 $\mu$ l $\times$ 16本
DHFRコントロール	5 $\mu$ l $\times$ 1本	5 $\mu$ l $\times$ 1本
ユニバーサルプライマー	80 $\mu$ l $\times$ 1本	80 $\mu$ l $\times$ 1本
マニュアル	1冊	1冊

### 保存条件

-80℃保存



4回用

コードNo.	品 名	規 格	容 量	希望納入価格(円)
299-59501	WakoPURE system	遺伝子研究用	4回用	16,000
295-59503			16回用	49,800

### 1 はじめに

2003年4月15日の朝日新聞夕刊に「井戸水から高濃度ヒ素—茨城県神栖町、旧日本軍毒ガス関連?—」という衝撃的な見出しで報道がなされた(図1)。この報道が茨城県民のみならず日本国民に大きなショックを与えたことは記憶に新しい。我々はこれまで我が国が経験したことのない事故を目の当たりにし、戦後60年を経た今日に至って旧日本軍の亡霊が突如として現れた感を抱かざるを得ない。本稿では化学兵器と環境汚染について筆者の研究室で行われた研究内容も併せて解説してみたい。

### 2 神栖町における事故の経緯

2000年から2003年春にかけて、茨城県神栖町木崎地区にある集合住宅の住民からめまい、手足のしびれ、歩行困難、立ちくらみ、ふらつき、ミオクローヌス(体のピクツキ)、睡眠障害など中枢神経症状の訴えがあった。診察を行った筑波大学神経内科の石井らは原因を究明するため、入院措置を取ってしばらく経過観察を行うことにした。やがて症状は改善して退院するまでになったが、自宅に戻るとまた症状が増悪するという経過をたどった。再度入院したが、結局原因は不明であった。今度は次女にも同様の症状が見られ、さらに集合住宅の別棟の住民にも同じ症状が見られた。そこで石井らは患者に共通した環境因子があるのではと考え、まず集合住宅で発生していることから井戸水を疑った。井戸水の水質検査を茨城県に依頼したところ、水道水質基準(0.010mgAs/L)の450倍ものヒ素が検出された<sup>1)</sup>(図2)。しかしこれまで報告されていた地下水による慢性ヒ素中毒症状とは全く異なる症状であった<sup>2)</sup>。

分析依頼を受けた茨城県衛生研究所の石崎らはヒ素の正体を探るべく、あらゆる分析方法を駆使して精緻な調査をした。その結果、ヒ素の本体は化学兵器の一種ジフェニルクロロアルシン(DA)およびジフェニルシアノアルシン(DC)の分解生成物ジ



図1. 「井戸水から高濃度ヒ素—茨城県神栖町・旧日本軍毒ガス関連?—」の新聞記事(平成15年4月15日朝日新聞夕刊より)



図2. 「井戸水」医師が気づく(平成15年5月10日朝日新聞夕刊より)

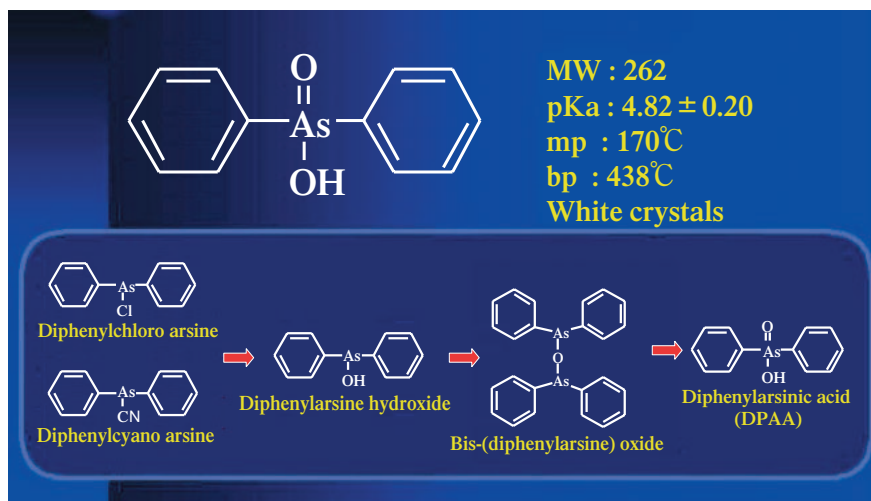


図3. ジフェニルクロロアルシンおよびジフェニルシアノアルシンからDPAAの生成

フェニルアルシン酸 (DPAA) であることが明らかとなった<sup>3)</sup> (図3)。

### 3 化学兵器とは

第二次世界大戦中に我が国を始めとし、いくつかの国々では毒ガスを含む化学兵器が製造された。化学兵器を製造することは国際条約に違反するため、限られた箇所でも秘密裏に製造されていた。我が国では中国大陸で使用する目的でマスタード(HD:イペリットとも呼ばれる(CICH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>S)、シアンガス(AC:HCN)、塩化シアン(CK:CNCI)、ホス

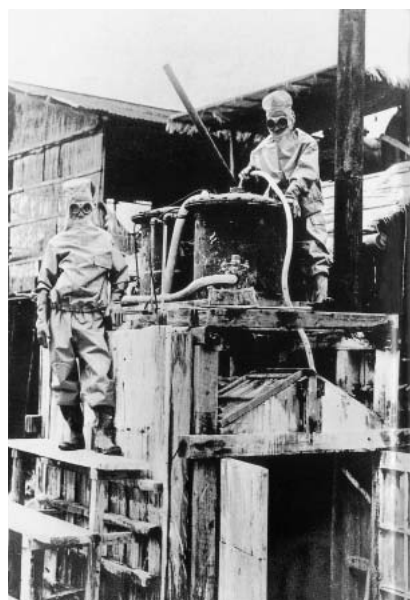


図4. 毒ガスを取り扱う作業員 (大久野島毒ガス資料館蔵)

ゲン(CG:COCl<sub>2</sub>)、有機ヒ素剤などの毒ガス兵器を製造した。有機ヒ素剤の中でも特に化学的殺傷力の強い代表的な化合物としてルイサイト(L:ジクロロ-2-クロロビニルアルシン(CICH=CHAsCl<sub>2</sub>))、ビス(2-クロロビニル)クロロアルシン((CICH=CH)<sub>2</sub>AsCl)、フェニルジクロロアルシン(PD:C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>AsCl<sub>2</sub>)、エチルジクロロアルシン(ED:C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>AsCl<sub>2</sub>)などが挙げられる。これらのヒ素剤は皮膚や粘膜に接触すると水疱を伴う激しい炎症を起こすため「糜爛(びらん)剤」として用いられ、その取り扱い是非常に危険を伴うものであった(図4)。

また戦闘力喪失の目的で「くしゃみ剤」ジフェニルクロロアルシン(DA)やジフェニルシアノアルシン(DC)が製造された。さらにヒ素剤の中には「嘔吐剤」アダムサイト(DM:C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>(NH)AsClC<sub>6</sub>H<sub>4</sub>)なども含まれる。旧日本軍は敗戦と同時にこれらの化学兵器を証拠隠滅のため中国各地の地中に遺棄した。そのため現在なお日中間で遺棄化学兵器の処理問題が山積している。これらの毒ガス製造は1937年頃から広島県忠海町の沖合にある大久野島で盛んに行われた。原料の亜ヒ酸は宮崎県高千穂近くの土呂久から運ばれていた。最盛期の1941年には1580tもの化学剤を製造し、ジフェニルシアノアルシンだけでも1938年に310tの製造があったと云われる。最近、神奈川県平塚市や寒川町の工事現場からルイサイトやDPAAが検出されているが、ここはかつて旧日本軍相模工廠があった場所でもある。日本国内ではまだ

多くの場所に毒ガス兵器が埋められていることが環境省の調査によって明らかにされている。これらのヒ素剤は地質環境中で分解してもなお有機ヒ素として残留するため、汚染した土から地下水に溶出し、飲料水としてヒトに摂取される可能性があり、今後も環境汚染と健康被害が懸念される。以上の観点から土壌、地下水など環境試料からヒ素剤の分解生成物を検出することは重要であると考えられる。

### 4 ジフェニルアルシン酸 (DPAA:C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>AsO(OH)C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>)

神栖町の井戸水から検出されたDPAAはジフェニルクロロアルシン(DA)およびジフェニルシアノアルシン(DC)の分解生成物と考えられる(図3)。環境中ではジフェニルクロロアルシンおよびジフェニルシアノアルシンの塩素やシアノ基が水酸基と置換してジフェニルアルシンヒドロキッドが生成し、さらにこの物質二分子から一分子の水が脱水したビスジフェニルアルシジオキッドを経て最終的にDPAAが生成することが考えられる。DPAAは環境中では比較的安定であると思われるが、地層中に長期間存在すると微生物による分解が考えられ、モノフェニルアルソン酸を経て最終的に無機のヒ素になることが推定される。DPAAは分子量262であり、酸解離定数(pKa)4.8、沸点438°C、融点170°Cをもつ白色結晶で、弱酸性を示すが水に比較的溶けにくい化合物である。クロロホルム、アセトニトリル、アルコールなどの有機溶媒には溶解する。

これまでこれらの有機ヒ素剤や分解生成物の環境中での挙動についてはほとんど研究はなされていない。生体影響や毒性研究に至っては皆無である。我々はDPAAの環境中での動態を明らかにする目的で環境試料からDPAAの検出を試みた。しかしDPAAは国内ではほとんど入手できない化合物であったことから、標準物質としてDPAAの合成を試みた。ヒ酸ならびにフェニルヒドラジンから酸化第二銅の触媒のもとにビス-ジフェニルアルシジオキッドを合成し、過酸化水素で酸化して粗DPAAを得た。DPAAは粗結晶から水で三回ほど再結晶

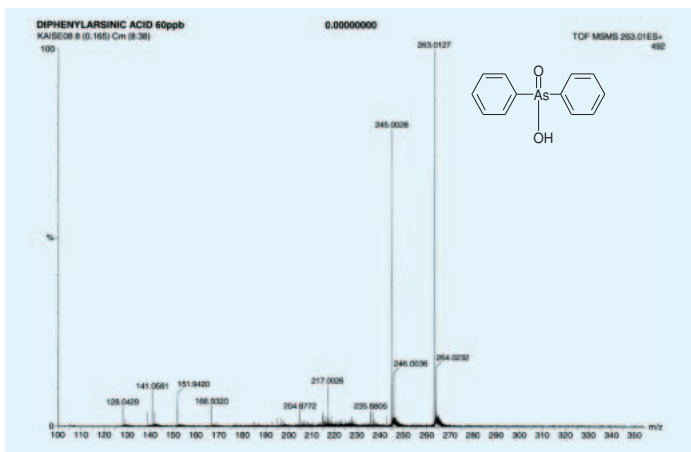


図5. DPAAのTOF-MSスペクトル

を行って得た。マススペクトル測定を行うと  $[M+H]^+$ :263 (図5) が得られ、さらに精密質量測定を行った結果  $C_{12}H_{11}O_2As$  の分子式が支持された。融点は170℃であった。また  $^1H$ -NMR:7.44ppm (t), 7.52ppm (t), 7.76ppm (d), 8.68ppm (s),  $^{13}C$ -NMR:129.1ppm, 130.6ppm, 132.5ppm, 133.2ppm から DPAA の構造が帰属された。この標準 DPAA は和光純薬工業 (株) から販売されている。

## 5 DPAAの検出

石崎らは井戸水からヒ素化合物の固相抽出を行い、溶出した画分について GC-MS 測定したところ、ビスジフェニルアルシノキシドを検出した<sup>3)</sup>。一方 DPAA は難揮発性のため直接 GC-MS では分析不可能で、DPAA をプロパンチオール ( $CH_3CH_2CH_2SH$ ) 誘導体に変換して GC-MS で検出した<sup>3)</sup>。DPAA の検出法にはこれまでチオグリコール酸メチルエステルを用いて揮発性の高い誘導体を生成して GC-MS 法による分析方法が報告されている<sup>4)</sup>。しかしこれらチオール化合物による誘導体生成は操作が煩雑であること、チオール化合物特有な臭気を持つことなどにより取り扱いが不便なこと、誘導体生成反応の速度に違いがあるなどの欠点がある。またチオール誘導体は加熱注入部で熱分解したり、カラム内部での脱吸着が起こる可能性があり、分析精度や信頼性に問題点があると考えられた<sup>5)</sup>。そこで著者は井戸水、土壌、生体試料から DPAA を検出する分析法を検討した。すなわち分離能



図6. HPLC/ICPMSシステム

力に優れた高速液体クロマトグラフとヒ素などに対して非常に感度の優れた誘導結合プラズマ質量分析計を連結させた装置 (HPLC/ICPMS) を用い (図6)、神栖町の井戸水や地下水の分析を行った。

分離は Inertsil C4 (GLサイエンス) を用い、ヒ素の検出は ELAN DRC-e (パーキンエルマージャパン) を用いた。溶離液は水-アセト

ニトリル (70:30)、カラム温度 40℃ で行った。ヒ素は  $m/z75$  でモニターし、ヒ素のイオンをクロマトグラムとして検出した。「くしゃみ剤」由来の分解生成物のクロマトグラムを図7に示した。

DPAA は広範囲なダイナミックレンジで直線性を示し、検出下限はヒ素として 3pg であった。DPAA の検量線を図8に示した。

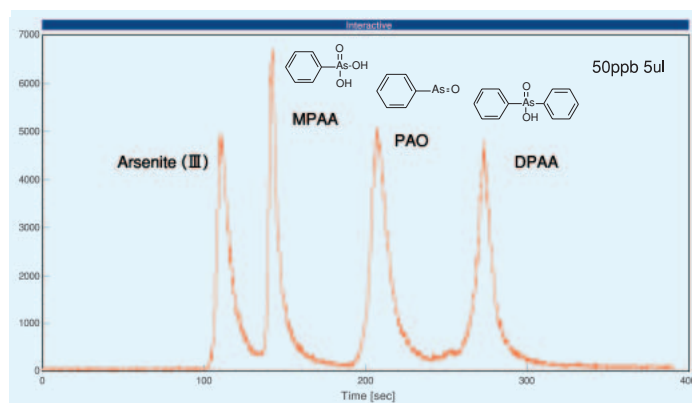


図7. 毒ガス由来のヒ素化合物のクロマトグラム

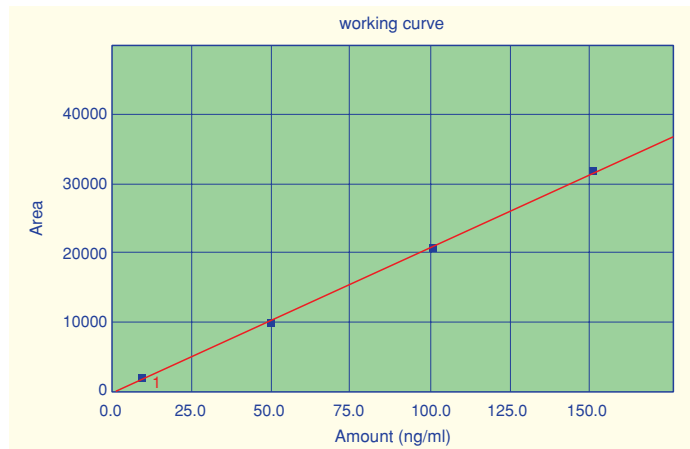


図8. DPAAの検量線

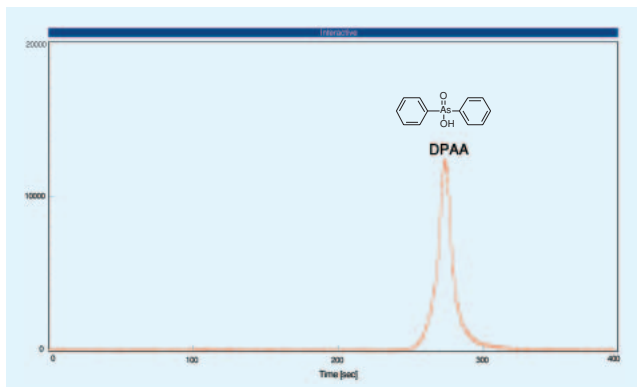


図9. DPAAが検出された井戸水

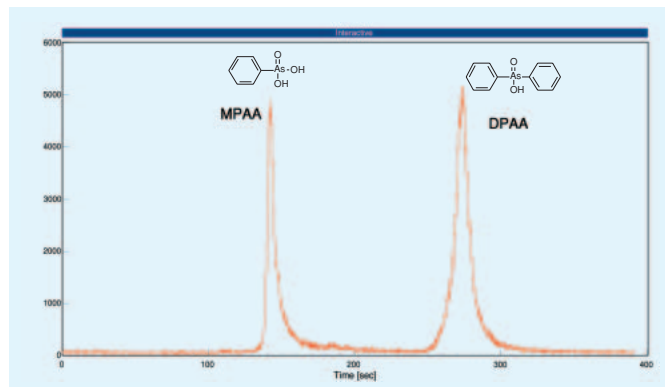


図10. DPAAならびにMPAAが検出された井戸水

我々は神栖町から採取された井戸水の試料を測定したところ、数カ所の井戸からDPAAを検出した(図9)。さらにモノフェニルアルソン酸(MPAA)とDPAAを検出した井戸もあった(図10)。またMPAAのみを検出した井戸もあった。MPAAはDPAAの分解生成物なのか合成過程での原料なのかは現在のところ明らかではない<sup>6)</sup>。なお我々の研究室ではDPAAが高濃度に含まれる井戸水中に超微量ではあるがトリフェニルアルシン((C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>)<sub>3</sub>As)の存在をGC-MSにより確認している。このトリフェニルアルシンはDPAAからGCの加熱注入部分で生成しないことを確認しており、化学剤由来のヒ素化合物と考えている。さらにこれまで確認されていない有機ヒ素化合物も数種類含まれる可能性もあるが、詳細は現在検討中である。一方茨城大学の楡井らは神栖町の地質ヒ素汚染について詳細に報告している<sup>7)</sup>。

## 6 おわりに

本稿では第二次世界大戦中に製造された毒ガス兵器の分解生成物である有機ヒ素化合物DPAAの地下水汚染について述べた。本事故の解明の糸口を見いだしたのは冷

静沈着に中毒患者を診察して井戸水に疑いを持った筑波大学の石井らの努力の結果であり、またヒ素化合物の正体を解明した茨城県衛生研究所石崎らのグループの成果である。これらのグループの協力がなかったら本事故はこれほど迅速に解明されなかったであろう。しかし今後これらの物質による土壌汚染や地層汚染が国内各地で起こる可能性も考えられるため、安全な飲料水を確保するためにも地下水中の有機ヒ素剤の監視が重要である。また周辺諸国でも同様な事例が起こりうる可能性があるため、その対応策が急務である。

### 【謝辞】

貴重なサンプルをご提供いただきました独立行政法人国立環境研究所統括研究官森田昌敏博士、伊藤裕康研究官ならびに茨城大学広域水圏環境科学教育センター教授の楡井久博士に深謝いたします。また本稿を校閲してくれました当研究室大学院生木下健司氏、学生野口綾乃氏に感謝いたします。

### 【参考文献】

- 1) 石井一弘、玉岡晃、大塚藤男:ジフェニルアルソン酸等による井戸水汚染と健康影響, 1-2, 「第11回ヒ素シンポジウム」講演要旨集, 札幌, (2003).
- 2) 石井一弘、作田 学:有機ヒ素中毒の発見をめぐって, 脳と神経, 55(12), 1065-1072(2003).
- 3) 石崎睦雄、柳岡知子、中村美樹、白田忠雄、上野清一、小室道彦、柴田美也子、北村立実、鈴木八重子、笹本明子、本多彰、花岡成行、緒方剛、土井幹雄:井戸水から検出されたフェニルヒ素化合物について, 43-44, 「第11回ヒ素シンポジウム」講演要旨集, 札幌, (2003).
- 4) Schoene, K., Steinhanses, J., Bruckert, H.-J. and Konig, A.: "Speciation of arsenic-containing chemical warfare agents by gas chromatographic analysis after derivatization with thioglycolic acid methyl ester", *J. Chromat.*, **605**, 257-262 (1992).
- 5) 木下健司、貝瀬利一、石崎睦雄:生体試料中のジフェニルアルソン酸の分析方法の検討, 45-46, 木下健司、志田保夫、石崎睦雄、野口政明、松田知憲、垣見英登、貝瀬利一:TOF-MSによる井戸水中のジフェニルアルソン酸の検出, 95-96, 「第11回ヒ素シンポジウム」講演要旨集, 札幌, (2003).
- 6) Kinoshita, K., Ishizaki, M., Shida, H., Sakuma, C., Kiso, K., Shikino, O., Ito, H., Morita, M., Ochi, T. and Kaise, T.: "Determination of phenylarsonic acid and diphenylarsinic acid, which were degradation products of organoarsenic chemical warfare agents, in the well water by HPLC/ICPMS system", *Appl. Organomet. Chem.*, 投稿中.
- 7) 茨城大学広域水圏センター神栖町有機ヒ素地質汚染調査団報告書, 1-5, 図11 (2003).

Products

Wako

コードNo.	品名	規格	容量	希望納入価格(円)
040-29181	ジフェニルアルソン酸標準品	ヒ素分析用	200mg	36,000



## 陰イオン界面活性剤の簡易分析

和光純薬工業株式会社 試薬研究所 吉田貴三子

水道水の水質基準の改定および試験方法の見直しに伴い陰イオン界面活性剤\*の分析法は、流路型吸光光度法から高速液体クロマトグラフ法へ改定された。この改定法では、分離用カラムにオクタデシルシリル基を化学結合したシリカゲルを充填したカラム(ODSカラム)又は、これと同等の性能を有するものを使用したHPLC-蛍光検出法が採用されている。

この方法に従って、分離用カラムにWakopak<sup>®</sup> Navi C18-5,4.6×250mm(ODSカラム)を使用して陰イオン界面活性剤測定用標準液(炭素数C10~14:和光純薬製)および洗剤を希釈して分析したところ、炭素数および分岐の状態により多数のピークとして検出された(図1)。一方で、水質基準では陰イオン界面活性剤をトータル量として規定していることから、検出感度の向上および定量計算法

の簡略化を考えるとピークの本数は少ないほど優位となる。そこで、炭素数のみを認識して、しかも分岐の状態を認識しない充填剤を設計しWakopak<sup>®</sup> WS AS-Aquaとして開発した。Wakopak<sup>®</sup> WS AS-Aquaを使用して上記と同一の標準液を分析した時のクロマトグラムを図2に示したが、当初の設計通りに炭素数C10~14の陰イオン界面活性剤を5本のピークに検出し、しかも検出感度の向上も認められた。

各標準液濃度10ppm~200ppmの範囲で作成した検量線は直線を示し、公定法通りに濃縮処理した試料の定量下限に相等する10ppm(2 $\mu$ g/lの検水を500倍濃縮)の標準液を測定したときの再現性は、CV=0.1~0.5%(n=5)、ODSで分析した時のピーク面積との相関はR<sup>2</sup>=0.9995~0.9999で良好な

結果が得られた。

以上、Wakopak<sup>®</sup> WS AS-Aquaを分離用カラムに使用するとODSカラムを使用した場合に比べて、測定後の定量計算が容易になることに加えて、検出感度の向上が認められるため検水の濃縮率を抑えることができるなど利便性が高い方法と考えられる。

水質基準の改定と試験方法の見直しを機会に、流路型吸光光度法からHPLC法への切り替えを検討される際に、本カラムを検討に加えていただき有用性を確認していただければ幸いです。

### 〔参考資料〕

平成15年7月22日厚生労働省告示第261号別表第24

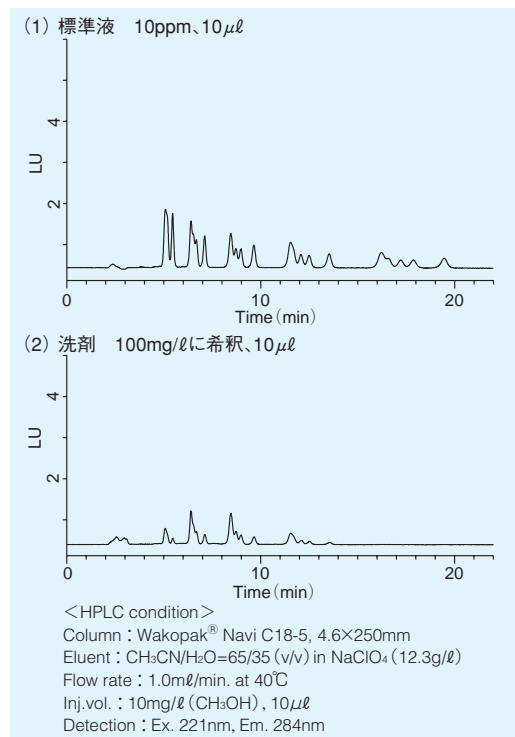


Fig.1 Wakopak<sup>®</sup> Navi C18-5, 4.6×250mm

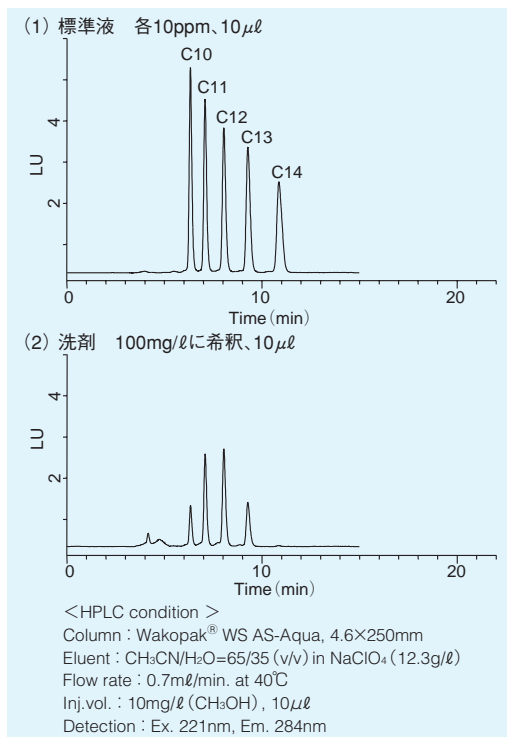


Fig.2 Wakopak<sup>®</sup> WS AS-Aqua, 4.6×250mm

\*陰イオン界面活性剤(Sodium Decylbenzenesulfonate:C10, Sodium Undecylbenzenesulfonate:C11, Sodium Dodecylbenzenesulfonate:C12, Sodium Tridecylbenzenesulfonate:C13, Sodium Tetradecylbenzenesulfonate:C14)



コードNo.	品名	規格	容量	希望納入価格(円)
195-13111	Sodium Decylbenzenesulfonate Standard Solution (1mg/ml Methanol Solution)	水質試験用	1ml×5A	7,500
192-13121	Sodium Undecylbenzenesulfonate Standard Solution (1mg/ml Methanol Solution)	水質試験用	1ml×5A	7,500
199-13131	Sodium Dodecylbenzenesulfonate Standard Solution (1mg/ml Methanol Solution)	水質試験用	1ml×5A	7,500
196-13141	Sodium Tridecylbenzenesulfonate Standard Solution (1mg/ml Methanol Solution)	水質試験用	1ml×5A	7,500
193-13151	Sodium Tetradecylbenzenesulfonate Standard Solution (1mg/ml Methanol Solution)	水質試験用	1ml×5A	7,500
013-20131	Anionic Surfactants Mixture Standard Solution (each 1mg/ml Methanol Solution)	水質試験用	1ml×5A	照会
コードNo.	品名	カラムサイズ	希望納入価格(円)	
001-00030	Wakopak <sup>®</sup> Wakosil AS-Aqua	4.6φ×250mm	60,000	
001-00030	Wakopak <sup>®</sup> Navi C18-5	4.6φ×250mm	48,000	

## 内臓脂肪細胞分化誘導系の確立

株式会社ホクドー Primary Culture Center 平 敏夫

内臓脂肪組織のひとつである腸間膜脂肪細胞 (Mesenteric Adipose tissue) は腸管から吸収した栄養分を肝臓に輸送する門脈に隣接して存在している (図1)。

腸管から吸収された栄養成分は門脈やリンパ管を通して肝臓へ運ばれ、全身組織に分配される。門脈、リンパ管が分布する腸間膜には年齢と共に脂肪組織が増生するが、近年この腸間膜脂肪の過剰蓄積が生活習慣病発症と深い関係があることが検証されてきている。

これまで腸間膜脂肪細胞の分化誘導系は確立されていなかったが、5年の開発期間を費やし、ようやくラット腸間膜脂肪細胞の分化誘導系を確立した。

この開発において通常、細胞培養に頻繁に使用されている牛胎児血清中には内臓脂肪細胞分化阻害因子を多く含むことがわかった (図2参照)。また新生仔牛血清に代えることにより若干は改善するもののロットによるばらつき等は頻繁に発生した。現在は血清中の内臓脂肪細胞分化阻害因子の活性を除去する方法を見だし、さらに外因性 (食事由来) の脂質が本内臓脂肪細胞分化を強力に促進していることがわかり本キットに応用している (特許出願中) (図3参照)。

現在、生活習慣病の *in vitro* モデルとしての有用性を検討している。

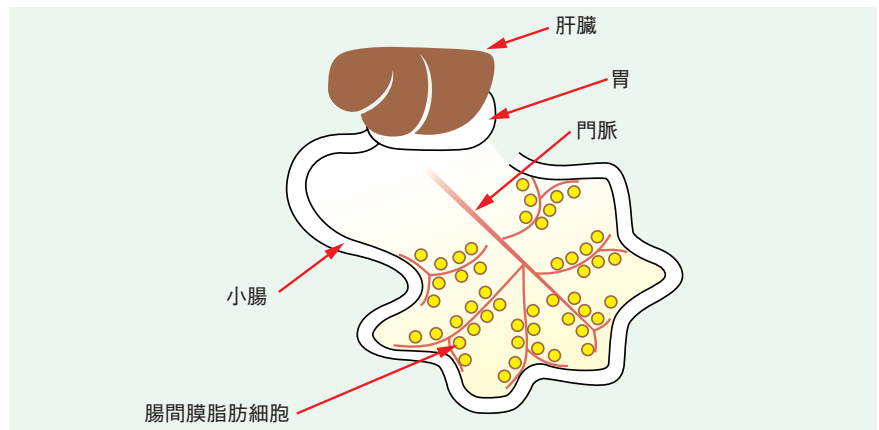


図1.

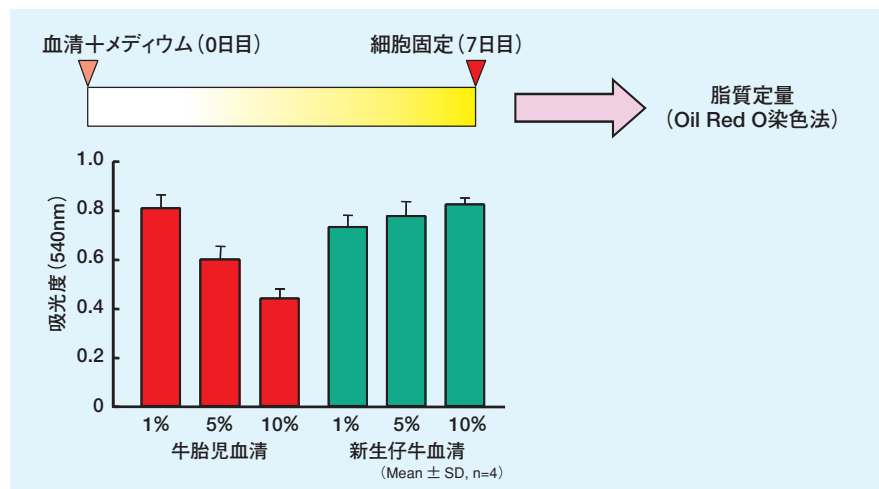


図2. 牛血清による脂肪分化誘導の影響

腸間膜脂肪前駆細胞は、牛胎児血清で濃度依存的に脂肪細胞への分化誘導を阻害し、阻害因子の存在を示唆した。一方、新生仔牛血清では濃度依存的に脂肪細胞への分化を誘導した。

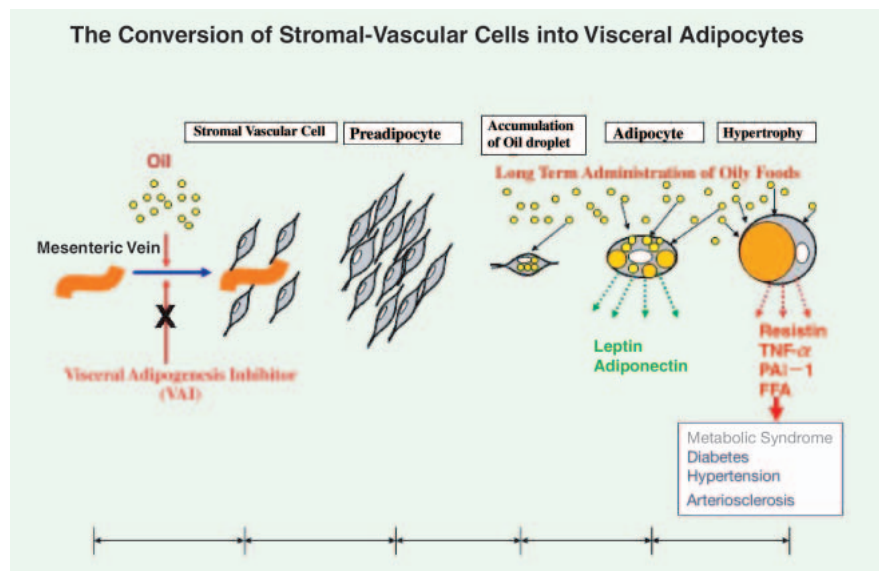


図3. 腸間膜脂肪細胞の分化過程

脂質の添加により脂肪前駆細胞の増殖・分化が促され、脂肪細胞へと分化が進み脂肪が蓄積される。

## 腸間膜脂肪細胞培養キット

本キットはラットの腸間膜から採取した腸間膜脂肪前駆細胞と腸間膜脂肪細胞分化に最適化した培養液を組合せた商品です。本キットを用いることにより腸間膜脂肪細胞を効率よく分化させることができます。生活習慣病発症のメカニズム解明、及び本症例の治療薬の探索などにご使用下さい。

### キット構成

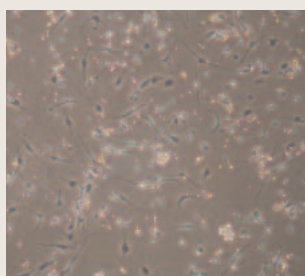
	F-4キット	P-1キット	P-2キット	P-4キット
腸間膜脂肪前駆細胞	25cm <sup>2</sup> フラスコ×4本	24wellプレート×1枚	24wellプレート×2枚	24wellプレート×4枚
内臓脂肪分化メディウム	250ml×1本	250ml×1本	250ml×2本	250ml×4本
単胞化サプリメント	10ml×1本	10ml×1本	20ml×1本	40ml×1本
使用目的	mRNA抽出用		一般探索用	

### 【腸間膜脂肪細胞培養キット メディウム組成】

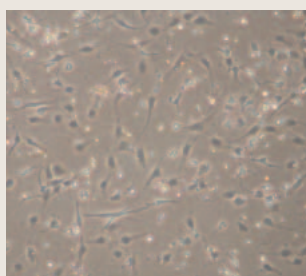
	内臓脂肪分化メディウム	単胞化サプリメント		内臓脂肪分化メディウム	単胞化サプリメント
D-MEM/F-12 medium	○	○	ascorbic acid	100μmol/l	○
内臓脂肪細胞分化阻害因子除去、 脂質増量血清(特許出願済み) 10%	○	○	octanoic acid	1μmol/l	○
ペニシリン 100units/ml	○	○	Triiodothyronine	50nmol/l	○
ストレプトマイシン 100μg/ml	○	○	Niacinamide	2.5mmol/l	○
pantothenic acid 17μmol/l	○	○	Insulin	10μg/ml	○
(+)-biotin 33μmol/l	○	○	Dexamethasone	25μmol/l	—

### 腸間膜脂肪細胞の分化過程

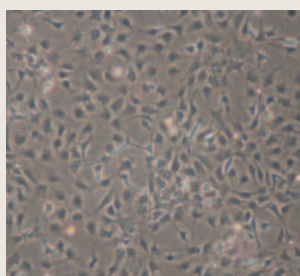
培養開始1~2日後に細胞質内に微少な脂肪滴が出現し始め、培養開始5日後頃にかけて脂肪滴が大きくなります。培養開始5日以降は細胞が剥がれやすくなりますので取扱いはご注意ください。



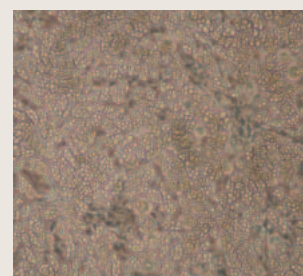
1) 到着後1晩培養した状態  
コンフルエント直前まで増殖している。  
脂肪滴の蓄積は開始していない。  
(脂肪滴を含有した細胞がわずかに混ざる場合があります)



2) 到着後1~2日間培養した状態  
細胞はほぼコンフルエントに達し、細胞質に微少な脂肪滴が出現し始めている。



3) 到着後2~3日間培養した状態  
脂肪滴が増え、大きくなってきている。  
(後述の単胞化サプリメントはこの状態またはこれ以降の添加をお勧めします)



4) 到着後8日間培養した状態  
脂肪滴が大きく明瞭になっている。細胞が縁から剥がれやすくなっているので取扱いは注意して下さい。

<実験例>



オイルレッドO染色  
GPDH活性測定

[次頁に続く]

## 単胞化サプリメントの使用法

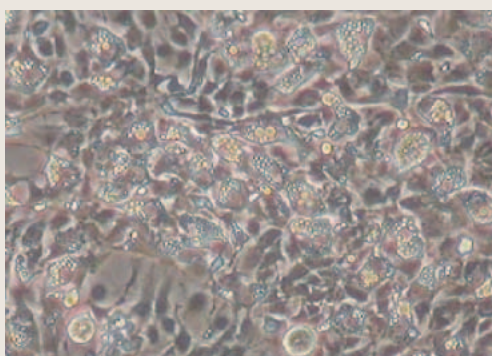
単胞化サプリメントは合成コルチコステロイドとしてデキサメサゾン $25\mu\text{mol}/\ell$ を添加した培地です。脂肪滴を蓄積しはじめた腸間膜脂肪細胞に添加すると、脂肪滴の肥大が促進する一方で細胞1個あたりの脂肪滴の数が減少し、脂肪滴は単胞化へ向かいます。また、薬物に対する細胞の反応性が変化します。また、単胞化サプリメントを添加すると細胞は剥がれにくくなり、培養可能な期間が延長します。

### 【培地ごと交換する方法】

- ① 9容の内臓脂肪分化メディアムに1容の単胞化サプリメントを添加し混合する。
- ② 培養容器のメディアムを吸引除去し、 $37^{\circ}\text{C}$ に保温した①の混合メディアムを添加する。

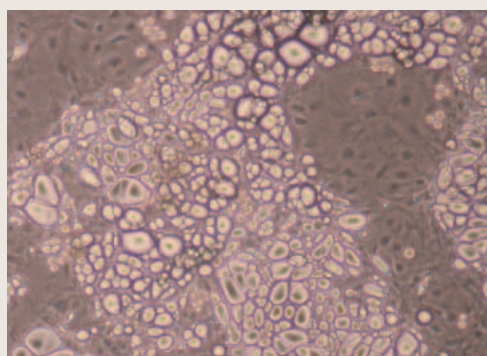
### 【培養中の培地に添加する方法】

- ① 培養中の培養液に1/10量の単胞化サプリメントを添加し穏やかに混合する。



単胞化サプリメント添加前

脂肪滴が明瞭になった状態で添加することをお勧めします。脂肪蓄積前に添加すると脂肪蓄積が起こらなくなる場合があります。



単胞化サプリメント添加10日目

巨大な脂肪滴が細胞あたり数個になった状態。単胞化サプリメントを添加すると細胞は剥がれにくくなり、培養可能な期間は延長します。

コードNo.	メーカーコード	品名	容量	希望納入価格(円)
309-14831	CUMAD01	腸間膜脂肪細胞培養キット F-4 (ラット)	4フラスコ	130,000
306-14841	CUMAD02	腸間膜脂肪細胞培養キット P-1 (ラット)	1プレート	90,000
303-14851	CUMAD03	腸間膜脂肪細胞培養キット P-2 (ラット)	2プレート	130,000
300-14861	CUMAD04	腸間膜脂肪細胞培養キット P-4 (ラット)	4プレート	150,000

## 関連商品

コードNo.	メーカーコード	品名	容量	希望納入価格(円)
306-08611	CUAD01	褐色脂肪細胞培養キット F-1 (ラット)	1フラスコ	100,000
302-08613	CUAD02	褐色脂肪細胞培養キット F-8 (ラット)	8フラスコ	130,000
303-08621	CUAD03	白色脂肪細胞培養キット F-1 (ラット)	1フラスコ	100,000
309-08623	CUAD04	白色脂肪細胞培養キット F-8 (ラット)	8フラスコ	130,000
309-14875	OP07	内臓脂肪分化メディアム	500mℓ	26,000
304-14881	OP08	単胞化サプリメント	40mℓ	10,000
302-13341	OP01	GPDH活性測定キット	100回用	50,000
301-14891	OP09	リピットアッセイキット	1セット	30,000

## 第56話 再認識されるペプチドグリカン

細菌細胞壁成分であるペプチドグリカンに関しては、これまでも本シリーズで取り上げてきました。第18話<sup>1)</sup>ではペプチドグリカン測定試薬としてSLP試薬を、第25話<sup>2)</sup>ではペプチドグリカンの概要をご紹介しました。最近、またペプチドグリカンが取り上げられることが多くなってきたので、今回はペプチドグリカンについてもう一度見直してみましょう。

ペプチドグリカンは、発熱性やサイトカイン産生など、エンドキシンとよく似た生物活性を示すことが知られています。しかしその活性はエンドキシンに比較して弱く、ウサギに0.6℃以上の発熱を起こさせる最小投与量は、*Staphylococcus aureus*由来のペプチドグリカンで7.3μg/kg、*E. coli* O55:B5由来のエンドキシンで2.7ng/kgと報告されています<sup>3)</sup>。すなわち、ペプチドグリカンの発熱活性は、エンドキシンの約2700分の1ということになります。ヒト全血が産生するサイトカイン量の比較でも、インターロイキン-6、腫瘍壊死因子(TNF)-α、インターロイキン-1を有意に産生させる最小量として、ペプチドグリカンがそれぞれ50ng/ml、140ng/ml、1350ng/mlであったのに対し、エンドキシンではそれぞれ14.0pg/ml、14.3pg/ml、14.2pg/mlとのことです<sup>3)</sup>、おおよそ3600分の1、9900分の1、9500分の1の活性

ということになります。これらの結果から、ペプチドグリカンの生物活性はエンドキシンより3から4オーダー低いと言えます。

第40話<sup>4)</sup>で、ペプチドグリカンの受容体としてToll-like receptor 2 (TLR2)が提唱されたこと<sup>5)</sup>をご紹介しました。最近この分野の研究の進歩がめざましく、エンドキシンの受容体がTLR-4であること、その反応にはMD-2という補助因子が必要なこと、ペプチドグリカンの受容体はTLR-2であり、TLR-2はTLR-1やTLR-6と2量体を形成することでペプチドグリカンやリポペプチドを認識することなどが報告されています<sup>6)</sup>。その他、エンドキシンやペプチドグリカンの他、鞭毛蛋白や細菌由来DNA2重鎖RNAなどを認識するTLRファミリーが見つかっており、強さは異なるにせよ種々の微生物由来成分による刺激が細胞内に伝達され、サイトカイン産生を促すという機構が明らかにされてきています。ペプチドグリカンとエンドキシンの生物活性の類似性、相乗効果、活性の強さの違いなどについては、TLRに関連した情報伝達の仕組みが明らかにされることによって、説明されてくることでしょう。

さて、第49話<sup>7)</sup>では透析療法におけるエンドキシンの影響に関する研究でエンドキシンやペプチドグリカンの影響が注目され

ていることをご紹介しました。土田らは、エンドキシン・ペプチドグリカン・β-グルカンによる汚染の認められた透析液で透析治療を受けた患者群の単核球のエンドキシンに対する反応性が、汚染の認められない透析液で透析治療を受けた患者群のそれに比べて大きく変化していることを報告しています<sup>8)</sup>。これは、急性毒性を発現しない量の微生物成分による慢性的な刺激が人体に影響を及ぼすことを示しています。ペプチドグリカンの汚染に慢性的にさらされた場合、人体はどのように反応するでしょう。おそらく、ペプチドグリカンの多少の汚染では急性反応は出ないと思われますから、軽い炎症反応が起こり、エンドキシンその他の刺激に対して、生体反応の挙動が変わってしまうのではないのでしょうか。現在、エンドキシンのように管理を受けていないペプチドグリカンをはじめとする種々の微生物由来成分では、そのようなことが起こる可能性がないとは言えませんし、それらがエンドキシンという主役の効果を修飾しているのは間違いないように思われます。最近の研究は、これらの機構を明らかにしてきているように感じられます。今後、その活性の強さから考えてエンドキシンがその中心の座を譲るとは考えられませんが、ペプチドグリカンなどの脇役の働きの制御が注目されてくるのではないのでしょうか。

## [参考文献]

- 1) 土谷正和：和光純薬時報, 63(1), 18(1995).
- 2) 土谷正和：和光純薬時報, 64(4), 16(1996).
- 3) Nakagawa, Y. et al.: *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, 9, 588-597(2002).
- 4) 土谷正和：和光純薬時報, 68(3), 25(2000).
- 5) 竹内 理、審良静男: *実験医学*, 18, 343(2000).
- 6) 三宅健介：「エンドキシン研究6」, p. 23-30, (医学図書出版)(2003).
- 7) 土谷正和：和光純薬時報, 70(4), 25(2002).
- 8) 土田健司 他：防菌防霉, 25, 405(1997).

今回は、第57話「高感度エンドキシン測定の実用」の予定です。



わき役が 大量点のおぜん立て  
ペプチドグリカンが活躍すると  
エンドキシンの活躍を増強する？

## 残留農薬試験用 農薬混合標準液



厚生労働省より、平成15年5月30日に新たな水質基準に関する省令が公布されました。その後、「水質基準に関する省令の制定及び水道法施行規則の一部改正等について」(厚生労働省健康局長通知;平成15年10月10日付健発第1010004号)により、101種類の農薬が水質基準を補完する項目である水質管理目標設定項目に定められ、これらは平成16年4月1日から施行されています。

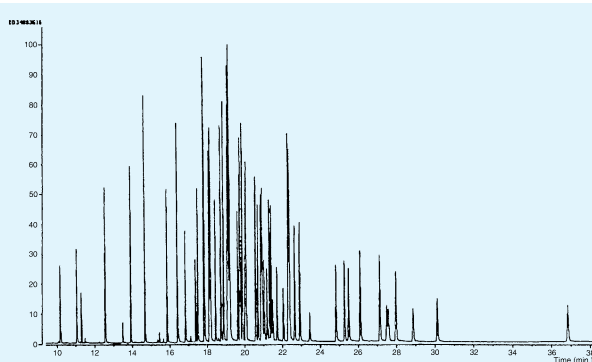
このたび、本改正に基づき安定性データを取得し、その結果、GC/MS、LC/MS用の4種の農薬混合標準液と、GC/MS用の内部混合標準液を商品化しました。製品に含まれていない他の成分は不安定なため、一斉分析を行う際は、その都度調製いただき、ご対応下さい。

## GC/MS用 57種農薬混合標準液

### 内容

- |                           |                          |
|---------------------------|--------------------------|
| 1. メチルダイムロン (46)          | 30. ベンディメタリン (44)        |
| 2. DEP (トリクロロホン) (24)     | 31. イソフェンホス (22)         |
| 3. DDVP (ジクロロボス) (11)     | 32. ジメタメトリン (89)         |
| 4. DBN (ジクロロベニル) (65)     | 33. PAP (フェントエート) (79)   |
| 5. エクロメゾール(エトリジアゾール) (27) | 34. プロシミドン (61)          |
| 6. クロロネブ (30)             | 35. MBPMC (テルブカルブ) (38)  |
| 7. BPMC (フェノブカルブ) (12)    | 36. ジメビベレート (78)         |
| 8. ベスロジン (ベンフルラリン) (43)   | 37. キャプタン (29)           |
| 9. ベンシクロン (33)            | 38. DMTP (メチダチオン) (57)   |
| 10. CAT (シマジン) (2)        | 39. ブタミホス (41)           |
| 11. ジメトエート (66)           | 40. フルトラニル (32)          |
| 12. ダイアジノン (6)            | 41. プレチラクロール (53)        |
| 13. プロピザミド (10)           | 42. ナプロバミド (39)          |
| 14. エチルチオメトン (81)         | 43. イソプロチオラン (IPT) (8)   |
| 15. ピロキロン (50)            | 44. ププロフェジン (80)         |
| 16. TPN (クロロタロニル) (9)     | 45. インキサチオン (5)          |
| 17. IBP (イプロベンホス) (15)    | 46. イプロジオン (26)          |
| 18. プロモブチド (59)           | 47. メプロニル (35)           |
| 19. トルクロホスメチル (31)        | 48. CNP (クロロニトロフェン) (13) |
| 20. ジチオピル (37)            | 49. EDDP (エディフェンホス) (49) |
| 21. メトラキシル (34)           | 50. テニルクロール (56)         |
| 22. シメリン (77)             | 51. ビリアチカルブ (40)         |
| 23. MEP (フェントロチオン) (7)    | 52. ビリダフェンチオン (25)       |
| 24. マラソン (マラチオン) (73)     | 53. ビベロホス (88)           |
| 25. エスプロカルブ (83)          | 54. EPN (16)             |
| 26. クロルピリホス (23)          | 55. ピフェノックス (85)         |
| 27. ベンチオカーブ (3)           | 56. ピリプロキシフェン (99)       |
| 28. MPP (フェンチオン) (71)     | 57. エトフェンプロックス (70)      |
| 29. フサライド (51)            | (各10 $\mu$ g/ml アセトン溶液)  |

## GC/MSによる標準クロマトグラム



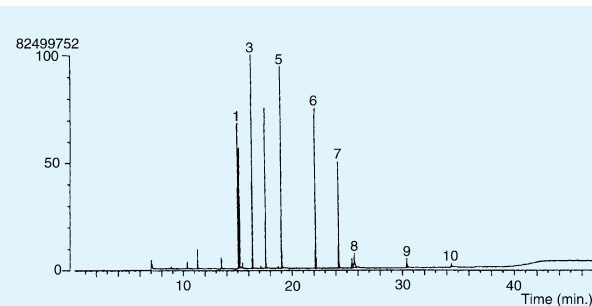
Phase : BPX-5 0.25 $\mu$ m film  
 Column : 30m $\times$ 0.25mm I.D.  
 Injection : 220 $^{\circ}$ C  
 Chamber : 250 $^{\circ}$ C  
 Column Temp. : 50 $^{\circ}$ C $\rightarrow$ 220 $^{\circ}$ C $\rightarrow$ 300 $^{\circ}$ C  
 Carrier Gas : He 2.0ml/min.  
 Injection Mode : Splitless

## GC/MS用 10種農薬混合標準液

### 内容

- |                        |  |
|------------------------|--|
| 1. MIPC (イソプロカルブ) (54) | 6. $\alpha$ -ベンゾエピン ( $\alpha$ -エンドスルファン) (69) |
| 2. モリネート (60)          | 7. $\beta$ -ベンゾエピン ( $\beta$ -エンドスルファン) (69)   |
| 3. トリフルラリン (100)       | 8. プロピコナゾール (97)                               |
| 4. アトラジン (63)          | 9. メフェナセット (52)                                |
| 5. アラクロール (47)         | 10. カフェンストール (101)                             |
- (各10 $\mu$ g/ml アセトン溶液)

## GC/MSによる標準クロマトグラム



Phase : BPX-5 0.25 $\mu$ m film  
 Column : 30m $\times$ 0.25mm I.D.  
 Injection : 220 $^{\circ}$ C  
 Chamber : 250 $^{\circ}$ C  
 Column Temp. : 50 $^{\circ}$ C $\rightarrow$ 220 $^{\circ}$ C $\rightarrow$ 300 $^{\circ}$ C  
 Carrier Gas : He 2.0ml/min.  
 Injection Mode : Splitless

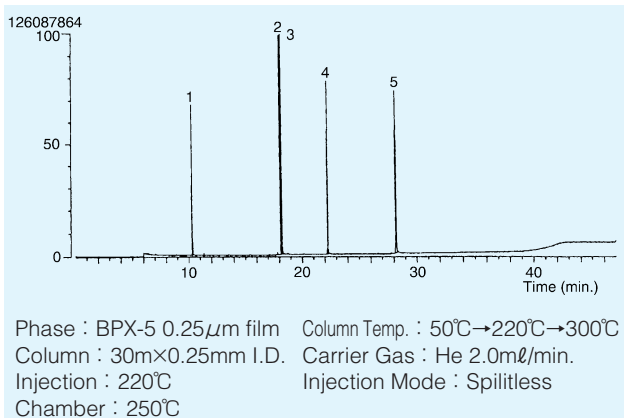
## GC/MS用

### 5種農薬内部混合標準液

#### 内容

- |                            |                         |
|----------------------------|-------------------------|
| 1. ナフタレン-d <sub>8</sub>    | 4. 9-プロモアントラセン          |
| 2. フェナントレン-d <sub>10</sub> | 5. クリセン-d <sub>12</sub> |
| 3. アントラセン-d <sub>10</sub>  | (各100μg/ml ノナン溶液)       |

#### GC/MSによる標準クロマトグラム

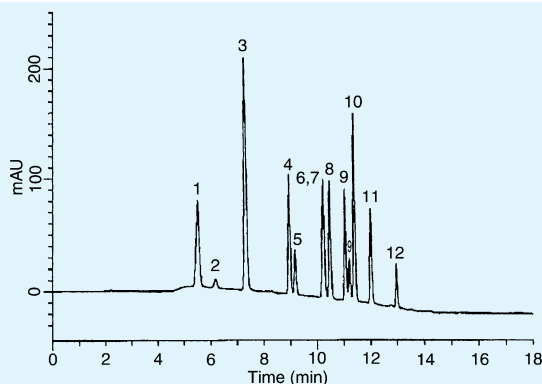


## LC/MS用

### 12種農薬混合標準液 (LC)

#### 内容

- |                                 |                      |
|---------------------------------|----------------------|
| 1. メソミル (74)                    | 7. DCMU (ジウロン) (68)  |
| 2. アシラム (36)                    | 8. ベンスルフロメチル (86)    |
| 3. トリシクラゾール (87)                | 9. シデュロン (98)        |
| 4. チオジカルブ (96)                  | 10. アゾキシストロビン (90)   |
| 5. カルボフラン<br>(カルボスルファン代謝物) (18) | 11. イプロジオン (26)      |
| 6. プロバナゾール (82)                 | 12. ベンスリド (SAP) (42) |
- (各20μg/ml アセトニトリル溶液)

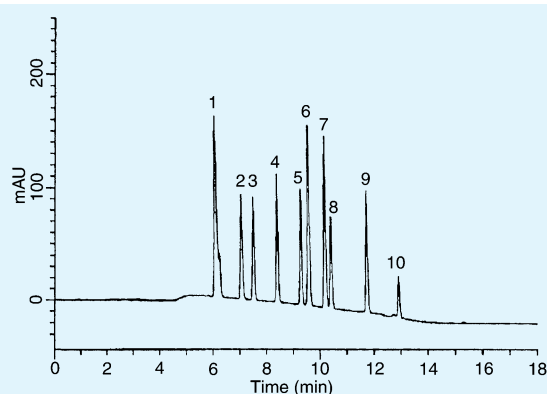


## LC/MS用

### 10種農薬混合標準液 (LC)

#### 内容

- |                                  |                    |
|----------------------------------|--------------------|
| 1. ベンタゾン (17)                    | 6. チオファネートメチル (55) |
| 2. 2,4-PA (2,4-ジクロロフェノキシ酢酸) (19) | 7. チウラム (1)        |
| 3. トリクロピル (20)                   | 8. フラザルスフロン (95)   |
| 4. MCPP (メコプロップ) (45)            | 9. ダイムロン (84)      |
| 5. ハロスルフロメチル (94)                | 10. カルプロノパミド (58)  |
- (各20μg/ml アセトニトリル溶液)



#### ご使用上の注意

- 2~10°C 保存下では徐々に分解しますので、必ず表示保存条件にて保存して下さい。
- 希釈後の溶液は徐々に分解しますので、希釈後はできるだけ速やかにご使用下さい。
- 希釈に用いる溶媒は、高純度の分析用グレードをご使用下さい。
- アンプル中には約1.5ml 入っています。

※品名うしろの( )内の数字は、水質管理目標設定項目における通しNo.です。

コードNo.	品名	規格	容量	希望納入価格(円)
160-21451	57種農薬混合標準液	残留農薬試験用	1ml×5A	65,000
167-21461	10種農薬混合標準液	残留農薬試験用	1ml×5A	25,000
163-21561	5種農薬内部混合標準液	残留農薬試験用	1ml×5A	25,000
164-21471	12種農薬混合標準液 (LC)	残留農薬試験用	1ml×5A	25,000
168-21511	10種農薬混合標準液 (LC)	残留農薬試験用	1ml×5A	25,000

## LC/MS用試薬 酢酸、ギ酸



ご好評いただいておりますLC/MS用溶媒アセトニトリル、メタノールに、今回新たに二種類の酸を追加しました。本品目群は、極微量の成分を分析するLC/MSに最適な試薬です。

### 規格例

	酢酸	ギ酸
外観	無色透明の液体	無色透明の液体
含量(HPLC)	99.5%以上	99.5%以上
蛍光試験	試験適合	試験適合
LC/MS分析適合性試験	試験適合	試験適合

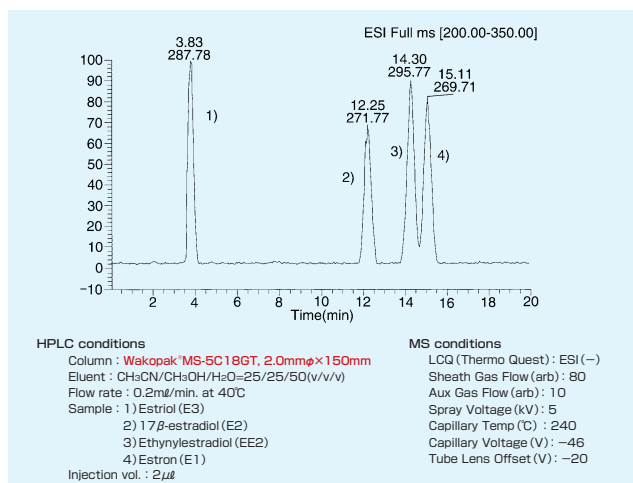
コードNo.	品名	規格	容量	希望納入価格(円)
018-20061	Acetic Acid	LC/MS用	50ml	5,500
067-04531	Formic Acid	LC/MS用	50ml	9,000
012-19851	Acetonitrile	LC/MS用	1ℓ	5,600
018-19853			3ℓ	13,000
138-14521	Methanol	LC/MS用	1ℓ	1,600
134-14523			3ℓ	3,400

## LC/MS用HPLCカラム Wakopak® MS-5C18GT



本品は、LC/MS分析用に最適化されたパッドカラムです。充てん剤は高分離性・高耐久性を示すODS充てん剤を採用、さらにステンレスカラム管内壁はガラスライニング処理を施し、最大限に不活性化処理し、カラムインレット・アウトレットフリットには高純度チタンを使用し非特異的吸着を最小限に抑えています。

### エストロゲンの分析



コードNo.	品名	カラムサイズ	カラムタイプ	カラム記号	希望納入価格(円)
001-00030	Wakopak® MS-5C18GT	2.0mmφ×50mm	デュボン	ノニD	49,000
		2.0mmφ×100mm		ノネD	56,000
		2.0mmφ×150mm		ノAD	59,000

## 改正水道法対応 水質分析用試薬



水道法は、平成4年の改正以来10年が経過し、水道水の水質を取り巻く環境も大きく変化した事、また世界保健機構(WHO)での飲料水水質ガイドライン全面改訂などを踏まえ、平成15年5月に水質基準が改定され、平成16年4月より施行されました。

当社では、この改正に合わせて新たにホルムアルデヒド、非イオン界面活性剤、総有機炭素などの各種標準液を追加発売しました。

### ハロ酢酸試験用 混合標準液

コードNo.	品名	規格	容量	希望納入価格(円)
035-19321	3 Chlorinated Acetic Acids Mixture Standard Solution (1mg/ml t-Butyl Methyl Ether Solution) 内容: クロロ酢酸、ジクロロ酢酸、トリクロロ酢酸	水質試験用	1ml×5A	7,000
086-07261	Halogenated Acetic Acid Mixture Standard Solution (1mg/ml t-Butyl Methyl Ether Solution) 内容: ブロモ酢酸、クロロ酢酸、ジクロロ酢酸、トリクロロ酢酸	水質試験用	2ml×10A	12,000

### ハロ酢酸試験用 内部標準液

コードNo.	品名	規格	容量	希望納入価格(円)
203-15981	1, 2, 3-Trichloropropane Standard Solution (1mg/ml t-Butyl Methyl Ether Solution)	水質試験用	1ml×5A	5,500

### ホルムアルデヒド試験用 標準液

コードNo.	品名	規格	容量	希望納入価格(円)
063-04511	Formaldehyde Standard Solution (1mg/ml Methanol Solution)	水質試験用	1ml×5A	5,600

### ホルムアルデヒド試験用 内部標準液

コードNo.	品名	規格	容量	希望納入価格(円)
034-19031	1-Chlorodecane Standard Solution (1mg/ml Hexane Solution)	水質試験用	1ml×5A	5,000

### 非イオン界面活性剤試験用 標準液

コードNo.	品名	規格	容量	希望納入価格(円)
081-08171	Heptaethylene Glycol Monododecyl Ether Standard Solution (1mg/ml Methanol Solution)	水質試験用	1ml×5A	7,000

### 総有機炭素試験用 標準液

コードNo.	品名	規格	容量	希望納入価格(円)
167-21341	Potassium Hydrogen Phthalate Standard Solution (as C: 1mg/ml Water Solution)	水質試験用	50ml	4,000



## 排水試験用試薬



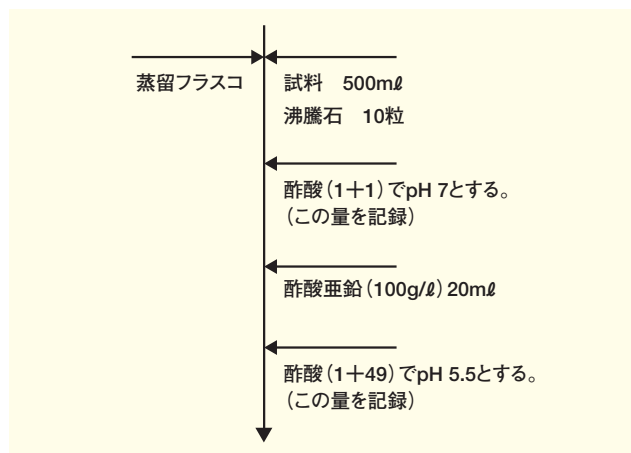
### シアン

かつてシアンは、鉱山排水やめっき処理工場の排水などからしばしば検出されましたが、近年ではきびしい規制により排水から検出されることはほとんどありません。しかし、微量でも非常に強い毒性があり今後も徹底した管理が必要とされています。JIS K 0102（工場排水試験方法）では、シアンの分析法としてピリジン-ピラゾロン吸光光度法、4-ピリジカルボン酸-ピラゾロン吸光光度法、イオン電極法が記載されています。当社では、これら公定法に対応した試薬を取揃えています。

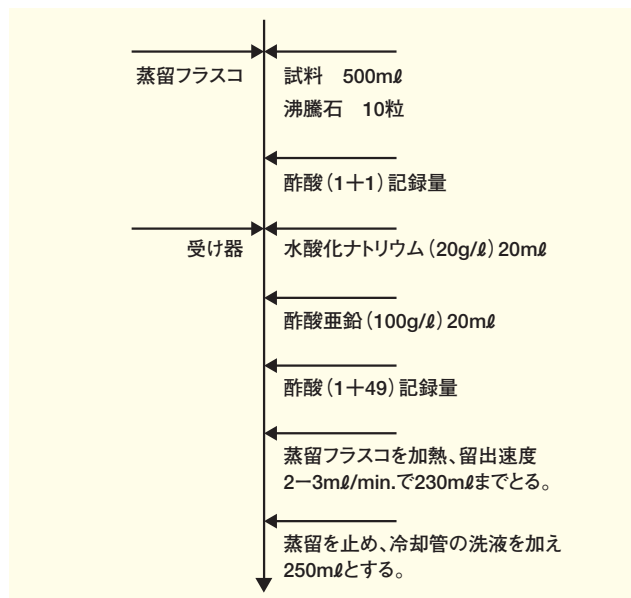
### 前処理

加熱蒸留法（pH 5.5で酢酸亜鉛の存在下で発生するシアン化水素）<sup>(※)</sup>

#### 【予備試験】



#### 【試料の前処理】



(※) この他通気法（pH 5.0で発生するシアン化水素）も記載されています。

### 分析のフローシート

#### 4-ピリジカルボン酸-ピラゾロン吸光光度法



コードNo.	品名	規格	容量	希望納入価格(円)
017-00256	Acetic Acid	試薬特級	500ml	800
017-00251			3 l	3,850
017-19605	Acetic Acid (1+8)	排水試験用	500ml	2,400
045-02916	N,N-Dimethylformamide	試薬特級	500ml	1,450
045-02911			3 l	5,100
193-02862	Disodium Hydrogen-phosphate	試薬特級	25g	830
197-02865			500g	1,700
080-01066	Hydrochloric Acid	試薬特級	500ml	600
080-01061			4kg	2,800
165-09502	3-Methyl-1-phenyl-5-pyrazolone	試薬特級	25g	2,600
167-09501			100g	6,000
162-01072	Phenolphthalein	試薬特級	25g	1,600
166-03611	Potassium Cyanide	試薬特級	5g	750
165-04242	Potassium Dihydrogen-phosphate	試薬特級	25g	780
169-04245			500g	1,250
162-11842	4-Pyridinecarboxylic Acid	シアン定量用	25g	2,100
032-02182	Sodium p-Toluenesulfonylchloramide Trihydrate	試薬特級	25g	1,100
030-02183			100g	2,200
036-02185	【Chloramine T】		500g	4,000
197-02206	Sodium Hypochlorite Solution	Pr.G	500ml	650
263-01795	10w/v% Zinc Acetate Solution	排水試験用	500ml	3,000

## ノニルフェノール・ オクチルフェノールを特異的に定量

日本エンバイロケミカルズ株式会社

環境汚染診断薬エコロジーナ®  
「AP ELISAキット」、「AP+APE ELISAキット」

改良新発売!!

アルキルフェノール類 (AP) は界面活性剤の原料やプラスチック製品の酸化防止剤として広範囲に利用されており、国内で年間約2万トン (ノニルフェノール) が生産されています。近年、アルキルフェノールのエストロゲン様作用が指摘されるとともに、野生生物に対して性分化異常や繁殖不全を引き起こすことが報告されています。アルキルフェノールは河川水や下水放流水中에서도検出されており、環境中での挙動が注目されています。

## 環境汚染診断薬エコロジーナ®「AP ELISAキット」が 新しくバージョンアップしました!!

新AP ELISAキットは、ノニルフェノール (NP)・オクチルフェノール (OP) を特異的に認識し、エチレンオキサイド鎖 (EO鎖) を持つアルキルフェノールエトキシレート (APE) にはほとんど反応しません。

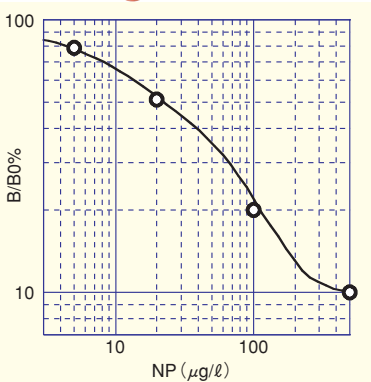
「AP ELISAキット」、「APE ELISAキット」、「AP+APE ELISAキット」と3種類のラインナップを揃え、それぞれの用途に合わせてキットをお選びいただけます。

※新APキットの発売に伴い、旧APキットの名称を  
「AP+APE ELISAキット」に変更しました。

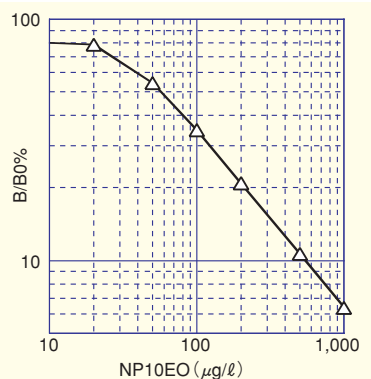


### 標準曲線及び定量範囲

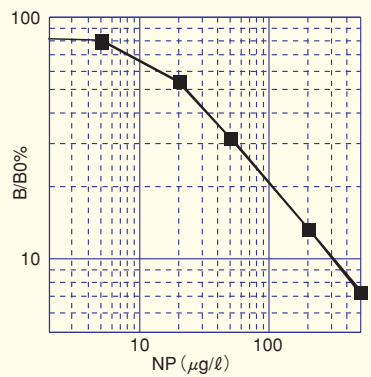
AP ELISA : 5-500 µg/l



APE ELISA : 20-1,000 µg/l



AP+APE ELISA : 5-500 µg/l



### AP ELISA キットの交差反応性

Compounds	Cross Reactivity (%)		
	AP ELISA	APE ELISA	AP+APE ELISA
Nonylphenol (NP)	100	2.1	100
Octylphenol (OP)	96	4.0	187
Nonylphenol Ethoxylate (NPnEO)			
NP1EO	1.2	20	127
NP2EO	2.1	40	175
NPnEO (n≐5)	3.2	80	140
NPnEO (n≐7.5)	4.5	100	112
NPnEO (n≐10)	4.9	100	100
Octylphenol Ethoxylate (OPnEO)			
OPnEO (n≐10)	2.9	230	156
Nonylphenoxy Acetic Acid (NPnEC)			
NP1EC	0.5	200	273
NP2EC	1.5	270	423
NP3EC	3.8	—	423
Anionic Surfactants			
Linear Alkylbenzene Sulfonates (LAS)	<0.1	<0.2	0.4
Sodium Dodecyl Sulfate (SDS)	<0.1	<0.2	0.3
Alkylether Sulfate (AES)	<0.1	<0.2	<0.1
Sodium Laurate (SOAP)	<0.1	<0.2	<0.1

コードNo.	メーカーコード	品名	容量	希望納入価格 (円)
<b>■ノニルフェノール (NP)・オクチルフェノール (OP) 測定用</b>				
300-15101	92957	AP ELISA キット (マイクロプレート)	1キット (96回用)	70,000
<b>■アルキルフェノール類 (AP)+アルキルフェノールエトキシレート (APE) 測定用</b>				
307-15111	92055	AP+APE ELISA キット (マイクロプレート) (旧AP ELISAキット:旧コードNo. 302-08691)	1キット (96回用)	70,000
<b>■アルキルフェノールエトキシレート (APE) 測定用</b>				
304-06071	91016	APE ELISA キット (マイクロプレート)	1キット (96回用)	70,000
301-06081	91017	APE ELISA キット (チューブ)	1キット (20回用)	50,000

## 生薬標準品



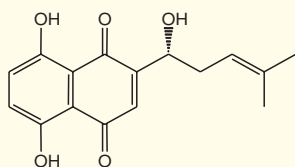
## シコニン標準品及びアルカニン標準品

日本各地、中国、朝鮮半島に自生する多年生草ムラサキ (*Lithospermum erythrorhizon* Sieb. 'et Zucc.) の根には、シコニン成分が含有されています。このムラサキ根から抽出された赤紫色色素は、化粧品原料にも使用されています。シコニン有効成分の薬理作用は抗炎症作用、創傷治癒促進作用、抗腫瘍作用などが報告されています。このシコニンには、光学異性体としてアルカニンが存在します。

今回商品化したシコニン標準品及びアルカニン標準品は第14改正日本薬局方に記載されており、シコニン有効成分の確認及び成分含量試験に使用されます。

### シコニン標準品

起 源： *Lithospermum erythrorhizon* Siebold et Zuccarini (Boraginaceae)  
 化学名： (+)-5,8-dihydroxy-2-(1-hydroxy-4-methyl-3-pentenyl)-1,4-naphthoquinone  
 CAS No.： [517-89-5]



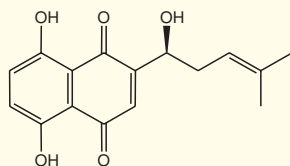
C<sub>16</sub>H<sub>16</sub>O<sub>5</sub>=288.30

アセトン溶状： 澄明  
 含量 (HPLC)： 99.0%以上

コードNo.	品 名	規 格	容 量	希望納入価格(円)
191-13331	Shikonin Standard	生薬試験用	10mg	30,000

### アルカニン標準品

起 源： *Lithospermum erythrorhizon* Siebold et Zuccarini (Boraginaceae)  
 化学名： (-)-5,8-dihydroxy-2-(1-hydroxy-4-methyl-3-pentenyl)-1,4-naphthoquinone  
 CAS No.： [517-88-4]



C<sub>16</sub>H<sub>16</sub>O<sub>5</sub>=288.30

アセトン溶状： 澄明  
 含量 (HPLC)： 99.0%以上

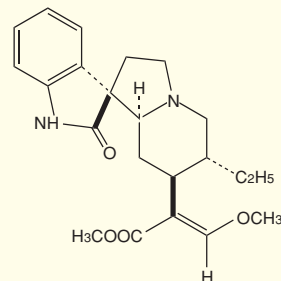
コードNo.	品 名	規 格	容 量	希望納入価格(円)
013-19901	Alkannin Standard	生薬試験用	10mg	30,000

## リンコフィリン標準品及びヒルスチン標準品

リンコフィリンとヒルスチンは生薬チョウトウコウより分離精製されたアルカロイドです。第14改正日本薬局方第一追補記載のリンコフィリン・ヒルスチンの確認及び成分含量試験に使用されます。

### リンコフィリン標準品

起 源： *Uncaria rhynchophylla* Miquel, *Uncaria sinensis* Haviland  
*Uncaria macrophylla* Wallich (Rubiaceae)  
 化学名： (7β,16E,20a)-16,17-Didehydro-17-methoxy-2-oxocorynoxan-16-carboxylic acid methyl ester  
 CAS No.： [76-66-4]



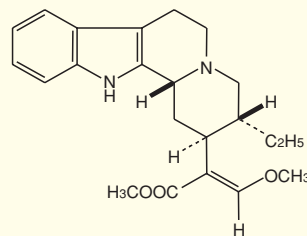
C<sub>22</sub>H<sub>28</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>=384.47

アセトン溶状： 澄明  
 TLC試験： 限度内  
 含量 (HPLC)： 99.0%以上

コードNo.	品 名	規 格	容 量	希望納入価格(円)
186-01871	Rhynchophylline Standard	生薬試験用	10mg	23,000

### ヒルスチン標準品

起 源： *Uncaria rhynchophylla* Miquel, *Uncaria sinensis* Haviland  
*Uncaria macrophylla* Wallich (Rubiaceae)  
 化学名： (3β,16E)-16,17-Didehydro-17-methoxycorynan-16-carboxylic acid methyl ester  
 CAS No.： [7729-23-9]



C<sub>22</sub>H<sub>28</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>=368.47

メタノール溶状： 澄明  
 含量 (HPLC)： 98.0%以上

コードNo.	品 名	規 格	容 量	希望納入価格(円)
082-08081	Hirsutine Standard	生薬試験用	5mg	35,000

## 話題のフルオラス化学関連商品



### ふっ素化試薬

### フルオラス樹脂製品

パーフルオロヘキシル基などのフルオラス(フルオロカーボン親和)性を有するふっ素含量の多い化合物は、その特異な物性を利用して従来の有機層水層との分離など、様々な新規の応用例が提案されています。

この度、Fluorous社の注目のふっ素化試薬とフルオラス樹脂関連製品の販売を開始します。フルオラス樹脂のプレパックドカラムSPEカートリッジを先行在庫しました。今後、各フルオラス化試薬を在庫する予定です。

### 特長

- 有機層水層とも分離した第3のフルオラス層を形成。
- パーフルオロ化試薬による修飾により、特異な物性を利用し効率的分離に活用可能。
- パーフルオロ化された樹脂(SPEカートリッジ)の併用により、さらに効率的に一斉分離が可能。
- 対象化合物の合成経路によって自由に活用法をデザイン可能。
- 樹脂は10回繰り返し使用可能。
- 樹脂単独の他、バックドカラム、TLC、HPCLカラムを提供。
- バックドカラムは、様々な形状にカスタマイズされたシステムにも対応。
- リサイクルで試薬の再活性化が可能。

### 製品形態

- ふっ素化試薬
- フルオラス樹脂関連製品

バックドカラム、TLC、樹脂単独、HPLCカラムのほか、カスタマイズされたシステムにも対応します。



SPE Columns



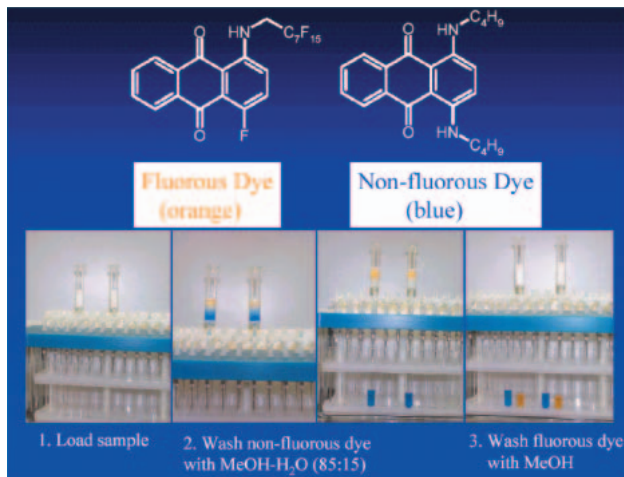
樹脂単独

バックドカラム

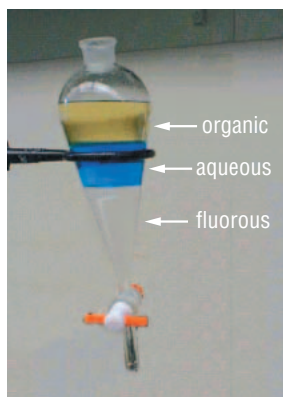
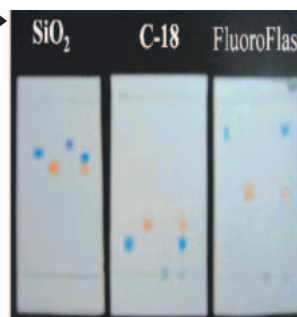


HPLCカラム

### 使用例



フルオラス化試料とフルオラス樹脂の併用時の分離



有機層水層との分離

### プレパックドカラム

コードNo.	メーカーコード	品名	容量	希望納入価格(円)
583-79751	801-0027S	FluoroFlash® SPE Cartridges, 2grams, 8cc tube-Flanged	5pack	17,800
—	801-0027S	FluoroFlash® SPE Cartridges, 2grams, 8cc tube-Flanged	20pack	69,000
586-79741	801-0027FL	FluoroFlash® SPE Cartridges, 2grams, 8cc tube-Flangeless	20pack	67,700
—	801-0027RL	FluoroFlash® SPE Cartridges, 2grams, 8cc tube-Rimless	20pack	69,000
586-79763	801-0058S	FluoroFlash® SPE Cartridges, 5grams, 10cc tube	2pack	28,600
—	801-0058S	FluoroFlash® SPE Cartridges, 5grams, 10cc tube	10pack	75,000
587-79771	801-0109S	FluoroFlash® SPE Cartridges, 10grams, 60cc tube	1pack	19,300
—	801-0109S	FluoroFlash® SPE Cartridges, 10grams, 60cc tube	5pack	75,000
584-79781	801-0209B	FluoroFlash® SPE Cartridges, 20grams, 60cc tube	2pack	67,700
—	801-0209A	FluoroFlash® SPE Cartridges, 20grams, 60cc tube	5pack	120,000

※その他製品については、お問合せ下さい。

## 迅速形質転換コンピテントセル ● ニッポンジーン ECOS™ Competent *E.coli*

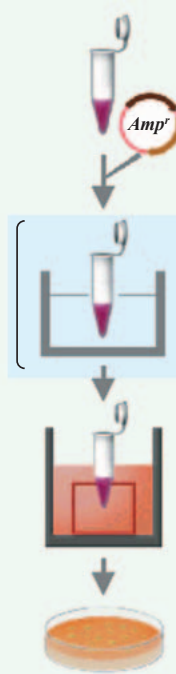
組換えDNA実験における基礎技術の一つに、大腸菌の形質転換があります。大腸菌の形質転換にはコンピテントセルという外部のDNAを取り込みやすくした大腸菌が使用されます。コンピテントセルの調製方法には、塩化カルシウム法、塩化ルビジウム法、Hanahan法などが一般的に知られており、これまで様々な改良が行われてきました。これらの方法に従って調製されたコンピテントセルでは、 $10^7 \sim 10^9$  cfu/ $\mu$ g DNAの形質転換体を得ることができ、現在様々な試薬メーカーから高い形質転換効率のコンピテントセルが販売されています。市販されている一般的なコンピテントセルの問題としては、形質転換操作に1.5~2.5時間が必要なことや、凍結融解や長期間の保存によって形質転換効率が著しく低下することが挙げられます。

本品はこのようなコンピテントセルの問題を改善したものであり、以下の特長を持った全く新しいコンピテントセルです。

### 特長

- 最短1分間での形質転換が可能  
(1分間プロトコルでの効率:  $\geq 1 \times 10^7$  cfu/ $\mu$ g pUC19 DNA)
- 高効率を維持したままでの時間短縮が可能  
(ECOS™ 6分間プロトコル)
- 凍結融解に対する高い耐性能力
- 高い長期保存安定性

### ECOS™ 1分間(6分間)プロトコル



- ・ 氷上でコンピテントセルを融解する。
- ・ 直ちに、4℃または氷上で冷却したプラスミド溶液またはライゲーション溶液を添加する。
- ・ 直ちにボルテックスで1秒間攪拌する。

**6分間プロトコルの場合**

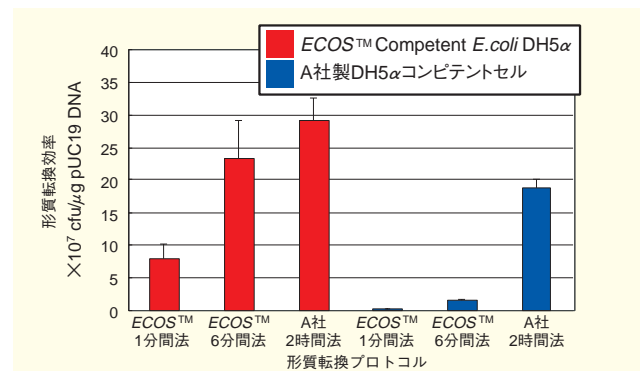
- ・ 氷上で5分間インキュベートする。
- 〔本操作により1分間プロトコルよりも2~3倍の形質転換効率を得ることができます。〕

- ・ 直ちに42℃で45秒間インキュベートする。
- ・ 直ちにボルテックスで1秒間攪拌する。
- ・ 直ちに全量をLBプレートに移して均一に塗布し、37℃で12~16時間インキュベートする。

\*1分間(6分間)プロトコルはセレクションにアンピシリンを使う場合にのみ有効です。薬剤耐性機構の違いにより、その他の薬剤(テトラサイクリン、カナマイシンなど)の場合は、形質転換効率が低下する場合があります。

### 実験1: プロトコルによる形質転換効率の変化

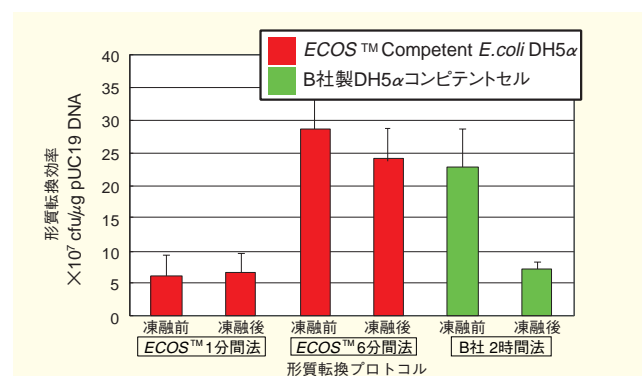
ECOS™ Competent *E.coli* DH5 $\alpha$ とA社製DH5 $\alpha$ コンピテントセルをECOS™ 1分間プロトコル、ECOS™ 6分間プロトコル、A社標準プロトコル(約2時間)でそれぞれ使用し、形質転換効率を測定した。本実験では、50 $\mu$ lのコンピテントセルを1pgのpUC19 DNAで形質転換し、全量をLBプレート(50 $\mu$ g/mlアンピシリン)に塗布した。



ECOS™ Competent *E. coli* DH5 $\alpha$ ではECOS™ 1分間及び6分間プロトコルでも高い形質転換効率を維持することができた。一方、A社製DH5 $\alpha$ コンピテントセルをECOS™ 1分間及び6分間プロトコルで使用した場合は形質転換効率が大幅に低下した。

### 実験2: 凍結融解による形質転換効率の変化

ECOS™ Competent *E. coli* DH5 $\alpha$ とB社製DH5 $\alpha$ コンピテントセルを氷上で融解後、軽くタッピングを行ってから-80℃で再凍結し、24時間後に形質転換効率を測定した。形質転換プロトコルには各製品の標準法を用い、その他の条件は実験1と同様に行った。



ECOS™ Competent *E. coli* DH5 $\alpha$ では凍結融解後でも1分間プロトコルではほぼ100%、6分間プロトコルでも約85%の効率を維持していた。一方、B社製DH5 $\alpha$ コンピテントセルでは約30%の効率しか維持することができなかった。

コードNo.	品名	容量	希望納入価格(円)
314-06131	ECOS™ Competent <i>E. coli</i> DH5 $\alpha$	50 $\mu$ l × 3本	9,000
310-06133	ECOS™ Competent <i>E. coli</i> DH5 $\alpha$	50 $\mu$ l × 25本	37,500
316-06191	ECOS™ Competent <i>E. coli</i> JM109	50 $\mu$ l × 3本	9,000
312-06193	ECOS™ Competent <i>E. coli</i> JM109	50 $\mu$ l × 25本	37,500

## Fidelity Systems社のTOPO DNA Polymeraseシリーズ



本品は、*Pyrococcus* DNA polymerase及び*Taq* DNA polymerase由来の触媒ドメインとメタン細菌である*Methanopyrus kandleri*由来の非特異的なDNA結合ドメインを融合した新規の耐熱性DNA polymeraseです。また、本酵素群は、トポイソメラーゼ活性を有しており、これまでの酵素では困難であった、GC-rich領域の増幅が本酵素群のみの反応で可能です。

今回、実際に通常の*Taq* DNA polymeraseでは増幅しないplasmidクローンを鋳型に用いて、各酵素の性能を検討しました。

### 実験1

*Taq* DNA polymerase (wildタイプ)とTOPOTAQ DNA Polymeraseを用いて、種々のGC-rich領域断片を有するベクターを鋳型に増幅を試みた(図1)。この4サンプルは、多くのGCクラスターを持つ領域を含んでいるため通常の*Taq* DNA polymeraseでは増幅が困難な領域である。

GC-rich領域を含む4サンプル(lane1, 2, 3, 4)において*Taq* DNA polymerase (wildタイプ)では、全く増幅することができなかったが、TOPOTAQ DNA Polymeraseは、すべてのサンプルを完全に増幅することができた。

\*GC-rich領域を含む4サンプルは、ベクターの制限酵素処理により、各断片が挿入されていることを確認している。

### 実験2

同様の実験をPYROTOPO及びTOPO-TAQ100 DNA Polymeraseを用いて増幅を試みた(図2)。

PYROTOPO、TOPOTAQ100 DNA Polymeraseとともに、約2,300bpのバンド以外はすべて増幅することができた。20cyclesでの反応では約2,300bpのバンドは薄っすらとしか検出できなかったが、サイクル数を多くすれば検出が可能と思われる。

### 実験3

GC-rich用のBufferを用いた増幅とTOPOTAQ DNA Polymeraseを用いた増幅を比較検討した(図3)。

GC-rich bufferでの増幅は、すべてのサンプルにおいて増幅が可能であったが、非特異的な増幅断片も同時に検出されている。さらに、高いGC配列を含まないβ-actin、GAP3DHの増幅効率が逆に低下する傾向にある。一方、TOPOTAQ DNA Polymeraseは、内在性のHot Start機能を有するため非特異的な断片も見られず、さらに、GC配列の有無に関わらず、すべてのサンプルにおいて良好なバンドを検出することができた。本TOPOTAQ DNA Polymeraseは非常に高いパフォーマンスを有する酵素で

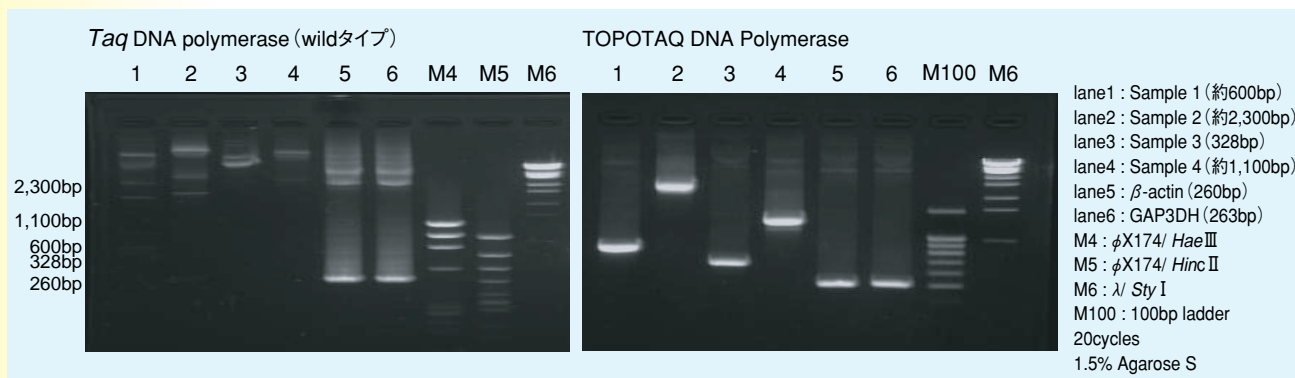


図1.

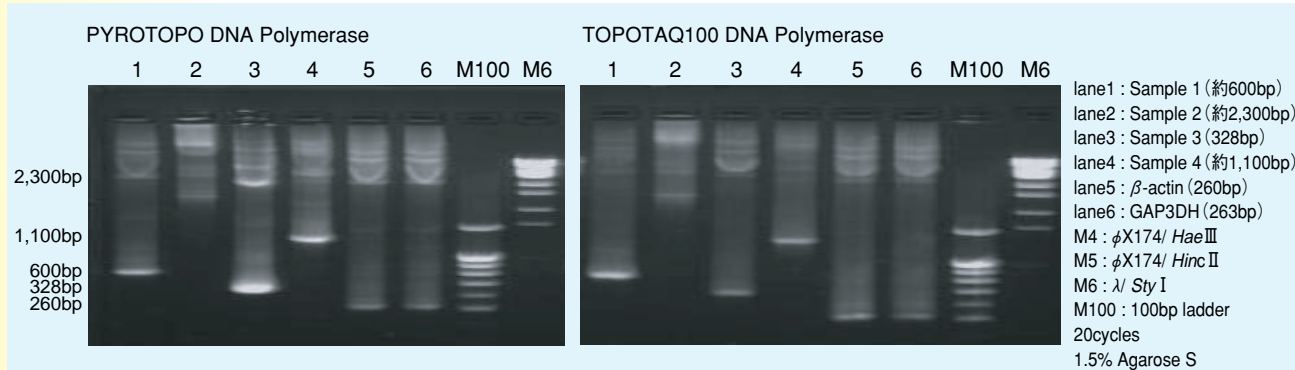


図2.

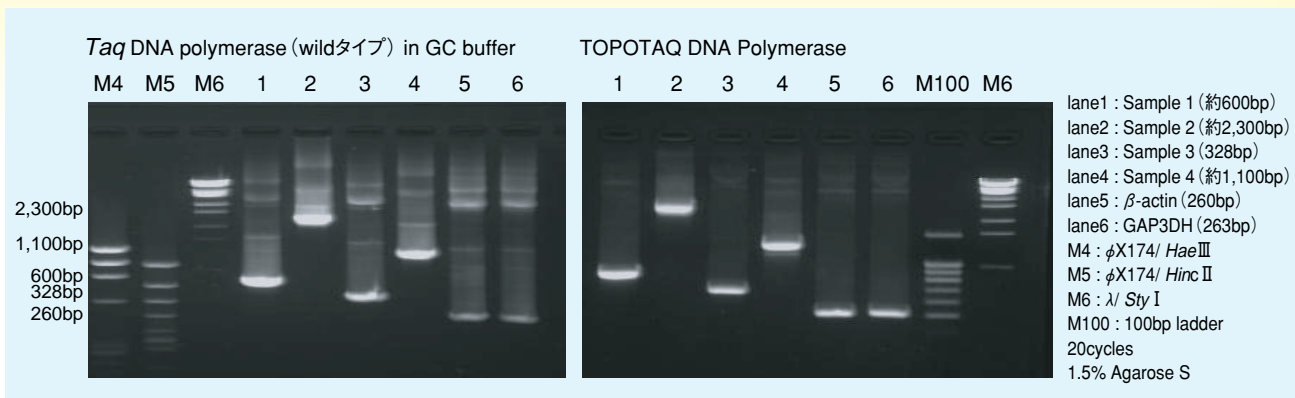


図3.

あるといえる。

### まとめ

今回検討した3種類の酵素とも、通常のTaq DNA polymeraseでは増幅することのできない領域を増幅することができた。特に、TOPOTAQ DNA Polymeraseは、すべてのサンプルにおいて良好な結果が得られた。スクリーニングやクローニングなどのファーストチョイスの酵素として有用であることを示す。また、PYROTOPO DNA Polymeraseは、3'-5'エキソヌクレアーゼ活性を有することによりFidelityの高い増幅が可能であり、タンパク質発現ベクター作成用として有用である。

#### [参考文献]

- 1) Pavlov, A. R., Belova, G. I., Kozyavkin, S. A. and Slesarev, A. I.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **99**, 13510 (2002).

表1. 各酵素の特長比較表

	TOPOTAQ	TOPOTAQ100	PYROTOPO
酵 素	34 $\mu$ l	50 $\mu$ l	50 $\mu$ l
2XAmplification buffer	1ml	1ml	0.25ml
1XDilution buffer	100 $\mu$ l		
濃 度	3.0U/ $\mu$ l	2.0U/ $\mu$ l	2.0U/ $\mu$ l
特 長	非常に増幅速度が速い。夾雑物の多いサンプルでも増幅できる。メタン細菌である <i>Methanopyrus kandleri</i> 由来の非特異的DNA結合ドメインを持つ。内因性のHot Start機能を持つ。	100 $^{\circ}$ Cの変性を必要とする反応に最適。120 $^{\circ}$ Cまで酵素が安定。メタン細菌である <i>Methanopyrus kandleri</i> 由来の非特異的DNA結合ドメインを持つ。100 $^{\circ}$ C以下の変性温度では効率よく反応しない。	100 $^{\circ}$ Cの変性を必要とする反応に最適。120 $^{\circ}$ Cまで酵素が安定。メタン細菌である <i>Methanopyrus kandleri</i> 由来の非特異的DNA結合ドメインを持つ。100 $^{\circ}$ C以下の変性温度では効率よく反応しない。
耐熱温度	120 $^{\circ}$ C	120 $^{\circ}$ C	120 $^{\circ}$ C
高塩濃度サンプル対応	150mmol/lまで	250mmol/lまで	200mmol/lまで
5'-3'エキソヌクレアーゼ活性	-	-	-
3'-5'エキソヌクレアーゼ活性	-	-	+
応 用 例	GC含量に関係なく、すべてのDNA配列に対応	大腸菌培養液からの直接の増幅	タンパク質発現ベクター作製用の鋳型調製。特に、高いFidelityを要求するGC-rich領域の増幅 血液やインジゴ染料に対して最も高い耐性を持つ

コードNo.	メーカーコード	品 名	容 量	希望納入価格 (円)
577-98031	P016	PYROTOPO DNA Polymerase	100units	25,000
587-81501	H016	PYROTOPO HiFi DNA Polymerase*	100units	35,000
574-98041	T016	TOPOTAQ DNA Polymerase	100units	25,000
571-98051	Q016	TOPOTAQ100 DNA Polymerase	100units	25,000

\*本酵素はTOPOTAQ DNA Polymeraseと超安定の*Methanopyrus Kandleri*由来のDNA topoisomerase酵素活性を持つハイブリッド酵素です。また高いFidelityを持っています。

## スーパーセップ専用 電気泳動槽を新発売! スーパーセパレーター™



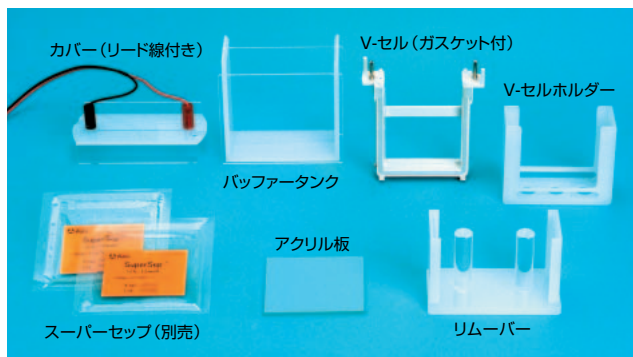
ご好評をいただいておりますポリアクリルアミドプレキャストゲル「スーパーセップ™」用の専用泳動槽「スーパーセパレーター™」が新発売となりました。簡単なセッティングで2枚のゲルを泳動できます。サンプルのアプライ状況は、ウェル背面の白色板により鮮明に確認でき、付属の白色アクリル板を用いると泳動状況も鮮明に確認できます。また、陽極槽と陰極槽が分離しているため、ランニングバッファーを別々に回収し、再利用することも可能です。



### 特長

- ゲルのセッティングは差し込むだけです。(使用方法①、②)
- ゲルの取り出しは、押し出すだけです。(使用方法⑥)
- サンプルのアプライ状況が鮮明に確認できるように、ウェル背面に白色板を採用しています。
- 低価格です。

### セット内容

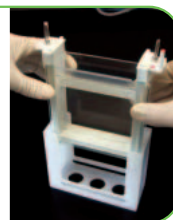


### 使用方法

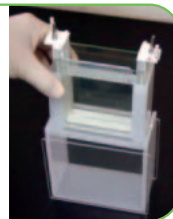
①スーパーセップ(ゲル)をV-セルにセットします。



②V-セルをV-セルホルダーに差し込みます。



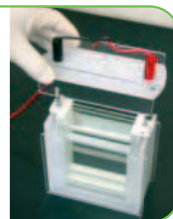
③泳動バッファーを満たしたバッファータンク(陽極バッファー槽)にV-セルホルダーを入れます。



④V-セルホルダー(陰極バッファー槽)に泳動バッファーを入れます。



⑤リード線付カバーでフタをし、泳動します。



⑥泳動後は、バッファーを取り除き、リムーバーでゲルプレートを押し出します。

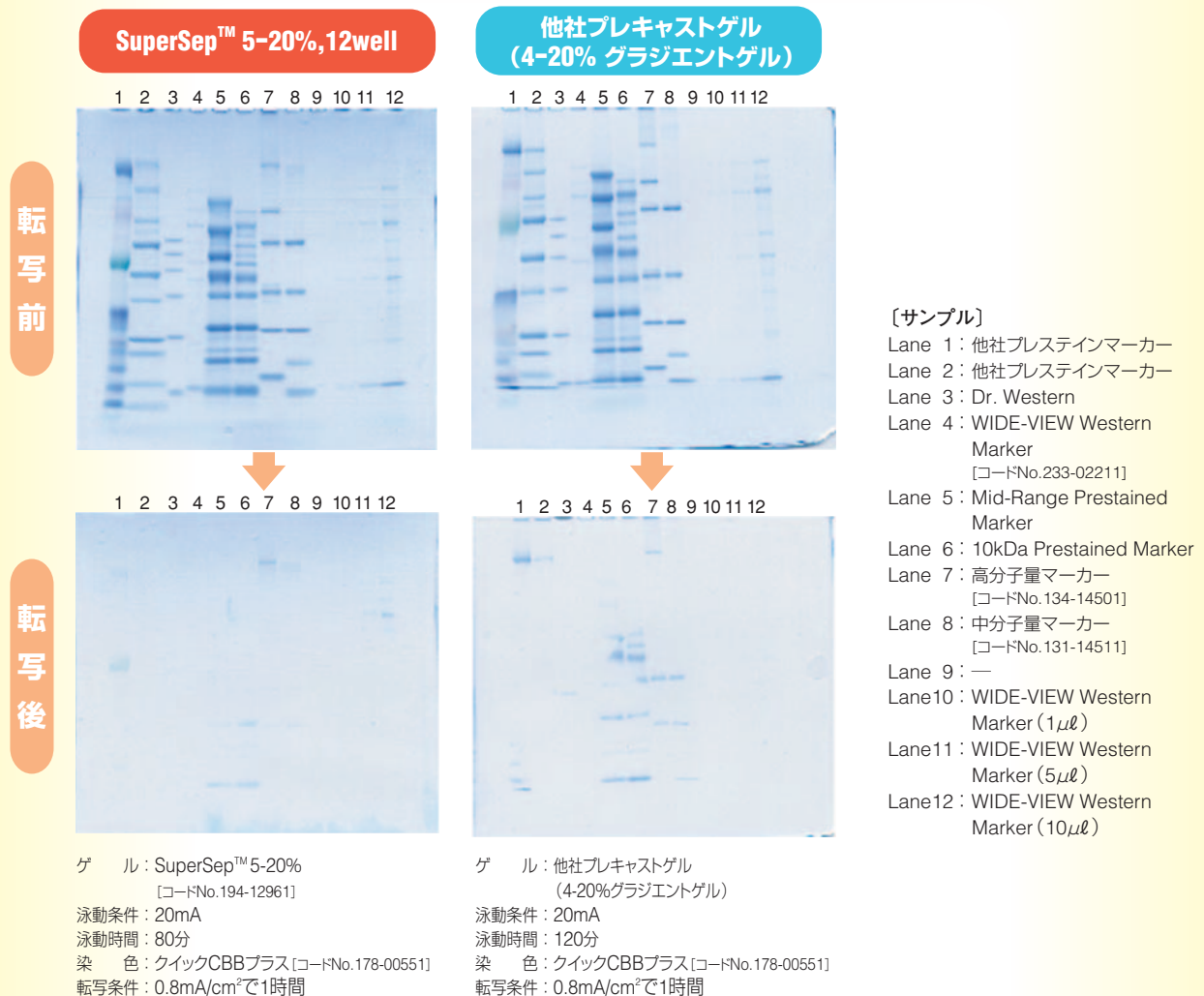


コードNo.	品名	規格	容量	希望納入価格(円)
190-13421	SuperSeparator™	電気泳動用	1セット	38,000



## 「SuperSep™」のウエスタンブロットにおける転写効率

ポリアクリルアミドプレキャストゲル「SuperSep™」のウエスタンブロットにおけるPVDF膜への転写効率を調べました。泳動は20mA/枚、転写はセミドライ式のプロットング装置を用いて0.8mA/cm<sup>2</sup>で1時間行った結果、汎用されている他社プレキャストゲルと比較して、転写後のゲル上のタンパク質バンドが少なく、明らかに「SuperSep™」の転写効率が良いことがわかりました。



コードNo.	品名	規格	容量	希望納入価格(円)
192-12901	SuperSep™ 7.5%, 12well	電気泳動用	10枚	12,000
199-12911	SuperSep™ 7.5%, 17well	電気泳動用	10枚	12,000
196-12921	SuperSep™ 10%, 12well	電気泳動用	10枚	12,000
193-12931	SuperSep™ 10%, 17well	電気泳動用	10枚	12,000
190-12941	SuperSep™ 12.5%, 12well	電気泳動用	10枚	12,000
197-12951	SuperSep™ 12.5%, 17well	電気泳動用	10枚	12,000
194-13061	SuperSep™ 15%, 12well	電気泳動用	10枚	18,000
191-13071	SuperSep™ 15%, 17well	電気泳動用	10枚	18,000
194-12961	SuperSep™ 5-20%, 12well	電気泳動用	10枚	12,000
191-12971	SuperSep™ 5-20%, 17well	電気泳動用	10枚	12,000
198-12981	SuperSep™ 10-20%, 12well	電気泳動用	10枚	12,000
195-12991	SuperSep™ 10-20%, 17well	電気泳動用	10枚	12,000
190-13301	SuperSep™ 12.5%, 2D	電気泳動用	10枚	18,000
197-13291	SuperSep™ 5-20%, 2D	電気泳動用	10枚	18,000

## 高松 豊吉(1852~1937)

大阪大学名誉教授 芝 哲夫

明治11年(1878)4月26日に東京神田一ツ橋の現在の学士会館の場所にあった東京大学教員控室で東京大学の卒業生と在学生二十数名によって化学会の第1回会合が開かれた。これが現在の日本化学会の創立の日であった。しかし当時唯一のわが国の化学者養成機関である東京大学理学部化学科における教育は英国人化学者のR.W.アトキンソンAtkinsonとE.ダイバースDiversによって行われていた。この東京大学卒業生の中から米国に留学していた松井直吉が明治13年(1880)に、英国留学の桜井錠二が明治15年(1882)にそれぞれ帰国して東京大学化学科教授に就任して、漸く日本人による独自の化学教育体制が始まるのである。

東京大学の初期の卒業生の中、桜井錠二や久原躬弦は純正化学の日本への導入を目標としたが、それに対して応用化学あるいは工業化学の育成は高松豊吉が中心となって推進された。この高松豊吉に焦点を当てた明治から大正にかけてのわが国の応用化学の始まりを振り返ってみたい。

高松豊吉は嘉永5年(1852)9月11日に江戸浅草で名主高松喜兵衛の二男として生まれた。明治4年(1871)に、後の東京大学に連なる南校に入学し、明治8年(1875)には改称された東京開成学校の化学科に進学して、明治11年(1878)に東京大学理学部となった化学科の第2回卒業生として卒業した<sup>1)</sup>。この第2回卒業生の中には後に高松と共に応用化学の研究と教育に携わった高山甚太郎や平賀義美がいた<sup>2)</sup>。高松はこの年、冒頭に述べた化学会の創立会員となっている。

高松は東京大学を卒業した年に、東京師範学校教員になるが、1年も経たぬ明治12年(1879)に文部省から英国へ留学を命じられ、マンチェスターのオーエンス大学に入学した。ここでは日本でも化学教科書の共著者として知られていたH.E.ロスコーRoscoeとC.シオルレンマーSchorlemmerに学んだ。製造化学の試験では最高得点をとって大学から書籍1冊を賞として貰ったという。この時東京大学の同級生平賀義美も同じ大学に留学して下宿を共にして、共に染色化学を修めた。



写真2. 東京瓦斯会社取締役時代の高松豊吉

2年後、高松はさらに染料、医薬の製造化学を研究するためにドイツへ移り、ベルリン大学のA.W. Hofmann研究室に入った。そこには当時長井長義が助手として在籍していたが、二人の間の交流についての記録はない。

3年間の留学を終えて明治15年(1882)に帰国した高松は東京大学理学部講師となり、染料化学の講義を担当した。翌々年には教授となりアトキンソンの製造化学の講義を引き継いで担当した。高松は留学時代から日本における工業化学の振興を志していて、東京大学における化学教育を純正化学と応用化学に分離することを提唱して、それが明治18年(1885)に実現して、理学部から分離した工芸学部が新

設され、機械、土木、採鉱冶金の各学科と共に応用化学科が設けられ、これに高松と松井直吉が教授として移った。その翌年(1886)には、東京大学が東京帝国大学となった機会に工芸学部は工部大学校と合併して、工科大学応用化学科となった。これが東京大学工学部における応用化学の濫觴である。このようにして日本の応用化学の教育体制が整うのである。この頃高松は日本絵具の顔料の研究や藍靛(インジゴ)製造に関する研究を行って発表しているが、当時のわが国の応用化学の揺籃期の状況は高松に研究に専念することを許さなかった。明治26年(1893)に帝国大学令が施行されて、講座制が敷かれた時、高松は応用化学第一講座を担当し、第二講座の中沢岩太と共に応用化学教育を進めた。

明治18年(1885)には高松は現在の東京工業大学の前身である東京職工学校の教員を嘱託されてここでも染色法の講義をし、捺染法の実習を担当した。これは旧友で同校に居た平賀義美が農商務省に転じた後任であった。全く一握りの人事で当時の応用化学の教育が支えられていたことが分かる。これが後に東京工業大学において色染工科と紡織工科が設けられる基となった。このように高松は明治初期にわが国が応用化学専門家を必要とする時期に東京大学、東京職工学校において多くの後継者の養成に努力している。



写真1. 東京帝国大学工科大学応用化学教室中庭にて  
左より 高松豊吉 中澤岩太 久原躬弦

一方で日本の民生の発展は堪能な専門化学者の登場を必要とする場面が増えてきた。明治36年(1903)に東京瓦斯会社の渋沢栄一会長から高松に同会社に常務取締役役に就任の要請があり、高松はこれを受けて東京大学教授を辞任して東京瓦斯会社へ移った。明治42年(1909)には同会社の社長となり、石炭ガスの副産物のコークスやアンモニアの製造法の確立、ガスの燈火用から熱源用への転換などの課題を処理して、わが国のガス事業の基盤を築いた。

この頃の高松は七面八臂というか、多くの場面で指導的役割を担った。財団法人理化学研究所は大正2年(1913)に米国から帰朝した高峰讓吉の国民科学研究所設立の提案が基になっているが、その演説を行なった築地精養軒での歓迎会を幹旋したのが高松であり、その後、理化学研究所の設立準備のために結成された化学工業調査会の筆頭委員に高松の名が出ていてその推進役となった。こうして大正6年(1917)に財団法人理化学研究所が設立を見るが、そのために最も大きい貢献をしたのは桜井錠二と高松であった。

大正4年(1915)には現在の産業技術総合研究所の前身である工業試験所が深川越中島から渋谷幡ヶ町へ移転する時に、高松は所長となってその拡張発展に大きい貢献を果たした。その他に高松が就いた役職を列挙すると、明治29年(1896)から大正13年(1924)まで特許局審査官



写真3. 東京工業試験所所長時代の高松豊吉

として特許審査の任に当たり、大正9年(1920)には現在の学術会議につながる学術研究会議の化学部長に選ばれ、大正12年(1923)には帝國学士院の会員になった。その他明治末年から大正時代にかけて次に示す要職に就任した。工学院管理長、帝國発明協会発明館館長、各種勲業博覧会審査部長、化学協議会会長、東京博物館評議員等々である。さらに高松が取締役あるいは顧問となった関係会社は日本化学工業株式会社、日韓瓦斯株式会社、高砂香料株式会社、日本耐火防腐株式会社、赤線検温器株式会社、友玉園製陶所、ミツワ化学研究所など実に枚挙に遑がない<sup>1)</sup>。

明治27年(1894)から2年間、高松は日本化学会の会長を勤めているが、化学会創立50年の昭和3年(1928)には創立会員から会長が選ばれることになり、再度高松が会長に選任された。工業化学会においても明治43年(1910)と45年(1912)の2期に会長に就任している。

高松はまた重要な化学著作を残している。『化学教科書』は3冊より成り、高松の帝國大学工科大学教授時代の明治23、24、27年にそれぞれ発行されている。これは文部省の委嘱で尋常師範学校用に編纂されたもので、ドイツのホフマンの化学講義録を参考にして、無機化学と有機化学に分かれている<sup>2)</sup>。この書は理科教科書として横書の体裁を採用した最初であった<sup>3)</sup>。

明治初期に邦語としての化学用語を統一することは化学会としての重要な事業であった。高松もその出版委員として検討を重ねたが、訳語をめぐる館員の間に論争が起り、東京化学会としての統一意見をまとめるに至らなかったが<sup>4)</sup>、一応明治24年(1891)に『化学訳語集』<sup>5)</sup>が出版された。さらに高松は桜井錠二とともに、その不備な点を補い、訂正増補した『化学語彙』<sup>6)</sup>を明治33年(1900)に出版した。これはその後長く、実質的には公用訳語集としての役割を果たす事になり何度も版を重ねた。

高松が丹波敬三、田原良純と共同編纂した大書『化学工業全書』はわが国の化学工業全般の実態をはじめてまとめたもので、全23冊が明治28年(1895)から大正5



写真4. 英国工業会50周年に際して高松豊吉に贈られた名誉会員章

年(1916)まで30年間かけて逐次刊行された<sup>8)</sup>。また東京化学会創立25年に当る明治36年(1903)には東京化学会誌に「最近二十五年間における化学全般の進歩」と題する講演録を載せ、明治時代初中期のわが国の化学の実態をまとめた記録として残している<sup>9)</sup>。

昭和6年(1931)に高松がかつて英国留学時に創立会員となっていた英国工業化学会が50周年を迎えた時、その名誉会員に選ばれて招待を受けたが、80歳の高齢のため出席できなかったため、後でジプロマと記念牌が贈られてきて高松の晩年の栄誉を飾った。

高松豊吉は日本に应用化学を根付かせるために生まれてきた申し子のように一生を駆け抜けて、昭和12年(1937)9月27日に満85歳の生涯を閉じた。

#### 【参考文献】

- 1) 鴨居武編：『工学博士 高松豊吉傳』、(化学工業時報社)(1932)。
- 2) 田中芳雄：「日本の化学を築いた人たち VIII 高松豊吉先生」、化学、16(8)、706(1961)。
- 3) 三井澄雄：「高松豊吉と化学教育」、季刊科学教育研究、9、1996-24(2000)。
- 4) 東條恒雄：「高松豊吉」、科学主義工業、7(9)、98-103(1943)。
- 5) 広田綱蔵：『明治の化学者—その抗争と苦闘—』、(東京化学同人)(1988)。
- 6) 東京化学会編：『化学訳語集』、(東京化学会)(明治24年)。
- 7) 桜井錠二、高松豊吉：『稿本 化学語彙』、(内田老鶴圃)(明治33年)。
- 8) 高松豊吉、丹波敬三、田原良純編：『化学工業全書』第1編第1巻、(文部省)(明治23年)；第1編第2巻、(大日本図書)(明治24年)；第2編、(大日本図書)(明治27年)。
- 9) 高松豊吉：「最近二十五年間に於ける化学全般の進歩」、東京化学会誌、24、487(1903)。

# 広範囲のウエスタン用タンパク質分子量マーカー

## ワイドビュー™ウエスタンサイズマーカー



本品は、ウエスタン用のタンパク質サイズマーカーです。免疫グロブリンと結合能を持つ組換えタンパク質により、ウエスタンプロットの一次抗体、二次抗体の両方に反応します。さらに、組換えタンパク質は高純度に精製されていますので、シャープではっきりしたバンドが得られます。また、分子量は正確で再現性のある結果が得られます。

### 特長

- ウエスタンプロットで、直接マーカーが確認できます。
- バンドの分子量が広範囲です。(25-150k)
- マウス、ウサギ、ヤギなどの抗体に反応します。
- 使用方法が簡便です。
- 正確な分子量が求められます。

### 推奨アプライ量

1-5 $\mu$ l/lane

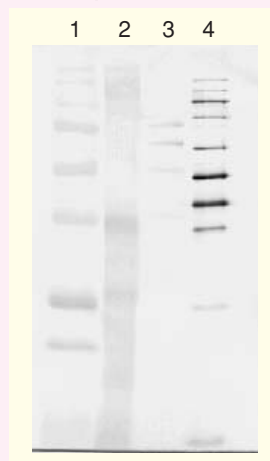
### 分子量範囲

25-150 (k)

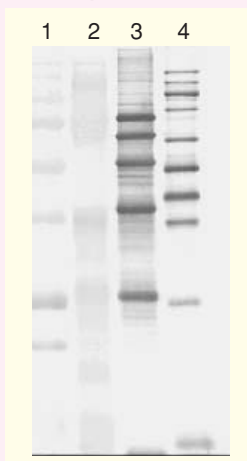
### 抗体の動物種による反応の違い

SDS-PAGE後、0.8mA/cm<sup>2</sup>でPVDF膜に転写し、一次抗体としてマウス及びウサギの抗ヒトIgM抗体を反応させました。検出は、当社のパスステインABC-POD (M) キット及びパスステインABC-POD (R) キットを用いました。その結果、両方の抗体で、きれいなバンドが得られました。

#### マウス抗体



#### ウサギ抗体



#### 〔サンプル〕

- Lane 1：他社プレステインマーカー  
Lane 2：他社プレステインマーカー  
Lane 3：Dr. Western  
Lane 4：WIDE-VIEW Western Size Marker

コードNo.	品名	規格	容量	希望納入価格(円)
233-02211	WIDE-VIEW Western Size Marker	電気泳動用	250 $\mu$ l	20,000

### 関連商品

#### 洗浄用バッファー

コードNo.	品名	規格	容量	希望納入価格(円)
160-20971	PBS-T, pH 7.4 (×10)	生化学用	500ml	4,800

収載されている試薬は、試験・研究の目的にのみ使用されるものであり、家庭用、医療用など他の用途には用いられません。

記載希望納入価格は本体価格であり消費税などが含まれておりません。

和光純薬時報 Vol.72 No.3

2004年7月15日 発行

発行責任者 松田知憲

編集責任者 大西礼子

発行所 和光純薬工業株式会社

〒540-8605 大阪市中央区道修町三丁目1番2号

TEL.06-6203-3741 (代表)

URL <http://www.wako-chem.co.jp>

印刷所 株式会社 林欧文堂

- 和光純薬時報に対するご意見・ご感想はこちらまでお寄せ下さい。

E-mail [oonishi.reiko@wako-chem.co.jp](mailto:oonishi.reiko@wako-chem.co.jp)

- 製品に対するお問合せはこちらまでお寄せ下さい。

フリーダイヤル 0120-052-099

フリーファックス 0120-052-806

E-mail [labchem-tec@wako-chem.co.jp](mailto:labchem-tec@wako-chem.co.jp)