

〔総説〕

「新規なキラルプレステッド酸触媒の開発
—金属を用いない新たな有機触媒の開発を目指して」
秋山隆彦 …… 2

「標準物質」 前田恒昭、宮崎晃一 …… 6

〈テクニカルレポート〉

「Evrogen社 Duplex-specific nuclease (DSN) を使用した
Normalization cDNA の作製」 林田幸信 …… 9

「DNA Extractor SP Kit (血中遊離DNA抽出用試薬) の開発」
平安一成 …… 10

〈Talking of LAL〉

「第57話 高感度エンドトキシン測定の応用」
土谷正和 …… 12

〔化学大家〕

「ジョーゼフ・プリーストリ」 島尾永康 …… 24

〔製品紹介〕

有機合成

キラルプレステッド酸触媒「(R)-NP-NAP」… 5

官能基選択的不均一触媒「Pd/C (en)」… 13

o-ニトロベンゼンスルホンアミド誘導体… 13

硫黄架橋2核ルテニウム錯体「met-DIRUX」… 14

環境・分析

産業技術総合研究所計量標準総合センター 認証標準物質… 8

ダイオキシン類分析用サンプリングボトル… 14

Presep®-C DNPHシリーズ… 15

生薬標準品 ゴミシ有効成分… 16

生化学

ポリ-γ-グルタミン酸… 16

DAB溶液… 17

ワイドビュー™プレステインタンパク質
サイズマーカー… 17

ワイドビュー™ウエスタンサイズマーカー… 17

ポリアクリルアミドゲル「スーパーセップ™」… 28

細胞生物

蛍光試薬… 18

ラットGLP-2 ELISAキット wako… 19

日本製粉㈱ ニワトリ型モノクローナル抗体の受託生産サービス… 20

遺伝子

Evrogen社 Duplex-specificヌクレアーゼ… 9

DNAエキストラクターSPキット… 11

富士フィルム(株) QuickGene-800… 21

Evrogen社 J-Redタンパク質発現ベクター… 22

機器

トキシノメーターET-5000… 23

〔お知らせ〕

第20回 Wakoワークショップ開催のご案内 …… 23

1 はじめに

医薬品、農薬などの生理活性物質を光学純度良く合成する優れた不斉合成反応の開発は有機合成化学に与えられた最も重要な課題の一つである。その中でもキラル触媒を用いたエナンチオ選択的な不斉合成反応は、触媒量の不斉源を用いて一方の鏡像異性体のみを光学純度良くかつ高収率で合成することが可能であることから、光学活性化合物の優れた合成手法となることが期待され、活発な研究が行われている。アルデヒド、イミンなどの求電子剤に対する炭素系求核剤のエナンチオ選択的な求核付加反応は、光学活性なアルコール、アミン類の優れた合成手法であるが、キラルルイス酸触媒として不斉配位子で修飾された金属錯体がこれまで一般的に用いられてきた¹⁾。様々な中心金属と不斉配位子を組み合わせることにより高い不斉収率が達成されている。金属触媒を用いた不斉合成反応は、有機金属化学の発展と共に、1980年から2000年までの20年間に飛躍的な発展を遂げ、中心原子上に様々な典型元素および遷移金属元素を有するキラル触媒が開発され、様々な場面において用いられている。

しかし、これら金属ルイス酸触媒にも問題点がある。

- 1) 安定性：キラルルイス酸触媒は一般に金属錯体と不斉配位子から系中で調製して直ちに用いられる。一般に単離、精製は困難であり、また、酸素、水分等に対して鋭敏である。
- 2) 金属が残存する場合がある。特に毒性を有する遷移金属を用いた場合には特に注意を払う必要がある。

不斉合成反応において、金属触媒を用いる必要があるのだろうか？我々は、金属触媒を用いないブレンステッド酸触媒を用いた炭素-炭素結合生成反応に興味を持ち研究を続けてきたが、これまで一般的に用いられてきたキラルルイス酸触媒ではなく、新規なキラルブレンステッド酸触媒を合成し、イミンへの求核付加反応が高いエナンチオ選択性で進行することを見いだした(Figure 1)。本稿では、その研究の経緯、および関連



Figure 1.

するプロトンまたは水素結合が重要な働きをする有機触媒の最近の研究について紹介する。

2 有機触媒について

近年、低分子量の光学活性な有機化合物がキラル触媒として効率良く働くことが見いだされ、「有機触媒を用いた不斉合成反応」が新たな研究分野として注目を集めている。カルボニル化合物に対する求核付加反応においても、List, Barbas, LernerらによりL-プロリンを用いた不斉アルドール反応が2000年に報告されて以来(Scheme 1)²⁾、多くの有機合成化学者の注目を集めている。

アルドール反応以外にもマンニッヒ反応、アミノヒドロキシル化反応など様々な反応においてL-プロリン(1)が極めて高い不斉触媒能を有することが明らかにされ、Jørgensen、林、Cordovaなど多くの研究者がこの分野に参入し、L-プロリンを用いた不斉合成反応の開発研究に取り組んでいる^{3,4)}。この反応は、カルボニル化合物とL-プロリンから生成した光学活性なエナミン中間体5を経てカルボン酸の水素がイミンを活性化することにより反応が進行すると考えられている。しかし、L-プロリンは有機溶媒に対する溶解度が低いため必ずしも良好な結果が得られない場合がある。そこで、より活性の高いL-プロリン誘導体として、GongおよびWu

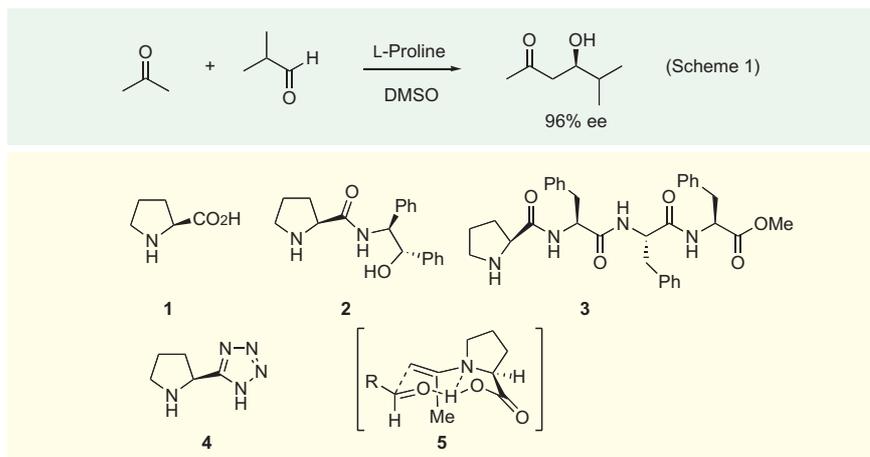
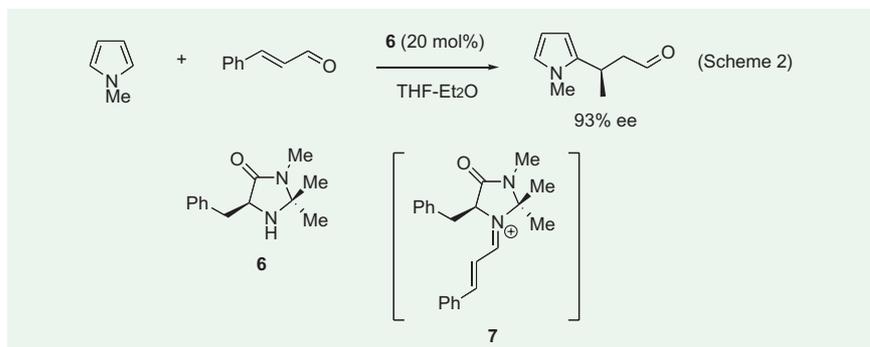


Figure 2.



らにより2、3が⁵⁾、山本、Leyらにより4が開発され、プロリンでは高い不斉収率が発現しない系における適用例や、触媒効率の向上などが報告されている⁶⁾。また、MacMillanらは、キラルな環状アミン誘導体6をデザインしている⁷⁾。アルデヒドから系中でイミニウム塩誘導体7が生成し、カルボニル化合物のLUMOを低下させることにより反応性を高めると同時に不斉環境を提供し、Diels-Alder反応、Friedel-Craftsアルキル化反応などにおいて高いエナンチオ選択性を発現している (Scheme 2)。

これらのキラル触媒は、基質と共有結合

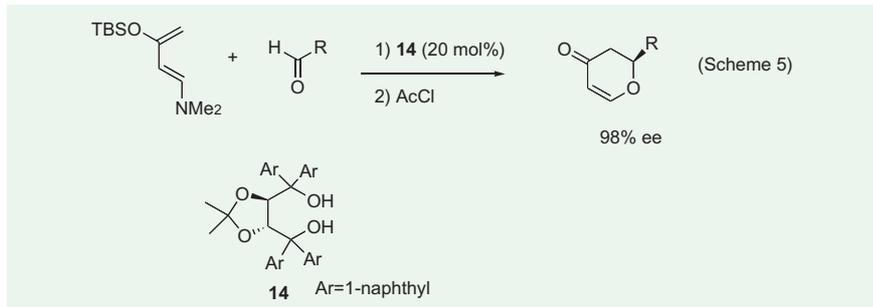
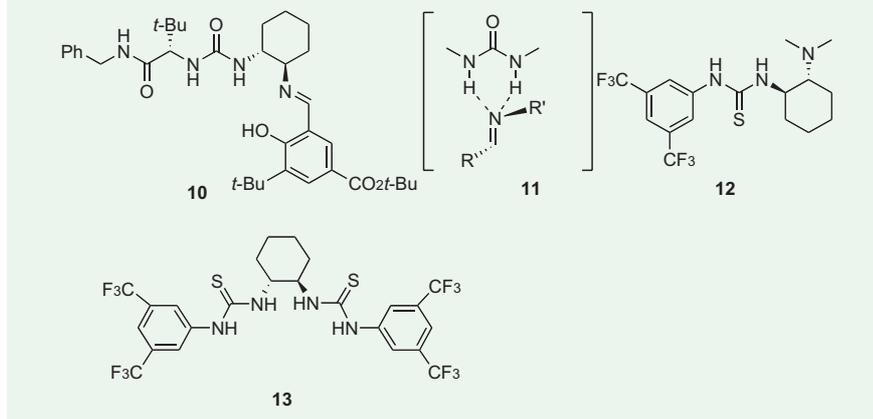
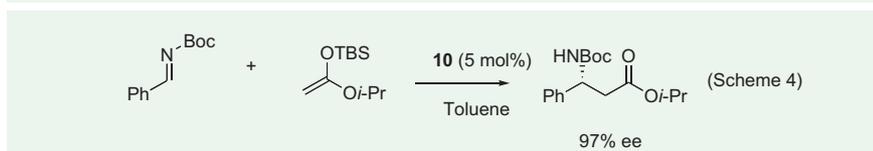
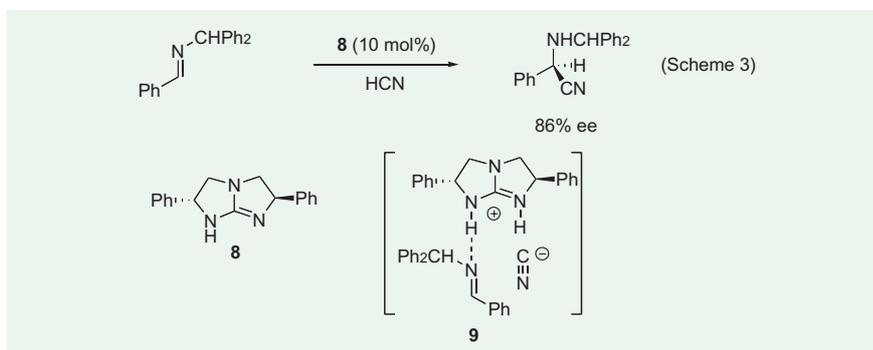
を形成し、キラルなエナミンあるいは、キラルなイミニウム塩を経て反応が進行しているが、近年、プロトンによる活性化あるいは、水素結合によりキラルな環境を形成したエナンチオ選択的な不斉合成反応が注目を集めている。Coreyらは、キラルなグアニジン8を触媒として用いている (Scheme 3)⁸⁾。グアニジンは塩基として作用しシアン化物アニオンが生成し、グアニジウムイオンの水素が水素結合によりイミンを活性化した中間体9を経て進行するとされている。また、Jacobsenらはキラルな尿素誘導体10を用いてイミンに対するHCNの付加反応、マンニツヒ

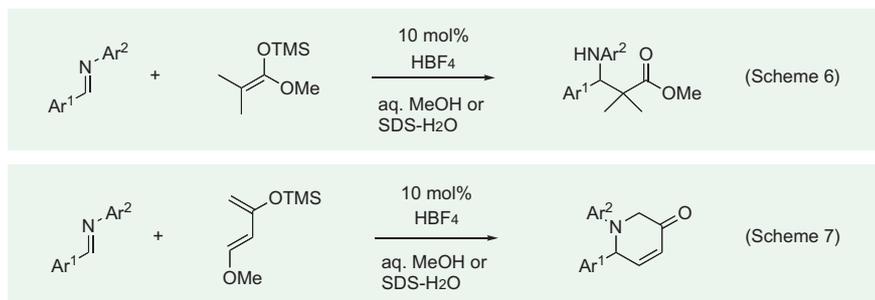
型反応、ホスホリル化反応などが高いエナンチオ選択性で進行することを明らかにしている (Scheme 4)⁹⁾。更に、これらの反応においては、イミンとチオ尿素が直交し、イミンのチッ素原子が尿素の2つの水素と水素結合を形成した中間体11を経て進行していることを明らかにしている。また、竹本、長澤らも新規な尿素、チオ尿素誘導体12、13を合成し、マイケル付加反応、Aza Henry反応、Morita Baylis-Hillman反応等において高い不斉収率を達成している¹⁰⁾。また、Rawalらは酒石酸より誘導したキラルジオール14が電子豊富ジエンとアルデヒドとの[4+2]型付加環化反応の優れた不斉触媒となることを報告している (Scheme 5)¹¹⁾。

3 プレンステッド酸触媒を用いたイミンへの求核付加反応

我々は、プレンステッド酸触媒を用いた炭素-炭素結合生成反応について興味を持ち研究を行っている。触媒量の HBF_4 を酸触媒として用いることにより、イミンに対するシリルエノラートの求核付加反応であるマンニツヒ型反応が、含水溶媒中において効率良く進行し、 β -アミノカルボニル化合物が高収率で得られることを報告した (Scheme 6)¹²⁾。また、本反応は、界面活性剤を用いることにより、有機溶媒を用いることなく、完全な水中でも効率良く進行することも明らかにしている¹³⁾。さらに、イミンとDanishefsky's dieneの[4+2]付加環化反応も同様に触媒量の HBF_4 触媒により含水溶媒中、あるいは水中で効率良く進行し、ジヒドロピリドン誘導体を得られることも見いだしている (Scheme 7)¹⁴⁾。プレンステッド酸としては HF は酸性が弱すぎ、 HCl では強過ぎる、 HBF_4 や p - TsOH などの $\text{p}K_a$ 1から-3程度の酸性度を有するプレンステッド酸が良好な結果を与えた。

プレンステッド酸がイミンの活性化剤として有効に働くことがわかったので、新たなキラルプレンステッド酸触媒を開発すれば、優れた不斉触媒として有用であると考え、新規なキラルプレンステッド酸の開発を目指して研究を開始した。触媒をデザインするポイントとして、環状構造を有していること、適





度な酸性度を有していることを考慮すると、必然的にリン酸エステルが考えられる。不斉源として比較的安価で容易に入手可能なピナフトールより得られるリン酸ジエステル15を用いることとした。15aは光学分割剤として既に用いられている¹⁵⁾。また、15aのラ

ンタノイド金属錯体は稲永らにより付加環化反応のキラル触媒として有用であることが報告されている¹⁶⁾。しかしながら、リン酸15a自体を酸触媒として用いた報告例はない。リン酸15はプレンステッド酸であるが、リン酸のホスホリル基の酸素原子はルイス塩基として働くことも期待できる。

まず、リン酸15aを用いてイミンとケテンシリルアセタールとのマンニヒ型反応を試みた(Scheme 8)。対応するβ-アミノエステルは高収率で得られたが、不斉は全く誘起されなかった。そこで、3,3'位に芳香環を導入した15bを用いたところ不斉収率は27% eeまで向上した。種々置換基を検討した結果

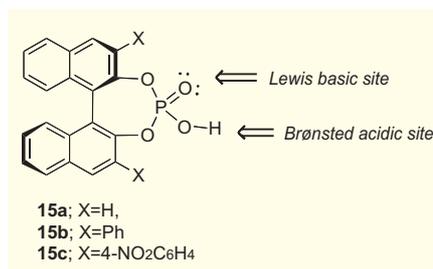


Figure 3.

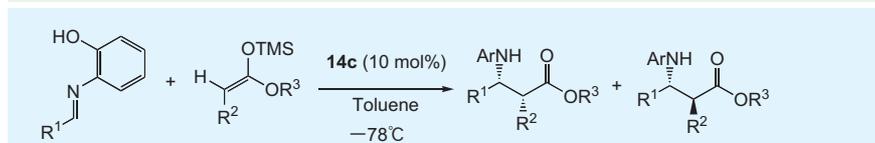
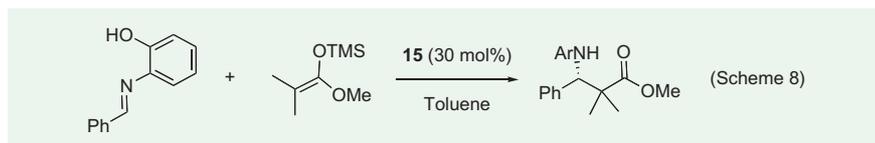


Table. Results of the Mannich-type Reactions

quant., <i>syn/anti</i> =87/13, 96% ee ^a	quant., <i>syn/anti</i> =93/7, 91% ee ^a	79%, <i>syn/anti</i> =100/0, 91% ee ^a
91%, <i>syn/anti</i> =95/5, 90% ee ^a	65%, <i>syn/anti</i> =95/5, 90% ee ^a	86%, <i>syn/anti</i> =100/0, 91% ee ^a

^aEe of *syn* isomer.

4-ニトロフェニル基を3,3'位に導入した15cを用いることにより生成物のβ-アミノエステルの不斉収率が89% eeまで向上することがわかった。3,3'位の芳香環に電子求引性基が置換したリン酸を用いると高い不斉収率が得られたが、電子供与性基の置換したリン酸を用いると不斉収率、化学収率共に低下した。

様々なケテンシリルアセタール、イミンを用いた結果を示す¹⁷⁾。様々なケテンシリルアセタールを用いても、対応するβ-アミノエステルが良好なシン選択性かつ高いエナンチオ選択性で得られた。プロピオン酸エステル由来のケテンシリルアセタールを用いると対応するβ-アミノエステルが96% eeで得られた。本反応は-78°Cで行っているが、わずかに不斉収率が低下するもの0°Cで行うことも可能である。たとえば、前述の96% eeが0°Cでは88% eeまで低下した。また、触媒を回収することも可能である。

4 反応機構について

本反応において、触媒量のプレンステッド酸で効率良く行うことが可能である。これは、反応後は、系中ではN-シリル化体となり、また、チッ素上の置換基が芳香環であるので、アミンの塩基性が低く、酸が触媒的に働くものと考えられる。また、イミンのチッ素原子上の置換基を検討した結果、o-ヒドロキシフェニル基を用いた場合にのみ高い不斉収率が発現することがわかった。そこで、o位のヒドロキシ基がエナンチオ選択性の発現に寄与していることがわかる。現在、9員環の遷移状態16を経由して反応が進行していると考えている。すなわち、リン酸の酸素原子のo位のヒドロキシ基と水素結合を形成していると考えている。

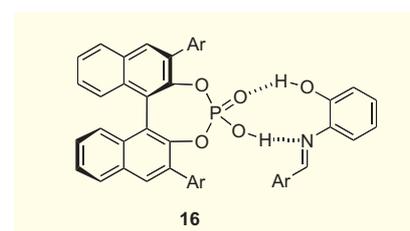


Figure 4.

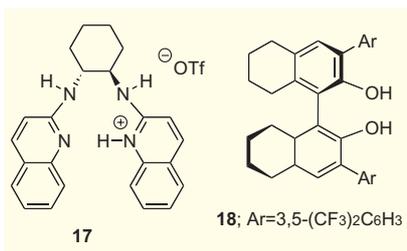


Figure 5.

5 他のキラルプレンステッド酸触媒

我々のグループが研究を開始した時点では、キラルプレンステッド酸を用いた不斉合成反応の研究の報告例はほとんどなかったが、我々の報告に続いて、寺田らもリン酸を用いた不斉触媒を報告し¹⁸⁾、また、Johnstonらはキラルなジキノリン誘導体のアンモニウム塩17をキラルプレンステッド酸触媒として用いたAza-Henry反応を¹⁹⁾、Schausらは18をキラルプレンステッド酸触媒として用いたMorita-Baylis-Hillman反応を報告している²⁰⁾。

6 最後に

以上、プロトン、あるいは水素結合の関与した有機触媒に焦点を当てて紹介してきた。他の有機触媒の最新の成果については新しい総説をご覧いただきたい²¹⁾。これまで不斉触媒としては有機金属触媒の独断場であったが、2000年以降急激にキラル触媒としての有機触媒に対する関心が高まっている。有機触媒はまさに21世紀の触媒であろう。キラルプレンステッド酸触媒としては発展途上であり、今後の更なる展開が期待される。

〔参考文献〕

- 1) "Comprehensive Asymmetric Catalysis I-III", Jacobsen, E. N., Pfaltz, A., Yamamoto, H., Eds., Springer-Verlag, Berlin, Germany (1999).
- 2) List, B., Lerner, R. A., Barbas, C. F., III: *J. Am. Chem. Soc.*, **122**, 2395-2396 (2000).
- 3) List, B.: *Synlett*, 1675-1686 (2001). Dalko, P. I., Moisan, L.: *Angew. Chem. Int. Ed.*, **40**, 3726-3748 (2001). Jarvo, E. R., Miller, S. J.: *Tetrahedron*, **58**, 2481-2495 (2002). Movassaghi, M., Jacobsen, E. N.: *Science*, **298**, 1904-1905 (2002). Cordova, A.: *Acc. Chem. Res.*, **37**, 102-112 (2004). List, B.: *Acc. Chem. Res.*, **37**, 548-557 (2004). Notz, W., Tanaka, F., Carlos, F., Barbas, C. F., III: *Acc. Chem. Res.*, **37**, 580-591 (2004).
- 4) Cordova, A., Watanabe, S.-i., Tanaka, F., Notz, W., Barbas, C. F., III: *J. Am. Chem. Soc.*, **124**, 1866-1867 (2002). Kumaragurubaran, N., Juhl, K., Zhuang, W., Bøgevig, A., Jørgensen, K. A.: *J. Am. Chem. Soc.*, **124**, 6244-6245 (2002). Hayashi, Y., Yamaguchi, J., Sumiya, T., Shoji, M.: *Angew. Chem. Int. Ed.*, **43**, 1112-1115 (2004). Bøgevig, A., Sundén, H., Cordova, A.: *Angew. Chem. Int. Ed.*, **43**, 1109-1112 (2004).
- 5) Tang, Z., Jiang, F., Yu, L.-T., Cui, X., Gong, L.-Z., Mi, A.-Q., Jiang, Y.-Z., Wu, Y.-D.: *J. Am. Chem. Soc.*, **125**, 5262-5263 (2003). Tang, Z., Yang, Z.-H., Cun, L.-F., Gong, L.-Z., Mi, A.-Q., Jiang, Y.-Z.: *Org. Lett.*, **6**, 2285-2287 (2004).
- 6) Torii, H., Nakadai, M., Ishihara, K., Saito, S., Yamamoto, H.: *Angew. Chem. Int. Ed.*, **43**, 1983-1986 (2004). Cobb, A. J. A., Shaw, D. M., Ley, S. V.: *Synlett*, 558-560 (2004).
- 7) Ahrendt, K. A., Borths, C. J., MacMillan, D. W. C.: *J. Am. Chem. Soc.*, **122**, 4243-4244 (2000). Paras, N. A., MacMillan, D. W. C.: *J. Am. Chem. Soc.*, **123**, 4370-4371 (2001). Northrup, A. B., MacMillan, D. W. C.: *J. Am. Chem. Soc.*, **124**, 6798-6799 (2002).
- 8) Corey, E. J., Grogan, M. J.: *Org. Lett.*, **1**, 157-160 (1999).
- 9) Sigman, M. S., Vachal, P., Jacobsen, E. N.: *Angew. Chem. Int. Ed.*, **39**, 1279-1281 (2000). Wenzel, A. G., Jacobsen, E. N.: *J. Am. Chem. Soc.*, **124**, 12964-12965 (2002). Vachal, P., Jacobsen, E. N.: *J. Am. Chem. Soc.*, **124**, 10012-10014 (2002).
- 10) Okino, T., Nakamura, S., Furukawa, T., Takemoto, Y.: *Org. Lett.*, **6**, 625-627 (2004). Sohtome, Y., Tanatani, A., Hashimoto, Y., Nagasawa, K.: *Tetrahedron Lett.*, **45**, 5589-5592 (2004).
- 11) Huang, Y., Unni, A. K., Thadani, A. N., Rawal, V. H.: *Nature*, **424**, 146 (2003). Thadani, A. N., Stankovic, A. R., Rawal, V. H.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **101**, 5846-5850 (2004).
- 12) Akiyama, T., Takaya, J., Kagoshima, H.: *Synlett*, 1045-1048 (1999). Akiyama, T., Takaya, J., Kagoshima, H.: *Tetrahedron Lett.*, **42**, 4025-4028 (2001).
- 13) Akiyama, T., Takaya, J., Kagoshima, H.: *Synlett*, 1426-1428 (1999).
- 14) Akiyama, T., Takaya, J., Kagoshima, H.: *Tetrahedron Lett.*, **40**, 7831-7834 (1999).
- 15) Wilen, S. H., Qi, J. Z.: *J. Org. Chem.*, **56**, 487-489 (1991).
- 16) Furuno, H., Hanamoto, T., Sugimoto, Y., Inanaga, J.: *Org. Lett.*, **2**, 49-52 (2000).
- 17) Akiyama, T., Itoh, J., Yokota, K., Fuchibe, K.: *Angew. Chem. Int. Ed.*, **43**, 1566-1568 (2004).
- 18) Uraguchi, D., Terada, M.: *J. Am. Chem. Soc.*, **126**, 5356-5357 (2004).
- 19) Nugent, B. M., Yoder, R. A., Johnston, J. N.: *J. Am. Chem. Soc.*, **126**, 3418-3419 (2004).
- 20) McDougal, N. T., Schaus, S. E.: *J. Am. Chem. Soc.*, **125**, 12094-12095 (2003).
- 21) Lygo, B., Andrews, B. I.: *Acc. Chem. Res.*, **37**, 518-525 (2004). Miller, S. J.: *Acc. Chem. Res.*, **37**, 601-610 (2004). Enders, D., Balensiefer, T.: *Acc. Chem. Res.*, **37**, 534-541 (2004). Aggarwal, V. K., Winn, C. L.: *Acc. Chem. Res.*, **37**, 611-620 (2004). Yang, D.: *Acc. Chem. Res.*, **37**, 497-505 (2004). Fu, G. C.: *Acc. Chem. Res.*, **37**, 542-547 (2004). Tian, S.-K., Chen, Y., Hang, J., Tang, L., McDaid, P., Deng, L.: *Acc. Chem. Res.*, **37**, 621-631 (2004). O'Donnell, M. J.: *Acc. Chem. Res.*, **37**, 506-517 (2004). Ooi, T., Maruoka, K.: *Acc. Chem. Res.*, **37**, 526-533 (2004). Shi, Y.: *Acc. Chem. Res.*, **37**, 488-496 (2004).

Products

キラルプレンステッド酸触媒

(R)-NP-NAP

[(R)-(-)-3,3'-Bis(4-nitrophenyl)-1,1'-binaphthyl-2,2'-diyl hydrogen phosphate]

コードNo.	品名	規格	容量	希望納入価格(円)
145-07861	(R)-NP-NAP	有機合成用	200mg	15,000

Wako

1 背景

標準物質は、試料等を分析し正しい値を得るという要求に答えるための基準として用いられており、特に計量証明に用いる測定機器の正確な校正を保証するためには欠かせないものとなっている。計量法は1992年の改正により、計量法校正事業者認定制度(JCSS)によって国家標準へのトレーサビリティの確保と質の保証を行っている。

JCSSでは、(独)産業技術総合研究所計量標準総合センター(NMIJ/AIST)(旧工業技術院物質工学工業技術研究所)が開発した技術を国が指定校正機関として指定した(財)化学物質評価研究機構(CERI)(旧化学品検査協会(CITI))に移転し、CERIはこの技術を基に特定標準物質及び製造装置を維持し、特定二次標準物質に値付けする。さらに認定事業者が特定二次標準物質を基に実用標準物質にJCSS標準付き校正証明書を付けて供給する。

現在、JCSSにより、標準ガスでは16物質に関して総数で191レベルの濃度標準が用意されており、この数は毎年増加している。無機標準液では100 mg/Lと1000 mg/Lの濃度レベルで、25種類の標準が供給されている。また、pH標準液は6種類が安定に供給されており、これらの値は1974年に検査制度として国家標準の供給体制が整備されて以来一貫して同等性が維持されている。2003年現在の実用標準物質の供給量は、標準ガスが年間約2万本、標準液が約1万本、pH標準液が約20万本程度である。

2 トレーサビリティの要求

計量証明事業以外の分野では、市販の試薬を適宜希釈して校正用標準液として用いることが多く、現時点では実用の問題は無いが、必ずしもトレーサビリティが確立されたものではない。また、我が国の工業標準規格である日本工業規格(JIS)に規定されている各種試験法でもこの点は明

確ではなく、トレーサビリティを宣言することは困難である。もちろん、試験法はJISに限らず、食品中の残留農薬や添加物の分析、環境中の汚染物質の分析や医療検査など様々な分野でも規定されており、JISの場合と同様の問題を含んでいる。しかしながら、最近ではこれらの分野においてトレーサビリティが求められるようになってきている。例えば、東南アジアの国々が米をヨーロッパに輸出する際に自国で検査を行うが、この検査証明書に関して検査方法のトレーサビリティを求めるというような状況である。

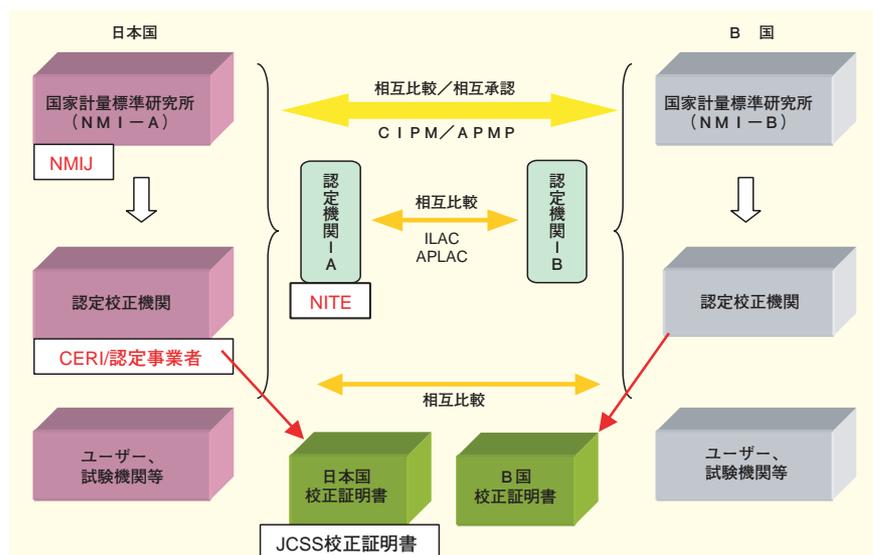
校正・試験機関は、このような要求に対応するため、自らトレーサビリティを宣言することが必須となってきており、国際標準化機構(ISO)では試験所及び校正機関の能力の証明としてISO/IEC17025を定めている。

3 国際整合性と標準物質の供給

1993年に円滑な国際貿易、地球環境の保全、人間の健康安全を目的に国際度

量衡委員会(CIPM)の9番目の諮問委員会として物質計測諮問委員会(CCQM)が創設され、化学計測分野におけるSIへのトレーサビリティを通じて国際的な同等性を確立することが示された。これを機に国家標準を頂点としてきた計量法の体制もSIへのトレーサビリティを確保することが必要となり、国際的な同等性の証明も求められるようになった。また、計量標準の種類では欧米各国からみて大きく立ち遅れていることが指摘され、国の施策として2010年までに250種類程度の標準物質を整備し供給することが決定された。この計画は知的基盤特別整備目標と呼ばれ、毎年計画の見直しを行いながらNMIJ/AISTが中心となり着実に開発が進められている。当初の5年間はJCSSに関わる標準物質をSIトレーサブルとすることが優先され、2005年にはほぼ全ての作業が完了しJCSSで供給される標準物質は120物質以上となる予定である。

国際的な同等性証明は、CCQMのもとで国際比較が行われており、NMIJとCERIが協力して国際比較に参加し同等性証明の努力を続けている。計量標準をとりまく国際的な状況としては、世界貿易



- ILAC:** 試験所・検査機関を認定する機関だけの国際組織、国際試験所認定協力機構
試験所の満たすべき要件(ISO/IEC 17025)や試験所認定機関の満たすべき要件(ISO/IEC ガイド58)の適用のための指針文書を作成し、認定機関間の相互比較を行っている。
- APLAC:** APEC域内の試験所認定機関の協力組織、アジア太平洋試験所認定協力機構
APLAC参加機関の技術的な同等性を認め合うものであり、試験所認定機関の相互承認評価を実施し信頼を高めている。

国際協力の一般的な図式

機関(WTO)が試験・検査・計測の技術基盤を統一して自由貿易の障壁を取り除こうという政策で合意したことが背景となり、1999年に国家計量機関(NMI)において計量標準に関する相互承認協定(グローバルMRA)が結ばれ、国際比較の結果はMRAを結んだ国の間で相互に承認されることが方向付けられた。このような同等性証明では、NMIに対して品質システムの第三者認定を受けること(または自己宣言)が要求され、標準物質への値付けはISO/IEC17025、標準物質の生産にはISOガイド34が求められている。我が国ではこのNMIの認定は(独)製品評価技術基盤機構の認定制度(ASNITE-NMI)により実施されており、2003年にNMIJとCERIは認定を取得した。

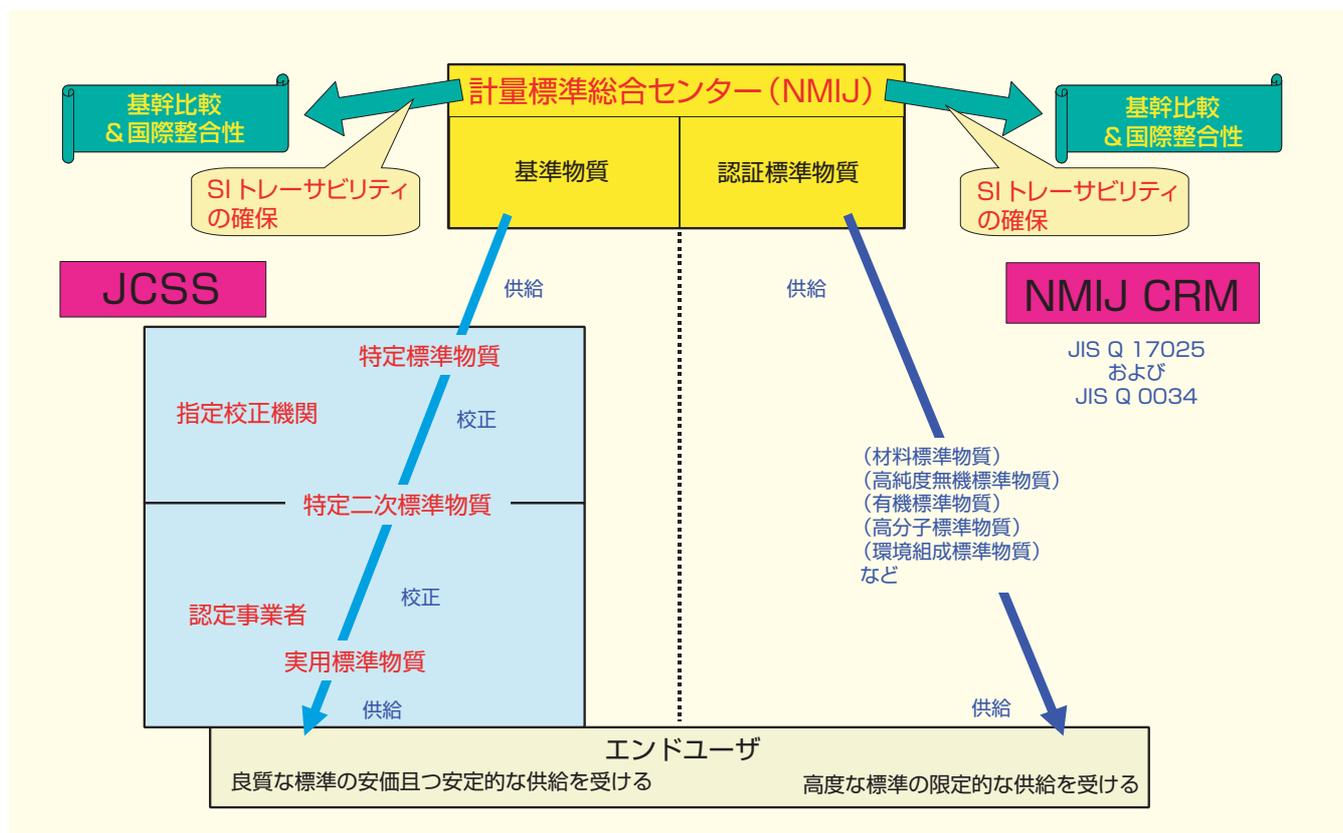
NMIJでは、SIへのトレーサビリティが保証された標準物質について認証を行う制度を定め、認証標準物質(NMIJ CRM)の開発・供給を開始している。これらのCRMはグローバルMRAの枠組みに対応したものと国際的に通用するものであり

JCSSによる供給を補完している。NMIJは、国の計量標準を所掌する機関としてCCQMの活動に参加するとともにアジア太平洋計量計画(APMP)の中で中心的な役割を果たし、国際的な同等性証明の普及と維持に努めている。国内においてはJCSSにおける中核機関として、またNMIJ CRMの供給機関として、国際的に同等性の証明された標準供給機関としての役割を担っている。

4 標準物質の値づけ

NMIJが供給するCRMは、計量分野で最高位に位置すると認められている一次標準物質である。標準物質には①他の物質を参照せずに値付けを行う一次測定法(Primary Method:SI単位系に直接繋がる測定方法)で値付けされたSIトレーサブルな標準物質、②二つ以上の独立した原理に基づく参照法(Reference Method)で値付けされた標準物質、③合意された

特定の方法により値付けされた合意値をもつ標準物質がある。有機純物質、標準液や無機標準液は①の方法で値付けされている。環境組成標準物質や材料標準物質などの多くは②の方法で値付けされている。②の方法では複数の方法を組み合わせて用いるので分析方法によらない値付けを行っていることになる。CRMの認証書には認証値とその不確かさの範囲、認証に用いた方法とトレーサビリティが記述されており、この値を保証する期間も示されている。また、認証値ではないが標準物質に付随する情報として参考値も示されている。さらに詳しい情報として認証を行った際に作成した技術文書が用意されており、必要に応じて参照することができる。認証値の不確かさは、均一性試験と保存安定試験の結果の不確かさを含むので、多くの場合単に分析した場合の分析精度より大きな値となっている。各国のNMIがこのような方法で値付けする技術を相互に評価するためにCCQMでは国際比較を実施しており、その結果はBIPMのホームページで公開され



標準物質供給スキーム

ている。この国際比較はブラインドテストであり、分析方法や測定装置の校正に用いる標準物質は参加する国がそれぞれ用意して試験に臨んでいる。このようにして信頼性を確保されたCRMはトレーサビリティの頂点に立つもので、国の技術水準を示すものである。

5 NMIJ-CRMの紹介

現在NMIJが供給を開始したCRMは材料標準物質が7種類18物質、高分子材料

標準物質が3物質、環境組成標準物質が7種類、高純度無機標準物質が1物質とまだ数は少ないが、この他に認証を行ったがJCSSの基準物質として直接供給を行っていないCRMが10物質、供給準備中の標準物質が2種類と着実に成果があがっている。これらの標準物質を開発するにあたって市場の動向や要求を積極的にとり入れ、国際的に通用する最高品質の標準物質が適宜利用される社会環境になることを期待している。



認証標準物質：ISOガイド30「標準物質に関連して用いられる用語及び定義」に記されているように、認証書が添付された標準物質。認証値はトレーサビリティの確立された手順によって確定され、不確かさが付与されている。これらは、分析・計測における真度(正確さ)の測定評価、手法の評価あるいはSIへのトレーサビリティの立証には不可欠なものである。

一次標準物質：国際単位系(SI)へのトレーサビリティが確立された手順によって確定され、その値に対して不確かさ(又は精度)が付与された標準物質。多くの場合、一次標準物質は国家計量機関(NMI)によって開発されている。

Products

認証標準物質 (NMIJ CRM)



■環境組成標準物質

コードNo.	メーカーコード	品名	容量	希望納入価格(円)
632-05321	NMIJ CRM 7301-a	海底質(ブチルスズ分析用)	60g	42,460
639-05331	NMIJ CRM 7302-a	海底質(有害金属分析用)	60g	36,340
636-05341	NMIJ CRM 7303-a	湖底質(有害金属分析用)	60g	36,340
633-05351	NMIJ CRM 7304-a	海底質(ポリクロロビフェニル・塩素系農薬類分析用-高濃度)	60g	48,570
630-05741	NMIJ CRM 7401-a	サメ肝油	1g	18,290

※7304-aは第1種特定化学物質の確約書が必要です

■材料標準物質

コードNo.	メーカーコード	品名	形態	容量	希望納入価格(円)	
630-05361	NMIJ CRM 1001-a	鉄-クロム合金(Cr 5%) EPMA用	約4×10×15mm の直方体	1個	33,830	
637-05371	NMIJ CRM 1002-a	鉄-クロム合金(Cr 15%) EPMA用		1個	33,830	
634-05381	NMIJ CRM 1003-a	鉄-クロム合金(Cr 20%) EPMA用		1個	33,830	
631-05391	NMIJ CRM 1004-a	鉄-クロム合金(Cr 30%) EPMA用		1個	33,830	
634-05401	NMIJ CRM 1005-a	鉄-クロム合金(Cr 40%) EPMA用		1個	33,830	
631-05411	NMIJ CRM 1006-a	鉄-ニッケル合金(Ni 5%) EPMA用	約3×10×15mm または 4×10×15mm の直方体	1個	33,830	
638-05421	NMIJ CRM 1007-a	鉄-ニッケル合金(Ni 10%) EPMA用		1個	33,830	
635-05431	NMIJ CRM 1008-a	鉄-ニッケル合金(Ni 20%) EPMA用		1個	33,830	
632-05441	NMIJ CRM 1009-a	鉄-ニッケル合金(Ni 40%) EPMA用		1個	33,830	
639-05451	NMIJ CRM 1010-a	鉄-ニッケル合金(Ni 60%) EPMA用		1個	33,830	
636-05461	NMIJ CRM 1011-a	鉄-炭素合金(C 0.1%) EPMA用	約3×10×15mm の直方体	1個	33,830	
633-05471	NMIJ CRM 1012-a	鉄-炭素合金(C 0.2%) EPMA用		1個	33,830	
630-05481	NMIJ CRM 1013-a	鉄-炭素合金(C 0.3%) EPMA用		1個	33,830	
637-05491	NMIJ CRM 1014-a	鉄-炭素合金(C 0.5%) EPMA用		1個	33,830	
630-05501	NMIJ CRM 1015-a	鉄-炭素合金(C 0.7%) EPMA用		1個	33,830	
637-05511	NMIJ CRM 1016-a	鉄-クロム合金(Cr 40%) 蛍光X線用		直径30mm、厚さ6mmの円盤状	1個	154,400
637-05751	NMIJ CRM 5202-a	SiO ₂ / Si多層膜標準物質		約13×13mmの正方形の薄片	1個	36,670
634-05761	NMIJ CRM 8001-a	ファインセラミックス用炭化けい素(α型) 微粉末標準物質	-	50g	16,910	
631-05771	NMIJ CRM 8002-a	ファインセラミックス用炭化けい素(β型) 微粉末標準物質	-	50g	16,910	

■高分子標準物質

コードNo.	メーカーコード	品名	容量	希望納入価格(円)
634-05521	NMIJ CRM 5001-a	ポリスチレンオリゴマー標準物質(PS2400)	0.2g	8,230
631-05531	NMIJ CRM 5002-a	ポリスチレンオリゴマー標準物質(PS500)	0.4g	9,490
638-05781	NMIJ CRM 5003-a	ポリカーボネート46000	0.2g	57,140

■高純度無機標準物質

638-05541	NMIJ CRM 3001-a	フタル酸水素カリウム	50g	16,570
-----------	-----------------	------------	-----	--------

Evrogen社 Duplex-specific nuclease (DSN) を使用したNormalization cDNAの作製

和光純薬工業株式会社 ゲノム研究所 林田 幸信

カムチャッカカニの肝臓由来の新規Duplex-specific nuclease (DSN)は2本鎖DNA及びDNA-RNAハイブリッド中のDNAを優先的に切断するDNA分解酵素である。至適温度は55~65℃と高く、また75℃でも安定に作用する特長がある。我々はこの新規DSNを使用した新たな方法によるNormalization cDNAを作製し、良好な結果が得られたので紹介する。

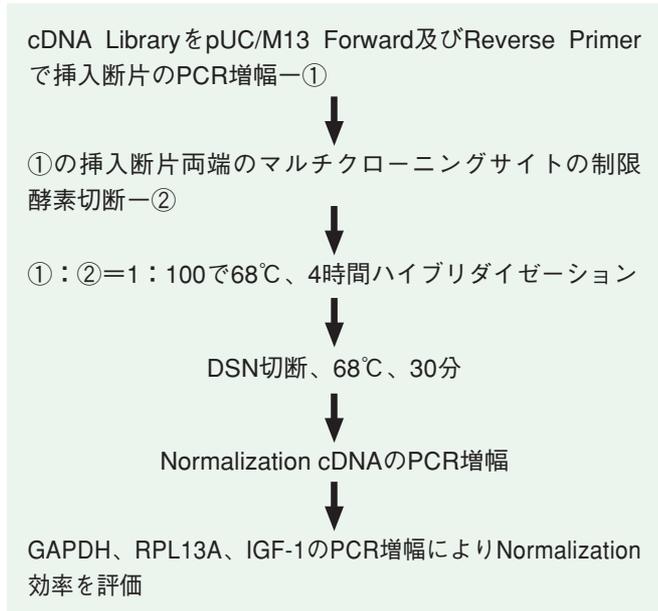
Normalization cDNAの作製方法としては一般的にハイドロキシアパタイト・カラムやマグネティック・ビーズを使用した方法が知られているが、作業工程が多く、操作も煩雑であり、安定した結果を得るには熟練を要する。各メーカー独自の方法による受託生産という手段もあるが、納期が約3ヶ月程かかり、また非常に高価であることからなかなか手が出ないのが現状である。そこで我々はDSNを使用した簡便で高効率なNormalization cDNAの作製方法を考案した。今回標的としてヒト正常肝臓cDNA Library (BioChain社：pUC系プラスミドベクター)を使用し、Normalization前後で比較した。評価遺伝子として高発現遺伝子であるglyceraldehyde-3-phosphate dehydro-

genase (GAPDH)、中発現遺伝子であるribosomal protein L13a (RPL13A)、低発現遺伝子であるinsulin-like growth factor I (IGF-1)を用いた。ヒト正常肝臓cDNA Libraryの挿入断片 (Control cDNA)とNormalization cDNAを各遺伝子のPCR増幅量により比較検討した。その結果、Control cDNAと比較してNormalization cDNAではRPL13Aはほぼ同等の増幅量であったがGAPDHは約1/100以下に増幅量が減少した。Control cDNAではGAPDHとRPL13Aでは約20倍以上の増幅量の差があると見られるが、Normalization後のcDNAの増幅量は同程度であることから、非常に効率よくNormalizationされていると考えられる。また低発現遺伝子であるIGF-1の比較では20サイクルのPCR増幅において双方ともにバンドは確認できなかったが25サイクルのPCR増幅でNormalization cDNAの方がControl cDNAと比較して増幅量が上回った。ハイドロキシアパタイト法のような従来法で作製したNormalization cDNAでは一般に効率よくNormalizationされないため中発現量以下の遺伝子においては元のcDNAの増幅量に留まっており、

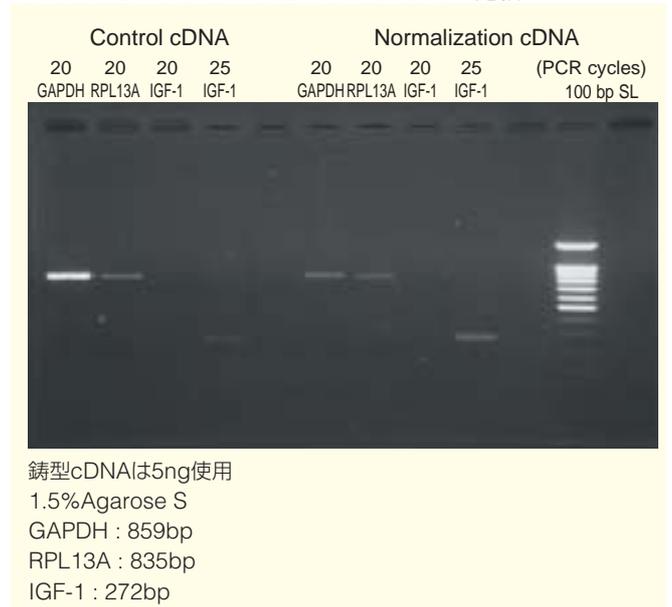
本法のNormalization効率が非常に優れていることを示している。今回我々が作製したNormalization cDNAは作業日程が2日と短かく、またpUC系のプラスミドに挿入されたcDNA Libraryで作製ができるため、市販品のcDNA Libraryまたは自作のcDNA Libraryを使用すれば、すべての工程をDNAで行うことができる。これらの点においても一般ユーザーにとっては容易に作製でき、かつ再現性のある結果が得られるものと予想される。

このDSNを用いて作製されたNormalization cDNAは発現量の低い遺伝子の探索に非常に有効である。またDNAマイクロアレイやDNAチップのプロープとして使用することにより、再現性のあるデータ、バックグラウンドの低減が可能であり、数社より販売の製品によるデータの互換性が30パーセント程と言われている現状を改善できると考えている。これら以外にも有効な使用方法があると考えられるが、Normalization cDNAの作製が「難しい」、「大変」、「面倒」と思っている研究者にとって本稿が参考になればと思っている。

作製方法



Control cDNAとNormalization cDNAとの比較



カムチャッカカニの肝臓由来の新規のDNAヌクレアーゼ

EVROGEN

コードNo.	メーカーコード	品名	容量	希望納入価格(円)
580-69991	EA001	Duplex-specific nuclease, lyophilized(50Kuniz-units)	1Set	86,000

DNA Extractor SP Kit (血中遊離DNA抽出用試薬)の開発

和光純薬工業株式会社 試薬研究所 平安 一成

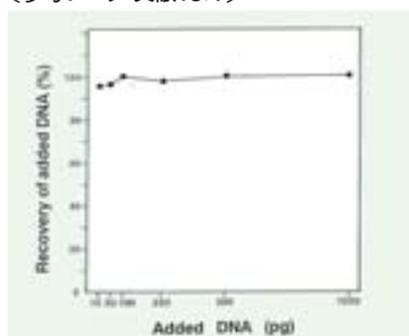
よう化ナトリウム法

1991年(平成3年)、筆者らは、当時DNA抽出試薬の主流であった劇物のフェノールやクロロホルムを使わずに一本のマイクロ遠心チューブ内で一連の抽出操作を行うDNA抽出法「よう化ナトリウム法」を開発した。よう化ナトリウムは、強いタンパク質可溶化剤として知られるカオトロピック塩であり、我々はその性質を利用することによって非常に簡便で高い回収率を持つDNA抽出法を完成させた¹⁾(下図:参考データ)。同法は、よう化ナトリウムとタンパク質分解酵素や界面活性剤などを使ってタンパク質を可溶化した後にアルコールを添加するだけでDNAを優先的に沈殿/濃縮する簡便な方法になっている^{1,2)}。

よう化ナトリウム法に基づく既製のキット試薬には、生物製剤(DNA Extractor Kit:コードNo. 295-50201)、全血液・組織(DNA Extractor WB Kit:コードNo. 291-50502)、毛髪・爪(DNA Extractor FM Kit:コードNo. 295-58501)、全血液・組織中のミトコンドリアDNA(mtDNA Extractor WB Kit:コードNo. 293-54401)、mtDNA Extractor CT Kit:コードNo. 291-55301)など様々な対象に適用した製品があり、その高い回収率を背景に微小な試料から極微量のDNAを抽出する試薬として好評を頂いている。また、よう化ナトリウム法がDNAに人為的酸化ダメージを与えにくい抽出方法であることから、DNA損傷マーカーである8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OH-dG)等を検出する際の前処理試薬としても広く利用されつつある³⁻⁵⁾。

今回、筆者らは、よう化ナトリウム法が持つ微量なDNAを高回収率に取得できる優れた特性を生かして、新たなDNA抽出試薬の対象を開拓し、その可能性を広げた。

[参考データ:文献1より]



血中遊離DNA

大腸癌における多段階遺伝子変異に代表される癌抑制遺伝子の不活化及び癌遺伝子の活性化などの多重変異が、癌化を誘発していることは広く知られている。*ras*や*p53*、*BRCA-1*などに代表される癌関連遺伝子と呼ばれる遺伝子群は、発癌に関わる働きやメカニズムが研究されるだけでなく、これらを利用した癌診断法開発の研究対象となっている。遺伝子診断法は、その潜在的なパワーが見込まれ、近年は癌の早期診断法開発の中心的な役割を担ってきた。他の従来型腫瘍マーカーと同様に血液を使った簡便かつ非侵襲的な診断法が期待されている。

1970年代当初から、癌に限らず全身性エリテマトーデス(SLE)などの様々な疾患で細胞の死滅や組織の傷害等によって遊離してきたDNAが、血清(血漿)中に搬出されているという報告がなされている^{6, 7)}。その中には癌関連遺伝子の検出等が数多く報告され、この血中遊離DNA(plasma DNA)が、特に癌の遺伝子診断法へ応用されることを期待されていた^{8, 9)}。

例えば、血中遊離DNA濃度は癌の進行度や大きさと相関し¹⁰⁾、*p53*や*K-ras*遺伝子の変異が検出される患者では、腫瘍の摘出手術後にも血中遊離DNA中に変異遺伝子が検出され続けていると高い確率で再発や転移が認められ^{10, 11)}、CEA等の従来マーカーよりも高率にそれらを検出できるといった報告がなされている^{10, 11)}。

また、血中遊離DNAを使った特定のマイクロサテライトの解析は、早期診断だけではなく、癌を発症する可能性が高いハイリスク患者の同定にも寄与する可能性が示唆されている¹²⁻¹⁴⁾。さらに、非小細胞肺癌(non-small cell lung cancer)を始めとする肺癌などでは、血中遊離DNAを使って*p16*癌抑制遺伝子のhypermethylationを検出することが癌再発診断の有力な手法になるとも考えられている¹⁵⁾。

血中を浮遊しているDNAの検出/解析には、このような可能性が秘められており、今後も注目される研究材料である。そこで、筆者らは、「よう化ナトリウム法」によるDNA抽出法を血中遊離DNA分析の前処理試薬として至適化した新規抽出試薬の開発を行った。

今回開発した試薬は、ヒト血清(血漿)中に浮遊しているDNAの抽出のために反応条件や試薬組成を整え、且つ血液中に含まれる多量の脂質成分の除去にも対応できるように調整したアルコール液もセット化して製品を組み立てた(商品名DNA Extractor SP Kit:コードNo. 296-60501)。ここでは、本新製品の内容を紹介すると共に、それを使って血中遊離DNAを抽出し、増幅検出した実施例を提示する。

DNA Extractor SP Kit:構成試薬

(試料100 μ lを対象として50回処理用)

- | | |
|----------------|-------------------------|
| (1) 酵素反応液 | 10ml \times 1本 |
| (2) タンパク質分解酵素液 | 250 μ l \times 1本 |
| (3) よう化ナトリウム溶液 | 15ml \times 1本 |
| (4) アルコール液 | 30ml \times 1本 |
| (5) 洗浄液(A) | 50ml \times 1本 |
| (6) 洗浄液(B) | 50ml \times 1本 |

DNA Extractor SP Kit:プロトコール

- (1) 血清(血漿)を100 μ l、1.5ml容マイクロ遠心チューブに添加する。
- (2) 酵素反応液を200 μ l添加する。
- (3) タンパク質分解酵素液を5 μ l添加して、ボルテックスミキサーで混合する。
- (4) 56 $^{\circ}$ Cで10分間、インキュベートする。
- (5) よう化ナトリウム溶液を300 μ l添加して、軽く混合する。
- (6) アルコール液を600 μ l添加して、ボルテックスミキサーで混合する。
- (7) 室温で10分間、放置する。
- (8) 12,000~20,000 \times gで10分間、室温で遠心分離する。
- (9) 上清を捨て、ペーパータオルの上で上清残液をできるだけ除く。
- (10) 沈殿に、洗浄液(A)を1ml添加して、ボルテックスミキサーで混合する。
- (11) 12,000~20,000 \times gで5分間、室温で遠心分離する。
- (12) ステップ9と同様の操作を行い上清残液をできるだけ除く。
- (13) 沈殿に、洗浄液(B)を1ml添加して、ボルテックスミキサーで混合する。
- (14) 12,000~20,000 \times gで5分間、室温で遠心分離する。
- (15) ステップ9と同様の操作を行い上清残液

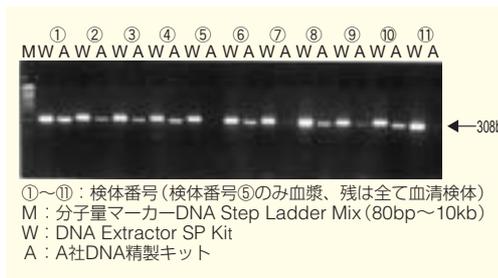


図1. p53-Exon5領域 (308bp) のPCRの結果



図2. p53-Exon7領域 (439bp) のPCRの結果

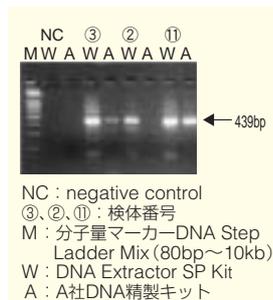


図3. p53-Exon7領域 (439bp) のPCR再試験

をできるだけ除く。

- (16) ブロックヒーター (約65℃) などで、約5分間、沈殿を乾燥させる。
- (17) 乾燥した沈殿に、適量のTE (pH 8.0) などを添加して、ボルテックスミキサーで混合する。
- (18) ブロックヒーター (約65℃) などで、3～5分間ほど加温しつつ、ボルテックスミキサーで攪拌して沈殿を完全に溶解させ、DNA試料とする。

実施例

(方法)

DNA Extractor SP Kitを用いて、健康人の血清 (10検体) 及び血漿 (1検体) からDNAを抽出し、20 μ lのTE (pH 8.0)に溶解したDNA試料の内5 μ l (25 μ l血清又は血漿相当量) に対して、p53-Exon5領域及びp53-Exon7領域のPCR増幅を行った (PCR条件

[PCRの反応条件]

[反応液]	
DNA試料	5 μ l (6.25 μ l:対照の場合)
forward primer	4pmol
reverse primer	4pmol
dNTP	200 μ mol/l
10 \times Gene Taq Universal Buffer	1 μ l
Gene Taq NT	0.5units
D.W.	10 μ lにfill up
[PCR cycles]	
96 $^{\circ}$ C	30sec
94 $^{\circ}$ C	30sec
XC	30sec
72 $^{\circ}$ C	1min
72 $^{\circ}$ C	5min
アニーリング温度 (XC) = 65 $^{\circ}$ C (Exon5) , 67.5 $^{\circ}$ C (Exon7) , 66 $^{\circ}$ C (Exon7再試験)	

は下記参照)。各々反応に使用するプライマーは、ニッポンジーン社のp53 Primers (Exon5:コードNo. 312-03511, Exon7:コードNo. 316-03531)を用いた。また、比較対照としては、多くの血中遊離DNA解析に関する文献で使用されているシリカ担体 (遠心ろ過)法を原理としたA社DNA精製キットを使って抽出したDNAを用い、1回のPCRに25 μ l血清又は血漿に相当するDNA溶液を試料として添加した。(結果)

本キットで抽出した検体については、Exon5のPCRで全ての検体から増幅断片が認められた (図1)。Exon7のPCRでは、1検体 (検体番号③)のみ増幅断片が認められなかったが、残りは全て増幅断片を検出することができた (図2)。しかも、PCR増幅断片のDNA量は、全ての検体において、本キットで抽出したDNAに対する増幅の方が、A社のキットで抽出したDNAに対する増幅結果より明らかに多く (太いバンドとして得られ)、本キットのDNA抽出効率の高さを示す結果となった。

Exon7の検出できなかった検体については、次の実験で、PCR条件を多少変えて再試験を行った結果、増幅断片を得ることができた (図3)。再試験を実施して増幅断片が得られたことで、100 μ lという少量の検体から抽出した場合でも、検討した全ての検体からp53遺伝子のPCR増幅が可能であることを示すことができた (PCRに供した検体量は25 μ l相当量)。

まとめ

今回の結果よりDNA Extractor SP Kitの特長として「高いDNA回収率」を示すことができた。血中遊離DNAを高収率で取得することは、上述したような疾患関連遺伝子の検出の感度や分析の精度を向上させることにつながり、診断法開発研究の進歩に寄与できるものと思われる。本キットに興味を抱いていただき、皆様方の研究の一助となれば幸いである。

[参考文献]

- 1) Ishizawa, M. et al: *Nucleic Acids Res.*, **19**, 5792 (1991).
- 2) Wang, L. et al: *Nucleic Acids Res.*, **22**, 1774-1775 (1994).
- 3) Helbeck, H. J. et al: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 288-293 (1998).
- 4) Hamilton, M. L. et al: *Nucleic Acids Res.*, **29**, 2117-2126 (2001).
- 5) Oikawa, S. et al: *Biochemistry*, **40**, 4763-4768 (2001).
- 6) Leon, S. A. et al: *Cancer Res.*, **37**, 646-650 (1977).
- 7) Koffler, D. et al: *J. Clin. Invest.*, **52**, 198-204 (1973).
- 8) Stroun, M. et al: *Eur. J. Cancer Clin. Oncol.*, **23**, 707-712 (1987).
- 9) Stroun, M. et al: *Oncology*, **46**, 318-322 (1989).
- 10) Shao, Z. M. et al: *Clin. Cancer Res.*, **7**, 2222-2227 (2001).
- 11) Yamada, T. et al: *Clin. Cancer Res.*, **4**, 1527-1532 (1998).
- 12) Silva, J. M. et al: *Cancer Res.*, **59**, 3251-3256 (1999).
- 13) Sozzi, G. et al: *Clin. Cancer Res.*, **5**, 2689-2692 (1999).
- 14) Khan, S. et al: *Int. J. Cancer*, **110**, 891-895 (2004).
- 15) Esteller, M. et al: *Cancer Res.*, **59**, 67-70 (1999).

血中遊離DNA抽出用試薬



コードNo.	品名	規格	容量	希望納入価格(円)
296-60501	DNA Extractor SP Kit	遺伝子研究用	50回用	25,000

第57話 高感度エンドトキシン測定の実用

比濁時間分析法や比色法を用いると、かなり低濃度のエンドトキシンが測定できるようになっています。本シリーズでも、水中のエンドトキシンの測定の話を取り上げ、試料の添加量を調整することでトキシノメーター法による1EU/ℓのエンドトキシンの検出が90分程度で行えること、また、試料中のエンドトキシンを濃縮できるパイロセップ法では0.1EU/ℓ以下のエンドトキシンの検出が可能であることをご紹介しました(第21話¹⁾)。トキシノメーターの場合、試薬自体が自然に活性化を起こさない試薬、いわゆるブランクの安定な試薬を用いると、測定時間を延長すればするほど低濃度までエンドトキシンの測定が可能となります。今回は、この性質を利用した血中エンドトキシン測定の実用例をご紹介します。

血中エンドトキシンの測定は、グラム陰性菌感染症診断に有用であることが期待され、検討されてきました。1980年代から1990年代前半にかけて、主に合成基質法を用いた測定が検討され、迅速診断に期待が持たれましたが、β-グルカンにも反応するリムルス試薬を使用していたため、その結果に疑問が持たれるようになりました。その後、エンドトキシン特異的試薬を用いた測定が主流になると血中エンドトキシンの陽性率が低下しました。血中エンドトキシン測定には、血液中に存在する測定妨害物質を不活性化する必要があります。妨害物質の不活性化は、血液(血漿)の前処理によって行われ、種々の方法が開発されています。なかなか完全な前処理

法というものはないのですが、筆者らは、簡単な操作で処理が行え、ある程度良い回収率の得られる希釈加熱法を採用しています。操作が簡便であることは、エンドトキシン汚染を防ぐという面からも非常に重要です。筆者らが開発した界面活性剤を用いた希釈加熱法で血漿を前処理し、エンドトキシンに特異的なリムルス試薬とトキシノメーターを用いてエンドトキシンを測定する方法では、通常用いられている5pg/mℓをカットオフ値とすると、グラム陰性菌感染症を発見できる確率(診断感度)が56%、陰性の時にグラム陰性菌感染症でない確率(診断特異度)が99%との結果を得ており、グラム陰性菌感染症を発見するより、否定することに優れている方法と思われる²⁾。同じデータを用いて、カットオフ値を1pg/mℓまで下げると、診断感度は72%に上昇します²⁾。そのかわり、診断特異度は81%まで下がります。

血漿の前処理時の希釈倍率は10倍です。使用しているエンドトキシン1pgは約0.007EUですから、血漿中の1pg/mℓのエンドトキシンを測定するためには、その10分の1である0.0007EU/mℓを検出する必要があります。最近では、使用する器具も吟味され、測定技術も向上してきましたから、器具や操作からの汚染は少なくなりました。それに伴って、血中エンドトキシンの測定も正確に行えるようになってきたのですが、エンドトキシンの検出率も下がったように思えます。血中エンドトキシンの上昇が予想されるグラム陰性菌感染

症例でもエンドトキシン値が低いことがありますし、健康人血漿からエンドトキシンが検出されることはほとんどありません。それでは、どれくらい低い濃度を測定すると健康人における血中エンドトキシン濃度が見えてくるのでしょうか。筆者らは、トキシノメーターの測定時間を延長すれば低濃度まで検出できるという特徴を利用して、健康人血漿中のエンドトキシン測定を試みました²⁾。すなわち、前処理した健康人血漿を999分間測定してみたのです。74人の健康人の血漿を測定したところ、平均のゲル化時間は690.3分、最大999分以上、最小79.2分、標準偏差191.6分でした。690分のゲル化時間から検量線の外挿によってエンドトキシン濃度を求めると、0.06pg/mℓ(0.72EU/ℓ)となりました。

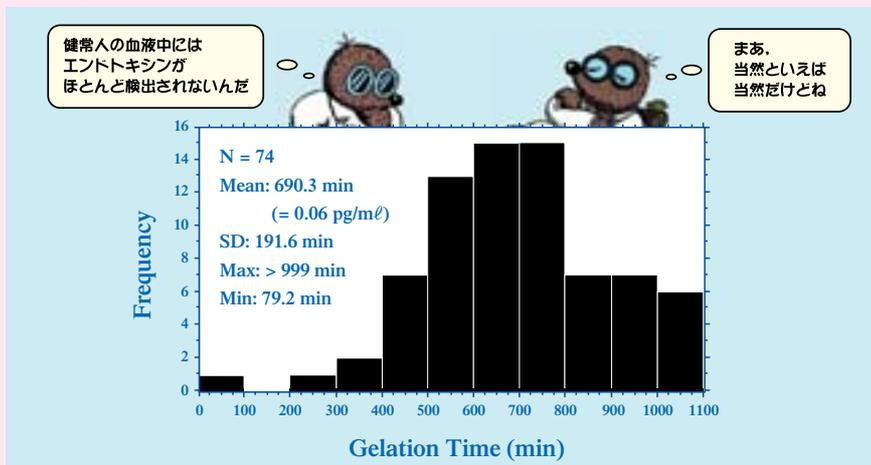
実際にこの方法を臨床研究に応用した例が報告されています³⁾。八重樫らは、健康人66名、感染症群31名、非感染症SIRS群40名について、測定時間を延長したエンドトキシン測定を行い、感染症群が他の群と比較して有意に高かったと報告しています。カットオフ値を1.1pg/mℓに設定すると、診断感度81.3%、診断特異度86.1%となっており、有用な検査になる可能性が示唆されています。問題は時間がかかることですが、この点も実際に測定すべき濃度が明らかになると、解決されていくことと思われます。

血液中にエンドトキシンが存在することは異常事態ですから、生体はこれに反応してエンドトキシンを抑えにかかると考えられます。このような状態は定常的でなく、常に変化していると思われるから、その測定も困難が予想されます。今後、エンドトキシン測定技術がさらに向上し、エンドトキシンの血中動態が明らかにされることを期待しています。

[参考文献]

- 1) 土谷正和:和光純薬時報, 63(4), 16(1995).
- 2) 土谷正和:「エンドトキシン研究5-研究と治療の進歩-」, p.17. (医学図書出版)(2002).
- 3) 八重樫泰法 他:エンドトキシン血症救命治療研究会誌, 7, 25(2003).

今回は、第58話「リムルス試験のバリデーション」の予定です。



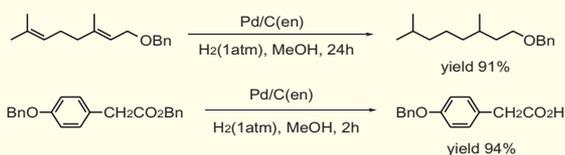
官能基選択的不均一触媒 Wako パラジウム-活性炭素エチレンジアミン 複合体 (Pd 3.5~6.5%) 【Pd/C (en)】

Pd/C (en) はパラジウム活性炭素 (Pd/C) のパラジウムとエチレンジアミンが約1:1の割合で複合化した不均一触媒です。中性条件下、様々な官能基を選択的に接触還元することが可能です。反応後はろ過するだけで簡単に除去することができます。また、通常のPd/Cに見られるような発火性を示さず、保存安定性を有する優れた還元触媒であり、工業的レベルでの展開が期待されます。

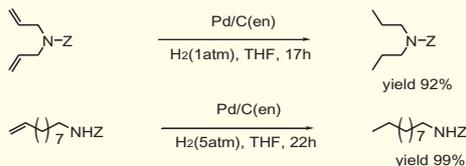
Pd/C (en) を用いた接触還元では、保護基であるベンジルエーテル²⁾、脂肪族アミンのZ (benzyloxycarbonyl) 基^{2, 3)}、*O*-TBDMS (*t*-butyldimethylsilyl) 基⁴⁾、エポキシド⁵⁾ 及びベンジルアルコール⁶⁾ の還元を抑制しながら、オレフィン、アジド、ニトロ、ベンジルエステル、芳香族ハロゲンなどの官能基を容易に還元することが可能です¹⁾。

反応例

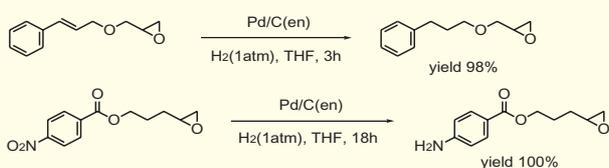
ベンジルエーテル基存在下での選択的還元反応²⁾



Z基存在下での選択的還元反応^{2, 3)}



エポキシド化合物の選択的還元反応⁶⁾



【参考文献】

- 1) 佐治木弘尚, 廣田耕作: 有機合成化学協会誌, **59**, 109 (2001).
- 2) Sajiki, H., Hattori, K. and Hirota, K.: *J. Org. Chem.*, **63**, 7990 (1998).
- 3) Hattori, K., Sajiki, H. and Hirota, K.: *Tetrahedron*, **56**, 8433 (2000).
- 4) Hattori, K., Sajiki, H. and Hirota, K.: *Tetrahedron Lett.*, **41**, 5711 (2000).
- 5) Sajiki, H., Hattori, K. and Hirota, K.: *Chem. Eur. J.*, **6**, 2200 (2000).
- 6) Sajiki, H., Hattori, K. and Hirota, K.: *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, 4043 (1998).

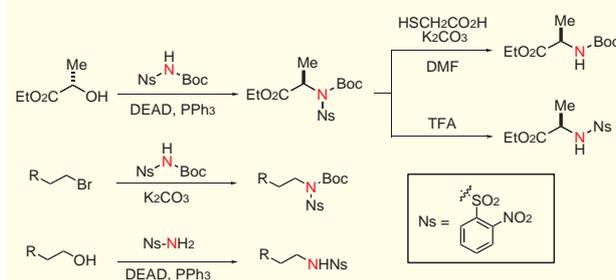
コードNo.	品名	規格	容量	希望納入価格(円)
163-21441	Palladium-Activated Carbon Ethylenediamine	有機合成用	1g	4,000
169-21443	Complex (Pd 3.5~6.5%)		5g	13,500

アミン合成試薬 Wako o-ニトロベンゼンスルホンアミド誘導体

o-ニトロベンゼンスルホンアミド誘導体は、相当するアルキルハライドやアルコールに簡便に窒素原子を導入することができるため、1級や2級アミンの合成に有用な求核試薬です¹⁾。これら結晶性の高いアンモニア等価体のスルホンアミド誘導体は、生理活性天然物の全合成や医薬品開発研究に多用されています^{2, 3)}。

この度、アミン合成試薬として重窒素化したo-ニトロベンゼンスルホンアミド及びその誘導体の販売を開始しました。¹⁵N標識アミン合成試薬を用いて¹⁵N標識化合物を容易に合成することが可能となりました。¹⁵N標識化合物は、薬物代謝研究など幅広い研究用途への応用が期待されています。

反応例



【参考文献】

- 1) Fukuyama, T., Cheung, M. and Kan, T.: *Synlett*, 1301 (1999).
- 2) 菅敏幸, 福山透: 有機合成化学協会誌, **59**, 779 (2001).
- 3) Kan, T. and Fukuyama, T.: *Chem. Commun.*, 353 (2004).

コードNo.	品名	規格	容量	希望納入価格(円)
■¹⁵N標識アミン合成試薬				
149-07881	o-Nitrobenzene(¹⁵ N)sulfonamide	有機合成用	1g	15,000
145-07883			5g	55,000
029-15141	N-BOC-o-nitrobenzenesulfonamide	有機合成用	1g	20,000
265-01831	N-Z-o-nitrobenzenesulfonamide	有機合成用	1g	20,000
012-20221	N-ALLOC-o-nitrobenzenesulfonamide	有機合成用	1g	近日発売

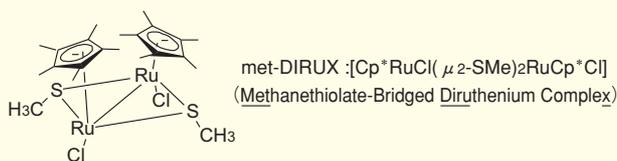
■¹⁴Nアミン合成試薬

142-07871	o-Nitrobenzenesulfonamide	有機合成用	5g	6,000
140-07872			25g	18,000
022-15131	N-BOC-o-nitrobenzenesulfonamide	有機合成用	5g	12,000
020-15132			25g	45,000
268-01821	N-Z-o-nitrobenzenesulfonamide	有機合成用	5g	12,000
266-01822			25g	45,000
015-20211	N-ALLOC-o-nitrobenzenesulfonamide	有機合成用	5g	近日発売
013-20212			25g	近日発売

硫黄架橋2核ルテニウム錯体 met-DIRUX

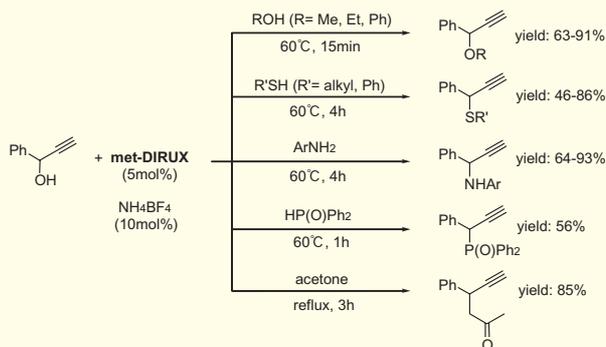
met-DIRUXはRuCl₃にpentamethylcyclopentadiene及びmethanethiolが配位したキラルな硫黄架橋2核ルテニウム触媒です。プロパルギルアルコールなどとルテニウム-アレンリデン錯体を形成し様々な基質と触媒的に反応することができます。たとえば、同一分子内の両末端アルキンによる環化反応¹⁾やプロパルギルアルコール化合物のプロパルギル位置換反応^{2, 3)}、フェノール化合物との環化付加反応⁴⁾、芳香族化合物のプロパルギル化反応⁵⁾、アルケンとのアレンリデン-エン反応⁶⁾が可能です。

また、不斉合成への応用も可能であり、空気中でも安定な触媒です。



反応例

プロパルギル位置換^{2, 3)}



フェノール化合物との環化付加反応⁴⁾



【参考文献】

- Nishibayashi, Y., Yamanashi, M., Wakiji, I. and Hidai, M.: *Angew. Chem. Int. Ed.*, **39**, 2909 (2000).
- Nishibayashi, Y., Wakiji, I. and Hidai, M.: *J. Am. Chem. Soc.*, **122**, 11019 (2000).
- Nishibayashi, Y., Wakiji, I., Ishii, Y., Uemura, S. and Hidai, M.: *J. Am. Chem. Soc.*, **123**, 3393 (2001).
- Nishibayashi, Y., Inada, Y., Hidai, M. and Uemura, S.: *J. Am. Chem. Soc.*, **124**, 7900 (2002).
- Nishibayashi, Y., Yoshikawa, M., Inada, Y., Hidai, M. and Uemura, S.: *J. Am. Chem. Soc.*, **124**, 11846 (2002).
- Nishibayashi, Y., Inada, Y., Hidai, M. and Uemura, S.: *J. Am. Chem. Soc.*, **125**, 6060 (2003).

コードNo.	品名	規格	容量	希望納入価格(円)
130-14581	met-DIRUX	有機合成用	200mg	13,000

ダイオキシン類分析用 サンプルングボトル(洗浄済み)

環境水を採取する際に使用する、ダイオキシン類ブランクを保証した3ℓのサンプルングボトルです。アセトンとジクロロメタンで2回洗浄しております。

最終洗浄液(ジクロロメタン)を採取し、高感度GC/MSにてダイオキシン類を測定、低濃度である事を保証しています。

洗浄後、1本ずつアルミ袋で包装し外部からの汚染を防いでいますので、開封しそのまま使用できます。



特長

- 2種類の溶媒(アセトン、ジクロロメタン)で洗浄
- ダイオキシン類のブランク値を高分解能GC/MSで保証
- 1本ごとにアルミ包装し、コンタミを防止
- 小包装(4本単位)から、大包装まで対応可能
- 事前洗浄なしでそのまま使用可能
- 1箱ごとに試験成績証明書添付

品質保証値

国土環境(株) 環境創造研究所にて測定

PCDDs	4~8塩素化物	0.0053pg-TEQ/本 以下
PCDF	4~8塩素化物	0.0031pg-TEQ/本 以下
Co-PCB *1		0.00046pg-TEQ/本 以下

*1 non-ortho Co-PCB (4~6塩素化物) 4種、mono-ortho Co-PCB (5~7塩素化物) 8種

コードNo.	品名	規格	容量	希望納入価格(円)
297-44651	ダイオキシン類分析用サンプルングボトル(洗浄済み)	-	3ℓ×4	12,000

アルデヒド分析用前処理カラム

Presep[®]-C DNPH (Short)

Presep[®]-C DNPH

アルデヒド類は有害大気汚染物質として、国内では悪臭防止法、大気汚染防止法、及びシックハウス(室内空気汚染)に係るガイドラインにより、規制・測定の対象となっています。

本品はカルボニル化合物の捕集ならびに2,4-ジニトロフェニルヒドラゾン(DNPH)による誘導体化を行う専用捕集管です。外装はルーアフィッティングタイプの高純度ポリエチレン製カートリッジを採用、大気捕集や溶媒抽出時の接続、取り扱いが容易です。この度商品化しましたPresep[®]-C DNPH(Short)は、充てん剤量を従来の約半分に変更し、さらに基材・フィルターの改良により、高流速でのサンプリングが可能です。用途に応じて、shortタイプと通常タイプをご選択下さい。



Presep[®]-C DNPH (Short)

Presep[®]-C DNPH

特長

Presep[®]-C DNPH (Short)

- 通気時の抵抗が低く、高流速でのサンプリングが可能
- 室内空気捕集に好適(厚生労働省法に準拠)

Presep[®]-C DNPHシリーズとして

- 低ブランクの実現
(ホルムアルデヒド、アセトアルデヒド及びアセトンによる汚染を極力抑えました)
- 使いやすい個別包装

仕様

	Presep [®] -C DNPH(Short)	Presep [®] -C DNPH
基 材	破砕状シリカゲル 粒子径:150-425 μ m 細孔径:7.0nm 比表面積:450cm ² /g	破砕状シリカゲル 粒子径:75-150 μ m 細孔径:7.0nm 比表面積:450cm ² /g
充てん剤量	約0.4g(シリカゲル)/ カートリッジ	約0.8g(シリカゲル)/ カートリッジ
D N P H 量	約0.9mg/カートリッジ	約1.8mg/カートリッジ
カラムサイズ	全長3.8cm、 最大幅1.9cm ϕ 充てん部1.0 ϕ ×0.8cm	全長5.0cm、 最大幅1.9cm ϕ 充てん部1.0 ϕ ×1.6cm
試料負荷量	約75 μ g (ホルムアルデヒドとして)	約150 μ g (ホルムアルデヒドとして)

捕集管の選択

Presep[®]-C DNPH (Short)

室内空気や高通気速度での捕集に好適。サンプリングポンプの吸引能力に応じて、本品を複数連結して使用することが可能。

Presep[®]-C DNPH

汎用タイプ。大気捕集などに好適*。

*:大気捕集の際、測定値がオゾンの影響を受ける場合は、Presep[®]-C オゾンスクラバーを大気吸引側に取り付けて下さい。

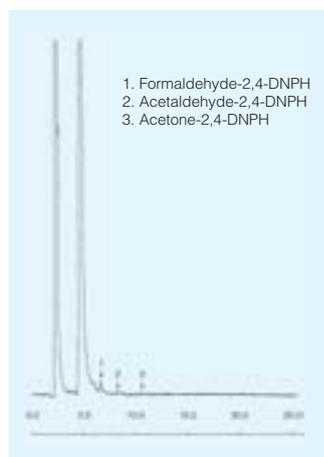
分析例

①カートリッジブランク

(アセトニトリル5m ℓ にて抽出)

②分析例

(実験室中の空気30 ℓ 採取)



カラム: Wakosil-II 5C18RS、4.6 ϕ ×250mm
 溶離液: CH₃CN/H₂O=60/40 (v/v)
 流速: 1.0m ℓ /min.at 40 $^{\circ}$ C
 検出: UV360nm,0.005AUFS(①)、0.04AUFS(②)
 注入量: 10 μ ℓ

コードNo.	品名	規格	容量	希望納入価格(円)
291-43951	Presep [®] -C DNPH (Short)	試料前処理用	20個	24,000

関連商品

コードNo.	品名	規格	容量	希望納入価格(円)
290-34251	Presep [®] -C DNPH	試料前処理用	20個	29,000
293-40351	Presep [®] -C Ozone Scrubber	試料前処理用	20個	13,500
017-17743	Acetonitrile	アルデヒド	100m ℓ	2,200
011-17741		分析用	200m ℓ	4,000

品名	カラムサイズ	カラムタイプ	記号	希望納入価格(円)
Wakopak [®] Wakosil-II 5C18RS	4.6 ϕ ×250mm	デュボン	トID	48,000
		ウォーターズ	トIW	

生薬標準品



ゴミシ(五味子)有効成分

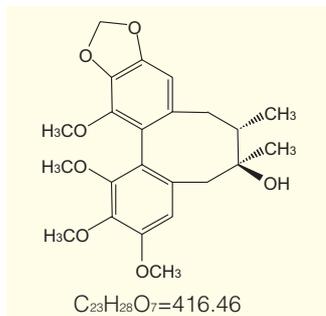
ゴミシ、シザンドリンはチョウセンゴミシ *Schisandra chinensis* Baillon (*Schisandraceae*) の果実に含まれる生薬有効成分です。ゴミシ有効成分は、中枢抑制、鎮咳、抗炎症、抗アレルギー及び利尿などの薬理作用が報告されています。

本品は局方取載ゴミシの確認試験に使用されます。

ゴミシンA標準品

起源: *Schisandra chinensis*
Baillon (*Schisandraceae*)
CAS No.: 58546-54-6

アセトニトリル溶状: 澄明
薄層クロマトグラフィー試験: 試験適合
含量 (HPLC): 98.0%以上

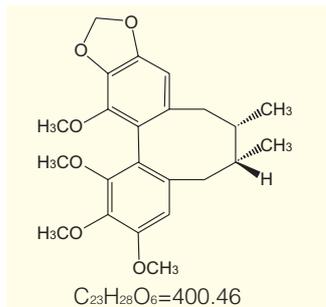


コードNo.	品名	規格	容量	希望納入価格(円)
077-04951	Gomisin A Standard	生薬試験用	10mg	26,000

ゴミシンN標準品

起源: *Schisandra chinensis*
Baillon (*Schisandraceae*)

アセトニトリル溶状: 澄明
薄層クロマトグラフィー試験: 試験適合
含量 (HPLC): 98.0%以上

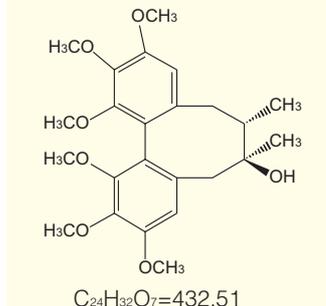


コードNo.	品名	規格	容量	希望納入価格(円)
074-04961	Gomisin N Standard	生薬試験用	10mg	26,000

シザンドリン標準品

起源: *Schisandra chinensis*
Baillon (*Schisandraceae*)
CAS No.: 7432-28-2

メタノール溶状: 澄明
薄層クロマトグラフィー試験: 試験適合
含量 (HPLC): 99.0%以上



コードNo.	品名	規格	容量	希望納入価格(円)
192-10441	Schizandrin Standard	生薬試験用	20mg	15,700

機能性高分子

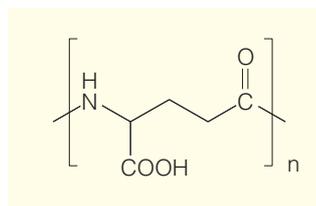


ポリ-γ-グルタミン酸

ポリ-γ-グルタミン酸はγ位のカルボキシル基とα位のアミノ基がペプチド結合で連なったポリマー(下図)で、主として納豆菌などの *Bacillus* 属菌によって産生されます。

本品は韓国の伝統大豆発酵食品であるチョングッチャンから単離された *Bacillus subtilis chungkookjang* により産生されたもので、通常の納豆菌から産生されるポリ-γ-グルタミン酸よりも非常に高分子量(20万~600万)であるため、吸水剤・保湿剤・増粘剤・ミネラル吸収促進剤・徐放性薬物伝達体(DDS)・生分解性凝集浄化剤など、機能性高分子化合物として化粧品・医薬品・工業用品の幅広い分野で用途開発が期待される物質です。

今回新製品として、平均分子量3タイプ、さらに各々Na有無による2タイプの合計6タイプと多彩に品揃えました。



特長

- DL混合物である。(D:L=7:3)
- 安定な粘度: 本品溶液の粘度値はpH、温度変化に対して比較的安定である。
- ロットごとに各平均分子量を確認済み。

*Naフリー

放射線処理による架橋反応に適する。放射線照射によってさらに複雑な高次構造を形成する結果、優れた吸水剤となることが知られている。水に難溶(アルカリ側で可溶)。

*Na塩

非常に水溶性が高く、生体内でのミネラル(Caイオンなど)吸収促進作用がある。

コードNo.	品名	規格	容量	希望納入価格(円)
--------	----	----	----	-----------

■Naフリータイプ

161-21361	Poly-γ-glutamic Acid, Average M.W.	生化学用	1g	3,500
167-21363	200,000~500,000		10g	17,500
165-21364	1,500,000~2,500,000		50g	52,500
168-21371	Poly-γ-glutamic Acid, Average M.W.	生化学用	1g	3,800
164-21373	1,500,000~2,500,000		10g	19,000
162-21374	4,000,000~6,000,000		50g	57,000
165-21381	Poly-γ-glutamic Acid, Average M.W.	生化学用	1g	4,100
161-21383	200,000~500,000		10g	20,500
169-21384	1,500,000~2,500,000		50g	61,500

■Na塩タイプ

162-21391	Poly-γ-glutamic Acid	生化学用	1g	3,000
168-21393	Sodium Salt, Average M.W.		10g	15,000
166-21394	200,000~500,000		50g	45,000
165-21401	Poly-γ-glutamic Acid	生化学用	1g	3,300
161-21403	Sodium Salt, Average M.W.		10g	16,500
169-21404	1,500,000~2,500,000		50g	49,500
162-21411	Poly-γ-glutamic Acid	生化学用	1g	3,600
168-21413	Sodium Salt, Average M.W.		10g	18,000
166-21414	4,000,000~6,000,000		50g	54,000

イムノブロットングや免疫組織染色に DAB溶液

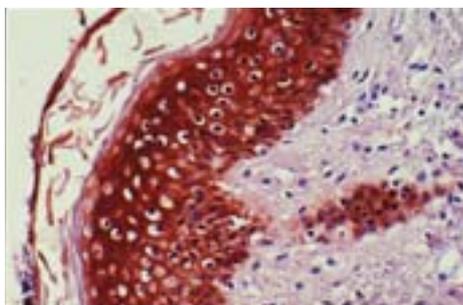
Wako

DAB (3,3'-diaminobenzidine) は、POD (Peroxidase) の発色基質です。PODと活性酸素の存在下で茶色に発色し、沈着します。そのため、イムノブロットングや免疫組織染色において、POD標識抗体の検出に使用されます。

本品は、このDABの濃縮液と反応液がセットになった商品です。反応液には過酸化水素が含まれていますので、使用前に濃縮液と反応液を混合するだけで、イムノブロットングや免疫組織化学などに使用できます。

内容

- DAB溶液 3ml × 1本
- 反応液 100ml × 1本



保存条件

2~10℃ 保存

コードNo.	品名	標識酵素	用途	規格	容量	希望納入価格(円)
545-02461	DAB Solution	Peroxidase	Immunohistochemistry Immunoblotting	生化学用	100ml用	18,800

関連商品

コードNo.	品名	標識酵素	用途	規格	容量	希望納入価格(円)
546-01911	TMB Solution (Microwell)	Peroxidase	ELISA	生化学用	100ml	12,000
543-01921	TMB Solution (Membrane)	Peroxidase	Immunohistochemistry Immunoblotting	生化学用	100ml	12,500
549-01901	2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic Acid) Solution	Peroxidase	ELISA	生化学用	100ml	11,000
547-01941	BCIP/NBT Solution	Alkaline phosphatase	Immunohistochemistry Immunoblotting	生化学用	100ml	12,500
540-01931	pNPP Solution	Alkaline phosphatase	Immunohistochemistry Immunoblotting	生化学用	100ml	11,000

青色とピンク色の着色済みマーカー Wako ワイドビュー™プレステイン タンパク質サイズマーカー

着色済みのタンパク質サイズマーカーです。含まれる8つのリコンビナントタンパク質には、青色とピンク色の発色団が共有結合しており、50kのバンドはピンク色、その他のバンドは青色を呈します。また、溶解後はボイルなしでそのまま使用できる簡単設計です。

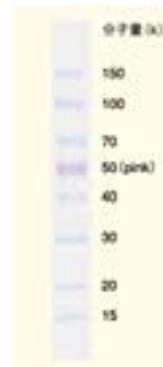
特長

- 2色のバンドで分子量の確認が容易です。
- 溶解後、そのままご使用いただけます。

推奨アプライ量 5-10μl / lane

分子量範囲 15-150 (k)

保存条件 -20℃ 保存



コードNo.	品名	規格	容量	希望納入価格(円)
230-02221	WIDE-VIEW™ Prestained Protein Size Marker	電気泳動用	500μl	18,000

ワイドビュー™ウエスタンサイズマーカー Wako

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リコンビナントタンパク質(プロテインG)により、ウエスタンブロットの一次抗体、二次抗体の両方に反応します。さらに、リコンビナント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

- ウエスタンブロットで、直接マーカーがバンドとして確認できます。
- マーカーの分子量が広範囲です。(16-150k)
- プロテインGと結合する様々な動物種の抗体と反応します。
- 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 1-5μl / lane

分子量範囲 16-150 (k)

保存条件 -20℃ 保存



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	250μl	20,000

関連商品

コードNo.	品名	規格	容量	希望納入価格(円)
134-14501	Molecular Weight Marker, High Range (分子量:17,30,42,79,116,200(k))	電気泳動用	1ml用	12,800
131-14511	Molecular Weight Marker, Middle Range (分子量:14,20,30,42,79(k))	電気泳動用	1ml用	12,800

蛍光試薬



蛍光試薬はRIの代替用途としての生体内物質標識の他に特長的な性質を持つものもあり、幅広い分野で様々な用途に使用することができます。この機会に是非ご利用下さい。

5-Carboxyfluorescein [5-FAM]

ペプチド、タンパク質、核酸の標識に用いられる緑色蛍光試薬です。本品の蛍光強度はpHに依存するため、標識試薬としての他に細胞内pH変化を調べるためにも使用できます。

測定波長： $\lambda_{ex}=492\text{nm}$ 、

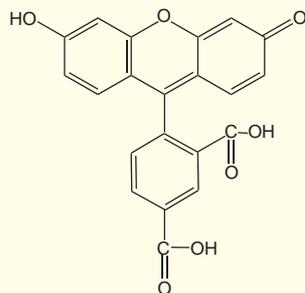
$\lambda_{em}=518\text{nm}$

溶解性：DMSO、DMF
に可溶。

CAS No. : 76823-03-5

【参考文献】

- 1) Hahn, M. *et al.* : *Electrophoresis*, 22, 2691 (2001).
- 2) Avrahami, D. *et al.* : *Biochemistry*, 40, 12591 (2001).
- 3) Hung, S. C. *et al.* : *Anal. Biochem.*, 243, 15 (1996).



$C_{21}H_{12}O_7=376.32$

コードNo.	品名	規格	容量	希望納入価格(円)
039-19341	5-Carboxyfluorescein [5-FAM]	細胞生物学用	100mg	10,000

Tetramethylrhodamine-5-maleimide

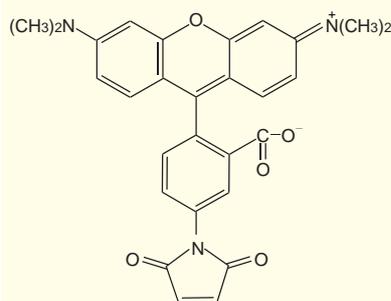
チオール標識蛍光試薬です。光安定性であり、蛍光強度はpHの影響を受けません。

測定波長： $\lambda_{ex}=541\text{nm}$ 、

$\lambda_{em}=569\text{nm}$

溶解性：DMSOに可溶。

CAS No. : 174568-67-3



$C_{28}H_{23}N_3O_5=481.50$

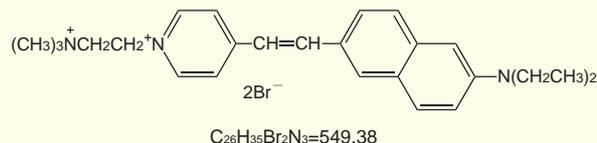
コードNo.	品名	規格	容量	希望納入価格(円)
204-16131	Tetramethylrhodamine-5-maleimide	細胞生物学用	5mg	近日発売

Di-2-ANEPEQ

ANEP (Amino Naphthyl Ethenyl Pyridinium) 色素の類似体である膜電位感受性色素です。電荷の変化に反応して蛍光スペクトルが変化します。本品はニューロン、心筋及び組織標本などにおける一過的な電荷の変化を調べるのに用いることができます。

測定波長： $\lambda_{ex}=517\text{nm}$ 、 $\lambda_{em}=721\text{nm}$

溶解性：DMSO、EtOHに可溶。



$C_{26}H_{35}Br_2N_3=549.38$

コードNo.	品名	規格	容量	希望納入価格(円)
046-29161	Di-2-ANEPEQ	細胞生物学用	5mg	近日発売

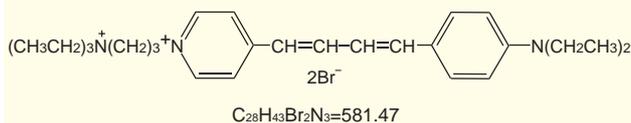
N-(3-Triethylammoniumpropyl)-4-[4-(diethylamino)phenyl]butadienylpyridinium dibromide [RH 414]

Dialkylaminophenylpolyenyropyridinium色素の類似体である膜電位感受性色素です。電荷の変化に反応して蛍光スペクトルが変化します。本品はニューロン、心筋及び組織標本などにおける一過的な電荷の変化を調べるのに用いることができます。

測定波長： $\lambda_{ex}=532\text{nm}$ 、 $\lambda_{em}=716\text{nm}$

溶解性：DMSO、EtOHに可溶。

CAS No. : 161433-30-3



$C_{28}H_{43}Br_2N_3=581.47$

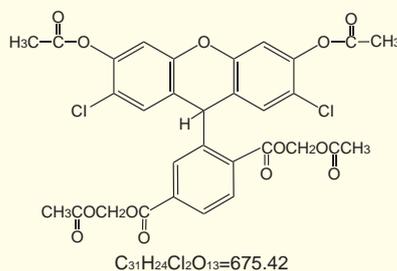
コードNo.	品名	規格	容量	希望納入価格(円)
141-07841	N-(3-Triethylammoniumpropyl)-4-[4-(diethylamino)phenyl]butadienylpyridinium dibromide [RH 414]	細胞生物学用	5mg	近日発売

6-Carboxy-2',7'-dichlorodihydrofluorescein Diacetate, Diacetoxymethyl Ester

細胞内エステラーゼの蛍光基質です。細胞膜透過性であり、細胞の中に入ると細胞内非特異的エステラーゼによって加水分解を受け、蛍光を呈します。また、酸化を受けることによっても蛍光を呈するため、アポトーシスの指標である活性酸素の検出にも用いられます。反応後の本品の蛍光スペクトル(λ_{em})は529nmです。

測定波長： $\lambda_{ex}=291\text{nm}$ 、 $\lambda_{em}=\text{none}$

溶解性：DMSOに可溶。



$C_{31}H_{24}Cl_2O_{13}=675.42$

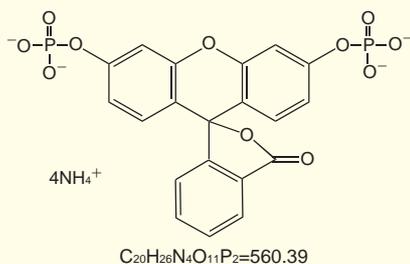
コードNo.	品名	規格	容量	希望納入価格(円)
032-19331	6-Carboxy-2',7'-dichlorodihydrofluorescein Diacetate, Diacetoxymethyl Ester	細胞生物学用	5mg	近日発売

Fluorescein Diphosphate Tetraammonium Salt [FDP]

ホスファターゼの蛍光基質です。りん酸基が加水分解されて強い蛍光を示します。チロシンホスファターゼの検出やELISA法の蛍光基質として用いられます。反応後の本品の蛍光スペクトル(λem)は514nmです。

測定波長: λex=272nm、λem=none

CAS No.: 217305-49-2



[参考文献]

- 1) Yu, J. S. *et al.*: *J. Biochem. (Tokyo)*, **129**, 243 (2001).
- 2) Nolkranz, K. *et al.*: *Anal. Chem.*, **74**, 4300 (2002).
- 3) Murakami, Y. *et al.*: *Biosens. Bioelectron.*, **16**, 1009 (2001).
- 4) Ahumada, A. and Izquierdo, L.: *Biol. Res.*, **27**, 241 (1994).
- 5) Huang, Z. *et al.*: *J. Immunol. Methods*, **149**, 261 (1992).

コードNo.	品名	規格	容量	希望納入価格(円)
060-04521	Fluorescein Diphosphate Tetraammonium Salt [FDP]	細胞生物学用	5mg	近日発売

簡便、定量性に優れたGLP-2測定キット Wako Rat GLP-2 ELISA Kit wako

プログルカゴンは、グルカゴン、グルカゴン様ペプチド(GLP)-1、GLP-2などから構成されており、膵臓ではグルカゴン、腸管ではGLP-1、GLP-2にプロセシングされます。最近、GLP-2を脳内に投与することによりラットの摂食行動が抑制されることが報告されました¹⁾。

本キットは、簡便でかつ特異性、定量性に優れた競合型ELISAキットです。血清、血漿サンプルの測定が可能です。

キット内容

- 抗体固定化96穴マイクロプレート(分割可) 1枚
- ラットGLP-2標準品 50ng
- ビオチン化ラットGLP-2 1本
- 抗ラットGLP-2, ウサギ 6mℓ
- HRP結合ストレプトアビジン 12mℓ
- 発色剤(OPD錠) 2錠
- 基質溶解液 26mℓ
- 緩衝液 25mℓ
- 洗浄原液(20×) 50mℓ
- 反応停止液 12mℓ
- プレートシール 3枚

測定手順

抗体固相化プレート

- ← ビオチン化ラットGLP-2 75μℓ、標準液または検体 25μℓ、抗ラットGLP-2, ウサギ 50μℓ

4℃、一晚静置

洗浄

- ← HRP結合ストレプトアビジン 100μℓ

室温(20~30℃)、1時間振とう

洗浄

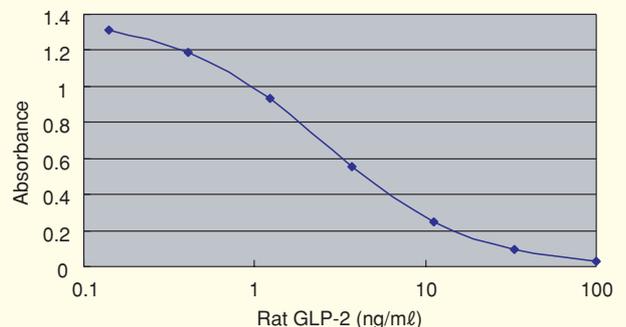
- ← 発色液 100μℓ

室温(20~30℃)、30分間反応

- ← 反応停止液 100μℓ

吸光度測定(492nm)

標準曲線



測定範囲 0.137~100ng/mℓ

測定時間 一晚+1.5時間

検体量 25μℓ

添加回収 109~123%(ラット血清)、108~109%(ラット血漿)

特異性 ラットGLP-2に特異的。300pmol/mℓの範囲内でラットグルカゴン及びラットGLP-1とは交差反応しない。

[参考文献]

- 1) Tang-Christensen, M. *et al.*: *Nature Med.*, **6**, 802 (2000).

コードNo.	品名	規格	容量	希望納入価格(円)
292-60601	Rat GLP-2 ELISA Kit wako	糖尿病研究用	96回用	75,000

関連商品

コードNo.	品名	規格	容量	希望納入価格(円)
291-59201	GLP-1(Human, Mouse, Rat) ELISA Kit wako	糖尿病研究用	96回用	75,000
297-57101	Glucagon (Human, Mouse, Rat) ELISA Kit wako	糖尿病研究用	96回用	75,000
295-57401	Rat C-Peptide ELISA Kit wako	糖尿病研究用	96回用	75,000
297-57601	Rat Leptin ELISA Kit wako	肥満研究用	96回用	60,000

抗体ができずにお困りの方へ **NIPPON** ニワトリ型モノクローナル抗体の受託生産サービス

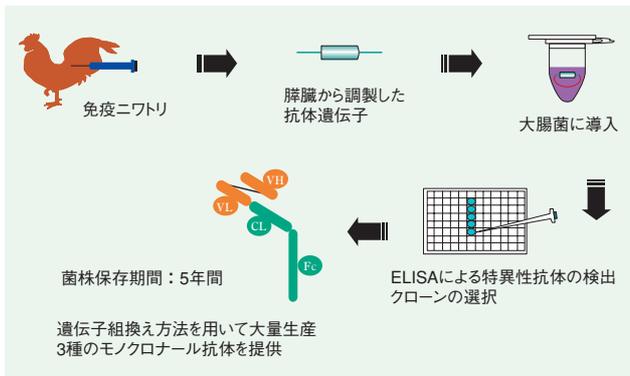
日本製粉㈱は、抗原を免疫したニワトリから遺伝子操作により抗体遺伝子を単離し、大腸菌で大量にモノクローナル抗体を生産する技術を確認しました。この技術を利用して、ニワトリ型モノクローナル抗体受託サービスを行っております。

特長

- 哺乳類由来の抗原でも抗体が作製できる可能性が高い
- 納期は約3ヶ月
- ニワトリ抗体の可変領域にマウスの定常領域を結合させたキメラ抗体
- 卵IgY (ポリクローナル抗体)も提供可能 (オプション)

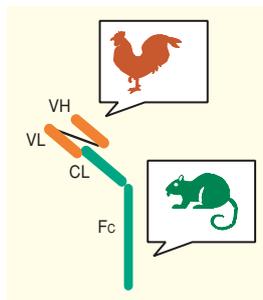
ニワトリ型モノクローナル抗体作製

お預かりした抗原をニワトリに免疫した後、脾臓から抗体遺伝子を単離し、大腸菌で抗体を産生させます。

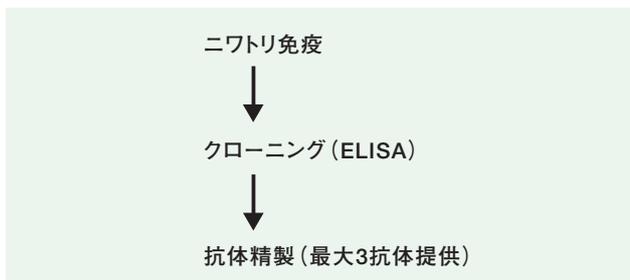


抗体の構造

可変領域 (VH, VL) はニワトリ型、定常領域 (C) はマウス型である一本鎖モノクローナル抗体です。ウエスタンブロット法やELISA法の二次抗体として抗マウス抗体が使用できます。



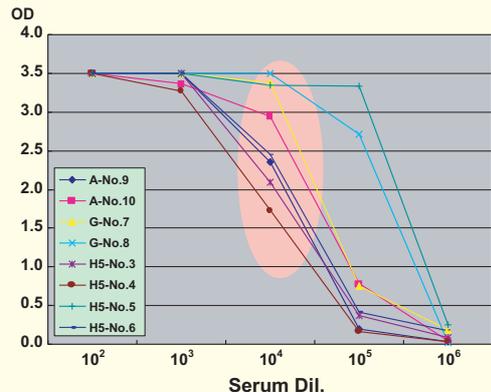
基本作業内容



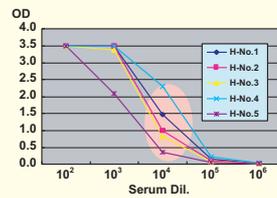
免疫時の抗体価の比較 (ニワトリ、マウス、ウサギ)

(免疫期間：約1.5ヶ月)

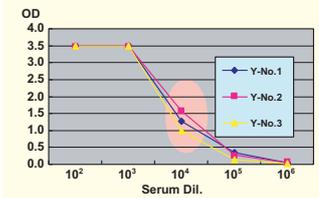
ニワトリの免疫時抗体価



マウスの免疫時抗体価



ウサギの免疫時抗体価



Q&A

- 必要な抗原量は?
A1. 5mg (濃度: 1mg/ml以上) です。
- 抗体は一本鎖モノクローナル抗体ですが、ウエスタンブロットニングやELISA、免疫沈降などの実験で、通常の二本鎖のモノクローナル抗体と同様に使用できますか?
A2. 通常の二本鎖のモノクローナル抗体と同様に使用できます。
- 抗体を生産する大腸菌は提供できますか?
A3. 申し訳ありませんが、大腸菌は提供できません。大腸菌が生産した抗体を精製してお届けします。
- 抗体産生菌株はどれくらい保存してあるのですか?
A4. 5年間保存しますので、その期間内であれば、同一クローンの追加抗体作製、精製が可能 (オプション) です。
- 抗体作製に失敗した場合は費用がかかるのですか?
A5. 基本作業料金として、10万円請求させていただきます。ただ、哺乳類由来の抗原の場合、種が異なる、ニワトリを免疫動物として作製しますので、抗体ができる可能性は高くなります。
- 抗体遺伝子配列の開示は可能でしょうか?
A6. 基本的には開示しませんが、契約に同意いただければ、開示します。

コードNo.	品名	納期	容量	希望納入価格 (円)
003-10500	ニワトリ型モノクローナル抗体	3ヶ月	3クローン	1,200,000

■オプション・他

品名	納期	容量	希望納入価格 (円)
クローニング (イムノブロットニング)	0.5ヶ月	-	130,000
追加抗体精製	0.5ヶ月	1クローン	80,000
卵IgY精製	2.5ヶ月	5個分	130,000
ポリクローナル抗体	3ヶ月	-	220,000

自動核酸抽出システム



QuickGene-800

従来の約 $1/10$ の厚さ! 革新的なメンブレンフィルター
あらゆる遺伝子研究へ、DNAそしてRNAの自動抽出を

21世紀に入り、ライフサイエンスの世界では、研究から臨床診断の幅広い領域で遺伝子に関わる様々な研究と技術開発がなされています。核酸(DNA, RNA)の抽出は、遺伝子研究を行うために避けて通ることのできないプロセスであり、迅速性及び簡便性の向上、自動化、低コスト化とともに、核酸の純度や収率に改良が求められていました。

「QuickGene-800」は、これらの要望にお応えする、富士フィルム独自の先進的な高分子製膜技術を駆使した「多孔質メンブレン」を用いて核酸の抽出を行うシステムです(Fig.1)。「多孔質メンブレン」は、核酸以外の成分との相互作用は少なく、選択的に核酸を吸着する表面改質がなされており、 $80\mu\text{m}$ と非常に薄いメンブレンにもかかわらず高い収量の核酸を捕捉することができます(Fig.2)。

従来からあった核酸抽出システムでは $1,000\mu\text{m}$ (1mm)という厚みのガラスフィルターを使用することからフィルター中の残留物による純度に課題があり、また遠心分離機が必要でした。しかし、「多孔質メンブレン」を用いることで遠心分離機を不要とし、低圧濾過方式で容易な抽出が可能となり、高純度、高収率、小型、簡便、迅速な自動システムが実現できます。

QuickGeneシステムは基礎研究にとどまらず遺伝子診断などの各種診断市場向けに発展するとともに、SNPs(一塩基多型)解析やマイクロアレイなど、各種診断へ繋げるトータルシステムとしての可能性を持っています。



Fig.1

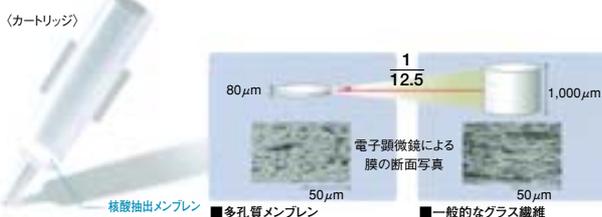


Fig.2 画期的な核酸抽出メンブレン

特長

- 小型軽量
加圧操作のみ、遠心分離器を使わないコンパクトな卓上自動システム。
- 簡単便利
サンプルをセット、モード選択。あとはスタートスイッチを押すだけ。
- 迅速処理
抽出時間は8サンプル同時でわずか6分*、小型ながら大量処理も可能。
※DNA全血キット
- 専用キット
全血DNA、培養細胞RNAそして組織DNA。必要な試薬がすべて揃う専用抽出キット。

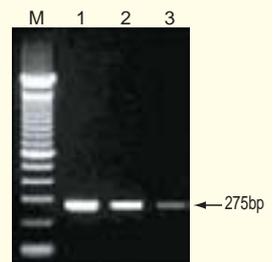


使用例

抽出DNAのPCR例

全血 $200\mu\text{l}$ から抽出したゲノムDNAを用い、p53 exon6領域をターゲットにPCRを行った。

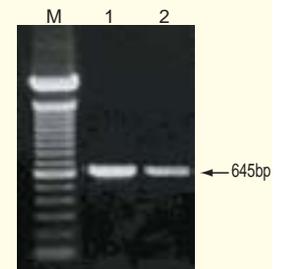
- M : 100bp ladder
 1 : ゲノムDNA $10\text{ng}/\mu\text{l}$
 2 : ゲノムDNA $1\text{ng}/\mu\text{l}$
 3 : ゲノムDNA $0.1\text{ng}/\mu\text{l}$



抽出RNAのRT-PCR例

HL60細胞 1×10^6 から抽出したtotal RNAを用い、 β -actinをターゲットにRT-PCRを行った。

- M : 100bp ladder
 1 : total RNA $100\text{pg}/\mu\text{l}$
 2 : total RNA $10\text{pg}/\mu\text{l}$



コードNo.	メーカーコード	品名	容量	希望納入価格(円)
■自動核酸抽出システム				
636-05601	—	QuickGene-800	1台	1,040,000
■専用抽出キット				
633-05611	DB-S	QuickGene DNA whole blood kit S	96回用	33,400
630-05621	RC-S	QuickGene RNA cultured cell kit S	96回用	51,400
637-05631	DT-S	QuickGene DNA tissue kit S	96回用	37,400

赤色蛍光タンパク質発現ベクター EVROGEN J-Red Protein Expression Vector

J-Redは、遺伝子改変操作により *Anthomedusae* クラゲの色素タンパク質を赤色に変えた新規の赤色蛍光タンパク質です。J-Redは、他の赤色蛍光タンパク質に見られるような細胞内での凝集などがないため、融合タンパク質として有用です。

特長

- 真の赤色蛍光である (610nm)
- 細胞内で凝集しないので融合タグに適している

励起波長 (nm) : 584

蛍光波長 (nm) : 610

ϵ (cm⁻¹·M⁻¹) : 44,000

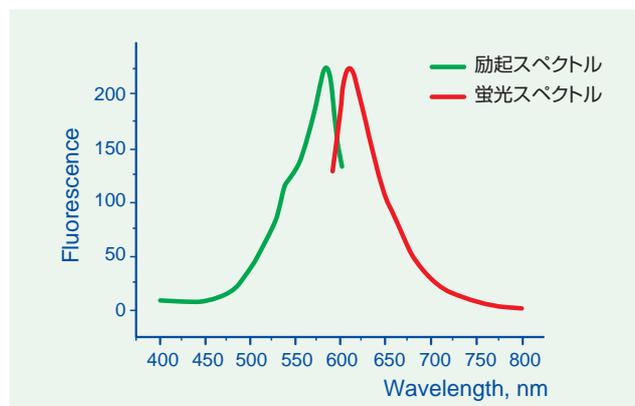
蛍光収量 (ϕ) : 0.20

コドン : ヒト型

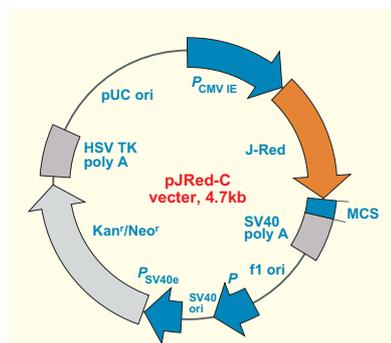
宿主 : 哺乳動物

プロモーター/選択マーカー : CMV IE/Kan/Neo

構造 : モノマー (ゲル電気泳動で確認)



■ pJRed-C vectorのマップ

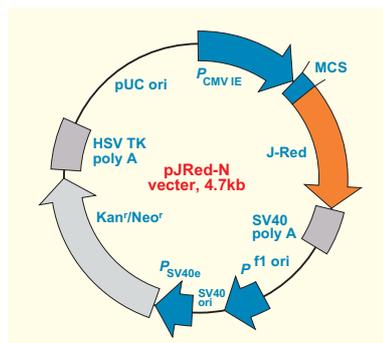


マルチクローニングサイト

J-Red $\frac{BglII}{TCC. GGA. CTC. AGA. TCT. CGA. GCT. CAA. GCT. TCG. AAT. TCT. GCA. ATC. TAA. CTG. ATC. A.}$ $\frac{SacI}{XhoI}$ $\frac{EcoRI}{HindIII}$ $\frac{SalI}{PstI}$ $\frac{KpnI}{SacI}$

$\frac{ApaI}{GCG. GGC. CCG. GGA. TCC. ACC. GGA. TCT. AGA. TAA. CTG. ATC. A.}$ $\frac{BamHI}{SacI}$ $\frac{SmaI/XmaI}{XbaI/\#}$ $\frac{Stops}{XbaI/\#}$ $\frac{BclI/\#}{BclI/\#}$

■ pJRed-N vectorのマップ



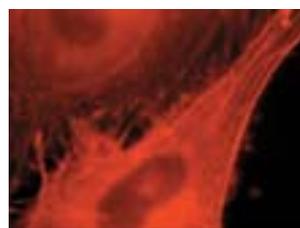
マルチクローニングサイト

$\frac{NheI}{GCTA. GCG. CTA. CCG. GAC. TCA. GAT. CTC. GAG. CTC. AAG. CTT. CGA. ATT. CTG. CAG.}$ $\frac{BglII}{XhoI}$ $\frac{SacI}{XhoI}$ $\frac{HindIII}{XhoI}$ $\frac{EcoRI}{PstI}$ $\frac{SalI}{PstI}$

$\frac{SalI}{TCG. ACG. GTA. CCG. CGG. GCC. CGG. GAT. CCA. CCG. GTC. GCC. ACC. ATG. XXX. XXX.}$ $\frac{KpnI}{SacI}$ $\frac{ApaI}{SmaI/XmaI}$ $\frac{BamHI}{SmaI/XmaI}$ $\frac{AgeI}{SmaI/XmaI}$ $\frac{J-Red}{SmaI/XmaI}$



EGFP-fibrillarin及びJ-Red-fibrillarin融合タンパク質を発現するHeLa細胞の蛍光顕微鏡写真
(A) : EGFPの緑色蛍光シグナル (B) : J-Redの赤色蛍光シグナル (C) : (A)と(B)を重ねた像



HeLa細胞へのJ-Red-actin融合タンパク質をコードするプラスミドの導入例 (一過性発現)

Notice to Purchaser: (ライセンスについて)

Evrogen Fluorescent Protein Products (the Products) are available to: Not-For-Profit-Entities for non-commercial research use. With purchase of the Products, non-profit entities are granted a worldwide, non-exclusive, royalty-free, limited license to use the Products for non-commercial life science research only. Such license specifically excludes the right to sell or otherwise transfer the Products, its components or derivatives to third parties. For any other use of the Products please contact Evrogen at license@evrogen.com

For-Profit-Entities for non-commercial or commercial applications under license. For license information please contact Evrogen at license@evrogen.com

コードNo.	メーカーコード	品名	容量	希望納入価格 (円)
581-82861	FP701	pJRed-C Vector	20µg	93,000
588-82871	FP702	pJRed-N Vector	20µg	93,000

エンドトキシン測定装置 トキシノメーターET-5000



トキシノメーターシリーズは、1985年にエンドトキシンとライセート試薬のゲル化による半定量の方法からエンドトキシン定量化を図る測定装置としてET-201が上市されました。

さらにET-208、ET-301、ET-2000及び全自動測定装置のET-auto3000を日本薬局方エンドトキシン試験法の比濁法測定装置として、また1996年光源に超高輝度青色LEDを採用し、黄色合成基質法試薬にも対応できるようになり比色法の測定装置としてもご愛顧頂いて参りました。

この度、ET-301の後継機としてET-5000を開発しました。



※プリンターはオプションです。

特長

- 超高輝度青色LEDの採用により比濁法試薬及び黄色発色合成基質法試薬にも対応
- 各種微生物細胞壁成分の測定が可能
エンドトキシン、(1,3)-β-D-グルカン、ペプチドグリカン
- 最大128検体同時測定可能(アナリシスモジュールを4台接続時)

- Windows版ソフトウェア「トキシマスターQC」(日本薬局方14局、FDAガイドライン、生物学的製剤基準エンドトキシン試験法に対応)を内蔵、高いデータ処理機能を提供
- WindowsXP採用により、将来的な機能拡張をサポート
USBコネクタ、LANコネクタを装備し、USB機器接続や将来のネットワーク接続機能などの拡張機能をサポート
バーコードリーダー、Part11対応、LANネットワークリモート制御可能
- パソコン不要のスタンドアロンシステム
- TFTカラー液晶ディスプレイ(タッチパネル)の採用による洗練された操作性を実現
- 反応試験管セットによる測定の自動スタート
- 設定温度を30/37℃切り替え可能
- 12mm試験管を利用することにより、マルチテスト、シングルテストの両方のテストが可能

コードNo.	品名	容量	希望納入価格(円)
293-43651	トキシノメーターET-5000コントロールモジュール	1台	2,000,000
299-43751	トキシノメーターET-5000 BL2アナリシスSモジュール	1台	1,800,000

関連商品

コードNo.	品名	容量	希望納入価格(円)
293-41059	トキシノメーターET-2000/J	1台	2,100,000
297-40859	トキシノメーターET-301 BL2アナリシスSモジュール/J	1台	1,800,000
293-42051	LS-トキシマスターQC5	1セット	480,000

■エンドトキシンフリーチップ

290-31451	バイオクリーンチップフココー200	100本	2,800
294-31351	バイオクリーンチップフココー1000	100本	2,800
298-32851	バイオクリーンチップフココーエクステンDS	100本	6,000

第20回 Wako ワークショップ

「がんの分子病態:新たな制御法の開発に向けて」

日時:平成16年11月24日(水) 10:00~17:00

場所:千里ライフサイエンスセンター ライフホール(5階)

大阪府豊中市新千里東町1丁目4番2号 TEL 06-6873-2010

総合企画:大阪大学大学院 医学系研究科

分子病態内科学(血液・腫瘍内科学)教授 金倉 譲 先生

参加費:無料

定員:420名(先着順)

参加申込先:和光純薬工業株式会社 試薬営業本部

学術部 ワークショップ係

〒540-8605 大阪市中央区道修町三丁目1番2号

FAX:06-6201-5964 TEL:06-6203-1788

E-mail:seminar@wako-chem.co.jp

講演プログラム

開始時間	演題	所属	講演者
10:00~	開催挨拶	和光純薬	
10:05~	はじめに	阪大院医	金倉 譲
10:10~	チロシンキナーゼからのシグナルと細胞がん化	東大医科研	山本 雅
10:50~	造血シグナルと分子標的治療	阪大院医	金倉 譲
11:30~	細胞周期制御とがん	九大生医研	中山 敬一
12:10~	(休憩)		
13:10~	細胞の接着・運動・増殖の制御機構	阪大院医	高井 義美
13:50~	膜結合型増殖因子と細胞増殖制御	愛大医	東山 繁樹
14:30~	がんのゲノム異常	東医歯大難研	稲澤 謙治
15:10~	(コーヒーブレイク)		
15:30~	白血病における転写とクロマチンの制御	国立がんセンター	北林 一生
16:10~	がん抑制遺伝子の機能	東大分生研	秋山 徹
16:50~	おわりに	阪大院医	金倉 譲
17:00~	閉会挨拶	和光純薬	

ジョーゼフ・プリーストリ (1733.3.13~1804.2.6)

科学史家 島尾 永康

非国教の牧師・教師

今日ジョーゼフ・プリーストリは酸素を発見した化学者として知られるが、本来は牧師・教師であり、ルネッサンス人のような広範な興味をもって、神学、歴史、教育、形而上学、言語、美学、政治、科学についての本、パンフレット、論文など、著作は200篇の多数に上る(うち101篇は科学論文)。著書の大部分は神学論争である。生前、科学者として大きな名声を博したが、宗教家としても、政治活動でも有名だった(図1)。毛織物業者が集中していたヨークシア州リーズの近くで、祖父の代からの毛織物の仕上げ職人の6人の子供の長子として生まれた。幼いときは母方の祖母に引き取られ、6歳で母が亡くなったあとまもなく、子供のない父方の伯母の許に送られ、伯母が亡くなるまで22年間一緒に暮らした。かれが生涯を通じて権威に服従しなかったのは、実の家族からずっと引き離されていたことによるとみる人もいる。現に18歳ころには一家の厳格なカルヴィニズムに反発するようになっていた。伯母の家によく出入りしていた非国教の牧師たちの神学論議や急進的な政治的見解に親しんだ。イギリスでは支配層・上流階級は英国教会に属し、その他の人々は非国教の諸宗派に属した。18世紀初め、非国教の教会が1000箇所も設立された。伯母はプリーストリに牧師になることを勧め、語学の才能があるかれはそのつもりでラテン語、ギリシア語、ヘブライ語を学び、さらにカルデア語、シリア語、アラビア語に及んだ。一時、病気になり志望を変更した時期には、フランス語、イタリア語、高地オランダ語(ドイツ語)などの現代語を独学した。

19歳で非国教のダヴェントリ・アカデミーに入学した。当時の英国の唯二つの大学、オックスフォードとケンブリジは非国教徒には門戸を閉ざしていたので、非国教徒は別にアカデミー(大学とは名乗れなかった)を設立し、それらは沈滞していた大学より充実した高等教育をおこない、国教徒の通学も認めていた。ちなみに支配層は、非国教徒を地方自治体の公職から追放する



図1. ジョーゼフ・プリーストリ、61歳。ウィリアム・アートード画、1794。

ための地方自治体法(1661年制定)と、非国教徒を中央公職から排除するための審査法(1673年制定)とを制定していたから、非国教徒が宗教的には英国教会に対立し、政治的には急進的になるのは当然だった。在学中から三位一体論への懐疑をつのらせ、「いかなる問題であれ、その異端的な面を見てとることができた」(『回想』、1787)プリーストリは、生涯を通じてつねに政治的、神学的問題では異端的立場をとり続けた。しかし当の本人は結構魅力的な人柄で、誠実で、真理探究に熱心で、好印象を与える人物であった。

最初はサフォーク州、ニーダム・マーケットの長老派教会の牧師補として赴任したが、若年の未熟さ、ひどい吃音、そして異端的な神学でさんざんな不評を蒙った。ここに3年過ごした後、ナントウィッチの教会に移ったが、ここではかれの神学はさほど問題にはならず、ささやかな学校を開いて教師として成功した(1758~61)。

電気学史

これが機縁となって、非国教の学校中の名門校ウォリントン・アカデミーに招かれて



図2. プリーストリの署名。

過ごした6年間(1761~67)で、プリーストリは大きく発展した(図3)。語学、近代史、法律、弁論と批評、さらに解剖学までほとんど何でも教えた。吃音矯正にも努めた。正式に牧師に任命され、教え子の姉メリー・ウィルキンソンと結婚した。妻の実家は18世紀イギリス有数の製鉄業者だった。プリーストリは教育的業績によってエディンバラ大学からLL.D(法学博士)を授与され(1764)、王立協会会員にもなった(1766)。かれが考案した『伝記図表』は、歴史的人物の生存期間を1本の横線で表示し、約2000人を幅60センチ、長さ90センチの1枚の紙にグラフ化した。これは好評で版を重ねた。

この時期の最大の業績は、大冊、『電気学の歴史と現状』、2巻、約800ページ(1767)である。原論文にもとづいて書かれているので、今なお価値を失わない。地方の非国教の牧師・教師が科学について書いた最初の書物が一挙に名著になったのは、次のような事情による。プリーストリはよくロンドンへでかけ、そこで当時、電気研究者として最も有名だったベンジャミン・フランクリンにうまく接触し、さらに電気学者ジョン・カントン、ウィリアム・ワトソン、リチャード・プライスと知り合った。かれらはすべて王立協会会員で、プライス以外は王立協会の最高の賞であるコブレイ賞受賞者でもあった。無名の青年プリーストリがこれら一流の人々をどのようにして引きつけたのである

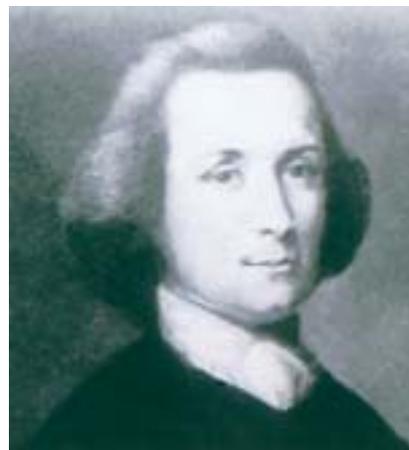


図3. ウォリントン・アカデミーの教師時代のプリーストリ、30歳ころ。作者不詳。親友フランクリンの肖像と並んで王立協会に掲げられている。

うか。科学のオリジナル研究を始めたばかりで早くも、この4人の人々の推薦で王立協会会員になった。さらに電気学史の執筆の構想をもちかけて、かれらから全面的な後援と助言を獲得したのは Priestley の手腕であろう。原稿の一部が出来上がるたびに、かれらに批評してもらい、参考書や原論文や実験のヒントをもらった。巻末に参考文献として Gilbert の『磁石論』(1600) から 1766 年の本まで 65 冊を年代順に列挙し、出版年不明の 8 冊を別に挙げている。そのうち著者が見たものには * 印をつけているが、41 冊ある。当時としては異例であった。18 世紀イギリスの電気研究についての最も権威ある記述となり、50 年以上にわたって有益なテキストとなった。英語版 5 版、オランダ語版、フランス語版、ドイツ語版各 1 版を出した。各種物質の電気伝導性など Priestley のオリジナル研究は第 2 版以後に収録された(図 4)。生涯を通じて Priestley は歴史的手法で知的問題に取り組んだ。電気学史執筆と同じころ、ウォルトン・アカデミーに歴史、政治学、経済学の講義を導入したが、これはオックスフォード大学に経済学教授職が設けられる 60 年も前だった。27 歳年長の、アメリカ植民地政庁代表の Franklin とは終生の友となり、アメリカ植民地の支持者となった。

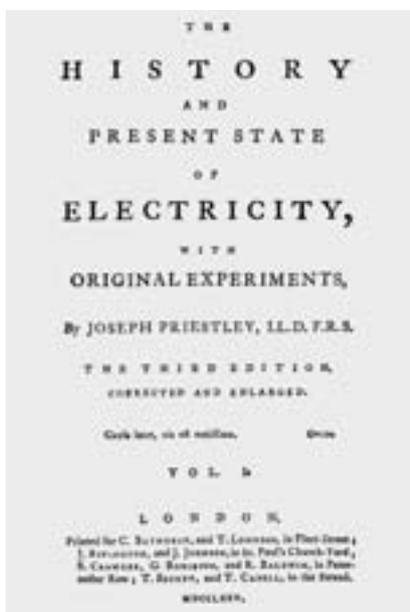


図 4. 『電気学の歴史と現状。オリジナル実験付き。』、第 3 版 (1775) の扉、第 1 巻、503 頁、第 2 巻、375 頁。

統治の原理：多数者の利益と幸福

『電気学史』の出版を待たず、生まれ故郷に近いリーズの牧師となった(1767~73)。教師から本職の牧師に復帰したのである。ここでユニテリアニズムの立場を明確に打ち出し、宗教と政治の論客となっていく。『英文法』、『電気学入門』、『透視画法』など 30 冊の著述があるが、最も注目すべきは、パンフレット、『統治の第一原理、および政治的、市民的、宗教的自由の本性』(1768)であろう。「いかなる国家であれその構成員の多数者の利益と幸福が、国家にかかわるすべての事柄を定める際の基準となる」という Priestley の言葉は、ジェレミー・ベンサムに影響して、「最大多数の最大幸福」という有名なスローガンになり(『政治論断片』、1776)、またトマス・ジェファソンの「アメリカ独立宣言」(1776)にも影響した。電気学史の成功に気をよくして、光学史、『視覚、光、色彩の発見史と現状』(1772)を出版したが、英独各 1 版しか出さず、資料収集の費用さえ回収できなかったので個別科学史を書くことを断念した。しかしマッハの光学史が 20 世紀になって英訳されるまで 150 年間、英語では唯一の光学史であった。風景画家ターナーはこの書物から影響を受けたという。

化学の研究

リーズ時代に化学の研究に手を染めたが、そのきっかけは住居の隣がたまたま醸造所だったので、発酵で生じるその豊富な炭酸ガスを加圧して、「ソーダ水」の製法を発明したことである。その冊子はフランス語に翻訳され、王立協会からはコブレイ賞を授与された。このころクック船長の南海への第二回航海に同行してはという話があり、本人と家族への手当てが非常に良かったのでその気になったが、かれの宗教的立場のゆえに不成立となった。子供も 3 人になり、家計が楽でないのを見た友人ブライスが、Priestley を尊敬していたシェルバーン

伯爵(ホイッグ党の有力政治家ウィリアム・ペッティ、1782 年に首相となる)に Priestley のパトロンになるよう推挙した。伯爵は承諾し Priestley も躊躇したのち、住み込みの「学問上のお相手役」となることを受諾した(1773~80)。リーズでの収入の 2.5 倍に当たる年収 250 ポンド、居宅付。辞職後は年金 150 ポンドを支給するという好条件だった。金銭と余暇に恵まれこの 7 年間で化学者 Priestley の最も実り多い時期である。家計が楽になったばかりでなく、科学者として創造性の頂点に達したときパトロンを得たのであるから、これほど時宜にかなったパトロンとの出会いはなかった。

Priestley が空気化学(気体化学)の研究を始めたのは 37 歳という遅い時期である。しかしその最初の 10 年間の研究で気体化学の第一人者となり、その興味は生涯の最後まで続いた。最初の論文、『諸種の空気についての観察』(1773)は古典的論文となっている。パリ王立科学アカデミーの 8 人の外国会員の一人にも選出された(図 5)。1772~75 年に 8 種類の新気体(かれは gas を用いず、一貫して air を使った)を発見した。現在の表記でいえば、NO₂、N₂O、HCl、CO、NH₃、O₂、SO₂、SiF₄ である。デーヴィもいうように、「独りでこれほど多くの新しい、珍しい物質を発見したものはいない。」

酸化水銀から酸素を遊離した有名な実験は、1774 年 8 月 1 日、シェルバーン伯の

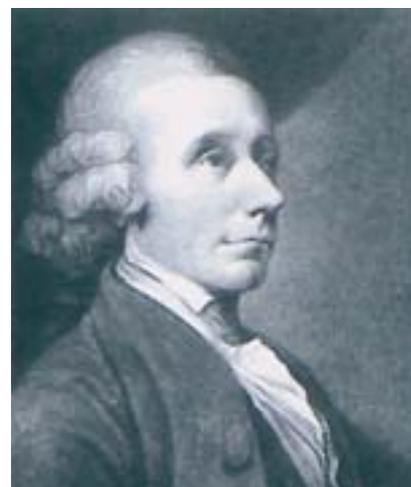


図 5. 化学者として最高の名声を博したところの Priestley, 50 歳。ヘンリ・フューゼリ画、1783。



図6. プリーストリの実験室。暖炉で加熱した固形物に銃身を挿入し、抽出した気体を、水銀を満たした盆に倒置した円筒に導く。左側のU字管で気体中の放電火花の実験をした。

夏の住居であるカーンの邸宅内のリーストリの実験室でおこなわれた(図6)。しかしリーストリはそれを以前に発見した笑気(N_2O)と見たから、この段階ではまだ酸素の発見とはいえない。10月にパリでラヴォワジエに会ったとき、研究を秘密にしない主義のリーストリは、自分の実験を洗ひざらい話したので、ラヴォワジエは11月にそれを追試したが、発生したのは普通の空気であると見た。翌年3月、リーストリは再び同じ実験をおこない、今度は著しく呼吸と燃焼を助ける新気体であると認め、ラヴォワジエの所見を批判した。この段階で酸素を発見したといえるが、理論好みでないリーストリはその発見の意義を理解せず、それをフロギストン説で解釈した。新気体を「酸素」と命名し、燃焼と酸生成の理論の中心に位置づけて、化学の新たな体系を創り出したのはラヴォワジエである。理論的関心の欠如がリーストリに自分の発見を理解させなかったとすれば、理論的明晰さがラヴォワジエに発見をさせなかった。かれに新事実を教えたのはリーストリである。近代化学の誕生にはこの二人のいずれも欠かせない。リーストリはまた植物が光合成によって酸素を発生させること、動物の呼吸に酸素が不可欠であることを証明した。

唯物論的形而上学

『物質と精神についての論考』(1777)は、リーストリの哲学の名著である(図7)。人間は肉体と精神からなり、物質である肉体は減びても非物質である精神または靈魂は不滅であるという古来の多くの哲学を否定して、リーストリは思考や感覚にかかわる精神は脳の機能であり、人間はすべて物質であり、肉体の死によって人間は全的に死滅するという、徹底した唯物論を展開した。その際、物質を構成するのは、従来の堅い粒子の原子論ではなく、引力と斥力の中心である、非物質的な、新しいボスコヴィッチ原子論を援用した。唯物論なら無神論につながるのが普通だが、リーストリはそれと両立しそうなキリスト教とを結合している。靈魂不滅説はもともと異教の思想体系の一部分だったのがキリスト教に持ち込まれ、それによってキリスト教の改悪が生じたとリーストリは見る。唯物論の立場にたてば、真正のキリスト教、すなわちユニテリアニズムになるというのである。精神は肉体とともに減びるとした一方で、最後の審判の日における万人の復活というキリスト教の教義を信奉していたから、唯物論と信仰を両立させた奇妙な著作になっている。しかしクロアチア人でイエズス会士、科学者ボスコヴィッチは、プリー

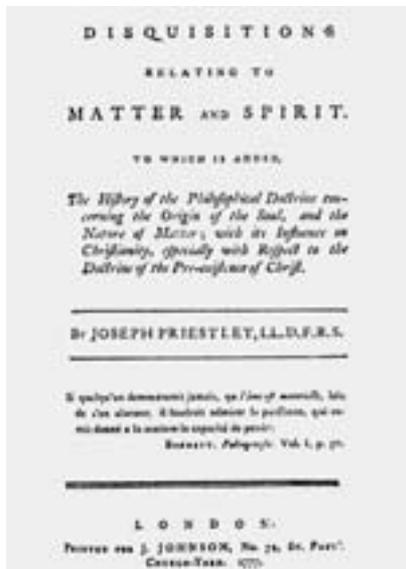


図7. 『物質と精神についての論考』(1777)の扉。

ストリが自分を唯物論者と見なしたとして激怒して抗議の手紙を寄せた。その実ボスコヴィッチは英語が読めず、リーストリの著書を読んでいなかった。ともあれ『物質と精神についての論考』は広く物議をかもし、リーストリは唯物論者、無神論者とごうごうたる非難を浴びた。シェルバーンとの関係もこのころ冷却したので辞職した。リーストリには上流社会への違和感もあった。

生涯の最良の歲月

義兄の勧めでバーミンガムに転居した。そこで過ごした最初の10年(1781~91)はリーストリの生涯で最も静穏な日々だった。いわば嵐の前の静けさだった。その教会はイギリスでも最も神学的にリベラルな教会の一つだったから居心地が良かった。まもなく入会したルナー協会はわずか14名の会員からなるが、マシュー・ボールドン、イラズマス・ダーウィン、ジェームズ・ワット、ジョサイア・ウェッジウッドなど、いずれも錚々たる地方の知識人、科学者、産業者である。リーストリはかれらから尊敬され、知的にも経済的にも大きい支援を受けた。バーミンガム時代のかれの科学機器の収集は当時の世界の最良のものとなっていた。ラヴォワジエは財産家である上に莫大な収入のある総括徴税請負人だったから、いくらでも思いのままに高価な実験装置を揃えることができたが、リーストリのような中流下層階級出身の牧師にとって、篤志家の寄付なしには研究は不可能だった。義兄の製鉄業者から1万ポンドの寄贈を受けたほか、シェルバーン伯の許にいたときは年額40ポンドの研究費が与えられたが、それ以後も、毎年、一定額の援助をしてくれる人々があり、『回想』では二十数名の名前を挙げている。ウェッジウッドはそれ以外にも陶製のレトルトや管を提供したし、直径16インチの大レンズを寄付した人もいる。リーストリは寄付集めに熱心だったと批判されてもいる。この時期、化学研究は進まず、ラヴォワジエとフランス化学者に対抗してフロギストン説を擁護する立場になっていた。一方、神学論争のほうは一層活発になった。

ユニテリアニズムの唱道

イタリアのレリオ・ソッチーニとファウスト・ソッチーニが16世紀に創始した教派は、キリスト教正統派教義の中心である三位一体論に反対して、キリストは神ではなく人間であるとし、聖書は教会の権威によらず理性によって解釈すべきであり、また教会と国家の結びつきを認めず、国家の起こす戦争には絶対反対の立場を貫いた。プリーストリーはリーズの牧師時代にこの立場に立つことを明確に表明した。当時はまだソッチーニ派と呼ばれていたが、のちにユニテリアニズムと呼ばれる教派になった。プリーストリーはバーミンガム時代には、得意の歴史的手法を用いて、『キリスト教改悪史』、2巻、(1782)を書き、三位一体論、処女懐胎、原罪などキリスト教の基本的教義のほとんどは改悪であるとする見解を述べた。これは1785年に禁書処分になった。しかしさらに『イエス・キリストについての初期の見解の歴史』、4巻、(1786)を書いた。プリーストリーに宗教的、政治的、知的理想を体現した人物を見ていた詩人コールリッジによれば、イギリスのユニテリアニズムを創始したのはプリーストリーであった。

国教会と国王の暴動

フランス革命がおこった1789年から英国国会の内外で審査法と地方自治体法問題がやかましく論じられ、プリーストリーはこれらの法律の撤回を求める非国教徒の指導者となった。このため全国の国教会の牧師から攻撃され、国会はプリーストリーを危険人物とした。かつての友人エドマンド・バークが非国教徒攻撃の指導者となった。プリーストリーはフランス革命を擁護するパンフレット(1791)を書き、フランス革命はすべての地上の政体の崩壊の始まりであり、神の国の到来を予告するものとした。フランス革命に対してイギリスには政治的反動がおこっていたから、かれは一層の敵意を受けた。

市の権力者たちが扇動した暴徒が、



図8. プリーストリー家を破壊するバーミンガムの暴徒。現場に居合わせた画家が描いたもの。

1791年7月14日、フランス革命2周年を祝う支持者のパーティを襲い、プリーストリーの教会、実験室、居宅を襲撃して放火し、論文、書籍、実験器具のほとんどを破壊した(図8)。7月14日の夜から17日の夜まで続いたこの暴動は、「国教会と国王の暴動」と呼ばれた。一家は着のみ着のままロンドンに移ったが、ロンドンでも王立協会会員のほとんどが、宗教的、政治的理由でプリーストリーを避けた。息子たちは就職できなくなったので、アメリカへ移住した。プリーストリーは自宅と実験室の損害賠償として約4085ポンドを申し立て、その約半額を取り戻した。

アメリカ移住

プリーストリーは大科学者のアメリカ移住の第一号となった(1794)。親友フランクリンは4年前に亡くなっていたが、アメリカの学界はかれを歓迎し、ペンシルヴァニア大学化学教授の地位の提供と、アメリカ哲学会会長への就任を要請した。プリーストリーはいずれも断り、サスケハナ河を5日間上流にさかのぼったノーサンバーランドに到着した。かれの息子が契約で取得していた70万エーカーの土地に、プリーストリーを首長とするイギリス人非国教徒の入植地をつくることになっていた。コールリッジらはそこに万民平等社会(パンティソクラシー)の実現を夢見ていた。しかしアメリカ人は想像したほどリベラルでもなければ、開明的でもなかった。アダムズ大統領時代には、プリーストリーは宗教的、政治的理由で疑惑



図9. ジョーゼフ・プリーストリー。オザイアス・ハンフリ画、制作年不詳。18世紀の風習によりプリーストリーは大抵かつらをつけていた。アメリカに移ってかつらを外した。

の目で見られ、外国人法を適用して国外退去させられる恐れさえあった。永年の友人で、しばしば文通もしていたジェファソンが大統領に就任したとき(1801)、生涯で初めて政府が自分に友好的な国に住むことになることと述べた。ノーサンバーランド在住10年間に神学書12冊、化学論文40報、パンフ3冊を出し、アメリカ最初のユニテリアン教会の一つを設立した。妻と末子に先立たれ、かれ自身も食道に障害を生じて、固形物を嚥下できなくなり、苦しい病床で最後まで知的活動を続けた(図9)。

[参考文献]

J. Linsay ed., *Autobiography of Joseph Priestley*, Adams & Dart.(1970). ; R.E.Schofield ed., *A Scientific Autobiography of Joseph Priestley*, The MIT Press.(1966). ; J.Priestley, *The History and Present State of Electricity*, 2 vols., 1767, Johnson Reprint.(1966). ; J.Priestley, *Experiments and Observations on Different Kinds of Air*, Vol.II.(1775). ; J.Priestley, *Disquisitions relating Matter and Spirit*, London, 1777, Arno Press.(1975). ; B.Willey, *The 18th Century Background*, Chatto & Windus.(1940).

ポリアクリルアミドプレキャストゲル



SuperSep™ System

SuperSep™ Systemは、ポリアクリルアミドゲル「スーパーセップ™」と専用泳動槽「スーパーセパレーター™」を中心とした電気泳動システムです。

特長

スーパーセップ™

- 保存安定性、再現性に優れている。
- ウェル容積が大きい。
- ウエスタンブロットイングにおいて、タンパク質バンドのPVD膜への転写効率が優れている。

スーパーセパレーター™

- 差し込むだけで2枚のゲルを泳動できる。
- 付属の白色アクリル板を反対側にセットすることにより、泳動状況が鮮明に確認できる。



仕様

プレートサイズ：100(H)×100(W)×3(T)mm ゲルサイズ：85(H)×90(W)×1(T)mm ウェル容積：35μℓ (12well), 25μℓ (17well)

泳動例

■ タンパク質のSDS-PAGE (CBB染色)



ゲル：SuperSep™ 5-20%, 12well [コードNo.194-12961]
 サンプルバッファー：Sample Buffer Soln. (×2, 2-ME+) [コードNo.196-11022]
 泳動バッファー：Running Buffer Soln. (×10) [コードNo.184-01291]
 染色：Quick CBB [コードNo.299-50101]
 サンプル：タンパク質分子量マーカー

■ 核酸の電気泳動 (臭化エチジウム染色)



ゲル：SuperSep™ 15%, 12well [コードNo.194-13061]
 サンプルバッファー：5mmol/ℓ Tris (pH 7.9), 1mmol/ℓ EDTA, 30% Sucrose, 0.004% BPB
 泳動バッファー：0.025mol/ℓ Tris, 1.92mol/ℓ Glycine
 染色：臭化エチジウム
 サンプル：DNAマーカー

コードNo.	品名	濃縮ゲル	分画分子量範囲(核酸のbp)	規格	容量	希望納入価格(円)
192-12901	SuperSep™ 7.5%, 12well	5%	40,000~200,000 (100~2,000)	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	5%	20,000~130,000 (50~500)	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	5%	14,000~80,000 (30~300)	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	5%	6,000~60,000 (20~300)	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	—	10,000~200,000 (50~750)	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	—	10,000~130,000 (50~500)	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	—	14,000~ 80,000 (30~300)	電気泳動用	10枚	18,000
197-13291	SuperSep™ 5-20%, 2D	—	10,000~200,000 (50~750)	電気泳動用	10枚	18,000
190-13421	SuperSeparator™ (簡易泳動槽)	—	—	電気泳動用	1セット	38,000

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.4

2004年10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

● 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