

PC12細胞にKMG-20-AM(Mgプローブ)を投与したときの蛍光顕微鏡像

## 〔総説〕

## 「マグネシウムイオン蛍光分子プローブ」

鈴木祥夫、岡浩太郎、鈴木孝治 .....2

## 「ヒドロキシアパタイト固定化ルテニウム触媒による環境調和型酸化反応」

金田清臣 .....8

## &lt;脳科学一口メモ&gt;

## 「脳由来神経栄養因子とシナプス伝達」

津本忠治 .....6

## &lt;テクニカルレポート&gt;

## 「水試料中エストロゲンの分析」 吉田貴三子 .....11

 「amaxa社「Nucleofector™」による細胞へのsiRNA導入」  
 廣世志津子 .....12

## &lt;Talking of LAL&gt;

## 「第52話 エンドトキシンの種類」 土谷正和 .....14

## 〔化学大家〕

## 「岸本一郎と西川虎之助」

芝 哲夫 .....25

## 〔製品紹介〕

## 有機合成

 ルテニウム(Ⅲ)-ヒドロキシアパタイト .....10  
 光学分割剤 .....15  
 ChemDiv社 ビルディングブロック製品 .....15

## クロマト

ワコーパック®Navi C18-5 .....16

## 環境分析

 水銀分析用試薬 .....16  
 日本エンバイロケミカルズ(株) AE ELISAキット .....17  
 ダイオキシン類分析用  
 プレセップ®多層シリカゲル .....28

## 細胞生物

 KMG-20-AM .....5  
 骨代謝関連試薬 .....18  
 イノシトールりん脂質代謝関連物質 .....19  
 薬理研究関連試薬 .....19  
 非動物由来組換えトリプシン .....19  
 スーパーセップ .....20  
 水酸化アルミニウムゲル .....20  
 (株)シバヤギ 血中IgE測定キット .....20  
 Apotech社 アポトーシス/ミトコンドリア  
 関連抗体 .....21

## 遺伝子

 RNAサイズスタンダードマーカーⅣ .....21  
 アルカリホスファターゼ溶液 ,エビ由来 .....22  
 (株)ニッポンジーンテック  
 CUGA®7 in vitro siRNA合成キット .....22  
 (株)ニッポンジーン  
 siRNAカスタム合成サービス .....22  
 (株)ニッポンジーン  
 Control siRNA duplexシリーズ .....23  
 amaxa社 Nucleofector™  
 マウス神経幹細胞、ラット神経幹細胞用キット .....24

### 1 はじめに

細胞内情報伝達は、医学、生物学の幅広い分野で研究されており、生細胞や組織中でのダイナミクスに関する情報を与える種々の試薬が市販されている。細胞情報を得る検出手段には、吸光、蛍光、化学発光および放射線を利用する方法が挙げられ、中でも蛍光法は感度や操作性等の面から最も取り扱いやすく、しかも生きた単一細胞内での化学過程の非破壊分析手段として利用されている。例えば、イオンあるいは小分子のダイナミクスを観察するための蛍光プローブとして、カルシウムイオン、亜鉛イオン、塩化物イオン、cAMP、NO蛍光プローブ等が報告されている。中でも1980年代に始まったカルシウムイオンプローブの開発は、蛍光プローブの代表的な成功例であり、単一細胞内のカルシウムイオンのダイナミクスに関して多くの知見が得られている。一方、マグネシウムイオンはカルシウムイオンと同様、生体に必要不可欠な物質であり、細胞内のエネルギー通貨であるATPあるいは記憶と学習の観点から注目されているグルタミン酸受容体と結合し、種々の酵素反応を制約したり、タンパク質の立体構造の安定化、さらに筋肉の収縮、ホルモンの分泌に関与していることが知られている。しかしながら、マグネシウムイオンの細胞内ダイナミクスに関する研究は、カルシウムイオンと比較して進展していないというのが現状である。その大きな理由は、細胞内でマグネシウムイオンを選択的に捕捉し(特にカルシウムイオンの妨害が大きい)ため、この影響を排除する必要がある)観察することができる有効な分子プローブがないためである。

今回我々が開発した蛍光分子プローブ KMG-20-AM (AM: Acetoxymethyl) は、蛍光色素としてクマリンを有している。マグネシウムイオン結合部位として、これまでの我々の研究の知見から、ジケトン類似構造を選択した<sup>1)-3)</sup>。また、分子内の分極状態を大きくし、錯形成に伴う蛍光スペクトル変化を大きくするた

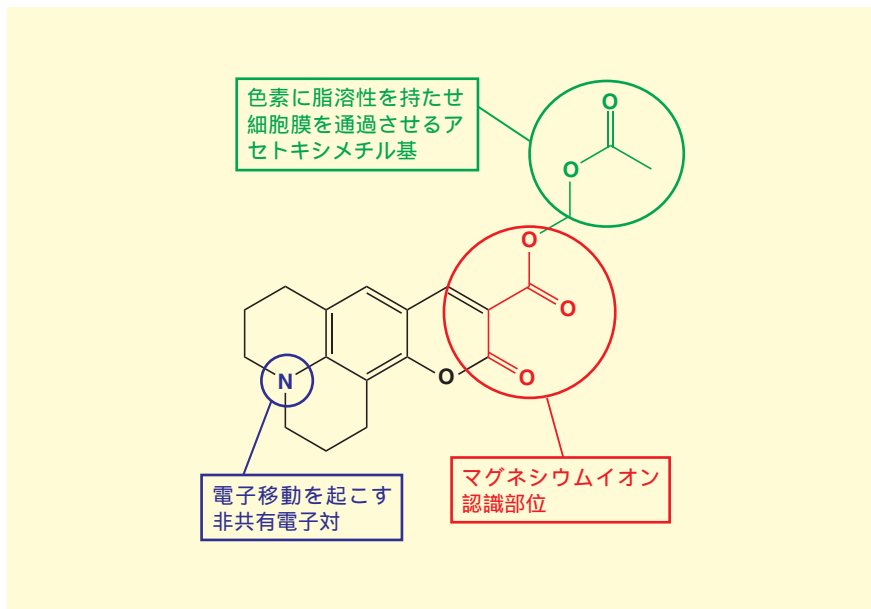


図1. KMG-20-AMの構造

めの3級アミンを有している。さらに、脂溶性化合物から水溶性化合物に容易に変換させるためアセトキシメチル基を導入している。この化合物を用いて、マグネシウムイオンをはじめとした種々の金属イオンに対する応答特性、熱力学的パラメータの算出、さらに生きた細胞内のマグネシウムイオンの動態について検討したので<sup>4)</sup>、ここにその一端を紹介したい。

### 2 キャリブレーション測定

蛍光強度からマグネシウムイオン濃度を求めるために、遊離のマグネシウムイオン濃度と蛍光強度の関係を予め測定す

る必要がある。そこで生理的条件下 ([HEPES] = 10.0mM, [KCl] = 130.0mM, [NaCl] = 20.0mM, [EGTA] = 2.0mM, pH7.4) において、マグネシウムイオン濃度を変化させたときのKMG-20応答特性を、吸収スペクトルおよび蛍光スペクトルを用いて観察した。図2 Aにマグネシウムイオン添加前後におけるKMG-20の吸収スペクトルを示す。極大吸収波長は428nmから448nmにシフトしたスペクトル変化が観察された。これは、マグネシウムイオンとKMG-20が強く複合体を形成することにより、KMG-20の分子内の電子状態が大きく変化していることを示している。さらに、430nmに等吸収点

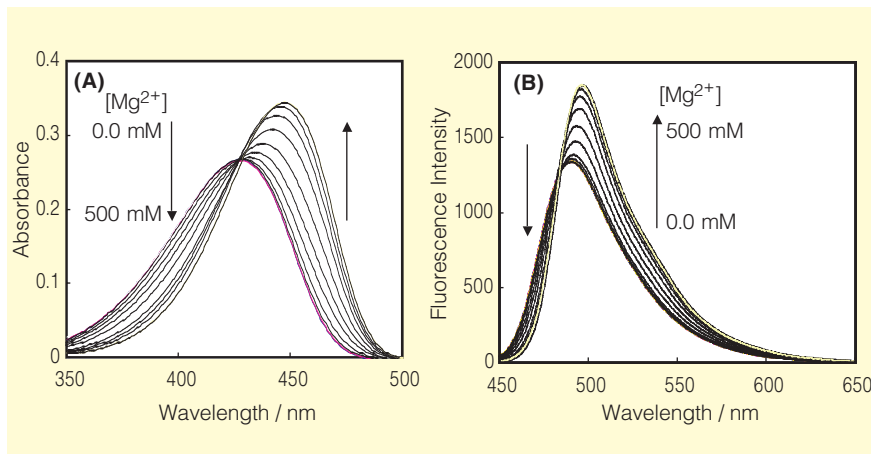


図2. マグネシウムイオンを添加前後のKMG-20の吸収スペクトル(A)と蛍光スペクトル(B)

表1. マグネシウムイオンおよびカルシウムイオンとの錯形成定数

蛍光プローブ	$K_{Mg}$ ( $M^{-1}$ )	$K_{Ca}$ ( $M^{-1}$ )	$K_{Mg}/K_{Ca}$
KMG-20	100.0	33.3	3.0
mag-fura-2	526.3*	40000*	0.013
mag-indo-1	370.4*	28570*	0.013
mag-fura-5	434.8*	35710*	0.012
Magnesium Green	500.0*	166660*	0.003

\* 参考文献 5 ) を参照

を持つ“シーソー型”のスペクトル変化を示していることから、2波長励起1波長蛍光測光法が可能となるため、より正確にマグネシウムイオン濃度を定量することが可能となる。

次に、マグネシウムイオンの添加の前後で、KMG-20の蛍光スペクトルを測定した。結果を図2Bに示す。マグネシウムイオン濃度の増加に伴い、蛍光強度が増加し、極大発光波長が、470nmから480nmにシフトした。さらに470nmにマグネシウムイオン濃度を変化させても蛍光強度が変化しない点が観察された。

ナトリウムイオン、カリウムイオンを添加した場合、吸収スペクトルおよび蛍光スペクトルともに変化が生じなかった。カルシウムイオンについては、数ミリモル添加した時点から応答ははじめた。しかし生細胞中のカルシウムイオン濃度は、ナノモルから数マイクロモルであるため、KMG-20に対するカルシウムイオンの妨害はない。

以上の結果を基に、KMG-20とマグネシウムイオン及び妨害イオンとなるカルシウムイオンとの錯形成定数をBenesi-Hildebrandプロットを用いて算出し、表1にまとめた。さらに、現在市販されているマグネシウムイオン蛍光指示薬 (mag-fura-2, mag-indo-1, mag-fura-5, Magnesium Green) の値も併せてまとめた。KMG-20とマグネシウムイオンの結合定数は $100.0M^{-1}$ 、カルシウムイオンとは $33.3M^{-1}$ であり、カルシウムイオンに対するマグネシウムイオンの選択性は3.0倍であった。一方、市販されているマグネシウムイオン指示薬においては、カルシウムイオンとの錯形成定数の方が、マグネシウムイオンよりも約100倍から300倍高いため、カルシウムイ

オンの妨害を受けることが予想される。実際に、KMG-20とMagnesium Greenについてカルシウムイオンの妨害について検討するため、測定溶液 [蛍光プローブ]= $10\mu M$ 、 $[MgCl_2]=1.0mM$  に、カルシウムイオンを $140nM$ から $850nM$ となるように濃度を変化させて添加し、蛍光強度の経時変化を測定した。その結果、図3に示したように、KMG-20はカルシウムイオンを添加しても、錯形成していたマグネシウムイオンとカルシウムイオンは置き換わらないために蛍光強度は変化しなかった。一方、Magnesium Greenの場合、マグネシウムイオンよりもカルシウムイオンの方が錯形成定数が高く、錯形成していたマグネシウムイオンとカルシウムイオンは置き換わり妨害を受けたため、蛍光強度の増加が観察された。以上のことから、KMG-20はマグネシウムイオンに対する選択性が高く、かつカルシウムイオンの妨害を受けないため、正確に生体内のマグネシウムイオン濃度を定量出来ることが明らかとなった。

### 3 細胞内のマグネシウムイオン測定

KMG-20-AMの細胞内への投与は、以下の操作法で行った。まず、濃度が $10\mu mol$

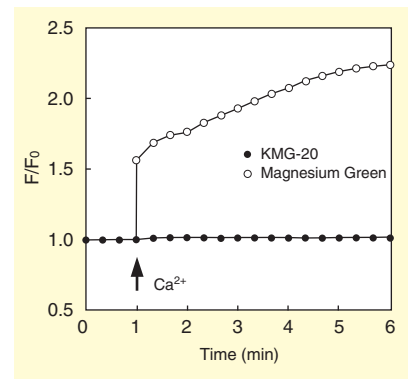


図3. カルシウムイオンを添加したときのKMG-20とMagnesium Greenの蛍光強度の経時変化

となるようにKMG-20-AMをDMSOに溶解し、これをPC12細胞の培養液に最終濃度が $10\mu M$ になるように加えた。37で30分間インキュベートした後、細胞を洗浄し、蛍光顕微鏡 (Axiovert S 100, Zeiss社) を用いて観察した。励起波長は440nm、検出波長は500~530nmとした。

PC12細胞にKMG-20-AMを投与した後の微分干渉像および蛍光像を図4に示す。蛍光像においては、赤色から黄色になるほど蛍光強度が高いことを示している。KMG-20は、細胞質および樹状突起部分である成長円錐に均一に分散しており、核を除いた部分を染色していることが確認された。

次にKMG-20-AMを細胞内に投与した状態で、細胞膜を脱分極させるために、 $120mM$ のカリウムイオンを添加した。結果を図5に示す。Aは刺激剤を投与する前、Bは投与した後の蛍光顕微鏡写真、Cは細胞の各部位ごとの蛍光強度の経時変化である。カリウムイオンを投与してから数秒後、細胞質および成長円錐部分が明るくなった。特に成長円錐部分で、

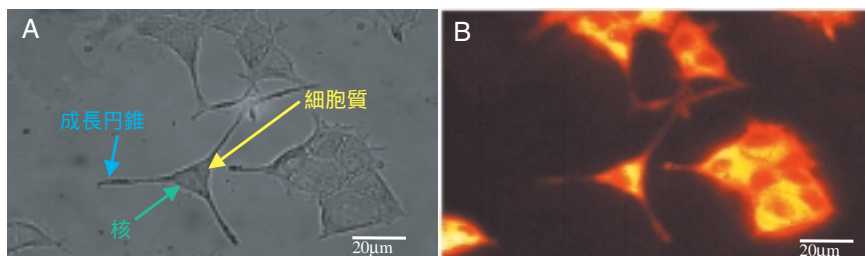


図4. PC12細胞にKMG-20-AMを投与したときの微分干渉像(A)と蛍光顕微鏡像(B)

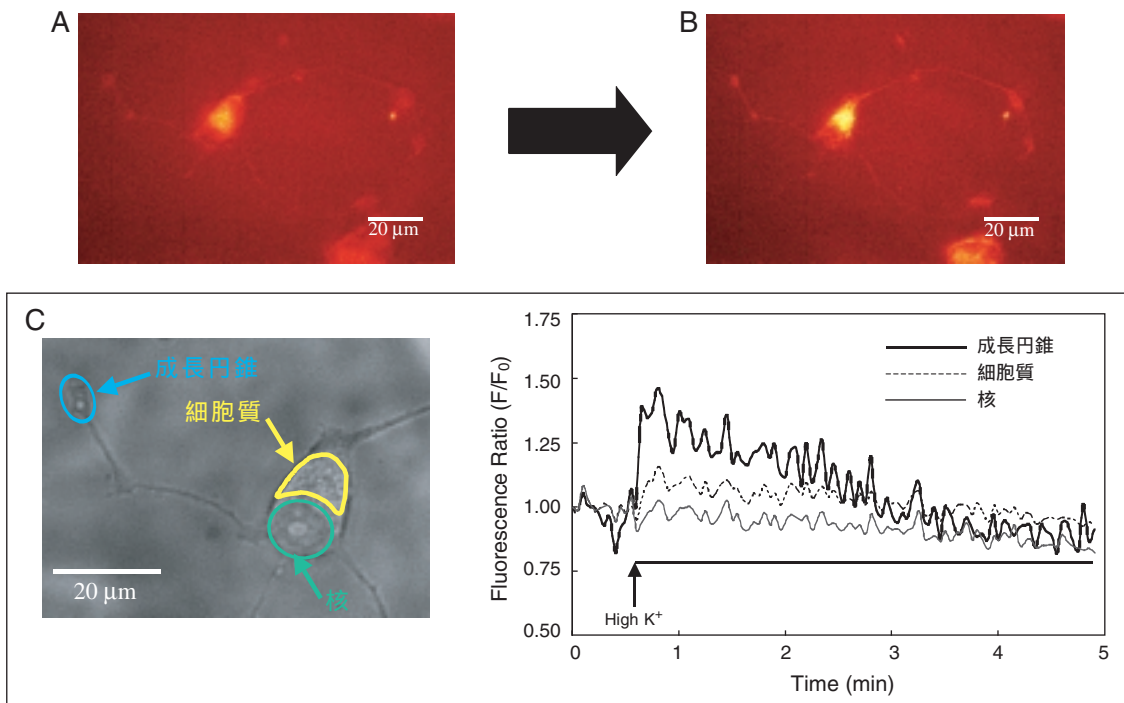


図5 . カリウムイオン添加前後の蛍光顕微鏡像 (A,B) および細胞の各部位の蛍光強度の経時変化 (C)

大きな蛍光強度の増加が確認された。さらに1分後、蛍光強度が減少しはじめ、4分後には初期状態に戻った。この現象のメカニズムを模式的に図6に示す。刺激（高濃度のカリウムイオン）を与えることにより膜電位が変化し、イオンチャネルを介して細胞内にカルシウムイオンが流入する。ミトコンドリア等のオルガネラにシグナル伝達が伝わり、細胞内のカルシウムイオン濃度を低減させるために、マグネシウムイオンが放出される。その結果、試薬とマグネシウムイオンが錯体を形成し、明るくなったと考えられる。さらにマグネシウムイオン放出源となるミトコンドリアは細胞質よりも成長円錐部分に局在していることが実験的に証明されたことから、図5Cにおいて、成長円錐部分のマグネシウムイオン濃度は細胞質部分よりも高く、蛍光強度の変化率に違いが生じたものと考えられる。PC12細胞以外にもウシ血管内皮細胞においても同様の結果が得られており、さらに最近ではマグネシウムイオンとナトリウムイオンの相関関係について明らか

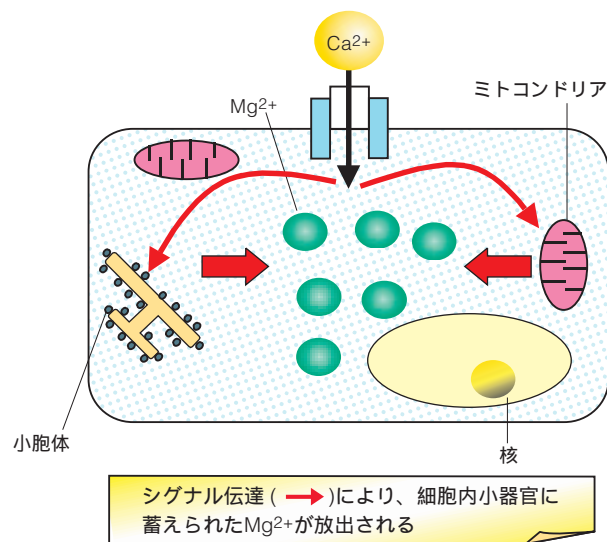


図6 . カリウムイオン投与によるマグネシウムイオン濃度増加の模式図

となっている<sup>6)</sup>。

このように開発した蛍光プローブは、生きた細胞中のマグネシウムイオンを選択的にかつ高感度で同定することに有用であることが示された。1980年代後半以降、同じ2価金属イオンであるカルシウ

ムイオンの生理学的知見が増えたのは、簡便に利用可能な蛍光プローブが開発されたためである。今後、さらに研究が進めば今まで明らかにされてこなかったマグネシウムイオンを中心とした分子生理学を展開でき、細胞の専門家や医療関係

者の基礎研究に活用されるものと期待している。

## 謝辞

本研究を遂行するにあたり、ご協力いただきました慶應義塾大学理工学部北村美一郎博士、久保田健氏、小松広和氏に深く感謝致します。

## 【参考文献】

- 1) Nagashima, H., Tohda, K., Matsunari, Y., Tsunakawa, Y., Watanabe, K., Inoue, H. and Suzuki, K.: *Anal. Lett.*, 23, 1993 (1990)
- 2) Suzuki, K., Watanabe, K., Matsumoto, Y., Kobayashi, M., Sato, S., Siswanta, D. and Hisamoto, H.: *Anal. Chem.*, 67, 324 (1995)
- 3) Suzuki, Y., Saito, N., Komatsu, H., Citterio, D., Kitamura, Y., Kubota, T., Oka, K. and Suzuki, K.: *Anal. Sci.*, 17, 11451 (2001)
- 4) Suzuki, Y., Komatsu, H., Ikeda, T., Saito, N., Araki, S., Citterio, D., Hisamoto, H., Kitamura, Y., Kubota, T., Nakagawa, J., Oka, K. and

Suzuki, K.: *Anal. Chem.*, 74, 1423 (2002)

- 5) Haugland, R. P.: "*Handbook of Fluorescent Probes and Research Products*, 7<sup>th</sup> ed.", Molecular Probes Inc.
- 6) Kubota, T., Tokuno, K., Nakagawa, J., Kitamura, Y., Ogawa, H., Suzuki, Y., Suzuki, K. and Oka, K.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 303, 332 (2003)



### 蛍光プローブ

蛍光光度法を用いて生体等の局所環境及びその変化を検出する物質

### PC12細胞

ラット副腎髄質クロム親和性細胞種より単離された神経系クローン細胞



# Products

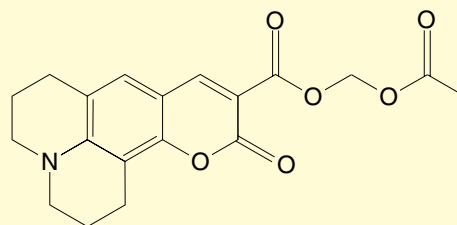
## Mg<sup>2+</sup>測定用蛍光プローブ

### KMG-20-AM

KMG-20-AMはMg<sup>2+</sup>を選択的に認識しますので、細胞内のMg<sup>2+</sup>の動態を見ることができます。また、本品はCa<sup>2+</sup>に対する感受性が低いため、より正確にMg<sup>2+</sup>を定量することができます。

形状：褐色粉末

含量 (HPLC) : 95%以上



C<sub>19</sub>H<sub>19</sub>NO<sub>6</sub> = 357.36

コードNo.	品名	規格	容量	希望納入価格(円)
110-00711	KMG-20-AM	細胞生物学用	1mg	10,000
116-00713			5mg	40,000

## 脳由来神経栄養因子とシナプス伝達

大阪大学大学院医学系研究科組織再生医学講座神経統合機能分野 津本 忠治

1950年代に末梢交感神経細胞の生存と突起伸展を促進する物質として神経成長因子(Nerve growth factor, NGF)が発見され、神経細胞の分化、成熟、生存のためには標的細胞から放出される特定の蛋白質を取り込む必要があるという神経栄養因子の概念が形成された<sup>1)</sup>。その後、分子生物学の発展とともにNGFの遺伝子ファミリーが次々と発見され、多数の蛋白質が神経栄養因子として同定されている<sup>2)</sup>。それらのうちニューロトロフィンと総称される蛋白質はファミリーを形成し、それぞれに特有な受容体を介して作用を発揮することが知られている(図1a)<sup>3,4)</sup>。このように、神経栄養因子のカテゴリーに入る蛋白質は非常に多いのであるが、本稿では、最近、特に研究が進んだ脳由来神経栄養因子(Brain-derived neurotrophic factor, BDNF)のシナプス伝達に対する作用を主に紹介する。

ニューロトロフィンのシナプス伝達に対する急性作用が最初に見出されたのは、共培養したカエルの筋細胞と神経細胞が作る神経-筋シナプスにおいてであった。この標本で、BDNFやNeurotrophin-3(NT-3)が投与後数分でシナプス伝達を増強することが見出された<sup>5)</sup>。この神経-筋シナプスはアセチルコリン作動性であるが、その後グルタミン酸を伝達物質とするラット海馬のシナプスにおいてもBDNFやNeurotrophin4/5(NT-4/5)が同様の作用を示すことが報告された<sup>6)</sup>。さらに、ラット大脳視覚野のスライス標本において、比較的高濃度(200ng/ml、7.14nMに相当)のBDNFが短潜時でしかも持続的に興奮性シナプス伝達の増強作用を示すことが見出された<sup>7)</sup>。一方、比較的低濃度(20ng/ml)のBDNFはシナプス反応を直接増強する作用は示さないが、1Hz、15分という低頻度連続入力によって通常惹き起こされるシナプス長期抑圧を阻止する作用をもつことがその後発見された<sup>8)</sup>。この結果は、生理的条件下では内因性のBDNFが低頻度連続入力によるシナプス抑圧の誘発を防いでいることを示唆している。

上述したように、BDNFを急性投与するとシナプス伝達を増強したり長期抑圧を阻止することが判明したのであるが、慢性投与はどのような作用を示すであろうか? この疑問

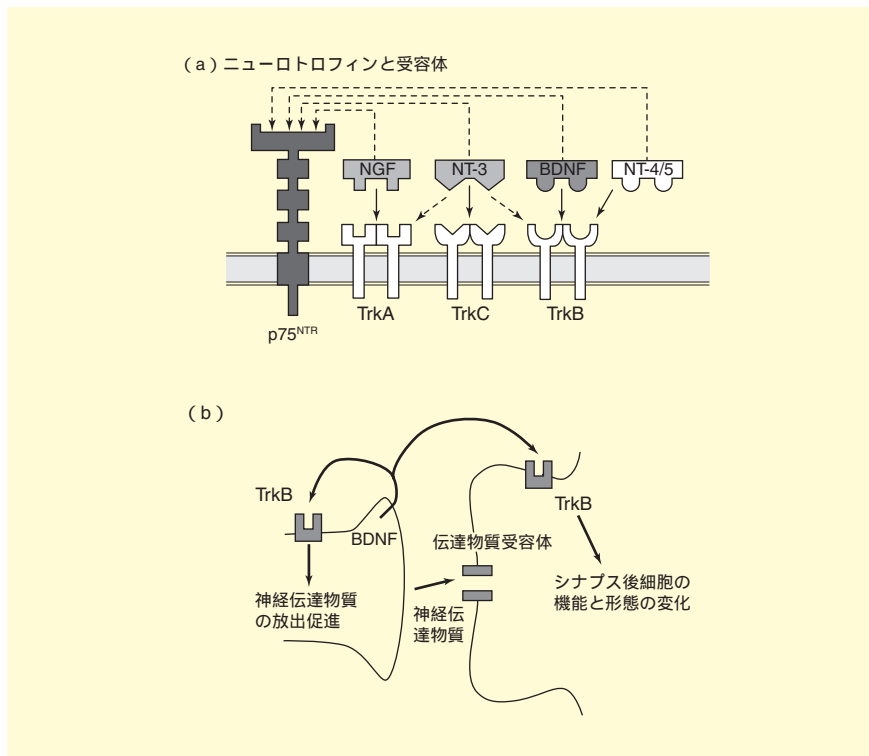


図1. a, 代表的なニューロトロフィンとその受容体。p75<sup>NTR</sup>は低親和性ニューロトロフィン受容体を示す。TrkA, TrkB, TrkCは高親和性ニューロトロフィン受容体を示す。特異的結合性を実線矢印で特異性の弱い結合性を点線矢印で示す(文献4より改変)。b, BDNFの放出部位と作用。左がシナプス前終末、右がシナプス後部を示す(文献3より改変)。

に対して培養大脳皮質神経細胞を用いて行われた最近の研究によると、8 - 12日間の慢性投与は誘発シナプス反応を増大させるという。また、この増大は、イオンチャネル型グルタミン酸受容体のうちN-methyl-D-aspartate(NMDA)受容体を介する成分の増大が特に大きいことから、シナプス前からの伝達物質放出増加だけではなくシナプス後部の受容体の変化をも伴っていると推測される。その理由は、もしシナプス前からの伝達物質増加だけが原因であるとすると、非NMDA型とNMDA型の両成分は等しく増大するはずだからである。さらに、BDNF慢性投与が機能的なシナプスの数を実際に増加させる効果があるのかどうかを確認するために伝達物質を放出したシナプス部位を標識できる蛍光色素FM1-43でシナプス前部を可視化する研究も行われた。その結果、BDNF慢性投与が群においてFM1-43色素で染色される領域が約2倍に増加することが明らかとなった。この結果は、BDNFが脳内神経回路に慢性的に作用するとシナプス前線維の増殖と活動

的シナプスの増加が起きることを示している。

前述したように、BDNFを代表とするニューロトロフィン、さらには神経栄養因子全般は、シナプス後細胞からシナプス前終末に移行して作用を発揮すると古くより考えられてきた。最近、この仮説を検証するため、Green Fluorescence Protein(GFP)を連結したBDNF遺伝子cDNAをプラスミッドに組み込んで培養神経細胞の核内に直接注入する実験が行われた<sup>9)</sup>。その結果、BDNFは軸索内を終末に向かって順向性に移動し、シナプス後細胞に移行することが見出された。さらに、この移行は神経細胞の電気活動をブグ毒(tetrodotoxin, TTX)で抑えると無くなること、逆に抑制阻害薬で活動を上げると増えることも見出された。これらの知見は、BDNFのシナプス後細胞への移行は神経細胞の電気活動に関連していることを示唆している。以上、単純化すれば、BDNFの急性作用は主にシナプス前からの伝達物質放出を増加させることであるので、シナプス前から活動依存的に放出されたBDNFは

autocrine或いはparacrine的にシナプス前に短時間で作用すると考えられる(図1b)。一方、慢性的には、シナプス後のTrkB受容体の活性化を介して伝達物質受容体の感受性を変えたり、シナプス後細胞の突起伸長を促進したりすると考えられる。このような神経活動と連携した神経栄養因子のシナプス後部への移行はシナプス後細胞の機能的・形態的变化に深く関与していると思われる。

### 【参考文献】

- 1) Levi-Montalchini, R.: *Science*, 237, 1154 (1987)
- 2) Bibel, M. and Barde, Y.-A.: *Genes Dev.*, 14, 2919(2000)
- 3) 津本忠治,「脳の発生・分化・可塑性」(御子柴克彦, 清水孝雄編) p.188 共立出版(2002)
- 4) Jessell, T.M. and Sanes, J.R.: "*Principles of Neural Science Fourth Edition*" (ed. Kandel, E.R. et al.) p.1041, McGraw-Hill(2000)
- 5) Lohof, A.M., Ip, N.Y. and Poo, M.-M.: *Nature*, 363, 350(1993)
- 6) Kang, H. and Schuman, E.M.: *Science*, 267, 1658(1995)
- 7) Akaneya, Y., Tsumoto, T., Kinoshita, S. and Hatanaka, H.: *J Neurosci*, 17, 6707(1997)
- 8) Kinoshita, S., Yasuda, H., Taniguchi, N., Katoh-Semba, R., Hatanaka, H. and Tsumoto, T.: *J Neurosci*, 19, 2122(1999)
- 9) Kohara, K., Kitamura, A., Morishima, M. and Tsumoto, T.: *Science*, 291, 2419(2001)

## ◆◆◆◆◆◆◆◆◆◆ 神経伝達研究用試薬 ◆◆◆◆◆◆◆◆◆◆

コードNo.	品名	[メーカー名]	規格(メーカーコード)	容量	希望納入価格(円)
141-07601	NGF- , Human , recombinant		生化学用	20μg	39,000
143-04861	2.5S NGF		生化学用	10μg	15,700
147-04641	7S NGF		生化学用	100μg	18,300
526-36081	-NGF, Rat, recombinant, Carrier Free	[Genzyme/TECHNE]	(3556X)	100μg	42,000
016-15731	Anti Human NGF , Monoclonal Antibody		免疫化学用	200μg	25,000
013-13781	Anti Mouse 2.5S NGF( Rabbit ),affinity purified IgG fraction		免疫化学用	1ml( 1mg/ml)	29,000
533-85981	Anti Human -NGF , Goat	[Genzyme/TECHNE]	(42256)	100μg	72,000
533-89901	Anti Human -NGF, Monoclonal	[Genzyme/TECHNE]	(43256)	500μg	59,000
530-52781	NGF Receptor( AB-1 )Monoclonal Antibody	[Calbiochem]	(GR10)	100μg	47,800
535-86921	Anti Rat -NGF, Goat	[Genzyme/TECHNE]	(42556)	100μg	72,000
562-48513	Anti p75NTR( neurotrophin receptor ), monoclonal	[UBI]	(05-446)	100μg	57,000
522-34621	p75Neurotrophin Receptor( NGF Receptor )Fc Chimera, Human, recombinant, Carrier Free	[Genzyme/TECHNE]	(2367X)	50μg	61,000
145-06641	Neurotrophin-3, Human, recombinant		生化学用	5μg	38,000
148-06631	Neurotrophin-4, Human, recombinant		生化学用	5μg	39,900
018-14951	Anti Human Neurotrophin-3 , Monoclonal Antibody		免疫化学用	200μg	30,000
560-46331	Anti Rat Trk-A( 140kDa ), Polyclonal	[UBI]	(06-574)	200μg	57,000
567-47321	Anti-Trk C	[UBI]	(06-675)	250μg	41,000
020-12913	BDNF , Human , recombinant		生化学用	10μg	40,000
010-16591	Anti Rat BDNF, Rabbit		免疫化学用	50μl	20,000
523-36351	Anti Human BDNF, Chicken	[Genzyme/TECHNE]	(42248)	100μg	72,000
528-37901	Anti Human BDNF, Monoclonal, Biotinylated	[Genzyme/TECHNE]	(45648)	50μg	77,000
539-89861	Anti Human BDNF, Monoclonal	[Genzyme/TECHNE]	(43248)	500μg	59,000
032-18851	CNTF, Human, recombinant		生化学用	20μg	39,000
034-16351	CNTF, Rat, recombinant		生化学用	20μg	42,000
530-85991	Anti Human CNTF, Goat	[Genzyme/TECHNE]	(42257)	100μg	72,000
530-89911	Anti Human CNTF, Monoclonal	[Genzyme/TECHNE]	(43257)	500μg	59,000
539-85101	Anti Human CNTF, Goat	[Genzyme/TECHNE]	(41257)	1mg	65,000
532-86291	Anti Human CNTF R, Goat	[Genzyme/TECHNE]	(42303)	100μg	72,000
132-13681	N-Methyl-D-aspartic Acid		生化学用	50mg	10,000
017-15761	Anti Rat Synaptotagmin 1, Monoclonal Antibody		免疫化学用	100μg	30,000
014-15771	Anti Rat SNAP-25, Monoclonal Antibody		免疫化学用	100μg	30,000
011-15781	Anti Rat Syntaxin, Monoclonal Antibody		免疫化学用	100μg	30,000
018-15791	Anti Rat Synaptobrevin 2, Rabbit		免疫化学用	100μg	30,000
207-15901	Tetrodotoxin, from Fugu		細胞生物学用	1mg	21,000
190-12441	SynaptoGreen C4【FM1-43】		生化学用	1mg	15,000

### はじめに

21世紀における化学者の使命は、自然と共生した持続可能な循環型社会を構築する新しい化学技術体系を創出することである。そのため、原子利用効率 (atom efficiency) や環境因子 (E-factor) を考慮した高効率でクリーンな化学プロセスの創成、および分離・回収・再使用を含めた資源の有効利用など、革新的な研究開発が望まれている。これらのテーマの実現には、これまでにない高機能性触媒の開発が必要不可欠となる<sup>1, 2)</sup>。

我々は、固体表面を利用した固定化金属錯体触媒の創製を行い、従来の均一系錯体触媒と不均一系金属錯体触媒の特徴を融合した新たな触媒分野を開拓し、グリーンサステナブルケミストリー (GSC) を指向した“ものづくり”をめざしている。均一系錯体触媒を用いた有機合成反応の発展に伴い、ポリスチレンなどの有機高分子や、シリカ、アルミナ、最近ではメソポーラスシリカなどの無機担体を利用した固定化錯体触媒の開発が行われているが、これらは既存の均一系錯体触媒の固定化という枠を越えるものではなかった。

金属酸化物などの無機結晶性化合物は、構成金属成分の組成やイオン半径に応じて独特の結晶構造を形成している。我々は、天然の無機結晶性化合物であるヒドロキシアパタイト<sup>3-6)</sup>、ハイドロタルサイト<sup>7-14)</sup>、モンモリロナイト<sup>15-17)</sup>の固体表面を触媒活性種の配位子として捉え、金属活性種の電子状態と、原子レベルでの配位環境を精密に制御している。反応に関与する金属イオン種が規則正しく配列した結晶表面では、均一系の分子

状錯体では得られない特異な触媒反応場を提供できる。本稿ではヒドロキシアパタイトの特性を利用してルテニウムを固定化したRuHAP触媒による、分子状酸素を用いたクリーンな環境調和型酸化反応について紹介する。

### ヒドロキシアパタイト固定化ルテニウム触媒

$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ の一般組成で表されるヒドロキシアパタイト(HAP)は、骨や歯など生体硬組織の主成分として知られ、イオン交換能、吸着能等の特徴をもつ機能性無機材料である。HAPのイオン交換体としての特性は、図1に示すように柱状に並んだ $\text{Ca}^{2+}$ イオン(Columnar Ca)が種々の金属イオンと容易に交換できることに起因する。HAPを $\text{RuCl}_3$ 水溶液で処理すると、表面の $\text{Ca}^{2+}$ と $\text{Ru}^{3+}$ が交換する。この時、EXAFS(広域X線吸収微細構造)などを用いたキャラクタリゼーションから、固体表面を配位子としたルテニウムリン酸錯体(RuHAP)が得られることを明らかにした(図2)。上記リン酸錯体は均一系では合成されておらず、HAP表面を利用することで特異的に生成している。また、HAPを用いた本触媒調製法は極めて簡便であり、さらに、原子レベルで構造の明確な活性金属種をその表面に創製することができる。

### アルコール類の酸化反応

アルコールの酸化によるカルボニル化合物の合成は、有機合成化学分野において、最も重要な官能基変換反応の一つである。

この酸化反応では、未だにクロム酸や二酸化マンガンなど、有害な重金属廃棄物を大量に排出する酸化剤を化学量論量用いる場合が多い。過酸化物やアミン-N-オキsidなどの有機酸化剤と遷移金属錯体を組み合わせた均一系触媒反応も報告されているが、グリーンケミストリーの観点からは、反応後に水のみを副生する分子状酸素( $\text{O}_2$ )あるいは空気を酸化剤とし、大量のアルコールを酸化できる触媒酸化法の開発が望ましい。近年、 $\text{O}_2$ を酸化剤とする金属錯体触媒による均一系反応の報告が活発になされているが、低活性で加圧の $\text{O}_2$ や添加剤が必要であることや、触媒の回収が困難など、実用上の問題が残されている。また、不溶性担体ヘスパーサーを介して、その末端に配位子を結合し金属錯体を固定化した研究もなされているが、金属-配位子間の結合が弱いため金属種の溶出が起こりやすく、有機担体では担体自体が酸化されるなど問題は多い。一方、無機担体は酸化雰囲気下でも化学的に安定であり、酸化反応に適している。

表1に示すように、RuHAP触媒は、1気圧の $\text{O}_2$ のみを酸化剤とし、各種ベンジル型、アリル型、脂肪族一級、二級アルコール類を高選択的に対応するアルデヒド、ケトンへと酸化できる<sup>3)</sup>。酸素のかわりに空気を用いても、反応速度、選択性の低下はほとんど見られない(entry 2)。また、ピリジンメタノール、チオフェンメタノールのようなヘテロ原子を有するアルコールでも、対応するアルデヒドが高収率で得られる(entries 14 and 15)。一級アルコールと二級アルコールの分子内競争反応では、一級アルコールが優先

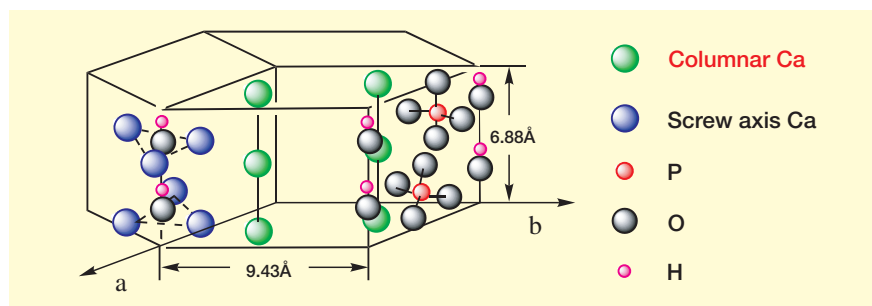


図1. ヒドロキシアパタイトの結晶構造

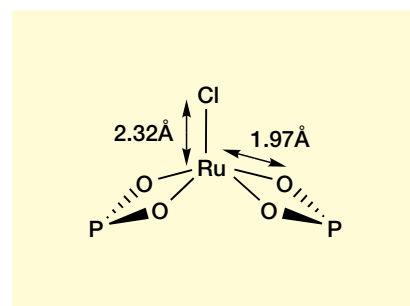
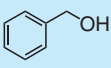

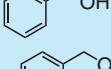

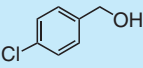
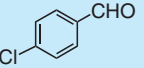
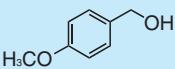
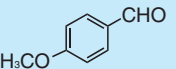
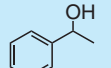
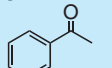
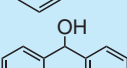
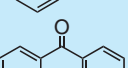
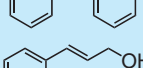
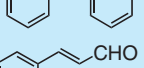
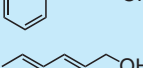
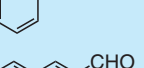
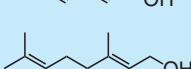
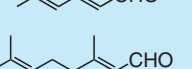
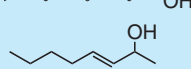
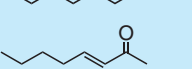
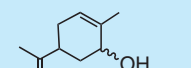
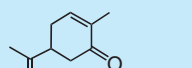
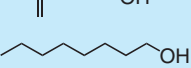
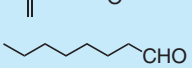
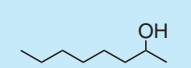
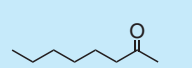
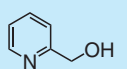
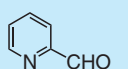
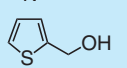
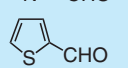


図2. RuHAPの表面構造



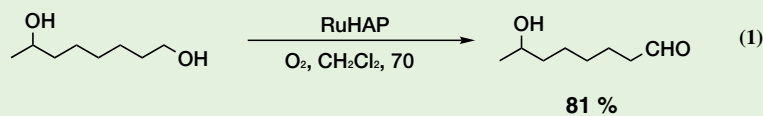
表1. RuHAP触媒による分子状酸素を用いたアルコール酸化反応<sup>a</sup>

entry	substrate	product	time (h)	convn (%)	yield (%)
1			3	100	>99
2 <sup>b</sup>			3	100	95
3			3	100	>99
4			3	100	92
5			2	100	98
6			2	100	>99
7			1	100	99
8			4	99	99
9			3	90	85
10			5	93	91
11			6	83	80
12 <sup>c</sup>			16	95	94
13			6	96	96
14			10	100	>99
15			2	100	94

<sup>a</sup> Alcohol (2 mmol), RuHAP (0.2 g), toluene (5 mL), 80 °C, O<sub>2</sub> atmosphere.

<sup>b</sup> Under 1 atm of air instead of pure O<sub>2</sub>.

<sup>c</sup> The reaction temperature was 60 °C.



的に酸化される(式1)。この選択性はRuO<sub>2</sub>のようなバルクのRu触媒ではみられない。RuHAPではRu種がHAP表面に単核で存在しているためこのような選択性が発現すると考えられる。RuHAP触媒によるアルコール類の酸化反応は、RuHAP表面のClとの配位子交換により生成するRu-alcoholate種を経由すると思われる。このRu-alcoholate種からのβ-ヒドリド

脱離によりカルボニル化合物とRu-H種が生成する。Ru-H種は酸素分子と反応し、Ru-OOHを与え、さらにアルコールとの配位子交換によりRu-alcoholate種を生成し触媒サイクルが形成される。均一系単核錯体、RuCl<sub>2</sub>(PPh<sub>3</sub>)<sub>2</sub>では、酸素を酸化剤として触媒サイクルを形成させるためには、ヒドロキノンやTEMPOなどのメディエーターが必要であるのに対し

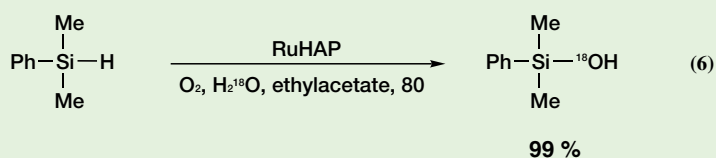
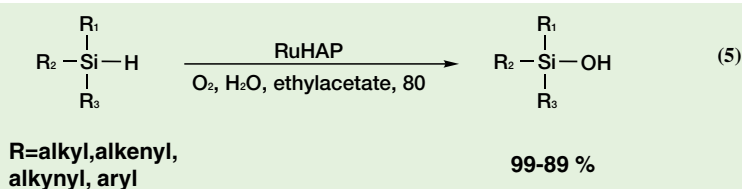
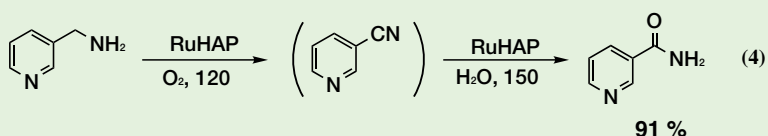
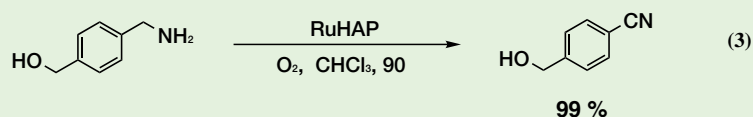
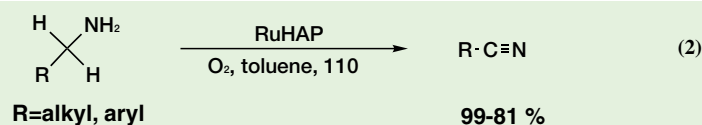
て、本RuHAPは添加剤を必要としない優れた触媒である。

### 分子状酸素存在下でのアミン・シラン類の酸化反応

RuHAPは、アミン類の酸化的脱水素反応や、シラン類の選択的酸化反応においても優れた触媒となる。脂肪族一級アミンやベンジルアミン類からは、高選択的にニトリルが得られる(式2)<sup>9</sup>)。また、アミンとアルコールとの分子内競争反応では、アミノ基の脱水素が優先し、4-(アミノメチル)ベンジルアルコールからは4-シアノベンジルアルコールが高選択的に生成する(式3)。さらに、本反応系に水を添加すると、ニトリルの水和反応も進行し、高収率でアミドが得られる。例えば、3-ピコリンアミンからワンポットでニコチンアミドが得られる(式4)。

RuHAP触媒を用いると、分子状酸素と少量の水存在下でシラン類を相当するシラノールへと収率良く酸化できる(式5)<sup>9</sup>)。RuHAP以外のRu触媒では生成物の逐次的な縮合反応が進行し、シラノール選択性が低い。また、本触媒では、炭素-炭素二重結合や三重結合など他の官能基を有するシランの反応においても高収率で対応するシラノールが得られる。RuHAP触媒による本シラン酸化は、酸化剤として水と分子状酸素を用いる点に特徴がある。H<sub>2</sub><sup>18</sup>Oを用いた同位体標識実験において、生成したシラノールに<sup>18</sup>Oが選択的に導入されたことから、生成物の酸素原子は水分子に由来している(式6)。

本触媒は固体触媒であるため濾過により容易に反応液からの分離が可能である。さらに、上記酸化反応において溶液へのRu種の溶出はなく、高い活性を維持したまま再使用が可能である。



## おわりに

本稿では、ヒドロキシアパタイト表面を配位子とした新たな触媒活性種の創成と、酸化反応への応用を紹介した。著者らが開発した固定化ルテニウム触媒を用いる酸化反応システムは、1) 容易な触媒調製、2) 高い触媒活性、3) シンプルなwork-upかつ触媒の再使用が可能、4) 有害な試剤を使用しない、という点で環境調和型である。今後、自然共生型の有機合成反応を視野に、分子状酸素を用いたエポキシ化反応、ベンゼンからの

フェノール合成などさらに高難度な酸化反応に挑戦していく予定である。

### 【参考文献】

- 1) Anastas, P. T. and Warner J. C.: "Green Chemistry: Theory and Practice", Oxford Press(1998)
- 2) 御園生誠、村橋俊一編:「グリーンケミストリー 持続的社会的のための化学」(講談社)2001)
- 3) Yamaguchi, K., Mori, K., Mizugaki, T., Ebitani, K. and Kaneda, K.: *J. Am. Chem. Soc.*, 122, 7144(2000)

- 4) Mori, K., Yamaguchi, K., Mizugaki, T., Ebitani, K. and Kaneda, K.: *Chem. Commun.*, 46(2001)
- 5) Mori, K., Tano, M., Mizugaki, T., Ebitani, K. and Kaneda, K.: *New J. Chem.*, 26, 153(2002)
- 6) Mori, K., Yamaguchi, K., Hara, T., Mizugaki, T., Ebitani, K. and Kaneda, K.: *J. Am. Chem. Soc.*, 124, 1157(2002)
- 7) Kaneda, K., Yamashita, T., Matsushita, T. and Ebitani, K.: *J. Org. Chem.*, 63, 175(1998)
- 8) Yamaguchi, K., Ebitani, K., Yoshida, T., Yoshida, H. and Kaneda, K.: *J. Am. Chem. Soc.*, 121, 452(1999)
- 9) Matsushita, T., Ebitani, K. and Kaneda, K.: *Chem. Commun.*, 26(1999)
- 10) Yamaguchi, K., Ebitani, K. and Kaneda, K.: *J. Org. Chem.*, 64, 296(1999)
- 11) Yamaguchi, K., Mizugaki, T., Ebitani, K. and Kaneda, K.: *New J. Chem.*, 23, 79(1999)
- 12) Yamaguchi, K., Mori, K., Mizugaki, T., Ebitani, K. and Kaneda, K.: *J. Org. Chem.*, 65, 689(2000)
- 13) Honma, T., Nakajyo, M., Mizugaki, T., Ebitani, K. and Kaneda, K.: *Tetrahedron Lett.*, 43, 622(2002)
- 14) Ji, H.-B., Mizugaki, T., Ebitani, K. and Kaneda, K.: *Tetrahedron Lett.*, 43, 717(2002)
- 15) Ebitani, K., Nagashima, K., Kawabata, T., Mizugaki, T. and Kaneda, K.: *Green Chem.*, 2, 15(2000)
- 16) Kawabata, T., Mizugaki, T., Ebitani, K. and Kaneda, K.: *Tetrahedron Lett.*, 42, 832(2001)
- 17) Ebitani, K., Ide, M., Mitsudome, T., Mizugaki, T. and Kaneda, K.: *Chem. Commun.*, 69(2002)



### Atom efficiency

全生成物の分子量の合計に対する目的とする化合物の分子量の割合

### E-factor

目的生成物に対する副生成物の重量の比

# Products

## 分子状酸素を用いたクリーンな環境調和型酸化反応に！

コードNo.	品名	規格	容量	希望納入価格(円)
182-01851	Ruthenium( )-Hydroxyapatite	有機合成用	1g	7,000
188-01853			5g	26,000

## 水試料中エストロゲンの分析

和光純薬工業株式会社 試薬研究所 吉田 貴子

エストロゲンは外因性内分泌攪乱作用が示唆されている物質(環境ホルモン)として河川水および下水における実態調査の測定対象となっている。環境省の「外因性内分泌攪乱化学物質調査暫定マニュアル」等に定める方法には、LC/MS法、ELISA法、などがあるが、ぬで島等は、HPLC/ECD法による水試料中のエストロゲン一斉分析法を報告している<sup>1)</sup>。今回この方法を参考に固相抽出カラムにPresep®-C RPP( short ) 分析カラムにWakopak® Navi C18-5を用い、河川水中のエストロゲン(エストリオール、17-エストラジオール、エストロン、エチニルエストラジオール)を一斉分析する方法について検討したので紹介する。

精製水および河川水1000mℓに標準1μg、0.3μg、0.1μgを添加し、Presep®-C RPP( short )を使用して前処理後、アセトニトリル3mℓで溶出し、直接HPLCで分析した。その時の回収率を表1に、固相抽出条件を図1に示した。

標準液1ng、河川水1000mℓの濃縮、河川水1000mℓに標準0.3μgを添加した場合の分析例とHPLC条件を図2に示した。河川水では、夾雑物の影響でエストリオールの検出はできなかったが、エストリオール以外の17-エストラジオール、エストロン、エチニルエストラジオールは、いずれも良好な分離と回収率を示した。また、ECD(アンペロメトリック電気化学検出器)による検出は、UV検出法に

比較して実試料中の夾雑物の影響が少なく、高い検出感度が得られた。さらに高感度分析が必要な場合には、溶出液をN<sub>2</sub>ガス気流下にて乾固後、50%アセトニトリルで再溶解したものをHPLC分析する方法が有効であった。この場合、各標準品0.5ng以下の検出も可能であった。

以上、Presep®-C RPP( short )を前処理に使用し、分析カラムにWakopak® Navi C18-5、4.6 x150mmを用いたHPLC/ECD法による水試料中エストロゲンの分析例を紹介した。

今回検討したHPLC/ECD法では河川水中の夾雑物の影響でエストリオールの検出はできなかったが、精製水への標準添加回収は良好で、溶出液として、アセトニトリル以外に酢酸エチル/メタノール(5:1)先使用でき、他の特異性に優れたエストロゲン分析法(例えばELISA法)の前処理へ適応可能と考える。本分析例が水中エストロゲン分析の参考になれば幸いである。

Presep®-C RPP( short )はODSと同様に逆相的な挙動を示すスチレンジピニルベンゼン-ポリメタクリレート系の親水性ポリマーを充填したカートリッジカラムで、ODS充填剤に比較して極性化合物の保持が大きい、塩基性化合物の吸着が少ない、使用可能なpH範囲が広い、などの利点がある。本誌Vol.70No.1、Vol.71No.1に使用例を紹介しているが、多方面に応用可能な固相抽出カラムである。

### 【参考文献】

- ぬで島智恵子、吉岡秀俊、備藤敏次、東野和雄、植田忠彦：固相抽出-電気化学検出器付きHPLC法によるビスフェノール-A、エストロゲン一斉分析法、日本水環境学会MS技術研究委員会シンポジウム「環境ホルモン物質の測定技術と水環境の現状」、1999年9月13日

Table1. 試料水への標準添加回収率

試料水	精製水1000mℓ			河川水1000mℓ		
	1μg n=4 回収率(%)	0.3μg n=2 回収率(%)	0.1μg n=2 回収率(%)	1μg n=2 回収率(%)	0.3μg n=2 回収率(%)	0.1μg n=2 回収率(%)
Estriol(E3)	98.3	89.9	76.2			
17-estradiol(E2)	96.6	97.5	90.6	97.9	94.5	91.2
Ethinylestradiol(EE2)	97.9	94.7	86.0	99.9	95.8	88.8
Estron(E1)	101.6	91.7	80.6	105.2	103.4	91.5

\* Estriolは不純物が重なるため測定不能。

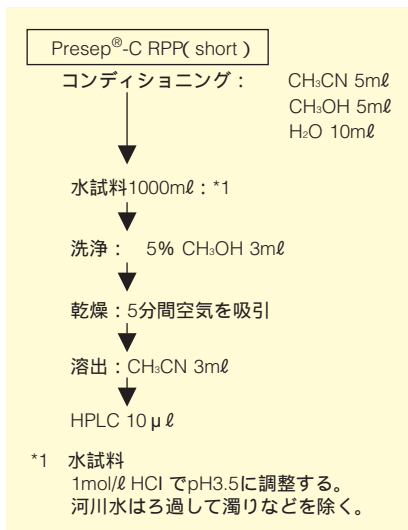


Fig.1. 固相抽出条件

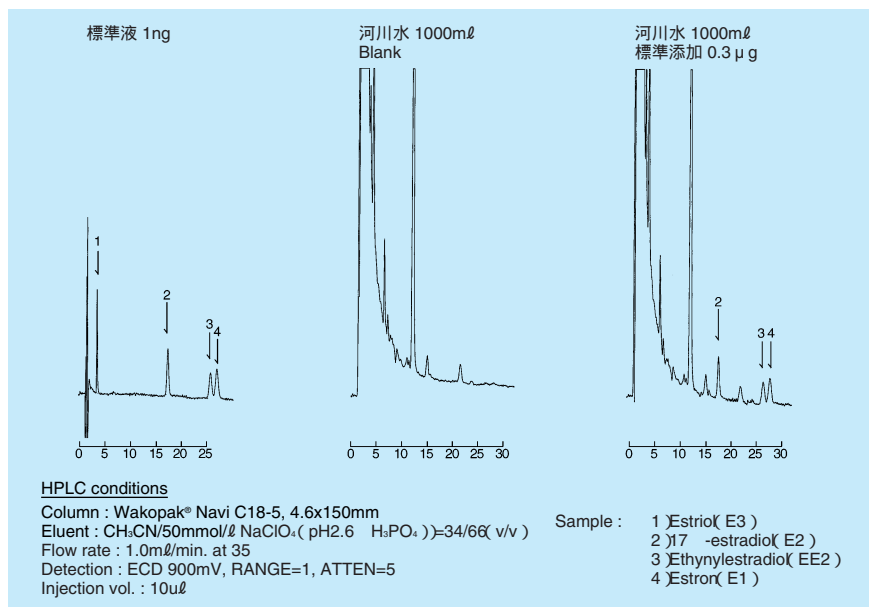


Fig.2. エストロゲンの分析

二本鎖RNAの細胞内への導入により、遺伝子の発現が抑制される現象はRNAi (RNA interference; RNA干渉) と呼ばれ、1998年に線虫において初めてその発現抑制効果が確認された。その後、植物やショウジョウバエなどにおいても同様の現象が発見されたが、哺乳類細胞では30bp以上のRNAが導入されると、抗ウイルス反応によるインターフェロン応答が働き細胞内の遺伝子発現を抑制してしまうことから、特定の遺伝子に対するRNAiは難しいと考えられてきた。

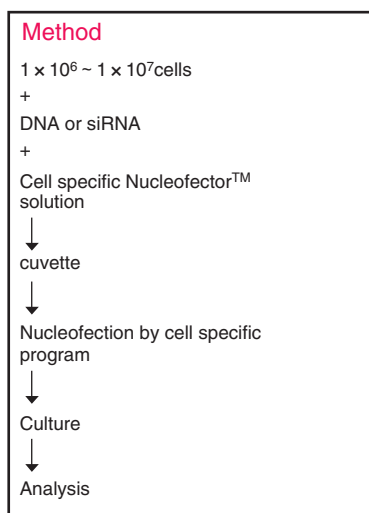
しかし、近年、Tuschlらにより、21~23bpの短い二本鎖RNA (siRNA) を細胞へ導入することでこのインターフェロン応答が回避でき、哺乳類細胞においても遺伝子発現の抑制が可能であることが確認された。これをきっかけにして、最近では細胞だけでなく個体レベルでもこのsiRNAを用いたRNAi実験が広く行われるようになってきており、今後、遺伝子機能解析や医療への応用が期待されている。

### siRNAの導入

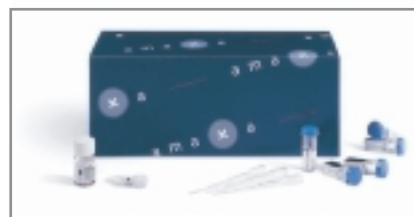
哺乳類細胞へのsiRNAの導入にはカチオニックリポソームを用いたリポフェクション法が多く用いられている。しかし、ある種の細胞ではリポフェクション法での核酸導入効率が低い場合、siRNAによる遺伝子の発現抑制効果が得られない場合がある。そこで今回、エレクトロポレーション法を応用したamaxa社「Nucleofector™」を用いて核酸導入の困難な細胞へのsiRNAの導入を検討した。

「Nucleofector™」はamaxa社から細胞ごとに専用の導入試薬とプログラムが準備されており、細胞、試薬、そして導入する核酸を混合し指定のプログラムを実行することで効率よく核酸が導入できる。siRNAに関して専用のプログラムはamaxa社から特に示されていないが、我々でいくつか条件を検討したところでは、今のところベクター等を導入する際に推奨されている条件がsiRNAでも最も効率よく導入できるようである。

「Nucleofector™」を用いたsiRNAの一



Nucleofector™装置



Nucleofector™キット

Fig.1 amaxa社Nucleofector™によるsiRNAの導入法の概要

一般的な導入方法は、Fig.1に示すように、培養していた細胞を回収しPBSでwashした後、 $1 \times 10^6 \sim 1 \times 10^7$ 個の細胞、および100pmolesのsiRNAを専用の試薬で100  $\mu$ lになるように混合しキュベットに移す。キュベットを「Nucleofector™」にセットし、amaxa社より提供されたその細胞に最も導入効率の良いプログラムを実行後、細胞を培地に移し培養する。実験の目的にもよるがsiRNAを導入する場合、抑制効果の確認はターゲットとする遺伝子から作られるタンパク質のターンオーバーを考慮して、通常、24時間から48時間後以降に行うことが多い。しかし、外部から導入されたsiRNAの効果は一過的であり、その効果は日が経つにつれ弱くなっていくため導入後数日のうちに解析を行うのが一般的である。

### siRNAの合成

RNAi実験では、通常、21~23bpの3'末端が2塩基突出した短い二本鎖RNAがsiRNAとして用いられる。siRNAはターゲットとなるmRNAの配列から任意に設定するが、発現抑制効果はその配列によって大きく影響される。しかし、配列の選択には今のところはっきりとしたルールはなく、任意の3~5カ所からsiRNAを合成し、その効果を実際に使用して確認するという方法がとられることが多い。Max

Planck研究所のTuschlらのホームページ (<http://www.mpibpc.gwdg.de/abteilungen/100/105/sirna.html>)に設定の目安が記載されているので参考にしてもよい。

RNAi実験では、現在、多くの研究者は有機化学的に合成されたsiRNAを使用している。これら化学合成siRNAは弊社を含めいくつかのメーカーから手に入れることができる。また、*in vitro*で酵素的にsiRNAを合成するキットも発売されており、この方法では比較的安価にsiRNAの作製が可能である。さらに、RNAポリメラーゼのプロモーターの下流にsiRNAの鋳型となる配列をつないだsiRNA発現ベクターにより、細胞内でsiRNAを合成する方法も昨年発表され、現在、多くの研究者によって検討が行われている。

### siRNAによる発現抑制

弊社では昨年からカスタムsiRNA合成とともに、siRNA関連製品として「Control siRNA duplex」を発売している。この「Control siRNA duplex」はアニーリング済みの化学合成siRNAで、文献上で実際に効果が確認されている配列を採用している。現在のところ10種類のsiRNAが発売されているが、今回はこれらの中からGFP、cdk1 siRNAを導入した結果を簡単に紹介する。

Fig.2は2種類の細胞にGFPに対するsiRNAを導入した結果である。HeLa細胞は一般的なリポフェクション法でも十分導入効率の高い細胞であるが、「Nucleofector™」を用いて導入した場合でも90%以上の細胞でsiRNAが取り込まれ細胞内のGFP発現が抑制されていることがわかる。ここで使用したNucleofector™ Solution R、プログラムA-28は、amaxa社が提示しているHeLa細胞における推奨の試薬、プログラムである。

一方、U937細胞はリンパ腫由来の細胞で、通常のリポフェクション法では遺伝子の導入効率が非常に低い。このような細胞ではsiRNAにおいても導入効率が低い。そのためRNAi実験を行うことは困難であることが多い。しかし、今回「Nucleofector™」を用いて行った結果では、50%以上の細胞にGFP Plasmidが導入され導入されたほぼ全ての細胞のGFP発現を抑制していることが確認できた。ここで用いた試薬Nucleofector™ Solution V、プログラムT-10もamaxa社が推奨するU937細胞用の方法である。

次に細胞内在性の遺伝子であるcdk1についてもGFPの時と同様にU937細胞へsiRNAを導入し、発現抑制効果を調べた(Fig.3)。まずsiRNAを導入して、24時間後に細胞を回収、細胞を溶解しタンパク質を抽出後、ウェスタンブロッティングにてcdk1タンパク質を検出した。U937細胞への核酸導入に関してamaxa社はT-10以外にもいくつかの推奨プログラムを提供しているが、実験の結果からそのいずれのプログラムにおいてもリポフェクション法より効果的にcdk1の発現を抑制していることがわかった。

ただし、ここに示したいいくつかのU937細胞用プログラムでは、導入効率が高い一方で50%前後の細胞が死んでしまうという問題がある。実験の目的によってはこの死細胞率が問題となることもあるかもしれない。今後は、導入効率が高く、なおかつ死細胞率の低い条件をさらに検討していく必要があると考えている。

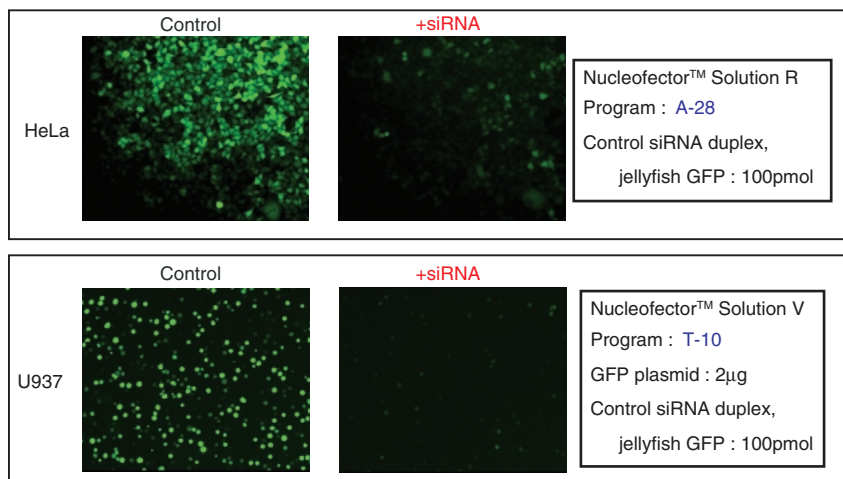


Fig.2 GFPを構成的に発現しているHeLa細胞、およびU937細胞におけるGFP siRNAの効果

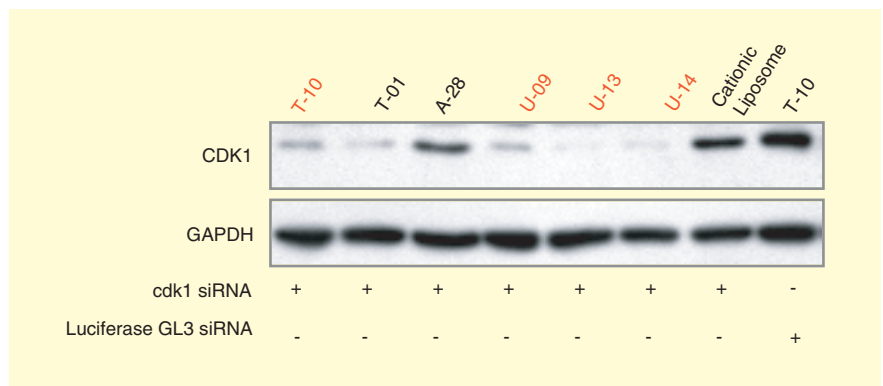


Fig.3 Nucleofector™各プログラムを用いたU937細胞へのcdk1 siRNAの導入 (赤字はamaxa社によるU937細胞用推奨プログラム)

以上のように「Nucleofector™」を用いたsiRNAの導入法は、通常の細胞株はもとより一般的に核酸の導入効率が低いとされている細胞株(特にprimary cellには専用の試薬とプログラムが準備されている)において有効な道具となるものと思われる。

(ここに載せたデータを含めたsiRNA関連実験データはニッポンジーンのホームページ(<http://www.nippongene.jp>)に掲載していく予定です。)

【参考文献】

- 1) Fire, A. *et al.*: *Nature*, 391, 80(1998)
- 2) Zamore, P. D. *et al.*: *Cell*, 101, 25(2000)
- 3) Elbashir, S. M. *et al.*: *Genes Dev.*, 15, 18(2001)
- 4) Bernstein, E. *et al.*: *Nature*, 409, 363(2001)
- 5) Elbashir, S. M. *et al.*: *Nature*, 411, 494(2001)

- 6) Miyagishi, M. and Taira, K.: *Nat. Biotechnol.*, 20, 497(2002)
- 7) Lee, N. S. *et al.*: *Nat. Biotechnol.*, 20, 500(2002)
- 8) Paul, C. P. *et al.*: *Nat. Biotechnol.*, 20, 505(2002)
- 9) Paddison, P. J. *et al.*: *Genes Dev.*, 16, 948(2002)
- 10) Sui, G. *et al.*: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 99, 5515(2002)
- 11) Yu, J. Y. *et al.*: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 99, 6047(2002)
- 12) Brummelkamp, T. R. *et al.*: *Science*, 296, 550(2002)

関連商品はP.22~P.24をご参照下さい。

## 第52話 エンドトキシンの種類

今回は、エンドトキシンの種類について、リムルス試験の観点から考えてみましょう。

エンドトキシンの研究は、臨床的に重要な細菌について進められてきました。実際、現在使用されているエンドトキシン標準品は大腸菌やサルモネラ菌由来のもので、例えば、日本薬局方では *Escherichia coli* UKT-B株由来の、米国薬局方では *Escherichia coli* O113株由来の、欧州薬局方では *Salmonella abortus-equi*由来のLPSをエンドトキシン標準品に使用しています。しかし、医薬品や医療器具に混入するエンドトキシン汚染源としての細菌は、必ずしも臨床に重要な菌とは限らず、水棲細菌や土壌細菌が大きな比率を占めていると思われます。この観点から、医薬品等の安全性試験に使用する標準エンドトキシンは *Pseudomonas* のような水中によく見られる菌から取るべきではないかとの意見があるようです。

以前にもご紹介したように、種々の乾燥菌体は、様々なリムルス反応性を示します<sup>1)</sup>。図1は、筆者らが測定したグラム陰性菌乾燥菌体のリムルス試験に対する反応性の一例です。 *Cytophaga*、 *Flavobacterium*、 *Sphingobacterium*、 *Sphingomonas* で非常に低い活性が認められます。その他の菌は、乾燥菌体 1 μg あたりのエンドトキシン活性が10から1000EUの範囲に入っています。すなわ

ち、グラム陰性菌の中に2つのグループがあって、その一つは非常に低い活性を示します。

グラム陰性菌であるにもかかわらず菌体がリムルス試験に反応しにくい原因として、いくつかの原因が考えられます。

一つは、細胞壁成分がLPS以外の成分で構成されている場合です。 *Sphingobacterium* や *Sphingomonas* は、その細胞壁にスフィンゴリピドを多く含んでいることがわかっています。 *Cytophaga*、 *Flavobacterium*、 *Sphingomonas* は遺伝的に近い菌種なので、細胞壁の成分が他のグラム陰性菌と大きく違うことがこれらのエンドトキシン活性の低さの原因かもしれません。

二つ目の原因として、菌体の構造、特に莢膜の有無です。莢膜がある菌体は、その際防壁が外界と接触しにくいため、リムルス試験とも反応しにくい場合が考えられます。

三つ目は、エンドトキシン自体の活性が菌によって違う場合です。LPSの活性中心と考えられるリピドAの構造は菌種によって異なりますから、そのエンドトキシン活性が異なる場合があることは理解できます。

精製したエンドトキシンの場合、その存在状態によって大きく活性が変化します<sup>2)</sup>。以前から溶液中のエンドトキシンの分散性を高める目的で、アルブミン、トリエチルアミン、糖アルコールなどが使われてきました。界面活性剤はエンドトキ

シンの分散を良くしますが、モノマー単位まで分散させたエンドトキシンの生物活性は非常に低いことが知られています。また、エンドトキシンの水懸濁液を超音波処理すると活性が変化することが知られています。実際、筆者らも超音波処理でエンドトキシン溶液の活性が10倍以上上昇した例を経験しています。

さて、リムルス試験で測定するエンドトキシンの活性とはどのようなものでしょう。この話題は以前にも取り上げましたが<sup>3,4)</sup>、リムルス試験で検出できるエンドトキシン活性は、測定時の存在状態における活性であって、決してエンドトキシンの絶対量を測定しているわけではありません。これは、未知の試料の場合、リムルス試験の結果からエンドトキシン量や菌体量を推測することが困難であることを示唆しています。この観点からすると、リムルス試験はある標準品に対比して試料中のエンドトキシン活性がどの程度であるかを知るための試薬と考えることができます。筆者は、医薬品等の安全性試験の場合、ウサギ発熱試験とリムルス試験の比較データを基に基準作りが行われていることから、確立された標準品があれば(由来菌にかかわらず)特に問題はないと思います。もちろん、試料中に混入するエンドトキシンの種類や状態、菌の種類などの情報があれば、絶対量の推定も可能と思われます。その場合は、試料中に混入してくるエンドトキシンの種類や状態を常に意識し、状況に適した標準や測定条件を考える必要があると思います。

### 【参考文献】

- 1) 土谷正和: 和光純薬時報, 6(1), 16 (1998)
- 2) 丹羽友: 「内毒素-その構造と活性」(本間 遜監修), p.124 (医歯薬出版 1983)
- 3) 土谷正和: 和光純薬時報, 6(1), 16 (1996)
- 4) 土谷正和: 和光純薬時報, 6(2), 16 (1996)

今回は、第53話「SLP試験の応用」の予定です。

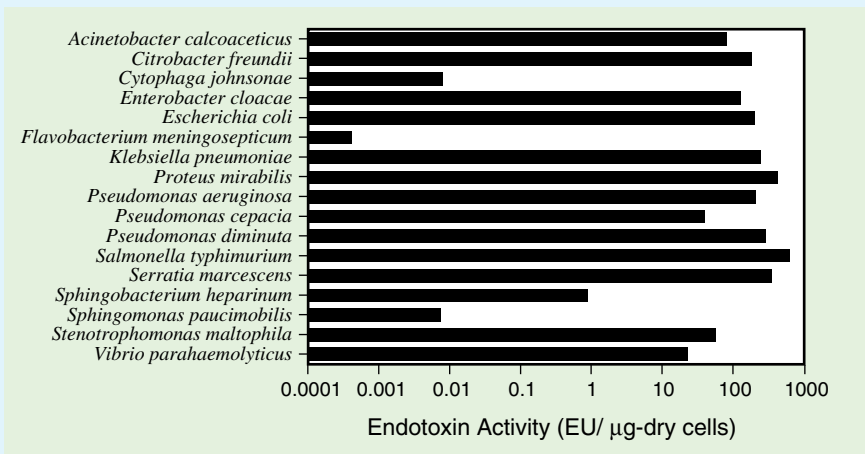


図1 .

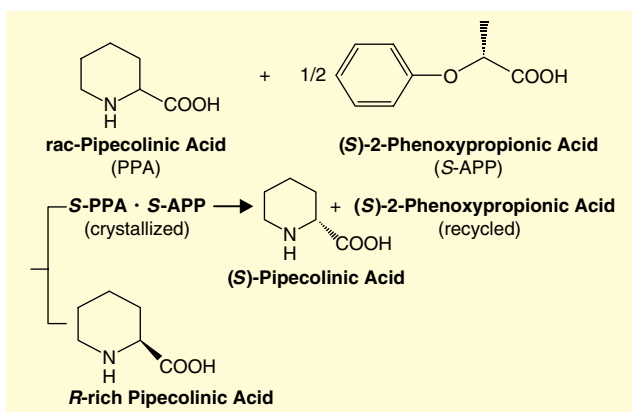
## 新しい光学分割剤

株式会社 ワコーケミカル

### 光学分割剤

ジアステレオマ - 塩法による光学分割剤として、高い光学純度の両鏡像体を揃えました。大量処理が可能でさらに回収再利用も可能です。

#### 反応例



コ-ドNo.	品名	含量(HPLC)	光学純度(HPLC)	容量	希望納入価格(円)
325-41021	(R)(+)-1-Benzylamino-3-phenoxy-2-propanol	97.0%以上	98.0%ee以上	5g	5,000
323-41022	(S)(-)-1-Benzylamino-3-phenoxy-2-propanol	97.0%以上	98.0%ee以上	25g	14,000
322-41031	(R)(+)-1-Benzylamino-3-phenoxy-2-propanol	97.0%以上	98.0%ee以上	5g	5,000
320-41032	(S)(-)-1-Benzylamino-3-phenoxy-2-propanol	97.0%以上	98.0%ee以上	25g	14,000
329-41041	(2R,3R)(+)-Tartramic Acid	97.0%以上	98.0%ee以上	5g	4,000
327-41042	(2S,3S)(-)-Tartramic Acid	97.0%以上	98.0%ee以上	25g	10,000
326-41051	(R)(+)-2-Phenoxypropionic Acid	97.0%以上	98.0%ee以上	5g	4,000
324-41052	(S)(-)-2-Phenoxypropionic Acid	97.0%以上	98.0%ee以上	25g	10,000
323-41061	(R)(+)-2-Phenoxypropionic Acid	97.0%以上	98.0%ee以上	5g	3,500
321-41062	(S)(-)-2-Phenoxypropionic Acid	97.0%以上	98.0%ee以上	25g	9,000
320-41071	(R)(+)-2-Phenoxypropionic Acid	97.0%以上	98.0%ee以上	5g	3,500
328-41072	(S)(-)-2-Phenoxypropionic Acid	97.0%以上	98.0%ee以上	25g	9,000

\* 別容量のご注文もお受けできますので、お問合せ下さい。

## ChemDiv

(Chemical Diversity Laboratories) 社

### ビルディングブロック製品

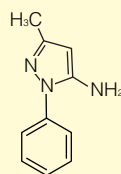
ChemDiv社は、カリフォルニア州のビルディングブロックとライブラリの供給メーカーです。この度、新しいビルディングブロックを開発しました。

#### 特長

- 低分子  
分子量200~250以下を中心に品揃えを増強しています。
- 品揃えをアミノ基、カルボニル基中心に展開し、アミノ酸系も包含
- 迅速納期  
弊社またはChemDiv社に在庫10g以上確保
- Webサイト< [www.chemdiv.com](http://www.chemdiv.com) > から製品情報をダウンロードできます。
- ビルディングブロックは和光の独占販売です。

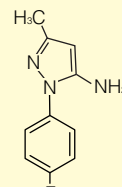
### 側鎖ビルディングブロックの製品例

メーカーコード：R052-2490



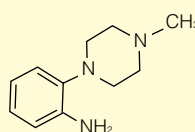
$C_{10}H_{11}N_3 = 173.22$

メーカーコード：R052-2498



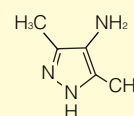
$C_{10}H_{10}FN_3 = 191.21$

メーカーコード：R052-2642



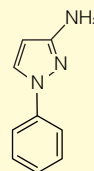
$C_{11}H_{17}N_3 = 191.28$

メーカーコード：R052-2768



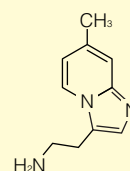
$C_8H_9N_3 = 111.15$

メーカーコード：R052-2784



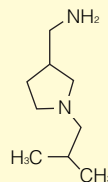
$C_9H_9N_3 = 159.19$

メーカーコード：R052-2788



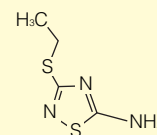
$C_{10}H_{13}N_3 = 175.23$

メーカーコード：R052-2820



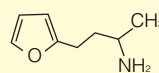
$C_9H_{20}N_2 = 156.27$

メーカーコード：R052-2831



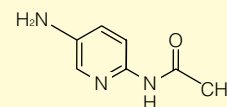
$C_4H_7N_2S_2 = 161.25$

メーカーコード：R052-2842



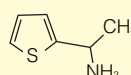
$C_8H_{13}NO = 139.20$

メーカーコード：R052-2848



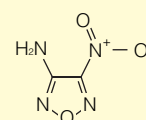
$C_7H_9N_3O = 151.17$

メーカーコード：R052-2851



$C_6H_9NS = 127.21$

メーカーコード：R052-2865



$C_2H_2N_4O_3 = 130.06$

ISISフォーマットまたはsdファイルで電子データを送付しますので、ご連絡下さい。

## HPLC用パッドカラム Wakopak® Naviシリーズ

### Wakopak® Navi C18-5

さらにグレードアップしたODS充てん剤

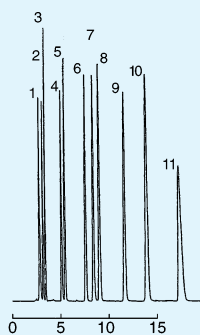
従来よりも高純度化した粒子径5μmのシリカゲルを採用しています。オクタデシル基修飾法を改良し、徹底的にエンドキャッピングを行った充てん剤です。応用範囲が広くファーストチョイスカラムとして最適です。

#### 分析例

##### [直鎖カルボン酸の分析]

###### 分析条件

Column size : 4.6 × 250mm  
 Eluent : 20mmol/l NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH 2.5)  
 Flow rate : 1.0ml/min.  
 Temp. : 35  
 Detection : UV 210nm 0.04Aufs  
 Sample : 1) Oxalic Acid  
 2) Tartaric Acid  
 3) Formic Acid  
 4) Lactic Acid  
 5) Acetic Acid  
 6) Citric Acid  
 7) Fumaric Acid  
 8) Succinic Acid  
 9) Acrylic Acid  
 10) Propionic Acid  
 11) Levulinic Acid

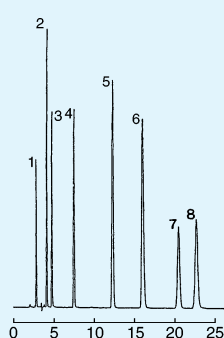


##### [水溶性ビタミンの分析]

###### 分析条件

Column size : 4.6 × 250mm  
 Eluent : CH<sub>3</sub>CN/0.1% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>  
 5mmol/l SHS = 10/90 (v/v)  
 Flow rate : 1.0ml/min.  
 Temp. : 40  
 Detection : UV 210nm 0.16Aufs  
 Sample : 1) L(+)-Ascorbic acid (V.C)  
 2) Nicotinic Acid  
 3) Nicotinamide  
 4) Pyridoxine·HCl (V.B<sub>6</sub>)  
 5) Caffeine  
 6) Thiamine·HCl (V.B<sub>1</sub>)  
 7) d-Biotin (V.H)  
 8) Riboflavin (V.B<sub>2</sub>)

SHS : Sodium 1-Hexane sulfonate



品名	カラムサイズ	カラムタイプ	希望納入価格(円)
Wakopak® Navi C18-5	4.6 × 150mm	デュボン(D) ウォーターズ(W)	45,000
	4.6 × 250mm		48,000
Wakopak® Navi C22-5	4.6 × 150mm	デュボン(D) ウォーターズ(W)	49,000
	4.6 × 250mm		52,000
Wakopak® Navi C30-5	4.6 × 150mm	デュボン(D) ウォーターズ(W)	52,000
	4.6 × 250mm		55,000

セミマイクロカラムから分取用カラムまで各種サイズを取揃えております。

Navi C22-5... ドコシル基修飾充てん剤を使用。

水比率の高い移動相でC18よりさらに高分離、高保持能が得られます。

Navi C30-5... ポリメリックタイプのトリアコンチル基修飾充てん剤を使用。

優れた構造認識能をもち同族体分析に威力を発揮します。

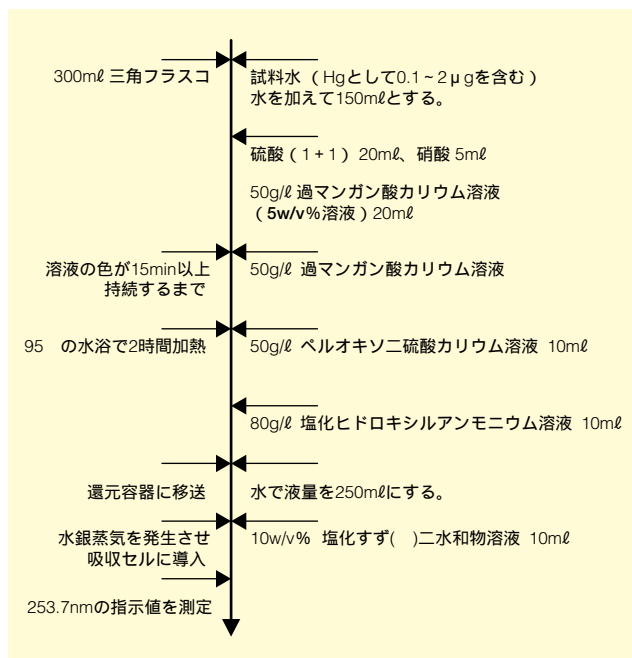
## 水銀分析用試薬

### 5w/v% 過マンガン酸カリウム溶液

水銀は、現状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、肝臓、毛髪などの生体内でしばしば検出されることから、今後も監視が必要です。

#### 分析のフローシート

還元気化原子吸光法 (JIS K 0101 工業用水試験法、JIS K 0102 工場排水試験法による)



[参考] 50g/l 過マンガン酸カリウム溶液は、上水試験でもご使用になれます。  
 上水試験 2001 P-383

コードNo.	品名	規格	容量	希望納入価格(円)
163-21005	5w/v% Potassium Permanganate Solution	排水試験用	500ml	3,800

#### 関連商品

コードNo.	品名	規格	容量	希望納入価格(円)
089-01472			25g	1,300
081-01471	Hydroxyammonium Chloride	試薬特級	100g	2,200
083-01475			500g	3,300
138-13661	Mercury Standard Solution (Hg:1000mg/l)	JCSS	100ml	2,400
135-13671	Mercury Standard Solution (Hg:100mg/l)	JCSS	100ml	2,700
140-04016	Nitric Acid	有害金属測定用	500ml	2,200
161-08921	Potassium Permanganate	有害金属測定用	250g	3,000
169-11891	Potassium Peroxodisulfate	窒素・りん測定用	100g	2,700
192-04696	Sulfuric Acid	試薬特級	500ml	770
198-04693			6kg	3,100
198-11565	64% Sulfuric Acid (1+1)	-	500ml	1,200
206-06681	Tin Chloride Dehydrate	有害金属測定用	100g	2,200

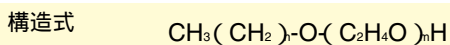


## 環境汚染診断薬エコロジーナシリーズ 日本エンバイロケミカルズ株式会社

### 非イオン界面活性剤 AE ELISAキット(チューブタイプ)

#### チューブタイプ追加!

近年、非イオン界面活性剤の生産量は陰イオン界面活性剤と同程度にまで増加しています。アルキルエトキシレート(AE, POER)は代表的な非イオン界面活性剤のひとつであり、家庭用合成洗剤に配合されるなど特に生産量が増加しています。AEの生分解性は比較的良好ですが、起泡性が強く、水道水質の管理上、監視の必要性が指摘されています。



#### 特長

モノクローナル抗体を使用しているため、製造ロット間で抗体性能にばらつきがありません。

定量範囲は2~100  $\mu\text{g}/\text{l}$  (プレートタイプは20~1,000  $\mu\text{g}/\text{l}$ ) と高感度で、環境水中のAEを特異的に検出・測定できます。測定値のCV(変動係数)は10%以下で、ばらつきが少なく、高精度です。

有機溶媒の使用量を削減できます。

試料の調製から定量まで2.5時間で測定が完了します。

APEキットとの併用により、POE型非イオン界面活性剤の総量を測定できます。

#### 【参考】非イオン界面活性剤の測定法

環境中の非イオン界面活性剤測定法として、上水試験法にはテトラチオシアノコバルト酸法(CTAS法)が記載されています。CTAS法ではAEとアルキルフェノールエトキシレート(APE, POEP)の総量を測定できますが、煩雑なクリーンアップ、有機溶媒による抽出が必要なほか、EO基の付加モル数による感度のばらつきなどの問題があります。改良法として4-(2-ピリジルアゾ)-レゾルシノール法(PAR法)やLC-MS法なども検討されています。

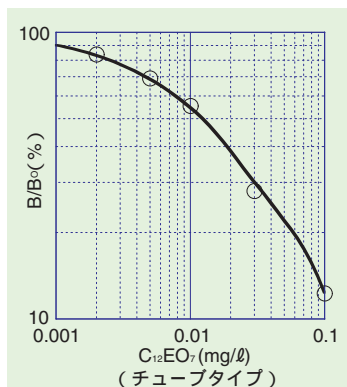
#### AE測定用標準曲線

定量範囲は2~100  $\mu\text{g}/\text{l}$  (プレートタイプは20~1,000  $\mu\text{g}/\text{l}$ )で、定量範囲内濃度の試料はろ過だけで測定することができます<sup>注)</sup>。

測定範囲外濃度の試料はろ過後、希釈あるいは濃縮操作(固相抽出)が必要になります。

測定値のCV(変動係数)は10%以下で、測定のばらつきが少なく、高精度です。

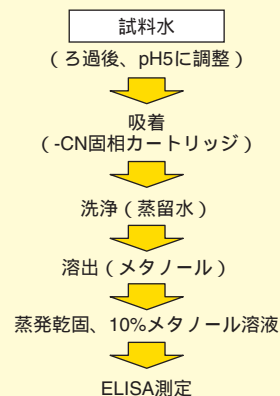
注) 測定試料により固相抽出などによる濃縮、クリーンアップが必要な場合があります。



#### 試料の前処理法(簡易固相抽出)

簡易固相抽出による濃縮によりpptオーダーの試料でも測定できます。

試料を-CNカートリッジに通水後、メタノールで溶出し、濃縮します。この過程でAEの測定を妨害する物質も同時に除去することができます。測定用試料は、最終的に10%メタノールに調製し、測定試料とします。

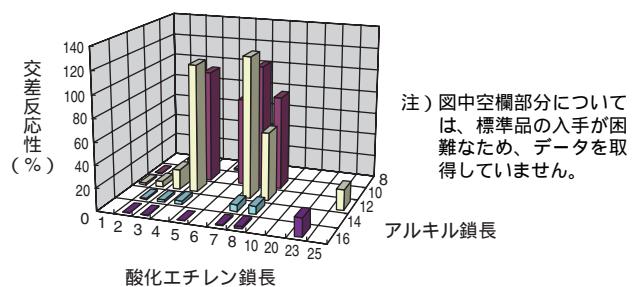


固相抽出の方法は測定対象により異なることがあります。

#### 抗AE抗体の交差反応性

抗AE抗体はアルキル鎖長10~12のAEに特異性が高く、APEなど他の非イオン界面活性剤にはほとんど反応しません。

また、石けん類やアルキル硫酸エステル塩などの陰イオン界面活性剤と若干交差反応します。



化合物	交差反応性 (%)
非イオン界面活性剤	
AE(C12EO7)	100
Nonylphenol Ethoxylate(NP10EO)	<1
Polyethylene Glyco(PEG)	<1
Tween-20	3
陰イオン界面活性剤	
Linear Alkylbenzene Sulfonates(LAS)	<1
Sodium Laurate	10
Sodium Dodecyl Sulfate(SDS)	16
Alkylether Sulfate(AES)	31
陽イオン界面活性剤	
Hexadecyltrimethyl Ammonium Chloride	<1

コードNo.	メーカーコード	品名	容量	希望納入価格(円)
300-14241	91769	AE ELISAキット(チューブタイプ)	1キット(20回用)	50,000
300-08251	91767	AE ELISAキット(プレートタイプ)	1キット(96回用)	70,000

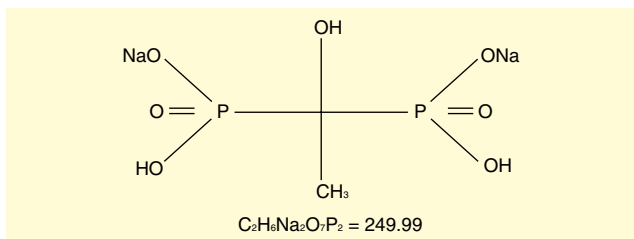
## 『骨代謝』関連試薬



### 骨吸収抑制作用物質

#### エチドロン酸二ナトリウム

破骨細胞による骨吸収を抑制し、異所性骨化の進展を阻止する作用をもつビスフォスフォネート系化合物です。  
 含量(滴定法):95.65%(Lot No. PKM2966の実測値)  
 pH(10g/ℓ, 25 ):4.2~5.2



コードNo.	品名	規格	容量	希望納入価格(円)
058-07181	Disodium Etidronate	薬理研究用	200mg	4,000
054-07183			1g	9,500
052-07184			5g	30,000

### 骨代謝関連サイトカイン類

#### BMP-14, ヒト, 組換え体

(BMP-14 : 骨形成因子 14)

BMP-14/CDMP-1はヒト胚発生中、長骨において発現する軟骨形成の基本的なインシレーターとして知られています。四肢の軟骨原基に発現しますが体幹の骨には発現しない特長があります。TGF-スーパーファミリーの一つGDF-5(Growth/differentiation factor-5)のヒト相同遺伝子産物です。

起 源 : Human bone morphogenetic protein 14 cDNA expressed in *E.coli*

形 状 : 凍結乾燥品(キャリアフリー)

エンドトキシン : 0.1ng/μg (1EU/μg) 以下

#### PTHrP, ヒト, 組換え体

(PTHrP : 副甲状腺ホルモン関連タンパク質)

PTHrP (Parathyroid Hormone Related Protein) はPTH (副甲状腺ホルモン) と相同なN末端アミノ酸配列を有し、その部分でPTH類似の作用があります。軟骨性骨形成などにおいては局所性のサイトカインとして作用し、また乳がんの骨転移の際にも重要な働きを示します。

起 源 : Human parathyroid hormone related protein cDNA expressed in *E.coli*

形 状 : 凍結乾燥品(キャリアフリー)

エンドトキシン : 0.1ng/μg (1EU/μg) 以下

#### Shh, ヒト, 組換え体

(Shh : ソニックヘッジホッグ)

Shhはヘッジホッグファミリーの一つであり、体軸の左右や胚芽の前後軸の決定などの形態形成に關与するサイトカインです。

起 源 : Human sonic hedgehog cDNA expressed in *E.coli*

形 状 : 凍結乾燥品(キャリアフリー)

エンドトキシン : 0.1ng/μg (1EU/μg) 以下

#### M-CSF, マウス, 組換え体

(M-CSF : マクロファージコロニー刺激因子)

M-CSFは単球、線維芽細胞および内皮細胞により産生されるマクロファージコロニーを刺激し、単球およびマクロファージによる抗体依存性細胞障害を促進して破骨細胞の骨吸収を阻害します。

起 源 : Mouse macrophage colony stimulating factor cDNA expressed in *E.coli*

形 状 : 凍結乾燥品(キャリアフリー)

エンドトキシン : 0.1ng/μg (1EU/μg) 以下

コードNo.	品名	規格	容量	希望納入価格(円)
023-14941	Bone Morphogenetic Protein 14, Human, recombinant【rhBMP-14】	細胞生物学用	10μg	39,000
165-21141	Parathyroid Hormone Related Protein, Human, recombinant【rhPTHrP】	細胞生物学用	50μg	39,000
199-12891	Sonic Hedgehog, Human, recombinant【rhShh】	細胞生物学用	25μg	39,000
135-14391	Macrophage Colony Stimulating Factor, Mouse, recombinant【rmM-CSF】	細胞生物学用	10μg	39,000

#### 関連商品

コードNo.	品名 [メーカー名]	規格 [メーカーコード]	容量	希望納入価格(円)
026-14811	rhBMP 2 【Bone Morphogenetic Protein 2, Human, recombinant】	生化学用	5μg	35,000
023-14821	rhBMP 4 【Bone Morphogenetic Protein 4, Human, recombinant】	生化学用	5μg	35,000
509-34531	rhBMP 6 【Bone Morphogenetic Protein 6, Human recombinant】 <small>(Genzyme/TECHNIE)</small>	(2507)	20μg	92,000
506-34541	rhBMP 7 【Bone Morphogenetic Protein 7, Human recombinant】 <small>(Genzyme/TECHNIE)</small>	(2354)	10μg	81,000
133-13611	rhM-CSF	生化学用	10μg	39,000
139-13613	【Macrophage Colony Stimulating Factor, Human, recombinant】		50μg	148,000
184-01671	RANK (Receptor) soluble, Human, recombinant	生化学用	100μg	37,000
182-01471	RANK Ligand soluble, Human, recombinant	生化学用	10μg	37,000
186-01474			50μg	148,000
184-01791	RANK Ligand soluble, Mouse, recombinant	生化学用	10μg	39,000

## イノシトールリン脂質代謝関連物質

Wako

### PIP<sub>s</sub>(diC8)シリーズ

脂質は細胞内情報伝達系に重要な役割を担っています。さらにイノシトールリン脂質をはじめ、様々な脂質そのものが脂質結合ドメインを介してタンパク質活性を制御していることが知られています。この度、イノシトールリン脂質代謝関連物質の品揃えが充実しました。脂質研究に是非ご利用下さい。

**規 格** 各製品共通

凍結乾燥品、合成品

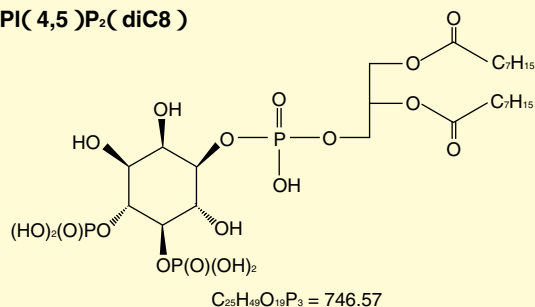
含量(NMR):98%以上

**側鎖による特長**

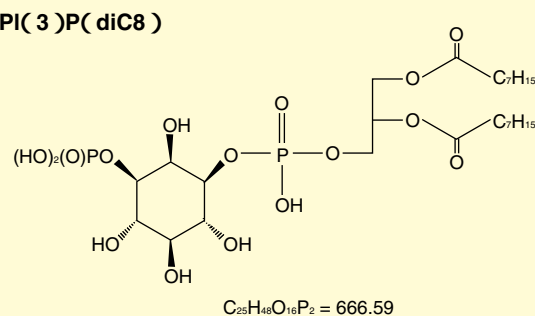
diC<sub>8</sub>(di-octanoyl):水系溶媒に可溶

**構造式例**

#### PI(4,5)P<sub>2</sub>(diC8)



#### PI(3)P(diC8)



コードNo.	品名	規格	容量	希望納入価格(円)
549-02361	L- <i>-</i> Phosphatidyl-D- <i>myo</i> -Inositol 3-Monophosphate(diC8)【PI(3)P(diC8)】	生化学用	200μg	27,000
546-02371	L- <i>-</i> Phosphatidyl-D- <i>myo</i> -Inositol 4-Monophosphate(diC8)【PI(4)P(diC8)】	生化学用	200μg	27,000
543-02381	L- <i>-</i> Phosphatidyl-D- <i>myo</i> -Inositol 5-Monophosphate(diC8)【PI(5)P(diC8)】	生化学用	200μg	27,000
545-02341	L- <i>-</i> Phosphatidyl-D- <i>myo</i> -Inositol 3,4-Diphosphate(diC8)【PI(3,4)P2(diC8)】	生化学用	200μg	39,500
542-02351	L- <i>-</i> Phosphatidyl-D- <i>myo</i> -Inositol 3,5-Diphosphate(diC8)【PI(3,5)P2(diC8)】	生化学用	200μg	39,500
540-02391	L- <i>-</i> Phosphatidyl-D- <i>myo</i> -Inositol 4,5-Diphosphate(diC8)【PI(4,5)P2(diC8)】	生化学用	500μg	31,000
541-02321	L- <i>-</i> Phosphatidyl-D- <i>myo</i> -Inositol 3,4,5-Triphosphate(diC8)【PI(3,4,5)P3(diC8)】	生化学用	200μg	42,000

## 薬理研究関連試薬

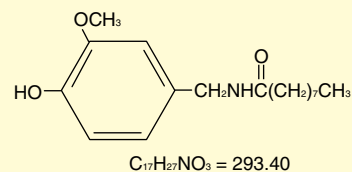
Wako

### ノニル酸ワニリルアミド

抗炎症作用を持つ合成カプサイシンのひとつです。局方収載の確認試験にも使用されます。

外 観：白色結晶性粉末

エタノール溶状：澄明



コードNo.	品名	規格	容量	希望納入価格(円)
142-07631	Nonylic Vanillylamide	薬理研究用	1g	4,000
148-07633	【N-Vanillylnonamide】		10g	10,000

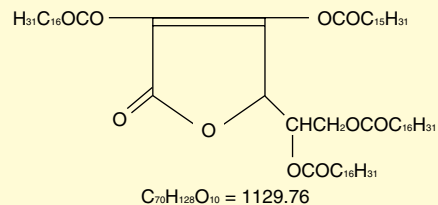
Wako

## テトラ2-ヘキサデカン酸アスコルビル【アスコルビン酸、油溶性】

細胞表皮に吸収され易い油溶性ビタミンCです。メラニンの生成を抑え、美白作用があります。

外 観：無色～うすい黄色、液体

エタノール溶状：澄明



コードNo.	品名	規格	容量	希望納入価格(円)
012-19591	Ascorbyl Tetra-2-hexadecanoate	生化学用	10g	4,000
018-19593	【Ascorbic Acid, oil soluble】		50g	12,000

## 非動物由来組換えトリプシン

Wako

### トリプシン, ウシ, とうもろこし発現組換え体

とうもろこしで発現させた組換えウシトリプシンです。とうもろこしで発現させているため、BSEのような動物病原体を含みません。

形 状：凍結乾燥品

活 性：172TAME units/mg以上

(3,300USP units/mg以上)

コードNo.	品名	規格	容量	希望納入価格(円)
208-15931	Trypsin, Bovine, recombinant	細胞生物学用	5mg	8,000
204-15933	expressed in Corn		50mg	48,000

## シャープで再現性の良い、 Wako 低コストプレキャストゲル

### SuperSep™

タンパク質、核酸の電気泳動用ポリアクリルアミドプレキャストゲルです。ゲル中には、SDSは含まれておりませんので、SDS-PAGEとNative-PAGEの両方に使用できます。



#### 仕様

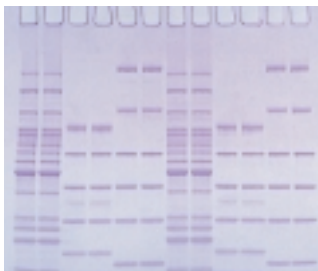
プレートサイズ:  
100(H)×100(W)×3(T)mm  
ゲルサイズ:  
85(H)×90(W)×1(T)mm  
ウェル数:12well、17well  
ウェル容積:  
35μl(12well) 25μl(17well)

#### 特長

1. 低コスト! (1,200円/1枚)
2. 使用期限は6ヶ月!
3. 濃縮ゲルにより、バンドがシャープ!
4. 再現性が良い!
5. 8連ピペット対応! (17wellのみ)
6. タンパク質、核酸に対応
7. SDS-PAGE、Native-PAGEに対応
8. ゲルが取り出しやすい包装形態

#### 泳動例

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12



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: Lane1,2,7,8 ラダーマーカー  
Lane3,4,9,10 低分子量マーカー  
Lane5,6,11,12 高分子量マーカー

#### 保存条件

2~10 保存(凍結不可) 遮光保存

コードNo.	品名	濃縮ゲル%	規格	容量	希望納入価格(円)
192-12901	SuperSep™,7.5%,12well	5%	電気泳動用	10枚	12,000
199-12911	SuperSep™,7.5%,17well	5%	電気泳動用	10枚	12,000
196-12921	SuperSep™,10%,12well	5%	電気泳動用	10枚	12,000
193-12931	SuperSep™,10%,17well	5%	電気泳動用	10枚	12,000
190-12941	SuperSep™,12.5%,12well	5%	電気泳動用	10枚	12,000
197-12951	SuperSep™,12.5%,17well	5%	電気泳動用	10枚	12,000
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

## アレルギー(IgE産生 惹起物質 Wako 水酸化アルミニウムゲル

水酸化アルミニウムゲルは、ALUMとも呼ばれ、IgE産生惹起物質として使用されます。本品はロット毎にIgE産生能試験を行っておりますので、安心してご使用頂けます。

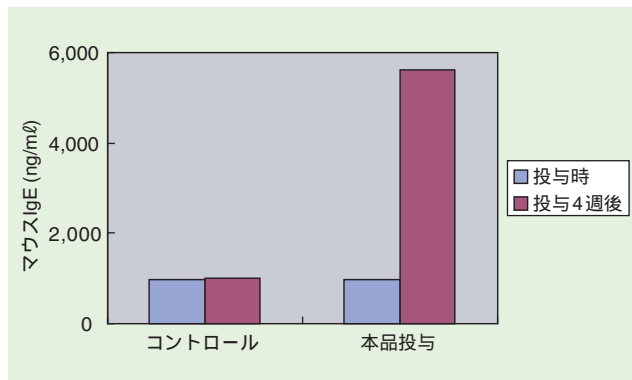
濃度: 20mg/ml

#### IgE産生能試験

##### 1) 方法

本品および50mg/ml DNP-BSAを等量、BALB/cマウスに2回腹腔投与し、血中IgEを測定する。

##### 2) 使用例 (BALB/cマウス、8週令、雄)



コードNo.	品名	規格	容量	希望納入価格(円)
019-19501	Aluminium Hydroxide Gel	免疫化学用	100mg	20,000

## 血中IgE測定キット

Shibayagi

### レビス® IgE ELISAキット

微量検体でマウス・ラットの血中IgE濃度を迅速測定

#### 特長

- 約5.5時間(ラットは約3.5時間)で測定可能
- 微量検体(血清、血漿5μlから)で測定可能
- 優れた再現性(CV値5%以下)
- 高い特異性(IgA、IgG、IgMとの交差性反応0.01%以下)
- 幅広い測定範囲(1~100ng/ml)

コードNo.	メーカーコード	品名	発色剤	容量	希望納入価格(円)
639-02891	AKRIE-010	レビス®IgE ELISAキット(マウス)	TMB	96回用	58,000
635-02893	AKRIE-210			192回用	100,000
632-04341	AKRIE-011	レビス®IgE ELISAキット(ラット)	TMB	96回用	58,000
638-04343	AKRIE-211			192回用	100,000

## Apotech社

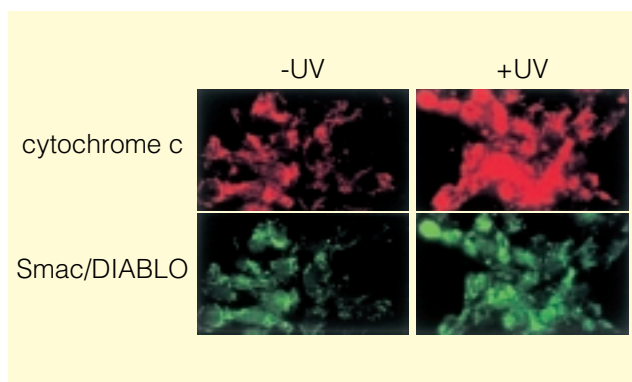


### アポトーシス/ミトコンドリア関連抗体

当社では、約1,000品目のアポトーシス関連抗体、測定キットおよび関連試薬をラインナップしているApotech社製品の取扱いを開始しました。

#### 主な製品分野

Apoptosis/Detection, Death Receptors, Caspases, Bcl-2 Family, Mitochondria, DNA Fragmentation, PARP-1  
Inflammation/TNF&TNF-R Superfamily, IL-1R &TLR, NF B&JNK Signaling  
Cancer Research/MDR  
Obesity&Diabetes Research



コードNo.	品名	容量	希望納入価格(円)
575-72451	Anti Mouse Smac/DIABLO, Monoclonal Antibody	100μg	69,600
572-72461	Anti Human Smac/DIABLO, Monoclonal Antibody	100μg	69,600
579-72471	Anti Human Apaf-1, Monoclonal Antibody	100μg	76,800
576-72481	Anti Mouse Apaf-1, Monoclonal Antibody( 13F11 )	100μg	76,800
573-72491	Anti Mouse Apaf-1, Monoclonal Antibody( 18H2 )	100μg	76,800
576-72501	Anti Rat Native Cytochrome c, Monoclonal Antibody	100μg	63,800
573-72511	Anti Horse Denatured Cytochrome c, Monoclonal Antibody	100μg	56,500
570-72521	Anti Human Active Caspase-3, Rabbit	100μg	107,000
577-72531	Anti Human Active Caspase-9, Rabbit	100μg	108,000
574-72541	Anti Mouse Survivine, Rabbit	100μg	63,800
571-72551	Anti Human HtrA2/Omi, Monoclonal Antibody	100μg	75,400

## RNAマーカー品目追加



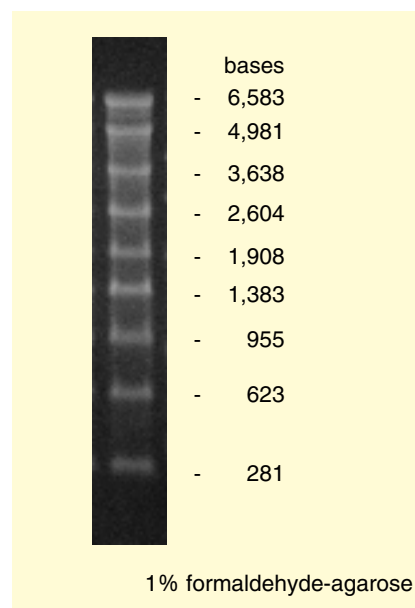
### RNAサイズスタンダードマーカーⅣ(0.28-6.58kb)

281、623、955、1,383、1,908、2,604、3,638、4,981、6,583bの9種類の*in vitro* 転写RNA産物です。グリオキサルまたはホルムアルデヒドアガロースゲル電気泳動でRNAサイズスタンダードとして使用することができます。エチジウムブロマイドで染色することによりバンドを確認できます。

形状：10mmol/l Tris-HCl(pH 8.0) 1mmol/l EDTA

添加量：3μl/レーン

〔貯法〕 - 80



コードNo.	品名	規格	容量	希望納入価格(円)
188-01831	RNA Size Standard Marker (0.28-6.58kb)	遺伝子研究用	50μl	21,000

#### 関連商品

コードNo.	品名	RNAサイズ	規格	容量	希望納入価格(円)
541-00741	RNA Size Standard Marker	100, 200, 300, 400, 500b	遺伝子研究用	25μg	14,500
542-00651	RNA Size Standard Marker	0.5k, 1k, 1.5k, 2k, 2.5k, 3k, 4k, 5k, 6k, 9kb	遺伝子研究用	50μg	24,000
545-01621	RNA Size Standard Marker (100b-1kb)	100, 200, 300, 400, 500, 750, 1,000b	遺伝子研究用	50μg	16,000
548-01731	Ribosomal RNA Marker( 16S+23S )	1,776, 3,566b	遺伝子研究用	2.5mg	14,000
545-01741	Ribosomal RNA Marker( 18S+28S )	2,000, 5,300b	遺伝子研究用	250μg	35,000

## 65 で完全不活化する

Wako

### アルカリホスファターゼ溶液, エビ由来

アルカリホスファターゼはDNAの5'末端を脱リン酸化しセルフライゲーションを防ぐために使用されますが、ウシ由来の酵素では脱リン酸化後の後処理が煩雑でした。本品は65 で15分間、加熱するだけで素早く簡単に活性を失活させることができます。

#### 特長

65 で不活化します

不活化後の手間な操作が必要ありません

コードNo.	品名	規格	容量	希望納入価格(円)
544-02291	Alkaline Phosphatase Solution, from Shrimp	遺伝子研究用	500U	9,700

## RNA i 関連試薬



### CUGA®7 *in vitro* siRNA Synthesis Kit

本キットでは、CUGA®7 RNAポリメラーゼを使用して、*in vitro* siRNA合成を行います。*in vitro* siRNA合成にはCUGA®7 RNAポリメラーゼの特長が最大限に機能します。

#### 特長

CUGA®7 RNAポリメラーゼによって、天然型RNAポリメラーゼよりも正確かつ大量の3'末端 2塩基突出 2本鎖siRNA合成が可能です。

化学合成よりも安価にsiRNAを作製することができます。操作は簡便で、1チューブ内で両鎖の転写反応を行います。siRNAは1日で合成することができます。

#### siRNA合成手順

鋳型合成DNA (sense, antisense) と、T7 プロモーター DNA オリゴのアニーリング

CUGA®7 RNA ポリメラーゼによるRNA合成

ヌクレアーゼによる鋳型DNAおよび不要なRNAの分解

精製

3'末端 2塩基突出 2本鎖siRNA

#### キット構成

ユーザーズマニュアル CUGA®7 Enzyme Solution  
 5× Transcription Reaction Buffer NTP mixture  
 2× Annealing Buffer T7 Promoter DNA Oligonucleotide  
 DNase Enzyme Solution RNase Enzyme Solution  
 Digestion Reaction Buffer Enzyme Dilution Buffer  
 Control GL3 siRNA Template H<sub>2</sub>O (RNase-Free)

コードNo.	品名	容量	希望納入価格(円)
301-14411	CUGA®7 <i>in vitro</i> siRNA Synthesis Kit	5反応用	42,000
307-14413		20反応用	95,000

## ニッポンジーン



### siRNAカスタム合成サービス

(株)ニッポンジーンでは最高品質のsiRNAをお届けするために、PAGE精製品をスタンダードとしています。

#### Set 1: 1本鎖siRNAセット

センス鎖、アンチセンス鎖のセットです。

合成スケール	保証量	精製
0.2 μmol	各30nmol	PAGE
1 μmol	各50nmol	PAGE

仕様: 19RNA + dTdT, 凍結乾燥品, 5 × annealing buffer + DEPC treated Water添付

納期: 2 ~ 3週間

#### Set 2: 2本鎖siRNA

アニーリング処理、濃度調整済み 2本鎖siRNAです。

合成スケール	保証量	精製
0.2 μmol	30nmol	PAGE
1 μmol	50nmol	PAGE

仕様: 19RNA + dTdT, 凍結乾燥品, 10nmol/tube

納期: 3 ~ 4週間 (Set 1 + 1週間)

#### オプション

多種の修飾が可能です!

5'標識 HEX/TET, 6-FAM, Cy3™, Cy5™, Phosphate

3'標識 Fluorescein, 6-FAM, TAMRA, Cy3™, Cy5™

その他 Fluorescein dT internal

#### 注文方法

専用依頼書に必要事項をご記入の上、当社または当社代理店の営業担当者にお渡し下さい。

専用依頼書は(株)ニッポンジーンホームページからダウンロードできます。

<http://www.nippongene.jp/>

#### 見積り方法

修飾など、Set 1、Set 2以外の仕様やオプションにつきましては、別途お見積りさせていただきますので、専用依頼書にてご依頼下さい。

本サービスは、siRNA合成 - 精製をEUROGENTEC社で行い、アニーリング処理などを(株)ニッポンジーンで行うものとなります。

品名	合成スケール	希望納入価格(円)
Set 1(1本鎖siRNAセット)	0.2 μmol	98,000
	1 μmol	118,000
Set 2 (2本鎖siRNA アニーリング・10nmol/tube分注済み)	0.2 μmol	128,000
	1 μmol	148,000
Screening Set 2( Set 2 × 3 )	0.2 μmol	282,000
Set 2 オプション(アニーリング後の脱塩処理)	-	5,000

## RNA i 関連試薬



### Control siRNA duplex シリーズ

#### 特 長

Control siRNA duplex シリーズは、文献<sup>1)2)3)</sup>にてRNAi (RNA interference) 効果が報告された配列を採用した2本鎖siRNAで、RNAi実験を行う際の陽性コントロールsiRNAとして使用することができます。

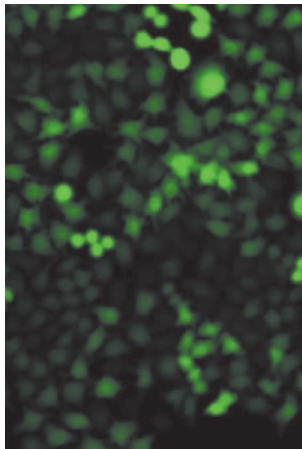
5nmolのsiRNAが凍結乾燥されています。

24ウェル培養細胞に対して60pmol導入実験<sup>3)</sup>を行った場合、約80回分に相当します。

#### 実験例 1

EGFPを発現している $1 \times 10^5$ 個のHeLa細胞に対して、Control siRNA duplex, Jellyfish GFP (final 100nmol/l)のリポフェクション法による導入実験を行った。

導入48時間後に蛍光顕微鏡で観察し、RNAi効果を確認した。



Control (H<sub>2</sub>O)



siRNA (100nmol/l)

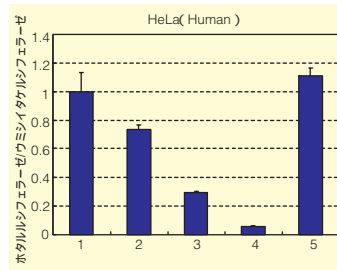
#### 〔結果〕

上記写真の様に、Control siRNA duplex, Jellyfish GFPの導入によって、EGFPの発現が抑制されていることが確認された。

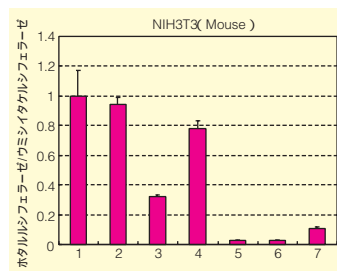
#### 実験例 2

$1 \times 10^5$ 個のHeLa細胞に対して、pGL3-control (1 μg) pRL-TK (0.1 μg)と同時にControl siRNA duplex, Firefly Luciferase GL3 (final 25nmol/l)、または同sense鎖 (final 25nmol/l) または同antisense鎖 (final 25nmol/l)、またはControl siRNA duplex, Jellyfish GFP (final 25nmol/l)をリポフェクション法で同時導入し、24時間後にLuciferase活性を測定してRNAi効果を確認した。

また、 $1 \times 10^5$ 個のNIH3T3細胞に対しても同様の実験を行い、Control siRNA duplex, Firefly Luciferase GL3についてはfinal 25nmol/l, 2.5nmol/l, 0.25nmol/lでの導入を行った。



- 1:negative control (H<sub>2</sub>O)
- 2:Firefly Luciferase GL3 sense 鎖 (final 25nmol/l)
- 3:Firefly Luciferase GL3 antisense 鎖 (final 25nmol/l)
- 4:Control siRNA duplex, Firefly Luciferase GL3 (final 25nmol/l)
- 5:Control siRNA duplex, Jellyfish GFP (final 25nmol/l)



- 1:negative control (H<sub>2</sub>O)
- 2:Firefly Luciferase GL3 sense 鎖 (final 25nmol/l)
- 3:Firefly Luciferase GL3 antisense 鎖 (final 25nmol/l)
- 4:Firefly Luciferase GL3 antisense 鎖 (final 2.5nmol/l)
- 5:Control siRNA duplex, Firefly Luciferase GL3 (final 2.5nmol/l)
- 6:Control siRNA duplex, Firefly Luciferase GL3 (final 0.25nmol/l)
- 7:Control siRNA duplex, Firefly Luciferase GL3 (final 0.25nmol/l)

#### 〔結果〕

siRNAは同配列のsense, antisenseの1/100濃度でも効果的にLuciferaseの発現を抑制していることから、siRNAは遺伝子発現抑制の効果的なツールであることが確認された。

また、Control siRNA duplex, Jellyfish GFPでは全く発現を抑制していないことから、RNAiには遺伝子特異的なsiRNAが必要であることも確認された。

#### 〔参考文献〕

- 1) Harborth, J. *et al.* *J. Cell Sci.*, 114, 4557 (2001)
- 2) Caplen, N.J. *et al.* *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 98, 9742 (2001)
- 3) Elbashir, S.M. *et al.* *Nature (London)* 411, 494 (2001)

\*本品はEUROGENETEC社で合成したsiRNAを原料に、ニッポンジーンで製品化をしています。

コードNo.	品 名	容 量	希望納入価格(円)
319-05841	Control siRNA duplex, Human -actin	5nmol	20,000
316-05851	Control siRNA duplex, Human NuMA	5nmol	20,000
313-05861	Control siRNA duplex, Human cdk1	5nmol	20,000
310-05871	Control siRNA duplex, Human Eg-5	5nmol	20,000
317-05881	Control siRNA duplex, Human Lamin A/C	5nmol	20,000
314-05891	Control siRNA duplex, Human Lamin B1	5nmol	20,000
317-05901	Control siRNA duplex, Human Vimentin	5nmol	20,000
314-05911	Control siRNA duplex, Jellyfish GFP	5nmol	20,000
311-05921	Control siRNA duplex, Firefly Luciferase GL2	5nmol	20,000
318-05931	Control siRNA duplex, Firefly Luciferase GL3	5nmol	20,000

## 遺伝子導入装置 「Nucleofector™」専用キットシリーズ マウス神経幹細胞、ラット神経幹細胞用キット

遺伝子導入システムNucleofector™は導入装置と細胞ごとに特化した専用試薬により高導入効率が得られ大好評をいただいています。今回、マウス用とラット用の2種類の神経幹細胞用キットが発売されました。本キットでの導入効率はマウス、ラットともに40%以上の効率が得られウイルス法を用いない簡便な導入法として神経幹細胞研究をバックアップします。



Nucleofector™ Device



Nucleofector™ Kit

### 特長

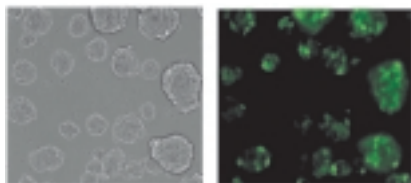
- 高い導入効率 (40~60%)
- 低い死細胞率
- 操作が簡単で再現性が高い

### キット構成

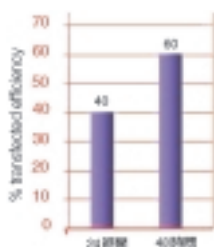
Nucleofector™ Solution	.....	2.25ml
Supplement	.....	0.5ml
キュベット	.....	25個
ピペット	.....	25本
マニュアル	.....	1冊

### 導入例

〔マウス神経幹細胞用キットでの導入例〕

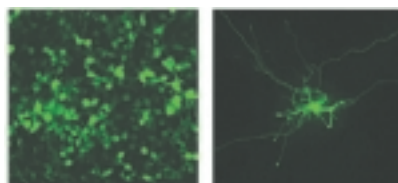


マウス胚から神経幹細胞を単離しプログラムA-33を使用しpEGFPを導入した。  
図左 導入後48時間経過時の顕微鏡像  
図右 導入後48時間経過時の蛍光顕微鏡像

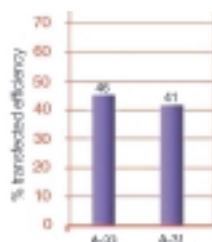


5 μgのpEGFPを導入後24時間、48時間経過時の導入効率  
細胞生存率は85-90%程度である

〔ラット神経幹細胞用キットでの導入例〕



ラット胚から神経幹細胞を単離しプログラムA-31を使用しpEGFPを導入した。  
図左 導入後2日経過時の蛍光顕微鏡像  
図右 導入後7日経過時の蛍光顕微鏡像



5 μgのpEGFPをA-30(高導入効率もしくは長期間発現させるためのプログラム)とA-31(分化能に最適なプログラム)により導入を行い48時間経過時の導入効率を測定

今回ご紹介したキットは神経幹細胞用キットになっています。海馬状神経細胞、皮質細胞、後根神経節に導入をお考えの方は下記 **Neuron Nucleofector™ Kit** をご使用下さい。

コードNo.	メーカーコード	品名	容量	希望納入価格(円)
<b>NEW</b> 572-72341	VPG-1004	Mouse Neural Stem Cell Nucleofector™ Kit	25回用	60,000
<b>NEW</b> 579-72351	VPG-1005	Rat Neural Stem Cell Nucleofector™ Kit	25回用	60,000
570-35521	VPG-1001	Mouse Neuron Nucleofector™ Kit	25回用	60,000
577-35531	VPG-1002	Chicken Neuron Nucleofector™ Kit	25回用	60,000
570-38681	VPG-1003	Rat Neuron Nucleofector™ Kit	25回用	60,000
507-98931	VPA-1001	Human B Cell Nucleofector™ Kit	25回用	60,000
504-98941	VPA-1002	Human T Cell Nucleofector™ Kit	25回用	60,000
501-98951	VPA-1003	Human CD34 Hematopoietic Progenitor Cell Nucleofector™ Kit	25回用	60,000
579-32671	VPA-1004	Human Dendritic Cell Nucleofector™ Kit	25回用	60,000
508-98961	VPB-1001	Human Coronary Artery Endothelial Cell Nucleofector™ Kit	25回用	60,000
505-98971	VPB-1002	Human Umbilical Vein Endothelial Cell Nucleofector™ Kit	25回用	60,000
573-35491	VPB-1003	Human Microvascular Endothelial Cell-Lung Nucleofector™ Kit	25回用	60,000
502-98981	VPC-1001	Human Aortic Smooth Muscle Cell Nucleofector™ Kit	25回用	60,000
509-98991	VPD-1001	Normal Human Dermal Fibroblast Nucleofector™ Kit	25回用	60,000
506-99001	VPD-1002	Normal Human Epidermal Keratinocyte-Neonatal Nucleofector™ Kit	25回用	60,000
503-99011	VPD-1003	Normal Human Epidermal Melanocyte-Neonatal Nucleofector™ Kit	25回用	60,000
576-35481	VPE-1001	Human Mesenchymal Stem Cell Nucleofector™ Kit	25回用	60,000
573-35511	VPF-1001	Human Chondrocyte Nucleofector™ Kit	25回用	60,000
574-70721	VPH-1001	Mouse ES Cell Nucleofector™ Kit	25回用	60,000
500-99021	VCA-1001	Nucleofector™ Kit R for Cell Line (e.g. for HeLa, NIH 3T3)	25回用	60,000
507-99031	VCA-1002	Nucleofector™ Kit T for Cell Line (e.g. for CHO, UT7/Epo)	25回用	60,000
504-99041	VCA-1003	Nucleofector™ Kit V for Cell Line (e.g. for 293, COS-7, K562, PC12, Jurkat, HepG2, HL60, HaCaT)	25回用	60,000
573-26341	VCO-1001	Cell Line Optimization Nucleofector™ Kit	50回用	140,000

### 導入装置

コードNo.	メーカーコード	品名	容量	希望納入価格(円)
500-98921	AAD-1001	Nucleofector™ Device	1台	2,500,000



## 岸本一郎 (1849 ~ 1878) と西川虎之助 (1854 ~ 1929)

大阪大学名誉教授 芝 哲夫

明治の世となり、近代国家の仲間入りを早急に果たさねばならなかった維新直後の日本では化学の分野でも多くの課題の解決が急がれた。その一つに貨幣制度の確立に伴う貨幣の製造があった。硬貨の鑄造は閉鎖された香港造幣局の技術者と設備、機械をそのまま移して、明治3年(1870)に創設された大阪の造幣寮において開始され軌道に乗った。

それに対して初期の紙幣の製造には印刷インキ、印肉などの化学製品の調製が必要とされた。この分野で貢献した明治初期の二人の日本人化学者、岸本一郎と西川虎之助について紹介する。

岸本一郎は嘉永2年(1849)6月10日に現在の兵庫県西宮市名塩で生れた。叔母が緒方洪庵夫人八重であったので、幼少の頃から大阪の緒方家に引き取られ、適塾生となって育った。慶応2年(1866)、17歳の時に、幕府派遣の英国留學生の選抜試験に合格して、同年10月に渡英し、ロンドンにおいて化学を専攻し勉強した。同じ年に松本銈太郎がオランダのコトレヒトに留学しているが(本誌 Vol.64, No.3, pp.2~4 (1996)参照)、この岸本と松本の渡欧がわが国の化学留學生の最初である。

2年間のロンドン留学中に、わが国では維新の変が起った。慶応4年(1868)岸本は留学を途中で打ち切り帰国した。帰国後、尼崎藩洋学教師を経て、明治2年(1869)大阪に開かれた舎密局(せいみきょく)に勤務した。舎密局では外国人化学専門教師としては最初に来日したオランダ人ハラタマK.W.Gratamaが教頭となって、当時最新の西欧理化学の教授が行われていた。松本もオランダから帰国して、舎密局に入り、助教を勤めていた。岸本は一等助手としてそのハラタマを助けて、化学の講義や実験を担当した。明治4年(1871)にハラタマが任期が切れて帰国した後の後任にはドイツ人リッテルH.Rittterが赴任したが、岸本は引き続き文部少助教として教鞭を取った。

大蔵省では明治4年(1871)に紙幣寮を設けて、紙幣の製造を試みたが、当初は国産の紙幣は作り得なかったため、ド



写真1. 岸本一郎

イツに製造を依頼してそれに偽造防止のために印を押して国内で通用することになっていた。その押印に必要な印肉の製造のために、明治5年(1872)に紙幣寮にアメリカ人アンチセルT.Antisellを雇い入れて、その任に当らせた。明治7年(1874)にこの紙幣寮内に舎密局すなわち化学局が新設された時、岸本一郎が呼ばれて、同局長、さらには試験部総長に任ぜられて、アンチセルの技術の継承がはかられた。当時日本国中に外国へ留学して化学専攻の勉強をした化学技術者は他にいなかったためである。

この紙幣寮舎密局において、アンチセルと岸本のコンビによって、「安全秘訣薬」と称する特殊な印肉製法の案出に成功した。また岸本はこの紙幣寮の学場すなわち教習所において化学技術者の育成指導も開始した。

岸本一郎にその技術を伝授し終わったアンチセルは明治9年(1876)に任を終えて帰国した。その後を受けて岸本はその頃、大蔵省印刷局となっていた印肉製造部門の責任者となり、わが国の化学技術の先覚者としての道を歩み始めた。ところが遺憾なことに、明治11年(1878)に岸本は肺結核に罹り、同年3月7日に満28歳の短い生涯を閉じた。岸本一郎は緒方洪庵の眠る東京駒込の高林寺に葬られ、そこには大蔵省印刷局による墓碑が建てられた(写真2)。

大蔵省印刷局の当事者は貴重な専門技術者を失って、事業の遂行に当惑したこ



写真3. 西川虎之助



写真2. 岸本一郎墓 東京駒込高林寺

と思う。明治初年のその頃、日本中を探してもそれに代わる化学者はいない。東京大学に理学部が創設されて、その前の開成学校に入っていた化学科の最初の卒業生3名が出たのが明治10年(1877)のことであるから、当時の日本の化学者の総数は十指にも満たないという状況であった。

その時、ロンドンに留学していた日本人化学者がまだ英国に在るとの情報印刷局に入ってきたことと思われる。岸本一郎の後任として、急遽英国から呼び寄せられたのが西川虎之助(にしがわとのすけ)であった。

西川虎之助は嘉永7年(1854)2月22日に浅野藩士西川理三郎の長男として広島に生まれ、明治2年(1869)15歳の時に広島藩外国留学生に選ばれて英国に渡り、応用化学を専攻した。明治5年(1872)に明治政府は新文教政策を実施するために海外に留学していた日本人全員に一旦帰国を命じた時にも、西川は英国に留まって、明治7年(1874)にウィンター嬢 K.W.Winter と結婚した(写真4)。

これはあるいは日本人留学生の国際結婚第1号であったかもしれない。新婦は虎之助より4歳年上の姉さん女房であった。夫人の実家のウィンター家は伯爵家

で、その経済的庇護を受けて西川はおそらく応用化学者として英国に骨を埋める積りであったと思われる。それは後のことになるが、唯一の息子を少年時に日本から英国へ帰らせて帰化させたことからもうかがえる。ところが明治12年(1879)に岸本一郎の後継者として大蔵省から印刷局製肉部技師に呼び戻され、西川は夫人を伴って帰国した。

西川は印刷局において帰国翌年の明治13年(1880)に早くもルブラン法によるソーダ類および晒粉の製造法を開発し、ついで芒硝、塩酸、黒灰、ソーダ灰、次亜硫酸ソーダの製造を行っている。その他壁紙などの用紙を漆加工する新事業を展開している。明治19年(1886)になって、王子村に新設された印刷局抄紙部において、西川は日本最初のグラウパー塔、ゲーリュサック塔による鉛室硫酸製造法を完成させ、印刷局における最大課題であった原料硫酸製造の最新技術導入を成功に導いた。

その後西川は明治政府の殖産事業の民間移譲の方針に基づいて印刷局を去り、明治22年(1889)に東京青山で製氷所を創設してわが国最初の製氷事業を立ち上げた。明治25年(1892)には大阪西成郡川北村字西野の大阪硫曹株式会社の技師

長兼工務支配人として赴任し(写真5)その工場設計から、硫酸、ソーダの製造実施に自らたずさわった。また英国式塊鉱炉やマレトラ式粉鉱炉もわが国ではじめて建設している。明治34年(1901)に、博士会の推薦によって工学博士の学位を得た。その後、大阪アルカリにも勤め、明治43年(1910)には日産化学の前身である大日本人造肥料の取締役に就任している。このように西川虎之助は日本の近代化学工業出発に際しての基幹であった酸、アルカリ工業および肥料工業の基礎確立に貢献した開拓者としてその名はわが国の化学工業界で忘れられるべきではないと思う。

西川虎之助の人柄はきわめて謙譲で、自己宣伝を嫌い、またあまり社交を好まない学者風の風格があったという。夫人との間に1男4女をもうけて、家庭ではすべて英国風で家族との会話も英語であった(写真6)。昭和4年(1929)1月22日に東京で亡くなり、青山墓地に葬られた。享年74歳であった。

平成10年(1998)に、京都大学超高層電波研究センターの客員研究員として来日中のベルリン自由大学教授ラビツケ K.Labitzke 女史が人を介して、筆者に会見を求められ、ラビツケ女史の曾祖父



写真4. 英国での新婚当時の西川虎之助とケイテイ夫人



写真5. 明治38年頃の大阪硫曹正門前の写真  
前列左から4人目が西川虎之助



写真6 . 西川虎之助とその家族  
 前列右より虎之助、長男正心、三女愛喜代、  
 四女憲、ケイテイ夫人  
 後列右より二女朝子、長女清子

Toranosuke Nisigawaのことを知りたいとの申し入れを受けた。虎之助の三女愛喜代(アキヨ)がドイツ人ペール E.Behr氏と結婚し、その長男アルフレッド・マサヨシ・ペール氏がドイツ人と結婚して生まれたのがラビツケ女史とわかった。その縁でさらに豊中市在住の虎之助の弟の孫、佐貫美洋子様を探し出し得て、虎之助の家族の情報、写真を見出すことができた。

#### 【参考文献】

- 岸本一郎：  
 「岸本一郎氏の事蹟」大蔵省印刷局，昭和39年。  
 名塩会編：『名塩史』西宮市，平成2年。  
 緒方銈次郎：「舎密局に就いてのかずかず」関西医事，第11巻，昭和14年。  
 芝 哲夫：「舎密局について」生産と技術，1964年。
- 西川虎之助：  
 中沢岩太：「我邦ニ於ケル硫酸及曹達製造ニ就テ」東京化学会誌，13，24(1892)  
 松井元太郎：『化学工業全書』第二十刷，p.5，124(1925)  
 日産化学工業株式会社：『八十年史』pp.47～51，昭和44年。  
 鎌谷親善：『日本近代化学工業の成立』pp.136，148，197～199，206，209(1989)  
 芝 哲夫：「明治の化学者の国際結婚 西川虎之助」近畿化学工業界，50(8)1(1998)

# ダイオキシン類分析用 プレセップ® 多層シリカゲル



**わずらわしい充てんが不要に!!**

排ガス、土壌中のダイオキシン類を分析する際、試料のクリーンアップに多層シリカゲルカラムクロマトグラフィーが用いられます。本品は、JIS K 0311(排ガス中のダイオキシン類及びコプラナーPCBの測定方法)およびJIS K 0312(工業用水・工場排水中のダイオキシン類及びコプラナーPCBの測定方法)に記載されている「多層シリカゲルカラム」に準拠した製品です。

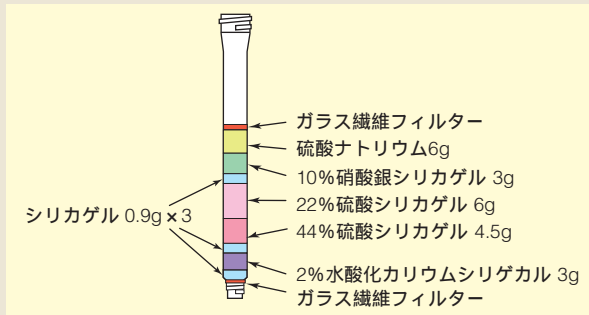


## 特長

- JIS K 0311、JIS K 0312に準じた設計
- 充てんの手間を簡略化
- 個別アルミパック包装を採用
- 必要な個数だけ使用可能

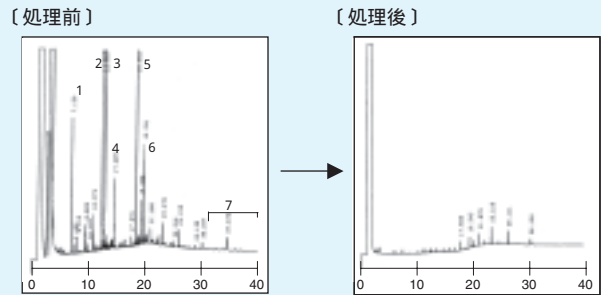
## カラムの組成

カラムクロマトグラフ管：ガラス製 内径 15mm



## 使用例

<プレセップ® 多層シリカゲルを用いた土壌試料のクリーンアップ>



1. 2,4,6-Trichlorophenol 2. Propylzamide 3. Anthracene 4. N,N-Bis(1-methylethyl)benzamide 5. Lenacil 6. Bis(2-ethylhexyl)phthalate 7. Terpenes

## 【操作方法】

- 100mlのダイオキシン類分析用ヘキサンを本品に通液し、コンディショニングを行う。
- アントラセン20μg、トリクロロフェノール10μgを添加した土壌抽出試料1mlをカラム層上部にチャージする。
- ダイオキシン類分析用ヘキサン200mlを通液し、クリーンアップを行う。
- 処理液を濃縮し、FID-GC法で測定する。

ご使用の際は、本品をダイオキシン類分析用ヘキサンなどの溶媒で十分洗浄を行って下さい。

## カラム接続部品



**プレセップ® コックアダプター**  
 カラムクロマトグラフ管下部にとりつけます。  
 試料溶出液の流速を調整します。



**プレセップ® カラムアダプター**  
 カラムクロマトグラフ管上部にとりつけます。  
 共通すり合わせ(TS15/25)つき分析ろうとが取り付け可能です。

コードNo.	品名	規格	容量	希望納入価格(円)
295-41651	Presep® Multilayer Silica Gel	ダイオキシン類分析用	5本	18,000
299-42151	Presep® Cock Adapter		1個	15,000
295-42251	Presep® Column Adapter		1個	4,000

## 関連商品

### プレセップ® 活性炭埋蔵シリカゲル、プレセップ® 活性炭混合シリカゲル

ご好評いただいております活性炭埋蔵シリカゲルと活性炭混合シリカゲルを、使いやすいガラス製カラムに充てんしました。本品は、高分解能GC-MS法で適合性試験を行い、ブランクを保証しておりますので安心してダイオキシン類のクリーンアップにご使用になれます。

コードNo.	品名	規格	容量	希望納入価格(円)
299-41551	Presep® Active Carbon-blended Silica Gel	ダイオキシン類分析用	10個	22,000
293-41451	Presep® Active Carbon-impregnated Silica Gel	ダイオキシン類分析用	10個	28,000
291-41751	Presep® Cylinder Adapter(PTFE製)		5個	13,000
297-41753			20個	45,000
635-04191	テフロン製ルアーストップコック		10個	19,200

記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。

記載価格は希望納入価格であり消費税などは含まれておりません。

和光純薬時報 Vol.71 No.3  
 2003年7月15日発行  
 発行責任者 金澤廣継  
 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 デジタル総合印刷株式会社

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)