



### 〔総説〕

「アリル位アリール化反応を超高効率で触媒するパラジウム NNC –ピンサー錯体」

浜坂 剛…………… 2

#### 〈テクニカルレポート〉

「Wakopak® Ultra APDS TAG® を用いたアミノ酸含有飲料中のアミノ酸類の定量」

須藤 勇紀…………… 6

### 〔連載〕

#### 〈神経変性疾患研究の最前線〉

「第3回 アルツハイマー病 (3) アミロイドβ」

堀 由起子、富田 泰輔…………… 8

#### 〈なるほど!! ELISA –基礎とコツー〉

「第3回 ELISA の操作法とそのポイント (中編)」

株式会社シバヤギ編…………… 12

#### 〈The Gateway to qNMR ~定量 NMR への扉~〉

「第2話 qNMR で正確な測定をするために」

三浦 亨…………… 14

### 〔化学大家〕

「アーネスト・ラザフォード」

山崎 昶…………… 28

### 〔製品紹介〕

#### 有機合成

カップリング反应用触媒 「DPP-NNC Pd」…………… 5

カーボネート溶媒…………… 18

硫酸化ジルコニア…………… 18

酸性有機溶媒…………… 19

#### 環境・分析

ワコーパック® ウルトラ APDS タグ®…………… 7

定量 NMR 用内標準物質…………… 17

アドバンテーム標準品…………… 19

ポジティブリスト関連標準品…………… 20

#### 細胞生物

ロイコマラカイトグリーン反应用試薬…………… 20

OX<sub>2</sub>Rアゴニスト「YNT-185・2HCl」…………… 25

#### 免疫

抗アミロイドβ抗体…………… 11

SmartEnzymes™ Genovis AB…………… 21

オレキシンA ELISAキットワコー…………… 24

抗ポドプラニン抗体…………… 26

#### 培養

神経細胞用分散液…………… 22

サイトカイン…………… 23

StemSure® hPSC リムーバー【rBC2LCN-PE38】…………… 32

#### 病理

キシレン代替品「パソクリーン™」…………… 26

#### 機器

MPR エンドトキシン測定システム for BT…………… 23

#### 〈ScreenFect™ 通信〉

「HeLa 細胞への siRNA 導入データ」…………… 27

### 〔お知らせ〕

qNMR Summit 2018 in Tokyo 開催のご案内…………… 16

第33回 Wako ワークショップ開催のご案内…………… 25

### 1 はじめに

遷移金属を用いた触媒的有機分子変換工程は、様々な有用化合物を合成するための強力な手法である。特に、パラジウム触媒を用いた炭素-炭素結合形成反応は、実験室スケールから化学工業プロセスに至るまで広範に用いられている<sup>1)</sup>。一方でこれらの反応では、標的分子を高収率で得るためにはパーセントオーダーのパラジウムが一般に必要とされている。そのため、しばしば生成物中へのパラジウムの混入が問題となる。特に、医薬品や機能性有機材料等を合成する場合、製品中への遷移金属類の混入が制限されているため、その除去には大きなコストがかかる (ICH-Q3D ガイドライン<sup>2)</sup> に従えば、例えば経口薬でのパラジウムの許容混入量の上限は 10 ppm である)。また、クラーク数が低いため資源枯渇の可能性のある等の問題もある。これらの問題を解決しうる一つの方法として、ppm オーダー以下で機能する超高効率触媒の開発が注目されている<sup>3)</sup>。

高効率錯体触媒の一つとして、ピンサー錯体がある<sup>4)</sup>。溝呂木-ヘック反応や鈴木-宮浦反応をモデル反応とし、その触媒活性が評価されている。図 1 には溝呂木-ヘック反応を効果的に触媒する代表的なピンサー錯体触媒を示す<sup>5)</sup>。我々も高効率錯体触媒開発に興味を持ち、ピンサー錯体触媒の研究を進める中で、1,10-フェナンスロリン骨格を有するパラジウム NNC-ピンサー錯体 (図 2: DPP-NNC Pd) が、酢酸アリル誘導体と有機ホウ素化合物によるアリル位アリール化反応を極めて高い効率で触媒することを見出した<sup>6)</sup>。なお、DPP-NNC Pd は 2013 年、東京大学理学研究科の塩谷先生らによってその合成が報告され<sup>7)</sup>、X 線結晶構造解析等によりその構造は明らかとされているものの、その触媒機能については未検討であった。本稿で

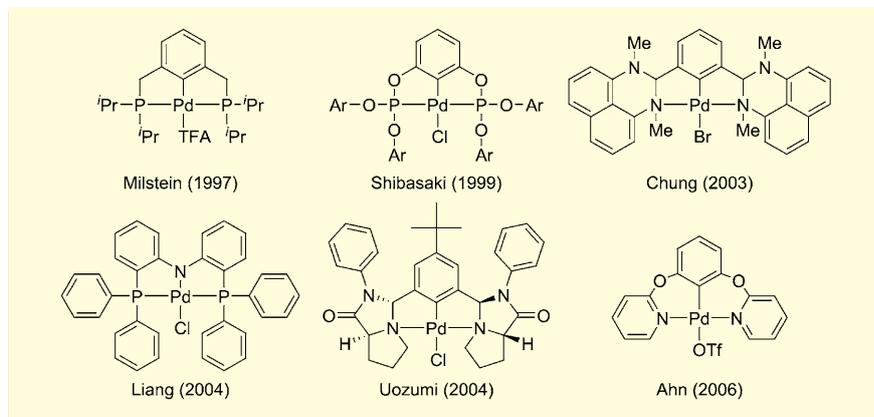


図 1. 代表的なパラジウムピンサー錯体

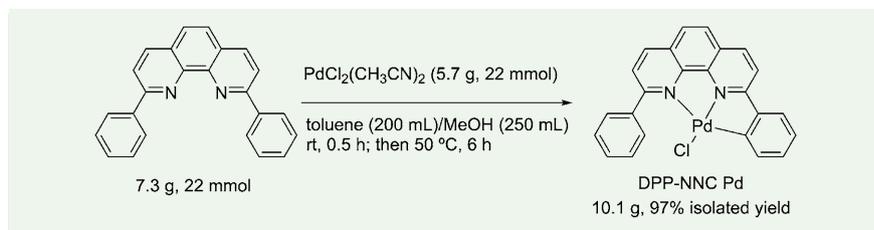


図 2. DPP-NNC Pd の合成

は、DPP-NNC Pd を触媒として用いた高効率アリル位アリール化反応について紹介する。

### 2 DPP-NNC Pd の合成

触媒機能検討を始めるに当たり、DPP-NNC Pd の大量合成を行うこととした。塩谷先生らの合成法に改良を加え、DPP-NNC Pd の 10 g スケールでの合成に成功した (図 2)。すなわち、2,9-ジフェニル-1,10-フェナンスロリンとジクロロビス (アセトニトリル) パラジウムをトルエン-メタノール混合溶媒中で室温にて 30 分間攪拌後、50 °C に昇温しさらに 6 時間攪拌後、ろ過することで標的錯体が 10.05 g、97% 収率で得られる。本錯体は空気下で安定であり、その取り扱いが容易である。

### 3 アリル位アリール化反応: 錯体触媒ならびに溶媒検討

アリル酢酸エステルと有機ホウ素化合物によるアリル位アリール化反応

は、触媒の炭素-炭素結合形成反応の一つである<sup>8)</sup>。本反応では、一般に、標的生成物を得るためには 1 mol% 以上の触媒量が必要とされており、ppm オーダー以下の触媒量で本反応を実現している例は限られている<sup>9)</sup>。我々は DPP-NNC Pd がアリル位アリール化反応を ppm オーダー以下の触媒量で効果的に進行させることを見出している。本節では、DPP-NNC Pd を触媒として用いたアリル位アリール化反応の条件検討について述べる。

DPP-NNC Pd を 0.1 mol% 量用い、酢酸シンナミル (**1a**) とテトラフェニルホウ酸ナトリウム (**2a**) の反応をメタノール中 50 °C にて実施したところ、反応は 1 時間以内に完結し、標的生成物 **3aa** が 91% の単離収率で得られた (表 1, entry 1)。この結果を受け、本触媒系では触媒量の更なる低減が可能であると考え、触媒量を 1 mol ppm (0.0001 mol%) まで減らし、反応を試みた。0.1 mol% の触媒量にて行った反応条件と同様に、メタノール中 50 °C にて反応を実施したところ、

表1. 酢酸シンナミルとテトラフェニルホウ酸ナトリウムとの反応

entry	catalyst	solvent	time, h	yield, %
1	DPP-NNC Pd (0.1 mol%)	MeOH	1	91
2	DPP-NNC Pd (1 mol ppm)	MeOH	24	87
3	none	MeOH	24	nr
4	DPP-NNC Pd (1 mol ppm)	THF	24	76
5	DPP-NNC Pd (1 mol ppm)	H <sub>2</sub> O	24	69
6	DPP-NNC Pd (1 mol ppm)	DMF	24	nr
7	DPP-NNC Pd (1 mol ppm)	1,1,2,2-TCE	24	1
8	DPP-NNC Pd (1 mol ppm)	toluene	24	nr
9	4 (1 mol ppm)	MeOH	24	16
10	5 (1 mol ppm)	MeOH	24	45
11	6 (1 mol ppm)	MeOH	24	56

反応開始 24 時間後には原料は完全に消費され、**3aa** が 87% の単離収率で得られた (entry 2)。なお、本反応は出発原料の酢酸アリルを 10 mmol 用いて行っており、比較的大きなスケールでも本触媒システムが問題なく機能することを示している。また、無触媒下では反応は進行しない (entry 3)。溶媒検討したところ、THF あるいは水中では 7 割程度反応が進行することを確認した (entries 4 and 5)。DMF、テトラクロロエタン、トルエン中では反応は進行しなかった (entries 6-9)。メタノールが本反応において最も適した溶媒であると言える。

さらに触媒量の低減を試みたところ、

1 mol ppb (0.0000001 mol%) の触媒量でも反応が進行した (図 3)。反応時間 24 時間では収率が 27% であり、触媒回転数 (TON) は 270,000,000 回、触媒回転頻度 (TOF) は 11,250,000 h<sup>-1</sup> であった。さらに反応時間を 96 時間まで延ばしたところ、収率は 50% となり、TON は 500,000,000 回に達した。この触媒回転数は我々が知る限りにおいて、アリル位アリール化反応の世界最高記録である。

DPP-NNC Pd と同様に 1,10-フェナンスロリン骨格を有する錯体について、その触媒活性を検討した。1,10-フェナンスロリン、2-フェニル-1,10-フェナンスロリン、そして 2,9-ジ

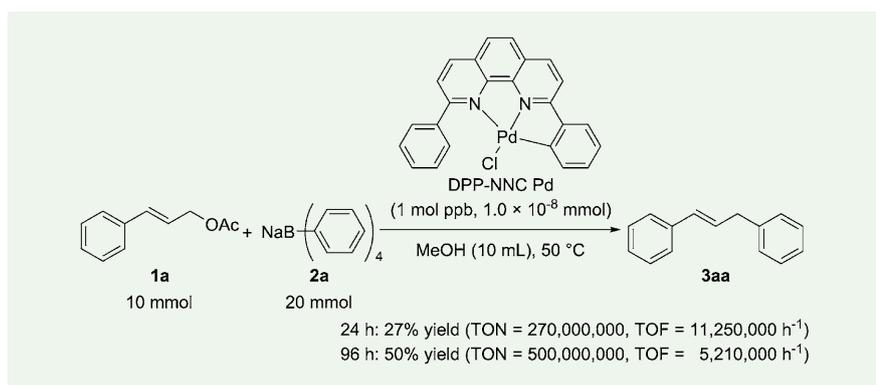


図3. 1 mol ppb の DPP-NNC Pd を用いたアリル位アリール化反応

メチル-1,10-フェナンスロリンを配位子とした錯体 (**4-6**) を用いて反応を実施したところ、それぞれ、16% (TON = 160,000)、45% (TON = 450,000)、そして 56% (TON = 560,000) の収率で標的化合物が得られた。立体障害が触媒活性に影響していると考えられる。一方、同様の反応条件下で DPP-NNC Pd を触媒として用いた場合の TON は 270,000,000 回に達しており、錯体 **4-6** を触媒として用いた場合と比較してその値は 3 桁大きく、ピンサー構造をとることでより高い活性を示すことが示唆された。

#### 4 アリル位アリール化反応: 基質一般性

本触媒システムを用いた基質一般性について検討した (図 4)。反応は酢酸アリル誘導体 (**1**) を 10 mmol、テトラアリールホウ酸ナトリウム (**2**) を 20 mmol のスケールにて、1 mol ppm の DPP-NNC Pd を触媒として用い、メタノール中 50 °C にて実施した。電子供与性基 (MeO、Me、<sup>t</sup>Bu、Ph) および電子吸引性基 (CF<sub>3</sub>、NO<sub>2</sub>、C(O)Me、COOMe) を有する酢酸シンナミル誘導体とテトラフェニルホウ酸ナトリウムの反応が進行し、目的のアリール化生成物 (**3ba-3ia**) が 77-95% 単離収率で得られた。ナフチル基を有する酢酸アリル誘導体 (**1j**) および立体的に嵩高い 2-メチル基および 2-メトキシ基置換酢酸シンナミル (**1k** および **1l**) の反応も DPP-NNC Pd は効果的に触媒した。酢酸シンナミル (**1a**) とテトラアリールホウ酸ナトリウム (**2b-d**) との反応も 1 mol ppm の触媒量で効率的に進行し、アリール化生成物 **4ab-ad** を 59-84% の収率で与えた。反応性が乏しい脂肪族置換酢酸アリル誘導体 (**1m-q**) についても検討を加えた。直鎖脂肪族アルキル (**1m**)、分岐状脂肪族アルキル (**1n**)、環状脂肪族アルキル (**1o**) 置換酢酸アリルとテトラフェニルホウ酸ナトリ

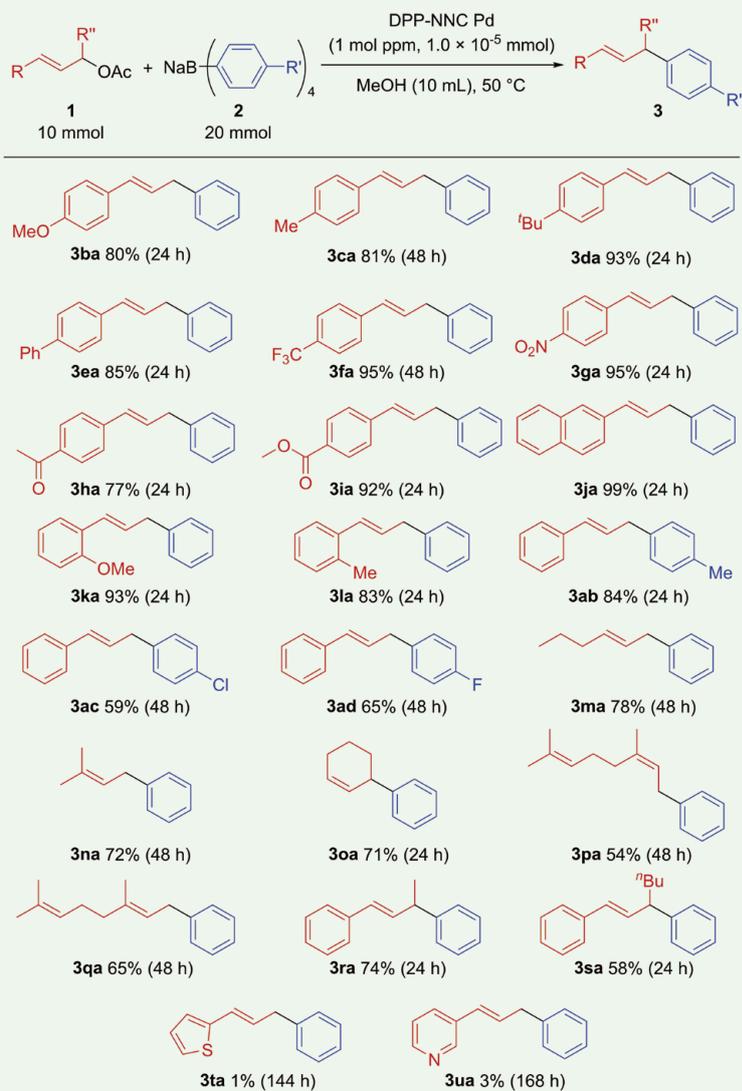


図4. 種々の置換基を持つ酢酸アリル誘導体とテトラアリールホウ酸ナトリウムとの反応

ウム (2a) の反応が進行し、対応するアリール化生成物 (3ma-ou) が 71-78% 収率で得られた。酢酸ネリル (1p) および酢酸ゲラニル (1q) も同様に反応が効果的に進行することを確認した。また、DPP-NNC Pd は 2 級酢酸アリル誘導体 (1r および 1s) と 2a の反応も効果的に触媒した。以上のように、本触媒系は広い範囲の基質一般性を示した。一方、残念ながら、同様の反応条件下では、ピリジンやチオフェンを持つ酢酸アリル誘導体を基質として用いた場合では反応がほとんど進行しなかった。

## 5 予備的反應機構検討

DPP-NNC Pd を用いたアリール化反応の反応機構に関する知見を得るためにいくつかの検討を行った。初めに、分岐酢酸アリル誘導体 (7) とテトラフェニルホウ酸ナトリウム (2a) の反応を、DPP-NNC Pd (1 mol ppm) 存在下、実施したところ、酢酸シンナミル (1a) を基質として用いた場合と同じ生成物が得られた (図 5a)。この結果は、反応中、 $\pi$ アリールパラジウム中間体が生成すること

を示唆している。続いて、DPP-NNC Pd とテトラフェニルホウ酸ナトリウム (2a) の等量反応を行ったところ、フェニル化した錯体 (8) がほぼ定量的に得られた (図 5b)。一方で、DPP-NNC Pd と酢酸シンナミルの等量反応を行った場合、反応は進行しなかった (図 5c)。得られた錯体 8 と酢酸シンナミルを反応させたところ、化合物 3aa が得られた (図 5d)。また、錯体 8 を触媒として用い、酢酸シンナミル (1a) とテトラフェニルホウ酸ナトリウム (2a) との反応を実施したところ、反応は良好に進行し、3aa が 93% 単離収率で得られた (図 5e)。以上の結果より、錯体 8 が本アリール化反応における中間体であることが推定される。

## 6 おわりに

我々は、ppb から ppm 量の DPP-NNC Pd が、穏和な反応条件下、種々の酢酸アリル誘導体とテトラフェニルホウ酸ナトリウムとのアリール化反応を極めて高い効率で触媒し、対応するアリール化生成物を高収率で与えることを見出した。TON は最大で 500,000,000 回に達する。本研究により、DPP-NNC Pd がアリール化反応を極めて高い効率で触媒することを示した。

我々は DPP-NNC Pd が他の触媒反応へも同様に高い効率を示すものと期待している。現在、本錯体を他の触媒反応へと適用し、ppm あるいは ppb オーダーの触媒量で種々の反応を効率的に進行させることを目指し、研究を展開しているところである。

## 7 謝辞

本研究は自然科学研究機構分子科学研究所 錯体触媒研究部門 魚住研究室にて行われました。研究室主宰者である魚住泰広教授には、本研究全体を通

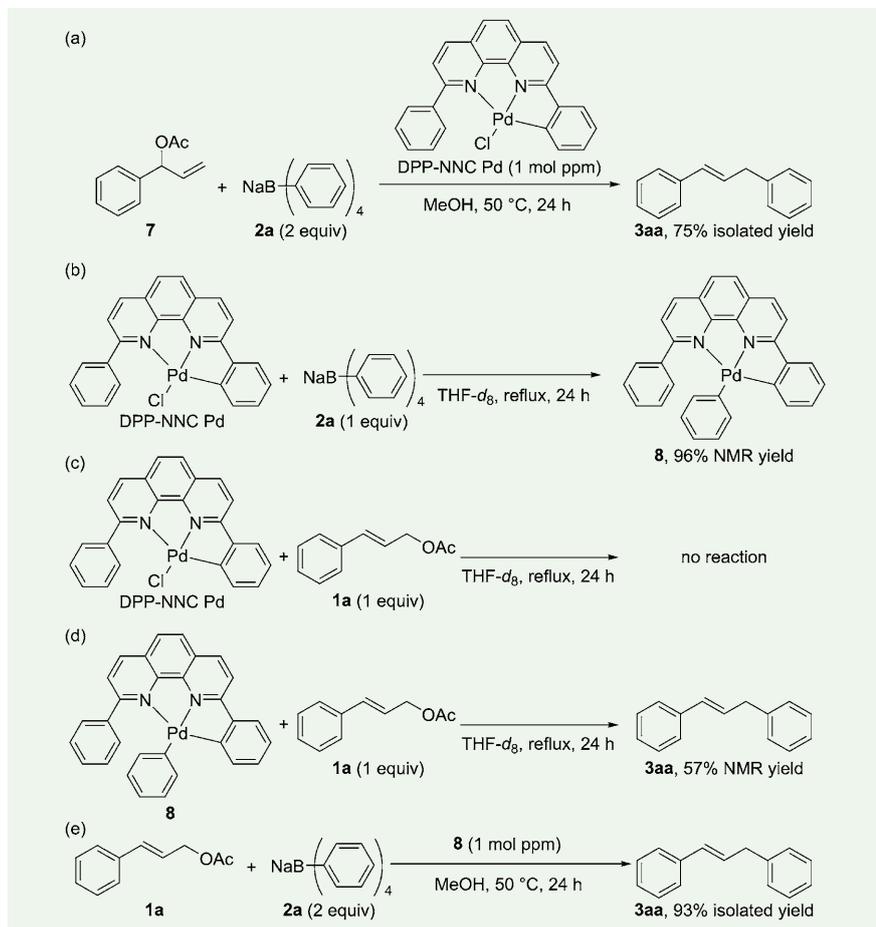


図5. 反応機構検討

してご指導いただきました。深謝いたします。また、実験を実施した、櫻井扶美恵博士に感謝いたします。

#### 【参考文献】

- 1) (a) Torborg, C. and Beller, M. : *Adv. Synth. Catal.*, **351**, 3027-3043 (2009). (b) Magano, J.

and Dunetz, J. R. : *Chem. Rev.*, **111**, 2177-2250 (2011).

- 2) ICH Q3D は以下の web ページからダウンロード可能である。 : <http://www.ich.org/products/guidelines/quality/article/quality-guidelines.html>

- 3) (a) Farina, V. : *Adv. Synth. Catal.*, **346**, 1553-1582 (2004). (b) Deraedt, C. and Astruc, D. :

*Acc. Chem. Res.*, **47**, 494-503 (2014).

- 4) 最近の総説 : Selander, N. and Szabó, K. J. : *Chem. Rev.*, **111**, 2048-2076 (2011).  
 5) (a) Ohff, M., Ohff, A., van der Boom, M. E. and Milstein, D. : *J. Am. Chem. Soc.*, **119**, 11687-11688 (1997). (b) Miyazaki, F., Yamaguchi, K. and Shibasaki, M. : *Tetrahedron Lett.*, **40**, 7379-7383 (1999). (c) Jung, I. G., Son, S. U., Park, K. H., Chung, K.-C., Lee, J. W. and Chung, Y. K. : *Organometallics*, **22**, 4715-4720 (2003). (d) Huang, M.-H. and Liang, L.-C. : *Organometallics*, **23**, 2813-2816 (2004). (e) Takenaka, K. and Uozumi, Y. : *Adv. Synth. Catal.*, **346**, 1693-1696 (2004). (f) Yoon, M. S., Ryu, D., Kim, J. and Ahn, K. H. : *Organometallics*, **25**, 2409-2411 (2006).  
 6) Hamasaka, G., Sakurai, F. and Uozumi, Y. : *Chem. Commun.*, **51**, 3886-3888 (2015).  
 7) Kuritani, M., Tashiro, S. and Shionoya, M. : *Chem.—Asian J.*, **8**, 1368-1371 (2013).  
 8) Pigge, F. C. : *Synthesis*, 1745-1762 (2010).  
 9) (a) Sarkar, S. M., Uozumi, Y. and Yamada, Y. M. A. : *Angew. Chem. Int. Ed.*, **50**, 9437-9441 (2011). (b) Yamada, Y. M. A., Sarkar, S. M. and Uozumi, Y. : *J. Am. Chem. Soc.*, **134**, 3190-3198 (2012).



#### 触媒回転数

触媒性能の指標の一つで、触媒回転数 = 生成物のモル数 / 触媒のモル数と定義される。その数が多いほど高効率な触媒であると言える。

#### ピンサー錯体

金属を橋頭位に有する 2 環性メトラサイクルである。配位子は、一般に、1 つのアニオン性配位部位 (例えば C) と 2 つの中性配位部位 (例えば N、P、S) を有する。触媒としての利用のみならず、機能性有機金属化合物としての応用も試みられている。

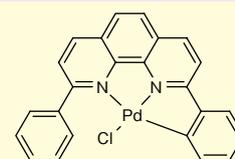
## 超高活性 カップリング反应用パラジウム触媒

### DPP-NNC Pd

本品は、ppm オーダーの触媒使用量で反応が進行する高活性なカップリング反应用のパラジウム触媒です。

#### 【参考文献】

- 1) Hamasaka, G., Sakurai, F. and Uozumi, Y. : *Chem. Commun.*, **51**, 3886 (2015).



C<sub>24</sub>H<sub>15</sub>ClN<sub>2</sub>Pd = 473.26  
CAS No. 1499115-56-8

コード No.	品名	規格	容量	希望納入価格(円)
044-34351	Diphenyl Phenanthroline NNC Palladium 【DPP-NNC Pd】	有機合成用	100mg	10,000
040-34353			500mg	30,000

☐…2~10℃保存 ☐…20℃保存 ☐…80℃保存 ☐…150℃保存 表示がない場合は室温保存です。その他の略号は、巻末をご参照下さい。  
掲載内容は、2017年10月時点での情報です。最新情報は、siyaku.com (<http://www.siyaku.com/>) をご参照下さい。

## Wakopak® Ultra APDS TAG® を用いたアミノ酸含有飲料中のアミノ酸類の定量

和光純薬工業株式会社 試薬化成品研究所 須藤 勇紀

### 1. はじめに

アミノ酸は1806年にアスパラガスの汁からアスパラギンが単離、発見されて以来、栄養素としての利用、呈味成分としての利用、生理作用の利用、反応性の利用の4つに大別される機能で私たちの生活の中で欠かせない存在となっています<sup>1)</sup>。また、動物が体内で合成できないアミノ酸はその動物の必須アミノ酸であり、食品栄養素として重要です。

日本では1991年に特定保健用食品制度、2002年に保健機能食品制度、2015年に機能性表示食品制度が実施されており、国民のセルフメディケーションの実践が期待されています<sup>2,3)</sup>。また、機能性表示食品制度は届出制度であるために新規企業が参入しやすく、特定保健用食品が2017年3月で1,127品目に対し、機能性表示食品は2017年3月で既に815品目であり、急激に増加していることで、食品市場の拡大が期待されています<sup>4)</sup>。アミノ酸の栄養素としての機能は既に広く認知されており、飲料、ドリンク剤、ゼリーなど幅広い形態でアミノ酸を含む食品が市場に存在していることから<sup>1)</sup>、これからも多くのアミノ酸を含む新商品が生まれると考えられます。

### 2. 3-アミノピリジル-N-ヒドロキシスクシンイミジルカルバメート (APDS) による誘導体化

HPLCにおけるアミノ酸分析の誘導体化手法は古くから存在し、ニンヒドリンをはじめo-フタルアルデヒドなど数多くの誘導体化試薬が存在します。今回、ご紹介するAPDSによるアミノ酸の誘導体化法は、疎水性が高まり、また、イオン化効率が上がるため逆相LC/MS (/MS) に有利な手法です<sup>5,6)</sup>。

本法は味の素株式会社の「アミノインデックス® がんりスクスクリーニング」(AICS) の中で利用されており<sup>7)</sup>、食品分析においてもアミノ酸分析専用装置であるUF-Amino Station を用いた分析例<sup>8)</sup>があります。

Wakopak® Ultra APDS TAG® は

汎用のLC/MS/MS装置を用いたAPDS-アミノ酸誘導体の分離分析が可能となる専用分析カラムです。今回、本カラムを用いて市販のアミノ酸含有飲料中のアミノ酸類を分析しましたのでご紹介します。

### 3. 実験方法及び結果

試料前処理及び誘導体化のフローを図1、LC/MS/MS条件を表1に示します。定量は内部標準法にて行いました。今回対象にした飲料中にはアミノ酸類がグリシン(Gly)、アラニン(Ala)、バリン(Val)、ロイシン(Leu)、イソロイシン(Ile)、アルギニン(Arg)の6成分を含むと記載されていましたが、表1中のNo.13~20のアミノ酸類は市販飲料中には含まれておりません。分析した市販飲料中の6成分の

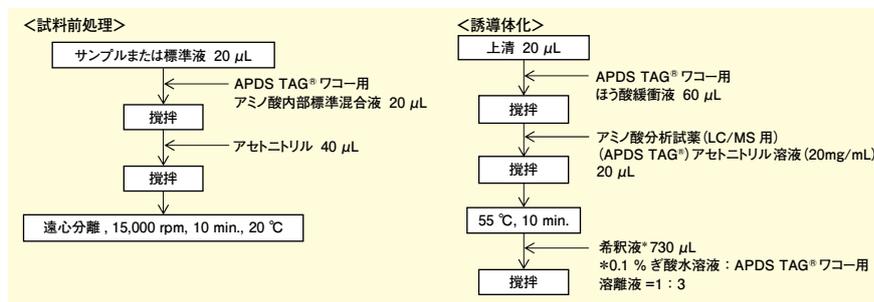


図1. 試料前処理及び誘導体化のフロー

表1. LC/MS/MS条件

機器	Prominence LC-20A XR(島津製作所)
カラム	Wakopak® Ultra APDS TAG® φ2.1 × 100 mm (W)
ガードフィルター	SunShell RP ガードフィルタ(クロマニックテクノロジーズ)
移動相 A	APDS TAG® ワコー用溶離液
移動相 B	60% アセトニトリル
グラジエント条件	0min. (A:B=94:6) → 0.05min. (92:8) → 1.70min. (92:8) → 1.71min. (88:12) → 4.95min. (70:30) → 5.95min. (40:60) → 5.96min. (5:95) → 6.70min. (5:95) → 6.71min. (94:6) → 12min. (94:6)
流量	0.3 mL/min.
カラム温度	40 °C
注入量	1 µL

機器	LCMS-8030 Plus(島津製作所)
イオン化	ESI positive
測定モード	MRM
DL 温度	250 °C
ネブライザーガス流量	1.5 L/min.
ヒートブロック温度	250 °C
ドラインガス流量	10 L/min.

No.	成分名(略称)	分子量	モニターイオン(m/z)	
			ブライカーサー	プロダクト
1	グリシン(Gly)	75.1	196.1	121.0
2	グリシン- <sup>13</sup> C <sub>2</sub> , <sup>15</sup> N(Gly-IS)	78.1	199.1	121.1
3	アラニン(Ala)	89.1	210.1	121.0
4	アラニン- <sup>13</sup> C <sub>3</sub> (Ala-IS)	92.1	213.1	121.1
5	バリン(Val)	117.2	238.1	121.0
6	バリン- <sup>13</sup> C <sub>5</sub> , <sup>15</sup> N(Val-IS)	123.1	244.1	121.1
7	ロイシン(Leu)	131.2	252.1	121.0
8	イソロイシン(Ile)	131.2	252.1	121.0
9	ロイシン-5,5,5-d <sub>3</sub> (Leu-IS)	134.2	255.1	121.1
10	イソロイシン- <sup>13</sup> C <sub>6</sub> , <sup>15</sup> N(Ile-IS)	138.1	259.1	121.1
11	アルギニン(Arg)	174.2	295.1	175.1
12	アルギニン- <sup>15</sup> N <sub>4</sub> (Arg-IS)	178.2	299.1	179.1
13	サルコシン(Sar)	89.1	210.0	121.0
14	ヒドロキシプロリン(Hydro)	131.1	252.1	121.0
15	アスパラギン(Asn)	132.1	253.1	121.0
16	アスパラギン酸(Asp)	133.1	254.1	121.0
17	グルタミン(Gln)	146.1	267.1	121.0
18	グルタミン酸(Glu)	147.1	268.1	121.0
19	α-アミノアジピン酸(α-AAA)	161.2	282.1	121.0
20	シトルリン(Cit)	175.2	296.3	121.0

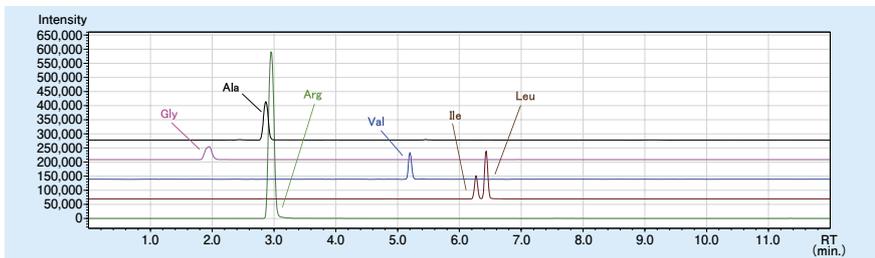


図2. 市販飲料中の6成分のMRMクロマトグラム

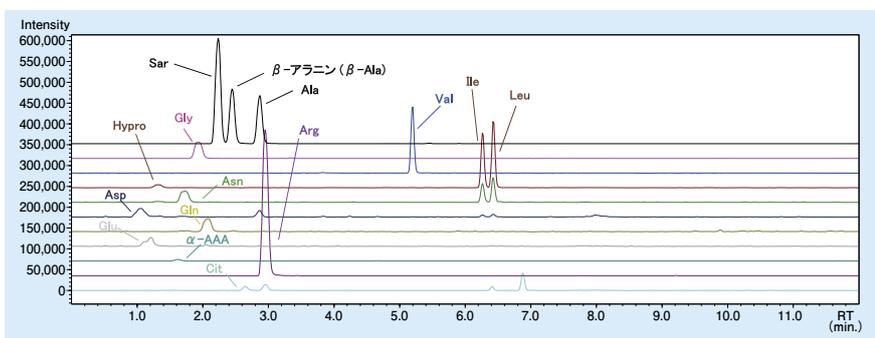


図3. 標準添加後の市販飲料のMRMクロマトグラム

MRMクロマトグラムを図2に示します。次に、このクロマトグラムが得られたサンプルにアミノ酸類の標準品を添加し、添加回収試験を行いました。標準添加後の市販飲料のMRMクロマトグラムを図3に示し、添加回収試

験の結果を図4に示します。回収率は99～103%であり、高い回収率を示しました。

今回の検討結果から Wakopak® Ultra APDS TAG® を用いた APDS 誘導体化によるアミノ酸類の定量は有

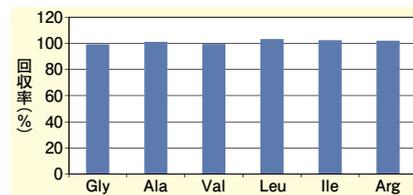


図4. 添加回収試験の結果

効であると考えられます。今回、ご紹介した結果は飲料のみですが、その他の食品や培養液などの試料の分析でも有用であると考えられますので是非アミノ酸類の定量にご活用下さい。

### 【謝辞】

本商品の検討にご協力頂きました味の素株式会社の皆様に深謝申し上げます。

### 【参考文献】

- 味の素株式会社 編：「アミノ酸ハンドブック」（工業調査会）（2003）。
- 大澤 俊彦：化学と生物，**44**（6），406（2006）。
- 和田 他：分析化学，**65**（6），301（2016）。
- 湯田 直樹：健康・栄養食品研究，**16**（1），1（2017）。
- 特許第 4453363 号。
- 宮野 博：和光純薬時報，**79**（1），2（2011）。
- 今泉 明：化学と生物，**53**（3），192（2015）。
- 渡邊 他：島津評論，**69**（1・2），47（2012）。

## ワコーパック® ウルトラAPDSタグ®

Wako

汎用 LC/MS で高感度・高速アミノ酸分析を実現できます。

コード No.	品 名	容 量	希望納入価格 (円)
235-63973	Wakopak® Ultra APDS TAG® φ2.1mm × 100mm (W)	1 本	120,000

### 関連商品

コード No.	品 名	規格 / メーカー	容 量	希望納入価格 (円)
014-23841	Amino Acid Analysis Reagent (for LC/MS) (APDS TAG®)	アミノ酸自動分析用	100mg	45,000
011-14463	Amino Acids Mixture Standard Solution, Type AN-2	アミノ酸自動分析用	1mL × 5A	9,200
015-14461			5mL	6,600
012-08643	Amino Acids Mixture Standard Solution, Type B	アミノ酸自動分析用	1mL × 5A	9,200
016-08641			5mL	6,600
019-08393	Amino Acids Mixture Standard Solution, Type H	アミノ酸自動分析用	1mL × 5A	6,300
013-08391			5mL	4,200
293-73701	APDS TAG® Wako Amino Acids Internal Standard Mixture Solution	アミノ酸自動分析用	1 セット	80,000
010-23061	APDS TAG® Wako Eluent	アミノ酸自動分析用	1L	6,100
019-23151	APDS TAG® Wako Borate Buffer	アミノ酸自動分析用	1L	9,900
380-04131	SunShell RP Guard Filter Starter kit (a holder, a cartridge, a tubing)	クロマニックテクノロジーズ	1 セット	20,000

Ref<sup>+</sup>…2～10℃保存 Ref<sup>0</sup>…20℃保存 Ref<sup>-</sup>…80℃保存 Ref<sup>+</sup>…150℃保存 表示がない場合は室温保存です。その他の略号は、巻末をご参照下さい。掲載内容は、2017年10月時点での情報です。最新情報は、siyaku.com (http://www.siyaku.com/) をご参照下さい。

## 第3回 アルツハイマー病 (3) アミロイドβ

東京大学大学院薬学系研究科 機能病態学教室 堀 由起子、富田 泰輔

### 1. はじめに Aβとは

アルツハイマー病 (Alzheimer disease; AD) 患者脳における特徴的な病理学所見の一つとして挙げられる老人斑は、異常に凝集し不溶化した蛋白質がβシート構造に富んだアミロイド線維とよばれる線維構造を形成し脳実質の細胞間隙に蓄積した構造物である (<http://bsd.neuroinf.jp/wiki/アミロイドβタンパク質>)。近年開発された、ヒト脳内に蓄積した老人斑をイメージングするアミロイドPETによる画像解析から、認知機能障害が見られる10～15年程前から出現していることが明らかとなっており、AD発症過程における最初期病変であると考えられている。1984年Glennierらによって脳血管アミロイドから、1985年Mastersらによって老人斑アミロイドから、単離精製とそれに次ぐアミノ酸同定を経て、老人斑の主要構成成分はamyloid β peptide (Aβ) であることが報告された<sup>1,2)</sup>。

Aβは、約40～43アミノ酸からなるペプチド断片である。N末端側、C末端側にそれぞれいくつかのバリエーションがあるが、老人斑に蓄積している代表的なAβとしては、40アミノ酸からなり40番目Val残基で終わるAβ40と、42アミノ酸からなり42番目Ala残基で終わるAβ42がある。Aβ40に比べ、Aβ42の凝集性は非常に高く、また老人斑として早期より蓄積している<sup>3)</sup>。また蓄積Aβの一部は修飾も受けており、3番目Glu残基がpyro化修飾されたAβも存在する<sup>4)</sup>。

### 2. アミロイド仮説

ADの大多数は孤発性であるが、ごく一部に常染色体優性遺伝形式を示す家族性AD (Familial AD; FAD) が報告されている。遺伝学的研究から、FADの原因遺伝子としてAβの前駆

体蛋白質 amyloid precursor protein (APP) をコードするAPP遺伝子、そしてAPP切断酵素γ-secretase複合体の活性中心蛋白質であるpresenilin 1及び2をコードするPSEN1及びPSEN2遺伝子が同定された。これらの3つの遺伝子上には、FAD家系において同定されたFAD変異がいくつも存在し、その変異効果として①Aβ産生総量の増加、②凝集性の高いAβ42の産生比率増加、③Aβ自体の凝集性の亢進が報告されている。このことから、産生されたAβが凝集・蓄積することがAD発症を導くとする「アミロイド仮説」の提唱へと繋がった<sup>5)</sup>。加えて、ADに対してprotectiveな変異としてAPP遺伝子上にA673T変異が同定され、その変異効果としてAβ産生の減少が報告されたことから<sup>6)</sup>、AD発症メカニズムとしての「アミロイド仮説」はさらに強く支持されることとなった。

脳内のAβ濃度は産生とクリアランスのバランスで調節され、そのバランスが崩れることによって凝集のフェーズへと移行すると考えられている。本稿では、この産生、クリアランス、凝集の3点からAβを記述し、Aβを治療標的としたAD根本治療法へ向けた展開について述べたい。

### 3. Aβ産生過程

Aβは、その前駆体蛋白質APPから切り出されるペプチド断片である。APPはI型I回膜貫通型蛋白質で、様々な組織にユビキタスに発現している。スプライシングの違いから主に695、751、770アミノ酸からなる3つのアイソフォームが存在するが、脳においては特に695アミノ酸のAPP695が多く発現している<sup>7,8,9)</sup>。

Aβは健常者の脳脊髄液中からも検出され、AD患者脳において病的に産生されるのではなく、APPの正常な代謝過程で産生、分泌される分子であ

る<sup>10,11)</sup>。AβはAPPから2段階の切断を受けて産生される (図1)。まず、APPの細胞外領域がβ-secretaseによって切断され、細胞外領域断片 (sAPPβ) が分泌される。続いて細胞膜に残ったAPPのC末端断片 (C99) がγ-secretaseによって切断され、AβとAICDが産生される。AβのC末端側のバリエーションはγ-secretaseによる切断に起因し、切断されるアミノ酸部位の異なるAβ37からAβ49までの複数種のAβが産生される<sup>12)</sup>。産生量の多いAβ40、また凝集性・毒性の高いAβ42が古典的に注目されてきたが、近年ではAβ43も凝集性・毒性が高いAβ分子種の一つとして注目されている<sup>13)</sup>。また、γ-secretaseの切断阻害ではなく切断活性調節を目的としたγ-secretase modulator (GSM) の開発と作用機序研究が進んでおり、Aβ37やAβ38といった短いAβ種の産生機構も注目を集めている。β-secretaseはBACE1、γ-secretaseはpresenilin 1あるいはpresenilin 2を活性中心とするAph-1, Pen-2, nicastrinとの4者複合体がその分子実態である。

APPの代謝過程には、Aβ産生経路のほかに非Aβ産生経路が存在する (図1)。非Aβ産生経路もまた2段階の切断によって起こり、2段階目の切断を担う酵素はAβ産生経路と同様にγ-secretaseであるが、1段階目の切断を担う酵素はα-secretaseである。α-secretaseはAPP上のAβ領域内部16番Lys残基と17番Leu残基の間で切断するため、産生される約3kDaのフラグメント (p3) はAβのN末端領域16アミノ酸を欠いたペプチド断片である。神経細胞においては、ADAM10が主要なα-secretaseである。

近年、Aβ産生量が神経活動依存的に変動することが報告されている。マウス脳内において、脳部位ごとの神経活動量の差とAβ産生量、Aβ蓄積量の差に相関関係があることや、神経

本シリーズの企画・構成に際し、東京大学大学院医学系研究科 岩坪威先生にご助言頂きました。

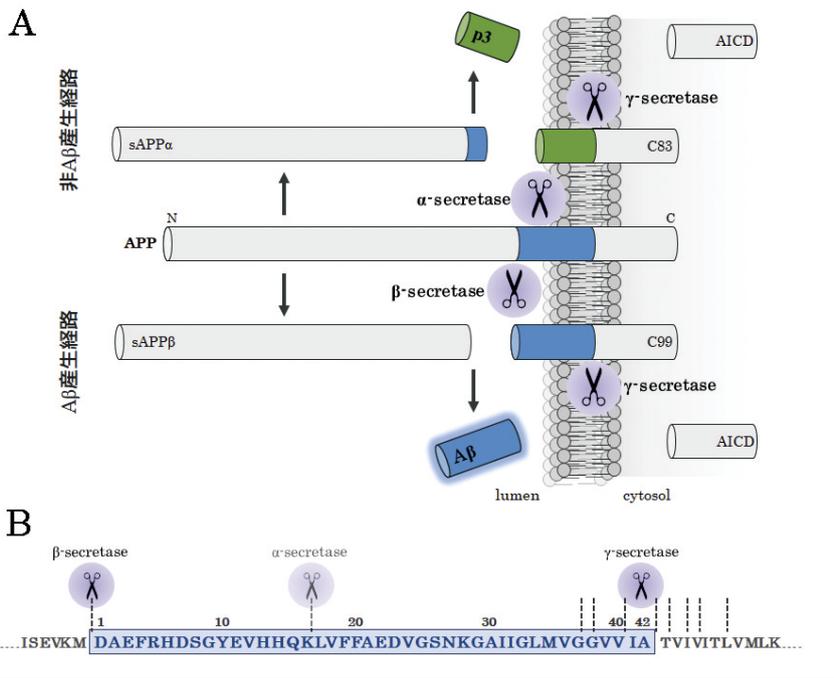


図1. Aβ産生経路と非Aβ産生経路

- (A) Aβ産生経路の模式図。APPが、β-secretase、γ-secretaseによって切断されることによりAβが(Aβ産生経路)、α-secretase、γ-secretaseによって切断されることによりp3が(非Aβ産生経路)産生される。
- (B) Aβ配列と切断部位の図。青色で示す領域がAβ配列。

活動が抑えられる睡眠時にはAβ産生量が減少することが明らかになった<sup>14,15)</sup>。またオプトジェネティクス技術を用い長期的に神経活動を亢進し続けると、Aβ蓄積量が増えることも示された<sup>16)</sup>。神経活動によってAβ産生が亢進するメカニズムは明らかではないが、神経活動亢進によるエンドサイトーシス亢進により、細胞表面に輸送されたAPPがエンドサイトーシスされBACE1による切断を受けやすくなる可能性が考えられている。

#### 4. Aβクリアランス過程

通常、産生されたAβは速やかに除去されることにより、脳内でその濃度は一定に保たれている。しかし一部のFAD患者においては、そのFAD変異効果によってAβ産生量が増加し、このバランスが崩れることでAD発症に至る。一方、孤発性AD患者

においては、Aβ産生の亢進ではなくAβクリアランスが破綻していることが明らかになった<sup>17)</sup>。この結果は、Aβ産生過程だけでなく、Aβクリアランス過程の詳細な分子機構研究の重要性を示唆している。このAβクリアランスの主な機構として、Aβ分解酵素による分解、グリア細胞などによる貪食、血液脳関門(BBB)を介した排出輸送などが報告されている。

代表的なAβ分解酵素としては、メタロプロテアーゼであるInsulin degrading enzyme(IDE)やNephrilysin(NEP)、セリンプロテアーゼであるKallikrein-related peptidase 7(KLK7)などが同定されている<sup>18,19,20)</sup>。いずれもマウス脳内内因性Aβを分解することがノックアウトマウスの解析から明らかになっており、またAD患者脳において量の減少や分解活性が低下していることも報告されている。

さらに、アデノ随伴ウイルスベクターを用いてNEPを発現させるとAβ蓄積の減少がみられるなど<sup>21)</sup>、これらのAβ分解酵素がAD治療標的となりうる可能性も示唆されている。

脳内のミクログリアやアストロサイトといったグリア細胞によるAβ貪食も推定されている。ミクログリアには、Aβ貪食に関与する可能性があるscavenger receptorなどの受容体が発現している。加えて、近年のゲノムワイド関連研究(Genome wide association study; GWAS)から見つかったADリスクに関連する可能性がある遺伝子群の中に、ミクログリアに発現が高い遺伝子が複数含まれており<sup>22)</sup>、このことはグリア細胞が何らかの形でAD発症に関わる可能性を示唆するものと考えられ興味深い。また実際これらの遺伝子の中で、CD33やTREM2などはAβクリアランスに影響を及ぼすことが報告されている<sup>23,24)</sup>。

#### 5. Aβ凝集過程

Aβは単量体では特定の構造をとらないが、凝集して蓄積したAβはβシート構造に富んだアミロイド線維を形成している。Aβ42はAβ40より凝集性が高く、脳内において老人斑として最初期に蓄積するAβ種である。Aβ40よりAβ42の方が構造変化しやすい理由は不明ではあるが、31~34番目、38~41番目のアミノ酸残基でβヘアピン構造をとりC末端が構造的に安定化することがβシート構造への構造変化を容易にしている可能性が指摘されている<sup>27)</sup>。またアミロイド線維は、Aβ分子内で25番から29番のアミノ酸にかけてターン構造をとってβシート構造を形成し、さらに分子間で相互作用することでクロスβシート構造をとっていると考えられている<sup>25,26)</sup>。分子内ターン構造をとるアミノ酸領域の近傍は、Aβの凝集性を亢進する効果をもつ遺伝子変異が集中

する hot spot であり、これらの変異によって A $\beta$  の構造変化が促進され、線維形成が加速する可能性が構造的な側面からも推測される。

A $\beta$  がアミロイド線維を形成する過程は、*in vitro* の実験系から核形成過程と伸長過程の2つの過程を経るというモデルが考えられている<sup>28, 29)</sup>。核形成過程は、A $\beta$  単量体が構造変化を生じつつ線維伸長の核となる重合核 (seed) を形成する最初の過程であり、ゆっくりと進行しアミロイド形成の律速段階となる。A $\beta$  42 は、A $\beta$  40 に比べこの核形成過程が早い。続く伸長過程は、形成された seed を起点に A $\beta$  が構造変化しつつ次々と結合していくことにより線維が伸長する、急速進行性の過程である。*in vitro* において、A $\beta$  40 を単独でインキュベートしても凝集の進行は遅いが、あらかじめ線維化させた A $\beta$  を少量加えると一気に凝集が加速する。また *in vivo* においても同様に、AD 患者脳由来あるいは A $\beta$  蓄積をもつ AD モデルマウス由来の脳ライゼートを若齢の A $\beta$  蓄積を持たないマウスの脳に注入すると、注入された A $\beta$  が seed として働き A $\beta$  蓄積が促進される<sup>30)</sup>。このことは A $\beta$  蓄積における seed 形成制御の重要性を示唆する。また前述の AD 患者脳由来 A $\beta$  アミロイドの構造解析において、アミロイド構造は一様ではなく、病状経過の異なる患者によって異なるアミロイド構造をとる可能性が示唆されており、最初に形成される seed 構造の重要性を示唆し興味深い<sup>26)</sup>。

初期に提唱された「アミロイド仮説」は、A $\beta$  が老人斑として蓄積することが AD 発症の原因であるとしていた。しかし、老人斑と認知機能低下の間に明確な相関関係がないことや、アミロイド線維よりも oligomer など A $\beta$  凝集中間体が強い毒性を示すことが明らかになったことから、現在では「特に凝集中間体が強い毒性を發揮す

る」と一部修正された形で「アミロイド仮説」が認知されている。A $\beta$  凝集中間体は、アミロイド線維構造をとり不溶化した A $\beta$  とは異なり、可溶性の低分子量 A $\beta$  重合体と定義づけられている。このような可溶性中間体として *in vitro* の実験から paranuclei、protofibrils、A $\beta$ -derived diffusible ligands (ADDL) など様々な A $\beta$  凝集中間体が報告されている<sup>31, 32, 33)</sup>。*in vivo* においても、dimer や trimer などの low-n oligomer に加え、12-mer からなる 56 kDa の A $\beta^*$  などが同定されている<sup>34, 35)</sup>。これらの A $\beta$  凝集中間体に共通して強いシナプス障害性や細胞障害性をもつことが報告されており、その形成機序や性質は興味深い。

## 6. A $\beta$ を治療標的とした AD 根本治療法

「アミロイド仮説」に立脚し、A $\beta$  を標的とした様々な AD 根本治療法が考えられている。主に (1) A $\beta$  産生阻害、(2) A $\beta$  クリアランス促進、(3) A $\beta$  凝集阻害を目的にした研究が進められており、基礎実験レベルではいくつかの候補化合物の探索・同定がなされているが、ここでは特に臨床試験まで進んでいる以下の2つの観点について記載したい。

1つ目としては、A $\beta$  産生阻害を目的とした各 secretase 活性制御法である。しかし  $\gamma$ -secretase には APP 以外にも様々な切断基質があり、特に Notch 切断阻害による副作用が大きな問題となっている。そのため  $\gamma$ -secretase 阻害剤ではなく、A $\beta$  42 産生を特異的に減少させるような切断活性調節を目的とした  $\gamma$ -secretase modulator (GSM) の開発が求められている。一方  $\beta$ -secretase である BACE1 は、BACE1 ノックアウトマウスが presenilin ノックアウトほどの異常な表現型を示さないこと、 $\beta$ -

secretase による切断は A $\beta$  産生過程の律速段階であることから、BACE1 阻害剤は有望な AD 治療薬となる可能性がある。

2つ目は、A $\beta$  クリアランスの促進である。この観点において臨床試験が進んでいるのが、受動免疫としての抗 A $\beta$  抗体、能動免疫としての A $\beta$  ワクチンである。1999 年、Schenk らは APP トランスジェニックマウスに凝集した A $\beta$  を免疫すると、脳内の A $\beta$  蓄積が減少することを報告した<sup>36)</sup>。その後、抗 A $\beta$  抗体を投与した場合でも同様の効果があることが示され<sup>37)</sup>、抗 A $\beta$  抗体によって A $\beta$  クリアランスが促進されることが示された。そのクリアランスメカニズムは完全には明らかになっていないが、ミクログリアによる A $\beta$  貪食作用の活性化、末梢への A $\beta$  引き抜きの亢進 (sink 仮説) などが考えられている。ただし、脳内への抗体の移行量が極めて少ないことや、抗体のエピトープによる効果の違いなど、まだ詳細なメカニズム解明が必要とされる。

しかし、これらの A $\beta$  を治療標的とした治療薬は、臨床試験において苦戦しているのが現状である。その理由の1つに、治療開始時期が遅いことが考えられている。前述の通り老人斑は認知機能障害を示す 10~15 年前から蓄積が開始していることから、認知機能障害を示し AD 病態が進んだ患者に対しては、A $\beta$  を標的とした治療戦略のみでは必ずしも症状の改善に繋がらない可能性がある。そこで A $\beta$  の蓄積病態が開始しているが未発症期、もしくは早期段階であるプレクリニカル期に対する予防的な介入、すなわち先制医療としての開発が進められている<sup>38, 39)</sup>。そのためこの治療戦略を有効なものとするためには、A $\beta$  アミロイドの簡便な画像診断法の開発やバイオマーカーの探索など、A $\beta$  蓄積の早期診断を可能にする手法の開発もあわせて求められている。

## 7. おわりに

長年のADに関する基礎研究結果から、AβをAD発症の原因とする「アミロイド仮説」及びAβを標的とする治療戦略の妥当性は概ね示されていると考える。しかし未だAD根本治療には至っていないことから、ADにおけるAβの寄与について、さらなる詳細な分子メカニズム解明が望まれるとともに、臨床応用が期待される。

### 【参考文献】

- Glenner, G. G. *et al.* : *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **120**, 885-890 (1984).
- Masters, C. L. *et al.* : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**, 4245-4249 (1985).
- Iwatsubo, T. *et al.* : *Neuron*, **13**, 45-53 (1994).
- Saido, T. C. *et al.* : *Neuron*, **14**, 457-466 (1995).
- Selkoe, D. J. and Hardy, J. : *EMBO Mol. Med.*, **8**, 595-608 (2016).
- Jonsson, T. *et al.* : *Nature*, **488**, 96-99 (2012).
- Ponte, P. *et al.* : *Nature*, **331**, 525-527 (1988).
- Tanzi, R. E. *et al.* : *Nature*, **331**, 528-530 (1988).
- Kitaguchi, N. *et al.* : *Nature*, **331**, 530-532 (1988).
- Haass, C. *et al.* : *Nature*, **359**, 322-325 (1992).
- Seubert, P. *et al.* : *Nature*, **359**, 325-327 (1992).
- Qi-Takahara, Y. *et al.* : *J. Neurosci.*, **25**, 436-445 (2005).
- Saito, T. *et al.* : *Nat. Neurosci.*, **14**, 1023-1032 (2011).
- Kang, J. E. *et al.* : *Science*, **326**, 1005-1007 (2009).
- Bero, A. W. *et al.* : *Nat. Neurosci.*, **14**, 750-756 (2011).
- Yamamoto, K. *et al.* : *Cell Rep.*, **11**, 859-865 (2015).
- Mawuenyega, K. G. *et al.* : *Science*, **330**, 1774 (2010).
- Iwata, N. *et al.* : *Nat. Med.*, **6**, 143-150 (2000).
- Qiu, W. Q. *et al.* : *J. Biol. Chem.*, **273**, 32730-32738 (1998).
- Kidana, K. *et al.* : unpublished
- Iwata, N. *et al.* : *Sci. Rep.*, **3**, 1472 (2013).
- Lambert, J. C. *et al.* : *Nat. Genet.*, **45**, 1452-1458 (2013).
- Griciuc, A. *et al.* : *Neuron*, **78**, 631-643 (2013).
- Wang, Y. *et al.* : *Cell*, **160**, 1061-1071 (2015).
- Petkova, A. T. *et al.* : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 16742-16747 (2002).
- Lu, J. X. *et al.* : *Cell*, **154**, 1257-1268 (2013).
- Sgourakis, N. G. *et al.* : *J. Mol. Biol.*, **368**, 1448-1457 (2007).
- Come, J. H. *et al.* : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**, 5959-5963 (1993).
- Jarrett, J. T. *et al.* : *Biochemistry*, **32**, 4693-4697 (1993).
- Meyer-Luehmann, M. *et al.* : *Science*, **313**, 1781-1784 (2006).
- Walsh, D. M. *et al.* : *J. Biol. Chem.*, **272**, 22364-22372 (1997).
- Bitan, G. *et al.* : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**, 330-335 (2003).
- Lambert, M. P. *et al.* : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 6448-6453 (1998).
- Shankar, G. M. *et al.* : *Nat. Med.*, **14**, 837-842 (2008).
- Lesne, S. *et al.* : *Nature*, **440**, 352-357 (2006).
- Schenk, D. *et al.* : *Nature*, **400**, 173-177 (1999).
- Bard, F. *et al.* : *Nat. Med.*, **6**, 916-919 (2000).
- Sperling, R. *et al.* : *Neuron*, **84**, 608-622 (2014).
- Reiman, E. M. *et al.* : *Nat. Rev. Neurol.*, **12**, 56-61 (2016).

今回は、「アルツハイマー病 (4) イメージング」の予定です。

## Aβ関連試薬

Wako

当社では、Aβ関連試薬を取り扱っています。詳しくは、当社HPをご覧ください。

### 抗体

コード No.	品名	Clone No.	エピトープ	サブクラス	適応実験	Aβペプチドとの反応性						規格	容量	希望納入価格(円)
						ヒト			マウス/ラット					
						Aβ1-40	Aβ1-42	Aβ1-43	Aβ1-40	Aβ1-42	Aβ1-43			
017-26871 013-26873	Anti Human Amyloid β, Monoclonal Antibody (BAN50)	BAN50	AβN末端 1-16	マウス IgG1・κ	WB/IHC/ IP/ELISA	○	○	○	×	×	×	免疫 化学用	10 μL 50 μL	10,000 35,000
近 日 発 売 014-26881 010-26883	Anti Amyloid β, Monoclonal Antibody (BNT77)	BNT77	Aβ 11-28	マウス IgA・κ	IHC/IP/ ELISA	○	○	○	○	○	○	免疫 化学用	10 μL 50 μL	照 会 照 会
018-26921 014-26923	Anti Amyloid β 40, Monoclonal Antibody (BA27)	BA27	Aβ 40 C末端	マウス IgG2a・κ	WB/IHC/ ELISA	○	×	×	○	×	×	免疫 化学用	10 μL 50 μL	10,000 35,000
014-26901 010-26903	Anti Amyloid β 42 (43), Monoclonal Antibody (BC05)	BC05	Aβ 42 C末端	マウス IgG1・κ	WB/IHC/ ELISA	×	○	○	×	○	○	免疫 化学用	10 μL 50 μL	10,000 35,000

製品情報 : [http://www.wako-chem.co.jp/siyaku/product/life/Amyloid\\_b/index.htm](http://www.wako-chem.co.jp/siyaku/product/life/Amyloid_b/index.htm)

### ELISAキット

製品情報 : <http://www.wako-chem.co.jp/siyaku/info/life/article/betaamyloidELISAKit.htm>  
[http://www.wako-chem.co.jp/siyaku/product/life/hs\\_amyloid/index.htm](http://www.wako-chem.co.jp/siyaku/product/life/hs_amyloid/index.htm)

### 染色キット

製品情報 : <http://www.wako-chem.co.jp/siyaku/product/life/amyloid/index.htm>

☐<sup>2</sup>…2~10℃保存 ☐<sup>5</sup>…20℃保存 ☐<sup>8</sup>…80℃保存 ☐<sup>15</sup>…150℃保存 表示がない場合は室温保存です。その他の略号は、巻末をご参照下さい。掲載内容は、2017年10月時点での情報です。最新情報は、siyaku.com (<http://www.siyaku.com/>) をご参照下さい。

## 第3回 ELISA の操作法とそのポイント (中編)

## ポイント⑥: 試薬の希釈

【試薬希釈作業の準備について】

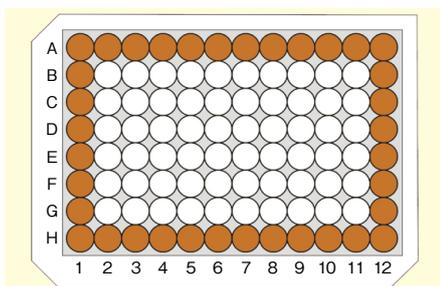
- キット構成試薬のうち、希釈が必要な試薬を確認しましょう。
- キット構成試薬の室温化が必要な場合は室温化をしましょう。  
特に冬季や春先は実験台の表面温度は暖房を入れても直ぐに上昇しません。実験台の上にキムタオルなどを敷いて、その上にキット構成品のすべてを並べ、室温化することをお勧めします。
- 試薬原液を分取する前に良く攪拌しましょう。この時、泡立てないように注意しましょう。
- 標識試薬など液量が少ない試薬は攪拌後、軽く遠心して、キャップ、壁面に付いたものを落としてから使用しましょう。
- 試薬原液を緩衝液で1,000倍以上に希釈する時は、段階希釈することをお勧めします。
  - ・10倍希釈の一例:  
試薬原液 20  $\mu$ L + 緩衝液 180  $\mu$ L  
試薬原液 10  $\mu$ L + 緩衝液 90  $\mu$ L
  - ・1,000倍希釈の一例:  
10倍希釈した溶液 100  $\mu$ L + 緩衝液 9,900  $\mu$ L  
緩衝液は10,000  $\mu$ L を分取したところから、100  $\mu$ L を抜き取っても構いません。
  - ・希釈後は良く攪拌しましょう。この時、泡立てないように注意しましょう。
- 試薬は用時調製するようにしましょう。

## ポイント⑦: エッジ現象

【エッジ現象 (エッジ効果とも言う) とは?】

ウェルプレートの外周部に位置するウェルは、他の内側のウェルと比べて外部からの温度の影響を受けやすいことから、その部分で反応が他の部分より進行し過ぎる、或いは抑制されることを言います。

一般的には冷蔵庫に保管してあったウェルプレートや試薬、検体を室温より低い状態で使用すると外側に暖



まって反応が速くなり、吸光度が高くなります。発色液の温度が低い場合は顕著に現れます。冬ではヒーターの温風またはストーブの輻射熱の影響を受け、夏ではクーラーの冷風の影響を受ける可能性があります。その結果、Blank (ゼロ濃度) の吸光度が最低濃度の標準溶液のウェルより高く (暖められた場合) なったり、Blank を含めた二重測定標準品ウェルのプレート端側が常に吸光度が高いなどという現象が見られることとなります。

## 【エッジ現象対策】

- 測定する1時間前から2時間前にウェルプレートや試薬、検体を冷蔵庫から出し反応温度に合わせましょう。
  - 測定開始前に試薬の温度を確認しましょう。
  - 空調機器/恒温槽/PC/人など熱源となるものの影響を直接受けないところで測定を行いましょう。
  - 反応温度を一定に保ちましょう。
  - 洗浄液の温度管理には特に注意しましょう。洗浄液は容量が多いので温度を合わせるのに時間がかかります。洗浄液の温度が反応温度と異なると洗浄の都度プレートの温度が変化してしまいます。
  - プレートシールやプレートカバーを使用しましょう。
  - プレートに温度が均一に伝わるようにしましょう。
  - インキュベータを使用する場合は緩衝液や洗浄液もインキュベータに入れておきましょう。
- \*ただし、試薬の安定性は事前に確認して下さい。

## ポイント⑧: 洗浄

ELISA 操作において洗浄はとても重要です。特に洗浄不足は非特異的反応によるブランクの吸光度が上がり、測定範囲の低濃度域での感度が得られなくなります。このようなことを防ぐためにも洗浄操作を確実に行きましょう。

## 【洗浄のポイント (手洗浄の場合)】

- 濃縮洗浄液が付属の場合は、精製水の温度を室温に戻してから希釈しましょう。ご存じのように液体の温度は室温に比べ変化しにくいいため操作開始時に洗浄液の温度が反応温度と違う場合があります。特に汲み置きした精製水を使用する場合は注意しましょう。操作前に温度確認することをお勧めします。
- インキュベータを使用する場合は、洗浄液もインキュベータに入れ温度を同じにしましょう。
- 検体、標準溶液を分注後指定時間反応させた後の1回目の洗浄については、反応液を捨て、洗浄液を各ウェルに満たす時、洗浄液が溢れたり、飛び跳ねたりして、隣り

のウェルに移ることのないように注意しましょう。  
この時の洗浄液量の目安は 250 ~ 300  $\mu$ L/ウェルです。  
2回目からは溢れても構いません。

- 洗浄液をウェルに満たす時、ある程度の水流の強さで行わないと洗浄不良を起こす可能性があります。特に8連、12連ピペットで分注する場合、洗浄が弱いことがあるので注意しましょう。
- ペルオキシダーゼ結合物反応後の洗浄工程は重要です。ピペットでウェルに洗浄液を分注する場合には洗浄不良を起こしやすいので洗浄回数を増やすことで改善される

場合があります(例えば、指定回数が4回の場合は6~8回)。

- 洗浄液をウェルに満たした後は手のひらの上で軽く水平方向に円を描くように5~10秒程攪拌してから一気にプレートを逆さまにして洗浄液を振り捨ててください。軽く攪拌することにより洗浄効果が上がります。
- 洗浄後、次の試薬を分注するまでにウェルを乾燥させないように注意しましょう。ウェルの乾燥はブランクが上がる原因になります。洗浄操作を始める前に、必ず次に分注する試薬を準備しましょう。

## ELISAトラブルシューティング

### A:最後の段階で発色が薄い、または発色しない原因と対策

- 1) 標準品や検体を入れ忘れた
- 2) 発色に関連する試薬液を入れ忘れた
  - ① ビオチン抗体
  - ② ペルオキシダーゼ結合抗体
  - ③ アビジンHRP
  - ④ TMB
- 3) 発色に関連する溶液の取り違いや希釈調製不良  
ビオチン抗体、アビジンHRPなど
- 4) 酵素阻害剤の混入  
希釈に使用した容器にアジ化ナトリウム ( $\text{NaN}_3$ ) が付着していたためにアビジンHRP溶液に混入し、HRPが失活した。  
\*アジ化ナトリウムは防腐剤としてさまざまな溶液(特に緩衝液)に加えられています。そのような溶液を取扱った器具は要注意です。抗凝固剤としてNaFを含む採血管が使用されている場合、或いは検体の保存にアジ化ナトリウムが使用されている場合、抗原抗体反応後、洗浄操作で洗い流されるはずですが、使用を避けるのが望ましいです。
- 5) プレートの過剰な洗浄  
特に自動洗浄機の洗浄パワーの調節が強すぎると固相化されている抗体や反応物を剥がしてしまうことがあります。適当な強さに設定しましょう。また、洗浄モードはプレートモードでの洗浄をお勧めします。  
マニュアルでの洗浄の場合はピペットや洗浄瓶の先端がウェル表面に接触しないように洗浄液を分注しましょう。
- 6) TMB溶液を冷蔵庫から出してすぐに加えていませんか?  
充分室温に戻してから加えないと発色が弱くなります(室温反応の場合)。



噴射ピンを用いて洗浄を行うと便利です。

### B:目で見て発色しているのに測定してみると吸光度が出ない原因と対策

プレートリーダーの測定波長のずれが考えられます。リーダーの波長の調整を行いましょう。フィルター式のリーダーではフィルターの波長が正しいかどうか確認しましょう。

### C:標準曲線が上手く描けない

#### 原因と対策

- 標準曲線が右上がりにならない  
全て低い吸光度  
検体は発色している  
⇒ 標準品の入れ忘れ ・ 標準品原液の入れ忘れ  
・ 標準品原液の取り違い
- 検体も発色していない  
⇒ 発色試薬の希釈ミス ・ 発色試薬の取り違い  
・ 第2抗体の取り違い ・ 第2抗体の入れ忘れ  
・ 第2抗体の変性、希釈ミス
- すべて高い吸光度  
⇒ 発色試薬の変性(酸化)
- 標準曲線が右下がりになった  
⇒ 標準曲線の添加順序が逆転した
- 標準曲線が凸凹になった  
⇒ 標準品の希釈途中でミスがあった
- 標準曲線が右寄りで感度が出ない  
⇒ 標準品の失活 ・ 反応時間を間違えた
- ブランク(ゼロ濃度)を含めた2重測定標準品用のウェルのプレート端側の吸光度が内側のものよりも常に高くなる  
⇒ エッジ現象が起きている可能性があります。
- 一般的注意事項  
標準溶液の原液を分注する際まずVortexで攪拌してください。この際、泡立てないように注意してください。  
標準溶液の希釈系列を作製する際、高濃度の標準溶液を採取して緩衝液の入った試験管に加えた後、よく攪拌してから次の操作に移ってください。

今回は、「第4回 ELISAの操作法とそのポイント(後編)」(最終回)の予定です。

本記事は、若林克己著「ELISA A to Z」(株式会社シバヤギ発行)をもとに、株式会社シバヤギで編集したものです。

## ELISAトレーニングキット

Shibayagi

コードNo.	メーカーコード	品名	容量	希望納入価格(円)
639-31581	AKRBS-TR2	ELISA training Kit	1kit	40,000

2~10°C保存 20°C保存 80°C保存 150°C保存 表示がない場合は室温保存です。その他の略号は、巻末をご参照下さい。掲載内容は、2017年10月時点での情報です。最新情報は、siyaku.com (http://www.siyaku.com/) をご参照下さい。

### 第2話 qNMRで精確な測定をするために

qNMRの手法は、大きく分けて内標準法と外標準法の2種類があります。試料溶液にqNMR用基準物質を内標準物質として添加して測定するのが内標準法です。これに対して外標準法は、試料溶液とは別にqNMR用基準物質を一定量溶かした濃度既知の標準溶液を用意して、試料溶液と標準溶液を別々に測定し定量する手法です。外標準法は試料にqNMR用基準物質を加える必要がなく、試料をそのまま回収できる点が大きな利点です。内標準法と外標準法の測定パラメータは基本的に同じと考えることができますが、外標準法によって純度や含有率を測定する場合、計算式によって補正される項に加えて、NMR試料管の違いなどを考慮する必要があるため、内標準法と比べて操作が複雑です。したがって、外標準法は内標準法と比べて、一般的に精度の保証が難しいといわれています。

そこで今回は、日本薬局方に採用済みの内標準法の測定フローに従って、qNMRで精確な測定をするためのポイントをご紹介します。内標準法の測定フロー概略図をFigure 1に示しました。試料調製、NMR測定、データ解析の3つのパートに分かれていますが、ご覧の通り、測定フローはいたって単純です。実際には、これらの操作で得られた天秤での秤量値やNMRスペクトルの信号面積などの値をFigure 2の計算式に代入して分析結果を得ることになります。qNMRと聞くとNMR測定だけを正確に行えば良いと思われがちですが、実際には試料調製、NMR測定、データ解析のすべてのパートを定量に適した方法で実施しなければ、最終的に精確な分析結果を得ることは困難です。ここからは、それぞれのパートに分けて精確な測定をするためのポイントをご紹介します。

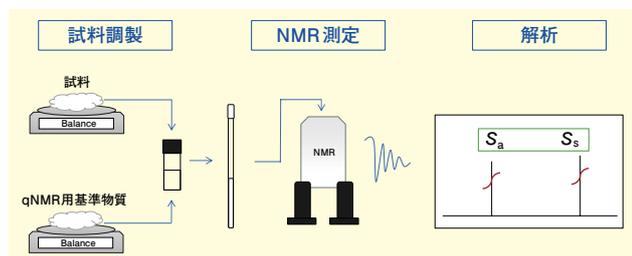


Figure 1. 内標準法の測定フロー概略図

$$P_a = \frac{S_a}{S_s} \times \frac{N_s}{N_a} \times \frac{M_a}{M_s} \times \frac{m_s}{m_a} \times P_s$$

$P_a$ : 分析種の純度または含有率  
 $P_s$ : qNMR用基準物質の純度  
 $S_a$ : 分析種のシグナル面積  
 $S_s$ : qNMR用基準物質のシグナル面積  
 $N_a$ : 分析種のプロトン数  
 $N_s$ : qNMR用基準物質のプロトン数  
 $M_a$ : 分析種のモル質量  
 $M_s$ : qNMR用基準物質のモル質量  
 $m_a$ : 試料の質量  
 $m_s$ : qNMR用基準物質の質量

Figure 2. 計算式

### 試料調製

qNMRの操作の中で軽視しがちなのが試料調製です。NMRを長年扱ってこられた方からすれば試料調製なんて“混ぜれば終わり”と思われるかもしれませんが、実は重要な操作です。日本薬局方(E)-ケイ皮酸qNMR純度規定の試料調製をFigure 3に示しました<sup>1)</sup>。この中では、ウルトラマイクロ天秤(日本薬局方の記載では“ウルトラマイクロ化学はかり”)となっています)の使用が規定されていますが、これは、数mgの試料やqNMR用基準物質を精確に計量するためには、このぐらい高精度な天秤を使用しないと精確な分析結果を得ることが難しいという理由からです。なお天秤での採取量の目安の参考になるものとして、米国薬局方(United States Pharmacopeia; USP)の最小計量値(minimum weight;  $W_{min}$ )があります。これは、天秤での計量の要求精度を満たす下限値のことで、はかりとる質量は、最小計量値より大きいことが目安となります。最小計量値 $W_{min}$ は、下記Eq.(1)に示したように、風袋など(一例として、試料採取用容器として用いるアルミ秤量皿(約60mg)などがあげられます)の質量を10回繰り返し測定した際の標準偏差(standard deviation; SD)  $\sigma$ に、安全係数2を計量における許容範囲(0.10%)で除した値2000(=2/(0.10/100))を乗じて算出することができます<sup>2)</sup>。みなさんも普段使っている天秤で最小計量値を一度測定してみることをお勧めします。

$$W_{min} = \sigma \times 2000 \quad \text{Eq. (1)}$$

また、使用するqNMR用基準物質についても注意が必要です。昨今、qNMR用基準物質として複数の製品が供給されていますが、その中でも国際単位系(International System of Units; SI)にトレーサビリティ(この場合は物質質量(モル; mol))が確保された認証標準物質(Certified Reference Material; CRM)を使用することが望ましいと言えます。qNMRの測定原理は、NMRスペクトル上に観測された物質質量が既知の基準物質の信号面積と分析種の信号面積を比較することで、分析種の物質質量をもとめる方法ですので、物質質量の基準となるqNMR用基準物質としては、やはりSIトレーサブルな純度が精確に値付けされている認証標準物質の使用をお勧めします。qNMR用基準物質に求められるその他のポイントとしては、高純度なものの、安定して精確に秤量できるもの、信号の数やスピン結合による信号の分裂が少ないもの、特異的な領域に化学シフトを与えるもの、重溶媒中で安定かつ試料と反応しないもの、重溶媒への溶解性が良好であるもの、などが挙げられます<sup>3)</sup>。試料調製におけるその他のポイントとしては、



使用する重水素化溶媒由来の信号が、定量分析の対象となる信号に重ならないことや、試料と qNMR 用基準物質が重水素化溶媒に完全に溶解していることなどが挙げられます。前者に関しては、ブランクとして重水素化溶媒だけの NMR スペクトルを取得し確認することをお勧めします。後者に関しては、溶媒の種類、温度、pH などさまざまな条件で溶解性が異なるため、溶解性に関する情報があれば参考にすることができます。

**定量法** ウルトラマイクロ化学はかりを用い、本品 5 mg 及び核磁気共鳴スペクトル測定用 1,4-BTMSB-d<sub>4</sub> 1 mg をそれぞれ精密に量り、核磁気共鳴スペクトル測定用重水素化クロロホルム 1 mL に溶かし、試料溶液とする。この液を外径 5 mm の NMR 試料管に入れ、核磁気共鳴スペクトル測定用 1,4-BTMSB-d<sub>4</sub> を内部基準物質として、次の試験条件で核磁気共鳴スペクトル測定法 (2.2f) 及び (5.0f) により、<sup>1</sup>H NMR を測定する。内部基準物質のシグナルを δ 0 ppm とし、δ 6.20 ppm 付近のシグナルの面積強度 A (水素数 1 に相当) を算出する。

Figure 3. 日本薬局方 (E)-ケイ皮酸 qNMR 純度規定の試料調製  
出典：「第十七改正日本薬局方」(厚生労働省) (<http://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/0000066530.html>)

## NMR 測定

qNMR に用いる NMR 測定条件としては、日本薬局方 qNMR 純度規定の試験条件が参考になります。Figure 4 に示した日本薬局方 (E)-ケイ皮酸 qNMR 純度規定の試験条件を参考に、NMR 測定条件についてポイントをご紹介します<sup>1,4)</sup>。①装置は <sup>1</sup>H 共鳴周波数 400MHz 以上と設定されています。NMR の感度と分解能は外部磁場が大きくなるにしたがって向上するため、十分な感度と分解能が得られるように 400MHz 以上に設定されています。装置の共鳴周波数は、測定の目的 (目標とする精度など) に合ったものを選択することをお勧めします。②デジタル分解能は 0.25Hz 以下に設定されています。NMR 信号は最初アナログ信号として取得されますが、その後デジタル信号に変換されます (パルス FT-NMR を前提としています)。その際、データポイント数が少ないと、フーリエ変換後の NMR スペクトルにおける信号の形状を正しく再現することができません。日本薬局方では信号の形状を再現するための十分なデジタル分解能として 0.25Hz 以下が設定されています。③スピニングをオフ (試料管の無回転) に設定しているのは、試料管を回転したときに現れるスピニングサイドバンドが、定量分析の対象となる信号に重なる可能性があり、これを回避するのが目的です。④パルス角が 90° に設定されているのは、単位時間当たりの感

度が良く、積算効率が高いからです。⑤ <sup>13</sup>C 核デカップリングはありに設定されています。<sup>13</sup>C 核デカップリングとは、<sup>13</sup>C 核とのスピン結合によって起こる微小な信号の分裂 (<sup>13</sup>C サテライトサイドバンド) を解消する手法です。<sup>13</sup>C サテライトサイドバンドが、定量分析の対象となる信号に重なることで正確な信号面積が得られなくなるのを防ぐことが目的です。⑥遅延時間は繰り返しパルス待ち時間 60 秒以上に設定されています。遅延時間とは、パルス系列において最初のパルスを打ってから、次の積算で同じパルスを打つまでの待ち時間です。定性測定などで一般的に用いられる遅延時間は 5 秒程度と短いですが、qNMR では信号面積の飽和を防ぐために、有効数字 2 桁以上の定量精度を目標とすると、遅延時間を縦緩和時間 (spin-lattice relaxation time, T<sub>1</sub>) の 7 倍以上設定する必要があります<sup>5)</sup>。日本薬局方では、通常の化合物の T<sub>1</sub> が長いものでも 7 秒程度ですので、その 7 倍を十分に確保している 60 秒以上を設定しています。

装置：<sup>1</sup>H 共鳴周波数 400 MHz 以上の核磁気共鳴スペクトル測定装置  
測定対象とする核：<sup>1</sup>H  
デジタル分解能：0.25 以下  
観測スペクトル幅：-5 ~ 15 ppm を含む 20 ppm 以上  
スピニング：オフ  
パルス角：90°  
<sup>13</sup>C 核デカップリング：あり  
遅延時間：繰り返しパルス待ち時間 60 秒以上  
積算回数：8 回以上  
ダミーキャン：2 回以上  
測定温度：20 ~ 30°C の一定温度

Figure 4. 日本薬局方 (E)-ケイ皮酸 qNMR 純度規定の試験条件  
出典：「第十七改正日本薬局方」(厚生労働省) (<http://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/0000066530.html>)

## データ解析

データ解析における主なポイントを以下に記載します。まず窓関数 (ウィンドウ関数) 処理について注意が必要です。窓関数とは、FID 信号をフーリエ変換するときに、スペクトルの感度や線幅などを改善させるために掛け合わせる関数のことを言います。窓関数処理をすることによって目的に合ったスペクトルに加工することができますが、その一方で、不適切な窓関数処理によって信号面積の正確さを失うことがあります。qNMR では、正確さを検証している場合を除いて、窓関数処理を行わないことが望ましいと言えます。ゼロフィリング処理は、データポイントが補完され、スペクトル形状が滑らかになることで、信号面積の精度が向上するので、実施することをお勧めします。



なおゼロフィリングとは、得られたFID信号の後ろに強度ゼロのデータポイントを補完し、見かけ上のデジタル分解能を向上させる方法のことです。またNMR信号の位相はNMR信号取得前には不明であるため、測定後に位相を合わせる必要があり、この操作を位相補正といいます。解析ソフトウェアによって、NMR信号の位相補正を自動的に行うことが可能ですが、位相のずれが残ることが多々あります。qNMRでは、位相のずれは信号面積のばらつきの原因となるため、手動操作で位相のずれを解消する必要があります<sup>6)</sup>。NMRスペクトルのベースラインは必ずしも強度0とならない場合が多いです。これは信号面積の取得においてばらつきの要因となるため、qNMRではベースライン補正を行うことをお勧めします<sup>6)</sup>。ベースライン補正には様々なアルゴリズムがありますが、qNMRでは、ベースラインと見なされるデータポイントを補正点として利用してベースラインを平らにする処理を行うことをお勧めします。選択したアルゴリズムによっては、信号の裾の一部などのデータポイントが補正点として利用され、その結果、信号形状が大きく影響を受けて信号面積が極端に変

わる場合があるので注意が必要です。ベースライン補正は、信号面積に大きな影響を与える場合があるため、一定のルールを決めて慎重に行うことが望ましいといえます。

今回は、実際の測定例を中心にお話ししたいと思います。

#### 【参考文献】

- 1) The Japanese Pharmacopoeia, Seventeenth Edition (E)-Cinnamic acid for assay 2 (Purity value by quantitative NMR).
- 2) USP "General Chapter 41 Balances", US Pharmacopoeia USP 39-NF 34 (2016).
- 3) Miura, T., Sugimoto, N., Suematsu, T., Millis, K. K., Asakura, K. and Yamada, Y.: *New Horizons of Process Chemistry*, 275-285 (2017).
- 4) Hosoe, J., Sugimoto, N., Suematsu, T., Yamada, Y., Miura, T., Hayakawa, M., Suzuki, H., Katsuhara, T., Nishimura, H., Kikuchi, Y., Yamashita, T. and Goda, Y.: *Pharmaceutical and Medical Device Regulatory Science*, **45**, 243-250 (2014).
- 5) Saito, T., Nakaie, S., Kinoshita, M., Ihara, T., Kinugasa, S., Nomura, A. and Maeda, T.: *Metrologia*, **41**, 213-218 (2004).
- 6) Yamazaki, T., Saito, T., Miura, T. and Ihara, T.: *BUNSEKI KAGAKU*, **61**, 963-967 (2012).

## qNMR Summit 2018 in Tokyo



日付	2018年1月29日(月)、30日(火)
開催場所	丸の内オアゾ 16階 (フクラシア丸の内オアゾ) 東京都千代田区丸の内1-6-4 オアゾ16階
主催	和光純薬工業株式会社、日本電子株式会社
参加費	無料
定員	200名(申し込み先着順、定員になり次第締め切らせて頂きます。)
申し込み方法	当社ホームページをご参照願います。
お問合せ先	和光純薬工業株式会社 qNMRサミット事務局 TEL 03-3270-9130

#### 【スケジュール】

1/29(月) PM 1:30 - 5:10

#### International qNMR Forum

Working toward ISO - Understanding NMR standards in the world

ISOに向けたポジティブな取り組み：世界のNMR規格を把握する・標準化に向けた第一歩

1/30(火) AM 9:00 - 11:30

#### USP qNMR Summit in Tokyo

NMR and qNMR in Pharmacopoeial Context

Compendial NMR and qNMR

1/30(火) PM 1:00 - 5:40

#### International qNMR Symposium

qNMR in the pharmaceutical science: Present and Future

製薬分野におけるqNMR：現在とこれから

1/30(火) PM 5:40 - 7:00 情報交換会

●講演会はすべて日英の同時通訳が入ります。

※qNMR summit 2018 in Tokyo は経済産業省 平成29年度「戦略的国際標準化加速事業(政府戦略分野に係る国際標準活動)」の委託事業で実施されます。



The qNMR logo is licensed under a Creative Commons Attribution-ShareAlike 4.0 International License.

## 定量NMR用内標準物質

Wako

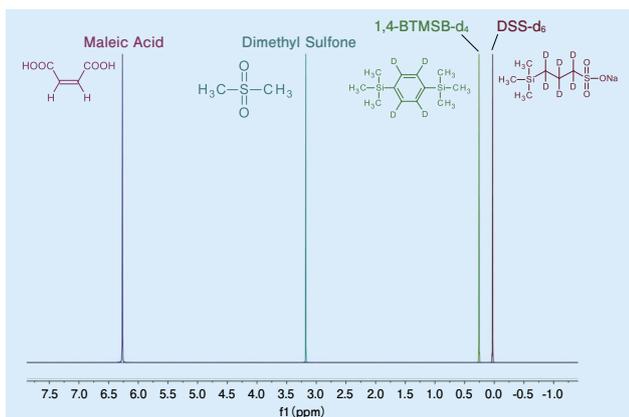
定量 NMR 用の基準物質として用いる標準物質には、①吸湿や昇華などによる質量変動が小さく、安定してはかり取れること、②純度値のトレーサビリティが保証されていること、③ NMR において単純な形状（可能であればシングルピーク）を示すことなどが挙げられます。また分析試料、重水素溶媒に応じて適切な標準物質を選定することが重要です<sup>1)</sup>。当社では定量 NMR 用の基準物質として最適な商品をラインアップしています。特に当社から販売している 4 種の標準物質（1,4-BTMSB-d<sub>4</sub>、DSS-d<sub>6</sub>、ジメチルスルホン、マレイン酸）は、IAJapan から ASNITE 認定プログラムによって認定を取得した認証標準物質（CRM (TraceSure®)）であり、計量トレーサビリティが表明された信頼性の高い標準物質です。



TraceSure® 認証書

### データ

■ <sup>1</sup>H NMR スペクトル (\*ケミカルシフトは条件によって多少変化します。)



### 溶解性情報

	マレイン酸	ジメチルスルホン	1,4-BTMSB-d <sub>4</sub>	DSS-d <sub>6</sub>
Acetone-d <sub>6</sub>	○	○	○	×
CDCl <sub>3</sub>	×	○	○	×
D <sub>2</sub> O	○	○	×	○
DMSO-d <sub>6</sub>	○	○	△	○
CD <sub>3</sub> OD	○	○	○	○
CD <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	×	○	○	×

### 【参考文献】

1) 「qNMR プライマリーガイド」ワーキング・グループ：「qNMR プライマリーガイド 基礎から実践まで」(共立出版(株)) (2015)。

コード No.	品名	規格	容量	希望納入価格 (円)
024-17031	1,4-BTMSB-d <sub>4</sub> Reference Material	TraceSure®	50mg	30,000
020-17033			50mg×4	75,000
044-31671	DSS-d <sub>6</sub> Reference Material	TraceSure®	50mg	30,000
040-31673			50mg×4	75,000
048-33271	Dimethyl Sulfone Reference Material	TraceSure®	100mg	15,000
135-17951	Maleic Acid Reference Material	TraceSure®	100mg	15,000
093-06731	4 Internal Standard Set for Quantitative NMR	定量 NMR 用	1セット	55,000

### 関連商品

#### NMIJ CRM

(<sup>1</sup>H,<sup>19</sup>F) の標準物質として使用可能です。

コード No.	品名	メーカー	容量	希望納入価格 (円)
634-29181	3,5-Bis(trifluoromethyl) benzoic Acid for Quantitative NMR( <sup>1</sup> H, <sup>19</sup> F)	産業技術総合研究所	200mg	18,750

### 標準品

標準物質を用いて定量 NMR によって値付けされた標準品です。純度には不確かさがついてきます。

コード No.	品名	規格	容量	希望納入価格 (円)
028-19011	Benzoic Acid Standard	定量 NMR 用	500mg	7,500
046-34171	Dimethyl Terephthalate Standard	定量 NMR 用	500mg	7,500
166-27911	Potassium Hydrogen Phthalate Standard	定量 NMR 用	500mg	7,500
207-20411	1,3,5-Trimethoxybenzene Standard	定量 NMR 用	500mg	7,500
204-20421	Triphenylmethane Standard	定量 NMR 用	500mg	7,500

### 標準液

内外標準法に使用できる定量 NMR 用標準液です。

コード No.	品名	規格	容量	希望納入価格 (円)
041-33641	DSS-d <sub>6</sub> Standard Solution (500mg/L Deuterium Oxide Solution)	定量 NMR 用	1mL×5A	18,000

### 秤量皿

低質量 (約 70mg) で帯電しにくい、繰り返し性が良く精密な秤量が可能です。

コード No.	品名	容量	希望納入価格 (円)
013-26351	Aluminium Weighing Dishes (φ8mm, 0.05mL)	100個	20,000

### NMRチューブ

定量 NMR に最適なハイグレードタイプです。

コード No.	品名	規格	容量	希望納入価格 (円)
297-47951	NMR Test Tube HG-Type (φ4.951~4.965mm×7インチ)	NMR 用	10本	4,000
293-47953			100本	38,000
295-48351	NMR Test Tube HG-Type (φ4.951~4.965mm×8インチ)	NMR 用	10本	4,400
291-48353			100本	41,800
295-35161	NMR Test Tube SHG-Type (φ4.951~4.965mm×7インチ)	NMR 用	10本	13,000
291-35163			10本×10	110,000

### NMR装置

日本電子(株)の NMR 装置を取扱っています。

品名	メーカー	容量	希望納入価格 (円)
JNM-ECZ400S FT-NMR	日本電子(株)	1台	照会

Ref: 2 ~ 10°C 保存    F: -20°C 保存    30: -80°C 保存    150: -150°C 保存    表示がない場合は室温保存です。その他の略号は、巻末をご参照下さい。掲載内容は、2017年10月時点での情報です。最新情報は、siyaku.com (http://www.siyaku.com/) をご参照下さい。

## 電池研究用

Wako

### カーボネート溶媒

当社では、リチウムイオン電池の電解液として使用される溶媒を取り揃えています。

#### 特長

- 水分、塩化物、金属含量を保証

#### 規格例

規格項目	規格値	
	炭酸ジエチル【DEC】 <chem>H3C2O2OC2H5</chem>	炭酸ジメチル【DMC】 <chem>H3CO2OCH3</chem>
含量(cGC)	98.0%以上	98.0%以上
水分	20ppm以下	20ppm以下
酸(H <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> として)	0.02%以下	0.1%以下
塩化物	5ppm以下	5ppm以下
Ca	1.0ppm以下	1.0ppm以下
Fe		
K		
Na		

規格項目	規格値	
	炭酸エチレン【EC】 <chem>C1OC1=O</chem>	炭酸フルオロエチレン【FEC】 <chem>C1OC(F)C1=O</chem>
含量(cGC)	98.0%以上	99.5%以上
水分	50ppm以下	200ppm以下
酸(H <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> として)	—	—
塩化物	5ppm以下	—
Ca	1.0ppm以下	—
Fe		—
K		—
Na		—

規格項目	規格値
	炭酸プロピレン【PC】 <chem>CC1OC1=O</chem>
含量(cGC)	98.0%以上
水分	20ppm以下
酸(H <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> として)	—
塩化物	5ppm以下
Ca	1.0ppm以下
Fe	
K	
Na	

コードNo.	品名	規格	容量	希望納入価格(円)
047-31921	Diethyl Carbonate	電池研究用	100mL	3,000
049-31925	【DEC】		500mL	6,000
044-31931	Dimethyl Carbonate	電池研究用	100mL	4,500
046-31935	【DMC】		500mL	6,200
057-08491	Ethylene Carbonate	電池研究用	100g	3,600
059-08495	【EC】		500g	6,000
NEW 063-06711	Fluoroethylene Carbonate	電池研究用	5g	7,900
NEW 061-06712	【FEC】		25g	23,000
169-25201	Propylene Carbonate	電池研究用	100mL	2,950
161-25205	【PC】		500mL	4,900

#### 関連商品

##### 重水素置換カーボネート溶媒

重水素で標識した溶媒を電解液に混合し、充放電後の分解物を分析することで、電池内での電解液の挙動を確認することができます。

コードNo.	品名	規格	容量	希望納入価格(円)
048-32291	Diethyl Carbonate-d <sub>10</sub>	有機合成用	1g	21,000
044-32293	【DEC-d <sub>10</sub> 】		5g	80,000
041-33141	1,2-Dimethoxyethane-d <sub>10</sub>	有機合成用	250mg	11,000
047-33143	【DME-d <sub>10</sub> 】		1g	30,000
041-32301	Dimethyl Carbonate-d <sub>6</sub>	有機合成用	1g	15,000
047-32303	【DMC-d <sub>6</sub> 】		5g	51,000
051-08911	Ethylene Carbonate-d <sub>4</sub>	電池研究用	250mg	14,000
057-08913	【EC-d <sub>4</sub> 】		1g	41,000
168-26131	Propylene Carbonate-d <sub>6</sub>	電池研究用	250mg	12,000
164-26133	【PC-d <sub>6</sub> 】		1g	35,000

## 固体超強酸触媒

Wako

### 硫酸化ジルコニア (SO<sub>4</sub>/ZrO<sub>2</sub>)

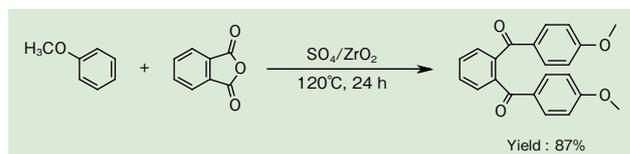
硫酸化ジルコニアは、固体でありながら硫酸より高い酸強度を有しており、エステル化、アシル化、異性化、エーテルの合成、アルキル化、不均化、重合、分解など、さまざまな酸触媒反応に優れた触媒性能を示します。

#### 特長

- 硫酸より高い強酸度
- 高温条件下の反応でも使用可能
- 装置腐食性が低い
- 廃酸処理が不要

#### 反応例

##### アシル化反応



[次頁に続く]

Ref: 2 ~ 10°C保存 [E]: -20°C保存 [80]: -80°C保存 [150]: -150°C保存 表示がない場合は室温保存です。その他の略号は、巻末をご参照下さい。掲載内容は、2017年10月時点での情報です。最新情報は、siyaku.com (http://www.siyaku.com/) をご参照下さい。

## 注意事項

- 本品の触媒活性を十分に発揮させるため、使用直前に、加熱乾燥することをおすすめします。
- 吸湿性があるため、使用後は湿気を避けて保管下さい。

## 【参考文献】

1) Matsuhashi, H. *et al.*: *Appl. Catal. A Gen.*, **360**, 89 (2009).

コードNo.	品名	規格	容量	希望納入価格(円)
262-02201	Zirconia, Sulfated	和光一級	5g	7,000
262-02202			25g	15,000

## 塩化水素ガスを用いる反応に

### 酸性有機溶媒

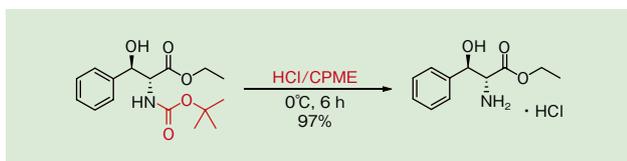
本品は、有機溶媒に塩化水素ガスを溶かして調製した酸性有機溶媒です。保護基の脱保護反応や塩酸塩の合成など強酸を用いる反応に使用できます。

ご希望の容量、濃度、溶媒がございましたら特注調液を承りますので、当社営業員または代理店にお問合せ下さい。

## 特長

- あらかじめ塩化水素を有機溶媒に溶かしているため、塩化水素のガスボンベが不要
- 医薬品・農薬の中間体となる塩酸塩の合成が可能

## 反応例



## 【参考文献】

1) Watanabe, K., Kogoshi, N., Miki, H. and Torisawa, Y.: *Synth. Commun.*, **39**, 2008 (2009).

コードNo.	品名	規格	容量	希望納入価格(円)
080-10415	Hydrogen Chloride, Cyclopentyl Methyl Ether Solution (abt. 2mol/L) <small>Ref. ①</small>	有機合成用	500mL	13,000
087-10425	Hydrogen Chloride, 1,4-Dioxane Solution (abt. 4mol/L) <small>Ref. ① ② ③</small>	有機合成用	500mL	照会
083-10405	Hydrogen Chloride, Ethyl Acetate Solution (abt. 4mol/L) <small>Ref. ① ② ③</small>	有機合成用	500mL	9,800
084-10435	Hydrogen Chloride, 2-Propanol Solution (abt. 2mol/L) <small>Ref. ① ②</small>	有機合成用	500mL	照会

## 合成甘味料の分析に

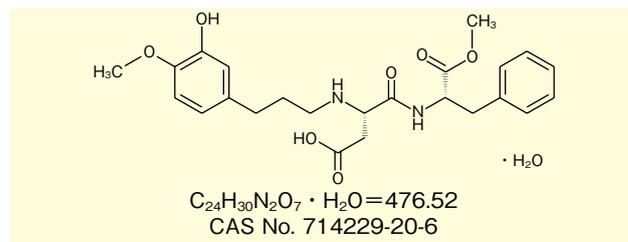
### アドバンテーム標準品

アドバンテームは、砂糖の20,000～40,000倍の甘さを持つといわれている高甘度合成甘味料です。アドバンテーム及びその主要な代謝産物であるアドバンテームアシッドは、第9版食品添加物公定書に記載予定です。

食品成分中のアドバンテームの分析に適した標準品をご紹介します。

## 製品仕様

- 含量（無水物換算）：99.0%以上
- 外観：白色～黄白色、粉末
- 化学名：Methyl N-[3-(3-Hydroxy-4-methoxyphenyl)propyl]-L-aspartyl-L-phenylalaninate Monohydrate



コードNo.	品名	規格	容量	希望納入価格(円)
018-26801	Advantame Standard <small>Ref.</small>	食品分析用	100mg	10,000

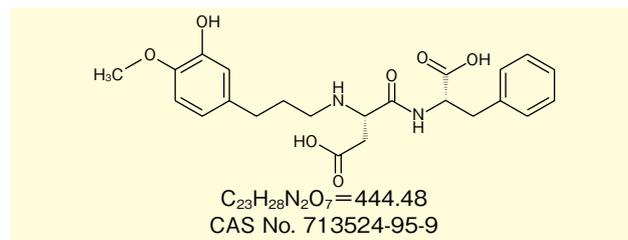
## 関連商品

### アドバンテームアシッド標準品

アドバンテームアシッドは、アドバンテームの加水分解物であり、主要代謝物の一つです。

## 製品仕様

- 含量：94.0%以上
- 外観：白色～黄色、粉末
- 化学名：N-[3-(3-Hydroxy-4-methoxyphenyl)propyl]-L-α-aspartyl-L-phenylalanine
- 別名：ANS 9801-acid



コードNo.	品名	規格	容量	希望納入価格(円)
015-26811	Advantame Acid Standard <small>Ref.</small>	食品分析用	100mg	10,000

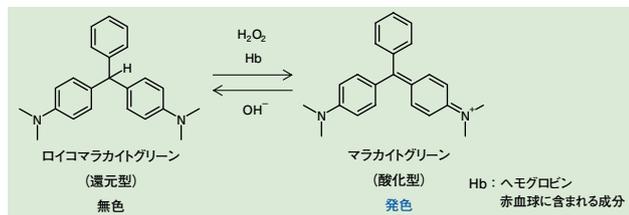
## 血痕判定用試薬

Wako

### ロイコマラカイトグリーン反应用試薬

ロイコマラカイトグリーン反応は、血液の判定において反応特異性が高く、誤判定が少ない血痕予備検査法として知られています。この反応は、無色のロイコマラカイトグリーンが血液中のヘモグロビンに含まれるヘムによって触媒される酸化還元反応により酸化され、青緑色のマラカイトグリーンに変換されるという機序によって起こります。

本品は、反応液を用時調製する従来法に対して、反応液の調液が不要ですぐに使用可能な血液判定用試薬です。

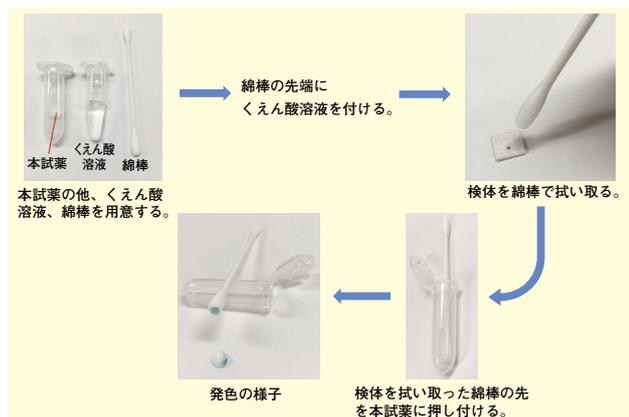


### 特長

- 反応液の調製不要
- 簡単な操作
- 1回分ごとの包装で、携帯に便利
- 従来法（反応液を用時調製）と同等の性能

### 使用方法

1. 1mol/Lくえん酸溶液を調製する。
  2. 綿棒の先に1mol/Lくえん酸溶液を付ける。
  3. 1mol/Lくえん酸溶液で湿らせた綿棒を使って検体を拭い取る。
  4. 検体を拭い取った綿棒の先を、本試薬に押し付ける。
  5. 本試薬の発色を観察する。
- ※発色は、おおよそ数秒後から開始されます。ただし、検体により差があります。



コード No.	品名	規格	容量	希望納入価格 (円)
126-06711	Leucomalachite Green Reaction Reagent [S leuco]	法医学研究用	100本	25,000

### 関連商品

コード No.	品名	規格	容量	希望納入価格 (円)
124-06511	Luminol Reaction Reagent Set	生化学用	3g×5包	20,000

## 追加品目のお知らせ

Wako

### ポジティブリスト関連標準品

当社では、ポジティブリスト制度の対象となる農薬標準品、動物用医薬品標準品を品揃えしています。

下記品目を新たに発売しました。

### 農薬標準品

- 2,4-DB-イソオクチル標準品
- 2,4-PA-ブトキシエチル標準品
- 2,4-PA-エチル標準品
- 2,4-PA-イソプロピル標準品
- キンクロラック代謝産物 C 標準品
- テブフロキン標準品
- テブフロキン代謝産物 M1 標準品

### 動物用医薬品標準品

- アザペロール標準品
- クロルマジノン標準品
- イプロニダゾール代謝産物 B 標準品

コード No.	品名	規格	容量	希望納入価格 (円)
049-34301	2,4-DB-isooctyl Standard	残留農薬試験用	50mg	14,000
163-28141	2,4-PA-butoxyethyl Standard	残留農薬試験用	100mg	14,000
160-28151	2,4-PA-ethyl Standard	残留農薬試験用	100mg	14,000
166-28131	2,4-PA-isopropyl Standard	残留農薬試験用	100mg	14,000
174-00771	Quinclorac Metabolite C Standard	残留農薬試験用	100mg	30,000
206-20621	Tebufloquin Standard	残留農薬試験用	100mg	25,000
203-20631	Tebufloquin Metabolite M1 Standard	残留農薬試験用	100mg	25,000
015-26791	Azaperol Standard	高速液体クロマトグラフ用	100mg	20,000
034-25141	Chlormadinone Standard	高速液体クロマトグラフ用	100mg	30,000
095-07271	Ipronidazole Metabolite B Standard	高速液体クロマトグラフ用	20mg	55,000

随時、当社 HP のリストに発売品目を追加・更新していきます。詳細は、当社 HP をご覧下さい。

当社試薬 HP → 分析 → 食品分析「ポジティブリスト」

和光 ポジティブリスト

検索

## 新規取扱メーカーのご紹介

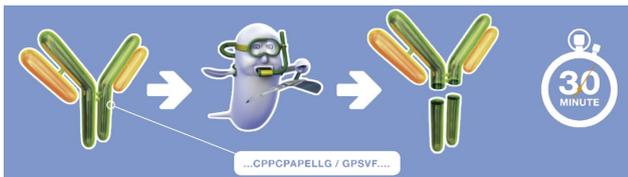
バイオ医薬研究用 酵素・試薬キット GENOVIS

### SmartEnzymes™ Genovis AB

Genovis 社は、抗体医薬研究用のバイオ医薬プロセス酵素 SmartEnzymes™ を開発・製造しているスウェーデン（ルンド）のメーカーです。モノクローナル抗体、ADCs (antibody drug conjugates)、Fc 融合タンパク質、バイオシミラーなどのバイオ医薬品の研究開発に使用できるユニークな酵素（プロテアーゼ、グリコシダーゼ）、試薬キットをラインアップしています。

#### FabRICATOR®

本品は、IgG のヒンジ領域直下を特異的に切断するプロテアーゼです。さまざまな生物種の IgG アイソタイプに使用でき、消化反応約 30 分で F(ab')<sub>2</sub> と Fc を生成できます。



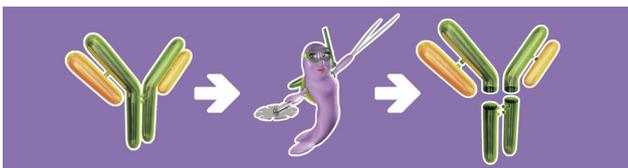
#### 〈切断サイト〉

Species & Subclasses	Native IgG	Species & Subclasses	Native IgG
Human IgG1	..CPAPELLG / GPSVF..	Mouse IgG2b	X
Human IgG2	..CPAPPVA / GPSVF..	Mouse IgG3	..CPPGNILG / GPSVF..
Human IgG3	..CPAPELLG / GPSVF..	Rat IgG2b	..CPVPELLG / GPSVF..
Human IgG4	..CPAPELLG / GPSVF..	Rhesus Monkey	..CPAPELLG / GPSVF..
Mouse IgG1	X	Rabbit	..CPPPELLG / GPSVF..
Mouse IgG2a	..CPAPNLLG / GPSVF..		

X = no digestion confirmed

#### FabULOUS®

本品は、IgG のヒンジ領域上部を特異的に切断するプロテアーゼです。さまざまな生物種の IgG アイソタイプに使用でき、消化反応約 60 分で Fab と Fc を生成できます。また、Fab 精製用のマウス L 鎖-Kappa 特異的のカラムを含むキットもラインアップしています。



#### 〈切断サイト〉

Species & Subclasses	Digestion under reduced condition. * Primary digestion site.	Species & Subclasses	Digestion under reduced condition. * Primary digestion site.
Human IgG1	..KTHT/CPPCPAPA.*	Mouse IgG2b	Yes (Site N.D.)
Human IgG2	Yes (Site N.D.)	Mouse IgG3	Yes (Site N.D.)
Human IgG3	Yes (Site N.D.)	Rat IgG2b	Yes (Several sites)
Human IgG4	X	Rhesus Monkey	N.D.
Mouse IgG1	..KPCIC/TVPEVS..	Rabbit	..KPT / CPPPE.*
Mouse IgG2a	Yes (Site N.D.)		

X = no digestion confirmed  
N.D. = Not determined

#### GlyCLICK™

本品は、Fc グライカンリモデリング反応とクリックケミストリーにより目的分子（ビオチン、deferoxamine (DFO), Azide 活性化など）の部位特異的修飾が可能です。

GlycINATOR® (EndoS2) による脱糖鎖反応後、galactosyl transferase, GalT (Y289L) により、GlcNAc を GalNAz 残基に変換し、この azide 基をリガンドとして dibenzocyclooctyne (DIBO) によるクリック反応で Fc 領域特異的に目的分子で修飾します。



#### その他の製品ラインアップ

##### ● IgG Proteases

- **FragIT™**: FabRICATOR® 固定化ビーズ充てんスピンカラム
- **FabRICATOR® Z**: FabRICATOR® のホモログプロテアーゼ
- **GingisKHAN®**: ヒト IgG1 ヒンジ領域上部 K223-T224 を認識するプロテアーゼ
- **FabALACTICA™**: ヒト IgG1 ヒンジ領域上部 KSCDKT/HTCPPCP を認識するプロテアーゼ

##### ● IgG Glycosidases

- **GlycINATOR®**: IgG 特異的エンドグリコシダーゼ
- **Immobilized GlycINATOR®**: GlycINATOR® 固定化ビーズ充てんスピンカラム
- **IgGZERO®**: 血清存在下でも使用可能な IgG 特異的エンドグリコシダーゼ
- **deGlycIT™ (Immobilized IgGZERO®)**: IgGZERO® 固定化ビーズ充てんカラム

##### ● Site-specific Endopeptidase

- **GingisREX™**: アルギニン C 末端側を特異的に認識・切断するプロテアーゼ

##### ● O-Glycan Elimination

- **OglyZOR™**: 糖タンパク質からコア1、コア3 O 結合型糖鎖を除去するエンドグリコシダーゼ
- **OpeRATOR™**: 糖タンパク質の O 結合型糖鎖修飾部位のセリンまたはスレオニンの N 末端を認識するプロテアーゼ
- **SialEXO™**: O 結合型、N 結合型タンパク質からシアル酸を除去するシアリダーゼ

詳細情報及びその他の製品情報は当社 HP をご覧下さい。

<http://www.wako-chem.co.jp/siyaku/product/life/genovis/index.htm>

## 簡単に神経細胞を回収可能

Wako

### 神経細胞用分散液

本品は、ラットやマウスの中枢神経組織から神経細胞を分散、回収することができます。3種類の溶液（酵素液、分散液、除去液）で構成されており、調液の手間なく、高い生存率を保持したまま簡単に神経細胞を回収することができます。

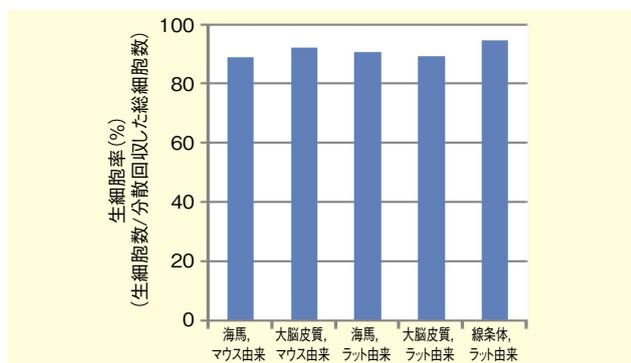
本品を用いて Neurosphere を分散することで接着培養時に死細胞が少なく、観察しやすい状態で神経細胞を培養できることが新たに分かりました。

### 特長

- 中枢神経組織や Neurosphere から簡単に安定して神経細胞を回収可能
- Ready-to-Use

### データ

#### 凍結神経細胞の分散時の生細胞率

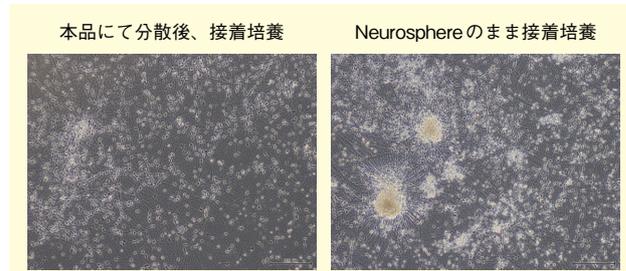


細胞名	総細胞数 (cells/vial)	生細胞数 (cells/vial)	生細胞率 (%)
海馬, マウス(胎生16日)由来	4.32 × 10 <sup>5</sup>	3.83 × 10 <sup>5</sup>	89
	6.64 × 10 <sup>6</sup>	6.09 × 10 <sup>6</sup>	92
	1.37 × 10 <sup>6</sup>	1.24 × 10 <sup>6</sup>	90
大脳皮質, マウス(胎生15日)由来	1.32 × 10 <sup>7</sup>	1.17 × 10 <sup>7</sup>	89
	1.32 × 10 <sup>7</sup>	1.17 × 10 <sup>7</sup>	89
	2.73 × 10 <sup>6</sup>	2.58 × 10 <sup>6</sup>	95
海馬, ラット(胎生19日)由来	1.32 × 10 <sup>7</sup>	1.17 × 10 <sup>7</sup>	89
	1.32 × 10 <sup>7</sup>	1.17 × 10 <sup>7</sup>	89
	2.73 × 10 <sup>6</sup>	2.58 × 10 <sup>6</sup>	95
大脳皮質, ラット(胎生17日)由来	1.32 × 10 <sup>7</sup>	1.17 × 10 <sup>7</sup>	89
	1.32 × 10 <sup>7</sup>	1.17 × 10 <sup>7</sup>	89
	2.73 × 10 <sup>6</sup>	2.58 × 10 <sup>6</sup>	95
線条体, ラット(胎生17日)由来	1.32 × 10 <sup>7</sup>	1.17 × 10 <sup>7</sup>	89
	1.32 × 10 <sup>7</sup>	1.17 × 10 <sup>7</sup>	89
	2.73 × 10 <sup>6</sup>	2.58 × 10 <sup>6</sup>	95

各種脳組織を凍結融解し、本品にて細胞を分散、回収して生細胞率を確認した。

本品を用いることで凍結脳組織から約90%の高い生細胞率で細胞を回収可能であると確認できた。

## Neurosphereの分散



正常ヒトiPS細胞より Neurosphere を形成し、接着培養、神経細胞への分化を行った。

本品を用いることで Neurosphere のまま接着培養した条件と比較して死細胞が少なく、神経細胞を観察しやすい状態で培養できることが確認できた。

(データご提供：東京慈恵会医科大学 再生医学研究部 岡野ジェイムス洋尚先生、田原 麻由様、東京慈恵会医科大学 小児科学講座 日暮 憲道先生)

### セット内容

	神経細胞用分散液	神経細胞用分散液S
酵素液	5.0mL × 4本	2.5mL × 10本
分散液	5.0mL × 4本	2.5mL × 10本
除去液	5.0mL × 4本	2.5mL × 10本

コードNo.	品名	規格	容量	希望納入価格(円)
291-78001	Neuron Dissociation Solutions	細胞培養用	4セット	31,100
297-78101	Neuron Dissociation Solutions S	細胞培養用	10セット	50,000

### 関連商品

#### 凍結神経細胞

コードNo.	品名	規格	容量	希望納入価格(円)
030-24881	Cerebral Cortex, from Mouse (embryonic day 15)	細胞培養用	2胎児/本	43,800
033-24871	Cerebral Cortex, from Rat (embryonic day 17)	細胞培養用	2胎児/本	50,000
036-24861	Cerebral Striatum, from Rat (embryonic day 17)	細胞培養用	2胎児/本	50,000
082-10291	Hippocampus, from Mouse (embryonic day 16)	細胞培養用	2.5胎児/本	56,300
085-10301	Hippocampus, from Rat (embryonic day 19)	細胞培養用	2.5胎児/本	62,500

#### 神経細胞用培地

コードNo.	品名	規格	容量	希望納入価格(円)
148-09671	Neuron Culture Medium	細胞培養用	100mL	50,000

## 品目追加

### サイトカイン

Wako

サイトカイン 2 品目が追加となりました。

#### ■ 骨形成因子 7, ヒト, 組換え体

骨形成因子 7 (Bone Morphogenetic Protein 7; BMP-7) は、TGF- $\beta$  スーパーファミリーに属する成長因子です。骨誘導因子-1 (Osteogenic Protein-1; OP-1) と呼ばれ、コラーゲンなど特定の骨誘導キャリアーとともに骨欠損治療への応用が研究されています。BMP-7 は発生過程の組織で広く発現しており、BMP-7 ノックアウトマウスでは、眼、腎臓、骨格形成などに異常が認められ、出生後致死となります。

#### ■ 可溶性インターロイキン-6レセプター $\alpha$ , ヒト, 組換え体

インターロイキン-6 (Interleukin-6; IL-6) は、B 細胞の活性化などに関わる炎症性サイトカインです。IL-6 は IL-6 レセプター $\alpha$  (IL-6R $\alpha$ ) と複合体を形成し、gp130 と会合して細胞内へのシグナル伝達を行います。本品は、細胞外領域から成り、低濃度で IL-6 活性のアゴニストとして作用します。

コード No.	品名	略名	規格	容量	希望納入価格 (円)
026-19171	Bone Morphogenetic Protein 7, Human, recombinant	BMP-7	細胞生物学用	10 $\mu$ g	39,000
092-07301	Interleukin-6 Receptor $\alpha$ soluble, Human, recombinant	sIL-6R $\alpha$	細胞生物学用	20 $\mu$ g	39,000

#### 大入り包装

サイトカインのお得な大入り包装を多数揃えています。使用量の多い方におすすめです。アニマルフリーサイトカイン<sup>※</sup>も豊富に取り揃えています。

※アニマルフリーサイトカインとは、製造工程において動物由来原料を使用せずに *E. coli* を培養し、発現させ精製したサイトカインです。動物に起因するウイルスの混入リスクを低減させた製品です。

サイトカイン大入り包装の製品一覧は、当社 HP をご覧下さい。

[http://www.wako-chem.co.jp/siyaku/product/life/cytokine\\_oo/index.htm](http://www.wako-chem.co.jp/siyaku/product/life/cytokine_oo/index.htm)

## エンドトキシン測定の多検体処理に最適！ マイクロプレート法 エンドトキシン測定システム MPR エンドトキシン測定システム for BT

Wako

本システムは、吸光リーダー ELx808IU と標準装備の解析ソフトウェア「トキシマスター<sup>®</sup>」を用いたエンドトキシン測定専用システムです。医薬品、医療機器の品質管理などさまざまなエンドトキシン試験に使用できます。



### 特長

- 多検体の同時測定が可能 (96 ウェルマイクロプレート対応)
- ライセート試薬の選択により、比色法/比濁法に適用
- 日本/米国/欧州の薬局方に沿った試験をサポート
- 厚生労働省 ER/ES 指針/FDA 21 CFR Part 11 に対応 (ER/ES セットのみのみ)

### ソフトウェア

- 解析ソフトウェア「トキシマスター<sup>®</sup>」  
使いやすい画面設計で簡便かつ正確な測定をサポート



- ER/ES 指針/FDA 21 CFR Part 11 への主な対応項目

- ・ユーザー認証・電子署名
- ・ユーザー毎の操作機能制限
- ・監査証跡

#### <その他の機能>

データ変更時は上書きされず新たなデータとして記録登録、設定変更時は変更事由の入力、バックアップ、復元などが可能

コード No.	品名	内容量	希望納入価格 (円)
299-35441	MPR エンドトキシン測定システム ER/ES セット for BT [セット内容] ・吸光リーダー ELx808IU ・Toxmaster <sup>®</sup> ER/ES MPR ・パソコン (サーバー兼クライアント) ・検証資料 ・IQ/OQ サービス	1 式	3,100,000
292-35431	MPR エンドトキシン測定システム 標準セット for BT [セット内容] ・吸光リーダー ELx808IU ・Toxmaster <sup>®</sup> MPR ・パソコン	1 式	1,900,000

詳細情報は当社専用 HP をご覧下さい。

Wako LAL システム : [www.wako-chem.co.jp/lal/](http://www.wako-chem.co.jp/lal/)

☑: 2 ~ 10°C 保存    ☒: 20°C 保存    ☓: 80°C 保存    ☔: 150°C 保存    表示がない場合は室温保存です。その他の略号は、巻末をご参照下さい。  
掲載内容は、2017 年 10 月時点での情報です。最新情報は、siyaku.com (<http://www.siyaku.com/>) をご参照下さい。

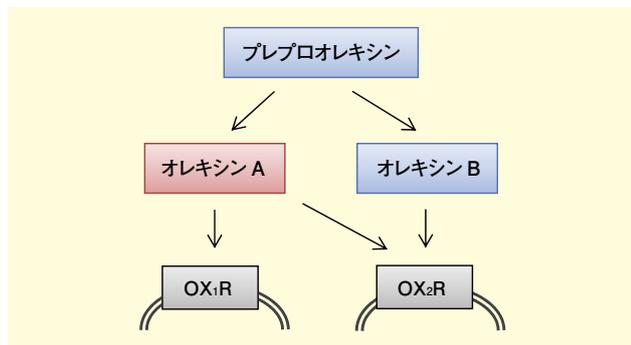
## 睡眠研究に

Wako

### オレキシンA ELISAキットワコー

オレキシンは、摂食及び睡眠・覚醒を制御する神経ペプチドです。オレキシンには同一の前駆体（プレプロオレキシン）から切り出されてできるオレキシンAとオレキシンBの2種があり、オレキシン受容体に結合して作用します。オレキシン受容体にはOX<sub>1</sub>RとOX<sub>2</sub>Rの2種があり、OX<sub>1</sub>RはオレキシンAへの親和性がオレキシンBより約50倍高く、OX<sub>2</sub>RはオレキシンAとBで同等の親和性を示すと報告されています。特にOX<sub>2</sub>Rは、睡眠・覚醒の制御に重要であると考えられています。睡眠障害であるナルコレプシー患者において、脳脊髄液中のオレキシンAの顕著な低下が見られたことから、オレキシンは覚醒・睡眠制御において重要と考えられています。

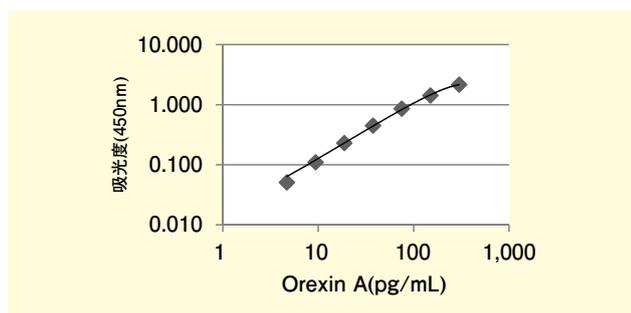
本品は、ヒト脳脊髄液及びラット脳脊髄液、血清、血漿中のオレキシンAを簡便に測定可能なELISAキットです。オレキシンBには交差反応しません。



### 基本性能

検量線範囲	4.69 ~ 300pg/mL
測定対象検体	ヒト脳脊髄液、ラット脳脊髄液、ラット血漿、ラット血清
必要検体量	25 μL
測定時間	約 20 時間
同時再現性	CV < 5%
日差再現性	CV < 16%

### 〈検線量〉



### 測定例

(n=2)

検体	測定値 (pg/mL)	検体	測定値 (pg/mL)
ヒト脳脊髄液①	21.48	ラット脳脊髄液②	126.06
ヒト脳脊髄液②	18.37	ラット脳脊髄液③	116.04
ヒト脳脊髄液③	16.50	ラット血漿①	1.45
ラット脳脊髄液①	47.47	ラット血漿②	2.28

### キット内容

- 抗体固相化96ウェルプレート 1プレート
- オレキシンA標準品 300pg × 1本
- ビオチン標識抗オレキシンA抗体 12mL × 1本
- ペルオキシダーゼ結合ストレプトアビジン溶液 12mL × 1本
- TMB溶液 12mL × 1本
- 緩衝液 20mL × 1本
- 反応停止液 12mL × 1本
- 濃縮洗浄液 (20 ×) 50mL × 1本
- プレートシール 4枚

コードNo.	品名	規格	容量	希望納入価格 (円)
293-79801	Orexin A ELISA Kit Wako <sup>Ref</sup>	免疫化学用	96回用	95,000

### 関連商品

コードNo.	メーカーコード	品名	規格 / メーカー	容量	希望納入価格 (円)
<b>オレキシン</b>					
159-03161	-	Orexin A (Human) <sup>F°</sup>	細胞生物学用	0.1mg	20,000
337-44821	4482-S	Orexin A (Human, 17-33) <sup>F°</sup>	（株）ペプチド研究所	0.1mg	8,000
156-03171	-	Orexin B (Human) <sup>F°</sup>	細胞生物学用	0.1mg	14,500
153-03181	-	Orexin B (Rat, Mouse) <sup>F°</sup>	細胞生物学用	0.1mg	14,500
<b>オレキシン受容体アゴニスト</b>					
013-24771	-	[Ala <sup>11</sup> , D-Leu <sup>15</sup> ]-Orexin B <sup>F°</sup>	細胞生物学用	1mg	53,000
194-17221	-	SB-668875 <sup>F°</sup>	細胞生物学用	1mg	65,000
<b>オレキシン受容体アンタゴニスト</b>					
104-00171	-	-	-	10mg	25,000
100-00173	-	JNJ 10397049 <sup>Ref</sup>	細胞生物学用	50mg	99,000
108-00174	-	-	-	250mg	370,000
585-82244	1960/1	-	-	1mg	24,000
581-82241	1960/10	SB 334867	Tocris	10mg	50,000
587-82243	1960/50	-	-	50mg	244,000
196-17421	-	-	-	5mg	11,000
192-17423	-	SB-408124 <sup>F°</sup>	細胞生物学用	25mg	39,000
192-17761	-	-	-	5mg	23,000
198-17763	-	SB-674042 <sup>F°</sup>	細胞生物学用	25mg	90,000
516-76461	3371/10	-	-	10mg	54,000
512-76463	3371/50	TCS OX2 29 <sup>Ref</sup>	Tocris	50mg	235,000
513-96491	3818/10	-	-	10mg	41,000
-	3818/50	TCS 1102	Tocris	50mg	184,000

<sup>Ref</sup>…2 ~ 10°C保存 <sup>F°</sup>…-20°C保存 <sup>30°</sup>…-80°C保存 <sup>150°</sup>…-150°C保存 表示がない場合は室温保存です。その他の略号は、巻末をご参照下さい。掲載内容は、2017年10月時点での情報です。最新情報は、siyaku.com (http://www.siyaku.com/) をご参照下さい。

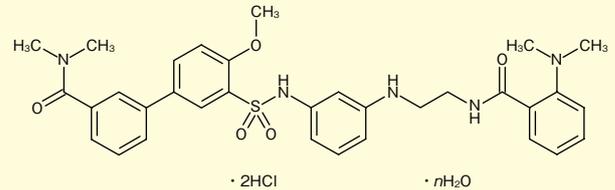
## 非ペプチド性オレキシン2受容体アゴニスト Wako

### YNT-185・2HCl

YNT-185・2HClは、非ペプチド性のオレキシン2受容体(OX<sub>2</sub>R)アゴニストです。ナルコレプシーモデルマウスの脳室内にオレキシンを投与することにより、症状が改善されることが報告されていますが、オレキシンはペプチドのため、血液脳関門を通過できず、脳内に投与しない限り、治療効果は期待できません。YNT-185・2HClは、マウス脳室内投与、腹腔内投与のいずれの場合においても、覚醒時間の延長効果を示し、またナルコレプシーモデルマウスの症状を改善すると報告されています。

#### 製品概要

- 外観：白色～わずかにうすい褐色、結晶性粉末～粉末
- 含量 (HPLC)：98.0% 以上
- 溶解性：生理食塩水 (pH 2.4<sup>\*</sup>)…1.3mol/L<sup>1)</sup>  
※本品溶解時の至適 pH は、約 2.4 以下です。
- EC<sub>50</sub>：OX<sub>2</sub>R…0.028 μmol/L (free base)<sup>1)</sup>  
OX<sub>1</sub>R…2.750 μmol/L (free base)<sup>1)</sup>



· 2HCl                      · nH<sub>2</sub>O  
 $C_{33}H_{37}N_5O_5S \cdot 2HCl \cdot nH_2O$   
 (C<sub>33</sub>H<sub>37</sub>N<sub>5</sub>O<sub>5</sub>S · 2HCl = 688.66)  
 CAS No. 1804978-82-2 (無水物)

#### 【参考文献】

- 1) Nagahara, T., Saitoh, T., Kutsumura, N., Irukayama-Tomobe, Y., Ogawa, Y., Kuroda, D., Gouda, H., Kumagai, H., Fujii, H., Yanagisawa, M. and Nagase, H. : *J. Med. Chem.*, **58**, 7931 (2015).
- 2) Irukayama-Tomobe, Y., Ogawa, Y., Tominaga, H., Ishikawa, Y., Hosokawa, N., Ambai, S., Kawabe, Y., Uchida, S., Nakajima, R., Saitoh, T., Kanda, T., Vogt, K., Sakurai, T., Nagase, H. and Yanagisawa, M. : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **114** (22), 573 (2017).

コードNo.	品名	規格	容量	希望納入価格(円)
254-00641	YNT-185 Dihydrochloride	細胞生物学用 E°	5mg	14,000
250-00643	Hydrate		100mg	140,000

## 第33回 Wako ワークショップ 「オートファジーの解析法と最新の話題」

日 時：平成 29 年 11 月 16 日 (木)  
 会 場：全電通ホール (御茶ノ水) <http://www.zhall.or.jp/>  
 〒101-0062 東京都千代田区神田駿河台 3 丁目 6 TEL 03-3219-2211 (代)  
 総合企画：水島 昇先生 (東京大学 大学院医学系研究科)  
 主催：和光純薬工業株式会社  
 参加費：無料  
 定員：250 名 (定員になり次第締め切らせていただきます)  
 参加申し込み：◆オンラインでのお申し込み：<https://labchem.wako-chem.co.jp/workshop/>  
 ◆FAX でのお申し込み：上記ホームページに掲載しています案内パンフレットの裏面をご利用の上、FAX 下さい。  
 FAX：0120-052-806  
 問合せ先：和光純薬工業株式会社 Wako ワークショップ係 TEL 06-6203-1788

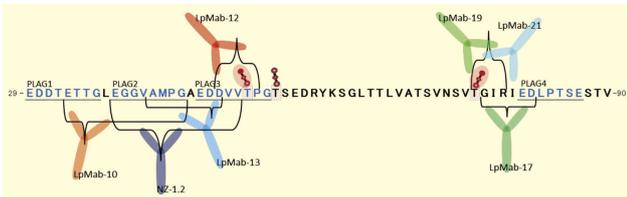
#### 講演プログラム

10:00	開会挨拶	和光純薬工業株式会社
10:10	「オートファジーフラックス計測とノックアウトマウス表現型」	東京大学 大学院医学系研究科 分子生物学分野 教授 水島 昇
11:05	「オートファジーの形態学：電顕と免疫組織」	福島県立医科大学 医学部 解剖・組織学講座 教授 和栗 聡
12:00	休 憩	
13:00	「ゼノファジーとリソファジー」	大阪大学 大学院医学系研究科 遺伝学教室 准教授 濱崎 万穂
13:40	「マイトファジーの誘導・検出と病態生理的意義」	東京都医学総合研究所 ユビキチンプロジェクト 松田 憲之
14:20	「酵母オートファジーアッセイと初期因子の機能」	東京大学 大学院医学系研究科 分子生物学分野 講師 山本 林
15:00	コーヒーブレイク	
15:20	「オートファジー解析用の特殊蛍光プローブ」	理化学研究所 脳科学総合研究センター 片山 博幸
16:00	「オートファジーとがん代謝解析：メタボローム解析からわかったこと」	新潟大学 大学院医歯学総合研究科 遺伝子制御講座 分子生物学分野 教授 小松 雅明
16:50	閉会挨拶	和光純薬工業株式会社

## リンパ管・腫瘍細胞マーカータンパク質 ポドプラニンの検出に 抗ポドプラニン、モノクローナル抗体

Wako

膜一回貫通型糖タンパク質であるポドプラニン (PDPN) は、リンパ内皮や肺胞上皮のマーカーとして利用されています。また、脳腫瘍、悪性中皮腫、精巣腫瘍、卵巣がんや種々の扁平上皮がんなどで過剰発現すること、腫瘍細胞の浸潤や転移に関与すること、発現の強弱が腫瘍の予後や浸潤性と一定の相関性を示すことが知られています。



ポドプラニン配列上の各抗体エピトープ

### ■ 抗ポドプラニン、モノクローナル抗体(LpMab-19)

本品は、PLAG4 領域近辺の Thr76-Arg79 を認識する抗体です。認識には Thr76 への糖鎖付加が必須となり、糖ペプチドを認識する抗体です。膠芽細胞腫、口腔扁平上皮がん及び正常細胞のリンパ内皮細胞、肺胞 I 型細胞及び腎糸球体上皮細胞のポドプラニン検出に使用できます。

- 免疫動物：マウス
- 抗体サブクラス：IgG 2b・κ
- アプリケーション：ELISA、FCM、IHC

### ■ 抗ポドプラニン、モノクローナル抗体(LpMab-21)

本品は、PLAG4 領域近辺の Thr76-Arg79 を認識する抗体です。認識には Thr76 へのシアル酸糖鎖付加が必須となり、糖ペプチドを認識する抗体です。また、ADCC 活性、CDC 活性があります。膠芽細胞腫、口腔扁平上皮がん、精上皮腫及び正常細胞のリンパ内皮細胞のポドプラニン検出に使用できます。しかし、LpMab-19 など他の抗ポドプラニン抗体と異なり、肺胞 I 型細胞及び腎糸球体上皮細胞のポドプラニンを認識しません。

- 免疫動物：マウス
- 抗体サブクラス：IgG 2a・κ
- アプリケーション：ELISA、FCM、IHC、ADCC、CDC

コード No.	品名	規格	容量	希望納入価格 (円)
NEW 017-27471	Anti Human Podoplanin, Monoclonal Antibody (LpMab-19)	免疫化学用 [F°]	100µg	34,000
NEW 014-27481	Anti Human Podoplanin, Monoclonal Antibody (LpMab-21)	免疫化学用 [F°]	100µg	34,000

上記以外の抗ポドプラニン抗体は、当社 HP をご覧ください。  
<http://www.wako-chem.co.jp/siyaku/product/life/PDPN/index.htm>

## 有機則非該当、キシレンと同性能で 安心・安全な病理環境を キシレン代替品：パソクリーン™

Wako

病理分野で汎用されているキシレンと同性能を有するパソクリーン™ の販売を開始しました。パソクリーン™ は各種規制に抵触しない環境対応製品です\*。

現在、労働安全衛生法施行令等の一部改正により、キシレンは「有機溶剤中毒予防規則」の適用を受け、50ppm の管理濃度を超える環境では女性の労働ができなくなっています。是非、この機会にキシレン代替品：パソクリーン™ の検討をお願いします。

\*消防法には該当しますのでご注意ください。

### 特長

- 透徹工程：キシレンと同等
- 脱パラフィン工程：キシレンと同等
- 揮発性：キシレンと同等

### データ

#### ■ キシレンとの比較

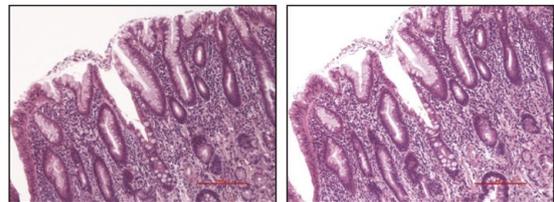


図1. ヘマトキシリン・エオジン染色 (胃)  
左：キシレン、右：パソクリーン™

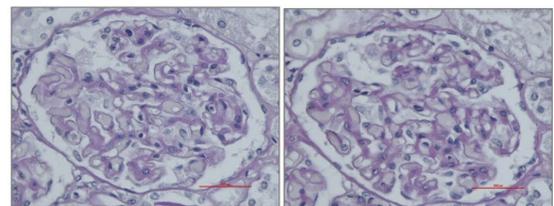


図2. 過よう素酸シッフ染色 (腎臓)  
左：キシレン、右：パソクリーン™

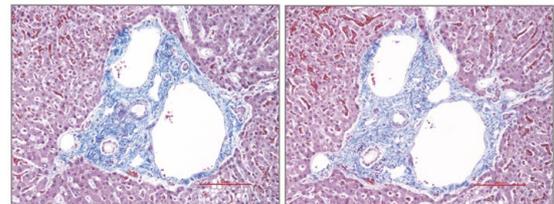


図3. マッサントリクローム染色 (肺)  
左：キシレン、右：パソクリーン™  
キシレンと同等であることが確認された。

コード No.	品名	規格	容量	希望納入価格 (円)
NEW 161-28321	PathoClean™	病理研究用	1L	2,800
NEW 169-28327	PathoClean™	病理研究用	18L	26,800



## HeLa細胞へのsiRNA導入データ

ScreenFect™siRNA を用いた HeLa 細胞への siRNA 導入実績及びリバーストランスフェクション (1-STEP) プロトコルを紹介します。

### ■ HeLa細胞へのリバーストランスフェクションプロトコル例 (24ウェルプレート)

#### 〈細胞の前培養〉

1. 適当な培養容器 (T-75 フラスコなど) を用いて、HeLa 細胞をセミコンフルエントになるまで培養する。

#### 〈トランスフェクション試薬の調製〉

1. 滅菌処理した 1.5mL 容チューブを 2 本用意する。
2. 上記工程で用意した 1 本のチューブに ScreenFect™ Dilution buffer を 24.5  $\mu$ L 添加する。
3. 2 に 0.5  $\mu$ L の ScreenFect™siRNA reagent を添加して全量で 25  $\mu$ L にする。・・・溶液 (A)  
(ScreenFect™siRNA Reagent は使用前にボルテックスして下さい。)
4. 1 で用意したもう 1 本のチューブに ScreenFect™ Dilution buffer を 24  $\mu$ L 添加する。
5. 4 に 1  $\mu$ L の 5  $\mu$ mol/L PIK3CB siRNA 溶液 (5 pmol) を添加する。・・・溶液 (B)
6. 溶液 (A) のチューブに溶液 (B) 全量を添加する。
7. 混合したチューブをタッピングで良く混合し、卓上遠心機でスピンドウンする。
8. 室温で 5 ~ 20 分間インキュベーションする。

#### 〈細胞懸濁液の調製〉

1. 〈細胞の前培養〉で用意したフラスコをインキュベーターから取り出す。
2. 培地を捨て、PBS で 1 回洗浄する。
3. トリプシン溶液を 2 mL 添加し、室温か CO<sub>2</sub> インキュベーターでインキュベーションし、細胞を培養容器から剥離させる。
4. FBS 添加培地を約 5 mL 添加し反応を止める。
5. ピペティングでよく細胞を分散させ、遠沈管に全量移す。
6. 150  $\times$  g, 5 分間遠心する。
7. ベレットを捨てないように上清を除く。
8. 新しい培地を 5 ~ 10 mL 添加し、ピペティングで細胞を分散させる。
9. 血球計算盤などの細胞カウンターを用いて細胞数を測定する。
10. 測定した細胞懸濁液の濃度から計算して、 $2.0 \times 10^5$  cells/mL の細胞懸濁液を調製する (調製する細胞懸濁液量は実験スケールに応じて適宜調節する)。

#### 〈トランスフェクション〉

1. 〈細胞懸濁液の調製〉で調液した細胞懸濁液 500  $\mu$ L をウェルへ添加する。
1. 〈トランスフェクション試薬の調製〉の工程 8 でインキュベーションしておいた DNA-lipid complex 50  $\mu$ L をウェルに添加し、プレートを軽く揺すって混合させる (ウェルに予め DNA-lipid complex 50  $\mu$ L を添加しておき、そこに細胞懸濁液を 500  $\mu$ L 添加しても構わない)。
3. CO<sub>2</sub> インキュベータで 24 ~ 48 時間培養し、実験に供する。

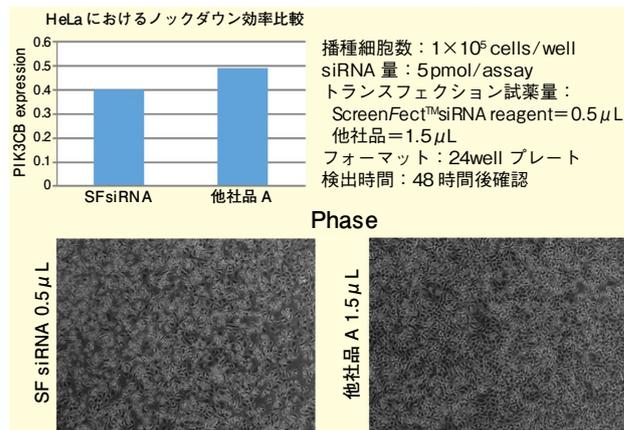
フォワードトランスフェクション (2-STEP) プロトコルを含む ScreenFect™siRNA のプロトコル電子版は、当社データベースからダウンロードできます。

<http://db.screenfect.jp/ja/documents/list/protocol>

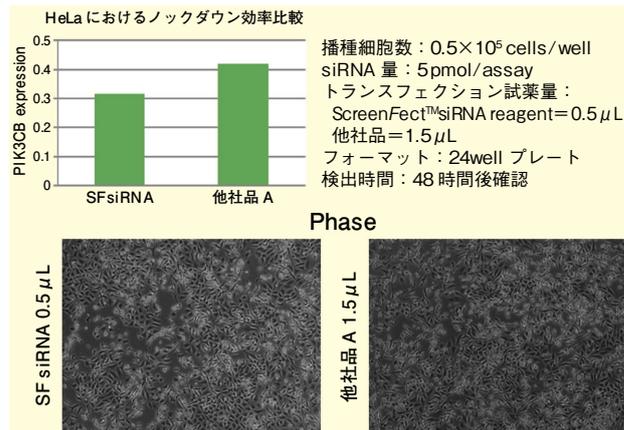
### ■ 実験データ

HeLa 細胞へリバーストランスフェクション法及びフォワードトランスフェクション法で PIK3CB siRNA の導入実験を行い、リアルタイム定量 PCR で PIK3CB mRNA の発現量を測定しました。定量結果を元に他社製品とノックダウン効率の比較を行ったところ、ScreenFect™siRNA は他社製品と同等以上のノックダウン効率を示しました。

#### 〈リバーストランスフェクション (1-STEP)〉



#### 〈フォワードトランスフェクション (2-STEP)〉



コード No.	品名	規格	容量	希望納入価格 (円)
299-75001	ScreenFect™siRNA	遺伝子研究用	0.2mL	11,000
295-75003			1mL	40,000
293-75004			1mL $\times$ 5	175,000

上記以外の ScreenFect™ シリーズの詳細情報は専用 HP (<http://screenfect.jp/ja/>) をご覧下さい。

さまざまな細胞に対するトランスフェクションプロトコル例をご紹介予定です。

掲載をご希望される細胞がございましたら、こちらのメールアドレスまでご連絡下さい。→ [jiho@wako-chem.co.jp](mailto:jiho@wako-chem.co.jp)

## アーネスト・ラザフォード (1871~1937)

理学博士 山崎 昶

ラザフォードの伝記はいろいろな大先生方の執筆されたもの<sup>1-10)</sup>がある。ラザフォード家はもともとスコットランドでの古い家柄であった。十九世紀の半ば頃、その一員であったジョージ・ラザフォード (1808-1875) と夫人のバーバラ (1811-1876) が、当時の新天地であったニュージーランドへの開拓民の募集に応じて、まだ幼かった四人の息子達とともに南島最北端のネルソン港付近に一家を構えた。これがニュージーランドのラザフォード家の初代で、アーネスト・ラザフォードの祖父母に当たる。

アーネストの父君であるジェイムズ (1837-1928) は、ジョージ、バーバラ夫妻の三男で、やがてマーサ・トンプソン (1841-1935) と結婚し、ネルソン近郊のワイメアの土地の一部を分けてもらい、家を建てた。ここがアーネストの生家である。ほかの兄弟姉妹も、最初はネルソンやワイメア近傍に家庭をもったが、やがてそれぞれ独立し、島内各地に居を定めた。みな子沢山であったから、アーネストには父方だけでも従兄弟と従姉妹が併せて五十人以上いたのである。

ジェイムズとマーサ夫妻の間には十二人の子供が生まれた。アーネストは次男で、上に兄が一人と姉が二人いた。さして年齢の違わない兄弟姉妹がたくさんいたので、さぞ賑やかな環境であったと思われる。後年アーネストが、「自分は周囲の雑音にはあまり乱されることなく集中力を持続できるようになったのも幼時の環境のおかげさ」と話したという。

1886年、14才になったアーネストは、すでにいろいろな教科で頭角をあらわし、奨学金を受けて、寄宿制の「ネルソン・カレッジ (Collegeを名乗っているが、実質的にはわが国の「中高一貫校」にほぼ相当する学校であった)」に入学を認められた。だが大家族を抱えるラザフォード家においては、奨学金が得られなくてはとて進学など難しかった。ここでも優秀な成績を収め、1889年に卒業して、クライストチャーチにあるカンタベリー・カレッジに奨学金を得て入学

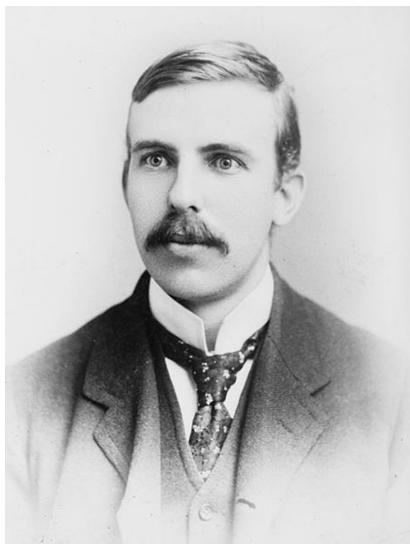


図1. アーネスト・ラザフォード  
Wikimedia Commons, [https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Ernest\\_Rutherford\\_1908.jpg](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Ernest_Rutherford_1908.jpg)

を許可された。

カンタベリー・カレッジを卒業した年 (1894) に、大英帝国の万国博覧会記念奨学金の給付枠がたまたまニュージーランドへ回ってきた。アーネストも応募したのだが、残念ながら次席であったので、やむなく帰郷し、当時北島のタラナキに移転していた両親の農場を手伝っていたところに吉報が届いた。折角選ばれた候補者が家庭の事情で辞退してしまったのである。

### キャヴェンディッシュ研究所 (1895-1899)

当時のケンブリッジ大学の総長であったデヴォンシャー公爵ウィリアム・キャヴェンディッシュの寄金によって1874年に創立されたキャヴェンディッシュ研究所は、初代所長はマックスウェル (1831-1879、在任期間1874-1879)、二代目はレイリー卿 (1842-1916、在任期間1879-1884) で、当時は三代目のJ. J. トムソン (1856-1940、在任期間1884-1917) であった。

ここからは親族と区別する必要がなくなるので、「ラザフォード」の方に呼称を改めることとする。ご了承ありたい。

ラザフォードはこの光栄ある研究所に

始めて参入を許された外部からの研究生の一人であった。1895年に、はるばる地球の反対側からやってきたラザフォードの才能は、いちやくトムソンの認める所となった。トムソンはまず彼の卒業研究で考案した無線電波受信機の検知装置をもっと発展させないかと示唆したらしい。だが、ラザフォードはそれよりも当時産声を上げたばかりの分野、すなわち物質と放射能の関連についての方へと興味を移し、無線電信の方は結局の所マルコーニの手によって実用化されることとなった。

1895年当時知られていた放射線としては、レントゲンのX線の他には、ヒットルフの発見になる「陰極線」、ゴルトシュタインの命名になる「カナル線 (陽極線)」くらいであった。やがてこれにベクレルの発見になる「ウラン線」が加わり、キュリー夫妻のラジウム発見後は「ラジウム線」、さらには「ベリリウム線」などの新顔も加わった。

ラザフォードは、これらの放射線の照射による気体の電離 (イオン化) を調べ、ウランやラジウム、トリウムなどから出てくる放射線には、大気イオン化や物質の透過性などから少なくとも二種類が存在することを発見した、一方は気体をイオン化する能力は大きいものの、数枚の紙やアルミ箔で遮ることが可能だが、もう一方は透過能力には優れているが気体中のイオン生成能力ははるかに劣る。彼は前者を「 $\alpha$ 線」後者を「 $\beta$ 線」と名付けた (後にフランスのヴィラルールによって第三の放射線が発見され、これにラザフォードが「 $\gamma$ 線」と命名したのは1904年のことである)。

万国博覧会記念奨学金の期限が切れて、トムソンの研究室に滞在することが不可能となったので、再びはるばる海を越えてカナダ (当時は大英帝国領) のモントリオールのマギル大学へ赴任することとなった。

### モントリオール時代 (1899-1907)

マギル大学時代の最初の研究成果は

「トリウムエマナチオン (エマネーションとも)」の発見である。1899年のことで、今日「ラドン」と命名されている86番元素の発見に外ならない。だが、通常のテキスト類には翌年(1900)の、ドイツのドルン(1848-1916)による「ラジウムエマナチオン」の方だけが掲載されている。トリウムが放射線を放出することはつとにキュリー夫妻によって報告されていた。

この発見は偶然の事からはじまったという。ラザフォードも同じ結論を得たのだが、同僚のオーウェン(電気工学の教授)にあとを任せることとした。ところがオーウェン教授がこのトリウムの放射線の測定をしている際に、ラザフォードがやってくると計測値が大きく揺らぐのである。なかなか原因が突き止められなかったが、やがて、ドアの開閉によって気流の乱れが生じる、つまり放射性の気体が発生していることを疑わせる。そこで、トリウム化合物上の大気を薄いガラス製の長い管に通してみると、管の中に放射能をもつ気体が移動し、やがてこの放射能は急速に衰えて、ガラス管の壁に別の種類の放射線( $\beta$ 線)を放出する生成物が析出するのが認められた。

この放射能を持つ気体について、ラザフォードは研究助手のハリエット・ブルックス嬢とともにまず物理的単離を試みた。酸化トリウム試料の上に放出されるらしい気体を細い薄手のガラス管に導くと、このガラス管の中に放射性の気体のみが送り込まれてくるが、これは前述のように比較的急速に減衰して壁面に別の析出物(実はトリウムエマナチオンの壊変生成物で、主に $\beta$ 放射体)が生じる。発生源と計測装置との間に銅製の蛇管を接続して液体窒素トラップで冷却することで、このなかなか捕え所のない気体を凝縮・捕集することになんとか成功したので、分子量の測定を試みたのだが、何しろ量がわずかなので、およその所40~100程度だという不正確な値しか得られなかった<sup>6)</sup>。

やがて1901年にはラザフォードの研

究室の新しいスタッフとしてオックスフォード大学からソディがやってくる。ラザフォードとソディのコンビはいろいろと重要な業績を上げたのだが、実はソディがマギル大学にいたのはそれほど長期間ではない。1903年(一年半後)には再び英国に戻り、ロンドン大学のラムゼイの研究室に入った。

ラザフォードとソディは、ブルックス嬢と行った物理的分離法とは別の化学的手法の導入によって、発生源の探索を試みた。そこでトリウム塩(硝酸トリウム)を水溶液とし、アンモニア水で水酸化トリウムを沈澱分離させてみた。驚いたことにこの操作で、エマナチオンを発生する源はほとんどが濾液の方へ移動してしまい、残った沈澱にはもともとの $\alpha$ 放射能の数分の一しか残らなかった。濾液の方の $\alpha$ 放射能はどんどん減衰し、ほぼ四日弱で強度が半分になってしまうのに、沈澱の放射能は逆に増大し、やがて元の状態に戻ることが判った。

このエマナチオンの発生源に対して、二人は「トリウムX」という名を与えた。前年(1900)クルックスが、硝酸ウラニルの水溶液から水酸化鉄を沈澱させたときに、もともとのウラニル塩の持つ放射能の大部分が沈澱の中に移行し、溶液中にはほとんど残らないが、時間とともに沈澱中の放射能は減衰し、ウラニル塩の放射能は逆に増大して元に戻ることを見出したのである。クルックスはこれに「ウランX」と名付けた。この「ウランX」は、今日風に考えればトリウム-234(およびトリウム-230)に当たるが、もちろんその頃は正体不明のままであった。

トリウムXの方は、もっとあとになってからラジウムの同位体であることが判明したのだが、当初はトリウムの $\alpha$ 壊変生成物だと考えられていた。

1903年にクルックスがスピンスリスコープを発明し、当時までに知られていたいろいろな放射線による発光(シンチレーション)を数えることにはじめて成功した。それまではこれらの放射線によ

る気体のイオン化を驗電器で測るか、電離した気体の発光の度合や、写真乾板の黒化度などを利用するしか計測方法がなかったから、ここで始めて「これらの放射線には粒子としての性質もある」ことが示唆されたと言える。その結果、放射壊変の定量的な取扱が可能となった。「半減期」がかなり正確に測定できるようになると、これによって発生源を同定することも容易になったし、放射能の変化(減衰、増加、平衡)も正確に記述できるようになった。

それまでは放射線はもっぱらX線と同様の光線の一種(つまり「波」として)の性質の方に重点が置かれ、粒子性の存在は軽視されていたのだが、トムソンによって陰極線が微細の荷電粒子(後に「電子(electron)」と名付けられた)からなっていることが解明されると、続々と発見されるそれぞれ別の放射能特性を持つ「新元素」を周期表のどこへ収容すべきかが大問題となった。

自然界において、原子が消滅したり生成したりすることが確かめられたのはこのトリウムエマナチオンの発見が最初とされる。この放射能の変化はいろいろな総説類<sup>1-8)</sup>に引用されているが、原論文は*Phil. Mag.*, 4, 370-96(1902)である。

後にラザフォードが一代男爵に叙せられたとき、選んだ紋章の中央に対称的に交叉する二本の曲線がデザインされたが、これこそまさに「原子の消滅・生成」を表現したものである(図3)<sup>11)</sup>。

ラザフォードも暗室の中で、 $\alpha$ 粒子や $\beta$ 粒子などによる蛍光を目視で数えていたのだが、さすがに目を酷使したために視力が低下してきた。後にマンチェスターでハンス・ガイガーが今日のGM(ガイガー=ミュラー)計数管の祖型である計測装置を製作したのも、恩師の苦勞を見かねたためという。最初は $\alpha$ 粒子の計測を目的として作られたのだが、後に改良されて $\beta$ 線や $\gamma$ 線、さらにはX線も計測できるようになった。

オットー・ハーンが(1905)ラムゼイの元からマギル大学へやってくる。ハー

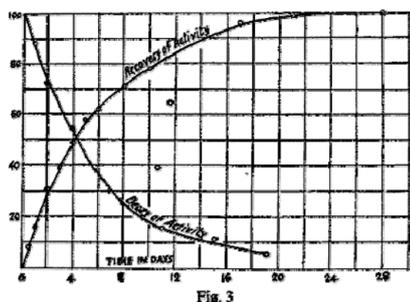


図2. トリウムエマナチオン（エマネーション）の生成と減衰  
Rutherford, E. and Soddy, F.: *Phil. Mag.*, 4. 470-96 (1902).

ンはフランクフルト・アム・マインの生まれで、マールブルク大学に進み、有機化学のツインケに師事した。学位を得たのち、ロンドン大学のラムゼイの元に留学した。ラムゼイはハーンに「君、ラジウムや放射能には興味ないかね」と尋ね、ハーンは「興味はありますが、でも自分は有機化学しかやってこなかったもので・・」と答えたところ、ラムゼイは「君こそ理想的な人材だ、早速モントリオールのラザフォードの所へ行って来たまえ」と送り出してくれたという。ハーンはマギル大学で「メソトリウム」「ラジオトリウム」などを発見し、これらをすでに発見されていた「トリウムX」などとあわせてメンデレーエフ以来の周期表のどこに収めるべきかが大問題となった。「ソディ・ファヤンスの法則」(1913)も「モーゼレイの法則」(1913)もまだ提案すらされていなかったし、「アイソトープ」という言葉をソディが提案した(1913)よりも前のことであるから、当時の物理・化学界の研究者たちの困惑振りは、後世のわれわれにも想像できる。

### マンチェスター時代 (1907-1920)

1907年に、マンチェスター大学のシュスター教授が引退することとなり、その後任としてラザフォードが招かれた。ラザフォードは、シュスターの助手を務めていたハンス・ガイガーに、自分の研究グループの一員となってくれるように依



図3. ラザフォードが一代男爵に叙爵されたときに選んだ紋章  
左の人物は伝説的な錬金術師の「ヘルメス・トリスメギストス」右側はマオリ族の戦士。中央の楯の部分にある交叉した曲線は、左図のトリウムエマナチオンの生成と減衰の様子を表現している。  
<http://www.numericana.com/arms/rutherford.htm>

頼し、その結果が以後の幾つもの輝かしい業績となった。もっとも物事がすべて順調に進んだわけではない。最大の問題は、彼の研究に必要なα線源、つまりラジウムの入手であった。

キュリー夫妻が初めて0.1グラムほどの塩化ラジウムを単離してから一年後の1899年には、1グラムのラジウムの市価はおよそ一千ドルほどであったのだが、医療・診断などの用途が急速に拡大し、その結果価格が高騰して、1914年にはグラムあたりで十数万ドル以上にもなったという。

幸いにして、オーストリアのウィーンに設立されていた「ラジウム研究所」が貴重なストックのラジウムの一部を貸与してくれることとなった。

1908年には、ラザフォードに「ノーベル化学賞」が授与された。受賞の対象は、「元素の崩壊、放射性物質の化学に関する研究」であった。それまで元素や原子は「不生不滅、不増不減」のものという概念を破壊して、自然界においても崩壊・生成が起きていることを証明したのだから、当時の化学者や物理学者の暗黙の了解事項が根本から覆されたことに

なる。だが、ラザフォード自身は「自分がそれまで物理学者だと皆に思われていたのに、一朝にして化学者の仲間入りをするようになったのだから、これこそもっとも驚くべき「変成 (transmutation)」にほかならないね」と述懐したという。

この年、α粒子がヘリウム原子核であることも証明された。α粒子は可視部に発光スペクトルを与えないが、粒子が消滅（当時の用語では「崩壊」）した後の気体の発光スペクトルは明確にヘリウムのスペクトルを与えることを示した。以前にラムゼイがクレーヴ石中に存在を確認したヘリウムの起源がこれで判明した。

このころ(1908)ガイガー＝マースデンの実験が開始される。マースデンは当時まだ卒業研究生であったという。ラジウムエマナチオン(ラドン)からのα粒子をアルミニウムや鉄などいろいろな金属箔に衝突させたときの散乱の様子を観察し、重い元素ほど散乱角度が大きくなることを見出した。そこでラザフォードの示唆に従って、もっと原子量の大きな金の箔を試料として同じ実験を試みたところ、α粒子の一部が極めて大きな角度(180°に近い)にまで曲げられることが観測された(1910)。これが現代の優れた表面分析法の「ラザフォード後方散乱法(RBS)」の創始でもある。

彼らの最初の実験装置では、α粒子の検出には蛍光板のシンチレーションを顕微鏡で観測する方式であったが、後にα粒子による気体のイオン化を利用した計数装置(今日のガイガー＝ミュラー計数管の祖型)が用いられるようになり、観測のために暗黒の環境で目を馴らさなくとも良くなった。

『ティッシューパーを的にして、径が15インチもある大砲の弾丸を射ったら、そのままろに撃ち返されたようなものだ』とラザフォードが形容したという。

この同じ年(1910)、ソディが、原子量(現代風には質量数)が異っても化学的に同じ性質のものは同一の元素であり、核外電子の数は等しいから化学的に同一の性質を示すというアイデアを発

表した（この時点ではまだ「アイソトープ」という言葉は使われていない）。

翌年（1911）、ガイガー＝マースデンの実験結果をもとに新しい原子モデルが提案される（ラザフォード散乱による原子核の発見）。原子の質量の大部分は、中心にある極めて小さなプラスに帯電した原子核によるもので、電子はそのまわりをめぐるという、トムソンのモデルとは全く異なったモデルである。

このころ、「ガイガー＝ヌッタルの法則」すなわち壊変定数と $\alpha$ 粒子のエネルギーの関係式が提案される。最初は『半減期の短いものほど飛程が長い』という定性的な表現だったが、後に定式化された。

この原因は現在ではガモフの『量子トンネル効果』に基づくものとして、もう少し複雑な式（その代り精密になった）で表現される。理化学研究所で113番元素（ニホニウム）が作られた折（最初は一原子のみであった）にも、きちんと半減期が報告されたのは、 $\alpha$ 線のエネルギーからこの法則で計算できたからである。

デンマークからニールス・ボーアがラザフォードのもとへやってくる（1912）。ボーアはラザフォードの最初のモデルを改訂し、電子が特定の軌道にあるときのみ安定となるというモデル（ラザフォード・ボーアモデル）を考案。今日の原子構造論の礎が築かれた。

この翌年（1913）、ソディが「アイソトープ」（isotopeすなわち「周期表で同じ（iso）位置（topos）に入る元素（同位元素）」という単語をギリシャ語の「同じ（*ισος*, isos.）」「位置（*τοπος*, topos）」から作る。なおこの年に「ソディ＝ファヤンスの法則」、すなわち放射壊変に伴う陽子数と質量数の変化を纏めた法則が発表される。ファヤンスは当時マンチェスターのラザフォードの研究室に滞在中であった。

これらの法則に従うと、それまでに報告されていた30種以上の「新元素」が、周期表に残されていた4箇所の空白に巧みに収められ、かつ、原子量（今日風に

は「核子数」であるが）がそれぞれ4の差のある三種類の壊変系列に整理されることとなった。

モーズレイの法則の論文が刊行されたのもこの年である。特性X線の波長と原子番号との間に密接な関係があること。つまり「原子番号の重要性」が確立された。だがモーズレイは1915年にトルコのガリポリで戦死した。

1919年に、Po-214（ラジウムC'）から生じる $\alpha$ 粒子を窒素中に導いた時、水素の原子核（陽子）の飛跡が観測された。つまり人工的に核反応を起こさせることに始めて成功したのである。

この時用いられた $\alpha$ 粒子源のPo-214は、ラジウム本体やラドン、ポロニウムなどよりも飛程の長い（エネルギーが大きい、現代風の尺度なら7.833MeV）強力な $\alpha$ 粒子が得られるので、ラザフォードの研究グループの愛用する線源であった。そのためか以後も長いこと、原子核の反応にはこのラジウムC'並みのエネルギーの粒子が必要だと考えられていたらしい。

## 再びキャヴェンディッシュ研究所（1919-1937）

第一次大戦が終了した頃、トムソンが研究所長を勇退することになり、後任としてラザフォードが招かれた。ラザフォードは、ウィルソンやアストンなどの以前からの同僚達には比較的自由に仕事をさせ、新しい若手のスタッフとの共同研究に努めた。チャドウィック、カピッツァ、コックロフト、ウォルトン、ブラケットなどみなこの頃の共同研究者である。ラザフォードは早くも1920年に「中性子」の存在を予見している。すなわち原子核中に陽子と電子とが強固に結合した別の粒子の存在の可能性を考えた。だが、電荷を持たない粒子なので、1932年にチャドウィックが発見するまで待たなくてはならなかった。

ここから彼の逝去（1937）までの時代については、紙面の制限もあり、核物理学や物性物理学に関する研究のウエイト

が次第に大きくなるため、小山慶太先生の御著書<sup>1)</sup>などに詳しく記載があるので、そちらに譲ることとする。ラザフォードの伝記は多数<sup>1-10)</sup>あるが、その中でも早稲田大学の小山慶太教授の纏められた「ケンブリッジの天才科学者たち」（新潮選書）<sup>1)</sup>は、タイトルにこそ名が出ていないものの、優れたラザフォード伝である。あと、オックスフォード大学の人物伝記シリーズの一冊である「アーネスト・ラザフォード」（梨本治男訳、大月書店）<sup>2)</sup>が比較的入手しやすい。

## 【参考文献】

極めて多数に上るので、すべてをリストアップすることは紙面の制約上不可能であるから、重要と思われるものだけを掲げる。

- 1) 小山慶太：「ケンブリッジの天才科学者たち」（新潮選書）（1995）。
- 2) Heilbron, J. L.: "Ernest Rutherford", (2003) (Oxford Portraits in Science の一冊で、邦訳はハイルブロン「アーネスト・ラザフォード」（梨本治男訳）（2009）,（大月書店）
- 3) Campbell, J.: "Rutherford Ancestors", AAS Publications, Christchurch, New Zealand (1996).
- 4) Campbell, J.: "Rutherford · A Brief Biography", <http://www.rutherford.org.nz/biography.html>  
上と同じく Campbell 教授の著書である "Rutherford, Scientist Supreme" (AAS Publications, Christchurch, New Zealand (1999)) からの抄出である。原著の記載の誤りの訂正を含む。
- 5) BIBNUM, BIBLIOTHÈQUE NUMÉRIQUE D'HISTOIRE DES SCIENCES  
[www.bibnum.education.fr/tags/rutherford](http://www.bibnum.education.fr/tags/rutherford)
- 6) マギル大学のラザフォード博物館のウェブページ  
[www.physics.mcgill.ca/museum/rutherford\\_museum.htm](http://www.physics.mcgill.ca/museum/rutherford_museum.htm)
- 7) AIP (アメリカ物理学協会) のウェブページ  
<http://history.aip.org/exhibits/rutherford>
- 8) 原子力百科事典 ATOMICA - 高度情報科学技術研究機構  
<http://www.rist.or.jp/atomica>
- 9) Rayner-Canham, M. F. and Rayner-Canham, G. W.: "Harriet Brooks — Pioneer Nuclear Scientist", McGill Queen's University Press, Montreal (1992).
- 10) <http://www.biography.com/people/ernest-rutherford-39099>
- 11) <http://www.numericana.com/arms/rutherford.htm>

