

電子、分子、超分子コロイド – 物質要素の三階層 –

Electron, Molecule, and Supramolecular Colloid – Three Class-Elements of Substance –

東京大学名誉教授 妹尾 学

MANABU SENO

Professor Emeritus, Tokyo University

1. はじめに

数年前、Nature誌が「化学者は何を知りたいと思っているか?」という、我々化学者にとって切実な関心のある記事を掲載したり。現今の化学がおかれている状況をみて、「化学は科学のすべての分野にわたり鍵となる役割をもっている。しかしそのことが意味するのは、化学は単に手近な道具に過ぎないのか? 化学はもはや打破すべき重要な課題をもっていないだろうか?」という問いに対する著名な化学者の意見をまとめたものである。興味深い応答の結果として、現在の化学に求められている6つの課題が提起されている。

- Q1. 特有の機能や動的特性をもつ分子をどのようにして設計できるか?
- Q2. 細胞の化学的基礎はなにか?
- Q3. エネルギー、宇宙、あるいは医学の分野で、今後必要となる材料をどのように創り出すか?
- Q4. 思考および記憶の化学的基礎はなにか?
- Q5. 地球上の生命の起源は? 他の世界では生命はどこで、どのようにして創られたか?
- Q6. すべての元素からつくられる可能な配列をどのようにして探索できるか?

どの課題をとっても、化学者にとって十分過大ともいえるべき研究対象である。我々はこれまで非常に多くの物質を見つけ出し、作り出してきた。アメリカ化学会のデータベースに登録された化学物質の総数は、近年急速に伸び 5×10^7 に達したという。しかし通常の医薬品程度の大きさをもつ分子の総数は 10^{40} にもなる。化学者は営々として新

しい物質をつくり続け、確かにそれは化学のアイデンティティの柱であった。しかし、化学が隣接科学のための単なる道具に陥らないために、化学は自身の意義をより明確にし、その役割を明らかにすべきであろう。

2. 元素の概念

言うまでもなく、化学は物質についての知の体系として発展してきた。世界をつくるものの本性を求めて、古くから種々の思索が続けられてきた。万物のもとのもの(始原)として、水、空気、火、土の四元素説の淵源は古代ギリシヤに遡る。アリストテレス(BC384年 – BC322年)は、質料と形相の概念を中心に自然学を展開した。形相(eidos)はすがた、かたちであり、それをつくるのが質料(hyle)である。それらは相対的な概念であり、人の形相は魂、質料は身体であるが、身体はまたそれ自身の形相であり、器官や組織が質料となる。質料の同質部分は四元素でつくられるが、四元素はまたそれぞれの形相をもち、それらの質料因はとくに第一質料とよばれ、すべての根源となる。

諸事物は自らのうちに本来的な運動(変化)の原理をもち、生成、消滅、転化する物体をつくる四元素は、第一質料から温、冷、乾、湿の形相を得てつくられ、それらは相互に転化しうると考えられた。このような万物流転の思想は、その後ヘレニズムの時代にアレキサンドリア周辺で始まったといわれるアルケミー(錬金術)の根拠ともなった。中世になって東ヨーロッパを経て、またイスラム・モーロ人が占拠したスペインから西ヨーロッパに伝わったアルケミーは、数百年にわたって西ヨーロッパの化学的風土の土台となった。そこでは四元素説やパラケルスス(1493年頃 –

1541年)が主唱する硫黄、水銀、塩の三元素説が信じられた。

このような観念論的な物質観を打破し、近代化学の礎を築いたのが、18世紀末、フランスのA.ラヴォアジエ(1743年 - 1794年)であった。彼はその頃発展した気体(空気)の化学の助けをかり、天秤を駆使した化学実験を押し進めることによって、それ以上分解できない原質として化学元素という実証的概念を確立した。この思想は近代科学のさきがけとなったF.バイコン(1561年 - 1626年)による実験を重視する実証的物質観を受け継ぐものであるが、彼の思想を実際に系統的に展開したラヴォアジエの功績は非常に大きい。新しい化学の体系として「化学原論」(1789年)にまとめられたが、その元素(単体)表には33種の元素が分類、配置された。

ラヴォアジエの元素概念は化学命名法とともに新しい化学の進むべき道の指標となり、以後新しい元素の発見が続き、物質の化学組成や性質の理解が進み、現象論的な立場に立つ物質の体系化が着実に進められていった。

3. 化学原子論

物質を連続的なものとみるか、不連続な構造をもつとみるか、物質観の2つのパターンがある。前者は思弁的な観念論に結びつきやすく、後者は機械論的な唯物論につながる傾向があった。世界は原子(atom)と空虚よりなるというデモクリトス(BC460年頃 - BC370年頃)の説をうけて、エピクロス(BC341年 - BC270年)は原子論を論じ、ローマ時代初期のルクレティウス(BC99年頃 - BC55年)は叙事詩「物の本質について」で、エピクロス学派の原子論哲学を詳細にうたった²⁾。

やがてキリスト教が広まるとともに、原子論は一時影をひそめたが、16世紀に入って近代科学の芽生えとともに原子論も復活し、バイコンやI.ニュートン(1642年 - 1727年)はこれに関心を寄せた。ラヴォアジエはやや抽象的な現象論的概念である化学元素を用いた。やや遅れてJ.ドルトン(1766年 - 1844年)は積極的に原子論を採用した。その頃、化合物をつくる成分元素の重さの比が簡単な整数比になること(定比の法則、倍数比の法則)が知られ、この関係は各元素がそれぞれ固有の重さをもつ原子から成ることを示していると考えたからである。彼は「化学哲学の新体系」(1808年)で、熱素(カロリック)の微粒子で

囲まれた化学原子をイメージし、化合物はこれらの原子が単純な割合で集まり形成されると考えた。

同じ頃、ゲイリュサック(1778年 - 1850年)は、気体反応において各成分の体積の間に簡単な整数比の関係が成り立つことを見出した(気体反応の法則)。ドルトンの原子論はこれをうまく説明できなかった。一方、A.アボガドロ(1776年 - 1856年)は、同じ条件で同体積の気体は同数の粒子をもつという仮説の下、水素や酸素の気体は2つの原子が結合した分子よりなるとすれば、気体反応の法則をうまく説明できることを示した。しかし、ドルトンは、同種原子は直接結合しないという考えに固執し、二原子分子の存在を認めなかった。このため19世紀前半の化学界に混乱を招いた。

1850年代に入って、有機化合物の体系化の努力はようやく実を結ぶようになり、F.A.ケクレ(1829年 - 1896年)は原子価の重要性を認め、炭素原子は4価で、炭素原子同士が直接結合し有機化合物の基本骨格をつくると考えた。同じころ、S.カニッツアロ(1826年 - 1910年)はアボガドロの分子説の妥当性を確認し、強く推進したことにより、原子論をめぐる混乱はようやく収束に向かい、化学の体系化が急速に進んだ。

4. 原子の実在性

原子論をめぐる混乱はあったが、多くの化学者は物質が原子や分子よりなるという考えになじみ、体系化が進められた。しかし、一部の化学者や多くの物理学者は、必ずしも原子・分子の実在性を容認していなかった。たとえば当時の指導的化学者、W.オストワルド(1853年 - 1932年)は、その頃確立された熱力学に基づき、エネルギー論の立場に拠った。原子論とエネルギー論の相克は、化学の発展段階の一コマとして興味深い。当時の思想状況からみて、現実性の強い原子論に対し、より抽象的真理性の高いのはエネルギー論であった。

原子論は物理学者にとっても無縁のものではなかった。気体状物質が高速で飛びまわる粒子(分子)よりなるという考えは、気体分子運動論として論じられた。気体中の分子は力学の法則にしたがって運動し、これによって気体が示す現象論的法則は説明された。しかしこのことから直ちにすべての物質は分子よりなると結論することはできなかった。化学者にとって水と水蒸気は同じ物質と

みられがちであるが、物理学者にとってはたとえ成分は同じであってもそれらは異なる物質である。液体が気体と同じように分子からなることを、どのようにして確かめればよいのであろうか、この課題に対して理論的解答を与えたのが、1905年のA.アインシュタイン(1879年 – 1955年)の論文「ブラウン運動について」であった。

水に浮かぶ花粉のような小さい粒子が絶え間なく不規則に動きまわるブラウン運動は、1827年に発見され、はじめ生命の仕業かとも考えられたが、小さい粒子ほど、また温度が高いほど活発に動く。やがて粒子よりむしろ媒質の水によるのではないかと考えられるようになった。もし水の分子が活発な熱運動を繰り返しているならば、そこに浮かぶ花粉のような小粒子は水分子の乱雑な熱運動に突き動かされるであろう。アインシュタインは、この考えに基づいてブラウン運動の理論を立てた。粒子が大きければ、分子の熱運動による衝撃は平均化され粒子はほとんど動かないが、十分に小さい粒子であれば、熱運動の衝撃は平均化されず絶えず強さや方向を変えて粒子を無秩序に突き動かすであろう。いわば熱平衡からのずれが、ゆらぎとしてのブラウン運動を引き起こすことになる。彼は、花粉程度の大きさの粒子についてさえ熱力学の法則が厳密には成り立たないことに、興味をもったのである。

この理論を卓越した実験によって検証したのが、J.B.ペラン(1870年 – 1942年)であった。試料として精製し大きさ(直径 $0.3\ \mu\text{m}$ 程度)を揃えた植物樹脂ガンボージを用い、重力下の沈降平衡の測定、ブラウン運動の軌跡の観測を顕微鏡下で注意深く行い、結果は理論の予測と十分な精度で一致することを見出した。またこの実験で求められるアボガドロ定数の値は、気体分子運動論で求められていた値とよく一致することも確かめた。これらの結果は、気体と同様、液体も活発に熱運動をする分子よりなることを明確に実証するものであり、原子・分子の実在性が物理、化学を問わず広く認められるようになった³⁾。

近代科学の祖ニュートンは、物質の量を表すものとして質量を定義した。地球上の物体は質量に比例する重力をうけるので、質量は重量として計測できる。原子・分子の概念が確立されたことによって、各物質の量は原子量や分子量を基準として測られ、共通の単位量をもたない。このためSI単位系では物質の量をあらわすのにモル(mol)を単位とする物質量がきめられた。1molは質量に換算すればその物質の原子(分子)量に等しく、1molに含

まれる粒子数はアボガドロ定数 $N_A = 6.022 \times 10^{23}\ \text{mol}^{-1}$ で、基礎定数の一つである。物質の量を数量として表すことは、アナログ量からデジタル量への変換であり、我々の物質観の深まりを示すものである。

5. 原子の構造的性、電子と原子核

前節に示したように、19世紀の段階で原子論は化学者にとっては十分な説明体系として機能したが、物理学者にとってはなお仮説の域を出なかった。ところが19世紀末から20世紀初頭にかけて、物質に関する知見が格段と増えた。端初はW.レントゲン(1845年 – 1923年)によるX線の発見(1895年)、J.トムソン(1856年 – 1940年)による陰極線の研究(1895年)であった。X線は波長の短い電磁波であり、陰極線は陰極から放出された負荷電粒子の流れであることが分かった。陰極線をつくる粒子についての質量/電荷の測定値から、電荷の大きさが水素カチオン(陽子)と同じであるとすれば、質量は陽子の1/1800程度となり、トムソンはこれが負電荷を持つ基本粒子と考え、電子(electron)と呼んだ。

次いで、1896年にA.ベクレル(1852年 – 1908年)が、1898年にキュリー夫妻(ピエール:1859年 – 1906年、マリ:1867年 – 1934年)が自然放射能を発見した。E.ラザフォード(1871年 – 1937年)はこの現象を究明し、ラジウムやトリウムは放射線を出して自然崩壊することを確認した。これは元素の不変性を否定するものであり、ラヴォアジエ以来の元素概念は崩れ、原子の構造的性を示すものであった。放射能の一成分の α 線はヘリウム原子核と考えられたが、ラザフォードは金の薄膜に α 線を照射したところ、その大部分はほとんど散乱されないが、2万分の1という小さい確率で後方散乱のような大きい散乱を起こすことを見出した。この結果は質量が集中した原子核の存在を示すものであり、1911年に原子核のまわりの広い空間に電子が配置された太陽系型の原子模型を提出した。

この原子模型はN.ボーア(1885年 – 1962年)に受け継がれ、1913年に原子核のまわりの許された軌道上を電子がまわるというボーア模型が提出された。これはマックス・プランク(1858年 – 1947年)の電磁波に対する量子仮説(1900年)に基づくもので、水素の原子スペクトルを見事に説明した。さらにド・ブロイ(1892年 – 1987年)の物質波の概念を(1924年)を受けて、1926年にE.シュレー

ディンガー(1887年 – 1961年)は電子の状態を表す波動関数が従うべき波動方程式を提出した。これは量子力学の成立を告げるものであった。

量子力学が支配する世界は古典力学の世界と全く異なる。電子の存在状態は波動性を持ち、粒子としての存在確率は波動関数の二乗で与えられる。また、電子の位置と運動量を同時に確定することはできない(ハイゼンベルグの不確定性原理、1927年)。これは原因-結果の確定性を保証する決定論的因果性の成立を拒むものである。しかもこれは事柄の複雑性からくる統計的性格に由来するものではなく、全く本質的な要請である。ボーアはこのような事情は原子的事象に対する我々の認識能力の欠如のためではなく、そのもの本来の性質と考えた。量子力学が支配する電子・原子の世界は、日常的なマクロの物質レベルとは異なり、より低位の階層に属すると考えざるを得ない。

6. 分子の階層

我々が日常的に接する物質は、単体および化合物からなり、それぞれ特有の原子組成、化学構造をもつ。原子の化学結合性は量子化学によって解明されたので、多くの場合物質の化学構造はその原子組成から予測することができる。無機化合物ではイオン結合により塩をつくることが多く、有機化合物では共有結合により分子を形成することが多い。ここで主役を演じるのは電子である。電子は粒子としてよりもむしろ波動として働き、原子核のまわりに固有の軌道をつくる。原子核に近い軌道にある電子はほぼその核のまわりにあるが、最も外側の軌道にある電子は化学結合にあずかり、分子全体に広がる分子軌道をつくり、分子の電子状態をきめる。安定な分子軌道が形成されるように各原子核の配置が定まり、分子の形状がきまる。

分子は原子(電子と原子核)より上位の物質の階層をつくる。たとえば水分子を考えてみよう。それは H_2O という分子式をもつが、その性質は必ずしもこれから予想しえない、酸素原子は電気陰性度が強く電子を強く引きつけるので、水素原子のただ1個の電子は酸素原子に引きつけられ、正電荷の水素原子核(陽子)は露出し、隣の水分子の酸素原子とも部分的に結合(水素結合)し、数分子から数十分子の水分子がゆるく結合したクラスターをつくる。

このクラスター構造が水の特徴的な性質の原因となる。物質を大きく親水性と疎水性に分類することがあるが、物質界での水の重要性が明らかであろう。とくに生体内での水の役割は非常に大きい。

次に、M.ファラデー(1791年 – 1867年)により発見され、ケクレがその化学構造をきめたベンゼンを考えてみよう。ベンゼンの化学式は C_6H_6 であるが、その性質はこれから容易に推定されるものではなかった。Cの数に比べHの数が少ないので、不飽和性が強く反応性が高いと予想されるが、ベンゼンは化学的に非常に安定である。ケクレは6個の炭素原子が直接結合する環状構造を推定した。原子価から考えて単結合と二重結合が交互に配置される構造が考えられるが、これには2通りの書き方がある。実際には2種の構造異性体は単離できないので、2つの構造は交互に変換し混ざり合っていると考えられた。その後共鳴という概念で説明されたが、この問題は量子力学によって完全な形で解決された。各炭素原子の sp^2 混成軌道がつくる σ 軌道に π 軌道が重なった分子軌道によって結合し、ヒュッケル則が示す芳香族性をもつことがあきらかにされたのである。

これらの例は、分子の化学的性質が分子軌道を占める電子の状態によって支配されることを示し、分子がそれを構成する原子とは異なる階層をつくることを意味している。階層をつくるシステムで、上位の階層を形成することによって下位の階層ではみられなかった新しい性質が発現することを、創発(emergence)の現象というが、水やベンゼンの例は分子レベルにおける創発現象の典型的なものと言えるであろう。

7. 超分子コロイド

少し時代を遡るが、1861年にT.グレアム(1805年 – 1869年)は身近の物質をその性状から晶質(クリスタロイド)と膠質(コロイド)に分類した。半透膜を通らない卵白やゼラチンなどが膠質で、これらは、食塩やショ糖など晶質と透析によって分離できる。膠質が示す浸透圧はかなり小さく、数千から数万におよぶ分子量に相当した。その後、W.オストワルド(1883年 – 1943年)はこの分類が物質固有の性質によるものではなく、その状態によると考え、膠質を改めてコロイド分散系と呼んだ。コロイドをつくる粒子は重力下で容易に沈降せず、ブラウン運動やチンダル現象を示

し、その存在は暗視野限界顕微鏡でようやく認められた。彼は、コロイド粒子の大きさを 10^{-7}m ($0.1\ \mu\text{m}$) $\sim 10^{-9}\text{m}$ (1nm)の範囲とした。

その後もコロイドの実体を究明する研究が続けられた。たとえばT.スヴェドベリ(1884年 - 1971年)は超遠心機を開発し、赤血球のヘモグロビンが単一の分子量66,800を示すことを知った(1926年)。またW.チゼリウス(1902年 - 1971年)は電気泳動法を開発し、血清タンパク質のグロブリンが3種の成分よりなることを見出した(1937年)。コロイド化学の研究対象はタンパク質や多糖、脂質など生体由来の物質(有機体)が多かった。これらを試料とすると、その純度が問題になった。コロイド状物質は広い分子量分布を示すものが多く、数種の単純物質の複合体である可能性が強かった。

でんぷんのような有機体の構造に対して古くからミセル構造説があった。ミセルは規則的な分子配列をもつ構造を意味するが、その後コロイド化学において重要な意味をもつようになった⁴⁾。それはセッケンの水溶液中でセッケン分子(長鎖脂肪酸イオン)が数十個会合し、イオンミセルを形成することが、J. W.マックベイン(1882年 - 1953年)によって明らかにされたからである(1913年)。このことは、コロイド分散系をつくる粒子は巨大分子ではなく、小分子が多数会合したものではないかという考えを広めた。確かにコロイド分散系の一つに、脂肪酸塩のような両親媒性化合物が水中で会合し形成するベシクルやリポソームなどの分子組織体(molecular assembly)があり、生体との関連で重要な物質状態と考えられている。

1920年代に、コロイド状物質がこのような低分子会合体ばかりでないことを主唱し、高分子化学の基礎を築いたのがH.シュタウディング(1881年 - 1965年)である⁵⁾。低分子集合体であれば、条件を変えたり、化学的変成を加えたりすることによって、みかけの分子量が大きく変動するであろう。彼は天然ゴムなどについて化学的変成を加えても分子量に大きな変化はないことを確かめ、さらにスチレン、シクロペンタジエン、インデンなど(モノマー)の重合により高分子量の重合体(ポリマー)が得られることを確認し、高分子(巨大分子)の存在を実証した。この取組はW.カロザース(1896年 - 1937年)に引き継がれ、ポリアミド(ナイロン)の合成によってプラスチック時代の幕あけとなり、第二次世界大戦後、石油化学工業の進展と重なって化学の黄金時代を築いたことはまだ記憶に新しいであろう。

コロイド化学から高分子化学への展開は目覚しく、生体物質への関心はその陰に追いやられた。コロイド化学はもともと生体物質の探究を柱の一つとしていたのであるが、合成高分子物質の画期的な発展によって、コロイド状物質はやや影をひそめていた感があった。しかし、やがて高分子化学の進展とともにタンパク質など生体高分子への関心も高まってきた。地球上の生物はすべて共通の化学的特徴をもっている。すなわち、生物はリン脂質二重層からなる膜で囲まれた細胞から構成され、アデノシン三リン酸(ATP)の化学エネルギーをエネルギー源とし、タンパク質を主体とする機能性物質によって環境に応答し、遺伝物質デオキシリボ核酸(DNA)によって自己を複製する。生体は巨大分子とそれらの複合体がつくる組織化構造によって、自らの生命を紡いでいる。

1978年にJ.-M. レーン(1939年 -)は、超分子化学(supramolecular chemistry)を提唱した⁶⁾。共有結合に基礎をおく分子化学に対して、非共有結合性の分子間相互作用と分子会合体を中核とする新しい化学分野の必要性を説いたのである。超分子化学のルーツとして、第一にA.ウェルナー(1866年 - 1919年)による配位結合の概念(1893年)、第二にE.フィッシャー(1852年 - 1919年)による酵素に対する鍵と鍵穴論(1894年)、第三にP.エーリッヒ(1854年 - 1915年)による免疫におけるレセプター概念(1906年)を挙げている。これらの機能発現のための物質的基礎として、超分子コロイド(supramolecular colloid)が中心となる階層が重要となるであろう(表1)。

表1 物質をつくる三階層の要素

要素	電子	分子	超分子コロイド
ファミリー	クォーク 陽子、中性子	原子、イオン 分子錯体	タンパク質、DNA リポソーム ベシクル
大きさ(m)	—	$10^{-11}\sim 10^{-8}$	$10^{-8}\sim 10^{-5}$
質量(kg)	$10^{-30}\sim 10^{-27}$	$10^{-27}\sim 10^{-23}$	$10^{-23}\sim 10^{-19}$
特性	波動性 粒子相補性	物質性	自己組織化 機能性
関連物質系	金属結晶 半導体	単体、化合物 化学物質	分子組織体 有機体

8. おわりに

化学は物質にかかわる科学であり、その中核となるのは分子である。分子の機能を解明するためには、それをつくる原子、さらに電子と原子核(陽子と中性子)を知らなければならない。そこで我々は日常の現象を支配する古典力学がもはや成り立たないことを知ったのである。そこは量子力学が支配する別の世界であった。

改めてまわりを見まわすと、生体の不思議に当惑する。生体は明らかにこれまで化学が扱ってきた物質でつくられている。しかし、我々にはまだ“生きている状態”の本質を解く鍵を手にしていない。現在、分子生物学や生命科学の発展は目覚しく、確かに生命はある特別な状態にある物質が示す特性のように見える。この特別な状態を発現する物質的基礎として、分子の階層を超えた巨大分子やそれらの複合体が組織化してつくる超分子構造が考えられる。生命という現象を創発する新しい物質階層の存在が予想されるのである。これは物質系の機能を究明する化学者の当然の目標であろう。

本稿のはじめに6つの課題を示した。Q1、Q6はこれまで通りの化学の勤めであり、Q3は化学の社会的役割を思い起こさせる。残る3つの課題はこれからの化学が目指すべき目標である。Q2は分子生物学の分野で熱心に進められ、Q5は最近改めて興味をあつめている。そして、Q4は人間にとって切実な問題であるが、これまでとくに化学の対象とは考えられていなかった。最近の脳科学、認知科学の進展は、意識も物質的機能が基礎となっていることを明らかにしているようである。これらの問題はいままでの予想以上に早い時期に解明の道筋が見えてくるかもしれない。科学の展開はまさに予断を許さない。

引用文献

- 1) P. Ball, What chemists want to know., *Nature*, **442**, 500-502 (2006)
- 2) T. C. Lucretius (樋口勝彦 訳), 物の本質について, 岩波書店 (1961)
- 3) J. Perrin (玉虫文一 訳), 原子, 岩波書店 (1978)
- 4) 北原文雄, ミセルの化学史-ミセル概念の起源とその確立まで-, *化学史研究*, **36**, 121-147 (2009)
- 5) H. Staudinger (小林義郎 訳), 研究回顧-高分子化学への道, 岩波書店 (1966)
- 6) J.-M. Lehn, Cryptates: inclusion complexes of macropolycyclic receptor molecules., *Pure Appl. Chem.*, **50**, 871 (1978)

*20ページより続く、「百日咳の検査学的診断」

引用文献

- 1) S. Mattoo, *et al*: Molecular pathogenesis, epidemiology, and clinical manifestations of respiratory infections due to *Bordetella pertussis* and other *Bordetella* subspecies. *Clin Microbiol Rev* **18**:326-82, (2005).
- 2) CH. Von König, *et al*: Pertussis of adults and infants. *Lancet Infect Dis* **2**:744-50, (2002).
- 3) Immunization, Vaccines and Biologicals, WHO: Laboratory manual for the diagnosis of whooping cough caused by *Bordetella pertussis*/*Bordetella parapertussis* (http://whqlibdoc.who.int/hq/2004/who_ivb_04.14_eng.pdf)
- 4) 佐藤勇治: 微生物検査必携 細菌・真菌検査 (3) (金井興美編), p F62-75, 日本公衆衛生協会, (1987).
- 5) 蒲地一成, 他: 百日咳. *小児科* **50**:35-41, (2009).
- 6) K. Kösters, *et al*: Evaluation of a real-time PCR assay for detection of *Bordetella pertussis* and *B. parapertussis* in clinical samples. *J Med Microbiol* **50**:436-40, (2001).
- 7) LM. Sloan, *et al*: Multiplex LightCycler PCR assay for detection and differentiation of *Bordetella pertussis* and *Bordetella parapertussis* in nasopharyngeal specimens. *J Clin Microbiol* **40**:96-100, (2002).
- 8) K. Kamachi, *et al*: Development and evaluation of a loop-mediated isothermal amplification method for rapid diagnosis of *Bordetella pertussis* infection. *J Clin Microbiol* **44**:1899-902, (2006).