

ORAC 法 測定原理

### 〔総説〕

- 「妥当性の確認された ORAC (酸素ラジカル吸収能) 法による食品の抗酸化能評価」 渡辺 純…………… 2
- 「造腫瘍性を有するヒト ES/iPS 細胞の非侵襲的モニタリング技術 –ヒト ES/iPS 細胞モニタリングキットの開発–」 舘野 浩章…………… 5
- 〈神経変性疾患研究の最前線〉
- 「第 1 回 アルツハイマー病(1)概論」 井原 涼子…………… 10
- 〈なるほど!! ELISA –基礎とコツ–〉
- 「第 1 回 ELISA とは？」 株式会社シバヤギ編…………… 14
- 「第 5 回 IIS シンポジウム・第 32 回 Wako ワークショップ合同ミーティング見聞録 Solving the mystery of sleep –睡眠・覚醒の謎に挑む」 藤山 知之…………… 26

### 〔化学大家〕

- 「ヨハン・ガドリン」 桜井 弘…………… 29

### 〔製品紹介〕

#### 有機合成

- アルキルホスフィン、低水分 塩基溶液シリーズ …… 16
- 有機分子触媒 VIP …… 17

#### 環境・分析

- H-ORAC 測定用キット …… 4
- ポジティブリスト関連標準品 …… 17
- 電子工業用 溶媒・酸 …… 18
- プレセップ® 55% 硫酸シリカゲル、  
プレセップ® 10% 硝酸銀シリカゲル …… 18

#### 免疫

- ELISA トレーニングキット …… 19
- 抗ポドプラニン, モノクローナル抗体 …… 19

#### 細胞生物

- マロニル- $^{13}\text{C}_3$  コエンザイム A リチウム …… 21
- 植物透明化試薬 ClearSee™ …… 24

#### 培養

- ヒト ES/iPS 細胞モニタリングキット …… 8
- 未分化ヒト ES/iPS 細胞検出試薬 rBC2LCN-FITC、  
rBC2LCN-547、rBC2LCN-635 …… 9
- 未分化ヒト ES/iPS 細胞除去試薬 rBC2LCN-PE23 …… 9
- bFGF 溶液, MF …… 20
- rPSL1a-FITC …… 20
- ウシ胎児血清 (FBS) …… 21
- ハイブリドーマ用無血清培地 …… 22

#### 遺伝子

- Cas9 タンパク質 …… 22
- KANEKA KanCap™ プレパックカラム …… 23
- MagCapture™ エクソソームアイソレーションキット PS …… 32
- 抗 CD63, モノクローナル抗体 (3-13) …… 32

### 〈ScreenFect™ 通信〉

- 「ヒト iPS 細胞への遺伝子導入データ」 …… 25

### 〔お知らせ〕

- 合成・材料、分析分野ホームページリニューアルのお知らせ …… 17

### はじめに

食品から摂取した抗酸化物質が活性酸素種を消去し、生体成分の酸化反応を防ぎ、健康の維持・増進に寄与することが期待されている。特に、野菜・果物などの食品中に豊富に含まれるポリフェノールやカロテノイドのような抗酸化物質が脚光を浴びている。我が国においても、農産物や加工食品の抗酸化能がアンチエイジングやエイジングケア、健康維持の観点から注目されており、食品産業界等から生鮮食品や加工食品への抗酸化能測定値の表示に対する要請が高まりつつある。

### 統一的な食品の抗酸化能測定法の必要性

我が国においては食品の抗酸化機能に関する長い研究の歴史があり、これまでに多種多様な抗酸化能測定法が用いられてきた。食品の抗酸化能は用いる測定法によって得られる値が異なる。例えば、代表的な抗酸化物質の抗酸化能を2つの異なる測定法（ORAC法とDPPH法）で測定し、測定値間の相関を調べると、両者の測定値の相関は低かった<sup>1)</sup>。すなわち、食品への抗酸化能表示を目指すには、まず測定法を統一する必要がある、さらに誰がどこで分析しても測定値が同程度となって測定値を比較可能なように測定方法を標準化する必要がある。また、抗酸化能測定法の統一と標準化は、抗酸化物質摂取の健康への寄与を議論する上でも必要である。抗酸化能測定法の統一・標準化およびその利活用を目指し、抗酸化能評価に関する広範な分野の第一線の研究者と食品への抗酸化能表示に関心をもつ企業が集結し、AOU研究会が2007年に設立された。AOU研究会では、ポリフェノール系抗酸化物質の抗酸化能指標（AOU-P）を求めるための測定法としてORAC測定法を選定している。

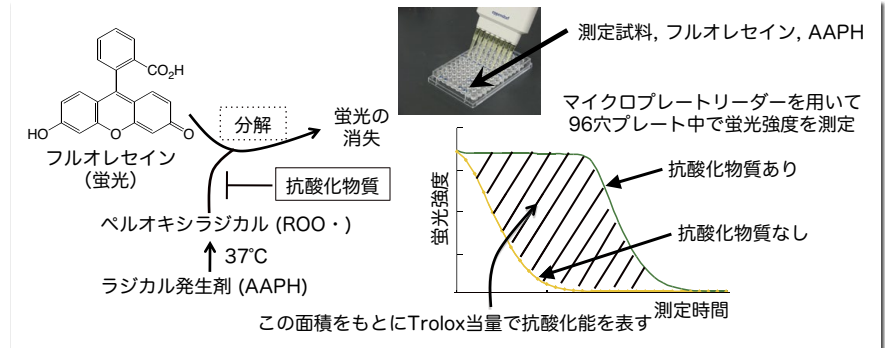


図1. ORAC法の測定原理とORAC値の計算

### ORAC法の特徴

ORAC法は、2,2'-azobis(2-amidino-propane)dihydrochloride (AAPH)の熱分解により生じるペルオキシラジカルが蛍光プローブであるフルオレセインを分解し、それに伴う蛍光強度の減弱過程が抗酸化物質の作用により抑制されることを利用して抗酸化能を測定する方法である（図1左）。ORAC法の特徴は、生体成分の過酸化反応に関与する脂質ペルオキシラジカルを模したラジカル種を用いて生理的pH条件下で測定を行う点であり、このため生体内での酸化反応に近い状態で抗酸化能が評価できる系であると考えられている<sup>2)</sup>。また、ORAC法では血清や臓器ホモジネートのような生体試料の抗酸化能も食品と同様の手法で測定できることから、抗酸化物質を投与したヒトや実験動物から血清を採取し、投与した食品の抗酸化能とそれに伴う血清の抗酸化能の変動を同一の測定法で評価することも可能である<sup>3)</sup>。

ORAC測定<sup>4)</sup>では、96穴マイクロプレートの各ウェルに食品抽出液等の試料溶液およびフルオレセイン溶液を加えて37°Cに加温した後、AAPH溶液の添加により反応を開始させ、蛍光強度（励起波長：485 nm近傍、検出波長：535 nm近傍）の経時変化を37°Cに庫内を保温したマイクロプレートリーダーを用いて2分間隔で90分間測定する。AAPH添加前の蛍光強

度に対する各時間での蛍光強度の相対値をプロットし、曲線下面積（AUC；area under the curve）を計算する。試料存在下のAUCから非存在下のAUCを差し引いたnet AUC（図1斜線部）は試料の抗酸化能に比例して増大するので、濃度既知の抗酸化物質標品であるTroloxのnet AUCから検量線を作成し、試料の抗酸化能をTrolox当量（TE）として表す。測定に必要な機械は汎用性の高い蛍光マイクロプレートリーダーのみであり、用いる試薬も安価なものである点も特徴である。

### ORAC法の妥当性確認

標準化された抗酸化能測定法を提示するためには、決められた分析手順に従って同じ試料を測定すれば、誰がどこで分析しても測定値のばらつきが一定範囲内におさまることを示す必要がある。食品の抗酸化物質には親水性成分と親油性成分が存在し、それらの抗酸化能を総合的に評価するためには親水性部のORAC（H-ORAC）と親油性部のORAC（L-ORAC）を個別に測定する（図2）。なお、野菜や果物など多くの食品では、親水性部の抗酸化への寄与が親油性部より大きい、ナッツなど親油性部の寄与が大きい食品も見られる<sup>5)</sup>。

H-ORAC測定に関しては、原法にほぼ準拠した標準作業手順書を作成して室間共同試験を行ったが、十分な室

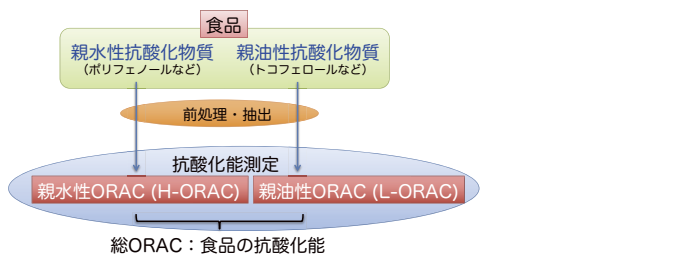


図2. ORAC 法による食品試料の抗酸化能測定手順

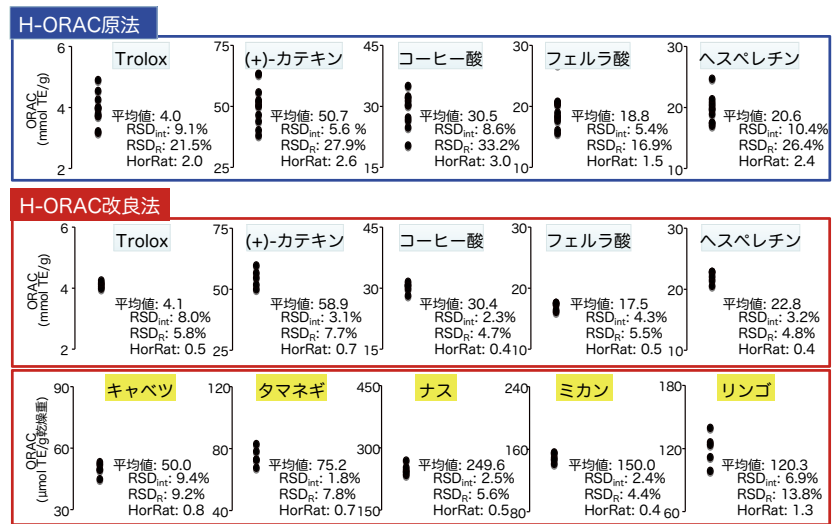
間精度が得られなかった (図3上)。H-ORAC 測定の室間精度の低下要因として、①マイクロプレートリーダーの温度制御特性に起因する測定プレート内のウェル間の温度むら、②各ウェル内の反応液の不均一さ、③一部試料において測定値が試料の希釈倍率に影響を受けることが考えられた。これらについて改良を施した改良 H-ORAC 測定法を開発した。問題点①に対しては測定プレート上部にプレートシールを貼付し、②に対してはラジカル発生剤の AAPH 溶液添加後に混合する操作を加えた。問題点③に対しては、1段階目の測定で試料のおおよその H-ORAC 値を計算し、その値から求めた最適な希釈倍率で2段階目の測定を実施して試料の H-ORAC 値を求める2段階の測定を行うことで、希釈倍率が収束するように改めた。この改良版 H-ORAC 法について室間共同試験を実施した結果、室間共同試験に用いた5種の抗酸化物質溶液、5種の野菜・果物抽出液ともに、分析法が妥当と判断される国際的な基準の範囲内に測定値のばらつきが収まることを確認した (図2)<sup>6)</sup>。さらに、この改良 H-ORAC 法による測定と同等の性能をもつ H-ORAC 測定キットを和光純薬と共同で開発した。

一方、親油性部の ORAC (L-ORAC) 測定に関しても分析法の妥当性確認を行った。L-ORAC 測定では親油性の抗酸化物質を水系に分散させるために、メチル化β-シクロデキストリンを含む含水アセトン溶液で試料を希釈する。このアセトンが試料の取扱中や

測定中に揮発することが問題と考えられた。また、H-ORAC 測定ではピペットチップなどのプラスチック器具類を用いるが、これらを用いて L-ORAC 測定試料を取り扱おうと、溶出された可塑剤が試料中に混入して測定を妨害することがわかった。これらの知見を踏まえ、① H-ORAC 測定と同様にプレートシールを貼付するとともに、測定プレートへの試料の分注を氷上で行う、②試料の取り扱いにはピペットチ

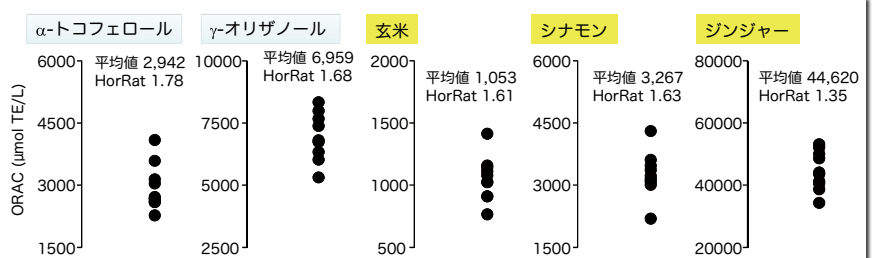
ップの代わりにガラスキャピラリーを用いる分注器、あるいはガラスマイクロシリンジを用い、プラスチック器具類を使用しないことなどを主な改良点とする改良版 L-ORAC 測定法を開発した<sup>7)</sup>。この改良版 L-ORAC 法について室間共同試験を行った結果、用いた合計5種類の抗酸化物質溶液、食品抽出液すべてにおいて分析法が妥当と判断される国際的な基準の範囲内に測定値のばらつきが収まることを確認した (図4)<sup>8)</sup>。

食品の抗酸化能測定において、試料が液体の場合はそのまま分析に供することが可能であるが、多くの場合は試料に含有される抗酸化物質を効率よく抽出する必要がある。抽出法として、凍結乾燥した試料から *n*-ヘキサン-ジクロロメタン (1:1) で親油性物質を抽出後、MWA (メタノール:水:酢



\*HorRat:分析法が妥当であるかどうかを判断する基準で、ハーモナイズド・プロトコルでは0.5~2.0の間であれば分析法が妥当であるとされる

図3. H-ORAC 原法と改良法による室間共同試験結果



\*HorRat:分析法が妥当であるかどうかを判断する基準で、ハーモナイズド・プロトコルでは0.5~2.0の間であれば分析法が妥当であるとされる

図4. L-ORAC 改良法による室間共同試験結果



酸=90:9.5:0.5)で親水性物質を抽出する方法を採用した。代表的な野菜・果物の凍結乾燥粉末を用い、ここに親油性抗酸化物質として $\alpha$ -トコフェロール、親水性抗酸化物質として没食子酸を添加して、それぞれの回収率を調べた。抽出は上記の様にn-ヘキサン-ジクロロメタン(1:1)とMWAを用いて連続的に行い、残留農薬等の抽出等に用いられる高速溶媒抽出装置と、抽出装置を用いない抽出方法の比較も行った。その結果、 $\alpha$ -トコフェロールは親油性部、没食子酸は親水性部にのみ見られること、回収率はとりわけ高速溶媒抽出装置を用いた場合に良好であった<sup>9)</sup>。

### 妥当性の確認された抗酸化能測定法による食品の抗酸化能データの蓄積

ポリフェノール等の二次代謝産物が寄与すると考えられる野菜や果物の抗酸化能は、品種や栽培条件、収穫期などによって変動すると考えられる。すなわち、抗酸化能の高い品種を選抜し、抗酸化能を高める栽培法を用いることによって高付加価値化が図れることを意味する。このような観点から、代表的な食品の抗酸化能データの蓄積

を行い、データベースの構築を行っている<sup>10)</sup>。ここで重要なことは、妥当性の確認された測定法を用いているため、改良H-ORAC, L-ORAC測定法による測定値が、データベースの抗酸化能測定値と比較可能なことである。また、食品の抗酸化能データの集積は、その食品の抗酸化能の代表値を知ることにもつながる。我々は、抗酸化物質を単独で摂取しているのではなく、食事から複数の抗酸化物質を組み合わせで摂取している。そのため、抗酸化物質の総量を反映する食品の抗酸化能(antioxidant capacity: AOC)に着目した研究が必要であると考えている。食品の抗酸化能データベースを充実させ、AOCと疾病発症リスクの関連性に関する高精度の疫学研究を実施しているところである。

### 今後の展望

ここで紹介した改良H-ORAC, L-ORAC測定法の標準作業手順書、およびプレートリーダーのデータからORAC値を計算するためのテンプレートは、食品需給センターのウェブサイト上に掲載され、利用可能である。

介護を要しない健康寿命の延伸は国

民の関心事であり、これに寄与する生活習慣の一つとして食生活のあり方に関する情報提供が強く求められるようになってきている。抗酸化能測定法の統一と標準化を通じた、食品のもつ抗酸化能について適切な情報を普及する取り組みが、食品の抗酸化能に関する機能性研究の進展と深化に繋がるものと確信している。筆者らの取り組みが、生産者にとっては抗酸化能を指標とした農産物・食品のブランド化に、消費者にとっては抗酸化能を基準とした食品選択の基準の確立に繋がることを期待したい。

### 【参考文献】

- 1) 渡辺純 他: 化学と生物, **47**, 237-243 (2009).
- 2) Huang, D. et al.: *J. Agric. Food Chem.*, **50**, 1815-1821 (2002).
- 3) Cao, G. H. et al.: *Free Radic. Biol. Med.*, **14**, 303-311 (1993).
- 4) 渡辺純 他: 日本食品科学工学会誌, **57**, 525-531 (2010).
- 5) Wu, X. et al.: *J. Agric. Food Chem.*, **52**, 4026-4037 (2004).
- 6) Watanabe, J. et al.: *Anal. Sci.*, **28**, 159-165 (2012).
- 7) Watanabe, J. et al.: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **77**, 857-859 (2013).
- 8) Watanabe, J. et al.: *Anal. Sci.*, **32**, 171-176 (2016).
- 9) Watanabe, J. et al.: *J. Food Sci.*, **79**, C1665-C1671 (2014).
- 10) Takebayashi, J. et al.: *J. Food Comp. Anal.*, **29**, 25-31 (2013).

## 食品などの抗酸化能の測定に

### H-ORAC測定用キット

#### キット構成

- フルオレセイン 1ml用×1
- トロロックス 1ml用×2
- AAPH 15ml用×2
- フェルラ酸 100mg×1
- Assay Buffer 500ml用×1
- 96穴マイクロプレート 2枚
- プレートシール 4枚

#### 〈キット以外に必要な試薬・器具・機材〉

- ・プレートリーダー
- ・メタノール
- ・恒温槽
- ・酢酸
- ・精製水
- ・マイクロピペット



コードNo.	品名	規格	容量	希望納入価格(円)
295-79501	H-ORAC Activity Assay Kit	食品分析用	1キット	照会

#### 関連商品 プレートリーダー

品名	メーカー	希望納入価格(円)
Spark <sup>®</sup>	TECAN	照会
Infinite <sup>®</sup> 200PRO	TECAN	照会

※製品の仕様詳細は下記当社HPからご確認いただけます。  
<http://www.wako-chem.co.jp/siyaku/kiki/multi/index.htm>

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4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。



### はじめに

ヒト ES 細胞や iPS 細胞は再生医療のための細胞源として期待されている一方、造腫瘍性という大きな課題を抱えている。我々はこれまでヒト ES/iPS 細胞に選択的に結合する rBC2LCN レクチンを見出し、ヒト ES/iPS 細胞を染色して、除去する技術を開発してきた。今回、我々は培養液を用いてヒト ES/iPS 細胞の数を非破壊的にモニタリングする技術を世界で初めて開発し、実用化することに成功した。ヒト ES/iPS 細胞を用いた再生医療の安全性向上への貢献が期待される。本総説ではヒト ES/iPS 細胞モニタリングキットの開発経緯についてご紹介したい。

### ヒト ES/iPS 細胞を用いた再生医療の大きな課題

ヒト ES 細胞やヒト iPS 細胞は、無限に増殖できる能力（自己複製能）や、心筋細胞や神経細胞など、あらゆる細胞に分化する能力（多能性）を持つことから、再生医療のための細胞源として世界的に大きな期待が寄せられている。特にヒト iPS 細胞は遺伝子を導入するだけで様々な体細胞から作製することができることから、再生医療のみならず、病態モデルや創薬開発などへの応用が期待されている。2015 年の 9 月には加齢黄斑変性の治療を目的として、自己のヒト iPS 細胞由来の網膜色素上皮細胞を移植する臨床研究が世界で初めて実施された。このようにヒト ES/iPS 細胞の臨床応用が進む一方で、安全性に関する大きな課題が立ち塞がる。ヒト ES/iPS 細胞から作製した移植用の細胞には、分化誘導後も尚、未分化な状態の細胞が残存し、腫瘍化する可能性があることが最大の懸念事項となっている。ヒト（自己）iPS（様）細胞加工医薬品等の品質及び安全性の確保に関する指針（薬食発

0907 第 3 号 2012 年 9 月 7 日）においても、「ヒト iPS（様）細胞加工医薬品等においては目的細胞以外の未分化細胞の混入を否定するための方策が最も重要な要件である。可能な限り中間製品の段階で目的細胞以外の未分化細胞の混入を否定することが望ましい」と記載されており、ヒト iPS（様）細胞加工医薬品を医療に用いる際には、残存する未分化細胞の造腫瘍性が大きな関心事になっていることが分かる。それ故、ヒト ES/iPS 細胞から作製した移植用細胞にどのくらい未分化な細胞が残存しているかを評価する技術が必要となる。

### ヒト ES/iPS 細胞特異的レクチン rBC2LCN の発見

我々はこれまで細胞表面を高密度に覆う糖鎖を迅速、高感度に解析する技術としてレクチンマイクロアレイを開発してきた。ヒト ES/iPS 細胞表面も他の細胞同様に糖鎖で覆われているが、これら多能性幹細胞がどのような糖鎖構造を発現しているのかについての詳細は明らかにされていなかった。こうした中、我々はレクチンアレイを用いて計 100 種以上のヒト ES/iPS 細胞を解析した<sup>1)</sup>。更に、質量分析計と液体クロマトグラフィーを用いて定量的な糖鎖構造解析を実施した<sup>2)</sup>。その結果、ヒト ES/iPS 細胞に発現する糖鎖構造を明らかにするとともに、レクチン（糖結合タンパク質の総称）の一種である rBC2LCN がヒト ES/iPS 細胞に特異的に結合することを見出した<sup>1)</sup>。その後、和光純薬工業との共同研究を実施し、rBC2LCN を用いてヒト ES/iPS 細胞を生きたまま染色できる試薬を開発した（非標識 rBC2LCN レクチン：2013 年 6 月、rBC2LCN-FITC：2014 年 6 月、rBC2LCN-635：2014 年 12 月、rBC2LCN-547：2015 年 6 月<sup>3)</sup>。更に rBC2LCN レクチンの C 末端部分に緑膿菌由来外毒素（PE23）を融合させた組換えタンパク質

（rBC2LCN-PE23：2015 年 7 月）を開発し、培養液に添加するだけで未分化細胞を選択的に殺傷除去することができる試薬を開発した<sup>4)</sup>。

### ヒト ES/iPS 細胞モニタリングキットの開発

rBC2LCN レクチンのヒト ES/iPS 細胞への結合機構を解析したところ、rBC2LCN はポドカリキシンという 1 型膜タンパク質上の O 型糖鎖の一種である H タイプ 3（Fuca1-2Galβ1-3GalNAc）と呼ばれる糖鎖エピトープに結合することが分かった<sup>5)</sup>。面白いことに、この rBC2LCN が反応性を示すポドカリキシン（以後、rBC2LCN 陽性ポドカリキシン）が、さまざまな種類のヒト ES/iPS 細胞から培養液中に分泌されていることを見出した<sup>6)</sup>。一方、ポドカリキシンは腎臓など他の組織にも存在するが、ヒト ES/iPS 細胞に特徴的な rBC2LCN 陽性ポドカリキシンは調べた限り通常の体細胞からは分泌されていない。すなわち、培養液中の rBC2LCN 陽性ポドカリキシンを調べることで、細胞自体を使わずに培養液を用いてヒト ES/iPS 細胞を検出できることになる。そこでまず、rBC2LCN を ELISA プレートに固相化することにより培養液中の rBC2LCN 陽性ポドカリキシンを捕捉して、それを検出するためのプローブを探索した<sup>6)</sup>。各種抗体やレクチンをスクリーニングした結果、O 型糖鎖に反応性を示す rABA レクチンを検出プローブとして用いることで、rBC2LCN 陽性ポドカリキシンを高感度に検出することが分かった。rBC2LCN レクチンと rABA レクチンの 2 種類のレクチンを用いたサンドイッチアッセイ系を GlycoStem 法と命名した。しかしポドカリキシンのタンパク質骨格に対して作製された各種抗体では、うまく検出することができなかった。それはポドカリキシンが多量の O 型糖鎖で覆われているため、

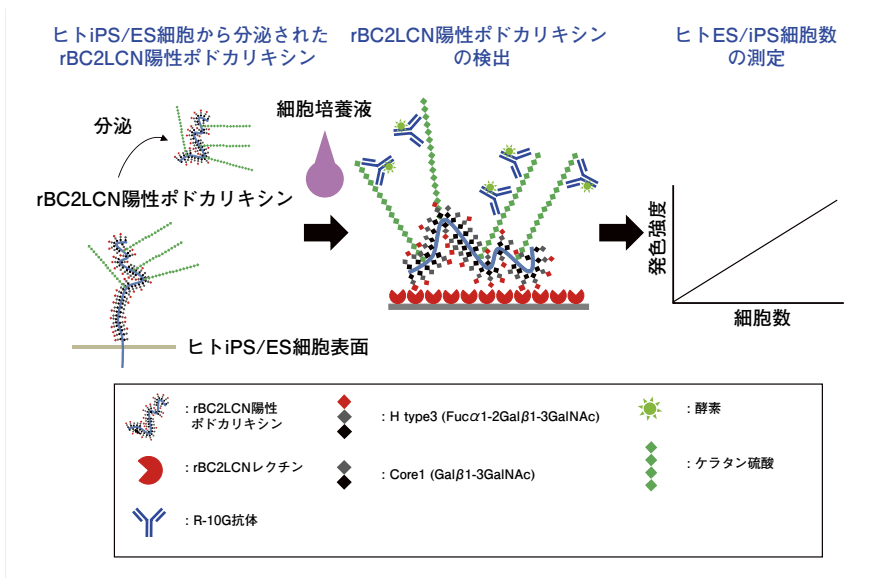


図1. GlycoStem-HP法(ヒトES/iPS細胞モニタリングキット)の概要

抗体がタンパク質骨格にうまくアクセスできないためであると考えられた。その後更に本 GlycoStem 法を検証した結果、培養液中に含まれるウシ胎児血清に対して高いバックグラウンドを示すことがわかった<sup>7)</sup>。そこで更に、ウシ胎児血清にバックグラウンドを示さない検出抗体の探索を行った。その

結果、ヒト ES/iPS 細胞に発現するポドカリキシンに提示された低硫酸化ケラタン硫酸に反応する R-10G 抗体を使用すると、ウシ胎児血清の影響を受けずに、培養液中の rBC2LCN 陽性ポドカリキシンを特異的に検出できることが分かった。rBC2LCN レクチンと R-10G 抗体を用いたサンドイッチ

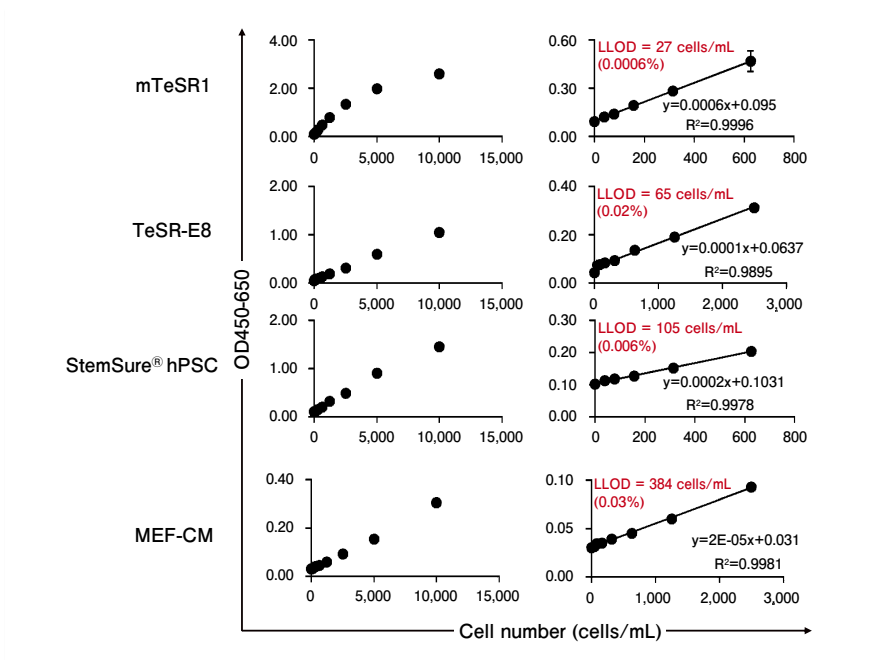


図2. GlycoStem-HP 法(ヒト ES/iPS 細胞モニタリングキット)を用いた標準曲線の作成  
各種培養液で培養したヒト iPS 細胞 (201B7 株) 培養上清を用いた解析。

アッセイ系を高性能 GlycoStem 法 (GlycoStem-HP 法) と名付けた。図 1 に GlycoStem-HP 法の概要を示す。GlycoStem-HP では mTeSR1、TeSR-E8、StemSure® hPSC medium、mouse embryonic fibroblast-conditioned media (MEF-CM) など各種培養液で培養したヒト ES/iPS 細胞の検出に適用可能であり、その検出下限値は 0.0006-0.03% であった (図 2)。

### ヒト iPS 細胞由来心筋細胞、及び神経幹細胞への応用

GlycoStem-HP 法が実際のヒト iPS 細胞由来の移植用細胞に適用できるかどうかについて検証した。そこで重症心不全の治療を目的として、ヒト iPS 細胞由来心筋細胞を用いた再生医療を目指して研究を進めている大阪大学心臓血管外科との共同研究により、ヒト iPS 細胞から心筋細胞を分化誘導する過程における未分化細胞数の測定を行った (図 3)。フローサイトメーターで解析したところ、全細胞数は分化誘導後 5 日目に増加し、その後は細胞数に大きな変動はなかった。一方、フローサイトメーターで Tra-1-60/rBC2LCN 陽性細胞数を測定したところ、分化誘導過程で徐々に減少した。GlycoStem-HP 法で得られた見かけの細胞数 (arbitrary unit, AU) も、全細胞数の増加とともに分化誘導 3 日後に増加したものの、その後は徐々に減少し、フローサイトメーターで算出された細胞数と類似していた。

更に脊椎損傷治療を目的としてヒト iPS 細胞由来神経幹細胞の移植を目指し研究を進めている慶應義塾大学医学部及び大阪医療センターとの共同で、ヒト神経幹細胞中に混在するヒト iPS 細胞の測定に挑戦した。その結果、GlycoStem-HP 法を用いると 0.05% のヒト iPS 細胞の混入を検出できることが分かった。2016 年 3 月、GlycoStem-HP 法は「ヒト ES/iPS 細胞モニタリングキット」として和光純薬工業から

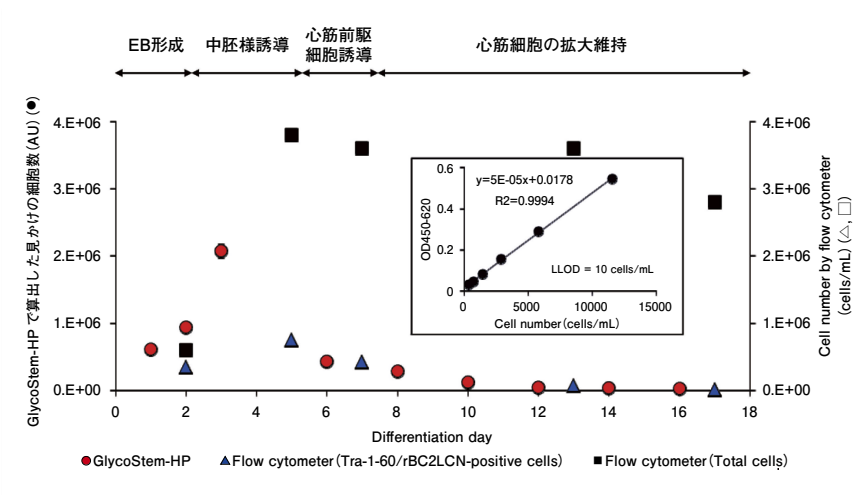


図3. GlycoStem-HP法(ヒトES/iPS細胞モニタリングキット)を用いた心筋分化過程の未分化細胞数のモニタリング

実用化に至った。

## おわりに

造腫瘍性試験法としては、免疫不全動物を用いた *in vivo* 造腫瘍性試験法に加え、未分化細胞に特異的な抗体を用いたフローサイトメトリー法、Lin28 遺伝子発現を指標とした PCR 法、Essential-8/LN521 培養増幅法などがある。これらの試験法はいずれも移植に用いる細胞の一部を検査に使用する必要があった。今回開発した GlycoStem-HP 法の最大の利点は、貴重な移植用細胞を用いることなく、僅か 50  $\mu$ L の培養液を用いて非破壊的に未分化細胞数を測定することが出来る点である。培養液で測定できるため、自動化検査装置の開発への展開も期待できる。培養液を用いて未分化細胞数を測定する技術は世界的にも他には存在しない。再生医療・細胞治療用の細胞加工品中に残存する未分化細胞の非破壊試験法としての活用が期待される。一方注意点としては、ヒト ES/iPS 細胞の数を rBC2LCN 陽性ポドカリキシンの量で測定しているため間接的であること、また細胞や培養液の種類によって分泌量が変化することなどがあげられる。GlycoStem-HP 法は未

分化細胞数を測定する新しい技術であることから様々な検証が必要であることは言うまでもない。

rBC2LCN レクチンを用いてヒト ES/iPS 細胞を染色、検出、除去する技術を開発し、実用化した(図4)。ヒト ES/iPS 細胞を用いた再生医療の実現化に貢献できるように、これら技術の改良と検証を進めるとともに、ヒト ES/iPS 細胞に発現する糖鎖の機能についても明らかにしていきたい。

## レクチン

糖鎖に結合するタンパク質の総称で、ヒトからウイルスまで全ての生物に存在する。1888年にロシアのステイルマークにより、ヒマ種子の抽出液がいろいろな動物の血球を凝集することを発見されたのが最初。特定の糖鎖に結合することから、古くから糖鎖解析のための試薬として応用されるほか、細胞間の相互作用を媒介することによりさまざまな生命現象に深く関与する機能を持つ。

## rBC2LCN

グラム陰性菌 *Burkholderia cenocepacia* 由来のレクチン BC2L-C の N 末端ドメインの組み換えタンパク質のこと。レクチンアレイを用いた解析の結果、各種ヒト ES/iPS 細胞と反応性を示すレクチンとして同定された。培養液に添加するだけで生きたままヒト ES/iPS 細胞を染色できることから、ヒト ES/iPS 細胞染色用試薬として、未標識体や各種蛍光標識体が和光純薬工業より実用化されている。

## 【参考文献】

- 1) Tateno, H., Toyota, M., Saito, S., Onuma, Y., Ito, Y., Hiemori, K., Fukumura, M., Matsushima, A., Nakanishi, M., Ohnuma, K.,

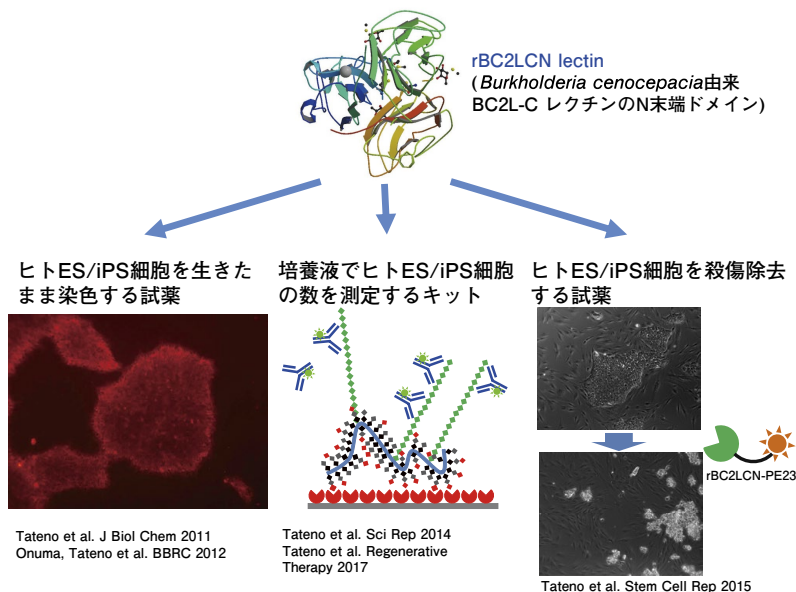


図4. rBC2LCN レクチンを用いたヒト ES/iPS 細胞の染色、検出、除去技術の開発



- Akutsu, H., Umezawa, A., Horimoto, K., Hirabayashi, J. and Asashima, M. : *J. Biol. Chem.*, **286**, 20345-20353 (2011).
- 2) Hasehira, K., Tateno, H., Onuma, Y., Ito, Y., Asashima, M. and Hirabayashi, J. : *Mol. Cell. Proteomics*, **11**, 1913-1923 (2012).
- 3) Onuma, Y., Tateno, H., Hirabayashi, J., Ito, Y. and Asashima, M. : *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **431**, 524-529 (2013).
- 4) Tateno, H., Onuma, Y., Ito, Y., Minoshima, F., Saito, S., Shimizu, M., Aiki, Y., Asashima, M. and Hirabayashi, J. : *Stem cell reports*, **4**, 811-820 (2015).
- 5) Tateno, H., Matsushima, A., Hiemori, K., Onuma, Y., Ito, Y., Hasehira, K., Nishimura, K., Ohtaka, M., Takayasu, S., Nakanishi, M., Ikehara, Y., Ohnuma, K., Chan, T., Toyoda, M., Akutsu, H., Umezawa, A., Asashima, M. and Hirabayashi, J. : *Stem Cells Transl. Med.*, **2**, 265-273 (2013).
- 6) Tateno, H., Onuma, Y., Ito, Y., Hiemori, K., Aiki, Y., Shimizu, M., Higuchi, K., Fukuda, M., Warashina, M., Honda, S., Asashima, M. and Hirabayashi, J. : *Sci. Rep.*, **4**, 4069 (2014).
- 7) Tateno, H., Hiemori, K., Hirayasu, K., Sougawa, N., Fukuda, M., Warashina, M., Amano, M., Funakoshi, T., Sadamura, Y., Miyagawa, S., Saito, A., Sawa, Y., Shofuda, T., Sumida, M., Kanemura, Y., Nakamura, M., Okano, H., Onuma, Y., Ito, Y., Asashima, M. and Hirabayashi, J. : *Regenerative therapy*, (2016), in press.

## 培養液でヒトES/iPS細胞数を推測可能！ 未分化細胞維持培養と分化工程の品質管理にご使用下さい



### ヒトES/iPS細胞モニタリングキット

本キットは、細胞を消費せずに培養上清を用いて、未分化細胞が培養液中に放出する rBC2LCN 陽性ポドカリキシンを定量的に測定することで培養液中に含まれるヒト ES/iPS 細胞数を推測できます。

#### 特長

- 培養上清を分析することで、未分化細胞数の増減をモニタリング可能
- 測定対象が培養上清であるため、細胞を検査に消費することなく、細胞はそのまま培養を継続可能
- 少量の培養上清 (50 μL) で分析可能
- ELISA 法を用いるため、簡便に多検体を処理可能

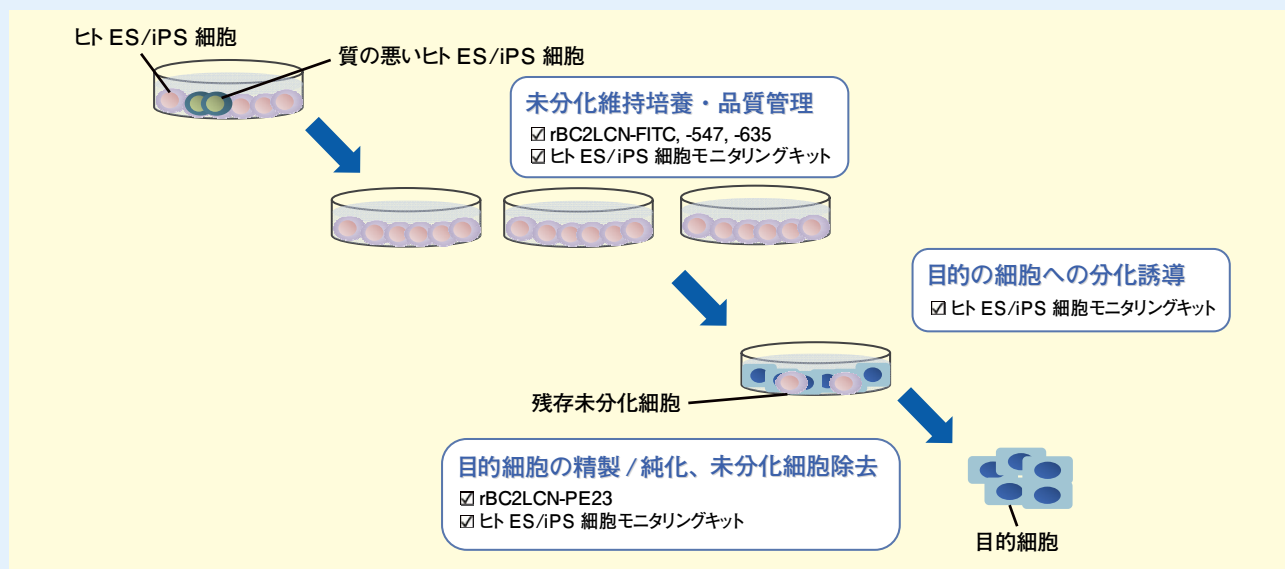
コード No.	品名	規格	容量	希望納入価格(円)
299-78301	Human ES/iPS Cell Monitoring Kit	再生医療研究用	96回用	96,000

詳細は、当社 HP ([http://www.wako-chem.co.jp/siyaku/product/life/es\\_ips\\_monitoring/index.htm](http://www.wako-chem.co.jp/siyaku/product/life/es_ips_monitoring/index.htm)) をご覧下さい。

#### 関連商品

#### rBC2LCN関連製品

ヒト ES/iPS 細胞の未分化維持培養～分化誘導～精製/純化の各工程において、rBC2LCN 関連製品を使用頂けます。



[次頁に続く]

...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4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。

未分化維持培養・品質管理

培地に添加するだけでヒトES/iPS細胞を染色可能！

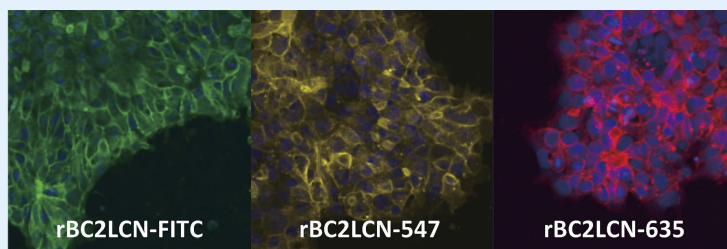


rBC2LCN-FITC、rBC2LCN-547、rBC2LCN-635

本品は、蛍光色素でラベル化した rBC2LCN です。ヒト ES/iPS 細胞の培養液に添加することで、未分化細胞を生きたまま解析することができます。細胞染色、フローサイトメトリーのいずれにもご使用頂けます。

特長

- 培地に添加するのみで染色可能
- 細胞固定せず細胞を生きたまま明瞭に染色可能
- 細胞毒性が低く、染色した状態で培養可能
- Tra-1-60, Tra-1-81, SSEA3, SSEA4 と同様に細胞表面上の糖鎖を認識
- 細胞染色、フローサイトメトリーに使用可能



(ヒト iPS 細胞 201B7 株)

コード No.	品名	規格	容量	希望納入価格(円)
180-02991	rBC2LCN-FITC 【AiLecS1-FITC】	細胞染色用	100 μL	20,000
186-02993	Excitation 495nm, Emission 520nm		100 μL × 5	80,000
186-03211	rBC2LCN-547 【AiLecS1-547】	細胞染色用	100 μL	30,000
182-03213	Excitation 551nm, Emission 565nm		100 μL × 5	120,000
185-03161	rBC2LCN-635 【AiLecS1-635】	細胞染色用	100 μL	30,000
181-03163	Excitation 634nm, Emission 654nm		100 μL × 5	120,000

詳細は、当社 HP (<http://www.wako-chem.co.jp/siyaku/product/life/rBC2LCN-FITC/index.htm>) をご覧下さい。

目的細胞の精製/純化、未分化細胞除去

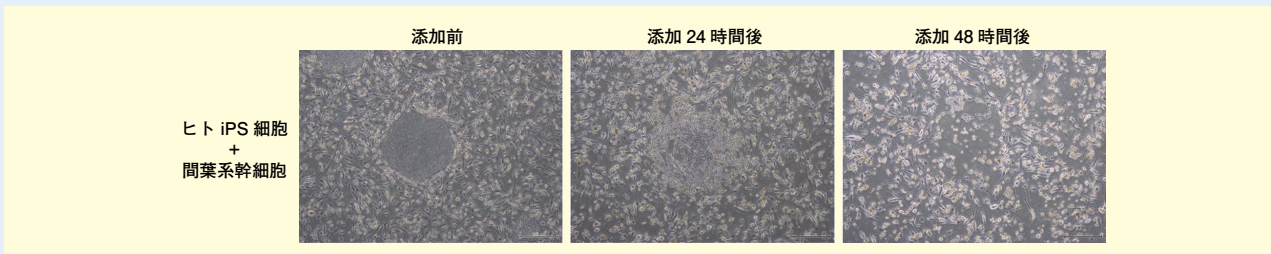
培地に添加するだけでヒトES/iPS細胞を除去可能！

rBC2LCN-PE23

本品は、緑膿菌由来外毒素の触媒ドメイン (PE23) を rBC2LCN の C 末端に融合させた組換えタンパク質です。rBC2LCN-PE23 は細胞内に取り込まれた後、タンパク質合成を阻害して細胞死を引き起こすことでヒト ES/iPS 細胞を殺傷します。殺傷された細胞は培養容器より浮遊するため、培地交換を行うことで、除去することが可能です。

データ

間葉系幹細胞分化でのヒト iPS 細胞の除去



疾患患者由来ヒト iPS 細胞を間葉系幹細胞に分化させ、ヒト iPS 細胞と間葉系幹細胞が混在している培養液に、終濃度 10 μg/mL となるように rBC2LCN-PE23 を添加した。添加 24 時間後にはヒト iPS 細胞のコロニーが崩れ始め、添加 48 時間後にはヒト iPS 細胞はほとんど除去されている。

一方、間葉系幹細胞は、rBC2LCN-PE23 添加 48 時間後でもその影響を受けることなく、細胞が生存している。

(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)

コード No.	品名	規格	容量	希望納入価格(円)
180-03231	rBC2LCN-PE23	細胞培養用	100 μL	30,000
186-03233			100 μL × 5	120,000

詳細は、当社 HP (<http://www.wako-chem.co.jp/siyaku/product/life/rBC2LCN-PE23/index.htm>) をご覧下さい。

☐…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 4 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1回 アルツハイマー病 (1) 概論

東京大学大学院医学系研究科 神経病理学、東京大学医学部附属病院 早期・探索開発推進室 井原 涼子

## 「神経変性疾患研究の最前線」シリーズ開始にあたって

東京大学大学院医学系研究科 神経病理学 岩坪 威

このたび和光純薬時報に、疾患研究の最前線を紹介する本格的なレビューシリーズがあらたに企画され、その第一弾として神経変性疾患を取り上げて頂ける僥倖に与った。かつて神経変性疾患は、治療はおろか診断すらも困難な稀少難病ばかり、との固定観念を逃れられぬ時代もあった。しかし医学研究の発展と高齢化社会の本格化に伴い、アルツハイマー病、パーキンソン病などは common disease と認識され、その診断・治療法開発も格段の進歩を遂げ、さらには希代の難病と目された ALS にも病態解明のメスが入ろうとしている。本シリーズでは、研究の発展の著しい幾つかの代表的な神経変性疾患を対象に、本邦の気鋭の研究者に、その現状と展望を存分に開陳頂くことにした。ご期待ください。

### はじめに

アルツハイマー病 (Alzheimer's Disease, AD) は、病理学的には老人斑と神経原線維変化を伴う海馬・側頭葉を中心とした神経細胞脱落を特徴とする神経変性疾患であり、臨床的には老年期に発症し、いわゆる物忘れを主体とする緩徐進行性の認知症を呈する。AD 以外にも物忘れを主とした認知症の原因となる病理があり、しばしばそれらは複数合併すること、また純粋なアルツハイマー病理であっても時に非典型的な臨床症状を来すことからわかるように、病理学的な AD と臨床像は必ずしも一対一に対応しない。本稿では AD を病理学的疾患と位置づけ、分子病態を説明した後、それに基づく新しい臨床診断区分や最新の臨床研究について解説したい。

### AD の病態生理

#### ・ADの神経病理所見

1906年にアロイス・アルツハイマーは、記憶障害と妄想を主徴とする初老期認知症患者の脳の顕微鏡的観察において、Bielschowsky 染色にて明瞭に観察される老人斑と神経原線維変化を認めたと報告した。老人斑は細胞外に、神経原線維変化は細胞内に生じる構造物である (図1)。この2つの病理学的特徴を有する疾患を、他の認知症と区別して AD と呼ぶようになって

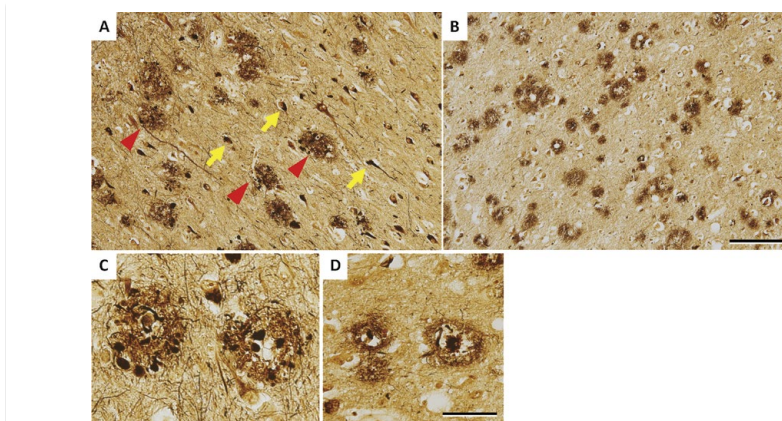


図1. 家族性AD症例 (50代、PSEN1 V717I変異) の脳病理

A・Cは海馬、B・Dは側頭葉皮質、Bielschowsky 染色。A: 多数の老人斑 (矢印) と神経原線維変化 (矢印) を認める。B: 全層にわたって老人斑を認める。C: 海馬には dystrophic neurite を伴う老人斑 (neuritic plaque) を認める。D: このように中心にコアを伴う老人斑を cored plaque と呼ぶ。スケールバー: A・Bは100μm、C・Dは50μm。

た。老人斑と神経原線維変化は、それぞれ独立してある程度均一な病理の進展形式をとることがわかり、老人斑は大脳新皮質→側頭葉内側構造物や基底核→脳幹→小脳<sup>1)</sup>、神経原線維変化は嗅内野→辺縁系→新皮質と進展する<sup>2)</sup>。2012年に発表された米国国立加齢研究所とアルツハイマー協会 (NIA-AA) による神経病理学的診断ガイドラインでは、両者の広がりや密度に対応したスコアが設定され、認知症の原因病理として説明しうるか否かが4段階で判断される<sup>3)</sup>。

#### ・βアミロイドとタウ、アミロイドカスケード仮説

1980年に入り生化学的手法が進歩し、細胞外にできる老人斑の主成分がβアミロイド (Aβ) であること、細

胞内にできる神経原線維変化の主成分が異常にリン酸化されたタウタンパク質であることが相次いで報告され、これらの発見はAD病態研究のブレイクスルーとなった。しかし、同じようにADを特徴づける分子のうち、どちらが病態の中心的役割を担うのか長く議論の対象となった。1990年代にADの約1%を占める家族性ADの病因遺伝子としてAPP、PSEN1、PSEN2が相次いで同定された<sup>46)</sup>。APPの産物アミロイド前駆タンパク質は1回膜貫通型タンパク質であり、管腔側でβセクレターゼのBACE1 (beta-site APP cleaving enzyme)、次いで細胞膜内でγセクレターゼによって切断され、そうして産生されたAβは細胞外に分泌される。PSEN1、PSEN2

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。



の産物プレセニリン1および2は、nicastatin、Aph-1、Pen-2とともにγセクレターゼを構成する分子で、酵素活性中心を形成することが判明した。このように、3つの病因遺伝子のいずれもAβ産生に関わり、一方、タウタンパク質をコードするMAPTの変異ではアルツハイマー病ではなく前頭側頭葉変性症になること、正常高齢者の病理学的な解析から老人斑を多く認めるが神経原線維変化を認めない症例が少なからず見られることなどから、Aβが病態の上流に位置すると考えられるようになった。これをまとめたアミロイド仮説（アミロイドカスケード仮説ともいう）は次のような病態の流れを仮定している。1) APP、PSEN1、PSEN2の変異によりAβ産生が増える→2) Aβが凝集し老人斑を形成する過程で、オリゴマーが作られる→3) オリゴマーがシナプス毒性を示し、シナプスおよび神経細胞の傷害を起こす→4) キナーゼ活性の変化によ

りタウのリン酸化が起こり神経原線維変化ができる→5) 広範な神経細胞機能不全と神経細胞死を生じ、臨床的に認知症を発症する（図2）<sup>7)</sup>。孤発性ADの場合は、Aβ産生過多ではなく、細胞外に分泌されたAβの分解遅延が想定されること、臨床的な認知機能障害はAβ病理ではなくタウ病理の進行度と強く関連することなど、解釈に注意が必要な点はあるものの、ADのモデルとなるAPPトランスジェニックマウスにおいてタウをノックアウトすると認知機能障害にならない<sup>8)</sup>、βセクレターゼによる切断に抵抗性のAPP変異はADになりにくい<sup>9)</sup>など仮説を支持するデータが複数あり、「仮説」ではあるものの広く信じられている。現在この仮説を理論的根拠として疾患修飾薬の開発が行われており、後述するバイオマーカーを用いた臨床診断区分もこの仮説に基づいた病態の経過を想定して設定されたものである。

仮説内では深く触れられていないが、Aβオリゴマーがどのようにタウを介した異常につながるのかは、いまだに最大のブラックボックスであり、またADの主たるリスク遺伝子であるAPOEが主にどのステップに関わるのか、未解明である。

・ADのバイオマーカー

バイオマーカーとは疾患の病態生理を反映する定量的な指標で、診断や重症度・進行度の評価に用いられる。ADの治療薬試験では評価項目として認知機能や日常生活機能を図る尺度が用いられてきたが、内的小および外的要因によるぶれが大きいとの理由で、それに代わる定量性の高いバイオマーカーの探索がなされてきた。ADのバイオマーカーとして、変化が出現する順に、脳内のAβ沈着を反映する脳脊髄液Aβ（特にAβ<sub>1-42</sub>）やアミロイドPET、神経細胞機能不全を反映するFDG-PETや機能的MRI、タウによる神経変性を反映する脳脊髄液リン酸化タウおよびタウ、タウPET、神経細胞死を反映する構造的MRIが挙げられる<sup>10)</sup>。近年アミロイドPET、タウPETといった生体分子イメージングの進歩が目覚ましく、選択基準への組み込みや、副次評価項目としての使用など、臨床研究で果たす役割も大きくなっている。侵襲度とコストの観点から血漿・血清バイオマーカーの開発が望まれているが、現在のところ信頼性の高いものは見つかっていない。

NIA-AAによるADの臨床診断区分

ADが根底にあることが疑われる、記憶障害を主とする認知症は、病理学的疾患としてのADと区別してアルツハイマー型認知症と呼ばれてきた。しかし、1995年頃から認知症の前段階として軽度認知障害（mild cognitive impairment, MCI）という言葉が用いられるようになったことや、バイオマーカーにより臨床症状が出るより

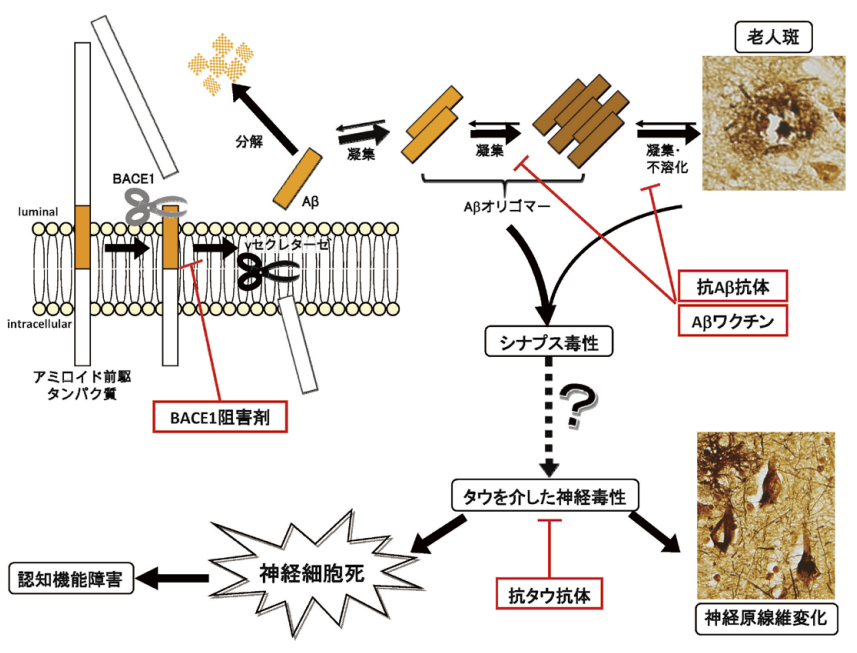
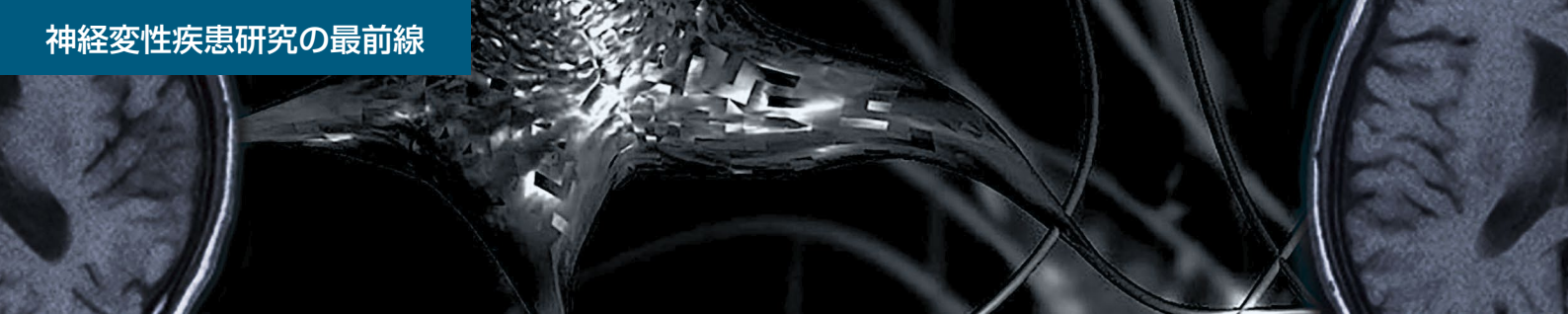


図2. アミロイド仮説と現在開発中の疾患修飾薬

アミロイド仮説は、Aβが産生され、オリゴマー化するとシナプス毒性を発揮し、何らかの機序でタウを介した神経毒性につながり、神経細胞死に至るというものである。この図からもわかるように、老人斑や神経原線維変化は、不溶性の凝集体を作ることによってAβやタウの毒性発揮からむしろ保護的に働く可能性が考えられている。抗Aβ抗体は、それぞれ凝集程度の異なるAβに作用することが想定されている。



もかなり前から病理変化が始まること  
がわかってきたことから、よりふさわ  
しい表現が望まれるようになった。実  
際、家族性 AD の遺伝子変異の未発  
症保因者を縦断的に追跡した多施設共  
同研究 Dominantly Inherited Alzheimer  
Network (DIAN) では、臨床的に症  
状が出る 20 年前からアミロイド PET  
によりアミロイド蓄積が見られること  
を明らかにした<sup>11)</sup>。このような流れ  
を踏まえ、2011 年に NIA-AA は、最  
新のバイオマーカーの知見を取り入れ  
た新しい診断基準を発表した<sup>12-14)</sup>。実  
に 25 年ぶりの改訂であった。新診断  
基準では、アルツハイマー病の臨床病  
期は、AD dementia、MCI due to AD、  
preclinical AD の 3 つに分類される。  
他の認知症疾患と同様に、dementia  
と MCI を分類するのは認知機能障害  
に加えて日常生活の自立の障害がある  
か否か、MCI と preclinical を分類す  
るのは日常的に一貫した認知機能障害  
があるか否かであるが、それぞれの診  
断区分の確からしさを増す手段として  
バイオマーカーの情報が加えられた。  
AD dementia は、緩徐進行性で客観的  
に示される認知機能悪化があり、健忘  
あるいは言語障害、視空間認知障害、  
遂行機能障害を特徴とするという臨床  
情報だけでも probable AD dementia  
の診断は可能だが、それに AD のバ  
イオマーカー陽性に加わると診断の確  
からしさが一段上がる。同様に MCI  
も、例えば臨床情報に加えて A $\beta$  バ  
イオマーカーと神経変性バイオマ  
ーカーの両方が陽性であるものを区別し  
て、MCI due to AD - high likelihood  
などとする。preclinical AD は臨床的  
に正常、あるいは MCI の診断を満た  
さない程度の軽微な認知機能障害を認  
めるのみだが、AD のバイオマーカー  
陽性のものを指す。preclinical AD は  
進行度に応じて 3 病期に分けられ、前  
述のようにアミロイド仮説を仮定する  
と、AD のバイオマーカーは A $\beta$ →タ  
ウや神経変性の順に生じることを踏ま

え、A $\beta$  マーカーのみが陽性の stage1、  
A $\beta$  マーカーに加えてタウまたは神経  
変性を示唆するマーカーが陽性である  
stage2、その 2 者のバイオマーカー陽  
性に加えて軽微な認知機能低下を認め  
る stage3 に分けられる。NIA-AA の  
診断基準は、バイオマーカーを取り入  
れると生前に高精度で病理診断がで  
きるという複数のグループの研究をコ  
ンセンサスとしてまとめたに過ぎない  
が、研究利用を目的として明確な診断  
区分が設けられたことは、観察研究や  
治験における被験者の選択の一助と  
なったと言えよう。一方、積極的なバ  
イオマーカーの測定を推奨しているも  
のではなく、preclinical AD の診断や  
バイオマーカーの測定は、あくまで研  
究目的に限るよう勧告している。

## AD の治療薬開発

1996 年にアリセプトが AD の治療  
薬として米国 FDA の認可を受けて以  
来、現在までに上市されてきたのは、  
症状改善薬のみである。日常診療にお  
いてこれらの薬は活躍しているが、ア  
ミロイド仮説に基づき病態そのものを  
止めるあるいは遅らせることを目的と  
した疾患修飾薬も待ち望まれている。  
疾患修飾薬は、この 20 年近く、開発  
が進んできたものの、残念ながら第Ⅲ  
相試験のハードルを超えることができ  
ていない。

A $\beta$  の産生を抑制する薬として最初  
に $\gamma$ セクレターゼ阻害薬の開発が進ん  
だが、最初の semagacestat は第Ⅲ相  
試験にて皮膚癌の発生のリスクの上昇  
を認めたため、開発中止となった<sup>15)</sup>。  
この副作用は $\gamma$ セクレターゼの基質の  
一つ、Notch を介したものと考えら  
れ、Notch 切断を抑制しない $\gamma$ セクレ  
ターゼ阻害薬や、 $\gamma$ セクレターゼ活性  
を変えずに毒性の強い A $\beta$ 42 の産生  
のみ減らす $\gamma$ セクレターゼ調整薬も開  
発されたが、Notch を介した副作用を  
完全に防げないという理由で開発中止

あるいは中断されている。それに代わ  
る A $\beta$  産生抑制薬として、BACE1 阻  
害薬に期待が集まっている。最初に臨  
床開発に進んだ 2 剤はいずれも非臨床  
試験での毒性のため開発中止となっ  
たが、現在も複数の薬物が臨床開発進  
行中である。ただ、BACE1 は、基質が  
多いことが懸念材料となっていた $\gamma$ セ  
クレターゼに代わる安全な標的と考え  
られてきたが、BACE1 のノックア  
ウトマウスに網膜病変を認めることがわ  
かってきており<sup>16)</sup>、以前よりも安全  
性の確保に慎重な姿勢となっている。

A $\beta$  のクリアランスを促進させる薬  
としては、受動免疫の抗 A $\beta$  抗体、能  
動免疫の A $\beta$  ワクチンが臨床開発され  
てきた。抗 A $\beta$  抗体は、最初に臨床治  
験に入った 2 剤に共通して amyloid-  
related imaging abnormalities (ARIA)  
という血管原性浮腫の副作用が認めら  
れ、開発が足踏みすることとなった。  
いずれも用量を減らすなどの工夫をし  
て第Ⅲ相試験に進んだものの、認知機  
能障害の進行抑制効果を示すことが  
できなかった<sup>17,18)</sup>。solanezumab は  
その後も MCI ~ 早期の AD dementia  
を対象とした治験を続けていたが、  
2016 年 11 月にエンドポイントを達成  
せずとの結果となった。後述する  
preclinical AD を対象とした治験にも  
採用されており、まだ検証過程にあ  
る。現在、標的とする A $\beta$  種やエピ  
トープが異なる複数の抗体薬が臨床開  
発に進み、期待も大きいですが、ARIA を  
避けながらの用量設定となるため、有  
効な用量設定を行えるかどうかが大  
きな鍵となる。A $\beta$  ワクチンの開発の歴  
史は抗体より古く、2001 年に A $\beta$  全  
長を用いたワクチン AN1792 が治験  
に進んだが、髄膜脳炎の副作用のため  
開発中止となった<sup>19)</sup>。現在では免疫  
原性の低い A $\beta$  の N 末を用いたワク  
チンの第Ⅱ相試験が行われている。

タウを標的とする治療薬も開発され  
てきたが、現在のところ第Ⅲ相試験で  
有効性を示したものはない。細胞外に



放出された病的なタウが正常な神経細胞内に取り込まれ、正常なタウを病的なものへと変質させる prion-like propagation によってタウの病理の進展が起こるといふ説が提唱されており<sup>20)</sup>、その抑制を目的とした抗タウ抗体が臨床開発に進み、関心を集めている。

## 新たな取り組み～ preclinical AD を対象とした治験

アミロイド仮説に基づいて開発された疾患修飾薬の臨床開発がうまくいっていない理由として、アミロイド仮説が正しくないためとする声はごく少数である。もちろん薬物側の改良点はあるが、これまでの治験では適切な対象に投与できていないことが失敗の主因と考える研究者が多い。第一に、真に対象とする病態を有する被験者を選択できているのかという問題があり、臨床的に重症度の軽い被験者を対象とする治験では、バイオマーカーを用いた被験者の選択が行われるようになってきた。第二に、対象とする病期が病態を抑制するには遅きに失しているのではないかということである。疾患修飾薬の治験の対象は、中等度 AD から早期 AD、早期 AD から MCI へと徐々に早期化してきたが、臨床症状が始める MCI においても、 $A\beta$  の蓄積はほぼ天井に達しており、それなりの脳萎縮、すなわち神経細胞死が見られる状態であることを考えると、もっと病態の軽いうちに介入するのが良いのではと考えられるに至った。2013 年より、家族性 AD の遺伝子変異の未発症保因者を対象とした DIAN-trial unit (DIAN-TU)、API (Alzheimer's Prevention Initiative)、アミロイド PET 陽性の孤発性 preclinical AD を

対象とした A4 study (Anti-Amyloid treatment in Asymptomatic Alzheimer's study) など preclinical AD を対象とした治験が相次いで開始された。DIAN-TU や API では被験者数が限られること、現在は主要評価項目として臨床的指標しか許容されていないが、preclinical 期には臨床症状の変化が少ないことから、従来の治験より長い 3 年～5 年という追跡期間が設定されている。多額の費用がかかる、若い被験者を対象にするため負担軽減の策を練る必要がある、軽微な認知機能障害を検出する尺度もまだ改良の余地がある、など先駆けであるがゆえの悩みは多いが、この革新的な治験に研究者・一般の人とも大きな期待を寄せている。その他、AD の臨床研究における最新のキーワードとして、このような治験を行うための public private partnership という新たな枠組み、多施設共同研究のデータを有効利用するためのデータシェアリング、そのデータを解析し効率的な治験の設計の助けとなる disease progression modeling などが挙げられる。

## おわりに

AD の研究の歴史をたどりながら、最新の研究を解説した。この 40 年間、多数の研究者により活発に AD 研究が行われ、特徴的な病理変化の主要構成成分の同定と遺伝性家系の病因遺伝子の同定は、病態の解明につながり、それが疾患修飾薬の開発だけでなく、バイオマーカーや診断基準といった臨床的に有用なツールにもつながった。一方、同じだけ長い年月にわたって健常者を含むコホートの縦断的臨床データと剖検の蓄積があり、そういった土台の上に、基礎研究と臨床研究の融合

とも言える、新しい臨床研究が積みあげられつつある。AD の研究の歴史は、間違いなく他の神経変性疾患の治療薬開発のモデルとなるだろう。

## 【参考文献】

- 1) Thal, D. R. *et al.* : *Neurology*, **58**, 1791-800 (2002).
- 2) Braak, H. *et al.* : *Acta Neuropathol.*, **112**, 389-404 (2006).
- 3) Montine, T. J. *et al.* ; National Institute on Aging ; Alzheimer's Association : *Acta Neuropathol.*, **123**, 1-11 (2002).
- 4) Goate, A. *et al.* : *Nature*, **349**, 704-6 (1991).
- 5) Sherrington, R. *et al.* : *Nature*, **375**, 754-60 (1995).
- 6) Levy-Lahad, E. *et al.* : *Science*, **269**, 970-3 (1995).
- 7) Hardy, J. *et al.* : *Science*, **297**, 353-6 (2002).
- 8) Roberson, E. D. *et al.* : *Science*, **316**, 750-4 (2007).
- 9) Jonsson, T. *et al.* : *Nature*, **488**, 96-9 (2012).
- 10) Jack, C. R. Jr. *et al.* : *Lancet Neurol.*, **9**, 119-28 (2010).
- 11) Bateman, R. J. *et al.* : Dominantly Inherited Alzheimer Network : *N. Engl. J. Med.*, **367**, 795-804 (2012).
- 12) McKhann, G. M. *et al.* : *Alzheimers Dement.*, **7**, 263-9 (2011).
- 13) Albert, M. S. *et al.* : *Alzheimers Dement.*, **7**, 270-9 (2011).
- 14) Sperling, R. A. *et al.* : *Alzheimers Dement.*, **7**, 280-92 (2011).
- 15) Doody, R. S. *et al.* ; Alzheimer's Disease Cooperative Study Steering Committee, Siemers, E. *et al.* ; Semagacestat Study Group : *N. Engl. J. Med.*, **369**, 341-50 (2013).
- 16) Cai, J. *et al.* : *EMBO Mol. Med.*, **4**, 980-91 (2012).
- 17) Salloway, S. *et al.* ; Bapineuzumab 301 and 302 Clinical Trial Investigators : *N. Engl. J. Med.*, **370**, 322-33 (2014).
- 18) Doody, R. S. *et al.* ; Alzheimer's Disease Cooperative Study Steering Committee; Solanezumab Study Group : *N. Engl. J. Med.*, **370**, 311-21 (2014).
- 19) Orgogozo, J. M. *et al.* : *Neurology*, **61**, 46-54 (2003).
- 20) Holmes, B. B. *et al.* : *J. Biol. Chem.*, **289**, 19855-61 (2014).

今回は、「アルツハイマー病 (2) タウタンパク質」の予定です。

当社では、アルツハイマー病研究関連試薬を取り扱っています。

詳細は当社 HP (<http://www.wako-chem.co.jp/siyaku/product/life/Alzheimer/index.htm>) をご覧下さい。

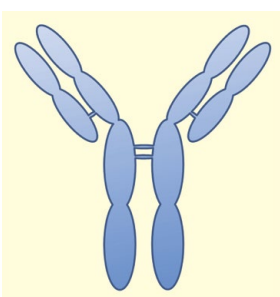


### 第1回 ELISA とは？

#### ELISAは免疫学的測定法のひとつ

ELISAは抗体を使った免疫学的測定法（イムノアッセイ、Immunoassay）のひとつです。Enzyme-linked immuno-sorbent assayの頭文字をとっています。「酵素結合免疫吸着測定法」、「酵素免疫測定法」と訳されています。読み方はエライザ／エライサ／イライザ／イライサと様々ですが、エライザが多いようです。

抗体は生体にとって異物である抗原が体内に入ることによって免疫反応を起こした結果作られるタンパク質です。イムノグロブリン(Ig)に属します。イムノグロブリンにはG(IgG)、M(IgM)、A(IgA)、D(IgD)、E(IgE)のクラスがあります。イムノアッセイで使われる抗体は主としてIgGです。



ELISAは、目的とする物質とだけ結合する「優れた特異的結合能」と「ごく微量の物質でも結合できる強い親和性」を持つ抗体を結合試薬として利用した測定法です。

#### ELISAでは抗体をどう利用するのか？

ここでは利用頻度が最も高いサンドイッチELISAについて説明します。通常96ウェルマイクロプレートを使います。

まず、ウェルの表面に抗体を吸着させておきます（コーティング、coatingとか固相化と言う）。この抗体は固相化抗体（キャプチャー抗体）と言われ、測定対象物質である抗原を捉えるために使われます。図1では都合上、抗体が1個しか付いていないように描かれていますが、実際は数多くの抗体が吸着されています。抗体が固相化されたウェルに抗原を含む溶液（標準品、または測定試料）を加え、抗体に抗原が結合するまでの時間放置します（一次反応）。反応が終わったら余分な液を捨て、ウェルを洗います。こうすると固相化抗体に結合した抗原だけがウェルに残ります。

次に、固相化抗体が抗原を認識する場所（エピトープ）とは異なるエピトープを認識する抗体（第二抗体とか二次抗体、検出抗体と言う）を加えて、しばらく放置します。この第二抗体にはあらかじめ化学的に酵素を結合（標識）してあります。

加えられた酵素標識第二抗体は固相化抗体に結合した抗原を認識し、それに結合します。その後、余分な酵素標識第二抗体を洗い流します。

次に、酵素反応によって発色する物質（色原性基質）の溶液を加え、酵素反応を行わせると色原性基質は酵素の作用を受けて色素に変わります。

そこで反応停止液を加え酵素反応を止めてから色の濃淡を96ウェルマイクロプレート用の比色計で測定します。こうして固相化抗体に結合した抗原の量が色素として測定できることになります。比色定量の結果は吸光度（absorbance）として表現されるので、標準品の測定結果から横軸に抗原濃度、縦軸に吸光度をとり検量線を描きます。この検量線を用い測定試料の吸光度から試料中の抗原量を計算します。

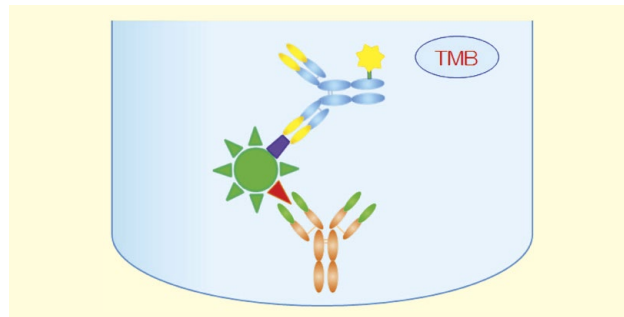


図1.

図1に示したサンドイッチELISAの実施方法はもっとも基本的な方法です。酵素の分子量はかなり大きいので抗体の結合に立体障害が生じる可能性があります。また1分子の抗体に多くの酵素を結合させることは困難です。

そこで別なタンパクに酵素を結合させて立体障害を少なくする方法が考えられました。

下の図2のように、第二抗体はビオチンで標識します。ビオチンは分子量が非常に小さい物質です。ビオチンとはもともと生体に存在する生理活性物質ですが、これと非常に強い親和力で結合するタンパク質が卵白の中に含まれているアビジンです。このアビジンに酵素を結合させ、抗原

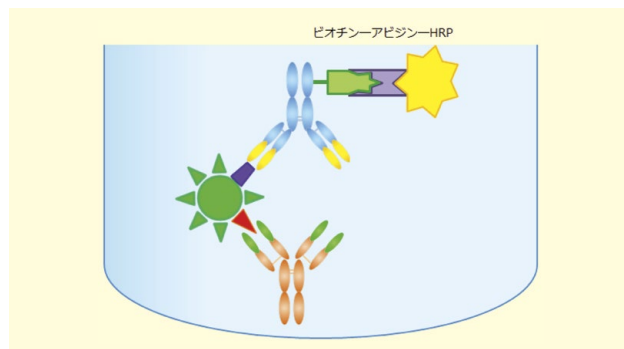


図2.

と結合したビオチン標識第二抗体と反応させれば、立体障害を克服できます。またアビジンに結合させる酵素を増やすことにより増幅効果も期待できます。ELISA ではこのような改善方法も用いられています。

本法は、抗体-抗原-抗体の形になるので、サンドイッチ法と呼ばれています。つまり抗体がパンで抗原をハムと考えるわけです。

### 酵素と色原性基質

ELISA で良く用いられている酵素はペルオキシダーゼと言う過酸化水素等を基質として酸化反応を触媒する酵素です。ペルオキシダーゼにはいくつかあります。今回はHRPと呼ばれる西洋わさび (Horseradish) 由来のペルオキシダーゼの主な性質を表1に要約しました。

ここでひとつご注意願いたいのは、検体に存在する可能性のある阻害剤です。ペルオキシダーゼの阻害剤は、表1にあるようにCN<sup>-</sup>、S<sup>2-</sup>、F<sup>-</sup>、N<sub>3</sub><sup>-</sup>などです。特に血液試料を採取するとき採血管がフッ素やNaN<sub>3</sub>でコーティングされているものを使用することがあります。ELISA では検体を抗体と反応させた後に洗浄するので、阻害剤が決定的な酵素活性抑制を起すほどではありませんが、洗浄後わずかに残存しているものが酵素をいくらかでも抑制すれば、発色の低下となって現れる可能性があります。これらの採血管は使用しないことが望ましいです。

HRPの色原性基質として使用されているのは、TMBと言われる、3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン (3,3',5,5'-Tetramethyl benzidine) です。HRPによって過酸化水素

表1.

ペルオキシダーゼ (Hydrogen peroxidase, Horseradish peroxidase, HRP)	
反応起源	色原性基質 + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ⇌ 酸化型色素 + 2H <sub>2</sub> O 西洋わさび (Horseradish)
分子量、至適pH 基質特異性	40,000, pH 6.5 色原性基質 (水素供与体) については特異性なし。 過酸化物としてはH <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , CH <sub>3</sub> OOH, C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OOHのみ
阻害剤と活性化剤	阻害剤: CN <sup>-</sup> , S <sup>2-</sup> , F <sup>-</sup> , N <sub>3</sub> <sup>-</sup> (抗凝固剤として用いられるフッ素イオンと保存料として用いられるNaN <sub>3</sub> に注意!)
安定性	乾燥、冷蔵状態で数年間、水溶液で冷蔵1年間安定

が分解され、生じた活性酸素がTMBを酸化します。この結果できた青紫の色素は反応を停止するために加えられる硫酸酸性下では黄色になり、450nmに吸収を持つようになります。

### 吸光度の測定

吸光度を測るには、TMB由来色素の吸収波長の450nmでの吸収を測定します。ウェルの均一性や、ウェルのキズなどの影響をキャンセルするために、副波長として620nm (600~650nm)の吸光度も求め、450nmの吸光度との差を真の吸光度として扱います。

吸光度とは、比色定量の基盤となる光の透過と溶液中の物質濃度との関係を示すランベルト-ベールの法則 (Lambert-Beer's law) によって決められる数値のことです。

$$\text{吸光度} = \log_{10}(I_0/I) = \epsilon lc$$

I<sub>0</sub>: 入射光、I: 透過光、

ε: モル吸光係数、l: 吸収層 (cm)、

c: 濃度 (M)

入射光に対する透過光の割合、即ち透過率の逆数の対数が吸光度 (absorbance) になります。

例えば、光が10%しか透過しないときには、吸光度は100/10 = 10、log<sub>10</sub> = 1となります。50%の透過率では、100/50 = 2、log<sub>2</sub> = 0.301となります。吸光度3.0は透過率0.1%ということになります。プレートリーダーの性能にも寄りますが信頼できる限界付近を事前に決めておくことをお勧めします。

表2.

透過率 (%)	90	80	50	10	1	0.1
吸光度	0.046	0.097	0.301	1.000	2.000	3.000

今回は、「第2回 ELISAの操作法とそのポイント (前編)」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。

## ~『イムノアッセイ』の測定技術習得をサポートします~

Shibayagi

教材 / 研修用 / 技術評価用

### ELISAトレーニングキット

ELISA トレーニングキットは、ELISA 測定を始められる方、ELISA 測定の技量を確認したい方、測定施設内 / 間で技術検定を実施したい方向けの製品です。

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

詳しくは、p.19をご覧ください。

空气中で不安定な化合物が使いやすくなりました!!  Wako

## アルキルホスフィン

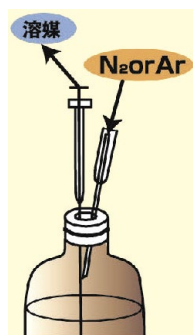
### 低水分 塩基溶液シリーズ

有機合成化学で使用する反応剤は、空气中の水分や酸素と反応し活性に大きな影響を与えることが知られています。このような反応剤は、秤量中の短い時間で失活・潮解するため、不活性ガス雰囲気下（グローブボックス内など）で秤量を行う必要があります。この度、このような不便さを解消する溶液タイプを発売しました。各容量ともシリンジ針で抜き取ることができるため、空气中の水分や酸素と触れることなく使用することができます。

#### 特長

- 空气中の水分や酸素と触れずに、使用することができる
- 取扱易い溶液タイプ




#### 試薬抜き取り方法



図のように N<sub>2</sub> または Ar ガスを吹き込みながら、シリンジにて試薬を抜き取って下さい。

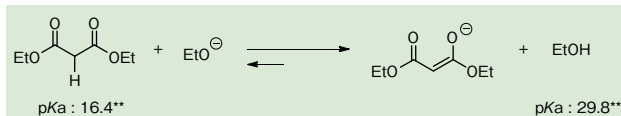
#### ■ アルキルホスフィン

アルキルホスフィン配位子は、さまざまな金属と錯体を形成し、カップリング反応に利用されます。本シリーズでは、特に空気と容易に反応するホスフィンをラインアップしました。

コード No.	品名	CAS No.	規格	容量	希望納入価格 (円)
206-20481	3mol/L Trimethylphosphine Tetrahydrofuran Solution 	594-09-2	有機合成用	50mL	30,000
205-20451	1mol/L Tri- <i>n</i> -butylphosphine Toluene Solution 	998-40-3	有機合成用	50mL	17,000
208-20441	1mol/L Tri- <i>t</i> -butylphosphine Hexane Solution 	13716-12-6	有機合成用	50mL	49,000











#### ■ 低水分 塩基溶液

有機塩基化合物は有機合成において重要な反応剤の一つで、基質の pKa を基に適切な反応剤を使用します。この度、潮解しやすい塩基化合物を低水分、高活性な状態でラインアップしました。



#### 各種溶媒における pKa 値

pKa の値が高い方が、強力な塩基として作用します。















基質	pKa		基質	pKa	
	H <sub>2</sub> O	DMSO		H <sub>2</sub> O	DMSO
<i>t</i> -butane 	53**	—	<i>t</i> -BuOH 	17.0**	32.2*
CH <sub>4</sub> 	48**	56**	DBN 	—	—
PhH 	43**	—	DBU 	17.0**	12**
NH <sub>3</sub> 	38**	41**	DABCO 	2.97, 8.82**	2.97, 8.93**
H <sub>2</sub> 	~36**	41*	DMAP 	9.2**	—

\* pKa table (Bordwells' group) : <http://www.chem.wisc.edu/areas/reich/pkatable/> (2016/12/27 現在)

\*\* pKa table (Evans' group) : [http://evans.rc.fas.harvard.edu/pdf/evans\\_pKa\\_table.pdf](http://evans.rc.fas.harvard.edu/pdf/evans_pKa_table.pdf) (2016/12/27 現在)

#### 規格例 1.0mol/L *t*-BuOK, THF 溶液

試験項目	規格値	試験項目	規格値
外観	試験適合	濃度	0.8~1.1mol/L
密度(20℃)	0.903~0.907g/mL	IR(ATR法)	試験適合
水分	0.1%以下	カリウム	試験適合

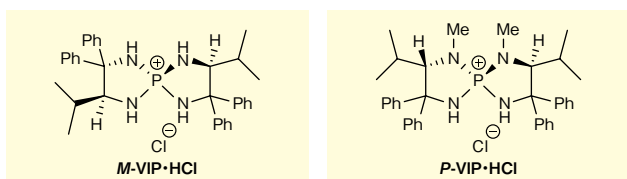
コード No.	品名	規格	容量	希望納入価格 (円)
128-06651	1.0mol/L Lithium <i>t</i> -Butoxide, Tetrahydrofuran Solution [ <i>t</i> -BuOLi] 	有機合成用	50mL	7,000
124-06653	1.0mol/L Lithium <i>t</i> -Butoxide, Tetrahydrofuran Solution [ <i>t</i> -BuOLi] 	有機合成用	250mL	23,000
192-18241	1.0mol/L Sodium <i>t</i> -Butoxide Tetrahydrofuran Solution [ <i>t</i> -BuONa] 	有機合成用	100mL	6,000
194-18245	1.0mol/L Sodium <i>t</i> -Butoxide Tetrahydrofuran Solution [ <i>t</i> -BuONa] 	有機合成用	500mL	12,000
169-27901	1.0mol/L Potassium <i>t</i> -Butoxide Tetrahydrofuran Solution [ <i>t</i> -BuOK] 	有機合成用	100mL	6,000
161-27905	1.0mol/L Potassium <i>t</i> -Butoxide Tetrahydrofuran Solution [ <i>t</i> -BuOK] 	有機合成用	500mL	12,000
047-34221	1.0mol/L 1,5-Diazabicyclo[4.3.0]-5-nonene Tetrahydrofuran Solution [DBN] 	有機合成用	100mL	11,000
049-34225	1.0mol/L 1,5-Diazabicyclo[4.3.0]-5-nonene Tetrahydrofuran Solution [DBN] 	有機合成用	500mL	40,000
042-34151	1.0mol/L 1,8-Diazabicyclo [5.4.0] undec-7-ene Tetrahydrofuran Solution [DBU] 	有機合成用	100mL	9,000
044-34155	1.0mol/L 1,8-Diazabicyclo [5.4.0] undec-7-ene Tetrahydrofuran Solution [DBU] 	有機合成用	500mL	33,000
040-34211	1.0mol/L 1,4-Diazabicyclo [2.2.2] octane Tetrahydrofuran Solution [DABCO] 	有機合成用	100mL	9,500
042-34215	1.0mol/L 1,4-Diazabicyclo [2.2.2] octane Tetrahydrofuran Solution [DABCO] 	有機合成用	500mL	35,000
043-34201	0.5mol/L 4-Dimethylaminopyridine Tetrahydrofuran Solution [DMAP] 	有機合成用	100mL	9,500
045-34205	0.5mol/L 4-Dimethylaminopyridine Tetrahydrofuran Solution [DMAP] 	有機合成用	500mL	35,000

☐…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4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。



## 高収率・高立体選択性を実現!! Wako 有機分子触媒 VIP

本触媒は、不斉アルドール反応、不斉マイケル付加反応、不斉ヒドロホスホニル化反応などの不斉反応に使用することができます。アミノ酸のバリンを原料とするためVIP (= Valine-derived IminoPhosphorane) とし、窒素上に置換基を持たないジアミンからはM体、メチル基をもつものからはP体の塩が生成します。



### 特長

- 収率、立体選択性、共に優れた不斉合成用触媒

### 反応例

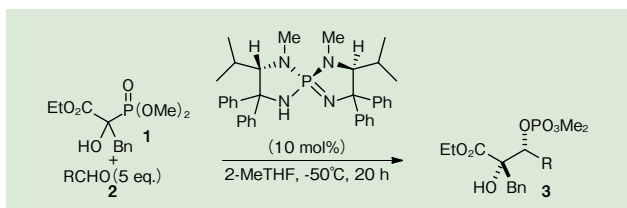


表. 高立体選択的アルドール反応<sup>[a]</sup>

No.	R	生成物	収率 [%] <sup>[b]</sup>	syn/anti <sup>[c]</sup>	エナンチオマー比 <sup>[d]</sup>
1	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	<b>3a</b>	71	> 30:1	95:5
2	2-naphthyl	<b>3b</b>	68	> 30:1	94.5:5.5
3	2-FC <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	<b>3c</b>	56	> 30:1	94:6
4	2-ClC <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	<b>3d</b>	64	> 30:1	95:5
5	3-NCC <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	<b>3e</b>	89	> 30:1	94:6
6	3-BrC <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	<b>3f</b>	87	> 30:1	95:5
7	4-ClC <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	<b>3g</b>	82	> 30:1	95:5
8	4-BrC <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	<b>3h</b>	91	> 30:1	95.5:4.5
9	4-MeO <sub>2</sub> CC <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	<b>3i</b>	89	> 30:1	97:3

[a] 本反応は基質 0.10mmol に対して 5.0 等量のアルデヒドを用い、2-MeTHF 中、-50°C、20 時間の反応条件で実施した。[b] 単離生成物の収率。[c] 未精製反応物に対して <sup>1</sup>H NMR 測定を行い、割合を決定した。[d] CHIRALPAK AD3 カラムを使用し、割合を決定した。

### 【参考文献】

1) Corbett, M. T., Uruguchi, D., Ooi, T. and Johnson, J. S.: *Angew. Chem. Int. Ed.*, **51**, 4685 (2012).

コード No.	品名	規格	容量	希望納入価格(円)
226-02381	P-VIP·HCl 	有機合成用	50mg	18,000
229-02371	M-VIP·HCl 	有機合成用	50mg	16,000

## この春、合成・材料及び分析分野のホームページをリニューアルします

各製品情報が見やすく探しやすいになります。「合成・材料」ページではサイエンスライターのコラムを閲覧、「分析」ページでは HPLC アプリケーションデータを検索いただけます。是非ご活用下さい。

[合成・材料]



[分析]



【合成・材料】 <http://labchem.wako-chem.co.jp/synthesis/>

【分析】 <http://labchem.wako-chem.co.jp/analysis/>

## 追加品目のお知らせ



### 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

- フルベンダゾール代謝産物 R35475 標準品
- メタアルデヒド標準品

#### 動物用医薬品標準品

- ゲンタマイシン C<sub>1</sub> 標準品
- イブロンダゾール標準品
- ロメフロキサシン塩酸塩標準品

コード No.	品名	規格	容量	希望納入価格(円)
 069-06671	Flubendazole Metabolite R35475 Standard 	高速液体クロマトグラフ用	100mg	30,000
 130-18741	Metaldehyde Standard  	残留農薬試験用	100mg	5,000
 079-06591	Gentamicin C <sub>1</sub> Standard 	高速液体クロマトグラフ用	50mg	23,000
 098-07261	Ipronidazole Standard 	高速液体クロマトグラフ用	100mg	30,000
 122-06671	Lomefloxacin Hydrochloride Standard 	高速液体クロマトグラフ用	100mg	8,000

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 の「ポジティブリスト関連品目」リストをご覧ください。

当社試薬 HP → カテゴリーから選ぶ → 分析・環境 → 食品分析 → 01. 残留農薬・動物用医薬品 (ポジティブリスト制度) → 1. ポジティブリスト制度対応 取扱品目一覧 (16/07)

和光 ポジティブリスト

検索 












## 金属含量・パーティクルを保証 Wako 電子工業用 溶媒・酸

パーティクルや金属含量を抑えた高純度の溶媒、酸類です。電子工業分野での試験研究にご使用いただけます。1本からの購入が可能で、使用期限は製造から12か月（硝酸は24か月）です。




### 規格例

試験項目	1-メチル-2-ピロリドン	塩酸
外観(APHA)	無色〜わずかに微黄色、 澄明の液体(50以下)	無色澄明の液体
比重(20/4℃)	1.032~1.037	—
水分	100ppm以下	—
屈折率 $n_D^{20}$	1.468~1.471	—
硫酸塩(SO <sub>4</sub> )	—	0.2ppm以下
蒸発残分	—	10ppm以下
強熱残分	—	2ppm以下
灰分	5ppm以下	—
塩化物(Cl)	1ppm以下	—
遊離塩素	—	試験適合
遊離アミン(CH <sub>3</sub> NH <sub>2</sub> として)	10ppm以下	—
よう素還元性物質	—	試験適合
亜硫酸塩(SO <sub>3</sub> )	—	1ppm以下
臭素(Br)	—	10ppm以下
よう化物(I)	—	1ppm以下
アンモニウム(NH <sub>4</sub> )	—	1ppm以下
含量(GC)	99.0%以上	—
濃度	—	35.0~37.0%
銀(Ag)	—	1ppb以下
アルミニウム(Al)	10ppb以下	200ppb以下
ヒ素(As)	—	5ppb以下
バリウム(Ba)	—	100ppb以下
カルシウム(Ca)	5ppb以下	300ppb以下
カドミウム(Cd)	—	1ppb以下
コバルト(Co)	—	1ppb以下
クロム(Cr)	1ppb以下	2ppb以下
銅(Cu)	2ppb以下	10ppb以下
鉄(Fe)	10ppb以下	100ppb以下
カリウム(K)	20ppb以下	50ppb以下
リチウム(Li)	—	5ppb以下
マグネシウム(Mg)	—	200ppb以下
マンガン(Mn)	—	5ppb以下
ナトリウム(Na)	50ppb以下	500ppb以下
ニッケル(Ni)	1ppb以下	10ppb以下
鉛(Pb)	1ppb以下	20ppb以下
ストロンチウム(Sr)	—	20ppb以下
亜鉛(Zn)	10ppb以下	50ppb以下
水銀(Hg)	—	5ppb以下
パーティクル(0.5μm以上)	100個/mL以下	試験適合
パーティクル(0.3μm以上)	300個/mL以下	—

### 溶媒類

コード No.	品名	規格	容量	希望納入価格(円)
 012-26821	Acetone 	電子工業用	1L	2,000
 056-09201	Ethanol 	電子工業用	1L	4,310
 133-18731	Methanol  	電子工業用	1L	1,700
 139-18691	1-Methyl-2-pyrrolidone 	電子工業用	1L	8,000
 169-28121	2-Propanol 	電子工業用	1L	3,000

### 酸類

コード No.	品名	規格	容量	希望納入価格(円)
087-10361	Hydrochloric Acid 	電子工業用	1kg	2,200
143-09741	Nitric Acid(1.42) 	電子工業用	1kg	2,400
194-18321	Sulfuric Acid 	電子工業用	1kg	2,000

### ダイオキシン類測定用

#### プレセップ® 55% 硫酸シリカゲル

#### プレセップ® 10% 硝酸銀シリカゲル

近年、臭素化ダイオキシン類の人への健康影響などに関する調査や施設などからの排出実態調査が進められています。

この度、ダイオキシン類を含むサンプルのクリーンアップにお使いいただけるプレセップ® 55% 硫酸シリカゲル、塩素化ダイオキシン、臭素化ダイオキシンの分離が可能なプレセップ® 10% 硝酸銀シリカゲルの販売を開始しました。



右：55%硫酸シリカゲル  
左：10%硝酸シリカゲル

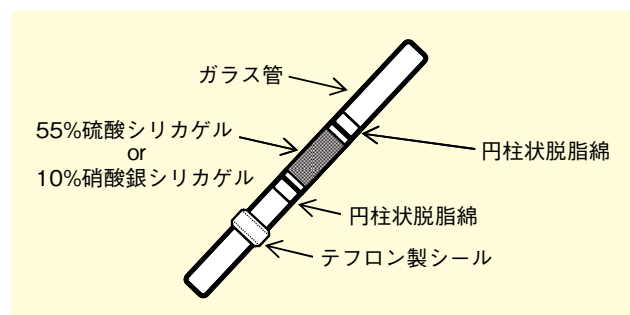
### 特長





- 外装に防湿性アルミ袋を採用
- 保管中の品質劣化が少なく、品質が安定

### 製品情報

- カラム材質：ガラス
- ガラス管サイズ：直径10.6mm × 長さ150mm

### 〈カラム組成〉



コード No.	品名	規格	容量	希望納入価格(円)
 293-35581	Presep® 55% Sulfuric Acid-impregnated Silica Gel 	ダイオキシン類測定用	10本	照会
 296-35571	Presep® 10% Silver Nitrate-impregnated Silica Gel 	ダイオキシン類測定用	10本	照会

 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4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。

## 「イムノアッセイ」の測定技術習得をサポート Shibayagi 教材／研修用／技術評価用

### ELISA トレーニングキット

ELISA トレーニングキットは、ELISA 測定を始められる方、ELISA 測定の技量を確認したい方、測定施設内／間で技術検定を実施したい方向けの製品です。測定対象はウシアルブミン（BSA）です。標準品、ポジティブコントロール（PC）を測定し、得られた標準曲線から PC 濃度を求めます。各標準品や PC の真度、C.V. 値を比較することにより測定技量の確認ができます。初心者は測定範囲を 1.56 ~ 50ng/mL の間で設定し、上級者は 0.78 ~ 50ng/mL の間で設定し、定量限界を比較することもできます。

#### 特長

- 短時間で測定可能（総反応時間：2.5 時間）
- すべての試薬が溶液タイプで即座に使用可能
- 環境に優しい防腐剤を使用
- 1つのキットを 3人（3組）で使用可能
- 高い再現性

#### 精度

- アッセイ内変動試験（5重測定、4検体）  
C.V. 値は 10% 未満
- アッセイ間変動試験（2重測定、3検体、3日間）  
C.V. 値は 10% 未満



※ BSA のコンタミネーションに注意しながら測定を行って下さい。

#### キット内容

- 抗体固相化 96 ウェルプレート 96 ウェル (8 × 12) × 1 枚
- アルブミン標準溶液 (500ng/mL) 200 μL × 1 本
- 緩衝液 60mL × 1 本
- ペルオキシダーゼ結合抗アルブミン抗体 200 μL × 1 本
- 発色液 (TMB) 12mL × 1 本
- 反応停止液 (1 mol/L H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) 12mL × 1 本
- 濃縮洗浄液 (10 ×) 100mL × 1 本
- プレートフレーム 2 個
- プレートシール 3 枚
- 希釈ウシ血清 (T) 1mL × 1 本

※ウシ血清は BSE 発生国以外の材料を使用

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

ELISA を行うすべての人に読んでほしい

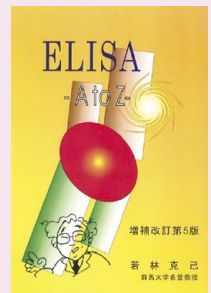
### ELISA -A to Z- 増補改訂第 5 版のご紹介

シバヤギ技術顧問をされていた、群馬大学名誉教授の若林 克己先生が ELISA の原理、実技、測定技術向上のコツを詳しく解説。

これから ELISA を始める人はもちろん、経験を積んだ方にもぜひ読んでほしい一冊。

実習や教育の解説にも役立ちます。

本キット購入者でご希望の方は、当社営業員もしくは代理店までご請求下さい。



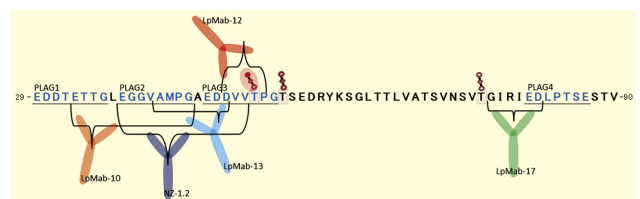
### リンパ管・腫瘍細胞マーカー抗体 Wako 抗ポドプラニン、モノクローナル抗体

膜一回貫通型糖タンパク質であるポドプラニン (PDPN) は、リンパ管内皮や肺胞上皮のマーカーとして知られる他、脳腫瘍、悪性中皮腫、精巣腫瘍や種々の扁平上皮がんなどで過剰発現し、悪性度と相関性があることが知られています。ポドプラニンは細胞外領域 (N 末端) に PLAG ドメイン (PLAG1-3) を持ち、PLAG3 を介して血小板上のレセプターである CLEC-2 と結合し、血小板凝集を引き起こす機構が見出されています。近年、PLAG4 ドメインが報告され、CLEC-2 との結合には PLAG3、PLAG4 の両方が関与することが示唆されています。

当社では複数のエピトープに対する抗ヒトポドプラニン抗体を取り揃えています。アプリケーションによって使い分けて、または組合せてご使用下さい。

また、イヌ、マウス、ウサギ、ラットに動物種特異性が高いモノクローナル抗体を取り揃えています。

#### ヒトポドプラニンに対する抗体認識部位



詳しくは当社 HP (<http://www.wako-chem.co.jp/siyaku/product/life/PDPN/index.htm>) をご覧下さい。



## 使いやすい滅菌済みの溶液品

### bFGF 溶液, MF

bFGF (Fibroblast Growth Factor (basic)) は、ヒト ES/iPS 細胞培養時に未分化性を維持させながら、細胞を増殖させるために必須の因子とされており、ヒト ES/iPS 細胞をはじめ各種幹細胞の維持培養に使用されています。本品は溶液品のためそのまま培地に添加して使用できます。無菌保証した製品のためコンタミリスクを抑えられます。

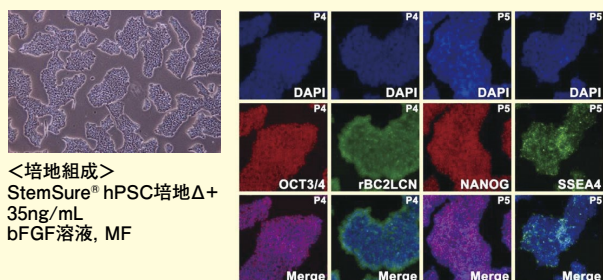
当社は科研製薬株式会社が販売する褥瘡・皮膚潰瘍治療剤「フィブラスト® スプレー」の有効成分である組換え型ヒト bFGF の提供を同社より受け、再生医療研究用試薬として販売しています。2016年5月に原薬等登録原簿 (マスターファイル: MF) にその他 (培地添加物) 区分として登録されました。

### 特長

- Ready-to-Use の溶液品
- 製造プロセスでの無菌保証
- MF 登録済み\*
- 生物由来原料基準クリア

### 製品概要

- タンパク質濃度: 0.9~1.1 mg/mL (初回実績値 1.0 mg/mL)
- エンドトキシン: 10 EU/mg 以下
- 比活性: 50 万国際標準単位/mg 以上 (BHK-21 細胞を用いたバイオアッセイ法による)



StemSure® hPSC 培地 Δ [コード No.197-17571] に終濃度が 35ng/mL となるように本品を添加し、ヒト iPS 細胞 201B7 株を 5 継代培養した。分化したような形態の細胞は観察されず、安定して培養できた。また、4 継代目 (P4) もしくは 5 継代目 (P5) の細胞を用いて、各種未分化マーカー (OCT3/4, rBC2LCN, NANOG, SSEA4) の発現を確認した。

### 【参考文献】

- 1) Akutsu, H. et al : *Regenerative Therapy*, 1, 18 (2015).

コード No.	品名	規格	容量	希望納入価格 (円)
062-06661	bFGF Solution, MF 	細胞培養用	50μL	80,000
068-06663			50μL×4	260,000

※原薬等登録原簿 (MF) への登録は、厚生労働省 (独立行政法人医薬品医療機器総合機構) による、品質及び安全性に関する確認または評価が行われたことを意味するものではありません。

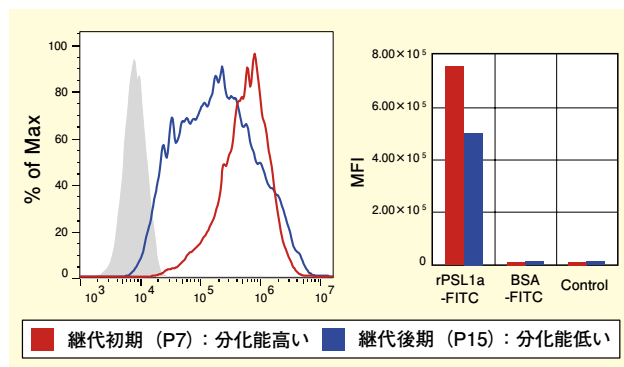
## 間葉系幹細胞の分化能マーカー

### rPSL1a-FITC

rPSL1a は、アミヒラタケ (*Polyporus squamosus*) 由来レクチンの組換え体で、α2-6 シアル酸を認識します。

ヒト脂肪由来間葉系幹細胞やヒト骨髓由来間葉系幹細胞、軟骨組織由来軟骨細胞において、rPSL1a は分化能が高い継代初期の間葉系幹細胞に反応性を持ちますが、分化能が低い継代後期の間葉系幹細胞やヒト皮膚線維芽細胞には反応性を持ちません。そのため、rPSL1a はヒト間葉系幹細胞の分化能を評価するマーカーとして使用できます。

### データ



ヒト多指症由来間葉系幹細胞 Yub622 について、分化能が高い培養初期 (P7) の細胞と分化能が低い培養後期 (P15) の細胞を rPSL1a-FITC と反応させ、フローサイトメトリーを用いて反応性を解析した。継代後期の細胞に比べ、継代初期の細胞が強く蛍光染色されていることが分かった。

(データご提供: 国立研究開発法人 産業技術総合研究所 創薬基盤研究部門 館野 浩章 先生)

### 【参考文献】

- 1) Hasehira, K., Hirabayashi, J. and Tateno, H. : *Glycoconj. J.*, (2016), in press.
- 2) Tateno, H., Saito, S., Hiemori, K., Kiyoi, K., Hasehira, K., Toyoda, M., Onuma, Y., Ito, Y., Akutsu, H. and Hirabayashi, J. : *Glycobiology*, 26, 1328 (2016).

コード No.	品名	規格	容量	希望納入価格 (円)
180-03351	rPSL1a-FITC 	フローサイトメリー用	100μL	70,000

 2~10°C 保存  E 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4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。

## オーストラリア産 高品質 FBS

### SELBORNE 社 ウシ胎児血清 (FBS)

SELBORNE 社は、BSE 非発生国であるオセアニア産の牛胎児血清 (FBS) をはじめとした牛由来製品を取り扱う製造会社です。

屠畜場と徹底した個体管理を行うことで、最終製品であるウシ胎児血清 (FBS) に関して、どの農場から採取を行ったかをトレースすることが可能です。



製造施設  
オーストラリア タスマニア島  
ローンセストン近郊

### 特 長

- EDQM, FDA 認可の cGMP 製造施設で製造
- 0.1 μm のフィルターを用いて 3 回のろ過滅菌を実施
- 9CFR 品質規格に則した品質試験を実施
- BVDV 陰性であることを確認

### 提出書類

- 牛出荷申告書 (National Vendor Declaration)  
※農場が牛を屠畜場へ出荷する際に記入するシート
- 屠畜シート (Kill Sheet)  
※牛の健康チェックをするためのシート (生前検査)
- 血液出荷表・納品書 ● 製造記録 (血液遠沈～凍結)
- 製造記録 (フィルターろ過～ボトリング)
- 試験成績書  
※ 9CFR 品質規格に則した品質試験
- 出荷伝票・健康証明書  
※ 日本への出荷伝票・ウシ由来製品の健康証明書
- 輸入検査申請書 ● 動物検疫検査合格通知書
- 輸入許可通知書


### 試験検査項目

- 微生物試験 無菌試験 (*ph Eur 2.6.1*)  
エンドトキシン試験: ≤ 10EU/mL  
マイコプラズマ試験 (*ph Eur 2.6.7*)
- ウイルス試験 (*9CFR 113.53*)
- 物性試験 pH: 6.8-8.1 浸透圧: 260-330mOsm/kg
- 生化学試験 ヘモグロビン: ≤ 25mg/dL  
トータルプロテイン: 30-45g/dL
- 生化学試験 (実測値)  
アルブミン α グロブリン β グロブリン γ グロブリン  
トータルビルビリニン コレステロール クレアチニン

尿素 Lactate Dehydrogenase (LDH)  
Aspartate Transaminase (SGOT)  
Alanine Transaminase (SGPT)

### ● 化学試験項目 (実測値)

グルコース カルシウム リン ナトリウム カリウム

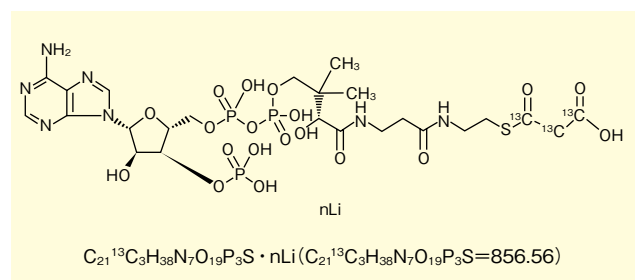
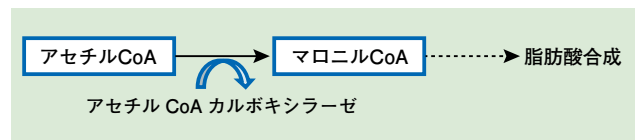
コード No.	メーカーコード	品 名	容量	希望納入価格 (円)
554-04855	FBS-04	FBS オーストラリア産 	500mL	照 会

## 糖尿病、脂肪酸合成の研究に マロニル-<sup>13</sup>C<sub>3</sub> コエンザイムAリチウム

本品は、マロニルコエンザイム A (CoA) リチウムの安定同位体です。

マロニル CoA は脂肪酸合成系において、アセチル CoA からカルボキシラーゼによって変換されます。この変換を阻害することによる、インスリン感受性亢進作用を利用した糖尿病治療剤が開発されています。また、心臓のエネルギー代謝への関与が示唆されており<sup>1)</sup>、心疾患研究の標的として注目されています。

生体内での代謝、産生物解析の指標にご利用下さい。




### 製品概要

- 外観: 白色～わずかにうすい褐色、結晶～粉末
- 水溶状: 試験適合
- 含量 (HPLC): 実績値報告 (91.5% ロット No.TWR5994)

### 【参考文献】

1) Fillmore, N. et al.: *IUBMB Life*, **66**, 139 (2014).

コード No.	品 名	規 格	容量	希望納入価格 (円)
136-18721	Malonyl- <sup>13</sup> C <sub>3</sub> Coenzyme A Lithium Salt 	薬理研究用	10mg	75,000

## 血清含有培地と同等の抗体産生能

### ハイブリドーマ用無血清培地

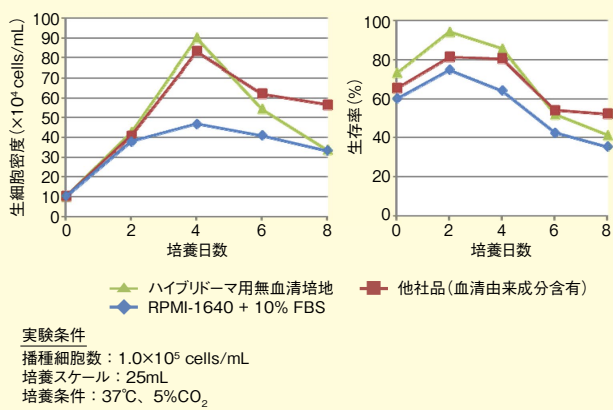
本品は、ハイブリドーマ培養用の無血清培地です。抗体産生にご使用いただけます。

#### 特長

- 無血清培地
- 血清成分含有培地と同等の細胞増殖能
- 血清成分含有培地と同等の抗体産生能

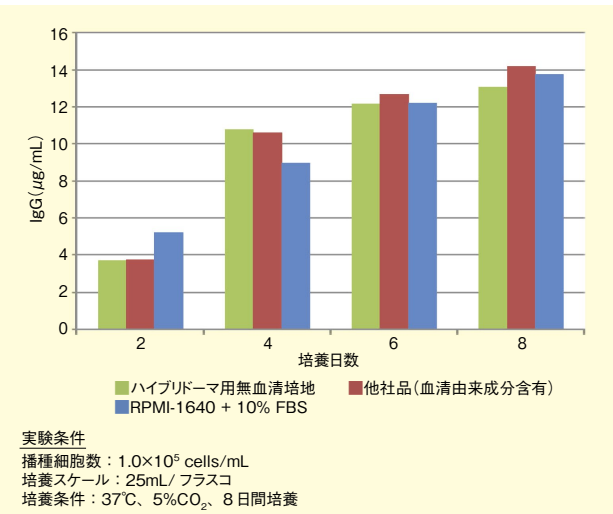
#### データ

##### 生細胞密度、生存率



本品は血清成分含有培地と同等の生細胞密度、生存率を示した。

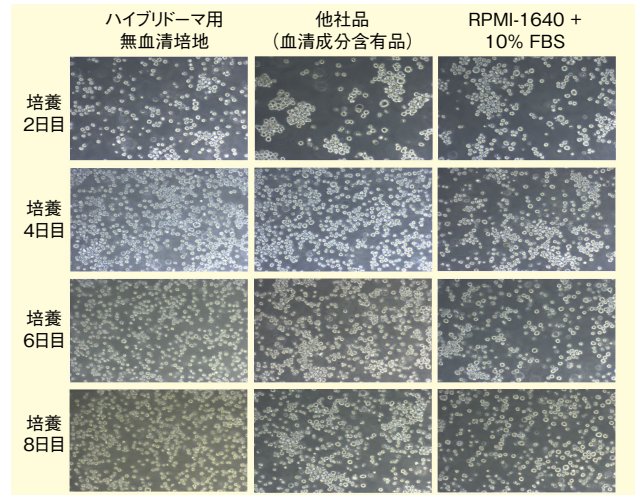
##### 抗体産生量




培養上清を各培養日数ごとに回収し、ELISA 法により抗体産生量を測定した。

本品は血清成分含有培地と同等の抗体産生能を示した。

##### 細胞形態



本品で培養したハイブリドーマは、血清入り培地と同様の細胞形態を示した。

コードNo.	品名	規格	容量	希望納入価格(円)
081-10381	Hybridoma Serum-Free Medium 	細胞培養用	1L	12,000

## CRISPR/Cas9 システムによるゲノム編集ツール

### Cas9 タンパク質

ニッポンジーンでは *S. pyogenes* 由来の Cas9 タンパク質と、Cas9 タンパク質に対するマウスモノクローナル抗体をご用意しています。Cas9 タンパク質は核移行シグナル (NLS) を有しており、合成したガイド RNA (gRNA) と組合せることでゲノム編集に利用することができます。

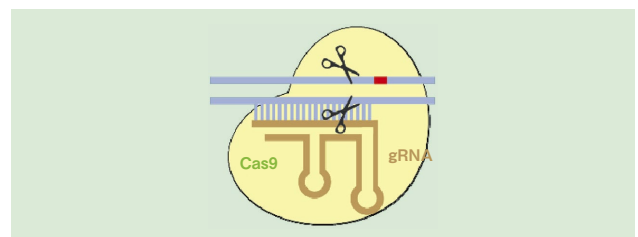
#### 高純度・高品質(野生型Cas9)

##### Cas9 Nuclease protein NLS

gRNA と相補的に結合した任意の DNA 配列を二本鎖切断し、DNA 損傷修復機構を利用して遺伝子変異を引き起こすことができます。

#### 特長

- DNA を二本鎖切断
- 低エンドトキシン (1 EU/μg 未満)
- NLS 付加で *in vivo* 実験でも高効率



[次頁に続く]



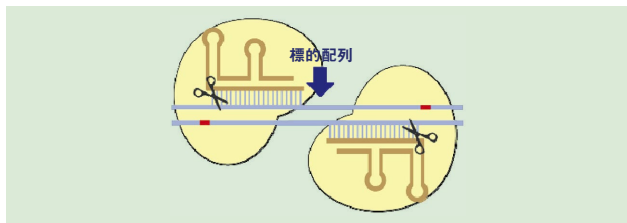
## 高精度なゲノム編集に(改変型Cas9)

### ■ Cas9 Nickase protein NLS

ゲノム編集の際は同時に2種類のgRNAを必要とします。Nickase型Cas9はDNAの一本鎖のみを切断しニックを入れるため、欠損や挿入が起こらずオフターゲット効果を抑制します。

#### 特長

- DNAの一本鎖のみを切断
- 2種類のgRNAを用いることでオフターゲット効果を抑制
- NLS付加で*in vivo*実験でも高効率



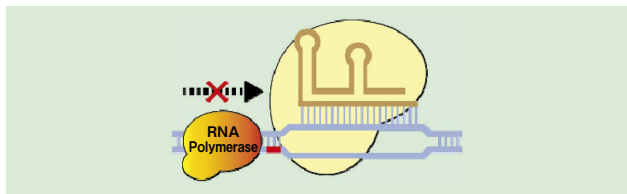
## 転写抑制研究に(不活性型Cas9)

### ■ dCas9 protein NLS

dCas9は、gRNAを介して標的配列へ結合することができます。転写開始部位の下流に結合すると転写伸長を阻害するなど、転写抑制などの研究への応用が期待されます。

#### 特長

- DNAの切断活性をもたない
- gRNAにより標的配列を認識し結合
- NLS付加で*in vivo*実験でも高効率



コードNo.	品名	濃度	容量	希望納入価格(円)
313-08421	Cas9 Nuclease protein NLS	1μg/μL	50μg	60,000
317-08441	Cas9 Nuclease protein NLS (high conc.)	3μg/μL	75μg	75,000
319-08521	Cas9 Nickase protein NLS	3μg/μL	75μg	75,000
316-08531	dCas9 protein NLS	3μg/μL	75μg	75,000

#### 関連商品

### Cas9モノクローナル抗体

コードNo.	品名	濃度	容量	希望納入価格(円)
310-08431	Anti-Cas9 Monoclonal Antibody	1μg/μL	50μg	55,000

## 抗体やFc融合キメラタンパク質の精製に最適 Wako

### KANEKA KanCapA™ プレパックカラム

KANEKA KanCapA™ プレパックカラムは、抗体及びFc融合キメラタンパク質の精製に使用可能なプレパックカラムです。イムノグロブリンのFc領域に特異的に結合する新規アルカリ耐性プロテインAを固定化したセルロース担体が充てんされています。

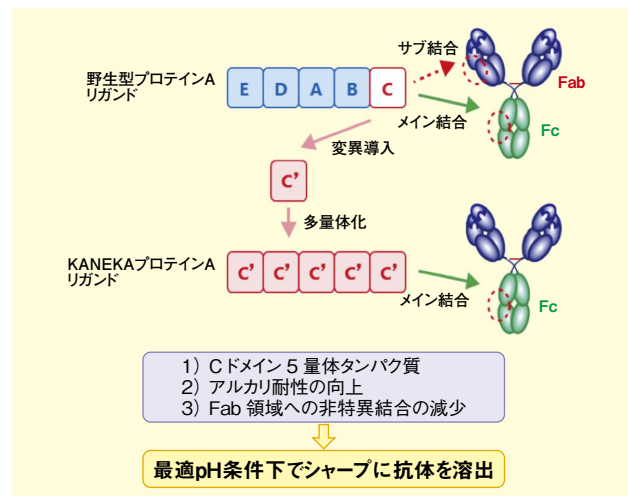
スクリーニング、初期開発プロセス、小スケール精製などにご使用下さい。

#### 特長

- アルカリ耐性及び長寿命
- 溶出pHを最適化
- 高吸着容量
- 高流速操作への対応及び製造スケールへ簡単なスケールアップが可能
- 再生利用可能
- Ready to Use



### ■ 本品に使用しているプロテインA(改変型プロテインA)概要



コードNo.	品名	規格	容量	希望納入価格(円)
111-01081	KANEKA KanCapA™		1mL	22,000
117-01083	Prepacked Column	遺伝子研究用	5mL	60,000
115-01084			5x5mL	240,000

カラム性能を維持し微生物増殖を防ぐため、未使用の本品の保管については説明書に従って下さい。またシステムから取り外した本品の両端をInlet stopperとOutlet stopperで強く締めて保管して下さい。その際、空気が入らないようご注意ください。

#### 関連商品

安価でバルク対応可能なビーズタイプもご用意しています。

コードNo.	品名	規格	容量	希望納入価格(円)
114-01071	KANEKA		2mL (net 1mL)	10,000
110-01073	KanCapA™	遺伝子研究用	10mL (net 5mL)	40,000
118-01074			50mL (net 25mL)	150,000

: 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4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。

## 植物科学新ツール 植物透明化試薬 Wako ClearSee™

ClearSee™ は、1) 固定、2) 洗浄、3) 透明化の3ステップで簡単に植物組織を透明にすることが可能な試薬です。植物科学の新しいツールとして、蛍光タンパク質や蛍光色素を用いた既存のイメージング技術と合わせることで、細胞レベルの現象と固体全体をつなぐシステムの解明などが期待されます。



左：処理なし  
右：ClearSee™ 処理後

(本ページ掲載データご提供：名古屋大学大学院理学研究科 栗原大輔先生・水多陽子先生)

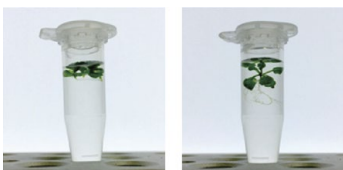
### 使用例

#### ■ シロイヌナズナの葉の透明化

詳細な方法は、製品に添付されている製品説明書をご確認ください。

#### 1. 固定

4% パラホルムアルデヒド溶液を用いて、サンプルを固定する。



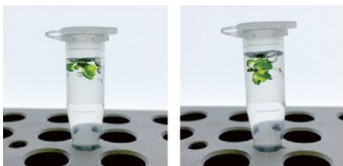
固定液に浸けたシロイヌナズナの葉・幼植物

#### 2. 洗浄

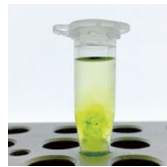
固定液を除き、1×PBSを1 mL 加えて1分間静置する。1×PBSを除き、新しい1×PBSを1 mL 加えて1分間静置する。この作業を2回繰り返す。

#### 3. 透明化処理

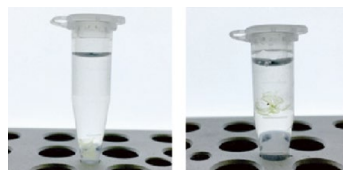
1×PBSを除き、ClearSee™ を1.3 mL 加える。必要に応じて、新しいClearSee™ で置換する。



ClearSee™ 中のシロイヌナズナの葉・幼植物

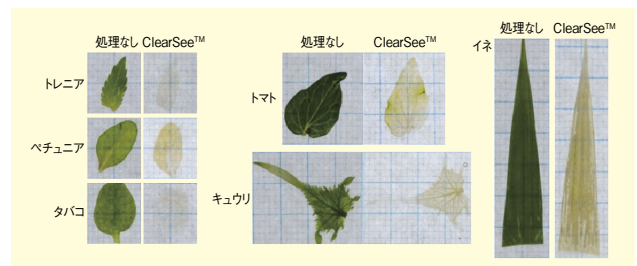


サンプルのまわりに除かれたクロロフィルが見える様子 (1~2日後)

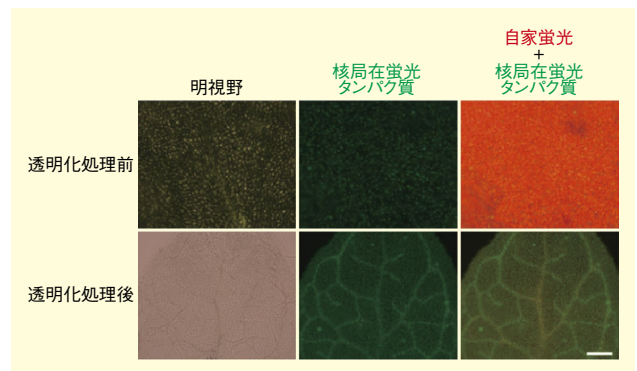


透明になったシロイヌナズナの葉・幼植物 (3~5日後)

#### ■ 他植物透明化例





#### ■ 観察例



透明化したシロイヌナズナの葉は、明視野では透明に見え、クロロフィルの赤い自家蛍光がなくなる。丸ごと葉が観察できるので、内部にある維管束の蛍光タンパク質も観察できる。スケールバーは200 μm。

コード No.	品名	規格	容量	希望納入価格 (円)
031-25151	ClearSee™	植物透明化用	50mL	20,000

#### ■ 関連商品

コード No.	品名	規格	容量	希望納入価格 (円)
160-16061	Paraformaldehyde 	組織固定用	100g	2,150
162-16065			500g	4,400
167-25981	16w/v% Paraformaldehyde Solution, Methanol free 	電子顕微鏡用	1mL×10A	9,000
163-25983			10mL×10A	11,500

## ヒトiPS細胞への遺伝子導入データ

ScreenFect™ A plus を用いたヒト iPS 細胞への遺伝子導入実績及びプロトコールを紹介いたします。iPS 細胞の足場として使用される Matrigel のプレートコーティング方法、Y-27632 を含む細胞懸濁液の調製プロトコール、また最適化された試薬比率を記載しますので、ご参考下さい。

### ■ヒトiPS細胞(201B7株)へのトランスフェクションプロトコール例

ここでは、StemSure® hPSC 培地 Δ (コード No. 197-17571) を使用したプロトコール例を一部紹介します。本プロトコール完全版や mTeSR1 培地を使用したプロトコールは、当社データベースをご参照下さい。

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

#### 〈トランスフェクション試薬の調製〉

2.0 μL の ScreenFect™ A plus reagent, 4.0 μg のプラスミド DNA が 160 μL の Opti-MEM に含まれるように DNA-lipid complex を作製する。

#### 〈Matrigel によるプレートコーティング〉

1. Matrigel hESC-Qualified Matrix を 4℃ で溶解する。室温で溶解すると凝固するため避ける。
2. Matrigel 300 μL を冷却した D-MEM/Ham's F-12 25mL で希釈する。
3. 希釈した Matrigel 溶液を 12 ウェルプレートに 1mL/well 加える。
4. 室温で 1 時間以上インキュベートする。

#### 〈細胞懸濁液の調製〉

1. StemSure® hPSC 培地 Δ を 2 ~ 8℃ で数時間から一晩かけてゆっくり融解する。37℃ では解凍しない。一週間以内に使用する。
2. 融解後の StemSure® hPSC 培地 Δ に bFGF (コード No. 064-05381, 068-05384) を終濃度 35 ~ 100ng/mL で添加し、完全培地を調製する (以下、sshPSC 培地という)。
3. sshPSC 培地は使用前に室温に戻す。温浴は使用しない。
4. Y-27632 を sshPSC 培地へ終濃度 10 μmol/L となるように添加する (以下、ROCKi+ 培地という)。
5. hiPS 細胞を培養中のプレートより、培地を除去し、細胞を PBS (-) で一度洗浄する。  
\*細胞は 80% 程度のコンフルエントとなった対数増殖期の状態でトランスフェクションして下さい。
6. PBS (-) を除去し、StemPro Accutase を添加する。
7. 37℃、5% CO<sub>2</sub> インキュベーターで 5 分間静置する。
8. ROCKi+ 培地を添加し、P1000 マイクロピペットを用いて、コロニーを剥がし、シングルセルへ分散する。
9. 15mL チューブに移す。
10. 1,000rpm (約 170 × g) で 3 分間、室温で遠心する。
11. 上清を除去する。ROCKi+ 培地で再懸濁する。
12. 生細胞数を計測する。
13. ROCKi+ 培地で 5 × 10<sup>5</sup> cells/mL に細胞濃度を調製する。

#### 〈トランスフェクション〉

用意しておいた DNA-lipid complex に調製した細胞懸濁液を 1mL 添加し、ピペッティングでよく混合して、全量を 12 ウェルプレートに播種する。

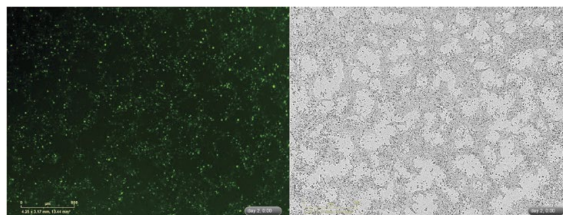
※ポイント

播種から 24 時間経過時に培地交換を行って下さい。このときの培地は Y-27632 を含む必要はありません。

### ■実験データ

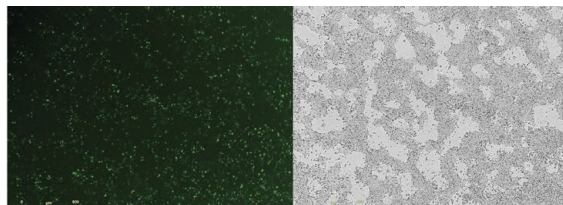
hiPS 細胞 (201B7株) へリバーストランスフェクション (1-STEP) で GFP 融合遺伝子の導入を行い、蛍光顕微鏡にて導入遺伝子の導入効率を比較しました。

〈StemSure® hPSC 培地 Δ 使用〉 導入効率: 52%



細胞数: 5 × 10<sup>5</sup> cells/well  
 プラスミド DNA 量: 4 μg/assay  
 トランスフェクション試薬混合比率:  
 DNA 量 (μg): ScreenFect™ A plus reagent (μL) = 1 : 0.5  
 フォーマット: 12 ウェルプレート  
 備考: ScreenFect™ A plus reagent 及び DNA は Opti-MEM で希釈した。

〈mTeSR1 培地使用〉 導入効率: 38%



細胞数: 5 × 10<sup>5</sup> cells/well  
 プラスミド DNA 量: 1 μg/assay  
 トランスフェクション試薬混合比率:  
 DNA 量 (μg): ScreenFect™ A plus reagent (μL) = 1 : 2  
 フォーマット: 12 ウェルプレート  
 備考: ScreenFect™ A plus reagent 及び DNA は Opti-MEM で希釈した。

### ■使用上の注意

- ・ヒト iPS 細胞への遺伝子導入は、シングルセルの状態で行うことをおすすめします。
- ・遺伝子導入時の細胞数は約 5 × 10<sup>5</sup> cells/well をおすすめします。
- ・プラスミド DNA 量が多いとき、導入遺伝子の発現量が高いことにより細胞死が引き起こされることがあります。

コードNo.	品名	規格	容量	希望納入価格(円)
293-77101	ScreenFect™ A plus	遺伝子研究用	0.2mL	9,000
299-77103			1mL	35,000
297-77104			1mL×5	140,000

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。

Matrigel は、Corning Incorporated の商標または登録商標です。/mTeSR1 は、WARF の商標または登録商標です。/Opti-MEM、StemPro は、Life Technologies Corporation の商標または登録商標です。

今後、順次各細胞に対するトランスフェクションプロトコー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)



*Solving the mystery of sleep* – 睡眠・覚醒の謎に挑む

筑波大学 国際統合睡眠医科学研究機構 (WPI-IIS) 柳沢／船戸研究室 日本学術振興会 特別研究員  
藤山 知之

第5回 IIS シンポジウム・第32回 Wako ワークショップ合同ミーティング「*Solving the mystery of sleep* – 睡眠・覚醒の謎に挑む」が2016年12月12日、東京カンファレンスセンター品川ビル内にて開催されました。本会は、筑波大学国際統合睡眠医科学研究機構 (International Institute for Integrative Sleep Medicine: IIS) の柳沢正史機構長が世話人となり、毎年開催されている Wako ワークショップと IIS シンポジウムを兼ねた国際会議でした。

私達は人生のおよそ1/3を寝て過ごしていますが、睡眠という生理現象について知られていることはごくわずかです。そのため睡眠は神経科学分野最大のブラックボックスと称されて、これまで数多くの研究者たちの興味を惹きつけてきました。ヒトにおける最初の脳波記録は1929年、ドイツの精神科医ベルガー博士によって報告され、睡眠が「覚醒以外の状態」として脳波で定義できるようになりました。これに伴い、睡眠と覚醒を巡るメカニズムは本格的な研究対象として発展してきました。近年、ゲノム編集技術、光遺伝学・薬理遺伝学・ウイルスベクターによる神経回路機能操作技術、脳・神経細胞活動イメージング法などの脳機能を知るための手段においてブレイク

スルーとなる技術革新が進んだことにより、睡眠・覚醒研究の手法にさらなる多様性がもたらされたことが、この分野の目覚ましい発展に寄与していると考えられます。本会では、世界に先駆け光遺伝学を睡眠・覚醒研究に取り入れたベルン大学 (スイス) の Antoine Adamantidis 博士をはじめ、国内外より著名な、または新進気鋭の研究者ら11名がそれぞれの研究の最新の知見についてご講演されました。この稿では、特に筆者の印象に残った5講演について述べます。

最初の演者は、理化学研究所脳科学総合研究センター (理研 BSI) の岡本仁先生で、「Evolutionarily conserved role of the habenula in resolution of social conflict」という演題でご講演されました。岡本先生はゼブラフィッシュとマウスをモデル動物として、感情や意思決定を引き起こす神経回路についてご研究されています。発表スライドは非常に印象的で、中でも荘厳なクラシック音楽をバックにザリガニの攻撃行動が流れる冒頭約5分間のシーンは、特に記憶に残りました。岡本先生のグループは、ゼブラフィッシュにおいて手綱核と呼ばれる脳部位から脚間核へ投射するふたつの並行した神経回路が、勝者および敗者に特有の行動を惹起するのにそれぞれ重要な役割を果たすということを発見されました。マウスでも手綱核-脚間核を結ぶ回路において同様の機能があるかを調べたところ、ゼブラフィッシュでみられた現象と非常によく似た結果が再現され、この回路が種を超えて進化的に保

存されていることが確認されました。哺乳類と魚類を研究対象として扱うことで、神経回路メカニズムのみならず脳の進化にも迫った、神経科学と生物学両方の面白さを味わうことのできる、たいへん意義のある研究だと感じました。睡眠の研究でも、同様のアプローチが睡眠・覚醒行動を司る神経回路の進化的保存性を語る上で有効となると考えられます。

続いて、IIS の柳沢正史機構長が「Forward genetic analysis of sleep in randomly mutagenized mice」というタイトルでご講演されました。柳沢先生はかつてオレキシンを発見し、現代の睡眠医科学研究分野の開拓者でもあります。最近、これまでの研究で得られた知見をもとにオレキシン2型受容体作動薬 (商品名: YNT-185, Wako) が開発され、ナルコレプシーモデルマウスの症状を改善することが報告されました。睡眠・覚醒に関わる神経回路 (作動系) が明らかになりつつある一方で、睡眠の恒常性制御についてはまだよくわかっていません。睡眠負債 (すなわち眠気) そのものの分子実体や神経細胞レベルにおけるメカニズムがこれまでまったく不明だったので、柳沢先生のグループは、睡眠の恒常性を制御する遺伝子の存在を仮定し、睡眠・覚醒様式に変化のあるマウス個体をフォワードジェネティクス的手法により探索したところ、覚醒時間が顕著に減少する *Sleepy* 家系、およびレム睡眠量が顕著に減少する *Dreamless* 家系という2つの変異系統を樹立することに成功しました。ここ



総合企画の柳沢正史先生



合同ミーティングの会場風景



ポスターセッション風景



H. Okamoto 先生



P. Nolan 先生



C. Anaclet 先生



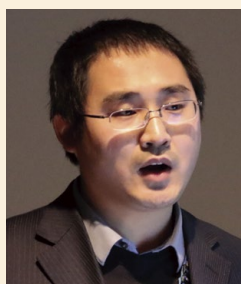
Y. Oishi 先生



A. Adamantidis 先生



C. Li 先生



Z. Wang 先生



A. Yamanaka 先生



J.-H. Han 先生



M. Murayama 先生

に至るまでにおよそ8,000匹以上のマウスの脳波が測定されており、筆者も当事者ながら改めてその研究スケールの大きさを実感しました。その後、原因遺伝子も次世代シーケンスによりそれぞれ同定され、*Sik3* および *Nalcn* という遺伝子の中のたった一つの塩基変異が睡眠異常を引き起こすことを見出し、ゲノム編集でもこれを再現しました。*Sik3* はセリン/スレオニンリン酸化酵素、*Nalcn* は電位非依存性イオンチャネルをコードする遺伝子です。面白いことに、線虫やショウジョウバエで *Sik3* のホモログを遺伝学的に操作した結果、睡眠様行動に顕著な異常がみられました。今後、この発見を契機に、睡眠負債の分子実体、ノンレム睡眠・レム睡眠・覚醒の神経細胞メカニズムの解明、さらには新規創薬の進展が期待されます。誰も発見していないメカニズムの解明に挑み続け、世界でも類稀なるリーダーシップを発揮されている柳沢先生の研究姿勢には（内輪ながら）感激しました。

昼食休憩をはさみ、ベルン大学（スイス）の Antoine Adamantidis 博士が「Causal evidence for the role of REM sleep theta rhythm in contextual memory consolidation」というタイトルでご講演されました。レム睡眠は記憶固定化との関連性が指摘されてきましたが、レム睡眠のみを効果的に阻害

する方法が確立されておらず、これまで直接の因果関係を示すのは非常に困難でした。同氏らの研究グループは、終脳の内側中隔に位置する GABA 作動性神経細胞の活動を、アーキロドプシンを用いて光遺伝学的に抑制することで、睡眠そのものを阻害することなく、レム睡眠中の記憶形成を強化する脳波成分（シータ波）を正確に遮断する手法を編み出しました。その結果、新奇物体認識や恐怖関連記憶の形成が阻害されることを見出し、さらにはレム睡眠以外での抑制は記憶形成に影響を及ぼさないことが示されました。これにより、記憶の固定化におけるレム睡眠の生理的意義について、その因果関係とメカニズムが明確になりました（Boyce *et al.*, *Science* 2016）。前述のように、同氏は睡眠・覚醒研究における光遺伝学的手法を最初に導入した研究者のひとりです。先見性があり、優雅かつ卓越した研究を続けられているお姿に、理想的な研究者像を見ました。

活発な意見交換がなされたポスター発表ののち、名古屋大学環境医学研究所の山中章弘先生が「Hypothalamic neurons regulate sleep/wakefulness and memory」というタイトルでご講演されました。山中先生は視床下部における光遺伝学研究の第一人者であり、ユーモア溢れる人柄がとても魅力

的な方です。視床下部に少数の細胞体が存在するメラニン凝集ホルモン（MCH）産生ニューロンは、海馬を含め脳のほとんどの領域に投射していることが知られていますが、これまでに同氏の研究グループは Tet-off システムと光遺伝学を組み合わせ、睡眠中に MCH ニューロンを特異的に活性化することで、ノンレム睡眠がレム睡眠へ移行することを報告しました。さらに、MCH 神経細胞の時期特異的な脱落マウスを作成したところ、新奇物体認識テストにおける顕著な成績上昇がみられ、MCH 神経の記憶形成における生理的役割が明らかになりました。一方、光遺伝学および薬理遺伝学を用いた MCH ニューロンの活性化では、恐怖記憶を減弱もしくは消去できる可能性が示されました。すなわち、睡眠・覚醒調節に重要な視床下部の MCH 神経細胞が、記憶の制御にも関わっていることが新たに明らかになったのです。神経回路機能操作技術を自在に駆使し、新規の生理的意義が明らかになっていく様は痛快で、この分野の醍醐味を感じました。

最後に、理研 BSI 行動神経生理学研究チームリーダーの村山正宜先生が「Cortical top-down input for perceptual memory consolidation」というタイトルでご講演されました。筆者は、この発表で紹介された研究の筆



頭著者の方と面識があり、互いの研究についてお話する機会があったのですが、村山先生の発表を拝聴するのはこれが初めてで、非常に楽しみにしていました。ノンレム睡眠は触覚などの知覚記憶の固定化に重要であることが知られていましたが、高次脳領域から低次脳領域への入力経路（トップダウン経路）とその反対の経路（ボトムアップ経路）のうち、どちらが記憶の固定化に重要であるかは解明されていませんでした。これを検証するため、同氏は触覚に関与するマウス大脳新皮質の第二運動野（M2）から第一体性感覚野（S1）を結ぶ神経回路をモデル系として採用し、光遺伝学を駆使した詳細な実験により、学習直後のノンレム睡眠におけるトップダウン入力により、感覚野の再活性化と知覚記憶の固定化が生じていることを明らかにされ

ました。さらに、ノンレム睡眠時にM2とS1において同期性の高い0.5-4 Hzの徐波活動がみられることを見出し、同期的な刺激が記憶を向上させるかどうかを光遺伝学で検証した結果、これが質感の記憶の固定化に十分であることも示されました（Miyamoto *et al.*, *Science* 2016）。将来、大脳新皮質を刺激もしくは抑制することによって、各種の記憶をコントロールできる可能性を感じさせる内容でした。また、村山先生は神経細胞レベルでのイメージング法の開発にも注力されており、顕微鏡メーカーとの共同開発によって、大多数の皮質神経細胞の活動を同時に可視化することにも成功されました。満天の星空の輝きを思わせるその動画の美しさに感動を覚えるとともに、脳を知るための技術開発に邁進する同氏の熱意と実行力には、度肝を

抜かれました。

すべての講演が終了した後も活発な議論が交わされるなど、例年以上に終始熱気を帯びた会だったように感じました。

### おわりに

筆者は神経発生生物学が専門で、睡眠研究者とはまだ到底いえません。IISの柳沢先生、船戸先生のもとで睡眠に関する研究を始めて3年程度の駆け出しで、なんとかついて行けるよう日々精進しています。今回、睡眠研究に携わる者の一員として、最先端の睡眠研究について議論する会の見聞録を寄稿する機会をいただきました。この場をお借りして、勉強の機会を与えてくださった発表者の先生方と、執筆をご依頼いただいた和光純薬の皆様へ厚く御礼を申し上げます。

## 5th IIS Symposium • 32nd Wako Workshop Joint Meeting 睡眠・覚醒の謎に挑む Solving the mystery of sleep

総合企画：柳沢 正史 先生（筑波大学 国際統合睡眠医科学研究機構（WPI-IIS）機構長）

主催：筑波大学 国際統合睡眠医科学研究機構（WPI-IIS）・和光純薬工業株式会社 合同ミーティング実行委員会

後援：文部科学省

日時：2016年12月12日（月） 9:00～18:00 会場：東京コンファレンスセンター・品川

### ＜プログラム＞

Opening Remarks		
Welcome	Masashi Yanagisawa	Director, IIS, University of Tsukuba
Opening Address 1	Toshio Kuroki	WPI Program Director
Opening Address 2	Masami Watanabe	Research Promotion Bureau, Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology (MEXT)
Session 1 <span style="float:right">Chair : Hiromasa Funato</span>		
Keynote lecture: Evolutionarily conserved role of the habenula in resolution of social conflict	Hitoshi Okamoto	RIKEN BSI
IIS updates: Forward genetic analysis of sleep in randomly mutagenized mice	Masashi Yanagisawa	WPI-IIS, University of Tsukuba
Session 2 <span style="float:right">Chair : Michael Lazarus</span>		
Circadian rhythm and sleep disturbances in discrete <i>Zhfx</i> 3 mouse mutants	Patrick Nolan	MRC Harwell
Brainstem circuitry regulating slow-wave-sleep	Christelle Anaclet	University of Massachusetts Medical School
IIS updates: Sleep-regulatory mechanism of the nucleus accumbens	Yo Oishi	WPI-IIS, University of Tsukuba
Session 3 <span style="float:right">Chair : Qinghua Liu</span>		
Contextual memory consolidation during REM sleep	Antoine Adamantidis	University of Bern
Dynamical neural circuitry underlying working memory	Chengyu Li	Shanghai Institutes for Biological Sciences
IIS updates: Synaptic phosphoproteome as a molecular correlate of sleep need	Zhiqiang Wang	WPI-IIS, University of Tsukuba
Poster Session & Tea Break		
Session 4 <span style="float:right">Chair : Kaspar Vogt</span>		
Hypothalamic neurons regulate sleep/wakefulness and memory	Akihiro Yamanaka	Nagoya University
Top-down mechanism for consolidation of associative memory	Jin-Hee Han	Korea Advanced Institute of Science and Technology
Cortical top-down inputs for perceptual memory consolidation	Masanori Murayama	RIKEN BSI
Closing		
Closing	Masahiro Miura	Wako Pure Chemical Industries, Ltd.

非ペプチド性オレキシン2受容体アゴニスト YNT-185・2HCl

詳細は、当社HP ([http://www.wako-chem.co.jp/siyaku/product/life/YNT185\\_2HCl/index.htm](http://www.wako-chem.co.jp/siyaku/product/life/YNT185_2HCl/index.htm)) をご覧ください。



ヨハン・ガドリン (1760.6.5~1852.8.15)

京都薬科大学名誉教授 桜井 弘

18世紀に入ったヨーロッパでは、卑金属を黄金に変える「賢者の石」の幻想がなおも支配していました。しかし、18世紀後半に入ると“定量的実験”の必要性が高まり、錬金術にもとづく物質観は少しずつ変化しはじめました。1760年イギリスのキャヴェンディッシュによる水素の発見、1772年スウェーデンのシェーレと1774年イギリスのブルストリーによる酸素の発見、1772年イギリスのラザフォードによる窒素の発見、1800年イタリアのボルタの発明によるボルタ電池をいち早く用いたイギリスのデービーによる1807-8年のカリウム、ナトリウム、マグネシウム、カルシウム、ストロンチウムそしてバリウムの6元素の発見の大潮流は自然界における元素の存在と科学を確立したものとして華々しく語られています。しかし、まさしく時を同じくして、現代の日常生活に今や欠くことのできなくなった希土類元素 (rare earth elements、レアアース) がスカンディナ비아半島で静かに研究されはじめ、新元素が次々と発見されていった歴史は、専門家を除いて、熱く語られることは多くはないようです。18世末からおよそ110年におよぶレアアース探求の苦闘の歴史の第1頁を拓いたヨハン・ガドリン (図1) の生涯とレアアースの発見の歴史を概略的に紹介しましょう。



図1. ヨハン・ガドリン (1760-1852)

います。15歳でトゥルク大学に入学し、ユークリッドやアルキメデスの知識を学びました。父は数学を学ぼう薦めましたが、ヨハンは化学に興味を示しました。ペーター・ガッド教授の影響を受けて、講義だけでなく演示実験にも出席し、父の図書やガッドが貸してくれた化学の書籍を片っ端から読みました。19歳になった1779年に、ヨハンは、スウェーデンのウプサラ大学に移りました。化学の教授としてトルビョルン・ベリマンがヨハンの指導教授となりました。ヨハンはベリマンと一緒に研究したのち、1783年にトゥルク大学にもどりしました。1881年には鉄の分析に関して博士論文を書き、翌年に博士となりました。

ここで、ヨハンの父母の家系を少し紹介しましょう。ガドリンの父ヤコブ・ガドリンは、トゥルク大学で天文学と物理学の教授をつとめ、ヨハンが生まれて2年後には神学の教授にもなりました。ヤコブは、スウェーデンのグスタフ3世に対抗する勢力のリーダーとなり、一時は投獄もされましたが免赦され、ヨハンが28歳のときトゥルク司教になっています。フィン

ランドで最も古いトゥルク教区は、ローマのバチカン文書館にも記載されていて、宗教改革の時代にはプロテスタント (ルター派信徒) となっています。ガドリンという姓はヘブライ語 “godol” に由来し、ラテン語では “magnus”、英語では “great” を意味しています。ヨハンの母方の祖父ヨハン・プロバリウスはスウェーデンの植物学者カール・フォン・リンネの教えを受けたスウェーデン王国で最も有名な自然科学者のひとりでした。スウェーデン王立アカデミーの会長をし、トゥルク大学では植物学と神学の教授、トゥルク主教をつとめた人物でした。

ヨハン・ガドリンは、ベリマン教授が亡くなったあと、1784年に後任教授の候補者の一人となりましたが、実現しませんでした。しかし翌年、トゥルク大学の特任教授に迎えられました。1786年から2年間、ガドリンは北ヨーロッパ諸国を旅し、多くの大学や鉱山を訪問しました。ドイツでは *Chemische Annalen* の編者ローレンツ・クレル、アイルランドではアデア・クロフォードやリチャード・キルバンらと研究をしました。ガドリンは、フィンランド語以外にラテン語、ドイツ語、フランス語、ロシア語やスウェーデン語で論文を書き、指導的科学家としてのキャリアを積み、スカンディナ비아では最初の燃焼に関するラボアジェ支持者となりました。28歳になった1789年には、トゥルク大学の教授に推薦され、1797年に正教授となりました。1790年には、スウェーデン王立科学アカデミーの会員に選ばれています。

1794年、34歳になったガドリンは、17歳の女性ヘドリック・ティレマンと結婚し、9人の子どもをもうけ、そのうち7人が成人しました。ヘドリックが亡くなった59歳のとき、24歳年下の女性エバ・パランドールと再婚しました。ガドリンは家庭的な夫ではなかつ

ガドリンの生涯<sup>1-4)</sup>

ガドリンは、1760年6月5日、当時スウェーデンの統治下にあったフィンランドの南西部のバルト海に面した500年以上の古い歴史を持つ町トゥルク (スウェーデン語でオーボ) で生まれました。ヨハンは、幼少のころから教育環境に恵まれて成長しました。5歳のころ家庭教師から教育を受け、1日に10時間も勉強したと伝えられて

Sc	Y	La	Ce	Pr	Nd	Pm	Sm	Eu	Gd	Tb	Dy	Ho	Er	Tm	Yb	Lu
21	30	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71

たようで、家族とは食事のときのみ顔を合わす程度で、書齋で多数の書籍に囲まれて日々を過ごしました。運動もせず、食べ、飲み、タバコを吸い、近視でしたがめがねをかけませんでした。彼はしばしばめまいに襲われましたが、医師に診てもらうこともなく、薬も飲みませんでした。

1798年には、スカンディナビアで最初の化学の本を出版しています。この本は50年以上もの長い間使われたそうです。学生のためには、当時としては初めての化学実験書も書きました。

1822年に62歳で定年退職したあと、ミュナマキに移り、30年間過ごしました。1827年トゥルクの町の大火で、教会近くにあったガドリンの実験室や鉱物コレクションは失われました。1852年8月15日に92歳で亡くなりました。

ガドリンは、数学、物理学、鉱物学、冶金学や工業化学などを含めて、多くの分野で研究をした、まさしく真のルネサンス人と言われています。フィンランド商務省を設立し、ビジネスマンとしても活躍しました。トゥルク音楽協会の設立メンバーとなり、またヨーロッパ各都市の化学会の名誉会員となりました。彼は膨大な量の書籍と図書館を持っていて、トゥルク大学には遺産として18世紀後半の出版物が多く残されています。彼の使っていた二つの実験棟は、現在も残されていて、ひとつは病院、もうひとつは子どもたちのデイケアセンターとして使われています。

ガドリンの名誉を讃えて元素ガドリニウム (Gd) が命名されています。元素名に人名が採用された2番目の例でした。最初は、ロシアの地理学者ワシーリー・サマルスキーを讃えて名付けられたサマリウム (Sm) でした。その後も、マリー・キュリー (Cm)、アルバート・アインシュタイン (Es)、エンリコ・フェルミ (Fm)、ドミトリー・メンデレーエフ (Md)、アルフ

レッド・ノーベル (Nb) などが挙げられますが、これらの重元素はすべて放射性元素です。サマリウムは自然界に安定同位体と放射性同位体で存在しますが、ガドリニウムは自然界でほとんどが非放射性元素として存在します。

### ガドリンの業績<sup>1-5)</sup>

ガドリンは、1791年に初期型カウンターカレント(向流式)蒸留装置を発明しています。アルコールの蒸留に革命をもたらしたと評価され、工業化学的には重要な装置でしたが、後に、リービッヒコンデンサーとよばれるようになりました。また、化学変化における熱に関心を持ち、特に比熱や潜熱の研究をし、それぞれ1874年と1791年に論文を発表しています。また、1810 - 1824年には、中国の合金白銅 (pak tong) や洋銀 (alpacca) の研究もしています。しかし、ガドリンの最大の歴史的業績は、最初のレアアース研究があげられます。

1792年ガドリンは、スウェーデンのベルセリウスの下で研究をしていたカール・アクセル・アレニウスが1787年に発見した、ストックホルム近郊のイッテルビー村の石英採石場で見つけられた“黒くて重い鉱物”標本を受け取りました。注意深く実験しながら、ガドリンは標本の約38%は、これまで知られていない元素<sup>6)</sup>であることを見つけ、1794年に研究成果を発表しました。鉱物名はイッテルビアとよばれていましたが、1797年アンデルス・エーケベリがイットリアと名付けました。ガドリンや多くの化学者は、イットリアは新元素であると信じていましたが、1805年にハンフリー・デービーがそれは純粋な元素ではなく、酸化物であることを明らかにしました。これが初めて発見された希土類元素の酸化物でした。イットリアから、金属イットリウムを得たのはドイツのフリードリヒ・ヴェーラーでした (1828年)。ガドリンが最初に研



図2. ガドリ石((Ce,La,Nd,Y)<sub>2</sub>FeBe<sub>2</sub>Si<sub>2</sub>O<sub>10</sub>)  
(京都大学総合博物館所蔵の第三高等学校標本、撮影 豊 遥秋博士、協力 京都大学総合博物館)

究した鉱物は、彼のこの分野での功績を讃えて、1800年にガドリ石 (Gadolinite) (図2) と名付けられました。

イットリアは研究初期には地球上にまれにしか存在しない元素と考えられ、希土類元素(レアアース)とよばれていましたが、実際の地殻中の存在量はそれほど少なくないことがわかりました。しかし、この名称は、現在でもそのまま使われています。たとえばレアアースのうち地殻中の元素存在度が最大のものはセリウムですが、これはスズ、鉛、亜鉛などよりも多く、最小のツリウムでもビスマスと同じ程度で、銀よりは多いことがわかりました。

### レアアース元素の発見の歴史

元素周期表ではレアアース(スカンジウム、イットリウムとランタノイドの合計17元素)は全元素(118元素)の1/7を占め、これらは現代の日常生活には欠かせないものです<sup>7,8)</sup>。しかし、それらの発見の経緯は混乱をきわめました。分離しても分離しても、瓜二つのような純粋な新元素はなかなか見つかりませんでした。1794年のイットリウムの発見から1907年のルテチウムの発見まで、じつに113年にもおよぶ戦いがあったのです<sup>7)</sup>。17種類の元素は、互いに著しい化学的類似性を持っていたからです。

ガドリンが研究したガドリ石から未知の元素が分離されイットリアと名

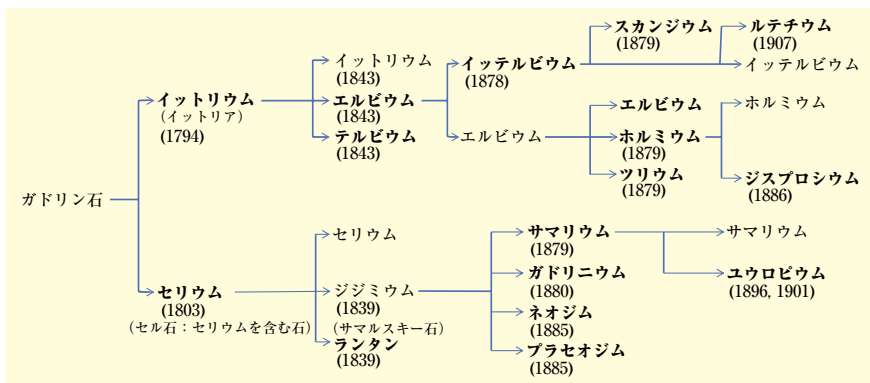


図3. 希土類元素(レアアース)の発見の歴史

太字で示した元素名と年号は、その元素が発見された年号として認定されていることを示している。ジジミウムという元素名は、現在は無い。ユウロビウムは、1896年に発見され、1901年に単離された。

表1. 元素の発見者と名前の由来(9種類)

元素名	原子番号	発見年	発見者	元素の名前の由来
イットリウム	39	1794	ガドリオン(フィンランド)	スウェーデンのイッテルビー
エルビウム	68	1843	モサンダー(スウェーデン)	スウェーデンのイッテルビー
テルビウム	65	1843	モサンダー(スウェーデン)	スウェーデンのイッテルビー
イッテルビウム	70	1878	マリニャック(スイス)	スウェーデンのイッテルビー
スカンジウム	21	1879	ニルソン(スウェーデン)	スウェーデンのラテン語名
ホルミウム	67	1879	クレーベ(スウェーデン)	ストックホルムの古名
ツリウム	69	1879	クレーベ(スウェーデン)	スカンジナビア半島の旧地名ツーレ
ジスプロシウム	66	1886	ボアボードラン(フランス)	ギリシャ語の“近づきにくい”
ルテチウム	71	1907	ユルバン(フランス)	パリの古名ルテチア

表2. 元素の発見者と名前の由来(7種類)

元素名	原子番号	発見年	発見者	元素の名前の由来
セリウム	58	1803	ベルセリウスとヒシンシエル(スウェーデン)	1801年に発見された小惑星ケレス
ランタン	57	1839	モサンダー(スウェーデン)	クラブロート(ドイツ)
サマリウム	62	1879	ボアボードラン(フランス)	鉱物の発見者サマルスキーを讃えて
ガドリニウム	64	1880	マリニャック(スイス)	ガドリンの功績をたたえて
ネオジウム	60	1885	ウェルスバッハ(オーストリア)	ギリシャ語の“新しい双子”
プラセオジウム	59	1885	ウェルスバッハ(オーストリア)	ギリシャ語の“緑の双子”
ユウロビウム	63	1896, 1901	ドマルセ(フランス)	ヨーロッパ大陸

\*サマリウムとガドリニウムは、元素の名前に人の名前がつけられた最初の例

付けられましたが、この中には9種類もの元素が含まれていました(図3)。このうち、イットリウム、エルビウム、テルビウム、イッテルビウムの4元素の名称は、イッテルビー村の名前に由来して名付けられました。一方、同じ鉱石から、1803年にベルセリウス、ヒシンシエルやクラブロートは新酸化物を見出し、2年前に発見された小惑星ケレスに因んでセリウムと名付けました。ところがこの酸化物の中

にも7種類の元素が隠れていたのです。レアアースの中では、プロメチウムのみが唯一人工元素です。この元素は、天然のウランの核分裂生成物中に見られるはずですが、半減期が短い(145Pm: 17.7年)自然界にはほとんど存在しません。1913年に、モーズリーにより存在が理論的に予測され、1947年にアメリカのマリンスキーらにより陽イオンクロマトグラフィーを用いて、ウランの核分裂生成物から

見出されました。

幅広い見識と技術を持ったガドリオンが拓いたレアアースの発見の歴史は、長い困難な研究を克服した素晴らしい航跡を残しています。イットリウムを先頭とする9元素およびセリウムを先頭とする7元素の発見者と元素名の由来(表1と2)から、北欧とヨーロッパの多数の人々がレアアース研究に携わった信念と情熱を感じることが出来るようです。無数の人々のたゆまぬ努力と忍耐があったからこそ、強力な永久磁石に欠かせないネオジウムやジスプロシウム、強い固体レーザー、カラーテレビの蛍光体あるいは高温超伝導体に使用されるイットリウムなどを含むレアアースが現代の私たちの生活を支えているのです<sup>8-10)</sup>。

【参考文献とノート】

- 1) Weeks, M. E.: "The Discovery of the Elements, XVI. The Rare Earth Elements", *J. Chem. Educ.*, **9**, 1751 (1932).
- 2) Dean, P. D. and Dean, K.: "Sir Johan Gadolin of Turku: The Grandfather of Gadolinium", *Academic Radiology*, **3** Suppl. 2, S165 (1996).
- 3) Pyykko, P. and Orama, O.: "What did Johan Gadolin actually do?", "Episodes from the History of the Rare Earth Elements" ed. by Evans, C. H., Kluwer Academic Publishers, p.1-12 (1996).
- 4) Johan Gadolin: [https://en.wikipedia.org/wiki/Johan\\_Gadolin](https://en.wikipedia.org/wiki/Johan_Gadolin)
- 5) ウィークス/レスター・著、大沼正則・監訳:「元素発見の歴史 3」、16: 希土類元素、p.728-765 (朝倉書店) (1990).
- 6) 古代哲学では、万物の根源をなす要素と考えられていた土 (earth)、空気 (air)、火 (fire)、水 (water) を4大元素とよんでいた。ガドリオンはこれにしたがって土 (earth) の成分を構成するものとして“未知の土”とした。この言葉が、後に希土類元素 (rare earth elements) とよばれるようになった。
- 7) 1947年に発見されたプロメチウムまでを含めると、1794年のイットリウムの発見から1947年まで実に153年の歳月が費やされた。
- 8) 桜井 弘編著:「元素111の新知識 第2版増補版」(講談社) (2013).
- 9) 文部科学省:「一家に1枚周期表」第10版(化学同人) (2017).
- 10) レアアース全般については、足立吟也編著「希土類元素の科学」(化学同人) (1999) および足立吟也監修・編集代表「レアメタル便覧」(丸善) (2011) を参考にされたい。



# Tim4アフィニティー法による高純度エクソソーム精製キット !! トライアルキット【2回用】を追加



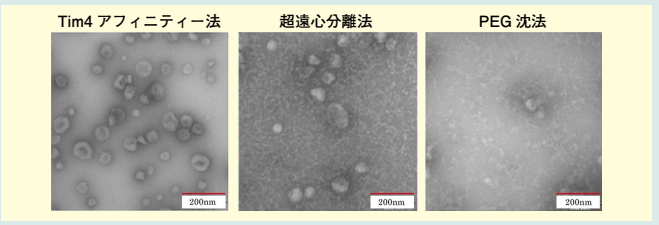
## MagCapture™ エクソソームアイソレーションキット PS

本キットは、細胞培養上清や血清などのサンプルから高純度なエクソソームをアフィニティー法によって簡便に取得できます。エクソソームの膜表面に存在するホスファチジルセリン (PS) にカルシウム依存的に結合する物質を用いているため、キレート剤によりインタクトな状態でエクソソームを溶出できます。

### 特長

- エクソソームを単離するために必要な試薬をキット化
- 培養上清、血清などからの高純度なエクソソームの単離
- 超遠心分離不要のため、簡便な操作で多検体処理が可能
- 単離したインタクトなエクソソームによる更なる研究の拡大
- 超遠心分離法と同等以上の回収効率
- マイクロベジクルなどの細胞外膜小胞の精製にも応用可能

### 電子顕微鏡解析結果



Tim4アフィニティー法 (和光法)、超遠心分離法、PEG沈法によってK562培養上清サンプルから回収したエクソソーム画分 (1-4 × 10<sup>10</sup> 粒子) を終濃度2%パラホルムアルデヒドで固定化し、電子顕微鏡解析を行った。  
和光法にて100nm前後の高純度エクソソームの濃縮を確認できた。

コード No.	品名	規格	容量	希望納入価格(円)
299-77603 293-77601	MagCapture™ Exosome Isolation Kit PS	遺伝子研究用	2回用 10回用	20,000 80,000

## エクソソームマーカー抗体 抗CD63, モノクローナル抗体 (3-13)

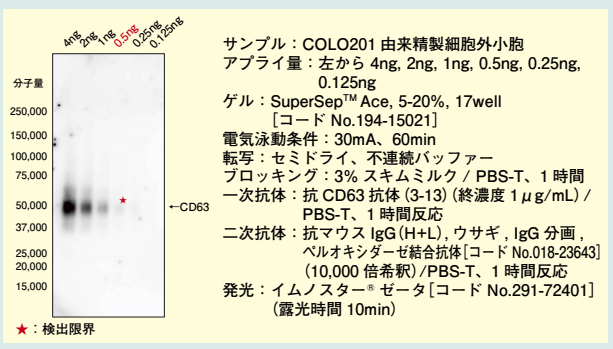


本品は、テトラスパンファミリー (TM4SF) のメンバーであるCD63 (lysosomal membrane associate glycoprotein-3: LAMP3) を特異的に認識するマウスモノクローナル抗体です。CD63は4回膜貫通ドメインをもつ膜タンパク質で、休止期血小板顆粒、活性化血小板細胞膜、休止期の顆粒球やT細胞、B細胞にも存在が確認され、活性化好中球の細胞表面に強く発現しています。近年、新たなバイオマーカーとして期待される細胞外小胞のマーカーとしても注目されています。

- 溶液組成: 1 × TBS (pH 7.2), 50% グリセロール, 0.05w/v% アジ化ナトリウム
  - 抗体濃度: 1.1 mg/mL
  - 免疫動物: マウス
  - Clone No.: 3-13
  - 結合抗体サブクラス: IgG1
  - 交差性: ヒト
- ※マウス、ラット、ウシのCD63には反応しないことを確認しています。
- 実用希釈倍率: WB 1:500 - 1:2,000 (非還元条件)  
ELISA 1:1,000 - 1:16,000  
フローサイト 1:100 - 1:1,000

### アプリケーションデータ

#### COLO 201 由来精製細胞外小胞のウェスタンブロット検出



コード No.	品名	規格	容量	希望納入価格(円)
016-27061 012-27063	Anti CD63, Monoclonal Antibody (3-13)	免疫化学用	20 μL 100 μL	9,000 30,000

Ref...2 ~ 10℃保存 F...-20℃保存 C80...-80℃保存 C150...-150℃保存 表示がない場合は室温保存です。  
 特定 毒物 劇物 毒物 劇物 毒薬 劇薬 危険物 向精神薬 特定麻薬向精神薬原料  
 化審法 第一種特定化学物質 化審法 第二種特定化学物質 化武 化学兵器禁止法 第一種指定物質 化武2 化学兵器禁止法 第二種指定物質  
 覚せい剤取締法 国民保護法  
 掲載内容は、2017年4月時点での情報です。上記以外の法律及び最新情報は、siyaku.com (http://www.siyaku.com/) をご参照下さい。

記載されている試薬は、試験・研究の目的にのみ使用されるものであり、「医薬品」、「食品」、「家庭用品」などとしては使用できません。  
 記載希望納入価格は本体価格であり消費税などが含まれておりません。

和光純薬時報 Vol. 85 No. 2  
 2017年4月15日発行  
 発行責任者 上田 衡  
 編集責任者 大西礼子  
 発行所 和光純薬工業株式会社  
 〒540-8605 大阪市中央区道修町三丁目1番2号  
 TEL.06-6203-3741 (代表)  
 URL http://www.wako-chem.co.jp  
 印刷所 共進社印刷株式会社

● 和光純薬時報に対するご意見・ご感想はこちらまでお寄せ下さい。  
 E-mail jiho@wako-chem.co.jp

● 製品に対するお問合せはこちらまでお寄せ下さい。  
 Please contact us to get detailed information on products in this journal.

■ 和光純薬工業株式会社 (Japan) <http://www.wako-chem.co.jp>  
 フリーダイヤル (日本のみ) 0120-052-099 / Tel 81-6-6203-3741  
 フリーファックス (日本のみ) 0120-052-806 / Fax 81-6-6201-5964  
 E-mail labchem-tec@wako-chem.co.jp

■ Wako Overseas Offices :  
 ・Wako Chemicals USA, Inc. <http://www.wakousa.com>  
 Toll-Free (U.S. only) 1-877-714-1920  
 Tel 1-804-714-1920 / Fax 1-804-271-7791  
 ・Wako Chemicals GmbH <http://www.wako-chemicals.de>  
 European Office (Neuss, Germany) : Tel 49-2131-3111-0 / Fax 49-2131-31110