

【総説】

「エクソソームによる腫瘍悪性化機構」

樋口 廣士、幸谷 愛…………… 2

「臭素化ダイオキシン類スクリーニング法の紹介」

鈴木 剛…………… 5

〈テクニカルレポート〉

「強塩基を発生するポレート型光塩基発生剤とその応用例」

築場 康佑、酒井 信彦…………… 16

【連載】

〈神経変性疾患研究の最前線〉

「第2回 アルツハイマー病(2) タウタンパク質」

長谷川 成人…………… 8

〈なるほど!! ELISA -基礎とコツ-〉

「第2回 ELISA の操作法とそのポイント(前編)」

株式会社シバヤギ編…………… 12

〈The Gateway to qNMR ~定量 NMR への扉~〉

「第1話 qNMR 高精度化のはじまり」

三浦 亨…………… 14

【化学大家】

「赤堀 四郎」

鈴木 不二男…………… 28

【製品紹介】

有機合成

光塩基発生剤 WPBG-266、WPBG-300 …………… 17

メタ位選択的 C-H ほう素化配位子 Cy-Ubpy、Amino-bpy …… 18

酸性有機溶媒(塩化水素ガス導入) …………… 18

トリアダマンチルホスフィン …………… 32

環境・分析

プレセップ®10% 硝酸銀シリカゲル、

プレセップ®55% 硫酸シリカゲル …………… 7

DSS-d₆ 標準液(500mg/L 重水溶液)、

ヘキサメチルジシラン標準液(500mg/L メタノール-d₄ 溶液) …… 15

免疫

抗 ATRX, モノクローナル抗体 …………… 23

抗アミロイド前駆体タンパク質, モノクローナル抗体(3E9)、

抗ヒトアポリボタンパク質 E4, モノクローナル抗体(1F9) …… 24

培養

神経細胞用培地…………… 25

細胞生物

ラボアッセイ™ アンモニア …………… 19

組織透明化試薬 SCALEVIEW®-A2 …………… 20

組織透明化試薬 SeeDB …………… 21

AkaLumine-HCl(アカルミネ™ 塩酸塩) …………… 22

Na-Preyessler型リンタンングステートカリウム塩、

Eu-Preyessler型リンタンングステートカリウム塩…………… 22

ゲフィチニブ…………… 23

遺伝子

MagCapture™ エクソソームアイソレーションキット PS …… 4

ECOS™ Competent *E. coli* …………… 26

〈ScreenFect™ 通信〉

「Sf9 細胞への遺伝子導入データ」…………… 27

【お知らせ】

試験研究用 医薬品成分化合物カタログ 第2版 発行のご案内 …………… 19

エクソソームによる腫瘍悪性化機構

東海大学総合医学研究所造血腫瘍分野 東海大学医学部血液腫瘍内科 樋口 廣士、幸谷 愛

はじめに

腫瘍の形成・悪性化の過程では、腫瘍細胞同士だけでなく、腫瘍細胞と正常細胞から構成される微小環境との、相互作用が必要である。例えば、多くの腫瘍組織には正常な免疫細胞が浸潤することが古くから観察されており、慢性炎症が腫瘍発生のリスクを増加させることは臨床的に認められる。その他にも、線維芽細胞や内皮細胞といった細胞が腫瘍微小環境を構成し、腫瘍細胞の増殖を助長することが報告されている。

腫瘍細胞そのものの根絶を目的とする多くの治療法は、正常細胞への毒性も強く、副作用など身体への負担が極めて大きい。加えて、染色体が不安定な腫瘍細胞は薬剤耐性を獲得しやすく、再発した場合に奏功しないことも大きな問題である。そこで、正常細胞から構成される微小環境を破壊、あるいは適切に制御することで腫瘍の根絶を目指した治療戦略が注目されている¹⁾。

本稿では、細胞外小胞エクソソームを介した腫瘍の転移・悪性化に関連する報告を紹介し、さらに、著者らが対象とするEpstein-Barrウイルス(EBV)陽性悪性リンパ腫におけるエクソソームの働きについて概説する。

細胞外小胞エクソソームとは

生体内のあらゆる細胞は、直接接触あるいはサイトカイン・ケモカインといった分泌タンパク質を介して、情報を伝達している。近年、このような細胞間の情報伝達を担う新たな因子として、細胞外小胞が注目を集めている。細胞外小胞は、細胞と同様に脂質二重膜から構成され、タンパク質・核酸・脂質などを内包しており、これらの分子が有する包括的な情報を同時に伝達

することが可能であると考えられている²⁾。

エクソソームは、細胞外小胞の中でも直径50～200nm程度の比較的小さな集団であり、多胞体(MVB: multivesicular body)と呼ばれるエンドソームから放出される。従来、エクソソームの分離には、超遠心法や密度勾配遠心法などが用いられてきたが、これらの手法では細胞由来の夾雑物を完全に取り除くことが困難であった。そこで、エクソソーム研究の高まりを受け、エクソソームをより高純度で分離する手法が求められた。著者らは、和光純薬が開発した新しいエクソソーム精製キットを利用して、エクソソームの分離を試みた。この試薬はエクソソーム表面に表出しているホスファチジルセリンに対するアフィニティを利用してエクソソームを分離する手法である。従来法である超遠心により分離したエクソソームと、本キットを用いて分離したエクソソームの電子顕微鏡下での観察画像を図1に示した。超遠心法ではエクソソーム以外に多くの夾雑物が混入しているが、本キットを使用することにより純度良くエクソソームを分離することに成功してい

る。今後、このようなアフィニティを利用した精製法がエクソソーム分離の新たな標準手法となることが期待される。

エクソソームと腫瘍の転移・悪性化

2007年にエクソソーム中にmiRNAが内包されていることが報告されて以来³⁾、エクソソームによる生体分子の輸送と、その生物学的意義に関して多くの研究が行われた。特に腫瘍細胞はエクソソームを活発に分泌することや、エクソソーム中には腫瘍特異的な抗原が内包され、それらがエクソソームによって輸送されうる可能性などから、エクソソームは、新しい診断・治療のターゲットとして注目を集めている。本稿では腫瘍由来エクソソームが微小環境に働きかけ、腫瘍転移・悪性化を促すことを示したいくつかの報告を紹介する。

腫瘍は他の組織に転移する際、間質細胞の間を移動して血管に到達する必要がある。このステップにおいてエクソソームは、フィブロネクチンを介した腫瘍細胞の運動性の促進や、プロテ

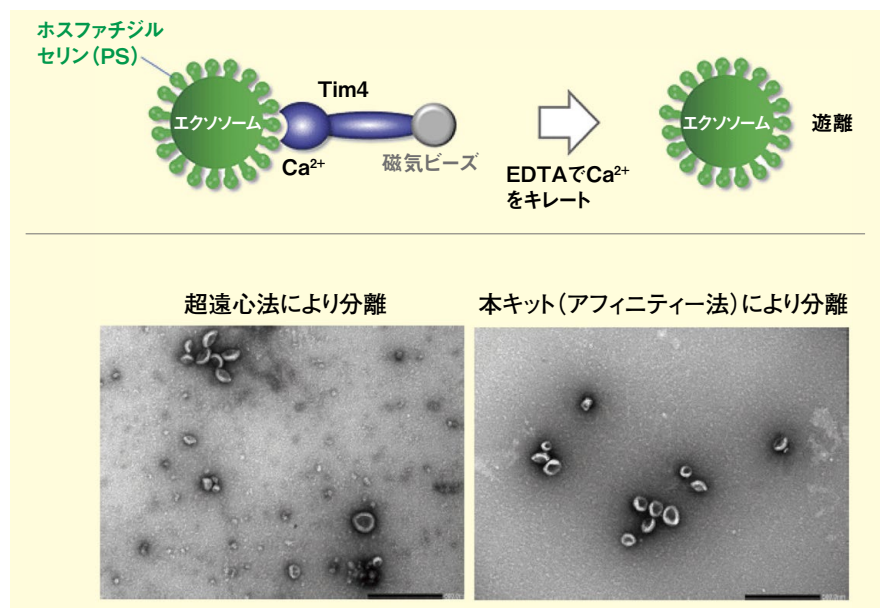


図1. 分離法によるエクソソーム純度の比較

アーゼ MT1-MMP を介した細胞外マトリックスの分解、血管新生や血管透過性の促進などにより、腫瘍転移を助長することが報告されている⁴⁷⁾。また、多くの腫瘍細胞は転移する組織に指向性を持つことが知られているが、エクソソーム表面のインテグリンがその指向性を決定する因子であることが報告されている。この報告中では、 $\alpha_v\beta_5$ インテグリンは肝臓、 $\alpha_6\beta_4 \cdot \alpha_6\beta_1$ インテグリンは肺への指向性を決定することが明らかにされた⁸⁾。これらの報告は、腫瘍細胞-微小環境の複雑なコミュニケーションを、エクソソームを中心として理解する上で極めて重要な報告である。

上記の報告を踏まえた上で、以下の項目では著者が独自に研究を進めている EBV 陽性リンパ腫におけるエクソソームの役割について概説する。

Epstein-Barr ウイルス (EBV) と悪性リンパ腫

Epstein-Barr ウイルス (EBV) は Burkitt リンパ腫培養細胞から分離された最初のヒトがんウイルスである。感染受容体として CD21 が同定されており、試験管内で容易に B 細胞の形質転換を引き起こす。その際、EBV がコードする LMP (latent membrane protein) や EBNA (EBV nuclear antigen) といった 9 種類の遺伝子が、細胞内シグナルや転写因子の活性を制御することにより、感染細胞の不死化や形質転換を誘導することが知られている。

現在、世界人口の 90% 以上は既に EBV に感染しており、潜伏感染状態であると言われているが、様々な原因で免疫力が低下した場合に、B 細胞性・T/NK 細胞性リンパ腫、稀に上咽頭がんや胃がんなど上皮細胞腫瘍なども引き起こす。一部の B 細胞性リンパ腫では、EBV 陽性の症例の場合、EBV 陰性の症例に比べて既存の治療

の効果が得られにくく、予後不良であることが報告されているため、現行の治療法に代わる、EBV 陽性リンパ腫に特異的な新規治療法開発が強く望まれている。著者らは EBV 陽性疾患治療におけるこの様な現状を鑑み、EBV 陽性リンパ腫の発症・悪性化の機序に焦点を当てて、研究を行ってきた。

重要なことに、EBV 陽性リンパ腫組織中には多くの免疫細胞の浸潤が認められ、腫瘍細胞の生存は炎症性微小環境に依存していると考えられている。著者らはこの点に着目し、EBV 陽性リンパ腫由来エクソソームの微小環境への影響、ならびにリンパ腫悪性化を促進する因子として EBV 由来 miRNA の働きを解析している。

EBV 由来 miRNA のエクソソームによる輸送

EBV は自身のゲノム上の BART (BamHI-A rightward transcripts) と呼ばれる領域に miRNA をコードしたクラスターを有している。このクラスターには約 40 種類の miRNA がコードされており、BART miRNA と表記されることもあるが、本稿では EBV miRNA と統一する。これら EBV miRNA のリンパ腫発症・悪性化における役割には、大きな議論の余地が残されているのが現状である。例えば、EBV miRNA はアポトーシス抑制などにより、腫瘍の生存を助けるという報告もあれば、EBV の潜伏状態を維持し、腫瘍化を抑制するという報告もある⁹⁾。

そのような中、Pegtel らのグループにより、EBV 陽性リンパ腫細胞がエクソソームを分泌しており、その中に EBV miRNA が含まれていることが報告された¹⁰⁾。この報告中で、エクソソームはヒト単球由来樹状細胞 (MoDC) に選択的に取り込まれ、EBV miRNA を輸送していることが

明らかにされた。この結果から、EBV 陽性リンパ腫由来のエクソソームは、腫瘍組織に浸潤する非腫瘍細胞の活性に何らかの影響を与え、微小環境構築を誘導する可能性が示唆された。

エクソソームのリンパ腫発症への影響

Pegtel らの報告を受け、著者らも同様の実験を試みたところ、リンパ腫由来エクソソームは単球/マクロファージに選択的に取り込まれることが明らかになった。さらに EBV miRNA を多量に含むエクソソームは、マクロファージにおける TNF α 、IL-10 などの遺伝子発現を促進するという結果が得られた。このような遺伝子発現パターンは腫瘍微小環境に浸潤する TAM (Tumor-associated macrophage) によく似ているため、EBV miRNA を含むエクソソームを取り込んだマクロファージが微小環境を構成する重要な機能を担う可能性が示唆された。

次に、EBV 陽性リンパ腫由来エクソソームが微小環境の構築を促進する可能性を確認するため、著者らは EBV 感染マウスモデルを利用した。本来、EBV はヒトをはじめとした霊長類にしか感染しないが、免疫不全 NOG マウスへヒト臍帯血由来 CD34 陽性造血幹細胞を移植し、その後 EBV 感染によりリンパ腫を発症するマウスモデルが既に確立されている。このマウスモデルに、野生型 EBV 株 (Akata) と EBV miRNA 欠損株 (B95-8) を感染させたところ、野生株感染マウスは著しく予後不良であるのに対して、miRNA 欠損株感染マウスは多くが予後良好であった。ここで、著者らは miRNA 欠損株感染マウスに、miRNA 内包エクソソームの静脈内投与を試みたところ、驚くべきことにリンパ腫の発症が観察され、さらに腫瘍

組織中へのマクロファージのおびただしい浸潤が認められた。最後に、クロドネートリポソーム投与により、腫瘍中のマクロファージを除去したところ、同時に腫瘍細胞も減少することが見出された。

以上の結果より、EBV 陽性リンパ腫悪性化の過程において、エクソソームはマクロファージを利用して腫瘍細胞に有利な微小環境を構築することが示唆された。

おわりに

発見された当初、エクソソームは不

要なタンパク質や核酸を細胞外に放出するための仕組みであると考えられていた。ところが今や、腫瘍をはじめとした様々な疾患の診断・治療のターゲットとして注目を集めている。本稿では、特に腫瘍由来エクソソームの機能に関わるいくつかの報告を紹介したが、エクソソームはあらゆる生命現象に関与すると思われる。多くの研究によりエクソソームの生物学的意義が明らかにされつつあるが、その機能の詳細には未解明の部分も多く残されている。著者らの研究が今後のエクソソーム研究の一助となることを願う。

【参考文献】

- 1) Quail, D. F. and Joyce, J. A. : *Nat. Med.*, **19** (11), 1423 (2013).
- 2) Tkach, M. and Thery, C. : *Cell*, **164**, 1226 (2016).
- 3) Valadi, H. *et al.* : *Nat. Cell Biol.*, **9** (6), 654 (2007).
- 4) Sung, B. H. *et al.* : *Nat. Commun.*, **6**, 7164 (2015).
- 5) Hoshino, D. *et al.* : *Cell Rep.*, **5**, 1159 (2013).
- 6) Kosaka, N. *et al.* : *J. Biol. Chem.*, **285** (23), 17442 (2010).
- 7) Zhou, W. *et al.* : *Cancer Cell*, **25**, 501 (2014).
- 8) Hoshino, A. *et al.* : *Nature*, **527**, 329 (2015).
- 9) Ok, C. Y. *et al.* : *Blood*, **122** (3), 328 (2013).
- 10) Pegtel, D. M. *et al.* : *PNAS*, **107** (14), 6328 (2010).

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 !!



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アフィニティー法によって高純度なエクソソームを簡便に取得することができます。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 Tim4 を使用しているため、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が可能
- 超遠心分離が不要のため、簡便な操作で多検体処理が可能
- インタクトなエクソソームの単離が可能で、その後の研究展開に期待できる
- 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

キット構成

- Streptavidin Magnetic Beads 600 μ L \times 1
- Biotin-labeled Exosome Capture 100 μ L \times 1
- Exosome Capture Immobilizing Buffer 35mL \times 1
- Exosome Binding Enhancer (\times 500) ... 500 μ L \times 1
- Washing Buffer 75mL \times 2
- Exosome Elution Buffer 5mL \times 1
- Reaction Tubes 22 本

コード No.	品名	規格	容量	希望納入価格(円)
299-77603	MagCapture™ Exosome Isolation Kit PS	Ref ^① 遺伝子研究用	2回用	20,000
293-77601			10回用	80,000

関連商品

コード No.	品名	規格	容量	希望納入価格(円)
297-79201	PS Capture™ Exosome ELISA Kit (Anti Mouse IgG POD)	Ref ^② 遺伝子研究用	96 回用	58,000

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

Ref^①...2~10℃保存 Ref^②...-20℃保存 Ref^③...-80℃保存 Ref^④...-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7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。

臭素化ダイオキシン類スクリーニング法の紹介

国立研究開発法人国立環境研究所 資源循環・廃棄物研究センター 基盤技術・物質管理研究室

(兼務) エコチル調査コアセンター 研究開発室 鈴木 剛

1 臭素化ダイオキシン類について

臭素化ダイオキシン類は、デカ BDE 等の臭素系難燃剤に含まれる不純物であり、含有製品のライフサイクル（製造・使用・廃棄・再資源化）を通じて生じる非意図的生成物である。難燃剤は、プラスチックや繊維等の燃えやすい材料を難燃化するために使用されている物質であり、発火や延焼を防ぐことで火災による死亡リスクを減らす有用性を持つ。そのため、難燃剤含有製品は普通の生活に欠かせないものとなっており、身の回りの含有製品としては家電製品や防災カーテン、自動車や航空機の内装等が挙げられる。環境省の取りまとめによると、2015 年の有機系難燃剤の国内使用量は、臭素系難燃剤で 41,250 トン/年、塩素系難燃剤で 4,600 トン/年、リン系難燃剤で 28,000 トン/年となっており、臭素系難燃剤の使用量が高い状況である。従って、臭素化ダイオキシン類の環境排出は、少なくとも臭素系難燃剤含有製品のライフサイクルを通じて今後も継続する。2011 年 3 月には、これまでの科学的知見に基づいて取りまとめられた、世界保健機構（WHO）と国連環境計画（UNEP）の専門家会合による総説¹⁾で、毒性等価係数（WHO-TEF）による臭素化ダイオキシン類のリスク管理の重要性が指摘され、ダイオキシン類と同様に毒性等量（TEQ）ベースで国際的に管理すべきことが提案されている。国内では、ダイオキシン類対策特別措置法（特措法）の附則 2 条に基づき、環境省が臭素系ダイオキシン類の排出実態を調査しており、臭素系難燃剤を取り扱う難燃繊維加工施設や含有製品の再資源化工場から、ダイオキシン類の排出基準に相当する値を大幅に超過する臭素化ダイオキシン類の排出を確認している²⁾。環境省は、排水や排出ガスに着目した重要な排出源を見極めるため

の調査を継続している。

2 臭素化ダイオキシン類スクリーニング法のニーズ

国内外の臭素化ダイオキシン類調査は、ガスクロマトグラフ高分解能質量分析計（GC-HRMS）法で行われている。GC-HRMS 法による調査は、汚染源推定を可能にする個別異性体情報を精度よく取得できる半面、高額な分析費用と長い分析時間の制約のため調査規模が限られている。UNEP/WHO 専門家会合の見解を受け、残留性有機汚染物質に関するストックホルム条約（POPs 条約）や特措法において臭素化ダイオキシン類のリスクが管理される場合、ダイオキシン類と共に TEQ ベースで管理されることになる。その場合、GC-HRMS 法では、ダイオキシン類と臭素化ダイオキシン類をそれぞれ分析する必要があり、これまで以上に分析費用や時間がかかるかと推察される。従って、臭素化ダイオキシン類スクリーニング法を活用した費用対効果の良いモニタリング調査態勢の確立は国内外で急務といえる。

3 スクリーニング法の開発と妥当性評価

著者らは、環境省の「環境研究総合推進費補助金循環型社会形成推進研究事業」として、平成 25 年度から平成 27 年度にかけて「生物検定法による塩素化/臭素化ダイオキシン類測定評価法の確立と高度利用に関する研究」を実施し、臭素化ダイオキシン類スクリーニング法の開発を実施した。具体的には、(1)臭素化ダイオキシン類の検出に関する現行生物検定法の妥当性評価、(2)ダイオキシン類と臭素化ダイオキシン類を分別評価する新規前処理法の開発、(3)新規前処理法を用いた生物検定法による既知濃度試料の測定評価、(4)開発測定評価法の利用可能性の評価を実施した。ここでは、得られた成果の概要を紹介する。

(1) 臭素化ダイオキシン類の検出に関する現行生物検定法の妥当性評価³⁾

環境省は、GC-HRMS 法によるダイオキシン類分析の難点（高額な分析費用、長い分析時間等）を補うために、2004 年 12 月に特措法施行規則の一部を改正して、廃棄物焼却炉からの排出ガス（焼却能力 2,000 kg/h 未満の小型焼却炉に限定）やばいじん及び燃え殻に含まれるダイオキシン類の測定の一部に簡易測定法を追加するとともに、2005 年 9 月に特措法施行規則第二条第一項第四号の規定に基づき環境大臣が定める方法（平成 17 年環境省告示第 92 号）を定め、4 種類の生物検定法を指定した。2010 年 3 月に当該告示の一部を改正して、現在は 10 種類の生物検定法がダイオキシン類の簡易測定法として指定されている。生物検定法（AhR バインディングアッセイ法 6 種類、イムノアッセイ法 4 種類）のうち、ダイオキシン類の AhR への結合に応じた遺伝子発現を評価する「AhR バインディングアッセイ法」は、測定原理を考慮すると臭素化ダイオキシン類の測定評価への応用が期待できる。本研究では、「AhR バインディングアッセイ法」のケイラックスアッセイ法（告示番号 1-1）と DR-CALUX アッセイ法（告示番号 1-4）を採用して、臭素系ダイオキシン類（計 32 異性体）の活性評価と、ダイオキシン類と臭素化ダイオキシン類の混合液の活性評価に基づく相加性評価を行ない、両手法の実施課題への利用の妥当性を評価した。臭素化ダイオキシン類 18 種（PBDDs 7 異性体、PBDFs 9 異性体、Co-PBBs 2 異性体）と臭素化塩素化ダイオキシン類 14 種（PXDDs 6 異性体、PXDFs 8 異性体）を評価したところ、WHO-TEF によるリスク管理が推奨されている 2, 3, 7, 8-位に臭素が置換している臭素化ダイオキシン類について顕著な用量反応が示され、得られた用量反応曲線の形状が 2,

3, 7, 8-TCDD(TCDD) と良く似ていた。臭素化塩素化ダイオキシン類も基本的に同様の傾向を示した。TCDD と臭素化ダイオキシン類及び臭素化塩素化ダイオキシン類の細胞応答濃度の比較によって得られる TCDD 比活性 (REP) は、対応する WHO-TEF との差が大凡 1 オーダー以内であり、WHO-TEF を良く反映していると考えられた。また、混合割合を変えたダイオキシン類と臭素化ダイオキシン類混合液の測定評価を実施したところ、相加性に基づいて算出した理論値と実験値が等しく、相加性が確認できた。結果として、ケイラックスアッセイ法及び DR-CALUX アッセイ法の臭素化ダイオキシン類検出ツールとしての妥当性が確認された。

(2) ダイオキシン類と臭素化ダイオキシン類を分別評価する新規前処理法の開発⁴⁾

現行の生物検定法では、ダイオキシン類と臭素化ダイオキシン類を包括して評価しており、管理基準を超過した試料について構成内訳 (ダイオキシン類と臭素化ダイオキシン類の寄与割合等) を把握できない難点がある。そのため、簡易な精製用と分画用の前処理法として、プレセップ[®] 55% 硫酸シリカゲル (精製カラム) (コード No. 293-35581) とプレセップ[®] 10% 硝酸銀シリカゲル (分画カラム) (コード No. 296-35571) を和光純薬工業株式会社と協力して開発した。当該カラムにおけるダイオキシン類及び臭素化ダイオキシン類の回収条件を評価して、ダイオキシン類と臭素化ダイオキシン類を分別評価可能か検討した。精製カラムにおけるヘキサンをを用いた化学物質標準品の回収率は、各種環境試料中 TEQ へ寄与の高い異性体 (1, 2, 3, 4, 6, 7, 8-HpCDD, 2, 3, 7, 8-TCDF, 1, 2, 3, 7, 8-PeCDF, 2, 3, 4, 7, 8-PeCDF, 1, 2, 3, 4, 7, 8-HxCDF, 2, 3, 4, 6, 7, 8-HxCDF, 2, 3, 7, 8-TBDF) で 90% 以上であった。また、焼却炉の排出ガ

ス、ばいじん及び燃え殻や、表層土壌、堆積物、ハウスダスト、作業環境や排水の抽出液を用いてカラム破過試験を実施し、供試可能な試料量を把握した。分画カラムでは、ヘキサンをダイオキシン類を、4% アセトン/ヘキサンを臭素化ダイオキシン類を回収した。標準物質の平均回収率 ($n=3$) は、ダイオキシン類 29 異性体で 65 ~ 102%、臭素化ダイオキシン類 11 異性体で 68 ~ 96% であり、良好な回収率を示した。これらの結果を踏まえて、精製カラム処理後の抽出液を包括画分、包括画分を分画カラム処理した抽出液をダイオキシン類画分と臭素化ダイオキシン類画分とした。よって、精製カラムと分画カラムを用いる手法を、ダイオキシン類と臭素化ダイオキシン類を分別評価する新規前処理法とした。

(3) 新規前処理法と生物検定法による既知濃度試料の測定評価⁴⁾

臭素化ダイオキシン類に係る問題を考慮すると、小型焼却炉の排出ガス、ばいじん及び燃え殻への適用に限定されている生物検定法を、その他試料に適用することが望ましい。そこで小型焼却炉からの排出ガス ($n=3$)、ばいじん ($n=3$)、燃え殻 ($n=3$)、表層土壌 ($n=3$)、堆積物 ($n=3$)、ハウスダスト ($n=3$)、作業環境 ($n=3$) 及び排水 ($n=3$) を対象として、ダイオキシン類と臭素化ダイオキシン類の GC-HRMS 法による化学分析を行い、既知濃度試料を得た。次いで既知濃度試料を対象として、公定法或いはそれに準じて抽出を行い、先述の (2) で開発した新規前処理法で各画分を調製して、生物検定法による測定評価を実施した。GC-HRMS 法と生物検定法で得られた測定値を比較すると、ダイオキシン類と臭素化ダイオキシン類の WHO-TEQ と包括画分の TEQ (生物検定法で得られる TCDD 等量) に有意な正の相関関係が示された。ダイオキシン類の排出基準や環境基準を考慮して、TEQ について適切な管理基準

を設けることで、ダイオキシン類及び臭素化ダイオキシン類汚染試料をスクリーニングできると考えられる。さらに分画カラムで得られたダイオキシン類画分と臭素化ダイオキシン類画分の TEQ 比は、GC-HRMS 法で得られたダイオキシン類と臭素化ダイオキシン類の WHO-TEQ 比と概ね一致した (図)。分画カラムで調製した画分を生物検定法で評価することで、構成内訳を把握出来ると考えられた。

(4) 開発測定評価法の利用可能性の評価

最後に、由来や履歴の異なる小型焼却炉の排出ガス、廃棄物焼却炉のばいじん及び燃え殻、排水、表層土壌、堆積物、建屋内空気及びハウスダストの計 341 試料を開発測定評価法で評価した。はじめに、ダイオキシン類の排出基準及び環境基準を管理基準として管理基準超過試料をスクリーニングした。次いで、管理基準超過試料の構成内訳を把握した。得られた結果は、臭素系難燃剤含有製品のライフサイクルにおいて、臭素化ダイオキシン類の高濃度排出事例が存在することを示唆した。具体的には、製造時の排出事例として電子機器製造業の小型焼却炉の排出ガスや難燃製品加工工場の排水、使用時の排出事例としてハウスダスト、廃棄処理時の排出事例として廃棄物焼却炉の排出ガス、ばいじん及び燃え殻、再資源化時の排出事例として廃電子機器解体処理地域で採取した表層土壌や堆積物が、それぞれ挙げられる。これらは、これまでの環境省の調査結果²⁾ と矛盾せず、また調査方針を支持するものであった。また、臭素系難燃剤を使用する製造業の小型焼却炉の排出ガスや都市部の下水処理場の流入水、廃棄物焼却炉由来の排水等、これまでに調査例が少なかった試料媒体においても臭素化ダイオキシン類汚染事例の存在が示唆された。取得結果は、多媒体を対象とする現行の臭素化ダイオキシン類排出実態等調査に、本

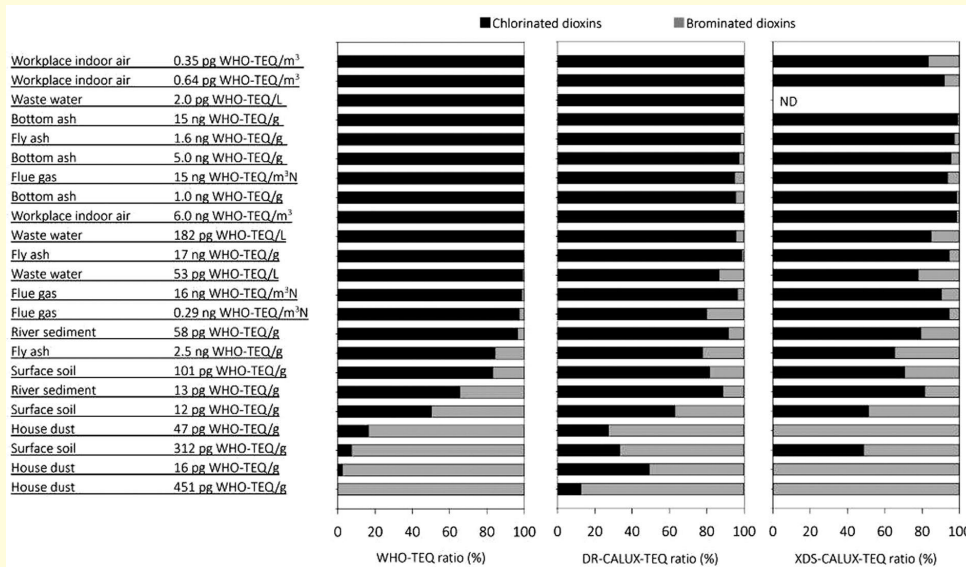


図. ダイオキシン類と臭素化ダイオキシン類の WHO-TEQ 比と 10% 硝酸銀シリカゲルカラムで調製したダイオキシン類画分と臭素化ダイオキシン類画分の生物検定法 TEQ 比 (図は文献 4) から引用)

WHO-TEQ : GC-HRMS 法による実測濃度と WHO-TEF から得られる WHO-TEQ、DR-CALUX-TEQ : DR-CALUX アッセイ法で得られる TEQ、XDS-CALUX-TEQ : ケイラックスアッセイ法で得られる TEQ

事業で開発した測定評価法がスクリーニング法として利用可能であることを示した。

4 おわりに

臭素系難燃剤のヘキサブロモシクロドデカン は 2012 年 10 月に POPs 条約上の対象物質に追加され、建築用のビーズ法発泡ポリスチレン及び押出発泡ポリスチレンを除いて、その製造や使用が禁止されている。また、同じく臭素系難燃剤のデカ BDE も同様に、自動車及び航空機用の特定の交換部品

を適用除外として、その製造や使用が禁止される予定である。既に販売された含有製品は、引き続き使用されるが、製品寿命を迎えたものから徐々に処理処分されることになる。ヘキサブロモシクロドデカンやデカ BDE は、それ自体を適切に管理していく必要があるが、非意図的生成物或いは不純物として含有製品に付随する臭素化ダイオキシン類も適切に管理していく必要がある。従って、臭素化ダイオキシン類の排出実態等調査は適正管理のために今後も必要と考えられ、臭素化ダイオキシン類スクリーニング法の活用が

期待される。また、アジアやアフリカの途上国で臭素系難燃剤を含む廃電子機器や廃自動車の不適切な処理や再資源化が社会問題になっており、臭素化ダイオキシン類による汚染実態の把握も喫緊の課題と推察される。

【参考文献】

- 1) van den Berg, M. et al. : *Toxicol. Sci.*, **133**, 197 (2013).
- 2) 環境省水・大気環境局総務課ダイオキシン対策室, 臭素系ダイオキシン類排出実態等調査結果報告書, 平成 13 年度~平成 27 年度.
- 3) Suzuki, G. et al. : *Toxicol. in Vitro (under review)*.
- 4) Suzuki, G. et al. : *Anal. Chim. Acta (in press)*.

ダイオキシン類分析用前処理カラム

プレセップ® シリーズ

塩素化ダイオキシン、臭素化ダイオキシンの分離にはプレセップ®10% 硝酸銀シリカゲルを、ダイオキシン類を測定するサンプルのクリーンアップには、プレセップ®55% 硫酸シリカゲルをご使用頂きます。

コード No.	品名	規格	容量	希望納入価格(円)
NEW 296-35571	Presep® 10% Silver Nitrate-impregnated Silica Gel	ダイオキシン類測定用	10本	照会
NEW 293-35581	Presep® 55% Sulfuric Acid-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7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回 アルツハイマー病 (2) タウタンパク質

東京都医学総合研究所 認知症・高次脳機能研究分野 長谷川 成人

はじめに

アルツハイマー病 (AD) を定義づける特徴的病理構造物として老人斑と神経原線維変化の二つが知られている。老人斑は約 40 アミノ酸からなるアミロイドβ (Aβ) ペプチドが細胞外に蓄積した構造物であり、神経原線維変化は、微小管結合タンパク質の一種であるタウタンパク質 (タウ) が細胞内に蓄積した構造物である。その構成タンパク質が明らかになる以前から、どちらがアルツハイマー病の発症や病態と関係するのか、また両者の関係はどうか、などについて議論されてきたが、未だに明確な結論はでていない。1990年に家族性ADの家系にAβの前駆体タンパク質 (APP) の遺伝子変異が発見されたことをきっかけに、ADは凝集性の高いAβの産生、蓄積が原因であるとする「アミロイド仮説」が提唱され、多くの研究者や製薬会社がAβの産生機序の研究やそれを制御する薬剤の開発に集中することとなった。しかしながらAβを標的とした治療薬の治験はことごとく失敗におわり、仮説の見直しや治療薬開発の方向性の修正が迫られている。一方、タウは様々な神経疾患に病変が出現することから、ADの原因と考えるよりも最終的な結果と考える風潮がしばらく続いたが、1998年のfrontotemporal dementia with parkinsonism linked to chromosome-17 (FTDP-17) のタウ遺伝子変異の発見を期にADの病態進行や症状との関係が見直された。また、最近ではタウを含めた細胞内異常タンパク質の細胞間伝播という新しい概念が提唱され大きな注目を集めている。本稿では、ADにおけるタウの存在様式について詳しく述べると共に、大きな注目を集めている異常型タウのプリオン様性質と病態形成の機序について概説したい。

タウ

タウは神経細胞に多く発現する微小管結合タンパク質の一種であり、微小管の重合促進、軸索における微小管の安定化に働く。ヒトでは、第17番染色体に存在する1つの遺伝子からmRNAのスプライシングにより複数のアイソフォーム (352~441 アミノ酸) が作られる (Fig. 1A)。中枢神経系では、胎児から幼若期には最も短いアイソフォームが、脳の発達に伴いエクソン2, 3, 10が挿入された分子が発現するようになり、大人の脳では、見かけ上48~67kDaの6種類のアイソフォームが発現する (Fig. 1B)¹⁾。エクソン10の挿入の有無により微小管結合に関わる繰り返し配列が3つの3Rタウと4つの4Rタウが生じ、4Rタウの方が3Rタウと比べて微小管重合能が高く、微小管を安定化する能力が高い。3Rタウと4Rタウの発現比率は大人の脳でほぼ1:1であるが、この比率が重要で、この比率に影響するようなタウの変異を生まれながらに持つ場合、成熟してからタウの蓄積を伴う認知症を発症する可能性がある。齧歯類はヒトと少し異なり、成熟するにつれて3Rタウはすべて4Rタウに置き換わる。脳の可塑性と関係があると思われるが、この違いにより、AD特徴的なタウ病変が現在でもマウスでは再現できていない (後述)。

タウは熱安定な微小管重合促進因子として同定された²⁾という経緯があ

るように、100℃で5分処理しても変性、失活しないタンパク質である。これはタウが明瞭な構造をとらないnatively unfolded proteinの一種であることと関係するが、分子量が比較的大きなタンパク質としては珍しく、この特徴を利用することで、脳からでも比較的容易に精製することができる。タウは生理的にリン酸化されており、リン酸化はタウの微小管重合能を低下させることが知られている。微小管の安定化がタウのリン酸化によって制御されていると考えられ、実際、神経突起や軸索の伸長、退縮を繰り返す胎児から幼若期において高度にリン酸化された状態で存在する。部位によってリン酸化されている割合は異なるが、胎児期は20~80%、成熟後は0~50%程度リン酸化された状態で存在する³⁾。

AD脳に蓄積するタウ

タウはAD患者脳でどのような状態で蓄積しているのであろうか？ 前述のように、ADの特徴病変の一つである神経原線維変化 (Fig. 2A) という構造物としてタウは蓄積する。電子顕微鏡観察からその超微形態はpaired helical filament (PHF) という特異な線維構造をとっていることが示されている (Fig. 2B)。1990年頃から電子顕微鏡による観察、抗体を用いた間接分析、患者脳から単離したタウの質量分析など、様々な方法で患者脳に蓄積するタウの解析が行われ、表1に示すような違いが明らかとなってき

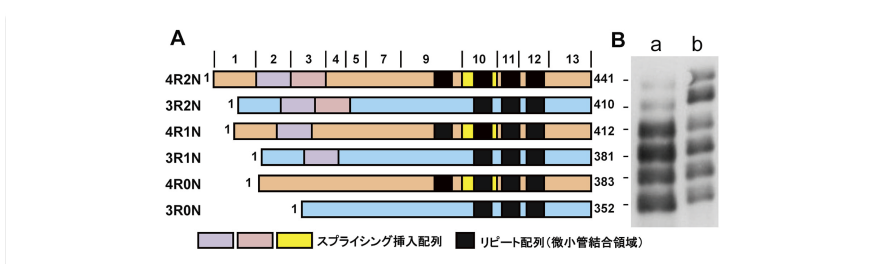


Fig. 1. ヒト脳に発現する6種類のタウ

A: 6種類のタウアイソフォームの模式図、B: a. 剖検脳の正常タウ (脱リン酸化後)、b. 大腸菌に発現、精製した6種類のリコンビナントタウ。いずれもT46抗体によるイムノブロット。

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。

た⁴⁾。①正常タウは明瞭な構造をとらない可溶性の高いタンパク質であるのに対し、蓄積タウはクロスβ構造に富むアミロイド様線維構造をとり、界面活性剤に対する不溶性、プロテアーゼ、ホスファターゼ耐性などを獲得している。②正常タウと同じ6種類のアイソフォームが蓄積するが質的にも量的にも正常タウより高度にリン酸化され、移動度の遅い60, 64, 68kDaのトリプレットバンドとして検出される(Fig. 2C)。③蓄積タウは断片化し、一部はユビキチン化、脱アミド化されており、電気泳動で明瞭なバンドにならないスメア状を呈するものもある。このような異常は、いつ、どのようなタイミングで生じるのか、またどの異常がタウ蓄積の原因か？最も注目されたのがリン酸化であり、タウキナーゼやホスファターゼに関する研究が多数報告された。タウはリン酸化されると微小管から解離し、自己凝集しやすくなるという考えが一般に受け入れやすかったことや、当時は細胞内情報伝達のリン酸化カスケードの研究が盛んであったためと考えられる。現在でもこの考えは根強く残っているが、様々なキナーゼを駆使してタウをリン酸化しても、患者脳と同じ異常リン酸化状態を再現することは難しく、リン酸化してもタウの凝集性が高まることもない。筆者らは、患者脳に蓄積するタウの解析や、細胞、動物モデルの実験結果などから、リン酸化は線維形成や蓄積後におこる細胞内の一種の防御反応と考えており原因ではないと考える⁴⁾。細胞内で凝集したタンパク質を異物として認識し、それらを分解、排除しようとした一種の防御反応として、リン酸化、ユビキチン化、断片化が起こったと考える方が説明しやすい。

● タウの異常病理形成と細胞間伝播 ●

前述のようにAD患者脳においてタウは、コンゴレッドやチオフラビ

表1. 正常タウと異常タウの比較

	Normal tau	Abnormal tau in AD
Isoforms	6 tau isoforms (3R + 4R tau)	6 tau isoforms (3R + 4R tau)
Structure	Natively unfolded	Amyloid-like PHFs & SFs (cross-β structure)
Properties	Water-soluble, heat-stable	Sarkosyl-insoluble, heat-stable
Functions	Microtubule assembly and stabilization	Some toxic functions
Modifications	Phosphorylated (20 ~ 50%)	Phosphorylated (30 ~ 100%) Partially ubiquitinated, deamidated
Apparent MW	45 ~ 68kDa + fragments	60, 64, 68kDa + fragments + smears
Protease-sensitivities	sensitive	resistant
Phosphatase-sensitivities	sensitive	resistant

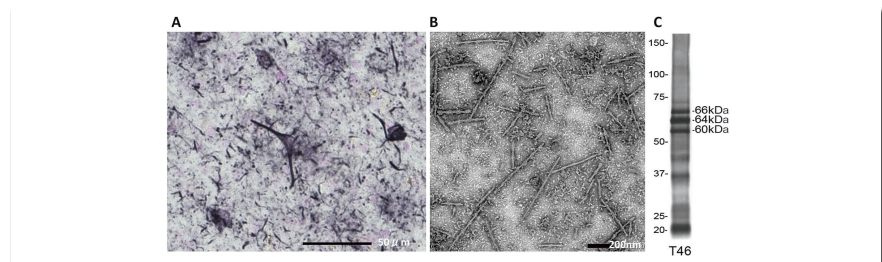
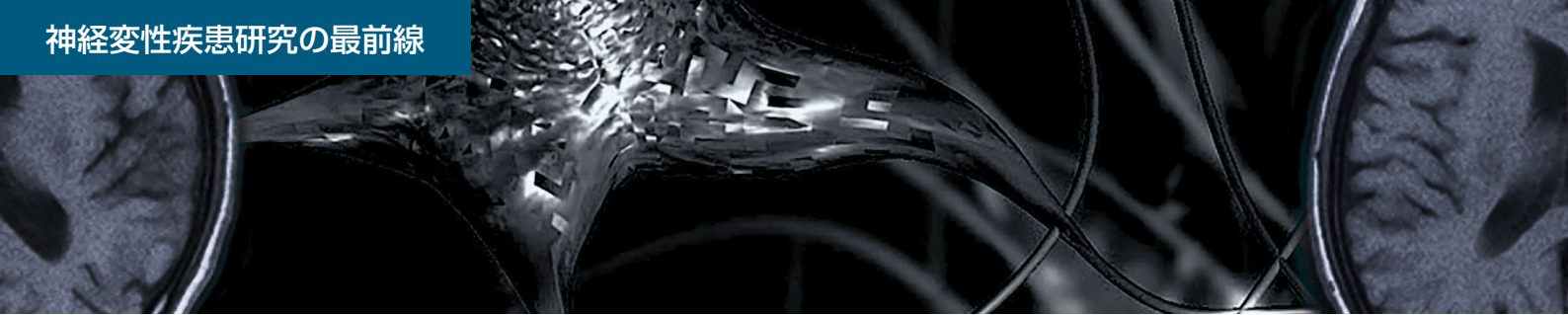


Fig. 2. A : AD 患者脳切片の抗タウ抗体 (AT8) による免疫組織染色、神経細胞内の構造物である神経原線維変化に加え、神経突起内に蓄積した糸屑様の構造物が多数観察される。B : AD 患者脳から調製したサルコシル不溶性画分の電子顕微鏡像 (ネガティブ染色)、PHF や SF が多数観察される。C : AD 脳のサルコシル不溶性画分の抗タウ抗体 (T46) によるイムノブロット、60,64,68kDa のリン酸化された全長タウのバンドの他、断片やレーン全体がそまる smear 状の反応が検出される。

ンなどのクロスβ構造と結合する色素に染まる物理化学的特性を有するアミロイド様線維構造をとって蓄積する。では、どのようにしてこの異常病理は形成されるのか。一般的にアミロイド線維は最初に凝集核が形成され、凝集核に正常タンパク質が結合、重合して線維が伸長するモデルが提唱され、受け入れられている。最初の凝集核はタンパク質分解低下、品質管理システム障害など様々な原因で生じると考えられ、その原因解明も必要であるが、異常型タウの増殖過程を制御する方が治療的観点からはより重要と思われる。なぜなら病気を発症した時点ですでにかなりの異常型タウが蓄積しているからである。Braak らの多数側の剖検脳の解析から、AD におけるタウの蓄積病変はかなり早い時期 (30代) から、

Aβ病変に先立って出現し、一定の方向性をもって徐々に広がることが知られている⁵⁾。はじめにタウ病変は海馬傍回前部の嗅内野で出現し (さらに初期は青斑核から始まると報告している)、徐々に海馬やマイネルト基底核、扁桃体というような大脳辺縁系へと広がり、さらに大脳新皮質へと広がる。重要なことはこのタウ病変の広がり症状がよく相関することであり、AD のステージ分類として使われている。最近、Aβ、タウの分子イメージング技術が発展し、生きたままの状態での病変がどこにどのくらい分布するか視覚化できるようになり、Braak の病変分布、進展様式が PET イメージングでも確認されるようになってきている。タウの蓄積病変が病気の進行とともに拡大することはよく知られていたが、



どうして広がるのか、どのようなメカニズムによるものかについては、ウイルス感染が想定されていた程度で特に議論されてこなかった。最近になり、このタウなどの細胞内異常タンパク質の病変が基本的にはプリオンと同じメカニズムで拡大することが提唱されて大きな注目を集めている⁶⁾。すなわち、構造変化した分子が正常分子を異常型に変換し増殖する。それが一つの細胞に留まらず、細胞間を越えて他の細胞にも伝わることで病変が広がるという機序である。

様々な神経疾患におけるタウタンパク質の異常

タウの異常病変はADだけでなく、ピック病 (PiD)、進行性核上性麻痺 (PSP)、皮質基底核変性症 (CBD) などの様々な神経疾患に認められる。このため、タウ病変は原因というよりは神経が変性する際の結果 (final common pathway) ではないかと考えられる時期もあった。しかしながら、1998年に認知症 (FTDP-17) の原因がタウ遺伝子 (*MAPT*) 変異であることが発見され、様々な疾患におけるタウ蓄積のすべてが神経変性の原因であることが判明した。*MAPT* 変異によって発症するこの認知症は、ADのような神経原線維変化を伴うものから、白質におけるグリア細胞タウ蓄積が目立つものまで、その病理、臨床像はさまざまである。変異効果の解析から、ミスセンス変異の多くがタウの構造や機能に影響すること、イントロン10とエクソン10内の変異の一部がエクソン10のスプライシングに影響して3Rタウと4Rタウの比率を変えることが示されている。タウ蓄積病変を伴うことが共通の特徴であり、タウ蓄積を介して神経変性がおこることを間接的に示している。これを機に、タウの異常を伴う疾患はタウオパチーと総称されるようになるが、疾患ごとに蓄積

するタウの種類、蓄積形態、蓄積細胞などが異なり、それぞれ特徴的病理を形成する。PiDでは3Rタウが第二層の小型神経細胞に、PSPやCBDでは4Rタウがグリア細胞を中心に蓄積する。一方、ADでは3Rタウと4Rタウがほぼ1:1で、比較的大型の神経 (錐体) 細胞に蓄積する。またその超微形態はPiDが直細管状、PSPやCBDではリボン様、ADはねじれ線維のように蓄積するタウのアイソフォーム構成によって異なる。また同じ4Rタウが蓄積するPSPとCBDでも蓄積形態は微妙に異なり、生化学的にもタウのC末端断片のバンドパターンやプロテアーゼ耐性バンドの違いで分類できることが示されている⁷⁾。このようにタウの異常は疾患の定義づけ、分類に使われるほど特徴的的病変であり、症状や病気の進行と深く関係する原因といえる。

タウの伝播モデル

このような多様なタウの病理と臨床像はどのようにして形成されるのか？ タウの異常病変を細胞、マウスで再現するため、野生型ヒトタウや変異タウを過剰発現する様々な試み、モデルが報告された。しかしながら、リン酸化タウのレベル上昇や細胞体や樹状突起内への局在変化は見られるものの、線維化タウが蓄積するまでの病変は、ほとんどみられず、例外的にP301LやP301S変異タウを過剰発現するトランスジェニックマウスにタウ蓄積を伴う神経変性が出現したのみであった。タウの異常病理が形成されにくい理由として「時間」という因子が考えられ、マウスの寿命という短い年月では変異タンパクを過剰発現しても病変形成まで至らないのかもしれない。前述のように、病変はシード依存的に凝集が起り、最初に凝集核が形成されるまでが律速であることからシードを導入することでこの期間を一気に短縮

することが可能となる。筆者らは、タウ線維の毒性を調べるため、リポフェクションでタウ線維を細胞内に導入することを試みた際、幸運にもタウ線維がこの方法で効率よく細胞内に導入できること、さらには導入されたタウ線維がシードとなり、細胞内の正常タウが異常型に変化して蓄積することを見出した。興味深いことに、3Rタウ線維を導入した細胞では3Rタウが蓄積し、4Rタウ線維を導入した細胞では4Rタウが蓄積した。すなわち、3Rタウ線維は3Rタウを凝集させ、4Rタウ線維は4Rタウを凝集させる⁸⁾。リピートが一つ多いだけであるが、同じ分子同士が凝集、蓄積するのである。このように同種の分子の線維化や異常化は様々なアミロイドの形成やプリオン病の原因であるプリオンタンパクの異常化現象とよく似ている。マウスの脳組織内においても同様、脳にシードを直接注入すると、数ヶ月でマウスの脳内の正常タンパク質が異常化して細胞内に蓄積してくるのである。この場合、リポフェクションのような試薬は特に必要でなく、おそらくエンドサイトーシスなどで一部が細胞内に取り込まれ増殖すると考えられる。このような細胞内異常タンパク質のプリオン様伝播の現象はタウ、 α シヌクレインはマウス脳への接種実験で実証されており、TDP-43についても培養細胞モデルのみであるが確認されている。

タウ病変の伝播については、病変を形成しないヒト野生型タウ発現Tgマウスに病理を形成するP301S変異タウマウスの脳抽出物を接種すると、数ヶ月後に病理が形成されるという実験が最初に報告され、続いてAD、PSPなどの患者脳抽出物をTgマウス脳に接種すると疾患に特徴的な病変がマウス脳内に出現することが報告された⁹⁾。しかしながら、4Rタウのみを発現するTgマウスで3Rタウと4Rタウが蓄積するAD病変を再現できるはずはなく、それぞれの疾患の特徴

病理を実際に再現できているかは生化学解析や電顕解析などで検討する必要がある。このように、タウ病変の伝播をマウスで調べる場合の最も大きな問題点は、成熟したマウスでは4R タウだけしか発現していない点である。前述のようにAD 脳では3R タウと4R タウの両方がほぼ1:1で蓄積することから、ヒトと同じように成熟しても3R タウと4R タウが同量発現するマウスシステムの構築が望まれる。プリオン病の感染実験と同様、実際の病態に近づけるには、過剰発現系ではなくノックインマウスなどの非過剰発現系がより望ましい。

おわりに

最後にAD 脳の神経細胞内で想定されるタウの線維化とその伝播のメカニズムについて考えたい (Fig. 3)。老化や様々な要因で、ある神経細胞に3R タウと4R タウが重合し異常型タウのシードが形成される。これに正常タウ (3R タウと4R タウの両方) が重合して線維の伸長反応がおこり、異常型タウが増幅する。その後はタウに限った話ではないが、他の細胞に伝播することで病変が広がると考えられる。伝播の機構については、細胞死や他の機構によって細胞外に放出され、古典的なエンドサイトーシスや他の機構によって近傍の細胞に取り込まれる場合や、トンネリングナノチューブ、シナプス、あるいは未知の機構を介して他の細胞に伝播することなどが考えられるが、主要な経路は未解明である。最近の筆者らはマーモセットの線条体に α シヌクレイン線維を接種する

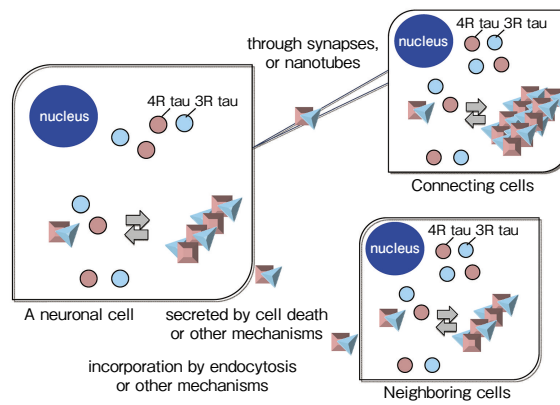


Fig. 3. ADにおける神経細胞内の異常タウの形成と細胞間伝播の模式図

実験を行ったところ、接種後3ヶ月という短期間であるにもかかわらず黒質の神経細胞にレビー小体様の異常 α シヌクレインの蓄積とチロシン水酸化酵素 (TH) 陽性神経細胞の減少を観察した¹⁰⁾。タウについても同じか検討が必要であるが、異常タンパク質が逆向性に伝播したことを強く示唆する所見である。このような方向性をもった分子の移動については、外に排出されたものが近くの細胞に取り込まれるという単純な系だけでは説明しにくく、細胞間の連絡回路や信号の伝達と関連した密接な連絡系を介しているようにみえる。伝播をおさえることができれば病気の進行を止めることができると考えられ、タウの伝播に関連した創薬が重要となる。特にワクチンや抗体療法によって異常型タウの除去を促進する戦略はいくつかの製薬会社が治験を進めている状況であり、今後の進展を注目したい。タウPETイメージングによって異常病変のひろがりを追うことが可能になってきており^{11,12)}、細胞死と密接に関係するタ

ウの蓄積を標的とした予防、治療法の開発は今後ますます注目されると思われる。

【参考文献】

- 1) Goedert, M. and Jakes, R. : *EMBO J.*, **9**, 4225 (1990).
- 2) Weingarten, M. D. et al. : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **72**, 1858 (1975).
- 3) Watanabe, A. et al. : *J. Biol. Chem.*, **268**, 25712 (1993).
- 4) Hasegawa, M. : *Biomolecules*, **6** (2), E24 (2016).
- 5) Braak, H. and Braak, E. : *Acta Neuropathol.*, **82**, 239 (1991).
- 6) Goedert, M. : *Science*, **349**, 1255555 (2015).
- 7) Taniguchi-Watanabe, S. et al. : *Acta Neuropathol.*, **131**, 267 (2016).
- 8) Nonaka, T. et al. : *J. Biol. Chem.*, **285**, 34885 (2010).
- 9) Clavaguera, F. et al. : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **110**, 9535 (2013).
- 10) Shimozawa, A. et al. : *Acta Neuropathol. Commun.*, **5**, 12 (2017).
- 11) Harada, R. et al. : *Biomolecules*, **6**, 7 (2016).
- 12) Ono, M. et al. : *Brain*, **140**, 764 (2017).

今回は、「アルツハイマー病 (3) アミロイド β 」の予定です。

当社では、3R や4R などのタウタンパク質や、タウ抗体を取り扱っています。

詳細は当社HPをご覧ください。

タウタンパク質 : http://www.wako-chem.co.jp/siyaku/product/life/tau_protein/index.htm

タウ抗体 : http://www.wako-chem.co.jp/siyaku/product/life/tau_series/index.htm

和光 Tau

検索

第2回 ELISA の操作法とそのポイント (前編)

市販キットを使用した場合の一般的な ELISA 操作法のポイントをご紹介します。キットメーカーにより推奨方法が異なります。実際には使用キットの取扱説明書に従って操作して下さい。

ポイント①：測定前のチェック

【納品時のチェックポイント】

■ 製品の状態を確認しましょう。輸送温度が適切だったかどうか、損傷がないかなど、異常の有無を確認しましょう。

【冷蔵保管品の場合のチェックポイント】

■ 冷蔵庫の温度設定（製品指定温度）を確認しましょう。試薬は凍結厳禁の場合があります。

■ 冷蔵庫内で吹き出し口から直接冷気が当たる位置での保管は避けましょう。凍結する可能性があります。

■ 冷蔵庫の温度が低過ぎるとキット構成品の濃縮洗浄液中の塩が析出することがあります。

■ 上下逆さまに置いたり、横向きに置いたりしないようにしましょう。

* プレートに保存安定液が充填されているものがあります。上下逆さまに保管すると抗体固相面に気泡が接触してしまいます。

【実験室・機器のチェックポイント】

- 反応温度が一定に調節できる実験室を選びましょう。
- ・ エアコンやストーブ、恒温槽、オートクレーブ、パソコンなど熱源が近くに無いこと。
- ・ 空気の流れが小さいこと（風速 0.4m/sec 以下を推奨します）。
- ・ 湿度が 30% 以上あることを推奨。
- ・ 直射日光が当たらないこと。

■ ピペットは定期的に校正を行いましょう。

■ 自動洗浄機、プレートリーダーなどメンテナンスされた機器、器具を使用しましょう。

ポイント②：ピペット (プランジャー型について)

■ ピペット操作について

ELISA 測定でピペットを使用する場面は、標準溶液の調製、試薬溶液の希釈調製、標準溶液や検体、試薬溶液を 96 ウェルプレートに分注するところです。これらの作業で再現性良く分注するために、手慣れたピペットのご使用をお勧めします。プッシュボタンを一定の力で押せるピペットをお勧めします。

■ ピペット選択について

96 ウェルプレートへの分注量は 5 μ L、10 μ L、50 μ L、100 μ L などさまざまです。5 μ L 分注する時は最大 10 μ L

のピペットを、50 μ L 分注する時は最大 100 μ L のピペットを選択するなど適切なピペットを使用しましょう。

96 ウェル全てに分注する際には連続分注器のご使用をお勧めします。また、メンテナンスされた電動ピペットもお勧めです。

ポイント③：プレートへの分注

【分注前の準備】

■ 96 ウェルプレートのアドレスを作成しましょう。どのウェルに何を入れるかを確認しましょう。

■ 96 ウェルプレートのシールは室温に戻してから剥がしましょう。

■ ストリップタイプのプレートの場合は外れてしまった時のためにストリップの端に油性ペンで No. を書きましょう。

■ キットの全試薬の室温化が必要な場合は室温に戻してから使用するようにしましょう（1 時間半～2 時間必要）。特に緩衝液、洗浄液は重要です。

【各標準溶液の分注時】

■ 0 濃度 (Blank)、一番薄い濃度の標準溶液から分注しましょう。連続分注時も薄い濃度のウェルから分注することをお勧めします。

■ 20 分前後で 1 プレート全てに分注できるようにしましょう。高感度タイプでは特にプレートの乾燥に注意しましょう。

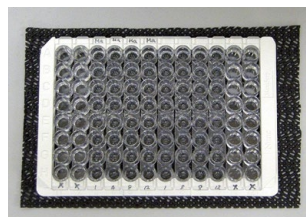
■ 連続分注時を除きチップは 1 ウェル毎に交換することをお勧めします。

■ 検体の希釈が必要な時は事前に希釈したものを用意しておきましょう。

■ 標準溶液、検体、第二抗体の入れ忘れに注意しましょう。

■ 泡を立てないように分注しましょう。

お薦めグッズ



96 ウェルプレートに分注する際にプレートのズレが気になる方へ。100 円ショップで販売している玄関マットなどのスベリ止めをプレートの下に敷き操作をすると便利です。

ポイント④：チップ使用法

チップ使用法のポイントに 2 つの方法があります。どちらか一方に統一して使用しましょう。

● プレウェットング法

1. 新しいチップをセットした後、採取する溶液を第一ス

トップ（プランジャーが最初に止まる所）の範囲で1～2回吸い上げ、放出する「プレウエット」を行った後、溶液を満たします。

2. チップの先端を容器の内壁に軽くタッチし先端の外側についている溶液を除去し取り出します（タッチ&ゴー）（図1）。
3. チップの先端をウェルの内壁から少し離し、溶液を排出します。この時プッシュボタンを最後まで押し、溶液を完全に排出します（ブローアウト）。
4. ウェルの内壁でタッチ&ゴーを行ってピペットを抜き出し、チップを交換します。この時チップ先端で内壁を擦らないように注意しましょう。

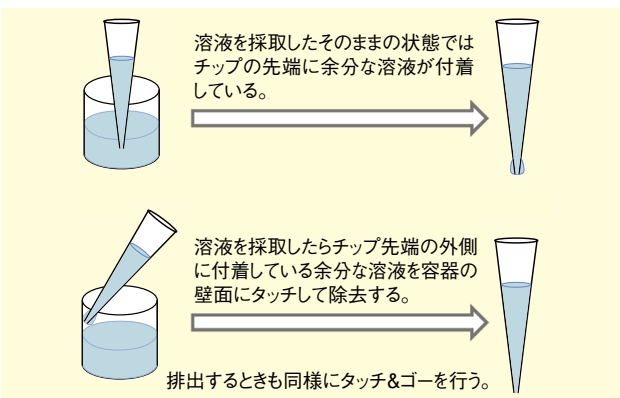


図1.

● 共洗いの法

この方法は緩衝液などが既にウェルやチューブに入っている場合に適用できます。微量な検体、微量な各標準溶液の分注作業時などにお勧めします。

1. 新しいチップをセットし、第一ストップまでプッシュボタンを押し下げ、採取する溶液を静かに吸い上げます。
2. 容器の内壁でタッチ&ゴーを行いピペットを取り出します。
3. 緩衝液などが既に入っているウェルにチップの先端を入れて溶液を放出し、第一ストップの範囲内で1～2回プッシュボタンを上下して「共洗い」します。最後にブローアウトします。
4. ウェルの内壁でタッチ&ゴーを行いピペットを抜き出し、チップを交換します。この時、チップの先を96ウェルプレートの内壁に擦らないように分注しましょう。

ピペッティング時における注意ポイント（一例）

プレウエット法、共洗いの法を使い分け正確な分注を行いましょ。ブローアウトをすると泡の発生が起こる可能性があります。泡の発生に注意しましょう。分注時にウェルの底面、壁面にチップを擦らないようにしましょう。固相化抗体が剥がれてしまいます。いつも一定のスピードで押し下げましょ。最後にタッチ&ゴーを行いましょ。

Q&A

Q：なぜ1検体1ウェルで測定してはいけないのでしょうか。

A：

● アッセイの操作法から考えると…

1ウェルでの測定結果をサポートする側面的データがないこと。もし測定操作に誤りやピペッティングの誤差があったとしても比較検討することができません。同一実験群の他の試料とかけ離れた結果でなければ一応測定操作に間違いはなかっただろうと推定することになりますが、本当にそれで良いのかと言う疑問が残ります。二重、三重測定ならばそれぞれの測定値がまとまっていれば測定操作に間違いがなかったと判定することができます。

それでは二重測定でも2つの測定値がかけ離れているときはどうするかということなのですが、二重測定の場合にはどちらが異常なのか正しいのか判らないのです。従って、同一実験群に属する他の試料との比較で考えることとなります。三重測定ならば他の2つからかけ離れている測定値は棄却することもできます。厳密に言えば棄却検定をした方が良いのですが試料数が少ないときには棄却することは難しくなります。特に二重測定では棄却検定のしようがありません。あまり変な値でなければ棄却しないで平均値を求める方が無難でしょう。

● 統計学的に考えると…

1ウェルの場合は自由度がゼロになります。したがって統計学的には信頼度はゼロです。二重、三重測定ならば平均値と標準誤差が計算できますので、測定値の95%信頼限界が判定できます。平均値の分布の形を示す標準誤差は試料数の平方根に反比例します。したがってレプリケートの数が多ければ平均値の信頼限界は狭くなり信用度は上がります。一方、標本の分布の形を示す標準偏差は試料数に関係なくほぼ一定なのですが、その信頼度は試料数に依存します。

次のグラフ（図2）は平均測定値を1、標準偏差を0.05（つまり相対標準偏差あるいは変動係数を5%）と仮定した時、測定の繰り返し、即ちウェルの数と求められた平均値の95%信頼区間を示したものです。シングルアッセイは論外ですが、二重アッセイでの平均値の信頼区間は上下約50%となります。三重測定で区間は上下10%強です。二重測定は最低限行うようにしましょう。

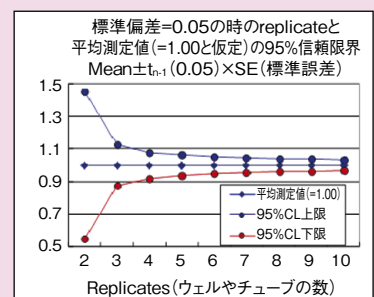


図2.

今回は、「第3回 ELISA の操作法とそのポイント（中編）」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。

The Gateway to qNMR

～定量 NMR への扉～

和光純薬工業株式会社 試薬化成品研究所 三浦 亨

第 1 話 qNMR 高精度化のはじまり

～プロローグ～

qNMR (quantitative Nuclear Magnetic Resonance) とは、日本語では定量 NMR と言われ、効率的に測定対象物質の物質量を測定できる手法であることから、昨今注目を集めています。このシリーズでは、ユーザーの皆様にご提供するとともに、我々の経験や公定法を含めた動向などについてもご紹介したいと思います。

qNMR 高精度化のはじまり

核磁気共鳴 (Nuclear Magnetic Resonance : NMR) スペクトルは、シグナルの化学シフト値、カップリングや分子内積分比などの情報から分子構造を推定することができるため、有機化学や天然物化学などの分野において、主に分子構造解析を目的とした定性分析に用いられてきました。¹H NMR スペクトル上に観察される個々の水素原子核 (プロトン) シグナルの面積比は、Fig. 1 に安息香酸の例を示したように分子上のプロトンの数比に比例します。

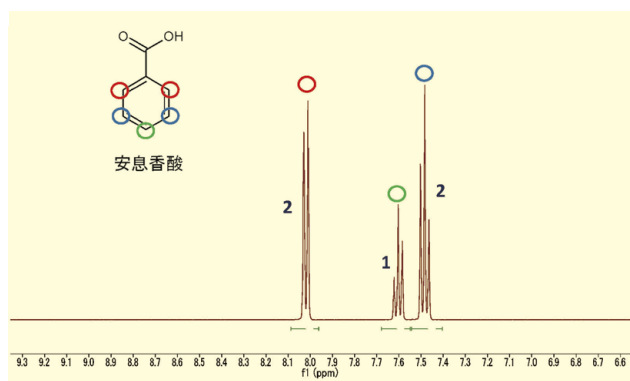


Fig. 1. 安息香酸の¹H NMR スペクトル

この現象は、分子内だけでなく分子間においても共通であることから、Fig. 2 に例示したように測定対象物質とは異なる濃度または純度既知の内標準物質 (qNMR 用基準物質) を添加した試料溶液を調製し、¹H NMR スペクトルを測定することによって、qNMR 用基準物質の濃度または純度を基準として、測定対象物質の濃度または純度をシグナル面積比の関係から迅速に測定することが可能です。qNMR は、個々の測定対象物質の分子が持つ吸光や蛍光などの物理特性を指標とせず、分子上のプロトンの量から物質量を求める方法であるため、試薬、残留農薬、天然物や食品添加物標準品などの精確な純度決定、標準品の存在しない物質の絶対定量などに応用が可能な手法です。

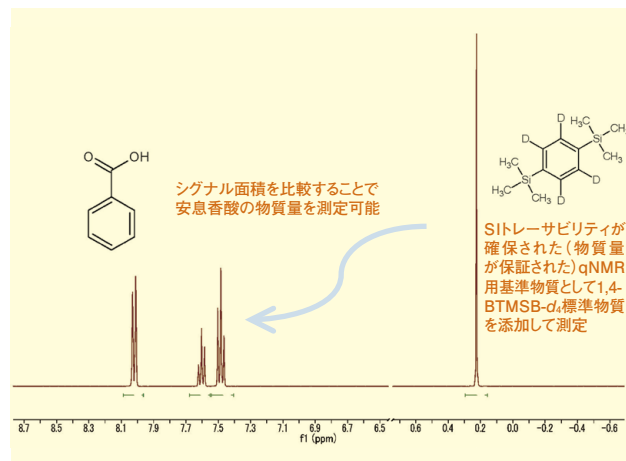


Fig. 2. qNMR 測定例

この原理を利用した「NMR による定量」(ここでは敢えて qNMR とは言いません。なぜなら精度が低かったからです) は、エヌ・エム・アラーと言われるいわゆる NMR 屋や合成者の方々の間では有機合成の収率確認などに古くから利用されてきましたが、正確な定量を行うための手法が確立されていなかったことや、測定に使用する qNMR に適した国際単位系 (SI) トレーサブル (この場合の SI は物質質量なので、要するに物質質量が正確に値付けされた) 基準物質などのインフラストラクチャーが未整備であったことから、その精度はお世辞にも良好とは言えず、高い精度が要求される実際の分析の現場において、いわゆる分析屋の方々には利用されることはほとんどありませんでした。

実は、物質質量測定法としての qNMR の高い効率性に最初に着目し高精度化を検討したのは、日本の計量計測分野における国家計量機関、つまりは産業技術総合研究所計量標準総合センター (National Metrology Institute of Japan : NMIJ) でした。彼らは、日本の国家標準物質 (National Standard) である NMIJ CRM の純度測定に qNMR を適用するために、測定条件などの高精度化にチャレンジしました。また、それとほぼ時を同じくして、医薬品や食品関連の公定法 (日本薬局方、食品添加物公定書) を策定する国立医薬品食品衛生研究所も qNMR の高い効率性に着目し公定法への適用を模索していました。その後、経済産業省と厚生労働省の二つの研究機関がタッグを組み、qNMR 高精度化のための共同研究に着手しました。この共同研究は、NMR 装置メーカーである日本電子株式会社、そして試薬メーカーである当社、和光純薬が加わり、4 機関オールジャパン体制でスタートしました。ちなみに、この共同研究は、参加者の間では「qNMR 会議」と言われていま



した。2009年には、この共同研究の枠組みに qNMR の界面活性剤への適用を検討していた花王株式会社に加わり、経済産業省の委託による基準認証研究開発事業「1 対多型校正技術の研究開発」が実施され、Fig. 3 に示したような qNMR 高精度化のためのインフラ整備が実施されました。

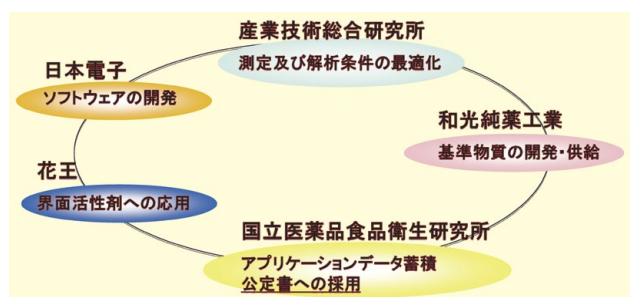


Fig. 3. qNMR のインフラ整備：5 機関共同研究

近年では、qNMR で高精度な定量が可能であることを示す測定例が複数報告されています¹⁻⁴⁾。実際に、生薬、食品添加物、残留農薬、アミノ酸、マイコトキシン及びマリントキシンなどは、これまで絶対純度を保証した標準物質や標準品の供給が困難でしたが、¹H qNMR を利用することによって、この問題が解決され、複数の国家計量機関や当社をはじめとした試薬メーカーから供給が開始されています。さらに、¹H qNMR 用に開発された SI トレーサブルな認証標準物質 (CRM : certified reference material) を qNMR 用基準物質として正確に添加した試料溶液を調製し、この試料溶液を ¹H qNMR 条件で測定することで、SI トレーサブルで高精度な定量値を得ることができる手法

として、AQARI (Accurate Quantitative nmR with Internal reference substance) 法が報告されています⁵⁻⁷⁾。日本薬局方や食品添加物公定書などの公定法では、純度や含有率を正確に測定するための定量法として、この AQARI 法を応用した ¹H qNMR の採用が既に開始されています⁸⁾。日本薬局方では生薬などの分野に限られていますが、既に 8 種の定量指標成分標品の純度決定に、また食品添加物公定書では、3 種の定量対象標品の純度決定に ¹H qNMR が採用されています。

このように ¹H qNMR は、従来のクロマトグラフィーとは原理が異なる革新的な定量法であり、SI トレーサブルで高精度な定量値を効率的に得ることができる方法であることから、医薬品や食品だけでなく、工業化学などの高精度な定量値が求められるさまざまな分野への応用が期待されています。

今回は、実際の測定法を中心にお話ししたいと思います。

【参考文献】

- 1) Pauli, G. F. *et al.* : *J. Med. Chem.*, **57**, 9220 (2014).
- 2) Yamazaki, T. *et al.* : *BUNSEKI KAGAKU*, **63**, 323 (2014).
- 3) Schoenberger, T. : *Anal. Bioanal. Chem.*, **403**, 247 (2012).
- 4) Watanabe, R. *et al.* : *Toxins*, **8**, Pii : F 294 (2016).
- 5) Tahara, M. *et al.* : *Environmental science*, **27**, 142 (2014).
- 6) Ohtsuki, T. *et al.* : *Talanta*, **131**, 712 (2014).
- 7) Kato, T. *et al.* : *Anal. Sci.*, **32**, 729 (2016).
- 8) Hosoe, J. *et al.* : *Pharmaceutical and Medical Device Regulatory Science*, **45**, 243 (2014).

Products



定量NMR用標準液

定量 NMR 法は、標準物質を基準として測定対象物質 (サンプル) の純度または濃度を評価する方法です。これまでの定量 NMR 用標準物質に加えて、内標準法に使用できる定量 NMR 用標準液をラインアップしました。

特長

- 定量 NMR 法による純度保証
- 標準物質の精密な秤量が不要
- 信頼性の証である不確かさを付与
- 外標準法の標準物質として使用することも可能



コード No.	品名	規格	容量	希望納入価格 (円)
041-33641	DSS-d ₆ Standard Solution (500mg/L Deuterium Oxide Solution)	☑ 定量 NMR 用	1mL × 5A	18,000
085-10161	Hexamethyldisilane Standard Solution (500mg/L Methanol-d ₄ Solution)	☑ 定量 NMR 用	1mL × 5A	18,000

上記以外にも、当社では、定量 NMR 用の試薬を取り扱っています。詳細は当社 HP をご覧ください。
(<https://labchem.wako-chem.co.jp/analysis/nmr/qnmr/>)

強塩基を発生するボレート型光塩基発生剤とその応用例

和光純薬工業株式会社 試薬化成品研究所 築場 康佑、酒井 信彦

1 はじめに

紫外線 (Ultra Violet, UV) を利用した化学反応は古くから知られており、さまざまな分野で広く応用されている。中でも、UV 照射によってラジカルや酸などの化学種を発生し、モノマーを重合もしくは架橋させて硬化樹脂を形成する技術は、電子産業、塗料、インキ、接着剤、封止材の分野で幅広く利用されている。硬化が迅速であるため生産効率を飛躍的に向上できることや、UV 照射部分にのみ選択的に微細な加工を施せるなどの理由から、今や産業界にはなくてはならない技術となっている。ここでは UV 照射によってアミンなどの塩基が発生する光塩基発生剤 (Photo Base Generator, PBG) とその応用について紹介する。

2 開発目的

エポキシモノマーを硬化させる場合、一般的にエポキシドとアミンの官能基数を揃えて使用直前に両者を混合する。もし上記を UV 硬化で実現する場合、大量のアミンを光潜在化させなければならず現実的ではない。一方、チオールやカルボン酸などの架橋剤を併用した場合、UV 照射によって塩基を発生できれば触媒的な硬化反応が可能となる。しかし、これまでの PBG では発生するアミンの塩基性が低く、硬化触媒として使用するには十分な機能を果たさなかった。そこで当社ではアルキルピグアニド (図 1) の強塩基性に着目し、PBG を開発している。

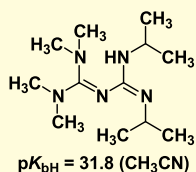


図 1. アルキルピグアニドの構造と塩基性度

3 WPBG-300

求核性の低いボレートアニオンとアルキルピグアニドを組合せた「WPBG-300 (図 2 内)」は各種エポキシモノマー中で高い保存安定性を示し、40℃で1ヶ月以上保存しても粘度の上昇を起こさない。またアントラセンやチオキサントンをはじめとする長波長に吸収を有する増感剤を併用することで、さまざまな波長域において WPBG-300 からアルキルピグアニドを発生できる (図 2)。WPBG-300 とチオールとエポキシの UV 硬化例を図 2 に示す。この UV 硬化反応では、UV を照射しただけでは組成物は硬化せず、80 ~ 120℃の加熱後にはじめて硬化する。この特長を活かし、WPBG-300 は UV 後硬化型接着剤として利用できる (図 3)。貼り合わせたい部材に組成物を塗布後、UV 照射しても樹脂はすぐには固まらないため、部材同士の位置を調整するワークタイムが得られ、塗工や貼り合わせに時間を要する大型の部材などの接着に利用でき

る。一方、光ラジカル発生剤を使用した一般的な UV 硬化反応では UV 照射だけで樹脂が硬化してしまうため、十分なワークタイムが得られない。また UV 後硬化接着剤は、加熱のみでは接着しないため、溶媒の揮発工程など露光前に加熱が必要な場合にも有効である。

4 WPBG-345

WPBG-300 は、架橋剤として多価カルボン酸を使用すると、酸によりボレート部位が分解してしまうため露光部・未露光部のコントラストが得られない。一方、電子吸引性基であるフッ素原子をボレートに導入した「WPBG-345」は耐酸性が高く、カルボン酸とエポキシの系でもコントラストが得られる (図 4)。

5 ボレート型 PBG に有効な増感剤

WPBG-345 をチオールとエポキシの系に適用した場合に WPBG-300 と比べ硬化速度が遅い。これは、WPBG-345 では酸に対する安定性が向上した

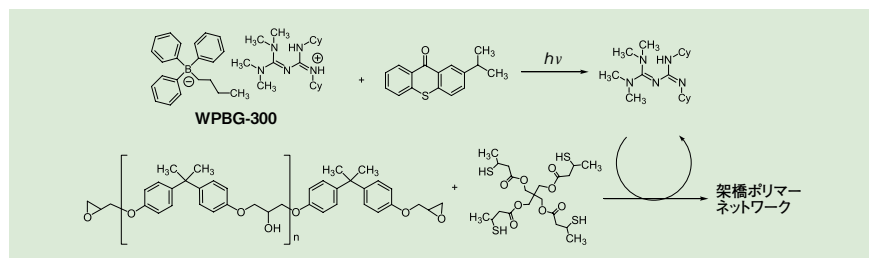


図 2. WPBG-300 を用いたエポキシとチオールによるアニオン UV 硬化
WPBG-300 (5 部)、2-インプロピルチオキサントン (1 部)、jER[®]828 (エポキシ等量 185、三菱ケミカル製) (100 部)、を混合後、加熱もしくは希釈剤で混合する。室温で、KarezMT[®]PE1 (SH 等量 138.5、昭和電工製) (70 部) を加え混合する。基板に塗布後、UV を 10 秒間照射し (面照度: 5mW/cm² (254nm)、100mW/cm² (365nm)、261mW/cm² (405nm))、120℃で 5 分間加熱する。

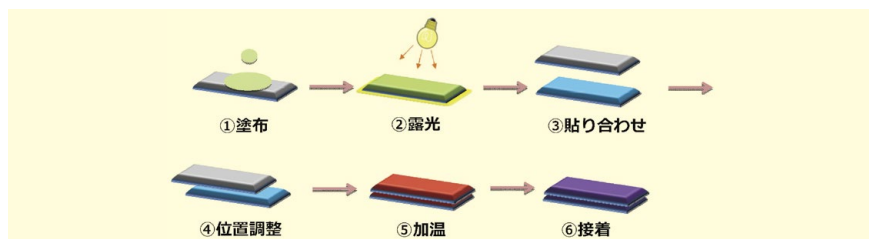


図 3. PBG を利用した後硬化接着

が、同時に光分解性も低下したことが原因である。WPBG-345 の光分解性は、組合わせる光増感剤の種類によって大きく異なる。2-エチルアントラキノンなどのアントラキノン骨格を有する化合物は WPBG-345 に対して高い光増感効果を示し、光分解性を向上させることができる。なお、WPBG-300 に対してもアントラキノン類を併用することで光分解性を向上できる (図5)。

6 おわりに

強塩基であるアルキルビグアニドを発生できる PBG は各分野で研究が進み、産業で利用されはじめています。当社では研究だけでなく工業化も進めている。アルキルビグアニドを発生させたことがない方には、是非とも当社の PBG を手に取ってもらい、その性能を体感して頂きたい。

架橋剤

ポリマー鎖同士を連結し、物理的・化学的性質を変化させる物質。

光増感反応

光増感剤が光を吸収して得たエネルギーを、反応すべき基質に渡すことで基質が反応すること。

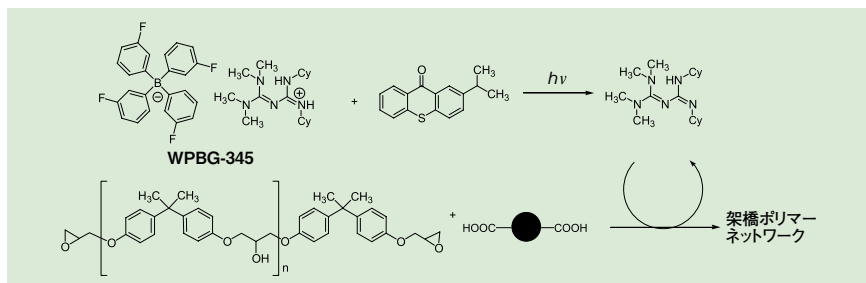


図4. WPBG-345 を用いたエポキシとカルボン酸によるアニオン UV 硬化

WPBG-345 (10部)、2-イソプロピルチオキサントン (2部)、jER®828 (エポキシ等量 185、三菱ケミカル製) (100部)、Joncryl®682 (OH等量 138、BASF ジャパン製) (64部)、 γ -ブチロラクトン (300部) を混合する。基板に塗布後、UV を 10 秒間照射し (面照度: 5mW/cm² (254nm)、100mW/cm² (365nm)、261mW/cm² (405nm))、150°C で 10 分間加熱する。

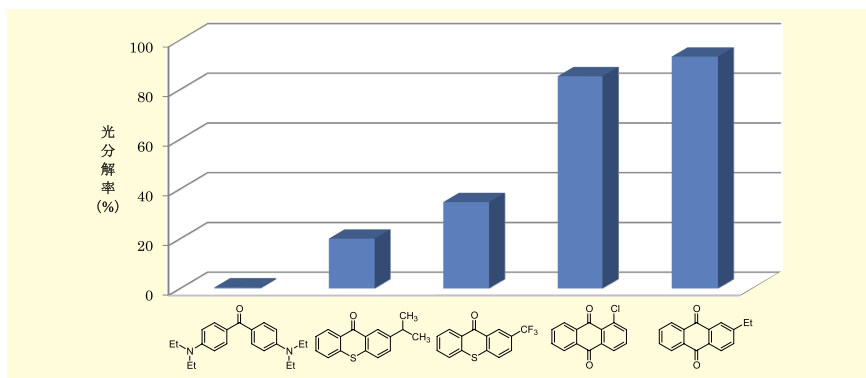


図5. 各種光増感剤を用いた場合の WPBG-345 の分解率

WPBG-345 (3.9 × 10⁻²mmol)、光増感剤 (0.5 当量) をアセトニトリル 50mL に溶解後、窒素でバブリングする。得られた溶液を石英セルに密封し、UV を 200 秒間照射後 (面照度: 5mW/cm² (254nm)、100mW/cm² (365nm)、261mW/cm² (405nm)) HPLC で分解率を測定する。

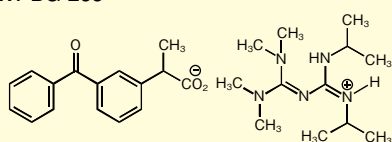
WPBG-345 につきましては現在開発中のため、お問合せは、当社化成品開発部までご連絡下さい。TEL : 03-3244-0305 E-mail : spec-chem@wako-chem.co.jp

Products

Wako CHEMICAL 株式会社ワコーケミカル

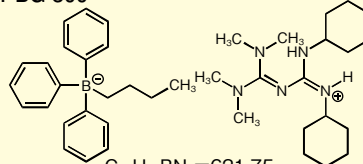
光塩基発生剤 WPBG シリーズ新製品

WPBG-266



C₂₈H₄₁N₅O₃=495.66
CAS No. 1632211-89-2

WPBG-300



C₄₀H₆₀BN₅=621.75
CAS No. 1801263-71-7

コード No.	品名	容量	希望納入価格(円)
NEW 355-44341	1,2-Diisopropyl-3-[Bis(dimethylamino)methylene]guanidium 2-[3-benzoylphenyl]propionate【WPBG-266】	5g	38,000
NEW 352-44351	1,2-Dicyclohexyl-4,4,5,5-tetramethylbiguanidium n-butyltriphenylborate 【WPBG-300】	5g	38,000

※ (株)ワコーケミカルは WPBG シリーズを上記 2 種以外にも取り揃えています。

メタ位選択的 C-H ほう素化配位子

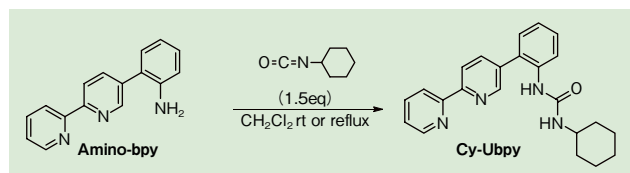
Cy-Ubpy

Amino-bpy

C-H 活性化反応は、通常、有機合成反応において不活性な C-H (炭素-水素) 結合を切断し、新たな結合生成を行う手法で、大変注目されています。このような反応は、工程数を減らすことができる反面、多くの C-H 結合の中から特定の C-H 結合のみを官能基化するため、反応の選択性が重要となります。

Cy-Ubpy* はアリール化合物を基質とし、カルボニル基を足掛かりにメタ位選択的ほう素化 [B(pin)] 反応が進行します。また、前駆体の Amino-bpy に対して、各種イソシアネート化合物を変更することで、Cy-Ubpy とは異なるウレア配位子を合成することが可能です。

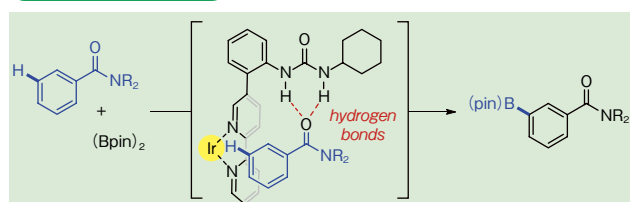
* Cy-Ubpy = Cyclohexyl-Urea bipyridine
(よみ：シクロヘキシル-ユービッピー)



特長

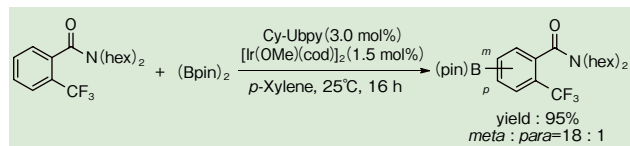
- 収率、位置選択性、共に優れた C-H ほう素化配位子

反応メカニズム



反応例

メタ位選択的 C-H ほう素化反応



【参考文献】

1) Kuninobu, Y., Ida, H., Nishi, M. and Kanai, M.: *Nat. Chem.*, **7**, 712 (2015).


コード No.	品名	規格	容量	希望納入価格 (円)
036-25221	Cy-Ubpy	有機合成用	250mg	14,000
032-25223			1g	40,000
027-19101	2-[(2,2'-Bipyridin)-5-yl]aniline 【Amino-bpy】	有機合成用	250mg	10,000
023-19103			1g	30,000

関連商品

オルト位選択的 C-H ほう素化配位子

コード No.	品名	規格	容量	希望納入価格 (円)
197-17451	Silica-SMAP	有機合成用	1g	18,000
193-17453			5g	70,000
194-17461	Silica-TRIP	有機合成用	1g	15,000
190-17463			5g	60,000

イリジウム触媒

コード No.	品名	規格	容量	希望納入価格 (円)
048-31831	Di-μ-methoxobis (1,5-cyclooctadiene) diiridium (I) 	有機合成用	250mg	8,500
044-31833			1g	23,000
042-31834			5g	照会

ガスボンベ不要!



酸性有機溶媒 (塩化水素ガス導入)

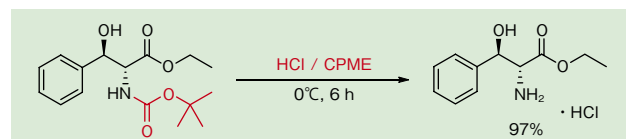
本品は、有機溶媒に塩化水素ガスを溶かして調製した酸性有機溶媒です。保護基の脱保護反応や塩酸塩の合成など強酸を用いる反応にお使い頂けます。

ご希望の容量、濃度、溶媒がございましたら特注の調製を承りますので当社営業員もしく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
- 医薬品や農薬の合成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) 	有機合成用	500mL	13,000
083-10405	Hydrogen Chloride, Ethyl Acetate Solution (abt. 4mol/L) 	有機合成用	500mL	9,800

: 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7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。

生体組織を透明化する革新的なアプローチ SCALEVIEW®-A2

宮脇敦史博士らにより、蛍光タンパク質の蛍光を損なうことなく簡便に生体組織を透明化する方法 Scale が開発されました。Scale は、水溶性透明化技術法です。

本品は、Scale の原理に基づき、処方された組織透明化試薬です。本品は、ホルマリンで固定された生体試料における光の吸収や蛍光タンパク質の蛍光を損なうことなく、光の散乱を除く働きを持つ水溶性の溶液で浸漬するだけで哺乳類動物の脳などの生体組織を透明化することが可能です。光学特性である屈折率 $n_e(20^\circ\text{C})$ は、1.377 ~ 1.381 です。

プロトコール例

透明化方法について、マウス脳を例に紹介します。

1. 固定

- ①マウスを 4% パラホルムアルデヒド(PFA)/PBS (pH 7.5 ~ 8.0) で灌流固定する。
- ②脳を取り出した後、4%PFA/PBS で固定(4℃、10 時間)し、20% スクロース /PBS に置換(4℃、24 時間)する。
- ③O.C.T. コンパウンドで包埋し、液体窒素で凍結する。
- ④凍結した脳を PBS で解凍・洗浄し、4%PFA/PBS で再固定する (室温、20 分間)。

2. 透明化処理

- ⑤固定された脳を本品中に浸漬する (室温)。

注意・ポイント

- 成体マウス脳 1 個につき本品を 30mL 以上ご使用下さい。
- 透明化には 1 週間以上必要です。浸漬中は、シェーカーなどでゆっくり振とうさせて下さい。また 1 日毎に本品を交換すると、透明化が進みやすくなります。
- 本品に浸漬することで、脳は 1 方向につきリニアに 10 ~ 30% 程度膨潤します。

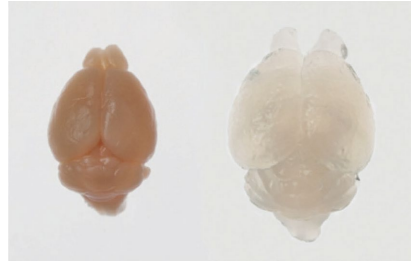
3. 観察

- ⑥処理した脳サンプルを 2 光子励起顕微鏡、オリンパス社製多光子専用対物レンズ: XLPLN25SVMP を用いて観察する。もしくは共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察する。

※観察終了後、脳を再び本品で浸漬し 4℃ で保存することが可能。

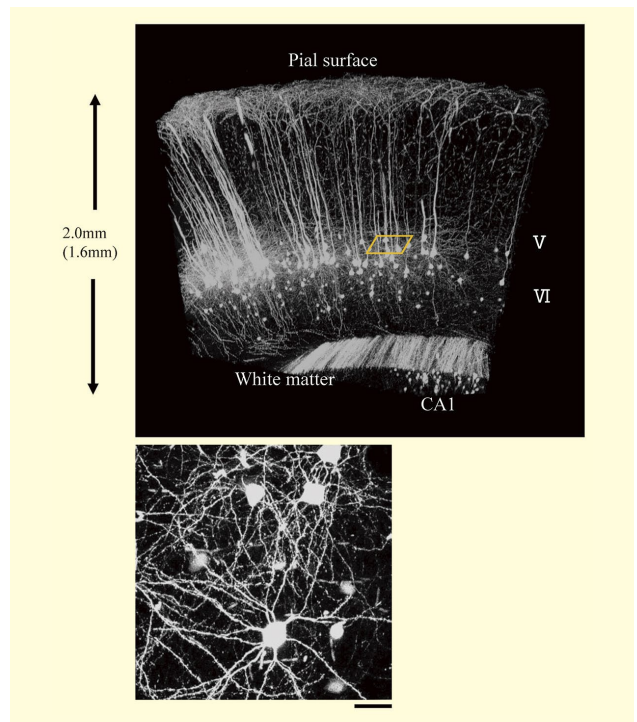
データ

SCALEVIEW®-A2 を用いたマウス脳の透明化例



左から順に、処理前マウス脳、本品に 2 週間浸漬したマウス脳

2 光子励起顕微鏡を用いて取得した Thy1-YFP-H マウス脳の深部観察画像



オリンパス社製多光子専用対物レンズ: XLPLN10XSVM を用いて観察した例。スケールバーは 50 μm 。

(データご提供: 理化学研究所 脳科学総合研究センター 細胞機能探索技術開発チーム 濱裕先生、宮脇敦史先生)
(協力: オリンパス株式会社)

【参考文献】

- 1) Hama, H. et al.: *Nat. Neurosci.*, **14**, 1481 (2011).

コードNo.	品名	規格	容量	希望納入価格(円)
193-18455	SCALEVIEW®-A2	組織透明化用	500mL	10,000

SCALEVIEW は、オリンパス株式会社の登録商標です。オリンパス株式会社より使用許諾を受けています。

生体試料の深部イメージングを実現

SeeDB

今井猛博士らにより、生体組織の形態や組成、蛍光タンパク質及び蛍光神経トレーサーの蛍光を損なうことなく短時間で簡単に脳などを透明化する方法 SeeDB (See Deep Brain) が開発されました。SeeDB は、水溶性透明化技術法です。

本品は、水とフルクトース、還元剤で構成されています。

SeeDB 法は、共焦点顕微鏡や 2 光子励起顕微鏡を使用して深部イメージングが可能であり、蛍光タンパク質・神経トレーサーを用いての蛍光神経回路の全貌解明や定量解析などさまざまなアプリケーションに利用することができます。

SeeDB 法に関する詳しい情報については、今井猛博士らによるウェブサイト SeeDB Resources (<https://sites.google.com/site/seedbresources/>) をご参照下さい。

プロトコール例

脊椎動物のさまざまな組織に対して使用することができますが、マウス脳を例に紹介します。

1. 固定

- ① マウス脳を 4% パラホルムアルデヒド/PBS で 4℃ で一晩固定する。
- ② サンプルを PBS で 3 回洗浄する (各 10 分間)。

2. 透明化処理

- ③ サンプルを 20mL の SeeDB : 20w/v% Fructose Solution が入った 50mL コニカルチューブに入れる。
チューブは室温下、ローテーターで 48 時間転倒回転する (約 4rpm)。脆弱なサンプルやスライスの場合にはシーソーシェーカーを用いても良い (約 17rpm)。
- ④ ~ ⑧ 処理液を下記の順で変更し、③と同様の操作を行う。
- ④ SeeDB : 40w/v% Fructose Solution (室温、4-8 時間)
- ⑤ SeeDB : 60w/v% Fructose Solution (室温、4-8 時間)
- ⑥ SeeDB : 80w/v% Fructose Solution (室温、12 時間)
- ⑦ SeeDB : 100w/v% Fructose Solution (室温、12 時間)
- ⑧ SeeDB (室温、24 時間)、最大 48 時間まで延長可能。
光にかざすと組織が透明になっていることを確認することができる。

3. 観察

- ⑨ SeeDB 処理した脳サンプルを共焦点レーザー顕微鏡もしくは 2 光子励起顕微鏡を用いて観察する。

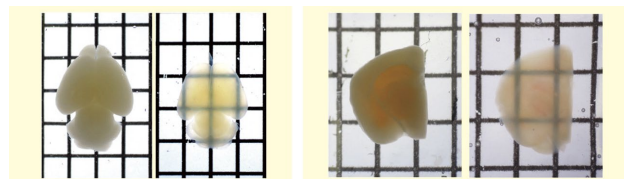
注意・ポイント

サンプルは SeeDB 液でマウントして下さい。本品を用いて透明化処理したサンプルの屈折率は 1.49 と高くなります。このため、対物レンズにはグリセリン浸レンズ、油浸レンズ、透明化用レンズが適していますが、水浸レンズでも深さ 2mm 程度

までであれば問題ありません。イメージングには各メーカー推奨のイメージング液をご使用下さい。SeeDB 液をイメージングに用いないで下さい。ドライレンズ (屈折率 1.0) や水浸レンズ (屈折率 1.33) を用いて画像取得する場合は、深さの数値を補正する必要があります (補正式については参考文献参照)。

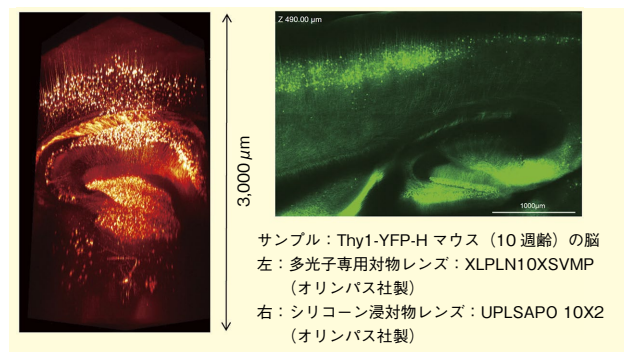
データ

SeeDB を用いた生体試料の透明化



左：新生仔マウス (生後 3 日) の全脳、右：成体マウス脳スライス (8 週齢、厚さ 2mm)

2 光子励起顕微鏡 (左) と共焦点顕微鏡 (右) による蛍光画像



サンプル：Thy1-YFP-H マウス (10 週齢) の脳
左：多光子専用対物レンズ：XLPLN10XSVMPO (オリンパス社製)
右：シリコン浸対物レンズ：UPLSAPO 10X2 (オリンパス社製)

(データご提供：理化学研究所 多細胞システム形成研究センター (理研 CDB) 感覚神経回路形成研究チーム 柯孟岑研究員、今井猛チームリーダー)

【参考文献】

- 1) Ke, M. T., Fujimoto, S. and Imai, T.: *Nat. Neurosci.*, **16** (8), 1154 (2013).
- 2) Ke, M. T., Fujimoto, S. and Imai, T.: *Bio-protocol* **4** (3), e1042 (2014).
- 3) Ke, M. T., and Imai, T.: *Curr. Protoc. Neurosci.*, **66**, unit 2.22.1 (2014).

コード No.	品名	規格	容量	希望納入価格 (円)
NEW 194-18441	SeeDB	組織透明化用	250mL	8,000
NEW 291-79601	SeeDB Trial Kit	組織透明化用	1Kit	30,000
NEW 193-18391	SeeDB:20w/v% Fructose Solution	組織透明化用	250mL	8,000
NEW 196-18401	SeeDB:40w/v% Fructose Solution	組織透明化用	250mL	8,000
NEW 193-18411	SeeDB:60w/v% Fructose Solution	組織透明化用	250mL	8,000
NEW 190-18421	SeeDB:80w/v% Fructose Solution	組織透明化用	250mL	8,000
NEW 197-18431	SeeDB:100w/v% Fructose Solution	組織透明化用	250mL	8,000

当社 HP にてイメージング動画など、データ多数ご紹介していますので、ご覧下さい。(http://www.wako-chem.co.jp/siyaku/product/life/SeeDB/index.htm)

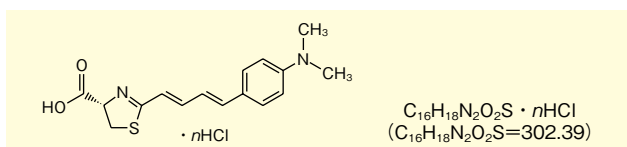
生体内深部イメージングを実現 **AkaLumine-HCl (アカルミネ™塩酸塩)**

本品は、670～680nmに発光ピークをもつルシフェリンアナログです。水、ヘモグロビンの吸収を受けにくい生体の窓に発光ピークをもつため生体深部の *in vivo* イメージングに適しています。

是非、イメージング実験にご活用下さい。

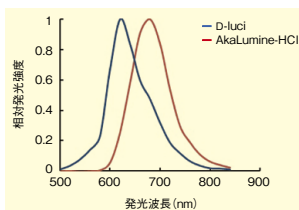
特長

- 近赤外発光基質： λ_{max} 675 nm
- 水・ヘモグロビンの吸収を受けにくく、*in vivo* イメージングに最適
- 従来品の AkaLumine よりも 50 倍以上の高い溶解性



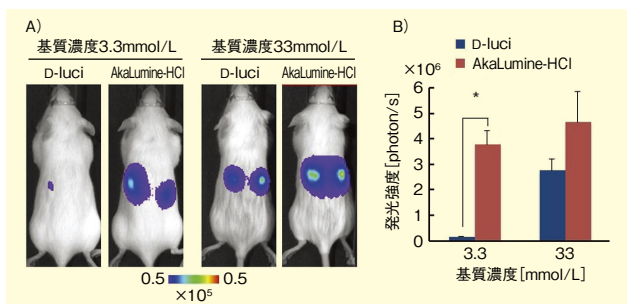
データ

発光スペクトル



LLC/lucの皮下腫瘍が形成されたマウスにD-luciferin (D-ルシフェリン) と AkaLumine-HCl (アカルミネ™塩酸塩) を投与し、生成された発光波長スペクトル

マウスを用いた *in vivo* イメージングデータ




- A) D-luciferin を投与して発光イメージを取得した4時間後に、同一個体に AkaLumine-HCl を投与した発光イメージング結果。
- B) LLC/lucの皮下腫瘍が形成されたマウスに、100 μ L の D-luciferin と AkaLumine-HCl を各基質濃度で腹腔内投与し、15分後に取得した発光イメージと腫瘍からの発光強度の定量解析 (n = 4, *P < 0.05)。

(データご提供：東京工業大学 生命理工学院 生命理工学系 ライフエンジニアリングコース 口丸高弘助教、近藤科江教授、電気通信大学大学院 情報理工学研究所 基盤理工学専攻 牧昌次郎助教)

【参考文献】

- 1) Iwano, S. et al.: *Tetrahedron*, **69**, 3847 (2013).
- 2) Kuchimaru, T. et al.: *Nature Communications*, **7**, 11856 (2016).

コードNo.	品名	規格	容量	希望納入価格(円)
012-26701	Aka Lumine <i>n</i> -Hydrochloride	生化学用	1mg	8,800
018-26703	[AkaLumine-HCl]		10mg	29,800

電子顕微鏡用ネガティブ染色試薬 **Na-Preyessler型リンタングステートカリウム塩**

Eu-Preyessler型リンタングステートカリウム塩

ネガティブ染色は、ウイルスなどを検出するための電子顕微鏡を用いた観察方法として知られています。

本品は、酢酸ウランなど従来のネガティブ染色に使用されている化合物の代わりに使用可能です。

特長

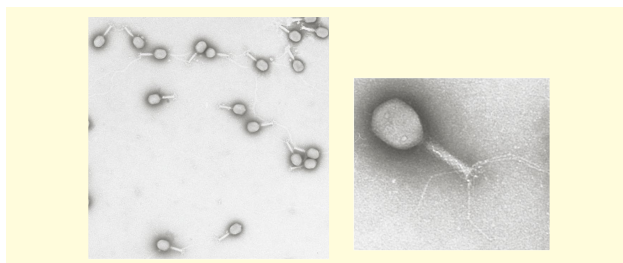
- 酢酸ウランと同等の染色性能
- pH調整などの必要なし
- 規制化合物の心配なし

プロトコル例

1. サンプルを水または緩衝液に溶解
Na-Preyessler型リンタングステートカリウム塩、Eu-Preyessler型リンタングステートカリウム塩は水や緩衝液に溶解すると中性になります。水に溶かすだけで使用できます(水に溶かしてpHメーターで測るとpH 5～7程度)。pHをあわせて染色をしたい場合は、pHをあわせた緩衝液を用いることもできます。
2. 従来のネガティブ染色方法に基づいて染色/観察
試薬濃度は、0.3～0.5 w/w%程度を推奨します。濃度が高いと染色剤の結晶が見える割合が増え、対象物が見える割合が減ります。対象物の周りに結晶が付きすぎている場合は濃度を下げることをおすすめします。また、Eu-Preyessler型リンタングステートカリウム塩はNa-Preyessler型リンタングステートカリウム塩と比較すると、TEMグリッド中できれいにウイルスが見えている範囲が広がる傾向があります。

データ

Na-Preyessler型リンタングステートカリウム塩 (0.3 w/w%) 水溶液を用いたネガティブ染色例



(データご提供：広島大学大学院工学研究科 物質化学工学部門 定金正洋准教授)

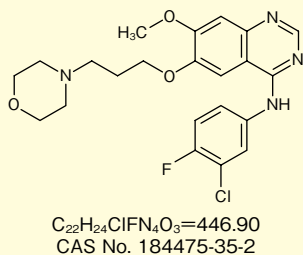
コードNo.	品名	規格	容量	希望納入価格(円)
169-27881	Potassium Na-encapsulated	電子顕微鏡用	100mg	12,000
165-27883	Preyessler-type Phosphotungstate	鏡用	500mg	40,000
166-27891	Potassium Eu-encapsulated	電子顕微鏡用	100mg	22,000
	Preyessler-type Phosphotungstate			

EGFR チロシンキナーゼ阻害剤 Wako ゲフィチニブ

本品は、上皮成長因子受容体 (EGFR) チロシンキナーゼの選択的な阻害剤です。がん細胞で過剰発現している EGFR が、がん細胞の増殖に関与しているため、EGFR チロシンキナーゼ阻害剤は、がんの治療薬として研究されています。ゲフィチニブは、EGFR チロシンキナーゼの自己リン酸化を阻害し、がん細胞の増殖に関するシグナル伝達を抑制することで、がん細胞の増殖を抑制すると考えられています。野生型 EGFR と比べ、変異型 EGFR に対して、より低濃度で阻害活性を示します。


製品概要

- 外観：白色～わずかにうすい褐色、結晶性粉末～粉末
- ジメチルスルホキシド溶状：試験適合
- 含量 (HPLC)：98.0%以上
- IC₅₀ = 0.033 μmol/L (*in vitro*, A 431 細胞膜分画)¹⁾



【参考文献】

- 1) Wakeling, A. E. *et al.* : *Cancer Res.*, **62**, 5749 (2002).
- 2) Lynch, T. J. *et al.* : *N. Engl. J. Med.*, **350**, 2129 (2004).

コード No.	品名	規格	容量	希望納入価格 (円)
078-06561	Gefitinib 	薬理研究用	500mg	12,500

その他の EGFR チロシンキナーゼ阻害剤は、当社 HP をご覧ください。<http://www.wako-chem.co.jp/siyaku/product/life/Gefitinib/index.htm>

神経膠腫の免疫染色による分子分類ツール Wako 抗 ATRX, モノクローナル抗体

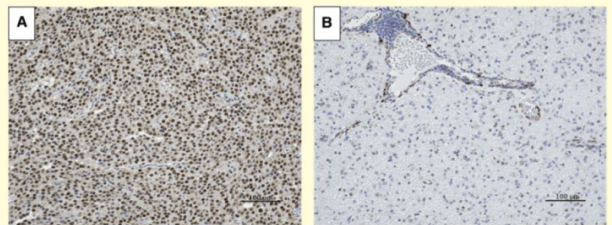
本品は、ATRX タンパク質を認識する抗体です。ATRX (α-Thalassemia/mental retardation syndrome X-linked) 遺伝子の変異は神経膠腫の腫瘍型分類のうち星細胞腫で認められる変異です。遺伝子変異を ATRX タンパク質発現量低下として検出できるため、シークエンスによる遺伝子変異検出の代替法として免疫組織染色によるタンパク質の検出が注目されています。

製品概要

- クローン No. AMab-6
- 免疫動物：マウス
- 抗体サブクラス：IgG1・κ
- 抗体濃度：約 1 mg/mL (製品ラベルに記載)
- 適用：ウエスタンブロット (1 μg/mL～)
免疫組織染色 (1～5 μg/mL)
ELISA (1 μg/mL～)

※実験系ごとに最適使用濃度をご検討下さい。

データ




A : 乏突起膠腫, IDH 変異 [WHO grade II]
B : びまん性星状細胞腫, IDH 変異 [WHO grade II]
一次抗体：3μg/mL 抗 ATRX, モノクローナル抗体
二次抗体：抗マウス IgG HRP 標識
検出：DAB, 対比染色：ヘマトキシリン



切片 A は ATRX 遺伝子変異がなく、本品により免疫組織染色陽性を示した。切片 B は ATRX 遺伝子変異があり、ATRX 発現が消失している。本品により免疫組織染色陰性を示した。正常細胞である血管内皮細胞が本品により染色された。
(データご提供：東北大学大学院医学系研究科 加藤幸成先生)

【参考文献】

- 1) Ogasawara, S. *et al.* : *Monoclon. Antib. Immunodiagn. Immunother.*, **35**, 254 (2016).

コード No.	品名	規格	容量	希望納入価格 (円)
017-26751	Anti ATRX, Monoclonal Antibody (AMab-6) 	免疫化学用	100μg	40,000

関連商品

コード No.	品名	規格	容量	希望納入価格 (円)
018-24081	Anti IDH1-R132H, Monoclonal Antibody (HMab-1) 	免疫化学用	100μg	34,000
013-26851	Anti IDH1-R132H, Monoclonal Antibody (HMab-2) 	免疫化学用	100μg	40,000

当社では上記の他に、神経膠腫で生じる遺伝子変異を免疫組織学的手法で検出する抗体を取り揃えています。詳細は当社 HP をご覧ください。(http://www.wako-chem.co.jp/siyaku/product/life/IDH/index.htm)

神経変性疾患などに



抗アミロイド前駆体タンパク質, モノクローナル抗体 (3E9)

抗ヒトアポリポタンパク質 E4, モノクローナル抗体 (1F9)

神経変性疾患の研究にご使用頂ける抗体をラインアップしました。

神経マーカーとして用いられる抗体、神経変性疾患に関係する因子を認識する抗体を取り揃えています。

特長

- ウエスタンブロットや免疫染色に使用可能
- お求めやすい少量包装 (10 μ L) あり

■ 抗アミロイド前駆体タンパク質, モノクローナル抗体 (3E9)

アミロイド β の前駆体タンパク質 (APP) は、神経の修復と成長に関与します。APP は、 α セクレターゼ及び β セクレターゼによって切断されます。 β セクレターゼが APP を切断すると、アルツハイマー病の原因物質であるアミロイド β を産生します。本品は、ヒト及びマウスのアミロイド前駆体タンパク質を認識するモノクローナル抗体です。

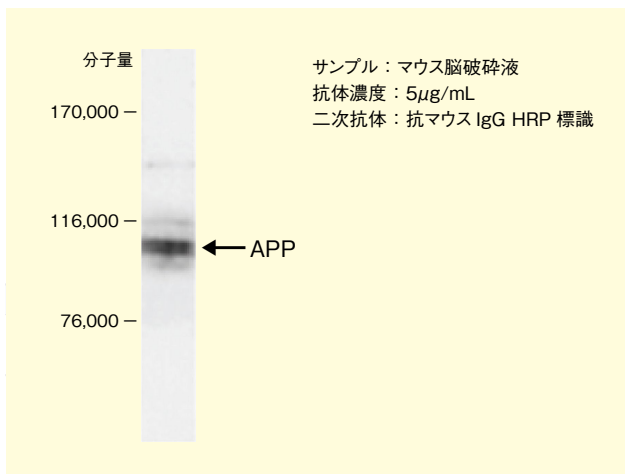
製品概要

- クローン No. 3E9
- 免疫動物：マウス
- 適応：ウエスタンブロット
- 交差性：ヒト、マウス

〔同クローン使用文献〕

1) Sakai, T. and Hohjoh, H.: *Cell Biol. Int.*, **30**, 952 (2006).

使用例



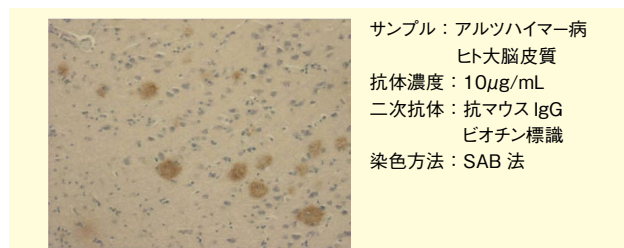
■ 抗ヒトアポリポタンパク質 E4, モノクローナル抗体 (1F9)

アポリポタンパク質 E (ApoE) は分子量約 34,000 からなる分泌タンパク質で、リポタンパク質を構成している主要なアポリポタンパク質の一つです。ApoE は、コレステロール輸送やリポタンパク質の代謝などに関与します。ApoE には、E2、E3、E4 の3つのアイソフォームが存在し、ApoE4 は、アルツハイマー病のリスク、病態などに関与していることが報告されています。本品は、ApoE4 を認識するモノクローナル抗体です。

製品概要

- クローン No. 1F9
- 免疫動物：マウス
- 適応実験：ウエスタンブロット、免疫組織染色
- 交差性：ヒト

使用例



コード No.	品名	規格	容量	希望納入価格 (円)
014-27241	Anti Amyloid Precursor Protein, Monoclonal Antibody (3E9) [F°]	免疫化学用	10 μ L	10,000
010-27243	Anti Human Apolipoprotein E4, Monoclonal Antibody (1F9) [F°]	免疫化学用	50 μ L	30,000
018-27261	Anti Human Apolipoprotein E4, Monoclonal Antibody (1F9) [F°]	免疫化学用	10 μ L	10,000
014-27263	Anti Human Apolipoprotein E4, Monoclonal Antibody (1F9) [F°]	免疫化学用	50 μ L	30,000

関連商品

神経変性疾患関連抗体

コード No.	品名	規格	容量	希望納入価格 (円)
010-27341	Anti Parkin, Monoclonal Antibody (Par6) [F°]	免疫化学用	10 μ L	10,000
016-27343	Anti Parkin, Monoclonal Antibody (Par6) [F°]	免疫化学用	50 μ L	30,000

神経マーカー抗体

コード No.	品名	規格	容量	希望納入価格 (円)
015-27271	Anti Drebrin, Monoclonal Antibody (M2F6) [F°]	免疫化学用	10 μ L	10,000
011-27273	Anti Drebrin, Monoclonal Antibody (M2F6) [F°]	免疫化学用	50 μ L	30,000
012-27281	Anti GFAP, Monoclonal Antibody (MO389) [F°]	免疫化学用	10 μ L	10,000
018-27283	Anti GFAP, Monoclonal Antibody (MO389) [F°]	免疫化学用	50 μ L	30,000
012-27301	Anti Human Phosphorylated GFAP S8, Monoclonal Antibody (YC10) [F°]	免疫化学用	10 μ L	10,000
018-27303	Anti Human Phosphorylated GFAP S8, Monoclonal Antibody (YC10) [F°]	免疫化学用	50 μ L	30,000
016-27321	Anti Human Phosphorylated GFAP S13, Monoclonal Antibody (KT13) [F°]	免疫化学用	10 μ L	10,000
012-27323	Anti Human Phosphorylated GFAP S13, Monoclonal Antibody (KT13) [F°]	免疫化学用	50 μ L	30,000
019-27291	Anti Pax6, Rabbit [F°]	免疫化学用	10 μ L	10,000
015-27293	Anti Pax6, Rabbit [F°]	免疫化学用	50 μ L	30,000
013-27331	Anti Synaptophysin, Monoclonal Antibody (171B5) [F°]	免疫化学用	10 μ L	10,000
019-27333	Anti Synaptophysin, Monoclonal Antibody (171B5) [F°]	免疫化学用	50 μ L	30,000

☐²…2~10℃保存 ☐^F…-20℃保存 ☐⁸⁰…-80℃保存 ☐¹⁵⁰…-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7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。

ヒト iPS 細胞由来神経細胞/プルキンエ細胞の培養に Wako 神経細胞用培地

本品は、ラット、マウスの初代神経細胞用無血清培地で、中枢神経系細胞の培養に最適化されています。

本品を用いてヒト iPS 細胞由来神経細胞を培養するとドーパミン神経分化誘導法による分散培養 14 日目（分化誘導後 42 日目）において成熟した神経細胞が得られ、Ca²⁺ イメージングにおいて自立的な活動を行う細胞が確認できました。

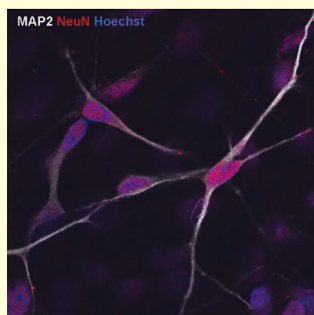
*本品はラットグリア細胞培養上清を含有しています。

特長

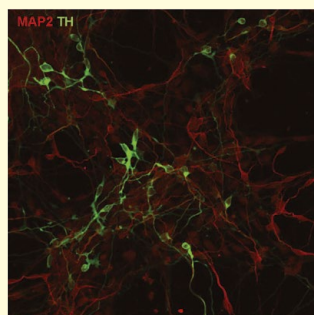
- ヒト iPS 細胞由来神経細胞やプルキンエ細胞の培養が可能
- Ca²⁺ イメージングにおいて自立的な活動を行うヒト iPS 細胞由来神経細胞の培養が可能

データ

■ ヒト iPS 細胞由来神経細胞の成熟度確認：各種マーカー染色
 〈ドーパミン神経分化誘導法による分散培養 14 日目（分化誘導後 42 日目）〉



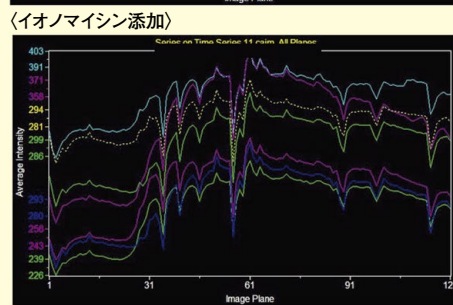
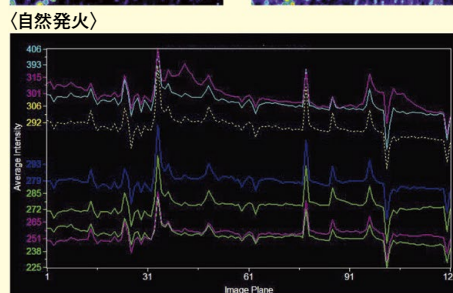
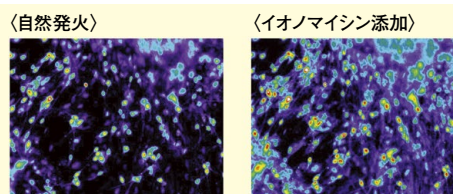
白：MAP2
 (樹状突起のマーカー)
 桃色：NeuN
 (成熟神経細胞の核のマーカー)
 青：Hoechst
 (細胞の核のマーカー)



赤：MAP2
 (樹状突起のマーカー)
 緑：TH
 (ドーパミン作動性ニューロンのマーカー)

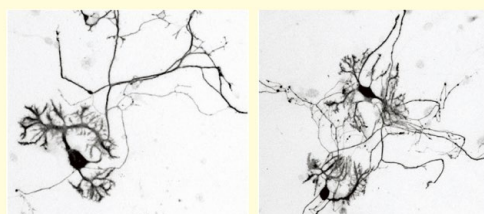
本品を用いて培養したヒト iPS 細胞由来神経細胞は NeuN 染色されることから成熟した神経細胞であると確認できた。(上)ドーパミン神経分化誘導法により得られた TH 陽性細胞の維持培養においても神経細胞の生存率が向上した。(下)
 (データご提供：東京慈恵会医科大学 再生医学研究部 岡野ジェイムス洋尚教授、坊野恵子先生)

■ ヒト iPS 細胞由来神経細胞の生理的機能検証 (Ca²⁺ イメージング)
 〈ドーパミン神経分化誘導法による分散培養 14 日目（分化誘導後 42 日目）〉




本品を用いて培養したヒト iPS 細胞由来神経細胞の中に Ca²⁺ イメージングにおいて自立的な活動を行う細胞が確認できた。
 (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、坊野恵子様)

■ マウスプルキンエ細胞の培養
 〈培養 14 日目〉



細胞数：0.1×10⁶ cells/well (妊娠 18 日目マウスの胎児海馬より分散)
 培養スケール：500 μL/well (ポリリジンコートガラスボトムディッシュ)
 培養条件：終濃度 1nmol/L Triiodothyronine を添加

本品に終濃度 1 nmol/L の濃度で Triiodothyronine を加え、培養したプルキンエ細胞は Calbindin 陽性であり、また、樹状突起の伸展が見られた。
 (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教授、小川優樹先生)


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

 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7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。

ヒートショック不要の大腸菌コンピテントセル ニッポン・ジーン ECOS™ Competent *E. coli*

本品は、SOC 培地での回復培養を必要とせず^{※1}、短時間で形質転換を行うことができる画期的なコンピテントセルです。2004年に発売以来、長年多くのお客様にご愛顧頂いています。今回は新たに、従来の「1分間プロトコル」からヒートショックを除いた新プロトコルをご紹介します。

特長

- ヒートショック不要の新プロトコルが登場 
- 1分間プロトコルで高速に形質転換が可能^{※1}
- 6分間プロトコルで高効率に形質転換が可能^{※1}
- 凍結融解に対する高い耐性^{※2}
- 従来品よりも形質転換効率が落ちにくい

※1. 薬剤にアンピシリンを使用する場合に有効です。

※2. 一度の凍結融解（再凍結）では形質転換効率はほとんど低下しません。ただし、凍結融解の繰り返しは形質転換効率の大幅な低下の原因となります。

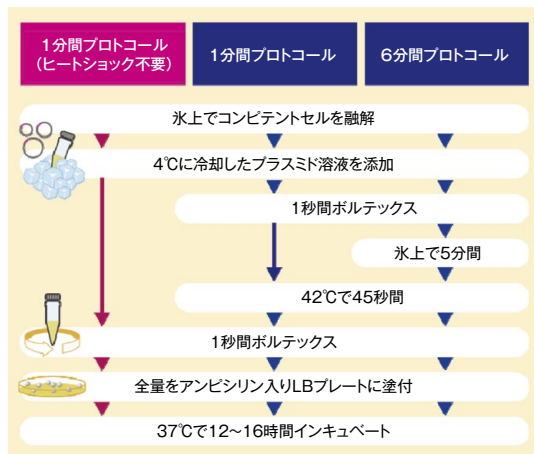
形質転換効率

ECOS™ 1分間プロトコルを以下の条件で実施した場合

- DH5α, JM109, XL1-Blue $\geq 1 \times 10^7$ (cfu/ μ g pUC 19 DNA)
- BL21 (DE3) $\geq 1 \times 10^6$ (cfu/ μ g pUC 19 DNA)

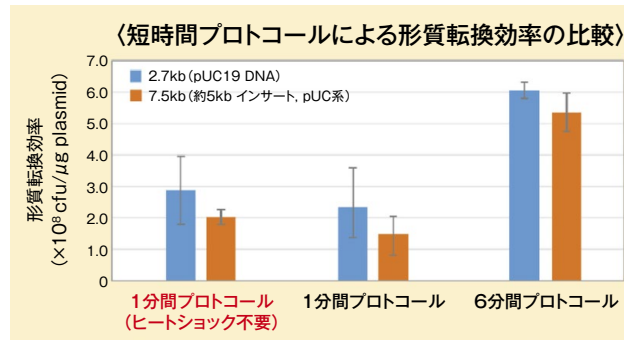
操作概要

従来の1分間プロトコルからヒートショック（42℃でのインキュベート）を除いた新プロトコルでは、ウォーターバスなどを用意する手間もなくなり、さらに簡単・迅速な操作が可能です。また、形質転換効率は従来の1分間プロトコルとほぼ同等です。



データ

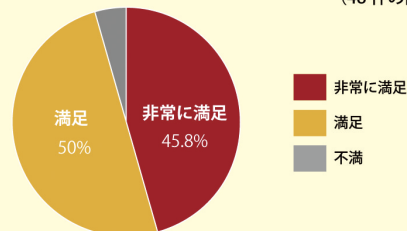
形質転換効率









ECOS™ Competent *E. coli* DH5α を「1分間プロトコル（ヒートショック不要）」、「1分間プロトコル」、「6分間プロトコル」で、pUC19 DNA (2.7 kb) と pUC 系プラスミド DNA (7.5 kb) を用いて形質転換を行った (n=3)。「1分間プロトコル（ヒートショック不要）」は、ヒートショックを行う従来の「1分間プロトコル」と同等の効率が得られた。

ECOS™ 新プロトコルの評価結果

Q. 「1分間プロトコル（ヒートショック不要）」の結果にご満足頂けましたか？
(48件の回答)



ECOS™ 体験キャンペーンを行い、新プロトコルの評価結果について伺った。アンケートの結果、95%の方が「非常に満足」または「満足」と答えた。

コードNo.	品名	容量	希望納入価格(円)
310-06236	ECOS™ Competent <i>E. coli</i>	50 μ L×40本	40,000
316-06233	ECOS™ Competent <i>E. coli</i> DH5α 	100 μ L×20本	36,000
314-06234	ECOS™ Competent <i>E. coli</i> DH5α	100 μ L×80本	132,000
312-07031	ECOS™ Competent <i>E. coli</i> DH5α-Jumbo Pack 	500 μ L×6本	39,000
317-06246	ECOS™ Competent <i>E. coli</i>	50 μ L×40本	40,000
313-06243	ECOS™ Competent <i>E. coli</i> JM109 	100 μ L×20本	36,000
311-06244	ECOS™ Competent <i>E. coli</i> JM109	100 μ L×80本	132,000
317-06523	ECOS™ Competent <i>E. coli</i>	100 μ L×10本	24,000
315-06524	ECOS™ Competent <i>E. coli</i> XL1-Blue 	100 μ L×20本	44,000
314-06533	ECOS™ Competent <i>E. coli</i>	100 μ L×10本	27,000
312-06534	ECOS™ Competent <i>E. coli</i> BL21 (DE3)  	100 μ L×20本	50,000

※ ECOS™ Competent *E. coli* BL21 (DE3) はカルタヘナ法該当品です。



Sf9細胞への遺伝子導入データ

ScreenFect™A、ScreenFect™A plusを用いたSf9細胞への遺伝子導入実績及びプロトコールをご紹介します。
PSFM-J1培地を用いた場合の最適化された試薬比率を記載しますので、ご覧下さい。

■ Sf9細胞へのトランスフェクションプロトコール例

ここでは、PSFM-J1培地ワコー、液体を使用した24ウェルスケールでの遺伝子導入プロトコール例の一部を紹介いたします。本プロトコールの完全版は、当社データベースをご参照下さい。(http://db.screenfect.jp/ja/documents/list/protocol)

〈使用試薬 & 器具〉

- ・ Sf9細胞： 2×10^5 cells/mL
- ・ PSFM-J1培地ワコー、液体（コード No. 160-25851） 1mL
- ・ 発現ベクター：1 μ g（例：pIEx/Bac-1 GFPベクター）
- ・ ScreenFect™A plus（コード No. 293-77101）
or ScreenFect™A（コード No. 293-73201）
- ・ 24ウェルプレート
- ・ 滅菌済みチップなど

〈細胞懸濁液の調製〉

2×10^5 cells/mLとなるように調製された細胞懸濁液 1mL を用意し、チューブへ分注する。

ポイント

- ・ PSFM-J1培地を使用量分小分けし、 $27^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ に温める。 30°C を超えてしまうと、昆虫細胞にダメージを与えてしまう。
- ・ 振とう培養を行っている場合、培養中の昆虫細胞懸濁液の細胞数をカウントする。静置培養を行っている場合、マイクロピペット(1000 μ L)などで細胞をフラスコ/プレートから剥がし、適当量の温めたPSFM-J1培地で懸濁する。懸濁後、 $300 \times g$ で2分間(室温)遠心し、上清を除去後、適当量の温めたPSFM-J1培地で懸濁する。懸濁後、細胞数をカウントする。
- ・ 振とう培養を行っている細胞は、対数増殖期の細胞を使用することが望ましい。一方、静置培養を行っている細胞は、70~80%程度のコンフルエントとなった対数増殖期の状態を使用することが望ましい。

〈トランスフェクション試薬の調製〉

1.0 μ LのScreenFect™A reagentまたはScreenFect™A plus reagentと、1.0 μ gのプラスミドDNAが50 μ LのScreenFect™ Dilution Buffer（もしくは、PSFM-J1培地）に含まれるようにDNA-lipid complexを作製する。作製後、 $27^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ にて20分間インキュベーションを行う。

〈トランスフェクション〉

用意しておいた細胞懸濁液 1mLに、DNA-lipid complexを全量添加し、ピペティングでよく混合して、全量を24ウェルプレートに播種する。

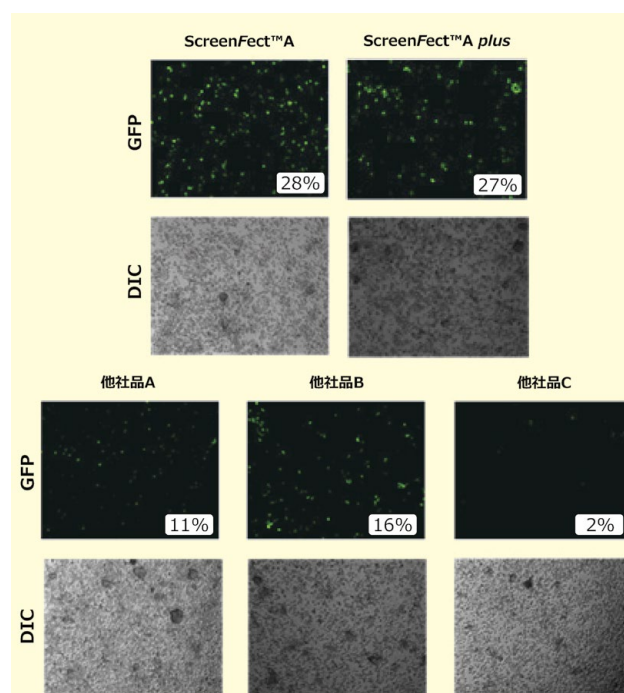
ポイント

- ・ 激しいピペティングは細胞にダメージを与える原因になるため、マイクロピペット(1000 μ L)などで2~5回程度のマイルドな混合を行う。

- ・ トランスフェクション後の培地交換は不要。
- ・ トランスフェクション後 day2~day6程度までサンプリングを行い、ウエスタンブロットなどで発現を確認し、発現量が最大になるポイントをご検討下さい。

■ 実験データ

Sf9細胞ヘリバーストランスフェクション(1-STEP)でGFP発現ベクターの導入を行い、蛍光顕微鏡及びFACS解析にて導入遺伝子の導入効率を比較しました。



細胞数： 2×10^5 cells/well (24ウェルプレート)
 プラスミドDNA量：1 μ g/assay
 トランスフェクション試薬混合比率：
 pDNA量(μ g)：各トランスフェクション試薬(μ L) = 1:1
 DNA-lipid complex形成時間：20分
 検出時間：トランスフェクション後48時間
 備考：ScreenFect™A reagent、ScreenFect™A plus reagentはScreenFect™添付バッファーで希釈した。他社品は、他社品推奨バッファーで希釈した。プラスミドDNAは各推奨バッファーで希釈した。

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			1mLx5	140,000
293-73201	ScreenFect™A	遺伝子研究用	0.2mL	8,000
299-73203			1mL	30,000
297-73204			1mLx5	120,000

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

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7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。

赤堀 四郎 (1900. 10. 20. ~ 1992. 11. 3)

大阪大学名誉教授 鈴木 不二男

生い立ち

赤堀四郎先生は明治33年(1900)10月20日に遠州灘の荒波が轟く静岡県大東町において、教育者であられた赤堀秀雄氏の四男としてお生まれになった。明治33年と言えば、19世紀最後の年に当たり、2か月後には20世紀が明けるといふ象徴的な年であった。先生のご回想によると、明治43年、10歳のときに早朝の4時に起こされ、眠い眼をこすりながら、東の明け方の地平線に輝くハレー彗星をご覧になったとのことである。お父上は漢文の先生であられたが、キューリー夫人のラジウムの発見や池田菊苗博士の味の素(グルタミン酸ナトリウム)の発見、鈴木梅太郎博士のオリザニン(ビタミンB₁)の発見などの話をされておられたとのことである。一方、母方の祖父は村で養蚕を指導された功労者であられた。母上は後に文化勲章を受章されたご子息、四郎先生の栄光をも見届けられた後に芦屋市のご自宅で白寿(99歳)を全うされた。

研究生活のはじまり

赤堀先生は千葉医学専門学校・薬学科で学ばれておられたときに中国人留学生の張 徳周さんに教わった言葉「雪埋梅花 不能埋香」(雪、梅花を埋むるも、香を埋むる能わず)(写真1)という言葉がお好きで、これを座右の

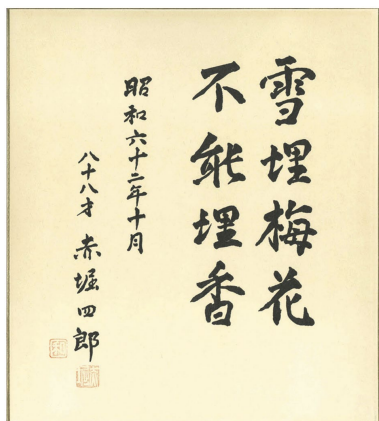


写真1. 座右の銘



写真2. 文化勲章ご受章

銘にされていた。先生は大正10年に同学科を卒業された後に東京帝国大学理学部化学科で西沢勇志智先生の研究助手になられ、トリモチの主成分であるフィトステリンの研究に取り組みました。この時代に先生は池田菊苗博士の化学通論の講義を聴講されている。池田博士と言えば、日本料理の伝統の味をつくる昆布の「うま味」がグルタミン酸ナトリウムであることを発見され、その大量生産に成功されて、「味の素」の商品名で売り出されたことで有名である。この時代の日本の化学における優れた発見として有名な業績としては、高峰讓吉博士の消化酵素：タ

カジアスターゼの発見と、鈴木梅太郎博士の脚気の特効薬、オリザニンがある。しかし、フィトステリンの研究は難航したので有機化学を勉強し直そうということになり、当時、日本の有機化学のメッカとされていた東北帝国大学理学部化学教室の眞島利行教授の研究室に内地留学され、その翌年、本人の希望や周囲からの勧めもあり東北帝国大学に入学し、眞島研の学生となられた(写真3)。眞島先生から与えられたテーマは「醤油の香気成分に関する研究」であった。大豆と麦あるいは米を蒸して麴を加えて発酵により生成される醤油に含まれる様々な香気成分を精製して同定することは、当時としては大変困難な仕事であった。様々な努力の結果、香気成分の一つとして同定されたのが硫黄を含んだメチオノールであった。このメチオノールの発酵中間体である硫黄を含んだアルデヒド(メチオナル)が、醤油の香気成分であることを突きとめられた。この研究が実を結んで「イミダゾール誘導体に関する研究」で理学博士の学位を授与された。

留学

赤堀先生はその後、昭和7年(1932)にチェコスロバキア(プラハ)のドイツ大学に留学された。プラハでは

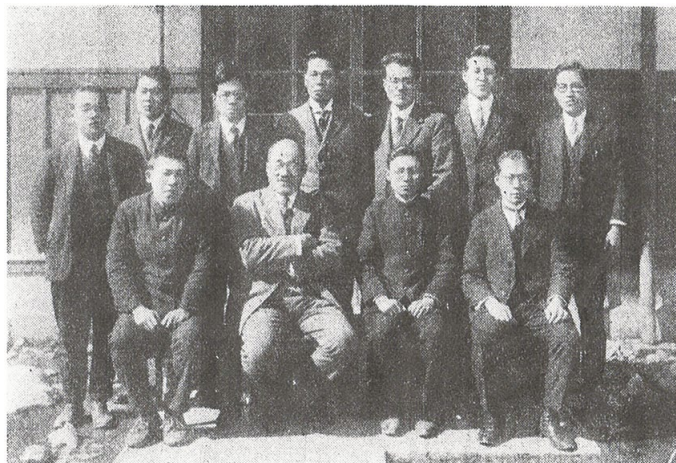


写真3. 大正15年眞島研(後列右端)
(眞島利行先生「遺稿と追憶」より)

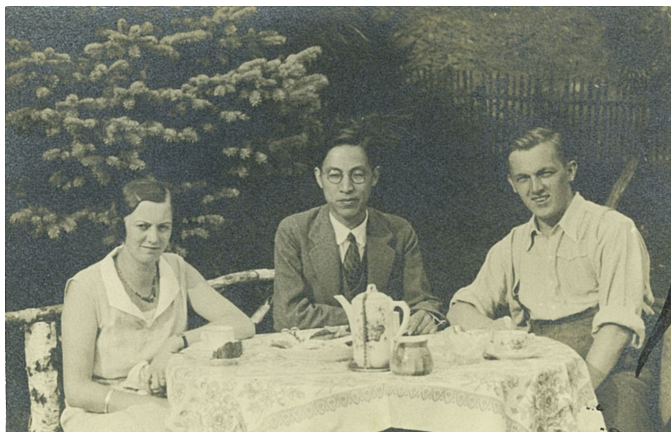


写真4. プラハ留学中

Waldschmidt-Leitz 教授の下で膀胱抽出液中のアミラーゼの研究、オキシプロリンの分別定量、クルペインのアミノ酸配列の研究などに取り組みました(写真4)。その後、アメリカに渡り、ロックフェラー大学のノースロップ教授の研究室に4か月間滞在され、各種酵素の分離精製と結晶化の方法を習得された後、2年半に亘る留学を終えて米国から秩父丸に乗船して横浜港に帰着された。

大阪帝国大学教授就任と新研究の展開

その後、帰国と同時に大阪帝国大学理学部講師、次いで助教授に任命されて有機化学講座を担当された。当時の理学部長は、赤堀先生の恩師であられた眞島利行先生であった。眞島先生は大学行政にも手腕を発揮され、昭和5年には北海道帝国大学理学部の創設にも尽力され、東北帝国大学と北海道帝国大学の理学部長を兼任された。翌6年には大阪医科大学を国立に移管して大阪帝国大学とする創設委員に任命されて初代の理学部長になられた。赤堀先生は1939年(昭和14年)、39歳で教授に昇任され有機化学第一講座を担当されたが、1941年には太平洋戦争が勃発したので、殆ど研究ができなくなる状態に追い込まれてしまわれた。戦争末期には中之島の研究室はガスも

電気も使えなくなるという状況に追い込まれ、その上、教官も学生も兵隊に取られて細々と研究を続けるという状態の後に敗戦の日を迎えることになった。まもなく卒業生たちも続々と復員してきたが、皆、自暴自棄になって生きる目的を見失っていた。そこで、先生は料理屋のごみ箱に捨ててあったカニやエビの殻をもらってきて、カニのキチン質を塩酸で分解して甘い糖をつくらうと考えられた。その結果、グルコサミンからRNAやDNAの成分であるデオキシリボースを合成する新たな方法を見つけられたのである。続けて戦前からの宿願であったタカアミラーゼの研究を再開されたが、その過程で戦争末期に爆薬の開発に用いたヒドラジンを利用すれば蛋白質のアミノ酸配列を明らかにすることができるのではないかと思いつかれた。これが後に蛋白質のC末端アミノ酸を同定する「ヒドラジン分解法」の発見として実ったのである。赤堀先生がバリエで開催された国際生化学会議(1952)で、この方法を発表されたところ、大きな反響を呼び、蛋白質のC末端アミノ酸の決定法として注目されるに至ったのである。これらの業績により、赤堀先生は1955年に日本学士院賞を受賞されている。

小生が大阪大学教養部に在籍していた頃のことであるが、朝日新聞の

1953年1月18日(日)号の第6面(学芸欄)に赤堀四郎先生が「満5歳から学校へ 独立後の教育」と題するご意見を述べられていた記事を拝見した。文化国家建設のためには教育制度の改革を行うことが急務であるが、子供の好奇心が最も旺盛な満5歳から6歳の間に是非、教育を始めて教育効率を上げ、将来の日本民族の文化的能力を向上させるべきであるというご意見であった。私はこの朝日新聞の記事に深い感銘を受けた。そして更に、戦時中に赤堀先生が執筆され、昭和19年に共立出版から刊行された610ページにも及ぶB5判の大著「アミノ酸および蛋白質」を京都の古本屋で見つけて思わず買い込んでしまった。その後、幸いにして大阪大学理学部化学科に進学することができ、念願の赤堀研究室に入れて頂くことができた。赤堀研では泉美治先生のご指導を仰いで有機化学の基礎を学んだ。ちょうどその頃、泉先生のグループは堂島川北岸の医学部付属病院の北側にあった塩見理化学研究所の一階西側に移転することになった。

理学部本館地下の赤堀研には故・森本史郎先生、故・大川乾次先生、故・成田耕造先生、池中徳治先生、故・佐藤了先生、故・藤原輝子先生、東大から来ておられた大野光先生(赤堀先生の有名な蛋白質のC-末端アミノ酸分析法に用いるヒドラジン分解法の研究を担当されていて、時々ヒドラジンの蒸留で爆発を起こされていた。)、岡田吉美先生、故・花房秀三郎先生、東大理学部から来ておられた故・及川淳先生、故・次田皓先生、故・春名一郎先生、松島泰次郎先生、戸田弘子さんなどがおられ、全国から優れた人々が赤堀先生の研究室に集まってきて、まさに赤堀研の黄金時代であったと言える(写真5)。

なお、昭和8年に理学部が開講した時には、本校舎は中之島4丁目に建築中であり理学部のスタッフは塩見理化

学研究所に間借りしていた。記録「松尾博志：電子立国日本を育てた男、八木秀次と独創者たち、文芸春秋社(1992)」によれば、理学部長の八木秀次先生の部屋の手前には湯川秀樹助手の部屋があったので、ノーベル賞受賞対象になった湯川先生の初論文(中間子論)は、この部屋で誕生したことになる。ちなみにこの頃、赤堀先生はプラハ(チェコスロバキア)のWaldschmidt-Leitz教授の下に留学中であつた。蛋白質研究所の前身である蛋白質研究施設は、この実験室で誕生したことになる。

1957年、小生が赤堀研の大学院学生であつた頃、戦後の日本において初めて「国際酵素化学シンポジウム」(International Symposium on Enzyme Chemistry, Tokyo and Kyoto, October 15-23, 1957)が開催され、有名な学者が多数来日されたので、我々も感激して参加した。この時の特別講演は、H. Theorell, F. Lipmann, W. A. Engelhardt, B. Chance, F. Lynennなどのノーベル賞受賞者クラスの人々に加えて、日本の代表として田宮博教授(東大・理・植物)が担当された。田宮先生は、このとき、“The Koji, an Important Source of Enzymes in Japan”と題して、日本は約1,700年前に中国から麴の利用法を学び、それ以来、麴を用いて日本の風土に即した食品を開発してきたこと、しかし、その酵素化学的な機構については19世紀の後半になって、やっと研究され始め、西欧にも伝えられるようになったことなどから説き起こし、赤堀四郎先生のTaka-amylase Aの結晶化をはじめ、様々な酵素に関する日本人研究者の業績を紹介され、“Koji may justly be called the national enzyme of Japan, both as an objective of scientific studies and as a material indispensable in the dietary life of the people”と結ばれた。



▲昭和28年3月 於理学部赤堀研
赤堀研・地下室の教授室の前の大部屋で赤堀教授を囲み、卒業研究配属された、前列左から次田、故春名、河野、矢野、角戸、関、福永、吉田(信)、菅江の面々。

写真5. 昭和28年理学部赤堀研卒研究生と(阪大春秋より引用)

生命の起源研究における赤堀先生のポリグリシン説

赤堀先生がポリグリシン説を発表されたのは1955年であつた。すなわち、ホルムアルデヒド、アンモニア、シアニ化水素からアミノアセトニトリルが生成し、その重合体からポリグリシンが生成する。その重合体に側鎖が結合した後、開裂すれば、様々なアミノ酸が生成することになる。この考え方によれば、フェニルアラニンやチロシンなどで見られるようにアミノ酸の炭素と側鎖のベンゼンの間には必ずメチレン基が1個介在することをうまく説明できることになる。さらにポリグリシン同士が水素結合をつくりながらカオリンなどの個体触媒に吸着し、側鎖と結合するならばD体とL体のどちらかが選択的に生じやすくなることなどもうまく説明できるという考え方であつた。この考え方は、生命の起源の研究で有名であつたロシアのオパーリンの目に留まり、彼が来日した時には、赤堀先生のポリグリシン説を詳しく紹介された上に、彼の著書「地球上の生命の起源」においても2ページにわたって詳しく紹介されている。(写真6)

理学部生物学科の創設、東京大学教授の兼任および蛋白質研究所の創設

赤堀先生の後半生は大学行政の組織者として活躍されたと言っても過言ではない。戦後、間もなく昭和22年に理学部長に就任されて以来、多くの学生に生化学への興味を持たせるためには生物学科の創設が不可欠だとお考えになられて、東大から奥貫一男先生(植物生理学)、神谷宜郎先生(植物生理学)を、京大からは本城市次郎先生(動物生理学)、吉川秀男先生(遺伝学)を、その他に伊勢村壽三先生(生物物理学)をもお招きになって生物学科を創設された。

その他、昭和28年には赤堀先生は東京大学に創設された応用微生物研究所の教授、および東京大学理学部化学科の左右田徳郎教授の後任教授をも兼任されることになり、ひと月の半分は東京に滞在されるという極めてご多忙な生活を送られることになった。

さらに赤堀先生は、「蛋白質構造討論会」や「酵素化学シンポジウム」を立ち上げられたほかに、蛋白質をめぐる総合的な研究所を設立することが必要だとお考えになり、学術会議などで精力的に奔走された結果、昭和31年に、文部省の予算で理学部付属の蛋白質研究施設の設置が認められた。当初は蛋白質有機化学



写真6. 第3回国際生化学会議 ブリュッセル (1955年) オバーリン博士とともに。
右から3番目赤堀先生、4番目オーバーリン博士

部門、代謝部門、溶液学部門の3部門で発足したが、その後、13部門へと発展し、現在は、化学、構造生物学、高次機能学、多階層蛋白質統合研究部門の他に7部門から成る付属蛋白質解析先端研究センター、さらには2部門から成る寄付研究部門を付置する一大研究所に発展している。

大阪大学学長としての六年間、その後

1960年、赤堀先生は大阪大学学長に選出され、6年間に亘って大学行政に携わられることになったが、学長就任の翌年に中之島のキャンパスは第二室戸台風に襲われ、理学部や医学部の学舎が浸水したほか理学部の原子核研究のサイクロトロンも使用不能になるなど甚大な被害を受けた。そこで、大阪大学はキャンパスの移転を迫られた結果、赤堀学長は1970年に開催された千里丘の万国博跡地の一部、70万m²を買収して移転するという大事業に取り組みされた。なお、この万国博の「人類の進歩と調和」というキャッチ

フレーズは赤堀先生の発案で決定されたという経緯があった。

赤堀先生は大阪大学を退官された年に大阪府の教育委員長、財団法人・理化学研究所の理事長にも就かれておられる。その他には、関西・大学セミナーハウスを兵庫県三田市に設立してその財団の理事長にも就任されている。このようにして長い年月にわたる学術への功勞により、学士院賞受賞(昭和30年)、文部省学術顧問(昭和38年)、日本学士院会員(昭和39年)、文化勲章(昭和40年)、勲一等瑞宝章(昭和50年)をお受けになるという数々の榮譽を受けられた(写真2)。さらに国際的にもソビエト連邦および西ドイツ科学アカデミー名誉会員、科学協力に関する日米委員、米国生化学会の名誉会員にも推挙されておられるほかに、チェコスロバキアからも勲章を受けておられる。このようにして、赤堀四郎先生は日本のアミノ酸および蛋白質研究の歴史に大きな足跡を残されたのである(写真7)。

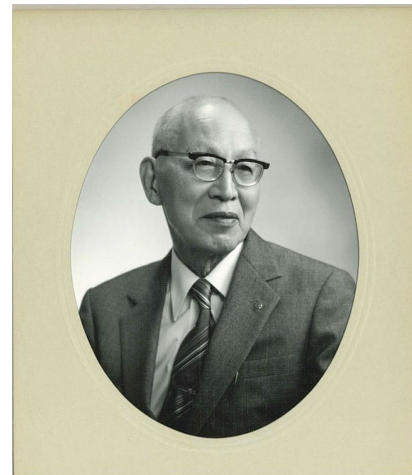


写真7. 喜寿を迎えられた赤堀先生

【参考文献】

- 1) 赤堀四郎:「わが青春」, p.1-20 静岡新聞(1990).
- 2) 赤堀四郎:“私の歩んだ道 有機化学の間道(前編)”, 生化学, **50** (10), 1029-1035 (1978).
- 3) 伊勢村壽三、泉 美治:“わが国における蛋白質研究の黎明期、赤堀四郎先生に聞く”, 蛋白質・核酸・酵素, **35**, 2175-2190 (1990).
- 4) 大阪大学編:「大阪大学歴代総長餘芳, 七代赤堀四郎(池中徳治)」, p.149-172 (大阪大学出版会)(2004).

空气中で安定な高活性ホスフィン配位子



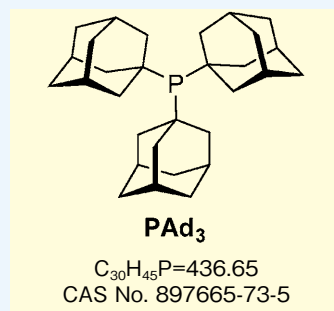
トリスアダマンチルホスフィン

鈴木-宮浦反応などの貴金属を用いる炭素-炭素結合形成反応は、医薬品や機能性材料の合成に欠かせない反応の一つです。特に、パラジウムを用いる反応が広く知られていますが、触媒によっては空气中で酸化され、反応活性が低下することが問題となっています。

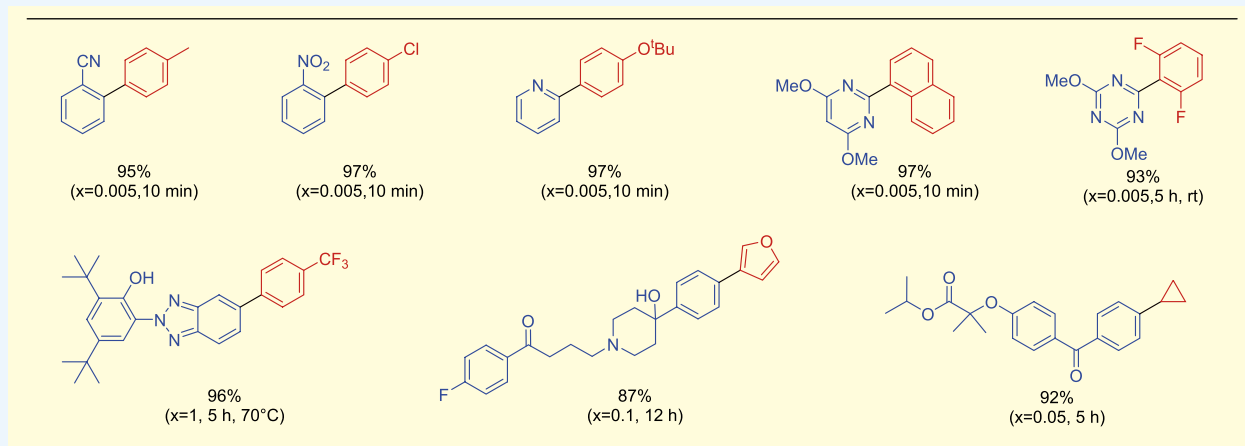
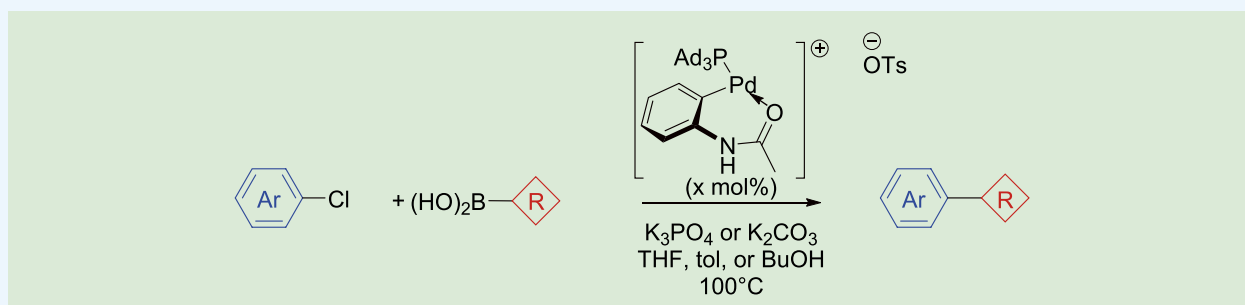
本品は、空气中で安定、かつ高反応性を示す配位子です。

特長

- 超高活性触媒 (0.005 mol% で反応が進行する)
- 塩化アリールでも反応が進行する
- 空气中で安定



反応例



【参考文献】

1) Chen, L., Ren, P. and Carrow, B. P.: *J. Am. Chem. Soc.*, **138**, 6392 (2016).

コード No.	品名	規格	容量	希望納入価格(円)
209-20591	Tris(1-adamantyl)phosphine 【PAD ₃ 】	有機合成用	250mg	照会
205-20593			1g	照会

Rf…2~10°C保存 F…-20°C保存 C80…80°C保存 150…150°C保存 表示がない場合は室温保存です。
 特定 毒1…特定毒物 毒2…毒物 劇1 劇2 劇3…劇物 毒薬 劇薬 危…危険物 向…向精神薬 特麻…特定麻薬向精神薬原料
第1…化審法 第一種特定化学物質 第2…化審法 第二種特定化学物質 化兵1…化学兵器禁止法 第一種指定物質 化兵2…化学兵器禁止法 第二種指定物質 カルタ…カルタヘナ法
覚…覚せい剤取締法 国保…国民保護法
 掲載内容は、2017年7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。

取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. 3

2017年7月15日発行

発行責任者 上田 衡

編集責任者 鎌田裕子

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

フリーファックス (日本のみ) 0120-052-806

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 49-2131-311-0 / Fax 49-2131-311100