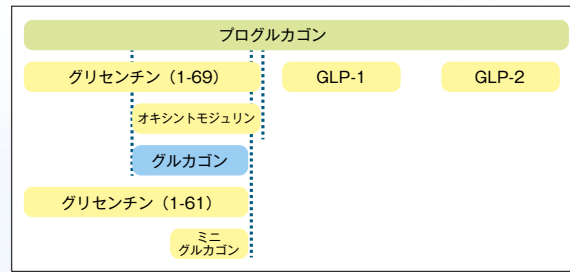


和光純薬時報

July 2018
Vol.86 No.3



グルカゴン及び
グルカゴン類似ペプチド

〔総説〕

「サンドイッチ ELISA を用いたグルカゴン再検証の必要性」 北村 忠弘、小林 雅樹…………… 2

「医薬品・再生医療等製品向け原材料 国産ウシ多血小板血漿由来血清「NeoSERA®」の開発」
濱田 彰子、山原 研一、高田 竜治、須藤 稔太…………… 5

〈テクニカルレポート〉

「ScreenFect™A および ScreenFect™A plus による遺伝子導入の特徴」 高木 徹、村上 孝…………… 8

【連載】

〈エクソソームと生命現象〉

「第2回 エクソソームのプロテオーム解析」 植田 幸嗣…………… 10

〈神経変性疾患研究の最前線〉

「第6回 パーキンソン病(2) α シヌクレイン」 上村 紀仁…………… 12

〈アミノ酸分析 ~新たな潮流~〉 **新連載**

「第1回 アミノ酸分析の歴史とニンヒドリンによるアミノ酸分析法」 伊藤 正人…………… 15

〈核酸医薬合成 基礎講座〉

「第3回 オリゴヌクレオチド合成におけるカップリング反応」 佐藤 健太郎…………… 18

〔化学大家〕

「長井 長義」 渋谷 雅之…………… 28

〔製品紹介〕

有機合成

- 核酸合成用 アクチベーター試薬
Activator-1 (4,5-Dicyanoimidazole) 他 …………… 19
- p型有機半導体材料 TBBT-C₄、TBBT-C₁₀ …………… 26
- ジスルフィド結合形成試薬 Npys-OMe …………… 32

分析

- 日立用ニンヒドリン発色溶液キット …………… 17
- 局方一般試験法用 0.5mol/L 水酸化カリウム・エタノール液 …… 27
- ポジティブリスト関連標準品 …………… 27
- コロイド滴定用 滴定液 …………… 27

培養

- NeoSERA® …………… 7
- ヘパリンナトリウム、ブタ腸粘膜由来 …………… 25

機器

- 多目的用途ステンレス缶「キミツ」…………… 25

免疫

- 高分子アミロイド β オリゴマー ELISA キットワコー …………… 22
- Tau ELISA キットワコー…………… 23
- 抗りん酸化 α -シヌクレイン, モノクローナル抗体 (pSyn#64),
抗りん酸化 α -シヌクレイン, モノクローナル抗体 (pSyn#64),
ビオチン結合 …………… 24

細胞生物

- グルカゴン ELISA キットワコー (サンドイッチ法) …………… 4
- ハリクロリン …………… 24

遺伝子

- ScreenFect™A …………… 9, 21
- ScreenFect™A plus…………… 9
- MagCapture™ エクソソームアイソレーションキット PS …… 11
- PS Capture™ エクソソーム ELISA キット
(ストレプトアビジン HRP) …………… 20

はじめに

グルカゴンの主な生理作用は肝臓に作用した際のグリコーゲン分解や糖原性アミノ酸を基質とした糖新生による血糖上昇である。また、グルカゴンは胃腸の蠕動運動を抑制する作用や、中枢に作用した場合の食欲抑制、褐色脂肪細胞における熱産生促進作用もある。最近では、グルカゴンは糖代謝調節よりもアミノ酸代謝調節に必須であることも明らかとなっている。従って、グルカゴンを単純にインスリンの拮抗ホルモンと考えてはいけな。一方、糖尿病における高グルカゴン血症の病態生理的意義と、糖尿病治療標的としてのグルカゴンにも注目が集まっている。しかしながら、従来のグルカゴン C 末抗体を用いた競合法 RIA では交叉反応性の問題から正確にグルカゴンを測定できなかった。本稿では、筆者らが開発した LC-MS/MS によるグルカゴン測定法とサンドイッチ ELISA について紹介し、従来の競合法 RIA との違いについて概説する。

1 グルカゴン測定系の問題

グルカゴン研究はインスリン研究に比べ、低迷してきた。その最大の理由はグルカゴン測定の不正確さにある。そのことは最近 Holst らのグループも指摘している¹⁾。彼らは世界各国で標準的に用いられている 8 種類のグルカゴン測定キットを比較検討し、どれ一つ感度、特異性に優れたものはないという結果を報告した。グルカゴンはインスリンが発見された 2 年後の 1923 年に発見された古いホルモンであるにもかかわらず、なぜインスリンと違って測定が困難なのか？ その理由はプログルカゴンからプロセッシングを受けてグルカゴンが合成される過程でアミノ酸配列が類似した複数のペプチドが合成されてくるからである。これは

プロインスリンからインスリンと C-ペプチドの 2 つしか合成されないのとは対照的である。特に、グリセンチンとオキシントモジュリンはアミノ酸配列がグルカゴンと重複しており、抗体を用いたイムノアッセイでは交叉反応を避けられない。従って、従来から使用されてきた多くのグルカゴン測定系はグルカゴンの C 末断端を認識する特殊抗体が使用されている（グリセンチンやオキシントモジュリンは C 末構造がグルカゴンと異なる）。しかしながら、血中にはグリセンチン(1-61)の存在が示唆されており、C 末断端認識抗体でも交叉してしまう。多くの臨床研究で血中グルカゴン濃度に関して安定したデータが得られにくかったのは、測定系の問題に起因するところが大きい。

特異性の問題を克服するには、N 末断端認識抗体と C 末断端認識抗体の両方を用いたサンドイッチ ELISA が有効である。この系を用いると、理論上、グリセンチン(1-61)を含め、種々のプログルカゴン由来のペプチドとの交叉反応を避けられる。最近、Holst もグルカゴンを正確に測定するにはサンドイッチ ELISA が必要であることを提唱しており²⁾、さらに最近、Mercodia 社のサンドイッチ ELISA が現時点で最も正確にグルカゴンを測定できると述べている³⁾。しかしながら、Mercodia 社のサンドイッチ ELISA もグルカゴンに対する特異性が十分でないことが指摘されている⁴⁾。筆者らも交叉反応試験を行い、グルカゴン以外の類似ペプチドに交叉反応することを確認した。即ち、従来法の競合法 RIA に比べると、グルカゴンに対する特異性は増したが、サンドイッチ ELISA といえども原理はイムノアッセイであり、抗体による非特異交叉反応を 100%除外することはできない。

上記の問題を克服すべく、筆者らはイムノアッセイ原理を用いない新たな測定法として、質量分析装置を用いた

グルカゴン測定系 (LC-MS/MS) を開発した⁵⁾。誌面の都合上、詳細は省くが、質量分析装置に Orbitrap-MS を使い、プロテアーゼ処理をせずに全長グルカゴンを直接測定し、さらに操作過程での回収率を補正する目的で、¹³C の安定同位体グルカゴンを用いて補正することで、グルカゴンのみを特異的に定量解析することが可能となった。しかしながら、今後、全ての検体を LC-MS/MS で測定できるかということ、現時点では以下の理由から困難である。まず、イムノアッセイと違って測定費用が高額になること、さらに、複数検体を同時に測定することができず、測定に時間がかかり過ぎるからである。LC-MS/MS とサンドイッチ ELISA による測定法の長所、短所を図 1 上にまとめてある。従って、機器の技術革新によりコストや測定時間の問題をクリアできれば、将来的にはグルカゴンは LC-MS/MS での測定が標準になる可能性はあるが、現時点では少なくとも LC-MS/MS の測定値に最も近いイムノアッセイを採用すべきと考えた。実際に筆者らが検討した LC-MS/MS とイムノアッセイ間でのグルカゴン測定値の相関結果を図 1 下に示す。サンドイッチ ELISA と LC-MS/MS の値に一致は見られないものの、概ね良好な相関は得られている。それに対し、従来法の競合法 RIA は LC-MS/MS とほとんど相関しない。従って、今後はグルカゴンの測定はサンドイッチ ELISA を用いて行われるべきであり、これまでのグルカゴンに関するデータもサンドイッチ ELISA で再検証の上、糖尿病におけるグルカゴンの新たな病態生理的意義の解明へとつなげていくべきである。

2 健常者における糖負荷と食事負荷後の血中グルカゴン動態

最も基本的なことであるが、健常者

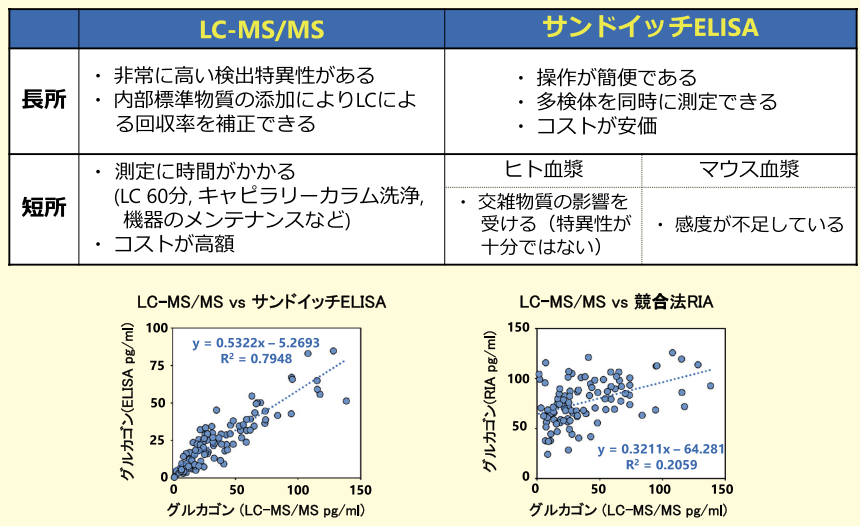


図1. 上: LC-MS/MS とサンドイッチ ELISA によるグルカゴン測定系の長所と短所。
下: LC-MS/MS とサンドイッチ ELISA、または競合法 RIA とのグルカゴン測定値の相関。文献5) から引用改変。

では糖負荷や食事負荷をすると、血中グルカゴン濃度はどのような変動をきたすのであろうか？ 血糖値、血中インスリン濃度の変動と合わせて、3種類の測定系で血中グルカゴン濃度を評価した結果を図2に示す。血糖値とインスリンに関しては、糖負荷 (75g ブドウ糖) と食事負荷 (約 50g 炭水化物、約 20g タンパク質、約 10g 脂質) では、ほぼ類似の変動パターンを示した。それに対し、グルカゴンは LC-MS/MS とサンドイッチ ELISA の両方において、糖負荷と食事負荷では逆

の変動パターンを示し、糖負荷でグルカゴンは有意に低下するが、食事負荷では上昇傾向を示した (その後、検体数を増やすことで有意に上昇することを確認済み)。重要なことに、これらの逆パターンは従来の競合法 RIA では認められなかった。従って、従来の測定法による結果をもとに、食後はインスリン分泌が促進されると同時にグルカゴン分泌は抑制されると考えられてきたが、それは誤りであり、食後はインスリンもグルカゴンも分泌が促進される。

それでは、食後にグルカゴン分泌が促進される生理的意義は何であろうか？ 冒頭で記述したようにグルカゴンには肝臓における糖産生促進作用以外に、中枢における食欲抑制、消化管運動抑制、褐色脂肪での熱産生促進などの生理作用があり、これらは全て食後に分泌促進した方が理にかなっている。すなわち、食後に摂食を止めさせる働きや、食事誘導性熱産生 (食後には体温上昇や発汗が起こる) にグルカゴンが関わっているという考え方である。しかしながら、最近では、グルカゴンは食後のアミノ酸代謝に必須であるために分泌が促進されるのではないかと考えられるようになった。即ち、食事時のタンパク質 (アミノ酸) が分解されて生じる NH₃ (アンモニア) は生体に有害であり、これを尿素に変換して尿として体外に排出する目的で、食後にグルカゴン分泌が促進されるという考え方である (グルカゴンには尿素合成促進作用がある)。実際に、筆者らも健常者にタンパク質負荷試験を行い、血中グルカゴン濃度が速やかに著しく上昇することを確認している (未発表データ)。

おわりに

最近、糖尿病に対する薬剤として、

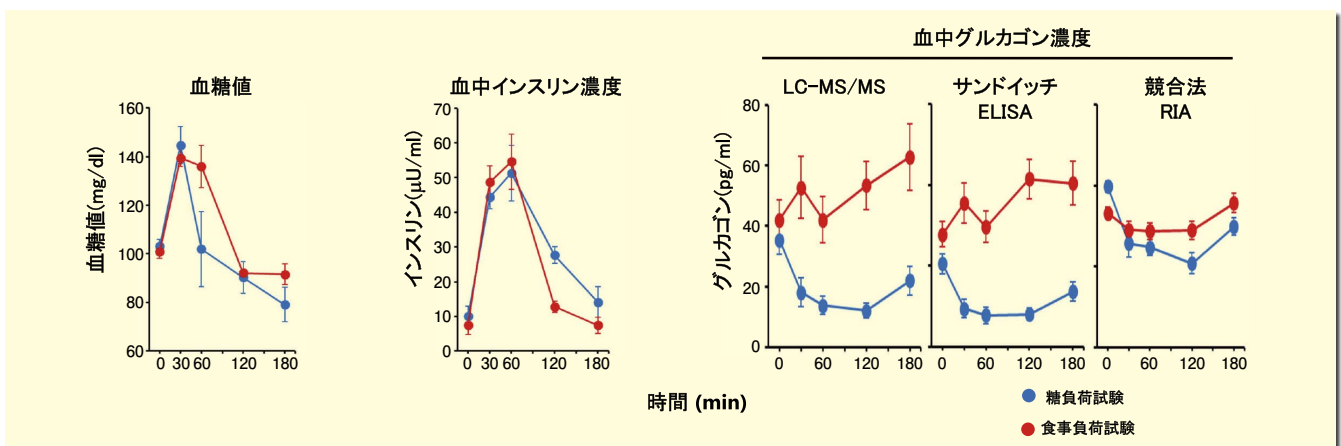


図2. 健常者に対し、糖負荷試験と食事負荷試験を行った際の血糖値、血中インスリン濃度、血中グルカゴン濃度 (LC-MS/MS、サンドイッチ ELISA、競合法 RIA) の経時的推移。文献5) から引用改変。

グルカゴン抑制作用を持つインクレチン関連薬が臨床応用され、グルカゴンが再注目されている。しかしながら、グルカゴンの測定系には交叉反応性の問題があり、正確に評価するには LC-MS/MS やサンドイッチ ELISA といった新しい測定系が必要である。今後、新規測定系を用いた糖尿病におけるグルカゴンの病態生理的意義の解明と、種々の糖尿病薬による血中グルカゴン濃度への影響の再検証を行い、将来的にはグルカゴンも視野に入れた糖尿病の病態診断と、それを基にした新たな治療戦略が期待される。

【参考文献】

1) Bak, M. J. *et al.* : "Specificity and sensitivity of commercially available assays for glucagon and oxyntomodulin measurement in humans",



LC-MS/MS

液体クロマトグラフィ (LC) にて分離した化合物を、質量分析装置 (MS) にてイオン化し分析する過程を 2 段階行い、高精度に化合物を同定する装置。

インクレチン

消化管由来のインスリン分泌促進因子として 1932 年に提唱された。1986 年

に Nauck らは、健常人にグルコースを経口投与すると、経静脈投与よりはるかに多いインスリン分泌が認められることを確認し、「インクレチン効果」と名付けた。代表的なインクレチンに GLP-1 と GIP があり、糖尿病薬である DPP4 阻害薬と GLP-1 受容体作動薬がインクレチン関連薬と呼ばれる。

Eur. J. Endocrinol., **170**, 529 (2014).

- 2) Holst, J. J. *et al.* : "Regulation of glucagon secretion by incretins", *Diabetes Obes. Metab.*, **13** Suppl 1, 89 (2011).
- 3) Wewer, Albrechtsen, N. J. *et al.* : "Hyperglucagonaemia analysed by glucagon sandwich ELISA : nonspecific interference or truly elevated levels?", *Diabetologia*, **57**, 1919 (2014).
- 4) Matsuo, T. *et al.* : "Postabsorptive hyperglucagonemia in patients with type 2 diabetes

mellitus analyzed with a novel enzyme-linked immunosorbent assay", *J. Diabetes Investig.*, **7**, 324 (2016).

- 5) Miyachi, A. *et al.* : "Accurate analytical method for human plasma glucagon levels using liquid chromatography-high resolution mass spectrometry : comparison with commercially available immunoassays", *Anal. Bioanal. Chem.*, **409**, 5911 (2017).

グルカゴン ELISA キットワコー (サンドイッチ法)

本品は、グルカゴンの N 末端認識モノクローナル抗体と C 末端認識モノクローナル抗体を用いたサンドイッチ ELISA キットです。

Wako

基本性能

測定原理	サンドイッチ法
検量線範囲	2.2 ~ 143.6 pmol/L (7.8 ~ 500pg/mL)
感度	0.3pmol/L (1.08pg/mL)
測定対象検体	血清 (ヒト、ラット、マウス)、血漿 (ヒト、ラット、マウス)、培養液
必要検体量	10 μL
測定時間	約 20 時間

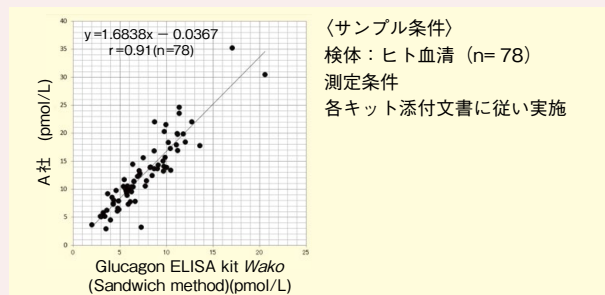
交差反応性

グルカゴン類似ペプチド	交差反応性 (%)
Glicentin (1-69) (ヒト)	0.68
Glicentin (1-69) (ラット)	0.96
Glicentin (1-69) (マウス)	0.97
Glicentin (1-61) (ヒト)	0.95
Glicentin (1-61) (ラット)	not confirmed
Glicentin (1-61) (マウス)	not confirmed
Oxyntomodulin (ヒト、ラット、マウス)	0.64
Mini-glucagon (ヒト、ラット、マウス)	not detected

キット内容

- 抗体固相化 96 ウェルプレート 1 プレート
- グルカゴン標準品 0.287 pmol × 1 本
- HRP 標識抗グルカゴン抗体溶液 12 mL × 1 本
- TMB 溶液 12 mL × 1 本
- 反応停止液 12 mL × 1 本
- 緩衝液 12 mL × 1 本
- 濃縮洗浄液 (20 ×) 50 mL × 1 本
- プレートシール 2 枚

他社製品との相関性データ



他社同等品と高い相関性がみられた。

コード No.	品名	規格	容量	希望納入価格 (円)
292-80001	Glucagon ELISA Kit Wako (Sandwich method)	糖尿病研究用	96 回用	95,000

詳しくは当社 HP をご覧下さい。

グルカゴン ELISA 和光

検索

はじめに

我々はヒト羊膜由来間葉系幹細胞（以下、羊膜 MSC）の製剤化と急性 GVHD（移植片対宿主病）およびクローン病に対する医師主導治験を実施中である（UMIN 試験 ID UMIN000029945、UMIN000029841）。治験向けの羊膜 MSC 製剤の製造には、MSC の培養に汎用される胎児ウシ血清（Fetal Bovine Serum：以下、FBS）と比べ、安全性・安定性・品質を高めた、我々が独自に開発した国産ウシ多血小板血漿「NeoSERA[®]」を使用している。本稿では、NeoSERA[®]の開発経緯とその特徴、使用上の注意点を中心に概説する。

NeoSERA[®]の開発背景： 医薬品・再生医療等製品 向け国産ウシ血清の復活

ウシ血清の中でも FBS は、ワクチン製造など細胞培養技術を用いて製造される医薬品等向けを含め、細胞培養用添加剤のスタンダードとして汎用されている。一方、1980 年代後半英国の報告から始まった牛海绵状脳症（Bovine Spongiform Encephalopathy：以下、BSE）の発生は、2001 年の我が国における BSE 発症を契機に、2003 年医薬品等の安全性を確保するため、当該生物由来原料に対して細菌やウイルス等の安全性確保のための基準（「生物由来原料基準」（平成 15 年 5 月 20 日厚生労働省告示第 210 号））が定められることとなった。同基準では、医薬品等向けの反すう動物に由来する原材料に関し、欧州の地理的 BSE リスク評価に基づき、原産国が規定された。この結果、BSE が発症した我が国は原産国として含まれず、我が国における細胞培養用途のウシ血清の製造が途絶えることとなった。

その後の世界における BSE 発生で

あるが、1992 年の 37,316 頭をピークに、発生経路となる飼料の規制強化等により発生頭数は大幅に減少し、2016 年には年間 1 頭の発生まで減少しており（国際獣疫事務局：以下、OIE、“Number of reported cases of bovine spongiform encephalopathy (BSE) in farmed cattle worldwide” 2016/3/25）、BSE のリスクは世界的に大幅に低下している。2013 年 5 月 OIE により日本や米国等が新たに BSE の「無視できるリスク国」に指定され、2014 年生物由来原料基準の改定（平成 26 年 9 月 26 日厚生労働省告示第 375 号）において、反すう動物由来原料等の原産国を OIE の指定する BSE が「無視できるリスク国」となったことから、国産のウシ血清が医薬品等の原材料に使用できる状況となっている。

現在我が国ではジェイス、ジャック、テムセル HS 注、ハートシートの 4 つの再生医療等製品が販売され、いずれもウシ血清を使用して培養されている（承認資料概要 参照：<http://www.pmda.go.jp/review-services/drug-reviews/review-information/ctp/0002.html>）。この理由は、FBS が細胞培養用添加剤のスタンダードであることに加え、細胞培養のコストが無血清培地よりも低額であることも理由である。しかしながら、FBS は不特定多数の胎児ウシの血液抽出物であることから、① BSE の原因プリオン混入のリスクがある、②ロット差がある、③細胞増殖性に劣ることがある、といった、①安全性、②安定性、③品質における問題点が以前から指摘されている。また、胎児ウシからという、倫理的に大きな問題のある手法により採取されている。

これらの背景を踏まえ、我々は国産成牛の血液を加工することにより、①安全、②安定、③高品質な、医薬品・再生医療等製品向け血清の開発に乗り出した。ヒト血液由来の多血小板血漿（platelet-rich plasma、以下 PRP）は

増殖因子を豊富に含むことから、ヒト細胞、特に MSC の培養用添加剤としての使用が多数報告されている¹⁾。これをヒントに、我々は成牛から多血小板血漿を抽出し、血清化处理を施した NeoSERA[®]の開発に成功した（特許第 6212723 号）。

NeoSERA[®]の安全性に関しては、獣医による定期的な健康確認を受け、管理された成牛から採取された血液を原料として製造することで完全なトレーサビリティを実現し、また、米国 USDA 規則 9CFR § 113.420 および欧州 EMEA 規則 EMEA/CVMP/743/00 に従い、ウイルス不活化を含む滅菌を目的に 30kGy 以上の γ 線照射を実施しており、生物由来原料基準の規程を満たす安全な細胞培養用血清である（平成 29 年 4 月 17 日 医薬品医療機器総合機構 再生医療等製品材料適格性確認書取得 薬機審長発第 0417002 号）。

また、安定性に関しては、単一プロトコルにて、少数の成牛からの繰り返し採血から得られた PRP をプールした上で分注製造することにより、ロット間差を最小限にしている。

NeoSERA[®]の性能

NeoSERA[®]の主原料である PRP は、platelet-derived growth factor (PDGF)、transforming growth factor β (TGF- β)、vascular endothelial growth factor (VEGF)、epidermal growth factor (EGF) 等を含む増殖因子が豊富に含まれており²⁾、細胞培養用添加剤として相応しい組成と考えられる。そこで、再生医療分野で広く検討されているヒト由来 MSC、ワクチン製造に汎用されている細胞株について、NeoSERA[®]の性能に関し FBS と比較検討した。

《ヒト由来MSCにおけるNeoSERA[®]による増殖性》

ヒト骨髄MSCおよびヒト羊膜MSCにおいて、NeoSERA[®]およびFBSをそれぞれ10%添加した α MEMにて培養し、増殖曲線より倍加時間を算出した。培養7日目の培養写真を図1、増殖曲線をグラフ1、増殖曲線より算出した倍加時間を表1に示す。

ヒト骨髄MSCおよびヒト羊膜MSCの培養写真(図1(A)(B))において、FBSおよびNeoSERA[®]で培養した細胞の形態に明確な差は認めなかった。増殖曲線(グラフ1)および倍加時間(表1)の結果から、ヒト骨髄・羊膜MSCの培養において、NeoSERA[®]はFBSよりも高い増殖性を有することが示されたことから、細

胞製剤化におけるメリットである、短時間で多くの細胞を得ることが期待される。

《ワクチン製造用細胞株におけるNeoSERA[®]による増殖性》

細胞バンクより入手したアフリカミドリザル腎臓由来細胞株Vero細胞およびヒト胎児肺由来細胞株MRC-5細胞において、NeoSERA[®](3ロット)およびFBSを細胞株のデータシートに基づき推奨される基礎培地に添加し培養を行い、増殖曲線より倍加時間を算出した。培養4日目あるいは5日目の培養写真を図2、増殖曲線をグラフ2、増殖曲線より算出した倍加時間を表2に示す。

VeroおよびMRC-5の培養写真(図

2(A)(B))において、FBSおよびNeoSERA[®]で培養した細胞の形態に明確な差は認めなかった。増殖曲線(グラフ2)および倍加時間(表2)の結果から、3ロットのNeoSERA[®]とFBSとの間に増殖性の差を認めなかった。

NeoSERA[®]使用上の注意

基本的にNeoSERA[®]の使用に関し、注意すべき点はFBSと大きな差はない。詳細はジャパン・バイオメディカル社HP(<https://www.japan-biomedical.jp/how-to-use-neosera>)を参照して欲しいが、最近しばしば受ける問い合わせが、NeoSERA[®]への培地変更の方法である。可能であれば初代培養よりNeoSERA[®]の使用が望ましいが、他の培養法にて培養していた細胞をNeoSERA[®]に変更する場合は3継代程度馴化させることをお願いしている。具体的には、①継代時にNeoSERA[®]に変更、あるいは②NeoSERA[®]の混合比率を3継代の間に段階的に増やす、といった方法で、細胞の性質により①または②の馴化方法を選択することを推奨する。馴化の際、細胞の増殖が速くなった場合であっても継代時の播種密度は大きく変更することなく、細胞をよく観察し、適切な継代のタイミングを決めることをおすすめしたい。

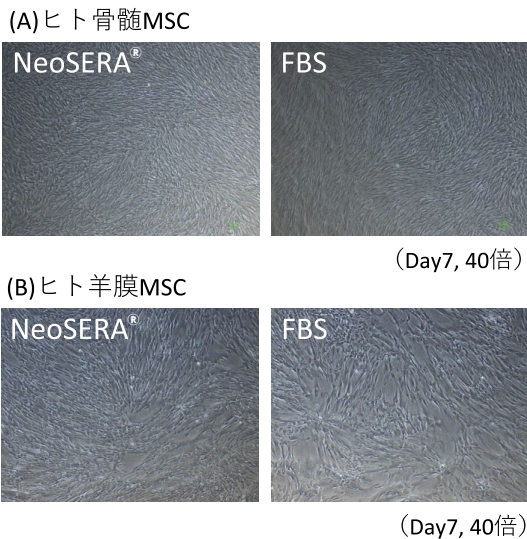
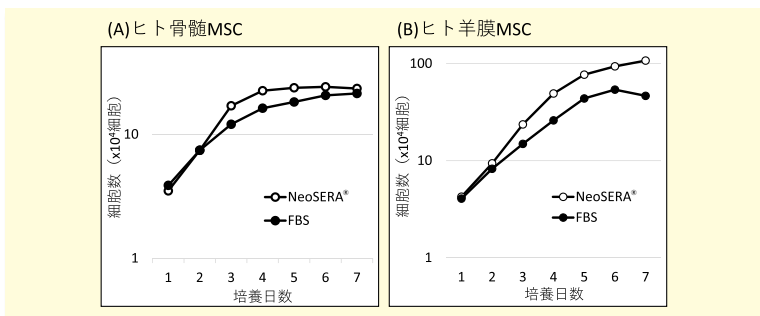


図1. (A) ヒト骨髄MSC培養写真(NeoSERA[®]、FBS:それぞれ40倍)
(B) ヒト羊膜MSC培養写真(NeoSERA[®]、FBS:それぞれ40倍)



グラフ1. (A) ヒト骨髄MSC増殖曲線(片対数)
(B) ヒト羊膜MSC増殖曲線(片対数)

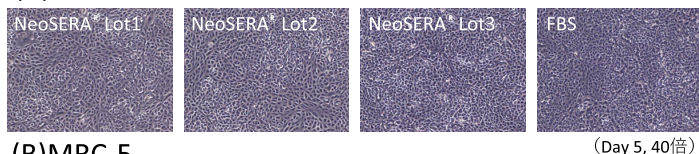
NeoSERA[®]の今後

細胞培養技術を用いて製造される医薬品・再生医療等製品において、

表1. ヒト骨髄MSC、ヒト羊膜MSC倍加時間

細胞	血清	倍加時間(時間)
ヒト骨髄MSC	NeoSERA [®]	12.8
	FBS	19.8
ヒト羊膜MSC	NeoSERA [®]	11.8
	FBS	14.0

(A)Vero



(B)MRC-5

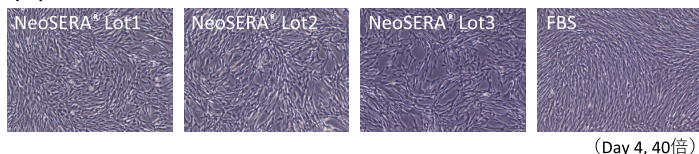
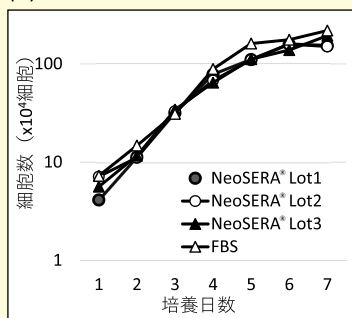


図2. (A) Vero 培養写真 (NeoSERA[®] 3ロット、FBS:それぞれ40倍)
(B) MRC-5 培養写真 (NeoSERA[®] 3ロット、FBS:それぞれ40倍)

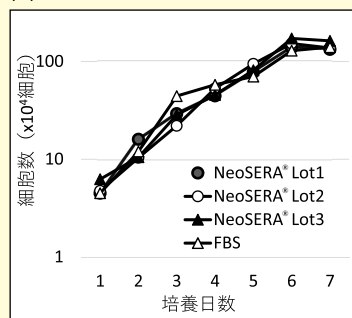
表2. Vero、MRC-5 倍加時間

細胞	血清	倍加時間 (時間)
Vero	NeoSERA [®] Lot1	10.9
	NeoSERA [®] Lot2	10.9
	NeoSERA [®] Lot3	10.8
	FBS	10.0
MRC-5	NeoSERA [®] Lot1	13.9
	NeoSERA [®] Lot2	13.4
	NeoSERA [®] Lot3	13.1
	FBS	12.6

(A)Vero



(B)MRC-5



グラフ2. (A) Vero 増殖曲線 (片対数)
(B) MRC-5 増殖曲線 (片対数)

NeoSERA[®]を原材料とすることで、製品の安全化、培養期間の短縮による低コスト化を実現できるものと考えて

おり、我が国だけでなく世界を視野に、積極的な啓蒙活動を行っていきたい。

現在、NeoSERA[®]のGMP製造化、更には豪州産の製造に取り組んでおり、近い将来、ジャパン・バイオメディカル社の新しいラインアップとして登場予定である。NeoSERA[®]をFBSの代替品として幅広い研究者・技術者に使用して頂き、我々にフィードバックを頂くことで、よりよい製品になるものと考えており、是非ご協力頂ければ幸いです。

【参考文献】

- 1) Rubio-Azpeitia, E. and Andia, I.: *Muscles Ligaments Tendons J.*, 4 (1), 52 (2014).
- 2) Anitua, E. et al.: *Thromb. Haemost.*, 91, 4 (2004).

再生医療等製品材料適格性確認書取得済

NeoSERA[®]

特長

- 生物由来原料基準の規程を満たす
- 高い細胞増殖性
- γ線照射済 (30kGy以上)
- 国産ウシ由来

コード No.	メーカーコード	品名	容量	希望納入価格(円)
632-41645	JBM001	NeoSERA [®] F	500mL	照会

希望納入価格につきましては、当社代理店もしくは担当営業まで、お問合せ下さい。

NeoSERA[®]は研究用として販売しております。動物由来原料であることによるウイルス及びその他感染性因子による潜在的危険性を認識し、購入者の責任の下で使用して下さい。また、製造元の承認を得ずに本品の再販・譲渡、再販・譲渡のための改変、商用製品の製造及びヒト・動物の医薬品・再生医療用途に使用することは禁止されていますため、ご相談下さい。

☑: 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、2018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。

はじめに

近年のゲノム科学の発展は生物ゲノムの塩基配列や発現解析を格段に飛躍させた。そこで解析された遺伝子の機能を解析することに欠かせないのが遺伝子導入技術である。プラスミド DNA や siRNA などの核酸を細胞に導入し、細胞の変化や機能を解析する手法は、現在の生物科学でもっとも基本的な技術の一つになっている。遺伝子工学技術の発展に伴い、現在では多くの遺伝子導入法や遺伝子導入試薬が登場している。また、遺伝子導入法として、ウイルスベクターを用いた方法もあり、ヒト疾患に応用できる安全なウイルスベクターも開発され応用されている¹⁾。さらに、CRISPR/Cas9 法の登場により、2 本鎖 DNA を切断して、目的の遺伝子を削除・挿入できるようになった。この CRISPR/Cas9 法を行う上でも、遺伝子導入法はとても重要なものになっている²⁾。このように、現在の生物科学実験を行う上で、目的の細胞に遺伝子を導入し、目的のタンパク質を発現させることは欠かせないことであり、簡便かつ安定的な発現が求められる。本稿では筆者の経験を踏まえ、簡易な手順で目的の細胞への遺伝子導入が高い効率で実現できる ScreenFect™A、ScreenFect™A plus の特徴について紹介したい。

遺伝子導入方法の種類と特徴

目的の細胞への遺伝子導入法として主に、リン酸カルシウム法、リポフェクション法、DEAE デキストラン法、エレクトロポレーション法、マイクロインジェクション法、ウイルスベクター法があり、それぞれの特徴がある³⁾。

リン酸カルシウム法：正電荷をもつカルシウムイオンを負の電荷をもつ DNA に結合させリン酸を加えると、カルシウムイオンとリン酸が結合し沈殿が生じる。このリン酸カルシウム・DNA 複合体が膜輸送であるエンドサ

イトーシスによって、細胞内に取り込まれ、核に移行することにより遺伝子を発現する方法である。特殊な機器や技術は必要なく、比較的簡単に行うことができる。

リポフェクション法：陽性電荷脂質などから成る脂質二重膜小胞（リポソーム）と導入する DNA との電気的な相互作用により複合体を形成し、貪食やエンドサイトーシスにより細胞内に取り込ませる方法。遺伝子導入効率が高く、オリゴヌクレオチドや二本鎖 RNA の導入も可能であり、特殊な機器や技術は必要なく、簡単に行うことができる。

DEAE デキストラン法：本法による動物細胞への遺伝子の取り込みや核内輸送のメカニズムは、DEAE デキストランと DNA が複合体を形成して細胞表面に結合し、エンドサイトーシスにより細胞内へと移行する。リン酸カルシウム法やリポフェクション法に比べて遺伝子導入効率が低く、細胞毒性がある。

エレクトロポレーション法：高電圧パルスにより一過性に細胞膜の脂質二重層の膜構造を不安定化させ、DNA を取り込ませる方法。導入効率は電圧・電気パルスの長さ・温度・細胞や DNA 濃度・緩衝液の組成などの条件により左右される。また、高電圧パルスをかけるので、他の方法と比較してバイアビリティーが低い。操作が簡単で遺伝子導入効率は高いが、高価な専用機器が必要である。

マイクロインジェクション法：1 個の細胞に微細ガラス注射針を刺して試料を導入する方法。原理は簡単ながら、高度な技術を必要とする。遺伝子改変動物（マウスやラットなど）の作製における常道で、受精卵に遺伝子を注入する。

ウイルスベクター法：レトロ（レンチ）ウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルスなど、ウイルス固有の生活環を応用し、目的の細胞に感染さ

せ遺伝子を導入する。組換えウイルスを作製する必要があるため、アデノ随伴ウイルス以外はバイオセーフティーレベル 2 (BSL2) 以上の施設が要求される。目的に合ったウイルスベクターを用い、組換えウイルスさえ作製できれば、遺伝子導入効率も高い。

ScreenFect™A および ScreenFect™A plus (リポフェクション法) を用いた遺伝子導入の例

ScreenFect™A シリーズの特記すべきポイントとして、使用面での簡便さと導入効率の高さにある。

1) one-step 法の簡便さ

従来より幅広く利用されているリポフェクション試薬の多くは、遺伝子導入の前日に目的の細胞を調整（播種）しておく必要がある。また、リポソームと DNA の複合体形成を妨げるため、抗生物質フリーや血清フリーの培養液を用いて培養しておかなければならない。それに対して ScreenFect™A シリーズでは、このような操作は必要ない。さらに目的の細胞を前日から調整しておく必要がなく、遺伝子導入実験の当日に、本試薬を用いて目的の遺伝子を細胞に導入することができる。使用する細胞は抗生物質も血清も含まれている培地でも遺伝子導入を行えるので、時間的に制約される場合でも細胞の調整や培地交換の必要がなく、非常に簡便にスムーズに遺伝子導入を行うことができる。

2) 遺伝子導入効率の高さ

ScreenFect™A および ScreenFect™A plus を使用し、ヒト胃がん細胞株 MNK45 細胞とヒト膀胱がん（肝転移）細胞株である KMP8 細胞を用いて遺伝子導入効率と生存率の例を示す。尚、導入した遺伝子は GFP (Green Fluorescent Protein) をコードする pCAGGS-EGFP を使用し、生存率の確認には Propidium Iodide (PI) 染色を行い、フローサイトメーターを用い

て比較した。

MNK45 細胞 (図 1) では他社製品と比較して、生存率はわずかに低下するものの、遺伝子導入効率が非常に高いことが確認された。遺伝子導入効率は他社と比較して 5~8 倍高い結果となった。KMP8 細胞 (図 2) でも同様に、生存率はわずかに低下するが、遺伝子導入効率が非常に高い。他社と比較して 8 倍以上高い導入効率を示した。

このように他社製品では非常に導入効率が低い細胞でも、ScreenFect™A シリーズを用いることで確実に目的の遺伝子を効率よく導入することができるように、前日からの細胞調整も必要なく、数多く市販されている遺伝子導入試薬の中で非常に有効な試薬だと考えられる。遺伝子導入試薬(ポリマー)の細胞毒性については、ScreenFect™A plus でやや高い様に見える。遺伝子導入後の実験評価項目にもよるが、十分な遺伝子発現が得られる利点の前には大きな障壁になる様には見えない魅力がある。

【参考文献】

- 1) Cong, L. et al. : "Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems", *Science*, **339**, 819 (2013).
- 2) Cucchiari, M. : "Human gene therapy : novel approaches to improve the current gene delivery systems", *Discov. Med.*, **21**, 495 (2016).
- 3) 村上 孝 : 「発光・蛍光蛋白質による細胞標識の基本的な手技とその応用」, *Surgery Frontier*, **16**, 97 (2009).

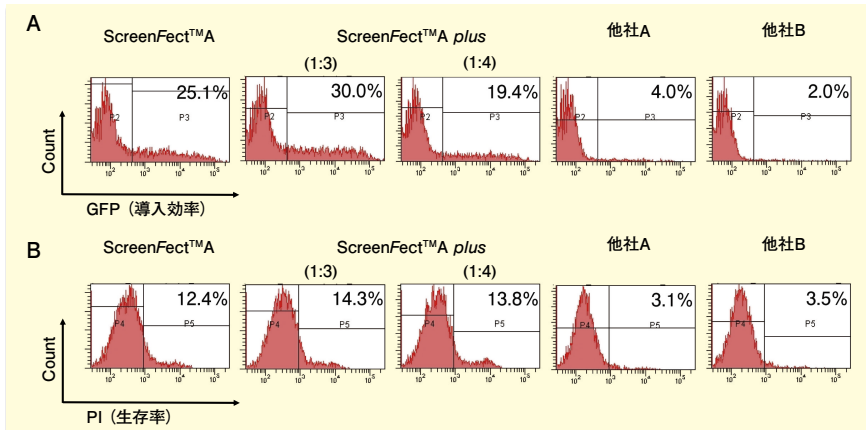


図 1. MNK45 細胞を用いた遺伝子導入効率の比較

ScreenFect™A および ScreenFect™A plus は遺伝子導入当日に細胞密度が 80% confluent になるように調整した。一方、他社試薬用では 6 well plate に 2.5×10^5 個ずつ細胞を前日に播種した。ScreenFect™A および ScreenFect™A plus は one-step 法、他社製品については two-step 法で遺伝子導入を行った。ScreenFect™A plus においては、試薬と DNA 量を (1:3), (1:4) の 2 通りで導入効率の比較を行った。遺伝子導入 24 時間後に、細胞をトリプシン処理し、培養液で 2 回洗った。遺伝子導入効率 (GFP 陽性率) の測定と Propidium Iodide (PI : $2 \mu\text{g/ml}$; 5 分間) 染色による細胞生存率の測定は FACSCant II フローサイトメーターで行った。

(A) ScreenFect™A, ScreenFect™A plus (1:3), (1:4), 他社 A, 他社 B について GFP 発現細胞を測定することにより、遺伝子導入効率の確認を行った。(B) ScreenFect™A, ScreenFect™A plus (1:3), (1:4), 他社 A, 他社 B について PI 陽性細胞を測定することにより、生存率の測定を行った。

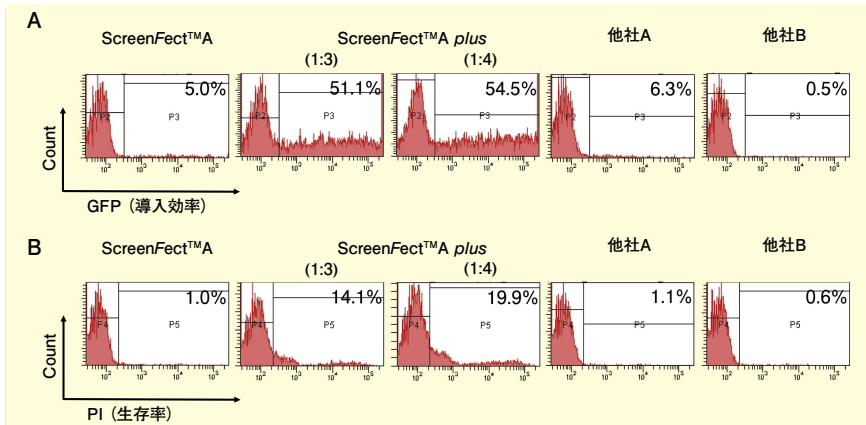


図 2. KMP8 細胞を用いた遺伝子導入効率の比較

実験条件は図 1 と同じ。

(A) ScreenFect™A, ScreenFect™A plus (1:3), (1:4), 他社 A, 他社 B について GFP 発現細胞を測定することにより、遺伝子導入効率の確認を行った。(B) ScreenFect™A, ScreenFect™A plus (1:3), (1:4), 他社 A, 他社 B について PI 陽性細胞を測定することにより、生存率の測定を行った。

トランスフェクション試薬

ScreenFect™A
ScreenFect™A plus



コード No.	品名	規格	容量	希望納入価格 (円)
293-73201	ScreenFect™A Ref	遺伝子研究用	0.2mL	8,000
299-73203			1mL	30,000
297-73204			1mLx5	120,000

コード No.	品名	規格	容量	希望納入価格 (円)
293-77101	ScreenFect™A plus Ref	遺伝子研究用	0.2mL	9,000
299-77103			1mL	35,000
297-77104			1mLx5	140,000

21 ページに実験データをご紹介します。

また、ScreenFect™ シリーズの詳細情報を専用 HP (<http://screenfect.jp/ja/>) にてご紹介しています。

Ref: 2~10℃保存 F: -20℃保存 30: -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、2018 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 エクソソームのプロテオーム解析

公益財団法人がん研究会 植田 幸嗣

微小分泌小胞の一種であるエクソソームは細胞内小胞輸送に由来する産物の一つであり、不要な分子を細胞外に放出したり、内包する分子を遠隔細胞に輸送、伝達する働きがあるとされる。一般的には直径数十～百ナノメートルほどの脂質二重膜構造を持ち、特定のタンパク質群（テトラスパニンファミリー、Rabファミリー、Tsg101、Alix など）や miRNA が細胞内構成比率と比して特に多く含まれるものとされる。ただし、粒子径を細かく分類してオミクス解析を行うと特定の粒子径依存的に分子構成が顕著に異なるとする研究結果が発表されるなど¹⁾、いまだエクソソームの分子生物学的定義は明確に定まっていない。実際に、様々な異なるエクソソーム精製法を用いた機能解析実験に基づいて（つまり精製純度の異なるエクソソームサンプルを用いて）、がんの転移、浸潤、血管新生、免疫細胞制御といった現象への関与が多数報告されている。

一方で、「病因細胞が持つ分子プロファイルを末梢血など体液中に放出された病因細胞由来エクソソームから読み取れること」は事実であり、すでに診断を目的としたエクソソームの利用は商業化が進んでいる。例えば、前立腺がん特異的な RNA 三種 PCA3 non-coding RNA、ERG mRNA、SPDEF mRNA を同時に尿中エクソソームから検出するテスト（ExoDx[®] Prostate IntelliScore）が CLIA（Clinical Laboratory Improvement Amendments）ラボのもとで開発されており、LDT（Laboratory Developed Tests：一つの試験検査施設内で設計・製造・使用される体外診断試験）として国際的な委託検査発注が可能となっている²⁾。また、同社は血漿からエクソソーム DNA/RNA、cfDNA（circulating free DNA）をワンステップで単離する技術を構築し、血液サンプルから非小細胞肺癌が持つ EGFR-T790M 変異

を検出するテストも発表している（ExoDx[®] EGFR T790M）。同変異は EGFR 阻害薬の治療を行った肺癌患者の 6 割が獲得する薬剤耐性の原因であり、オシメルチニブなど同変異 EGFR にも有効な薬剤への切り替えを判断するために迅速な耐性獲得診断が重要とされる。210 例の同変異保持肺癌患者に対する比較試験によると、すでに承認されている cfDNA を用いた診断法（cobas[®] EGFR Mutation Test v2）では T790M 検出の感度、特異度が 58%、80% だったのに対し、ExoDx[®] EGFR T790M テストではそれぞれ 92%、89% とより良好な診断結果が得られたと報告されている³⁾。

こうした背景から、基礎生物学研究、臨床応用のいずれにおいてもエクソソームを高純度に、施設間差なく高い再現性を持って、誰でも簡便に単離精製可能なツールは不可欠なパーツと言える。特に、血清や血漿といったサンプルから精製したエクソソームのタンパク質を対象とした研究においては非常に高いレベルの精製効率が求められる。血清・血漿は 60 mg/ml を超えるタンパク質濃度を持ち、リポタンパク質など高分子量複合体も多く存在するため、一般的にエクソソーム精製法として用いられる超遠心沈降法を用いてもなお多量の血清中のフリータンパク質（IgM、 α 2-マクログロブリン、補体成分など）やリポタンパク質が共存する。したがって超遠心沈降法によって精製した血清タンパク質を LC/MS による網羅的定量プロテオーム解析に供すると、含有量の上位をほぼ全て血清中フリータンパク質が占め、エクソソーム由来タンパク質はわずかしら検出されない⁴⁾。

超遠心法以外にも抗体を用いたアフィニティー精製法やポリマー沈降法、ゲル濾過法、切除組織浸漬液から直接回収する方法⁵⁾、など様々なエクソソーム精製法が使用されているが、MagCapture[™] Exosome Isolation Kit

PS（以後 MagCapture キット）はエクソソーム膜を構成する脂質の一つであるフォスファチジルセリン（PS）を標的としたアフィニティー精製を原理としており、他と比べて様々な利点を持つ。マグネットビーズに固相化された Tim-4 タンパク質と PS 間の結合はカルシウムイオン要求性であり、キレート剤を用いて溶出することにより非特異的なビーズ結合タンパク質を溶出させることなくエクソソームを特異的に溶出できるため精製純度が高い。また、マグネットビーズによる精製操作が支障なく行える範囲であればサンプルの容量に制限がないのも希薄な試料を用いる際に有効である。さらに変性溶解を伴わずに溶出を行うため、粒子数計測、検鏡、細胞投与実験などその後のアプリケーションを問わず使用できる特徴もある。

実際に同一の血清から図 1A に従ってエクソソームを精製、Orbitrap Fusion Lumos 質量分析計により網羅的なプロテオーム解析を行った結果を示す。総タンパク質同定数は超遠心精製エクソソームから 612 種、MagCapture キット精製エクソソームから 1,103 種となり、後者の方が約 1.8 倍も多く同定数を得ることができた（図 1B）。これは前者において血清中に存在する多量のフリータンパク質の残存が多く、それらが微量なエクソソーム由来シグナルをマスクしてしまった結果である。また、同定タンパク質を相対定量値と共に俯瞰してみると、エクソソームマーカータンパク質とされる分子群の同定数、そして相対含有量ともに MagCapture キット精製エクソソームの方が多岐にわたる（図 2）。このことから同キットから得られたエクソソームの純度が既存の超遠心沈降法に比べて非常に高いと言える。

精製度の高いエクソソームを使用することは、エクソソームの機能を解明する上でも、診断・治療薬のターゲッ

トを探索する上でも大変有利で信頼性も高いことは言うまでもない。この点において MagCapture キットは精製度、汎用性、再現性などの面からあらゆるエクソソーム研究の起点となりうる性能を持っている。ただし、同キットで回収した産物もまた、PS リッチな膜成分を持つサイズ非依存的な構造体の集合であって、他の既存研究が指すエクソソームと同等のものかどうかはこれからのオミクス解析によって慎重に評価、定義していかなければならない。MagCapture キットをはじめとした精製技術、そしてそれらを検出する技術の発展に伴って、エクソソームの本態解明と臨床利用がさらに進展することを期待している。

【参考文献】

- 1) Zhang, H. *et al.* : "Identification of distinct nanoparticles and subsets of extracellular vesicles by asymmetric flow field-flow fractionation", *Nat. Cell Biol.*, **20**, 332 (2018).
- 2) McKiernan, J. *et al.* : "A Novel Urine Exosome Gene Expression Assay to Predict High-grade Prostate Cancer at Initial Biopsy", *JAMA. Oncol.*, **2**, 882 (2016).
- 3) Castellanos-Rizaldos, E. *et al.* : "Exosome-based Detection of EGFR T790M in Plasma from Non-Small Cell Lung Cancer Patients", *Clin. Cancer Res.*, DOI : 10.1158/1078-0432.CCR-17-3369 (2018).
- 4) 植田幸嗣 : 「プロテオーム解析から見たバイオマーカーとしてのエクソソームとその特徴」, *細胞工学*, **32**, 71 (2013).
- 5) Jingushi, K. *et al.* : "Extracellular vesicles isolated from human renal cell carcinoma tissues disrupt vascular endothelial cell morphology via azurocidin", *Int. J. Cancer*, **142**, 607 (2018).

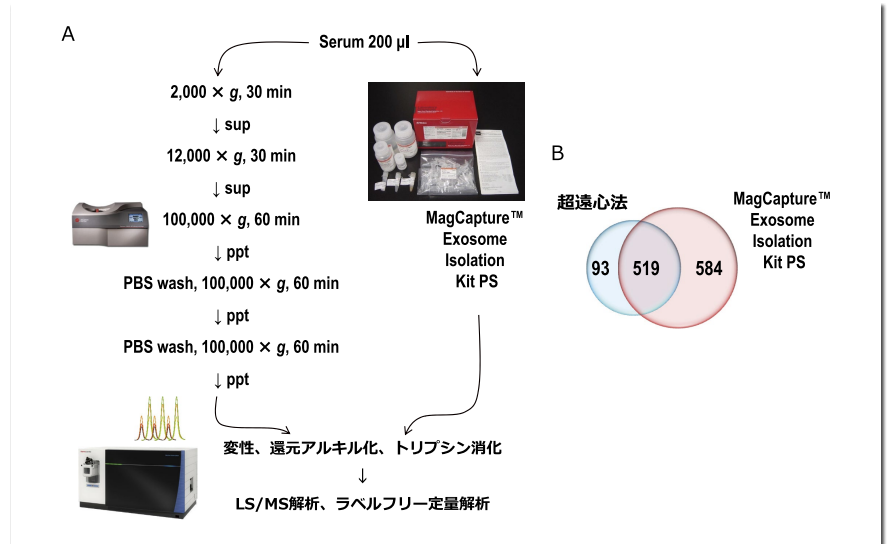


図 1. エクソソームのプロテオーム解析における精製純度の影響

- A) 超遠心沈降法と MagCapture™ Exosome Isolation Kit PS による血清中エクソソームの精製と質量分析
 B) 同定タンパク質の数と重複

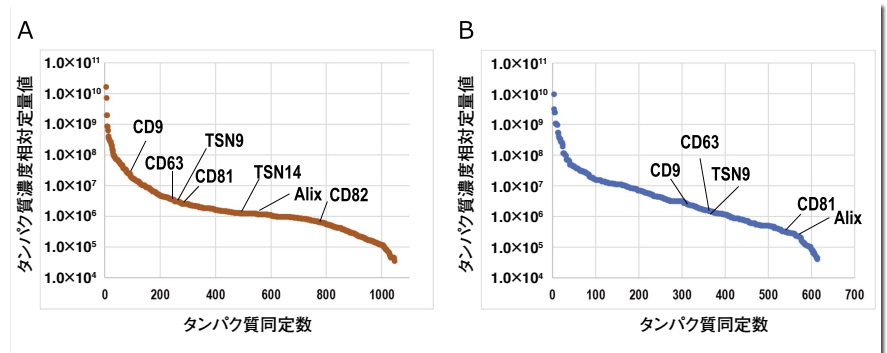


図 2. 同定エクソソームタンパク質の定量俯瞰図

- A) MagCapture™ Exosome Isolation Kit PS、B) 超遠心沈降法により精製した血清中エクソソームの定量プロテオーム解析結果。
 エクソソームマーカーとして報告のあるタンパク質をピックアップして記載した。

MagCapture™ エクソソームアイソレーションキット PS

Wako

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

詳細は当社 HP をご覧下さい。また、20 ページにてエクソソーム ELISA キットもご紹介しています。

エクソソーム 和光

検索

☑️…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、2018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6回 パーキンソン病 (2) α シヌクレイン

京都大学大学院医学研究科 臨床神経学 (神経内科) 上村 紀仁

はじめに

パーキンソン病 (PD) は、黒質緻密部ドパミン神経細胞脱落と神経細胞内封入体である Lewy 小体の形成を病理学的特徴とする。1912年に Fritz Heinrich Lewy によってこの神経細胞内封入体 (後に Lewy 小体と命名) が記載されてから、長らく PD の病態における意義は不明であった¹⁾。しかし、1997年に家族性パーキンソン病の原因として α シヌクレイン (α syn) のミスセンス変異が報告され、さらに同年、孤発性 PD における Lewy 小体が抗 α syn 抗体で強く染色されることが示され、 α syn が PD の病態に深く関わっていると考えられるようになった^{2,3)}。その後、家族性 PD の原因として SNCA (α syn 遺伝子) の二重複と三重変異が、また孤発性 PD のリスクとして SNCA の一塩基多型も報告され、 α syn が PD の病態生理において中心的役割を果たしていることは疑いの余地が無い^{4,5)}。本稿では、まず α syn の生理機能について述べ、これまでに報告されている PD の病態への関与について概説する。

α シヌクレインの構造と生理機能

シヌクレインは哺乳類では 1991年に同定され、 α 、 β 、 γ シヌクレインの3つのサブタイプが存在する⁶⁾。 α syn は 140 アミノ酸で構成され、中枢神経系では主に神経細胞で発現しており、シナプス前終末に豊富に存在する。 α syn の N 末端には、高度に保存された 6 アミノ酸残基から成る 7 回繰り返し配列が存在し、両親媒性の α ヘリックス構造を形成することが予想される⁷⁾。実際、 α syn モノマーは、細胞質内において特定の構造を持たない形態 (unfolded form) と、膜に付着した α ヘリックス構造を取る形態 (α -helical form) とで、平衡状態で

存在していると考えられている⁸⁾。生理的に α syn は安定な四量体 (folded helical tetramers) で存在するという報告もあるが、これには議論がある⁹⁾。家族性 PD の原因となるミスセンス変異はこの N 末端領域に集中している (図 1)。 α syn の中央部である non-amyloid-component (NAC) 領域は、アルツハイマー病患者脳における老人斑に存在するペプチド配列として見出された¹⁰⁾。同部位は疎水性で、 α syn の凝集に関わっている¹¹⁾。C 末端は酸性アミノ酸に富み、Lewy 小体においてリン酸化される Ser129 が存在する¹²⁾。Lewy 小体を構成する α syn の Ser129 は高度にリン酸化されており、正常脳にはほとんど存在しないことから、病的に凝集した α syn を検出する目的で同リン酸化 α syn に対する抗体による免疫組織染色等がしばしば行われる。

α syn の生理機能については不明な点が多い。キンカチョウ (zebra finch) においては、若く、歌を覚える時期に一致して、関連する神経核に α syn の発現上昇が認められ、神経可塑性の制御に関わっているのではないかと推測された¹³⁾。 α syn ノックアウトマウスの解析では、寿命、生殖機能、脳の形態に異常は見られなかった¹⁴⁾。しかし、脳スライス標本を用いた電気生理学的解析により、 α syn はシナプス小胞の放出に対して抑制的に働くと報告されている¹⁴⁾。 α syn を強制発現した初代神経培養細胞を用いた研究でも、 α syn の同様の機能が示されている¹⁵⁾。さらに、 α syn が SNARE 複合体を介した脂質膜の融合を抑制するという報告があり、これは前述の知見を支持するものと考えられる¹⁶⁾。一方で、CSP α はシナプス前終末において SNARE 複合体形成を促進する働きがあるが、CSP α ノックアウトマウスのシナプス変性や、早期に死亡するという異常表現型が α syn の強制発現にて代償されるという報告がある¹⁷⁾。そ

の後、 α syn が、その C 末端配列にて synaptobrevin 2 と結合し、SNARE 複合体の形成を促進すると報告された¹⁸⁾。しかし、 α syn の機能として、前述したシナプス小胞の放出抑制と SNARE 複合体の形成促進をどのようにリンクさせて解釈するかは難しいところである。

α シヌクレイン凝集と細胞毒性

α syn は本来的に可溶性の蛋白質であるが、シヌクレイノパチーと総称される疾患群において、 β シート構造に富んだアミロイド線維を形成する。シヌクレイノパチーには、PD の他にレビー小体型認知症 (DLB)、多系統萎縮症 (MSA) が含まれる。リコンビナント α syn も試験管内で線維 (フィブリル) を形成するが、この凝集過程で可溶性の重合体であるオリゴマーを形成し、一般的にオリゴマーとフィブリルが細胞毒性を発揮すると考えられている (図 2)。試験管内では、家族性 PD の原因となる A53T 変異はフィブリル化を促進する一方で、A30P 変異はオリゴマー化が促進される¹⁹⁾。生理的に α syn がテトラマーで存在すると主張するグループからは、家族性 PD の原因となる α syn ミスセンス変異はテトラマーを減少させ、不定形のモノマーを増加させることで α syn 重合と細胞毒性が促進されると報告している²⁰⁾。ドパミンの代謝過程では活性酸素種が産生されるため、ドパミン神経細胞は強い酸化ストレスに曝されている。 α syn は酸化ストレス下において、ジチロシン結合を介してオリゴマー化する²¹⁾。また、ドパミンの酸化代謝物であるキノン体も同様に、 α syn の C 末端に作用してオリゴマー化を促進・安定化する²²⁾。しかし、オリゴマーと一概に言っても、試験管内での作製法によって、異なる構造と細胞毒性を持つものが報告され、また *in vivo* でも性質の異なるオリゴマー

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

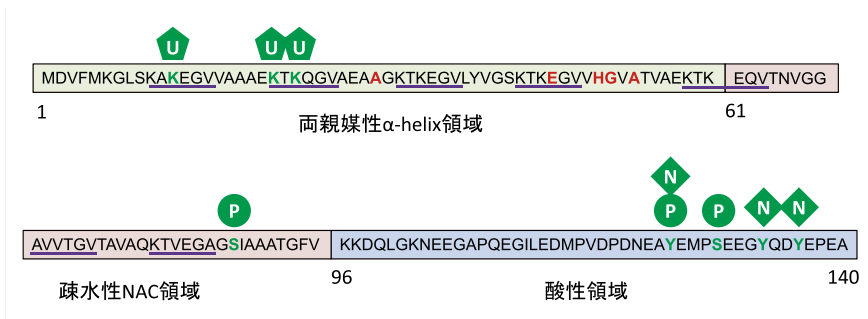


図1. αシヌクレインの構造

赤：家族性PDで報告されているミスセンス変異部位。下線：繰り返し配列。
 緑：PDにおいて報告されている翻訳後修飾部位。U：ユビキチン化、P：リン酸化、N：ニトロ化。

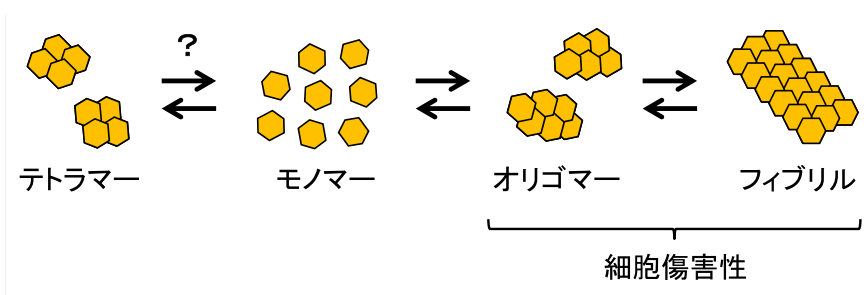


図2. αシヌクレインの凝集

生理的にモノマーとして存在しているか、テトラマーとして存在しているかは議論がある。オリゴマーとフィブリルには、構造の異なるものの存在が示唆されている。

の存在が報告されている^{23, 24)}。このように、オリゴマーは多様な分子種を含んでいると考えられるが、一般にはオリゴマーは膜傷害性に働き、ミトコンドリア機能障害や酸化ストレスの惹起、小胞体-ゴルジ体間の小胞輸送の障害、シャペロン介在性オートファジーの障害、シナプス前終末におけるSNARE複合体形成の障害など、様々な機序で細胞傷害性に働くことが報告されている²³⁻²⁸⁾。一方、αsynの凝集にはNAC領域の配列が必要とされているが¹¹⁾、SSNMRによる解析では、アミノ酸46-54と63-96が“Greek key”の形を取ってフィブリルの核を形成していると報告されている²⁹⁾。αsynフィブリルをマウス胎児由来初代培養神経細胞に投与すると、神経細胞内に取り込まれたαsynフィブリルの一部が鑄型となり、経時的に神経細

胞内においてαsyn線維形成が見られ、2週間の経過でシナプス機能障害と神経細胞脱落が見られる³⁰⁾。PDの病態において、オリゴマー、フィブリルのいずれが病態に寄与するかは治療ターゲットを考慮する上でも重要と考えられる。*in vivo*においてフィブリルと比較してオリゴマーが強い毒性を発揮するとする報告³¹⁾、またPD患者脳ではproximity ligation assay (PLA)法を用いることで、通常のαsyn免疫染色では同定できないオリゴマーが広範に観察されることが報告されている³²⁾。一方で、*in vivo*イメージングによる解析では、αsynフィブリルをマウス脳に接種して神経細胞に凝集病変を形成すると、凝集病変を形成した神経細胞が経時的に脱落することが示されている³³⁾。オリゴマーとフィブリルのどちらが病態により強く寄与

しているかは結論がついていない。

αシヌクレインの細胞間伝播

Lewy病変が黒質緻密部ドパミン神経細胞以外にも見られることは以前から知られていたが、Braakらは、剖検にてLewy病変が見つかった非PD患者 (incidental cases) と、PD患者について体系的な病理解析を行った。これによると、最初期Lewy病変は延髄迷走神経背側核と嗅球に起こり、一定のパターンに従って進展する可能性が考えられた³⁴⁾。また、病初期から消化管神経叢にもLewy病変が認められたことから、消化管の神経叢に起因したLewy病変が、遠心性の迷走神経線維を逆行性に伝播し、中枢神経内において迷走神経背側核に最初期Lewy病変を形成する可能性が示唆された³⁵⁾。このいわゆるBraak仮説は、Lewy病変が伝播するという新しい概念の裏付けが無かったが、その後、PD治療のため胎児由来ドパミン神経細胞の脳内移植を受けた患者の剖検にて、移植された細胞内にもLewy小体が認められたことが報告された^{36, 37)}。さらに、αsynを*in vitro*にて精製・フィブリル化してマウス脳に接種することにより、接種されたフィブリルを核として神経細胞内において内因性αsynが凝集し、これが神経回路に沿って伝播することが報告された^{38, 39)}。また、PD患者由来のLewy小体をマウスとサルに接種することで、神経細胞内αsyn凝集病変形成され、脳の他部位にも伝播することが報告された⁴⁰⁾。以上の現象はαsynのprion様伝播とも呼ばれ、Braak仮説を説明しうる可能性があり、広く注目されることとなった。治療ターゲットの側面からは、神経細胞間の伝播機序の解明と、介入による伝播の制御が試みられている。報告によって実験系や対象とされるαsyn分子種 (モノマー、オリゴマー、フィブリル) に違いがあるもの

の、伝播機序として、直接に細胞膜を貫通、飲作用 (macropinocytosis)、受容体介在性エンドサイトーシス、エキソソーム、ナノチューブを介する等の様々な報告があり、いずれが病態において重要な役割を担っているかは未だに分かっていない⁴¹⁻⁴⁵⁾。

αシヌクレイン凝集における構造多型

最近、*in vitro* で作製した α syn フィブリルは、作製条件の違いによって生化学的性質 (凝集構造) や、培養細胞やマウス脳内で惹起する病態 (生物学的活性) が異なることが報告された^{46, 47)}。これらの報告は、凝集 α syn には多様性が存在し、ヒト体内においても多様な凝集 α syn が異なる病態を引き起こす可能性を想起させる。PD と DLB は共通して神経細胞内 α syn 凝集病変を特徴とするが、臨床経過と病理進展パターンが異なる。また MSA はオリゴドンドロサイト内 α syn 凝集病変の形成を特徴とし、PD と DLB とは病理学的に明確に異なる。同じ α syn という蛋白質が、異なる臨床経過と病理像を示すことは未だに大きな謎である。最近、凝集 α syn の違いから、シヌクレインパチーの病態の違いを解明しようとする研究が進んでいる。例えば、MSA 脳から抽出された α syn は、PD 脳由来 α syn と比較してマウス脳や培養細胞において α syn 凝集病変を惹起しやすく、強い毒性を発揮することが報告されている^{48, 49)}。では、凝集 α syn の違いのみで病態の違いが説明できるかという、そうではないようである。MSA 脳由来 α syn をマウス脳に接種してもオリゴドンドロサイト内 α syn 凝集病変は形成されず、神経細胞内に α syn 凝集病変が形成された^{48, 50)}。病態の違いを説明・再現するには、凝集 α syn の違いのみな

らず、宿主側の何らかの要因が必要なのかもしれない。

おわりに

Lewy 小体の主要構成成分が α syn であることが発見されてから約 20 年が経過し、様々な実験系で、様々な病態機序と治療ターゲットが報告されているが、今までのところ疾患修飾薬と言える治療法の開発には成功していない。疾患の病態を完全に再現できる系は存在しないが、各々の実験系で病態のどの部分を再現しているかを改めて見直すことが、真に治療法開発に結び付く発見に繋がるのではないかと考える。

【参考文献】

- 1) Goedert, M. *et al.* : *Nat. Rev. Neurol.*, **9**, 13 (2013).
- 2) Polymeropoulos, M. H. *et al.* : *Science*, **276**, 2045 (1997).
- 3) Spillantini, M. G. *et al.* : *Nature*, **388**, 839 (1997).
- 4) Singleton, A. B. *et al.* : *Science*, **302**, 841 (2003).
- 5) Satake, W. *et al.* : *Nat. Genet.*, **41**, 1303 (2009).
- 6) Maroteaux, L. and Scheller, R. H. : *Brain Res. Mol. Brain Res.*, **11**, 335 (1991).
- 7) Bendor, J. T. *et al.* : *Neuron*, **79**, 1044 (2013).
- 8) Pineda, A. and Burre, J. : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **114**, 1223 (2017).
- 9) Bartels, T. *et al.* : *Nature*, **477**, 107 (2011).
- 10) Ueda, K. *et al.* : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**, 11282 (1993).
- 11) Giasson, B. I. *et al.* : *J. Biol. Chem.*, **276**, 2380 (2001).
- 12) Fujiwara, H. *et al.* : *Nat. Cell Biol.*, **4**, 160 (2002).
- 13) George, J. M. *et al.* : *Neuron*, **15**, 361 (1995).
- 14) Abeliovich, A. *et al.* : *Neuron*, **25**, 239 (2000).
- 15) Nemani, V. M. *et al.* : *Neuron*, **65**, 66 (2010).
- 16) DeWitt, D. C. and Rhoades, E. : *Biochemistry*, **52**, 2385 (2013).
- 17) Chandra, S. *et al.* : *Cell*, **123**, 383 (2005).
- 18) Burre, J. *et al.* : *Science*, **329**, 1663 (2010).
- 19) Conway, K. A. *et al.* : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**, 571 (2000).
- 20) Dettmer, U. *et al.* : *Nat. Commun.*, **6**, 7314

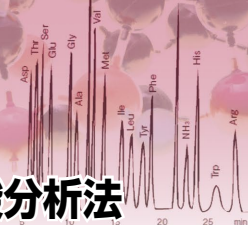
- (2015).
- 21) Souza, J. M. *et al.* : *J. Bio. Chem.*, **275**, 18344 (2000).
- 22) Mazzulli, J. R. *et al.* : *J. Neurosci.*, **26**, 10068 (2006).
- 23) Fusco, G. *et al.* : *Science*, **358**, 1440 (2017).
- 24) Mor, D. E. *et al.* : *Nat. Neurosci.*, **20**, 1560 (2017).
- 25) Mazzulli, J. R. *et al.* : *Cell*, **146**, 37 (2011).
- 26) Cremades, N. *et al.* : *Cell*, **149**, 1048 (2012).
- 27) Martinez-Vicente, M. *et al.* : *J. Clin. Invest.*, **118**, 777 (2008).
- 28) Choi, B. K. *et al.* : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **110**, 4087 (2013).
- 29) Tuttle, M. D. *et al.* : *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **23**, 409 (2016).
- 30) Volpicelli-Daley, L. A. *et al.* : *Neuron*, **72**, 57 (2011).
- 31) Winner, B. *et al.* : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **108**, 4194 (2011).
- 32) Roberts, R. F. *et al.* : *Brain*, **138**, 1642 (2015).
- 33) Osterberg, V. R. *et al.* : *Cell Rep.*, **10**, 1252 (2015).
- 34) Braak, H. *et al.* : *Neurobiol. Aging*, **24**, 197 (2003).
- 35) Braak, H. *et al.* : *Neurosci. Lett.*, **396**, 67 (2006).
- 36) Li, J. Y. *et al.* : *Nat. Med.*, **14**, 501 (2008).
- 37) Kordower, J. H. *et al.* : *Nat. Med.*, **14**, 504 (2008).
- 38) Luk, K. C. *et al.* : *Science*, **338**, 949 (2012).
- 39) Masuda-Suzukake, M. *et al.* : *Brain*, **136**, 1128 (2013).
- 40) Recasens, A. *et al.* : *Ann. Neurol.*, **75**, 351 (2014).
- 41) Lee, H. J. *et al.* : *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, **40**, 1835 (2008).
- 42) Hansen, C. *et al.* : *J. Clin. Invest.*, **121**, 715 (2011).
- 43) Alvarez-Erviti, L. *et al.* : *Neurobiol. Dis.*, **42**, 360 (2011).
- 44) Holmes, B. B. *et al.* : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **110**, E3138 (2013).
- 45) Abounit, S. *et al.* : *EMBO J.*, **35**, 2120 (2016).
- 46) Guo, J. L. *et al.* : *Cell*, **154**, 103 (2013).
- 47) Peelaerts, W. *et al.* : *Nature*, **522**, 340 (2015).
- 48) Prusiner, S. B. *et al.* : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **112**, E5308 (2015).
- 49) Woerman, A. L. *et al.* : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **112**, E4949 (2015).
- 50) Bernis, M. E. *et al.* : *Acta Neuropathol. Commun.*, **3**, 75 (2015).

今回は、「ALS (筋萎縮性側索硬化症)」
[最終回] の予定です。

24 ページにて、当社取り扱いの抗リソチアミン抗体をご紹介します。

第1回 アミノ酸分析の歴史とニンヒドリンによるアミノ酸分析法

株式会社日立ハイテクサイエンス 伊藤 正人



「アミノ酸分析～新たな潮流～」シリーズ開始にあたって

味の素株式会社 イノベーション研究所 宮野 博

アミノ酸はタンパク質の構成成分であり、代謝物としても重要である。アミノ酸測定技術は、1941年の分配クロマトグラフィーに始まるが、現在も進歩し続けており、高感度化、高速化、D-アミノ酸の高感度測定法の開発、正確な定量値を出すための環境整備等が進んでいる。アミノ酸分析技術の進歩は、生化学や栄養学始めさまざまな研究を進展させ、ひいては人々の豊かな暮らしに貢献していくものである。

本連載では、それぞれの技術を実際に牽引する先生に執筆をお願いし、アミノ酸分析の最新情報を提供する。

はじめに

アミノ酸は、生命の起源を思い描くにあたり最初にできた複雑な物質と考えられている。ただ不思議なことに私たちの体をつくるタンパク質はL-アミノ酸だけで構成されている。L-アミノ酸は光学異性体の一方であり、生命誕生の初期段階に地球内外のどこかでL-アミノ酸がD-アミノ酸より自発的に優勢になり、以降L-アミノ酸が増殖したにちがいない。このようなミステリーを解明すべく例えば地球外から飛来する生命構成物質が探索されている。なにはともあれ生命をつかさどる基本的なアミノ酸であるが、タンパク質構成アミノ酸は20成分あり、それらを分析するにはそれぞれ分子構造が類似しているためまず各成分を分離する必要がある。また大部分のアミノ酸分子には紫外線の吸収に特異性がないため、クロマトグラフィー分離法の検出手段として一般に用いられている紫外吸光度法がそのままでは利用されてこなかった。実際には後述するようないくつかの分離方法と誘導体化検出手段の組合せによる分析方法が考案されている。

アミノ酸分析法

第17改正日本薬局方には8つのアミノ酸分析法が参考情報として記載されているが¹⁾、前述の通りアミノ酸分子をそのまま検出する方法はなく何れも誘導体化アミノ酸を検出するものである(表1)。アミノ酸はアミノ基とカルボキシル基(カルボキシ基)をもつ両性イオン(双性イオン)物質であ

り、水溶液中ではイオン化している。イオンのままでは分離分析でもっぱら使用されている逆相クロマトグラフィー(逆相HPLC)が適用しづらいため、カラムに導入する前に誘導体化するプレカラム誘導体化法がいくつか考案された。イオン交換クロマトグラフィーを利用すれば、イオン自体をそのまま分離することも可能だが、検出するためには分離後に誘導体化する必要がある。こちらはポストカラム誘導体化法と呼ばれる。

表1に示す誘導体化法には一長一短がある。ポストカラム検出法は、アミノ酸の各成分をそのままイオン交換クロマトグラフィーにより分離してから反応試薬を混合し誘導体化するため希釈やピーク拡散が生じるが、反応物が複数種類生成されても反応が途中であっても影響が少ない。このため定量性、再現性に優れている。一方、プレカラム誘導体化法は反応生成物が安定で1種類であれば、逆相HPLCが利用できるため高速高感度化が図りやすい特徴がある²⁾。また反応試薬の消費量は比較的少ないが、反応効率が試料マトリックスの影響を受ける可能性がある。試薬ブランクは、プレカラム法では検出されないか分離する必要がある。

ポストカラム法では検出に影響の少ない試薬を選ばなければならない。ポストカラム法にはニンヒドリン法とOPA法があり、前者は安定性が高く、後者は感度が高いと言える。

逆相クロマトグラフィーはイオン交換クロマトグラフィーよりも高速高分離化にむいていると言われており、その分離方法を応用するプレカラム法が局方に6つ収載されている。それぞれに特色があり、まずPITC法はEdman分解に伴う誘導体化法であり、プレカラム法の原点とも呼べる。AQC法は蛍光検出法により高感度化が図られたが、システイン(Cys)の検出限界は他の成分に比べあまりよくない。OPAプレカラム法は、高感度な蛍光検出法であるが、プロリン(Pro)など2級アミンを検出できない欠点を補うため方法7または8と組み合わせて利用されている。DABS-Cl法は可視光の吸光度法を応用し、PITC法に比較して高選択性・高感度化がなされた。FMOC-Cl法は2級アミンの高感度分析が可能であるがヒスチジン(His)誘導体が分解されやすく安定測定が難しいため、OPAプレカラム法と併用される場合がある。最後のNBD-F法は2級アミンを含めて分析できるため実用的な高

表1. 日本薬局方におけるアミノ酸分析法の記載事項

方法	アミノ酸分析法	分離方法	検出波長	検出限界	直線性・範囲
方法1	ニンヒドリンによるポストカラム検出法	イオン交換クロマトグラフィー	吸光1: 570 nm 吸光2: 440 nm	約10 pmol Proは約50 pmol	20~500 pmol
方法2	OPAによるポストカラム蛍光検出法	イオン交換クロマトグラフィー	励起348 nm 蛍光450 nm	数10 pmol Proは特別処理で検出可能	数pmol~ 数10 nmol
方法3	PITCプレカラム誘導体化法	逆相HPLC	吸光245 nm	ほとんど1 pmol	20~500 pmol
方法4	AQCプレカラム誘導体化法	逆相HPLC	励起250 nm 蛍光395 nm	成分により約40~320 fmol Cysは約800 fmol	2.5~200 μmol/L
方法5	OPAプレカラム誘導体化法	逆相HPLC	励起348 nm 蛍光450 nm	50 fmol、実際は1 pmol Proは検出できない	-
方法6	DABS-Clプレカラム誘導体化法	逆相HPLC	吸光436 nm	約1 pmol	2~5 pmolが定量限界
方法7	FMOC-Clプレカラム誘導体化法	逆相HPLC	励起260 nm 蛍光313 nm	数fmol His誘導体は分解していく	0.1~50 μmol/L
方法8	NBD-Fプレカラム誘導体化法	逆相HPLC	励起480 nm 蛍光530 nm	約10 fmol	-



感度法として位置づけられている。

一口にアミノ酸と言っても、Pro、Cys、His などに対して各分析法にそれぞれの適用性があり、用途に応じて使いこなす必要がある。本稿では標準的な方法として永く利用されているニンヒドリンによるポストカラム検出法にフォーカスし、アミノ酸分析の歴史を振り返る。



図1. KLA-2形(1962) 図2. 835形(1977) 図3. LA8080 AminoSAAYA® (2017)

ニンヒドリン法の歴史

歴史をさかのぼること³⁾ 1948年、MooreとSteinがアミノ酸分析のクロマトグラフィーで使用するためのニンヒドリン光度法を報告した。でん粉クロマトグラフィーを利用し、反応生成物の吸光度スペクトルやアミノ酸各成分のニンヒドリン反応特性が検討された。1958年にSpackmanは両博士とともにアミノ酸のクロマトグラフィー利用のための自動記録クロマトグラフィー装置を発表した⁴⁾。これがちょうど表1のニンヒドリンによるポストカラム検出法のさきがけとなった。1962年、日立製作所は同様のKLA-2形アミノ酸分析計⁵⁾を完成した(図1)。国産初となったKLA-2形は内径9mm、長さ50cmと150cmのガラス製カラムを2本搭載していた。当時はまだ充てん剤のイオン交換樹脂は破砕状であり、粒径は約300~1,000μmもあった。短い方のカラムによりリジン(Lys)~アルギニン(Arg)の塩基性アミノ酸を先に4時間で、長い方でアスパラギン酸(Asp)からフェニルアラニン(Phe)までの酸性・中性アミノ酸を15時間かけて分析した。試料添加などを含めるとおよそ1日に1検体ベースの分析法であった。

1977年4月、ニュージーランド沖で日本のトロール船が謎の動物を捕獲し、ネス湖のネッシーのようなプレシオサウルスではないか、もしかしたら怪獣を発見したかもしれないとのニュースが報じられた⁶⁾。甲板に付着したひげ状の前びれが日立製作所那珂

工場に持ち込まれ、当時の最新鋭機によりアミノ酸組成分析が試みられた。特徴的なコラーゲンの組成を示したためサメ(フカ)のひれの棘条(きょくじょう)であることが判明し、怪獣の夢は発見から3か月後水泡に帰してしまった。この時に使用された835形から10MPa以上の高圧力をかけて分析する高速液体クロマトグラフィー(HPLC)としてのアミノ酸分析計の時代が始まった(図2)。充てん剤は粒径5μmにまで微粒子化された球形の樹脂が採用された。内径4mm長さ150mmのステンレス鋼カラムを用いて酸性から中性、塩基性アミノ酸まで1本のカラムで分析可能となった。タンパク質加水分解物のアミノ酸18成分を約50分間で分析できるところまで高速化された。

ニンヒドリン法の現在

2017年、コンパクトな卓上型高速アミノ酸分析計LA8080が公表された⁷⁾(図3)。ニンヒドリン法の測定原理はMooreらの報告⁴⁾と同じであるが、最新の流路図を用いて説明する(図4)。溶離液として、タンパク質加水分解物であるアミノ酸約20成分の分析法にはクエン酸ナトリウム系の緩衝液が、生体由来の約40成分にはクエン酸リチウム系の緩衝液が用いられている。溶離液はポンプ1により送液され、アンモニア除去用のフィルタカラムを経て、オートサンプラに至る。アスパラギン(AspNH₂)やグルタミン(GluNH₂)は酸化されやすく、それを

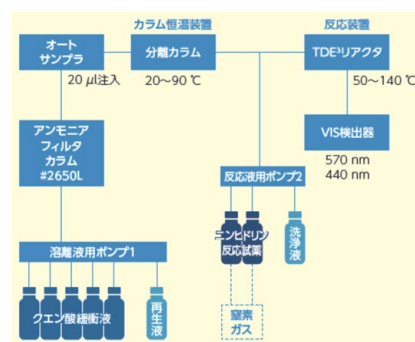


図4. ニンヒドリン法の流路図

抑えるためには冷蔵保存が有効である。カラムは、スルホン酸基が導入された強酸性のイオン交換樹脂(粒径3μm)が充てんされ、ペルチエ方式のカラム恒温装置により温度コントロールされる。ポストカラム誘導体化のため分離カラムから溶出された各アミノ酸成分に対し、ポンプ2からのニンヒドリン反応液を合流・混合する。反応装置はカートリッジタイプのTDE³⁾(キューブ)リアクターを135°Cで恒温する。検出器は、アミノ酸の反応生成物であるRuhemann's purpleの吸光度極大である可視光570nmで検出する³⁾。一方、2級アミンであるProとヒドロキシプロリン(Hypro)からはRuhemann's purpleが生成されず、440nmで検出する。この検出波長はMooreらの装置⁴⁾とまったく同一である。

タンパク質の加水分解は一般に6mol/L塩酸を用いて110°C 24時間の条件下で行われる。Cysやメチオニン(Met)を正確に定量分析する場合、過ギ酸酸化してから塩酸を用いて加水分解する方法もある。またトリプトファン(Trp)を測定する場合にはア



ルカリで加水分解する方法もある。ニンヒドリン法のアプリケーションとして、タンパク質加水分解物分析法のクロマトグラム（標準試料各成分 2 nmol 注入、カラム温度 57°C 一定）を図 5 に示す。イソロイシン (Ile) とロイシン (Leu) は分子構造が類似しており、クロマトグラフィーの分離は難しい。その分離度として 1.2 以上が得られた。さらに SN 比 2 で Asp の検出限界 2.5 pmol 以下、グリシン (Gly) とヒスチジン (His) のピーク面積再現性 RSD1.0% 以下の結果であった。なお Cys は標準試料中ではジスルフィド結合をしたシスチンの状態で存在している。

もう一つのアプリケーションとして生体液分析法もある。その名の通り動物試料の血清や尿などを分析するわけだが、健康サプリメントおよびワインや醤油などの食品中のタウリン (Tau)、ギャバ (γ -ABA)、オルニチン (Orn) などアミノ酸類縁物質を含めて約 40 成分も分析できる。温度タイムプログラムを駆使する生体液分析法（標準試料各成分 2 nmol 注入）も良好なクロマトグラムが得られた（図 6）。AspNH₂ や GluNH₂ が分離される以外に、例えばジペプチドのアンセリン (Ans) やカルノシン (Car) が検出されている。ハイドロキシリジン (Hylys) には立体異性体があり、カラムが良好な時はダブルピークになって見えることがある。また、シトルリン (Cit) と α -アミノ酪酸 (α -ABA)、あるいは 1-メチルヒスチジン (1-Mehis)

や 3-メチルヒスチジン (3-Mehis) も分離が難しい成分である。

最後に今なお Moore らのポストカラムニンヒドリン法が広く利用されている理由を述べたい。一つは分離方法にある。アミノ基に起因するカチオンを交換するクロマトグラフィーがベースであり⁸⁾、基本的にはアミノ酸各成分の等電点の順番に保持時間が並ぶ。ただそれだけでは説明できない分離のメカニズムが存在する。それは充てん剤担体であるスチレンとジビニルベンゼンの共重合体が寄与する疎水性相互作用モードである。例えば、フェニルアラニンとチロシンなど芳香族アミノ酸の分離に効果があると考えられる。分析法開発者は溶離液組成や、ステップワイズ溶離の切り替えタイミング、カラム温度コントロールなどによりイオン交換と疎水性相互作用をたくみに操り、目的成分の分離を実現することができる。

今一つはニンヒドリンを用いるポストカラム誘導体化法に特長がある。こちらにもアミノ基が鍵となり、Ruhemann's purple を生成する。ポストカラム法は試料中の夾雑成分を分離することができるため、夾雑物に妨害されづらい。このため食品や生物由来の実試料であっても除タンパクとフィルタリングだけ確実に前処理しておけば、一定のデータが得られる高い信頼性がある。Ruhemann's purple 生成の特異性が高く、かつ可視光域の吸光度を測定しているためクロマトグラムに

夾雑ピークがほとんど出現しない。このような理由により高い定量再現性が得られ、さらに検出のダイナミックレンジも広く 4 桁以上の直線性が確保できる。加えてニンヒドリン試薬も冷暗所に保管しておけば劣化しづらく安定である。

おわりに

多くのアミノ酸分析法の中でも特にポストカラムニンヒドリン法は、分離法を検討すれば分析時間がかかっても一定の分離度が確保でき、最終的に高い定量精度が得られることが魅力になっていると言えよう。冒頭に述べた非対称性研究などのために D-アミノ酸を L-アミノ酸から分離する分析法については本連載に掲載されることを期待して筆を置きたい。

謝辞

味の素イノベーション研究所 基盤技術研究所の宮野博所長と小澤真一研究員、ならびに出口喜三郎 元北海道大学特任教授にご指導いただきましたこと心より感謝申し上げます。

【参考文献】

- 1) 一般財団法人 医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス財団編：「第十七改正日本薬局方」（じほう）（2016）。
- 2) 中村 洋監修：「ちょっと詳しい液クロのコツ前処理編」（丸善）（2006）。
- 3) 小澤真一、宮野博、伊藤正人：S. I. NEWS, 58, 4968 (2015)。
- 4) Spackman, D. H. et al. : Anal. Chem., 30, 1190 (1958)。
- 5) 宇井信生、岩永貞昭、崎山文夫共編：「タンパク質・ペプチドの高速液体クロマトグラフィー」（化学同人）（1984）。
- 6) 伊藤正人：ぶんせき, 2010, 145 (2010)。
- 7) 伊藤正人、成松郁子、裴敏伶、森崎敦己、鈴木裕志、福田真人、八木隆、大月繁夫、関一也、豊崎耕作：S. I. NEWS, 61, 5360 (2018)。
- 8) 中村 洋監修：「ちょっと詳しい液クロのコツ分離編」（丸善）（2007）。

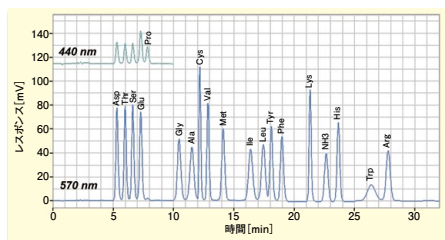


図 5. タンパク質加水分解物分析法

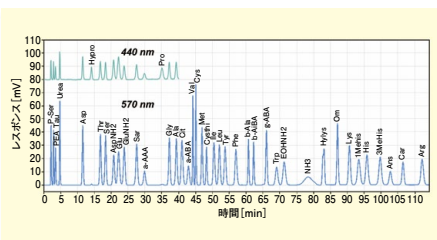
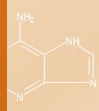


図 6. 生体液分析法

コード No.	品名	規格	容量	希望納入価格(円)
299-70501	Ninhydrin Coloring Solution Kit for HITACHI	日立高速アミノ酸分析計用	2L用	15,000

Refr: 2 ~ 10°C 保存 F: 20°C 保存 30: 80°C 保存 50: 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、2018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3回 オリゴヌクレオチド合成におけるカップリング反応

DNA 及び RNA は、構成単位である核酸が、リン酸ジエステル結合によって多数結合した構造をとる。このリン酸ジエステル結合は、他の低分子化合物ではほとんど見られない結合であり、独特な合成法が開発されている。

核酸合成においては、この結合生成反応を何度も繰り返すことになるため、その効率は全体の収率を大きく左右する。今回は、このリン酸ジエステル結合生成反応について解説してゆく。

カップリング反応の歴史

1950年代、核酸合成が初めて行われた頃に用いられたのは、ホスホクロリダートを経由する方法であった¹⁾。形式上、酸塩化物とアルコールの反応によるカルボン酸エステル合成の、リン酸版に当たる。

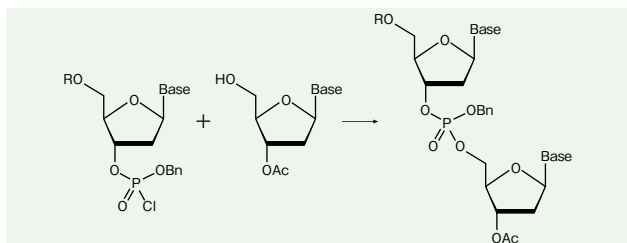


図1. ホスホクロリダートを経由する合成法

核酸合成の開祖といわれる H. G. Khorana は、保護されたヌクレオチドのリン酸部分と、5'位が保護されたヌクレオチドを、直接カップリングさせる方法を開発した²⁾。縮合剤としては、*N,N'*-ジシクロヘキシルカルボジイミド (DCC) または塩化 *p*-トルエンルスホニル (TsCl) が用いられた。これは「リン酸ジエステル法」と呼ばれることがある。

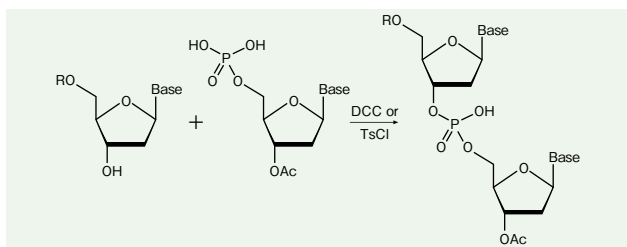


図2. Khorana によるリン酸ジエステル法

ただしこの方法では、リン酸のヒドロキシ基が両方とも反応しうするため、ヌクレオチドが2つ導入された枝分かれ核酸が副生成物として生成してしまう。これを防ぐため、1960年代には R. Letsinger らおよび C. Reese らによって、「リン酸トリエステル法」が開発された³⁾。これは、リン酸のヒドロキシ基のひとつを 2-シアノエチル基で保護した上で、カップリングを行う手法である。シアノエチル基は、オリゴヌクレオチド鎖延長反応終了後に、濃アンモニア水で処理することで、核酸塩基の保護基（前回記事参照）と共に切除される（図3）。

こうした工夫が重ねられてはきたが、核酸合成においてはこの反応を数十回繰り返す必要があるため、その効率は十分とはいえなかった。たとえば収率90%の工程でも、30回繰り返す

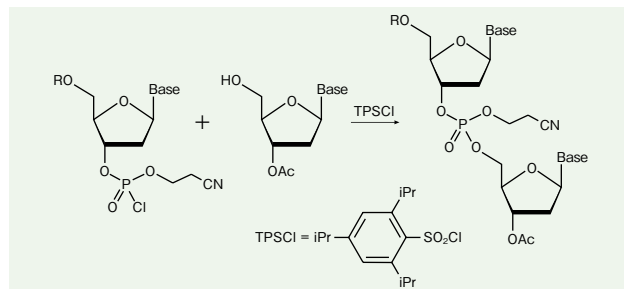


図3. リン酸トリエステル法

と総収率は4.2%にしかならないため、できうる限り収率100%に近づける必要がある。

そこで1970年代に入ってから、重リン酸トリエステル法が開発された。四配位のリン酸エステル結合よりも、三配位の重リン酸エステル結合の方が作りやすいという知見に基づく発想であった。重リン酸エステル結合の安定性は高くないので、エステル結合生成後に改めて酸化を行ない、リン酸エステルに変換する必要がある。このため工程数は増えるが、全体として収率向上につながるため、この方法が受け入れられていった（酸化反応については次回で詳述）。

ホスホアミダイト法

こうした中、核酸合成におけるカップリング反応の決定版として登場したのが、ホスホアミダイト法である⁴⁾。リン原子に、ヌクレオチド（またはデオキシヌクレオチド、以下同様）の3'位とシアノエトキシ基、ジアルキルアミノ基が結合した図4のような化合物が、一般にホスホアミダイトと呼ばれる。ジアルキルアミノ基としては、ジイソプロピルアミノ基が最もよく用いられる。これより小さければ安定性に欠け、かさ高ければ反応性が低下するためである。

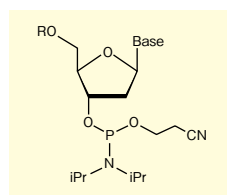
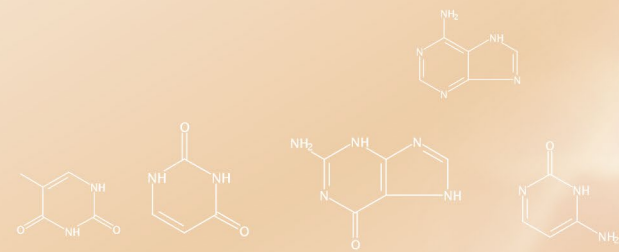


図4. ホスホアミダイト

適切に保護されたヌクレオチドに対し、活性化剤となる 1*H*-テトラゾールと共にこのユニットを作用させると、置換反応が起こって両者がカップリングする。活性化剤となるテトラゾールは、2つの役割を演じる。まずテトラゾールからプロトンが放出され、ホスホアミダイトの窒素原子に結合して活性化される。ここからジイソプロピルアミンが脱離し、テトラゾリル基と置換したものが活性種となる、これが5'位ヒドロキシ基と反応して、カップリングが成立する。

活性化剤として 1*H*-テトラゾールは有効だが、低温では結晶が析出してしまふことがある。このため、溶解度の高い 2-エチルチオテトラゾール、2-ベンジルチオテトラゾールなどが用い



られることもあり、1*H*-テトラゾールよりも反応が早く終了することが多い。また、4,5-ジシアノイミダゾールなども用いられる。

ヌクレオチド鎖が結合した固相担体に対し、0.02 ~ 0.2M のホスホロアミダイトのアセトニトリル溶液、0.2 ~ 0.7M の活性化剤のアセトニトリル溶液を流し込んで反応させる。ヌクレオチド鎖に対し、モル比でホスホロアミダイトを5倍程度、活性化剤を20倍程度過剰に用いて、徹底的に反応を進行させる。

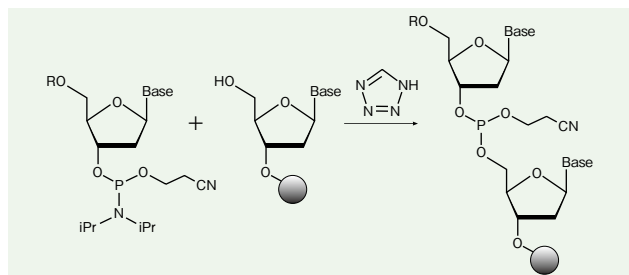


図5. ホスホロアミダイト法によるカップリング

立体障害の少ないDNA合成の場合には数十秒で反応が終了するが、RNA合成の場合には5分から15分ほどの時間を要する。またホスホロアミダイトは水分に弱いので、溶媒などではできる限り乾燥させたものを用いる。反応終了後はアセトニトリルで担体を徹底的に洗浄し、過剰の試薬を除去する。

ホスホロアミダイトの合成

天然の各ヌクレオシドのホスホロアミダイトは市販されているので、通常はこれを反応に用いる。ただし特殊なヌクレオシドなどを用いる場合には、ホスホロアミダイトを自製する必要がある。

適切に保護されたヌクレオシドに対し、2-シアノエチル-*N,N,N',N'*-テトライソプロピルホスホロジアミダイトを作用させることで、目的とするホスホロアミダイトを得られる⁵⁾。

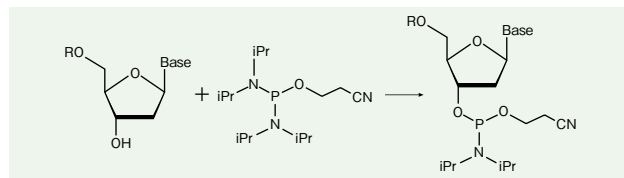


図6. ホスホロアミダイトの合成

なお、2-シアノエチル-*N,N,N',N'*-テトライソプロピルホスホロジアミダイトは不安定な化合物なので、使用時に調製する必要がある^{6,7)}。

ヌクレオシドのホスホロアミダイトは、低温、無水の固体状態ではほぼ安定に保存できる。溶液中でも、中性ではかなり安定だが、酸性ではほぼ瞬時に分解してしまう。このため、保存には気を配る必要がある。できたホスホロアミダイトは、シリカゲルカラムで精製を行うことも可能だが、展開溶媒に数%のトリエチルアミンを添加し、弱塩基性を保ちながら溶出させることが望ましい。

なお、ホスホロアミダイトのリン原子は不斉点となるため、分子全体としてジアステレオマーとなる。このため、TLCでは2つのスポットが見えることがあり、NMRでも両ジアステレオマーのピークが観測されるので、注意する必要がある。

次回、酸化反応を含めた合成プロトコルの流れについて解説する。

【参考文献】

- 1) Michaelson, A. M. and Todd, A. R. : *J. Chem. Soc.*, 2632 (1955).
- 2) Gilham, P. T. and Khorana, H. G. : *J. Am. Chem. Soc.*, **80**, 6212 (1958).
- 3) Reese, C. B. : *Tetrahedron*, **34**, 3143 (1978).
- 4) Beaucage, S. L. and Caruthers, M. H. : *Tetrahedron Letters*, **22**, 1859 (1981).
- 5) Nielsen, J. *et al.* : *Nucleic Acids Res.*, **14**, 7391 (1986).
- 6) Nielsen, J. *et al.* : *Nucleic Acids Res.*, **15**, 3626 (1987).
- 7) Beaucage, S. L. : *e-EROS (Encyclopedia of Reagents for Organic Synthesis)*, doi : 10.1002/047084289.X.rn.00312

オリゴヌクレオチド合成 アクチベーター試薬

Wako

コード No.	品名	規格	容量	希望納入価格(円)
016-27561	Activator-1 (4,5-Dicyanoimidazole)	核酸合成用	5g	10,000
014-27562	水分値 : 300ppm 以下		25g	22,000
019-27551	Activator-4 (5-Ethylthio-1 <i>H</i> -tetrazole)	核酸合成用	5g	12,000
017-27552	水分値 : 300ppm 以下		25g	30,000
013-19685	Activator Solution-1 (0.25mol/L 4,5-Dicyanoimidazole, Acetonitrile Solution)	核酸合成用	500mL	照会
011-19681	水分値 : 30ppm 以下		3L	照会
011-19701	Activator Solution-2 (0.45mol/L 1 <i>H</i> -Tetrazole, Acetonitrile Solution)	核酸合成用	3L	照会
015-20015	Activator Solution-3 (0.25mol/L 5-Benzylthio-1 <i>H</i> -tetrazole, Acetonitrile Solution)	核酸合成用	500mL	8,500
013-20011	水分値 : 30ppm 以下		3L	照会
018-19691	Activator Solution-4 (0.25mol/L 5-Ethylthio-1 <i>H</i> -tetrazole, Acetonitrile Solution)	核酸合成用	3L	照会

その他オリゴヌクレオチド合成に使用する商品を取り扱っています。当社 HP をご覧下さい。

<https://labchem.wako-chem.co.jp/synthesis/nucleic-acid-synthesis/cat/>

体液検体中 細胞外小胞の解析ツール

PS Capture™ エクソソームELISAキット(ストレプトアビジンHRP)

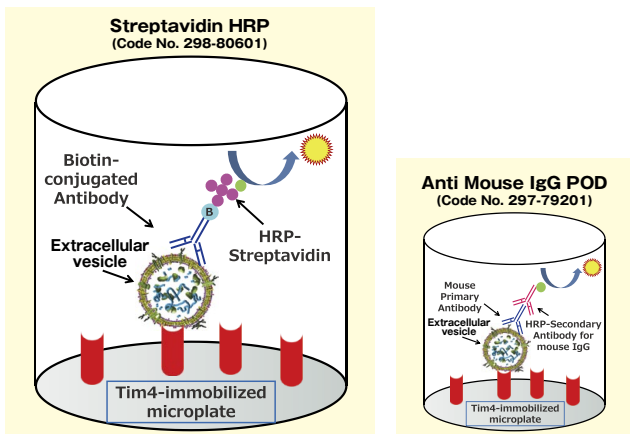
Wako

本キットは、細胞培養上清や体液検体中の細胞外小胞の定性解析及び定量解析に利用できる酵素免疫測定試薬です。細胞外小胞表面のホスファチジルセリン (PS) と特異的に結合するタンパク質を固相化したプレートに細胞外小胞を反応させて固定化した後、目的の細胞外小胞表面マーカータンパク質に対するビオチン標識抗体を一次検出に、キット付属の HRP 標識ストレプトアビジンを二次検出に用いて、目的のマーカータンパク質を表面に有する細胞外小胞を高感度に検出することができます。そして、さまざまな動物種のビオチン標識抗体を一次検出に用いることができます。また、二次検出に HRP 標識ストレプトアビジンを採用しており、血液成分への非特異結合が低いため、血液サンプル中の細胞外小胞を高感度に検出できます。

特長

- 高感度 (ウエスタンブロットの 50 ~ 1,000 倍の感度で検出可能)
- 細胞培養上清や体液検体中の細胞外小胞を直接定性・定量可能
- 解析に使用する細胞外小胞量を節約可能 (ウエスタンブロットの 10 ~ 1,000 分の 1 以下)
- 血清及びヘパリン血漿は 2 倍希釈以上で測定可能 (総反応液量 100 μL に対して血清 / ヘパリン血漿量は 50 μL まで)

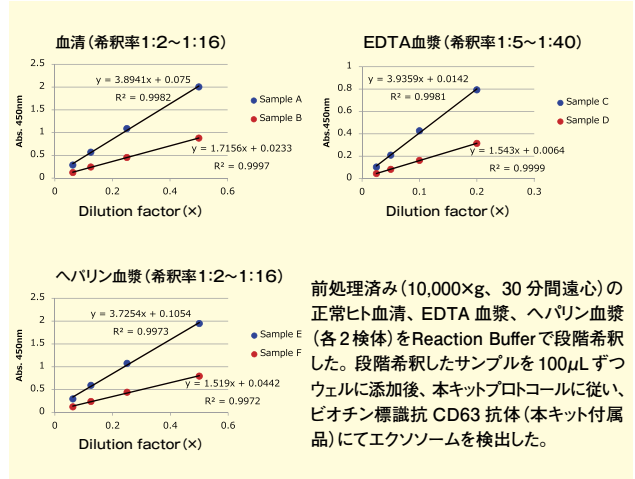
測定原理



当社キット PS Capture™ Exosome ELISA Kit (Anti Mouse IgG POD) (Code No. 297-79201) (図右) では、一次抗体にマウス抗体、二次抗体に抗マウス IgG 抗体を用いていましたが、本キット (図左) ではビオチン標識抗体を一次検出、二次検出に HRP 標識ストレプトアビジンを用いています。そのため、抗体種に依存せずに細胞外小胞を解析できます。

データ

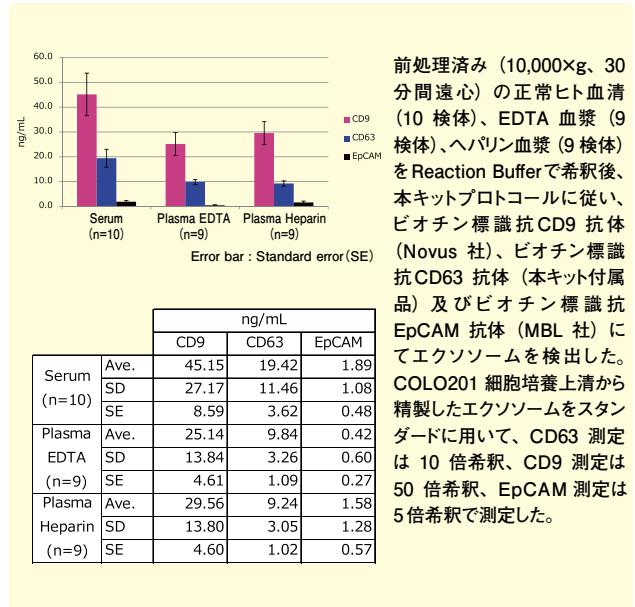
血液検体の希釈直線性



血清、EDTA 血漿及びヘパリン血漿を各 2 検体用意し、CD63 測定における希釈直線性を評価した。

結果、血清とヘパリン血漿の場合、CD63 測定において 2 倍希釈以上で良好な直線性を確認できた。EDTA 血漿の場合、5 倍希釈以上で良好な直線性を確認できた。

ヒト正常血液検体中のエクソソームマーカー相対濃度の測定

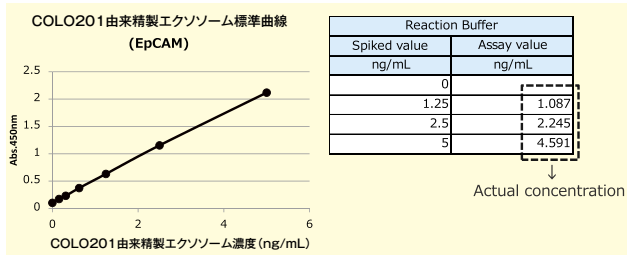


正常血液検体としてヒト血清 (10 検体)、EDTA 血漿 (9 検体)、ヘパリン血漿 (9 検体) を用意し、エクソソームマーカーの CD63 及び CD9、がん細胞エクソソーム特異的のマーカーとして報告されている EpCAM の測定を行った。

結果、エクソソームマーカーの CD63 及び CD9 は各血液検体で検出されたが、がん細胞エクソソーム表面抗原の EpCAM は極微量であることが示された。

[次頁に続く]

COLO 201由来精製エクソソームの添加回収試験



Reaction Buffer	
Spiked value ng/mL	Assay value ng/mL
0	
1.25	1.087
2.5	2.245
5	4.591

Actual concentration

血清 (希釈率 1:2)			
Actual conc. of spiked-in ng/mL	Assay value ng/mL	Recovery value ng/mL	Recovery rate %
0	0.381		
1.087	1.418	1.037	95
2.245	2.377	1.996	89
4.591	4.429	4.048	88

EDTA血漿 (希釈率 1:2)			
Actual conc. of spiked-in ng/mL	Assay value ng/mL	Recovery value ng/mL	Recovery rate %
0	1.861		
1.087	2.945	1.084	100
2.245	3.898	2.037	91
4.591	6.007	4.146	90

ヘパリン血漿 (希釈率 1:2)			
Actual conc. of spiked-in ng/mL	Assay value ng/mL	Recovery value ng/mL	Recovery rate %
0	0.433		
1.087	1.524	1.091	100
2.245	2.566	2.133	95
4.591	4.719	4.286	93

COLO201 細胞培養上清から MagCapture™ Exosome Isolation Kit PS [コード No. 293-77601] を用いてエクソソームを精製し、各濃度の精製エクソソームを前処理済み (10,000 × g, 30 分間遠心) のプール正常ヒト血清、EDTA 血漿、ヘパリン血漿 2 倍希釈液に添加した。添加サンプル中のエクソソームを、本キットプロトコルに従い、ビオチン標識 EpCAM 抗体 (MBL 社) にて検出した。

COLO201 細胞由来精製エクソソームを用いて標準曲線を作成し、各サンプルの添加回収率を算出した。

プール血清、EDTA 血漿、ヘパリン血漿の 2 倍希釈液を用意し、COLO201 細胞培養上清から精製した 3 濃度の COLO201 由来エクソソームを添加し、EpCAM 測定における回収率を求めた。

添加回収率は、EpCAM 測定においては 100% ± 10% 程度に収まっており、良好な回収性能を示した*。

※【血液検体の希釈直線性】を加味し、EDTA 血漿においては、5 倍以上希釈して測定することを推奨します。

コード No.	品名	規格	容量	希望納入価格 (円)
298-80601	PS Capture™ Exosome ELISA Kit (Streptavidin HRP)	遺伝子研究用	96回用	58,000

関連商品

コード No.	品名	用途	規格	容量	希望納入価格 (円)
299-77603	MagCapture™ Exosome Isolation Kit PS	精製	遺伝子研究用	2回用	20,000
293-77601	PS Capture™ Exosome ELISA Kit (Streptavidin HRP)	精製	遺伝子研究用	10回用	80,000
297-79201	PS Capture™ Exosome ELISA Kit (Anti Mouse IgG POD)	定性 / 定量解析	遺伝子研究用	96回用	58,000
297-79701	PS Capture™ Exosome Flow Cytometry Kit	定性解析	遺伝子研究用	300回用	30,000
016-27061	Anti CD63, Monoclonal Antibody (3-13)	免疫化学用	20μL	9,000	
012-27063	Anti CD63, Monoclonal Antibody (3-13)	定性解析	100μL	30,000	

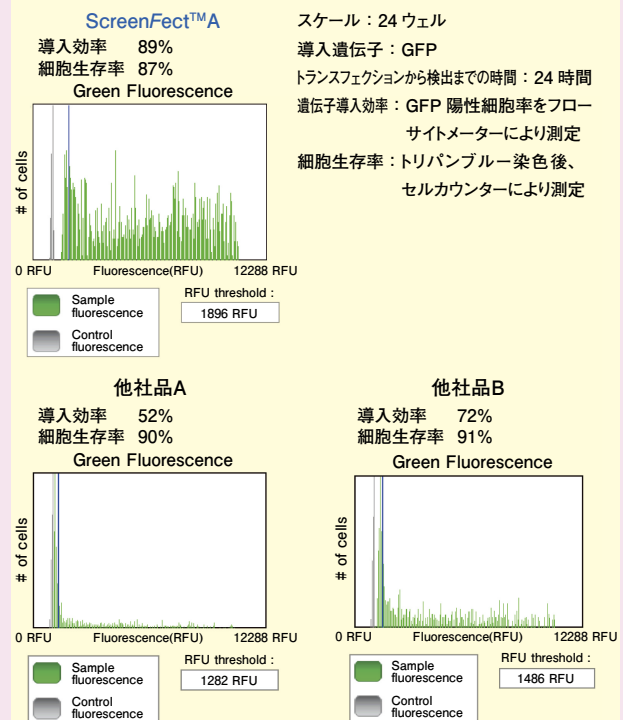
RF... 2 ~ 10℃ 保存 F... 20℃ 保存 R... 80℃ 保存 RS... 150℃ 保存 表示がない場合は室温保存です。その他の略号は、巻末をご参照下さい。掲載内容は、2018 年 7 月時点での情報です。最新情報は、siyaku.com (http://www.siyaku.com/) をご参照下さい。

Experimental Data

高性能かつ安価なトランスフェクション試薬 ScreenFect™ A

Wako

本品を用いた HEK293T 細胞への遺伝子導入結果をご紹介します。



スケール：24 ウェル
導入遺伝子：GFP
トランスフェクションから検出までの時間：24 時間
遺伝子導入効率：GFP 陽性細胞率をフローサイトメーターにより測定
細胞生存率：トリパンブルー染色後、セルカウンターにより測定

ScreenFect™ A が最も高い遺伝子導入効率を示した。(データご提供：埼玉医科大学 医学部微生物学 村上教授)

商品情報詳細・サンプル依頼は WEB ページへ

各商品の詳細は WEB ページでご覧頂けます。導入実績データも公開しています。

コード No.	品名	規格	容量	希望納入価格 (円)
293-73201	ScreenFect™ A	遺伝子研究用	0.2mL	8,000
299-73203			1mL	30,000
297-73204			1mL×5	120,000

関連商品

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

アルツハイマー病研究に

Tau ELISA キットワコー

Wako

Tau は、微小管結合タンパク質の一つで、主に中枢神経系の神経細胞に発現しており、微小管の安定性を制御しています。アルツハイマー病患者の脳では、りん酸化 Tau が蓄積した神経原線維変化が形成され、その出現の程度が認知症の重症度と相関すると報告されています。そのため、Tau はアルツハイマー病の原因究明や治療薬開発のために研究されています。一方、脳脊髄液中の総 Tau とりん酸化 Tau の濃度はアルツハイマー病患者で非認知症患者よりも上昇すると報告されています。

本品は、Tau を簡便に測定できる ELISA キットです。りん酸化状態に関わらず、すべての Tau を定量することができます。

特長

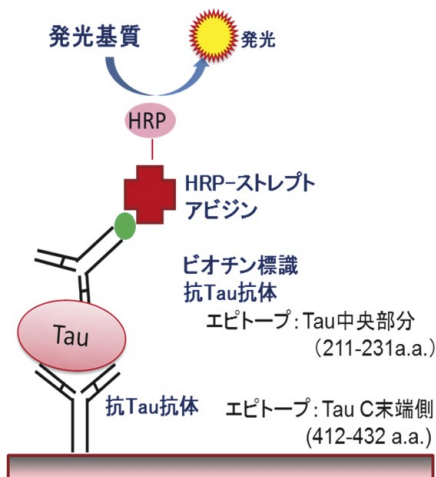
- 少量検体で測定可能
- 高感度

性能

検量線範囲	4.10 ~ 1,000pg/mL
測定対象	Total Tau
測定対象検体	ヒト脳脊髄液 (CSF)
必要検体量	10 μ L ~*1
測定時間	3 時間
検出法	発光系

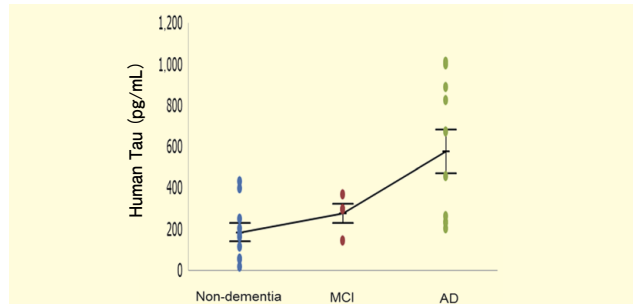
*1 希釈の正確さを考慮して CSF 検体量は 50 μ L を推奨しています。

測定原理



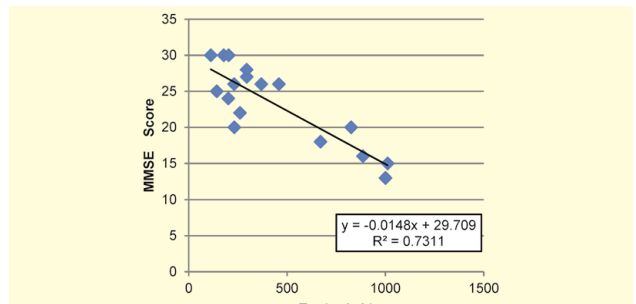
測定例

ヒト脳脊髄液中の Tau の測定



非認知症者 (non-dementia)、軽度認知障害患者 (MCI)、アルツハイマー病患者 (AD) の脳脊髄液を本キットで測定したところ非認知症者 (non-dementia)、軽度認知障害患者 (MCI)、アルツハイマー病患者 (AD) の間で有意差が見られた。

認知機能診断テスト (MMSE スコア) との相関データ



23 点以下：認知症の疑い 24-27 点：軽度認知障害の疑い 28-30 点：正常

本キットで測定した脳脊髄液中の Tau 濃度と脳脊髄液を採取した患者の MMSE スコアの相関性を検討した。Tau の濃度と MMSE スコアに相関が見られた。

キット内容

- Antibody-coated Plate 1 プレート
- Tau Standard 1 本
- Buffer 60mL \times 1 本
- Biotin-conjugated Antibody Solution 100 μ L \times 1 本
- Peroxidase-conjugated Streptavidin Solution 100 μ L \times 1 本
- Luminescent Reagent 1 6mL \times 1 本
- Luminescent Reagent 2 6mL \times 1 本
- Wash Solution (10 \times) 100mL \times 1 本
- Sample Buffer 1 0.6mL \times 1 本
- Sample Buffer 2 30mL \times 1 本
- Plate Seal 3 枚

コード No.	品名	規格	容量	希望納入価格 (円)
296-80401	Tau ELISA Kit Wako	免疫化学用	96回用	98,000

抗 Tau, モノクローナル抗体も取揃えています。当社 HP にてデータをご紹介しています。

Tau 抗体 和光

検索

パーキンソン病の研究に

Wako

抗リン酸化 α -シヌクレイン, モノクローナル抗体(pSyn#64)

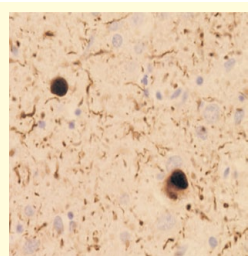
抗リン酸化 α -シヌクレイン, モノクローナル抗体(pSyn#64), ビオチン結合

パーキンソン病、レビー小体型認知症 (DLB) などの神経細胞に特異的に出現するレビー小体は、セリン 129 残基が特異的にリン酸化を受けた α -シヌクレインタンパク質を含んでいます。本品は、正常な α -シヌクレインとは反応せず、蓄積したリン酸化 α -シヌクレインのみを認識するため、レビー小体関連病変の研究にご利用頂けます。

製品概要

	抗リン酸化 α -シヌクレイン, モノクローナル抗体 (pSyn#64)	抗リン酸化 α -シヌクレイン, モノクローナル抗体 (pSyn#64), ビオチン結合
標識体	未標識	ビオチン
クローンNo.	pSyn#64	
サブクラス	マウスIgG	
抗原	セリン129がリン酸化されたヒト α -シヌクレインの 124-134残基	
種交差性	ヒト、マウス、ラット	
組成	血清含有培地上清, 0.05% アジ化ナトリウム	PBS, 0.05% アジ化ナトリウム
実用希釈倍率	免疫組織染色 (1:1,000 ~ 10,000) ウエスタンブロット (1:1,000 ~ 10,000)	免疫細胞染色 (1:200 ~ 5,000) 免疫組織染色 (1:200 ~ 5,000)

使用例



本品を用いたレビー小体型認知症の脳切片免疫組織染色像。病変部位であるレビー小体が特異的に染色されている。

(データご提供：東京大学大学院医学系研究科 岩坪威先生)

コード No.	品名	規格	容量	希望納入価格 (円)
015-25191	Anti Phosphorylated α -Synuclein, Monoclonal Antibody (pSyn#64)	免疫化学用	50 μ L	30,000
010-26481	Anti Phosphorylated α -Synuclein, Monoclonal Antibody (pSyn#64), Biotin-conjugated	免疫化学用	100 μ L	45,000

当社では、その他、A β やタウ関連試薬を取扱っています。22 ページにて高分子アミロイド β オリゴマー ELISA キット、23 ページにて Tau ELISA キットをご紹介します。また、当社 HP で上記抗体の染色画像などのデータを掲載していますので、是非、ご覧下さい。

和光 シヌクレイン

検索

VCAM-1 産生阻害作用物質

Wako

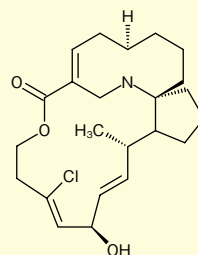
ハリクロリン

ハリクロリンは、クロイツカイメン由来のアルカロイドです¹⁾。VCAM-1 産生阻害作用を示します²⁾。また、NF- κ B 活性化の阻害を介し、内皮への単球接着を減少させる³⁾、血管平滑筋細胞において L-型 Ca²⁺ チャネルを阻害する⁴⁾と報告されています。

VCAM-1 は、IL-4、TNF などの刺激により血管内皮細胞に発現し白血球と強力に接着する細胞接着分子で、炎症、がん、移植臓器拒否反応などに深く関わると考えられており、ハリクロリンは、抗炎症、抗がん、免疫抑制のリード化合物となる可能性があります。

製品概要

- 外観：白色の固体
- メタノール溶状：試験適合
- 含量 (HPLC)：94.9% (初回生産ロット実測値)



C₂₃H₃₂ClNO₃=405.96
CAS RN® 178176-75-5

【参考文献】

- 1) Kuramoto, M. et al. : *Tetrahedron Lett.*, **37** (22), 3867 (1996).
- 2) Kuramoto, M. et al. : *Mar. Drugs*, **2**, 39 (2004).
- 3) Tsubosaka, Y. et al. : *J. Pharmacol. Sci.*, **113**, 208 (2010).
- 4) Tsubosaka, Y. et al. : *Eur. J. Pharmacol.*, **628**, 128 (2010).

コード No.	品名	規格	容量	希望納入価格 (円)
089-10441	Halichlorine	生化学用	100 μ g	55,000

当社では、海洋天然物由来毒性成分を多数取扱っています。下記当社 HP にてご紹介しています。

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

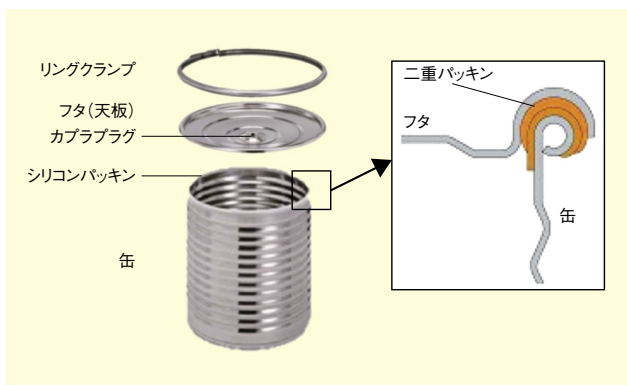
和光 海洋天然物由来毒性成分

検索

耐高真空性能 多目的ステンレス缶！ 株式会社スギヤマゲン

キミツ

本品は、極めて優れた耐高真空性能をもつフルオープンタイプのステンレス缶です。独特な構造の二重パッキンが缶内の真空度の上昇に従って缶とフタの間にくい込むため強力に密閉します。



特長

- 独自構造のステンレス缶（SUS-304 製）
 - 板厚 1.5mm ながら、缶の胴体はリブで補強し、フタと底は内側へ湾曲成型してあるため、約 -0.1Mpa の真空下でも座屈しない。
 - ガスバリア性が極めて高く、湿気除去や遮光性が高い。
- 超広口のフルオープンタイプ
 - 胴体の溶接面のラップや底部の隙間がなく簡単に洗浄・スチーム殺菌が可能。
 - パッキンはシリコンゴム製で、簡単に取り外して洗浄・スチーム殺菌が可能。
 - 缶とフタはリングクランプを締めるだけで固定できるため、作業能率が向上。
 - 缶内にラックやトレーを入れることで、細かいものでも立体的に収納可能。
- ワンタッチ方式のカプラを採用
 - 真空ポンプやガスボンベと配管することで、簡単に真空引きや不活性ガス置換、ガス燻蒸などが可能。
 - 真空圧ゲージや正負圧ゲージを取り付けて缶内圧をモニターすることができる。
 - バリアカットや三方バルブを取り付け、缶内圧を外気圧に戻すことにより、簡単にフタを開けることができる。
- 特注仕様の相談
 - 覗き窓付フタや吸引ろ過缶など、お客様のご要望に応じた仕様での製作や加工が可能。

用途

半導体その他電子部品・フィルム・ディスク・紙製品・医薬品・化粧品・香料・化学品・インク・塗料・セラミックス・新素材・生鮮食品・乳肉・バイオ試料・分析用試料・飲料水・文化財などの保存・輸送など。

〈ご注意〉

本品は、耐加圧性がないため、ガス置換を行う際は、先に減圧を行うなど、容器内部が加圧状態にならないようご注意ください。

コード No.	メーカーコード	品名	容量	重量	寸法 (mm)			希望納入価格 (円)
					外高	板厚	内径	
637-41651	010-SS	キミツ	10L	8.3kg	205	1.5	φ 390	104,000
634-41661	020-SS		20L	9.3kg	280			108,000
631-41671	030-SS		30L	11.1kg	400			112,000
638-41681	050-SS		50L	13.9kg	580			116,000
635-41691	100-SS		100L	18.0kg	488	φ 567	174,000	
638-41701	200-SS		200L	27.5kg	920		186,000	

高純度品

Wako

ヘパリンナトリウム、ブタ腸粘膜由来

ヘパリンは、マスト細胞において作られるムコ多糖で、脾臓、肺、筋肉をはじめ種々の臓器や血中に存在し、血液凝固阻止作用があります。ムコ多糖の中では最も多く硫酸基を含み、硫酸基が負に帯電しているため、種々の生理活性物質と相互作用を示します。また、bFGF と結合することで、液体中における bFGF の安定性が増すという報告もされています。さらに、ラクトフェリンなどの血清タンパク質、エンドヌクレアーゼなどの DNA 結合タンパク質やアンチトロンビン III などの凝固因子とも結合性を持つため、それらタンパク質の精製にも使用できます。


本品は、高純度なヘパリンナトリウムです。特に不純物である亜硝酸分解抵抗性物質を製造工程において除去しています。

特長

- 高純度
- 亜硝酸分解抵抗性物質除去済み

製品概要

- 活性：130units/mg 以上 (初回ロット実測値：208units/mg)
- 不純物 (亜硝酸分解抵抗性物質)：0.20% 以下
- エンドトキシン試験済み

コード No.	品名	規格	容量	希望納入価格 (円)
NEW 088-10391	Heparin Sodium, from Porcine Intestinal Mucosa 	細胞培養用	250mg	7,000
NEW 084-10393			1g	18,000
NEW 082-10394			5g	60,000

p型有機半導体材料

Wako

TBBT-C₄

TBBT-C₁₀

有機電界効果トランジスタ (OFET) は、機械的に柔軟かつ軽量であるメリットに加え、低コスト・低環境負荷の塗布プロセスによって作製可能な有機半導体材料を活性層に用いているため、プリントド・フレキシブルデバイスなど次世代エレクトロニクスへの応用が期待されています。

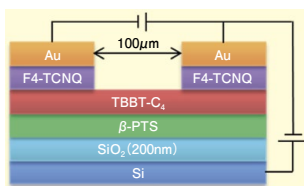
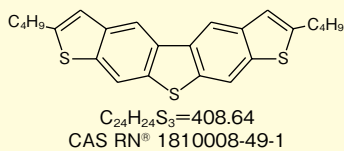
この度、高いホール移動度を有し、溶解性の高い p 型有機半導体材料のラインアップを追加しました。本品は東京大学 竹谷教授、岡本准教授と富士フィルム (株) の共同研究によって開発された新規材料です。

特長

- 高いホール移動度
5cm²/Vs を超えるホール移動度
- 高耐熱性
OSC パターニングに必要な温度履歴を経ても特性が劣化しない
- 高溶解性
トルエン溶解度：0.5wt%
- 高い再現性
パイクリスタル社によるトランジスタ特性評価で良好な再現性を確認
- 昇華精製品
純度 99% 以上を保証

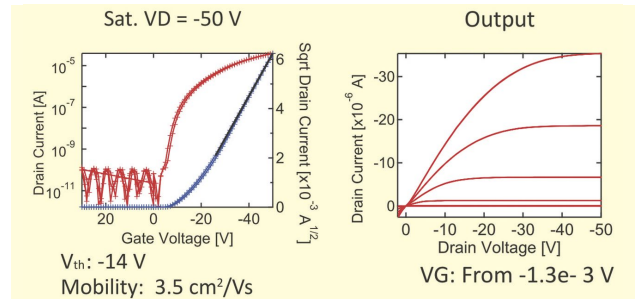
データ

■ エッジキャスト法による結晶膜作製・トランジスタ特性評価 (TBBT-C₄)

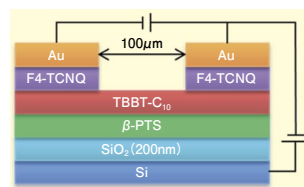
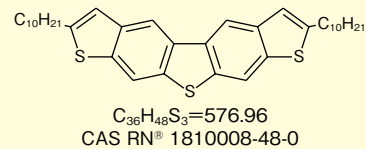


〈塗布膜作成条件〉

溶媒	トルエン
濃度	0.05wt%
溶かした温度	60°C
Hot plate 温度	50°C
基板	SiO ₂ 200nm
SAM	β-PTS
滴下量	1 滴
乾燥	減圧下 50°C, 8h

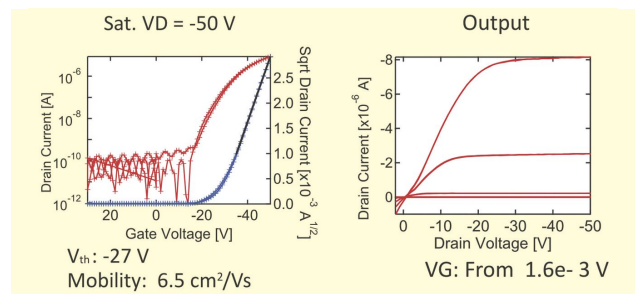


〈TBBT-C₁₀〉



〈塗布膜作成条件〉

溶媒	アニソール
濃度	0.05 wt%
溶かした温度	70°C
Hot plate 温度	40°C
基板	SiO ₂ 200nm
SAM	β-PTS
滴下量	1 滴
乾燥	減圧下 70°C, 24h



〔参考文献〕

- 1) Okamoto, T. et al.: *Adv. Mater.*, **25**, 6392 (2013).
- 2) Mitsui, C. et al.: *J. Mater. Chem. C.*, **5**, 1903 (2017).
- 3) 岡本敏宏: 和光純薬時報, **86**, 10 (2018).

コードNo.	品名	規格	容量	希望納入価格(円)
208-20821	TBBT-C ₄	機能性有機材料用	100mg	75,000
205-20831	TBBT-C ₁₀	機能性有機材料用	100mg	75,000

本品は東京大学、富士フィルム (株) のライセンスを受けて製品化しました。

関連商品

有機半導体ビルディングブロック

コードNo.	品名	規格	容量	希望納入価格(円)
201-20811	TBBT-Br ₂	機能性有機材料用	250mg	照会
204-20801	TBBT-H ₂	機能性有機材料用	250mg	照会

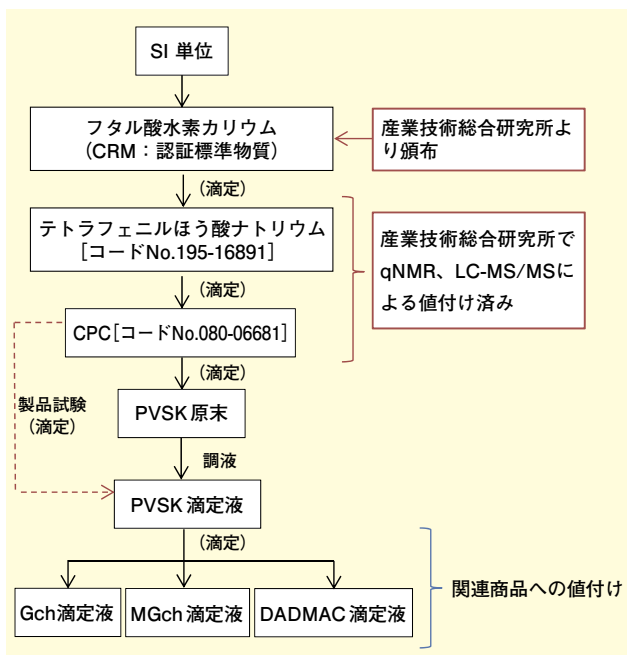
リニューアル!

コロイド滴定用 滴定液

Wako

ご愛顧頂いていますコロイド滴定用試薬の値付けを国際単位系 (SI) にトレーサブルな評価方法にリニューアルしました。

値付方法概略



【略語説明】

CPC: ヘキサデシルピリジニウムクロリド
 PVSK: ポリビニル硫酸カリウム
 Gch: グリコールキトサン
 MGch: メチルグリコールキトサン
 DADMAC: ポリ(塩化ジアリルジメチルアンモニウム)

今回のリニューアル商品を用いてこれまでと同様の試験を行った場合、試験結果が変わる可能性があります。

詳細は当社 HP をご覧下さい。

<https://labchem.wako-chem.co.jp/info/docs/PVSKhenkou180305.pdf>

コード No.	品名	規格	容量	希望納入価格 (円)
077-06715	N/200 Gch Solution [N/200 Glycol Chitosan Solution]	コロイド 滴定用	500mL	照会
139-18875	N/200 MeGch Solution [N/200 Methyl Glycol Chitosan Solution]	コロイド 滴定用	500mL	照会
042-34455	N/400 DADMAC Solution [N/400 Poly(diallyldimethylammonium Chloride) Solution]	コロイド 滴定用	500mL	照会
167-28105	N/400 PVSK Solution [N/400 Potassium Polyvinyl Sulfate Solution]	コロイド 滴定用	500mL	照会

無アルデヒドエタノールを使用して調製

局方一般試験法用 0.5mol/L 水酸化カリウム・エタノール液

Wako

本品は、日本薬局方に準じた無アルデヒドエタノールを用いて調製した 0.5mol/L 水酸化カリウム・エタノール液です。当社の局方一般試験法用 容量分析用標準液は、日本薬局方に準じた調製及び標定を行い、濃度を保証しています。

特長

- 無アルデヒド処理済みのエタノールを用いて調製
- ファクターは小数点以下 3 桁

コード No.	品名	規格	容量	希望納入価格 (円)
169-28425	0.5mol/L Potassium Hydroxide-Ethanol Solution	局方一般 試験法用	500mL	4,800

関連商品

コード No.	品名	規格	容量	希望納入価格 (円)
164-27995	0.1mol/L Potassium Hydroxide-Ethanol Solution	局方一般 試験法用	500mL	4,800

追加品目のお知らせ

ポジティブリスト関連標準品

Wako

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ラインアップしています。

下記品目を新たに発売しました。

農薬標準品

- ジクロベニル代謝産物 E 標準品
- エトフメセート代謝産物 M2 標準品
- ピカルブトラゾクス標準品
- ピカルブトラゾクス代謝産物 B 標準品
- キザロホップ標準品

コード No.	品名	規格	容量	希望納入価格 (円)
045-34401	Dichlobenil Metabolite E Standard	残留農薬 試験用	100mg	6,000
053-09211	Ethofumesate Metabolite M2 Standard	残留農薬 試験用	100mg	30,000
160-28391	Picarbutrazox Standard	残留農薬 試験用	100mg	25,000
163-28401	Picarbutrazox Metabolite B Standard	残留農薬 試験用	100mg	30,000
178-00791	Quizalofop Standard	残留農薬 試験用	100mg	35,000

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

当社試薬 HP → 分析 → 食品分析「ポジティブリスト」

和光 ポジティブリスト

検索

長井 長義 (1845.7.24. ~ 1929.2.10)

徳島大学名誉教授 渋谷 雅之

長井長義(写真1)の事跡については、過去に多くの著作¹⁻⁶⁾などで紹介されているが、ここでは薬学の創始や発展に関連して長井が果たした役割を中心に、その生涯をたどってみたい。

生い立ちと長崎留学⁷⁾

長井長義は弘化2年(1845)阿波蜂須賀藩の医官を務める長井琳章の長男として現在の徳島市中常三島町に生まれた。15歳で元服して直安と称し、慶応2年(1866)22歳のときに他の6名とともに長崎留学の藩命を受けた。長井が藩庁から命ぜられた長崎留学の名目は「洋学修行」という漠然としたものだったが、父・琳章は阿波藩の御殿医だったことから嫡子の長井に医学修行を期待したのは当然のことだったのであろう。

一方、長井は、当時阿波藩に仕えていた関寛齋から化学を学び、興味を抱きはじめており、当人の留学意図は最初から化学修行にあった。長井は関寛齋から、オランダ人化学者・ハラタマおよび写真師の上野彦馬に宛てた紹介状を得て長崎に旅立つ。長崎に着いた長井は、ハラタマが入れ違いに江戸に去ったことを知る。そこで当時の日本では数少ない職業写真館を開いていた上野彦馬に師事することになった。彦馬は化学者としても著名である。上野彦馬の写真術は当時の最先端科学の雰囲気を持っていたであろう。

長井は精得館(幕府が創設した医学校)に通い、医学修行らしい記録を残すが、その期間は最初の1ヶ月のみで、その後は精得館を無視して写真用薬品の製造、砂糖の精製、電気メッキ、ライフル銃、大砲の発射管、等々の研究に明け暮れる。父の跡を継いで医師になることを運命づけられていた長井は、その運命の糸を自ら断ち切った。

大学東校

鳥羽伏見戦争の情報を長崎で聞いた



写真1. 壮年期の長井長義

長井は慶応4年3月に帰藩する。翌明治2年正月、京都の伊東玄伯(方成)に入門し、同年3月の東京遷都により、伊東と共に東京に移り大学東校(東京大学の淵源)に入学する(写真2)。大学東校は、新政府により我が国に創設された医学教育機関だったが、ここで医学を修めようとする意図が長井にあったと推測するのは難しい。長井が伊東玄伯に師事したのは、父・琳章に対する親孝行ととらえるのが自然であろう。一方、大学本校(昌平学校)の南にあった大学南校(旧・開成学校)には法、理、文の3科がおかれた。南校の中に理化学教育の創始があったため、長井が東校から南校に転校しようとして発覚し、御目玉を喰うといったこともあったらしい⁸⁾。

大学創設当初の初年次教育はドイツ語で行われていたが、時の趨勢から、大学南校の教育システムが突如英語に切り替えられる。文部省は英語教育の徹底に努める一方、ドイツ語から転向することが困難な上級学生のために臨時に「鉱山学科」を設けて収容し、学生の卒業後は廃止するといった荒技を使う⁹⁾。のちに我が国の薬学を担うことになる下山順一郎、丹波敬三、丹羽

藤吉郎、田原良純、高橋三郎などの逸材は大学南校でドイツ語を習得し、専門に進んで理化学を学ぼうとしていたが、鉱山学に転向するわけにもゆかず途方にくれていた⁸⁾。明治6年、大学東校(医学校)内に製薬学科が設けられたことにより、ドイツ語教育が続いていた大学東校に、これらの逸材が集団で移動し、現代薬学の“ご先祖”になるという、信じられない経緯をたどる。一方、前述のように理化学の可能性をもった南校への転校が長井の意識に姿を見せても不思議はなかったのである。こうした大混乱の中から日本の薬学は誕生した。

父・琳章と徳島藩庁の執拗な束縛にもかかわらず、長井の化学志向に揺るぎはなかった。そして化学を社会に活かす分野として、長井が薬学を意識しはじめるのは、ベルリンにおける長与専齋との出会い(後述)がきっかけであったかもしれない。



写真2. 大学東校時代の長井長義

ベルリン留学¹⁰⁾

大学東校に学んだ長井は、明治政府により第1回欧州派遣留学生に選ばれた。明治4年、長井は太平洋航路のアメリカ丸で米国に渡り、さらに大西洋

を渡ってベルリンに到る。長井の渡米に遅れること9ヶ月、特命全権大使・岩倉具視の率いる使節団が、同じアメリカ丸に乗って米欧回覧の旅に出た。

ベルリン大学で有機化学の大家・ホフマンに学び、数々の学術的業績をあげた長井は、のちにホフマンに請われて私設助手となり、さらにベルリン大学助手に就任し、ドイツ化学会における将来を嘱望されるようになる。

長井は結局ベルリンに13年間滞在するのだが、この時期、日本では教育システムの確立や科学産業の育成に関して次々と課題が生まれ、急速に新しい制度や組織が作られつつあった。長井とともにベルリンに留学し、明治7年に帰国していた柴田承桂（東京医学校初代製薬学科教授）や、衛生局長・長与専齋は東京大学医学部における化学部門や、製薬会社の技術指導者として長井を嘱望し、約10年にわたり長井の帰国要請運動を展開する。かくして明治17年、長井は帰国し、活動の場を日本に移した。

学位

長井はドイツ留学中、ベルリン大学からDr. der Philosophieの学位を得ていたが、帰国後の日本にはまだ学位制度がなかった。明治21年、勅令第13号によってわが国初の博士25人が誕生した。理学、工学、医学、文学、法学の各5人に文部大臣・森有礼から学位記が授与され、長井は理学博士の学位を受領する。写真3は関東大震災と太平洋戦争における東京空襲から奇跡的に守られ、現在は徳島大学が所蔵している貴重な学位記である。

当初薬学はまだ主要な学術分野と認められていなかった。薬学博士の誕生までには10年あまりを要し、その間医学博士の授与を打診された薬学者は受領を辞退した。明治32年、勅令第344号により学位に薬学が加えられ、長井は田原良純、下山順一郎、丹波敬三とともに薬学博士第1号となる。

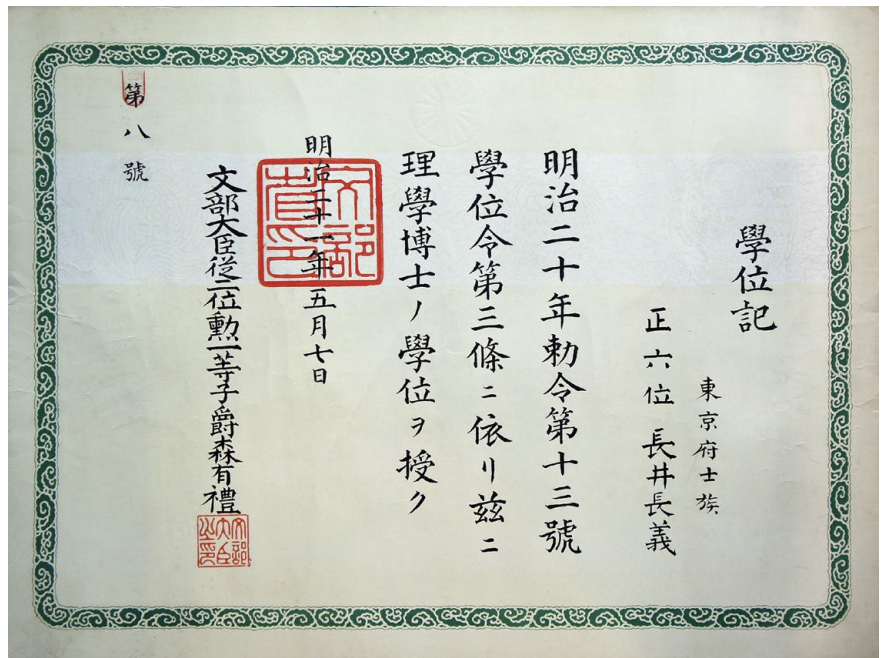


写真3. 明治21年5月7日、勅令第13号により日本最初の博士学位が授与された。

医薬分業

長井は帰国直後の明治18年、日本薬学会の前身である東京薬学会で演説し、ベルリンでの経験を元にして、薬剤師養成と医薬分業の重要性を次のように説いた。「日本では医学と薬学が密着して離れない。民間では薬の代価と診察料の違いを理解できず、薬の代価が診察への謝礼そのものの性質を持っていると誤解している。ヨーロッパでは薬学は一大専門学である。そのため、薬の専門家でない医師がそれを理解できないのは当然であり、国民もそのことを認めている。薬学そのものの進歩のために努力すると同時に、このような困った習慣を正すのは、我々薬学者の義務である」

長井の医薬分業に関する見識はベルリン留学中に長与専齋との交わりの中で形成されたものである。

長井と長与の交友の芽生えは幕末の長崎にあった。長井が長崎で化学を学び始めた時期、長与専齋は精得館の若いリーダーとして医学生徒の衆望を集めていた。それから4年後、岩倉使節団

に随行してベルリンに到った長与専齋（写真4）は我が国の医療制度の基本を定める使命を帯びていた。ベルリンで長井と再会した長与専齋は、その意

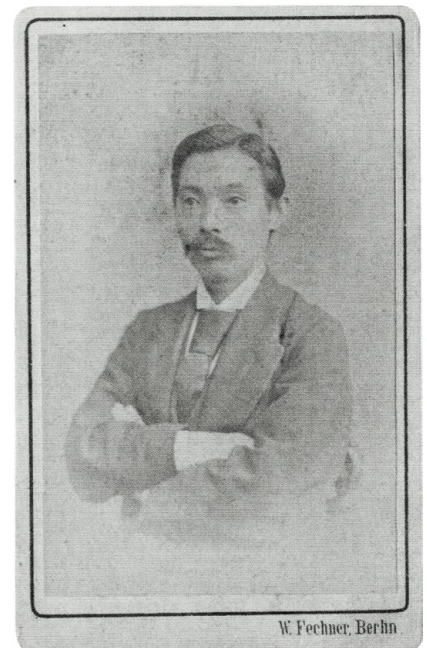


写真4. 長与専齋（明治5年11月20日に長与がホフマンに呈したことを示す裏書きがある。ホフマンの旧蔵アルバムに加えられていたと伝わる。参考文献11より引用）

見や、新生ドイツの医療制度を参考にしつつ「医制」76箇條の草案を練る。そしてベルリンにおける長与と長井の出会いが2人が日本の医薬分業を考え始める発端となる。

明治7年、医制の54条から76条で薬舗と売薬に関して規定され、医薬分業が明文化されたが、「医師が必要とするときは医師自ら調剤できる」という例外規定が盛り込まれ、この例外規定が、以後140年にわたり医薬分業の成熟を阻む要因の一つとなった。

長与専齋はドイツから帰国後、日本で最初の近代的薬学教育機関である東京医学校製薬学科の設立を急ぎ、明治6年に実現した。当時西洋医薬品を輸入する業者には悪質なものも多く、不良医薬品が日本中にはびこりつつあり、しかも医薬関係者に、それを見破る力はなかった。そのため、長与は日本独自の薬品を製造する必要性を痛感していたのだ。

エフェドリンの発見と産学官連携

帰国後の長井は、東京大学教授、衛生局東京試験所長、中央衛生会委員、大日本製薬会社製薬長などの要職を兼務し、教育、研究、社会貢献を実践した。これらが近年の日本で大学の3大使命として定着した状況を思えば、長井の先見性に学ぶものは多い。

明治18年7月、長井は大日本製薬会社の一室で、衛生局の試験研究員・山科元忠から黒褐色のエキスを示された。山科が野生植物の麻黄から抽出したものであり、そのエキスの中に、肉眼で認められる結晶性の物質が混在しているのが発見された。山科は不幸にも間もなく死亡したが、この時発見されたエフェドリン（写真5）に関する研究は、長井をリーダーとして引き継がれ、43年にわたって続けられた。

長井は前述の東京薬学会における演説（明治18年）の後半で、自然界から有効成分を発見し、人工合成により医薬品を生み出すことの重要性を説



写真5. 昭和3年11月10日、大日本製薬（株）に発売が許可された「エフェドリンナガキ」

き、その分野の学問に対する貢献を自らの使命と位置づけた。その後、長井は医科大学内科教授・三浦謹之助らとの共同研究により開発したいくつかの医薬品を大日本製薬（株）に技術移転するなど、産学官連携の草分け的な業績を残す。長井が開発したミドリアチン（瞳孔拡散剤）、アロカイン（局所麻酔剤）などは、日本人が独自に開発した医薬品として、以後の時代をリードすることになる。

長井は明治20年に日本薬学会初代会頭に就任し、その逝去まで、実に42年にわたり薬学会を指導した。

天然物有機化学

天然物有機化学は長井がその創始にかかわり、戦前戦後を通じて日本が世界をリードした学問分野である。天然物の構造研究に関しては、戦後核磁気共鳴スペクトル（NMR）や、X線結晶解析などの手法が開発され、天然有機化合物の研究は飛躍的な進歩を遂げ、化学の初心者でも複雑な化学構造の謎を解くことができるようになった。そのため学術としての重要性は低

下したが、未知の化学構造を解明するという、胸躍らせる学問の経験を積んだ若者たちは、やがて合成化学や生命化学の分野に進出して、その中核となるに至るのである。

長井自身による研究は、ホフマン教授の指導のもとにベルリンで開始された。長井は、ワニリンやオイゲノールといった、芳香を発する植物成分の構造に関する研究の成果をまとめてPh.D.の学位を得たほか、ホフマンに協力して、窒素を含む天然物の化学合成など、優れた研究をおこなった。

日本に帰国した後、長井は東京大学および衛生試験所において漢方薬の成分を究明する研究にとりかかる。牡丹皮、苦参、蒼朮、百部根、白屈菜などがその対象となった。これらの中で成分の化学構造の解明にまでこぎ着けたものは、前述のエフェドリンの他、ベンゼン環やナフタレン環を基本骨格とする低分子化合物である。このような比較的単純な化学構造を持つ化合物は、化学の黎明期には好んで取り上げられた研究対象だった。元素分析にしても大量のサンプルを用いて、七輪と炭火の火力で分析するといった時代である。少し複雑な分子に行き当たった場合は、たちまち研究が暗礁に乗り上げるのは普通のことだった。一例として、苦参の塩基成分でありマトリンと名付けられた中枢神経毒（図1）があった。この化合物は15個の炭素を持つ四環性の物質であり、当時の知識と技術では手も足も出ない対象だった。長井による基礎研究を引き継いだのは、丹羽藤吉郎、田原良純ら、その

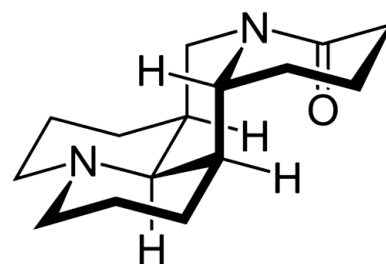


図1. マトリンの立体構造

後の日本を代表する天然物有機化学者である。以後、長井の後を継いで東京帝国大学医学部薬学科薬化学講座の継承者となった近藤平三郎、および三代目となった落合英二に引き継がれ、最終的には昭和32年、落合の後輩である津田恭助により化学合成などで構造が決定された。余談ながら近藤、落合、津田は、いずれも文化勲章を受章している。

長井の研究姿勢は、その後日本の天然物有機化学の分野に伝統的に引き継がれ、基礎薬学の研究と教育に大きな役割を果たした。そして日本の薬学が薬剤師養成という目標に向かって進み始めた近年、ようやくその基礎薬学的な役割を終えようとしている。長井が蒔いた天然物有機化学の種は近年下村脩氏(2008・化学賞)や大村智氏(2015・生理学医学賞)のノーベル賞受賞によって、ようやく花開いたようにみえる。一方それは、長井が残した伝統により日本の薬学が輝いた遠い過去の時代への鎮魂歌のようでもある。

長井は生涯天然物有機化学に取り組んだが、正確には楽しんだと言うべきであろう。長井の研究の量に比して、それらを発表した論文数の少なさは、このことと深い関係を持っているようにみえる。そして長井の研究発表におけるこのような淡泊な態度は、競争相手の少なかった時代のせいばかりではないように思える。

学校創設と人材育成

長井の残した業績の中で、学校創設に関する貢献は忘れてはならないものである。

大正年間の学制改革の中で、四国では高知と松山に高等学校が設置されたが、長井の郷里徳島では専門学校を設置しようとする動きがあった。徳島は海を隔てて京阪神に隣接しているにもかかわらず産業が不振だったことを背景としている。長井は製薬産業に貢献できる人材を養成するという目標を掲

げて教育研究組織の創設を国に働きかけた。その結果、大正12年に現在の徳島大学薬学部の淵源となる徳島高等工業学校応用化学科製薬科学部が誕生した。このような経緯で創設された薬学部は全国唯一のものであり、その特色は脈々と受け継がれたが、近年、薬剤師養成のための全国的な組織替えにより、その伝統に終止符が打たれた。長井は他に、富山薬専や熊本薬専の創立、発展にも尽力している。

一方、長井は晩年、日本女子大学の「香雪化学館」の創設に協力し、創設後は化学教授として女子化学者の育成に努めた。長井が育てた黒田チカ(お茶の水女子大学教授)、丹下ウメ(日本初の女性農学博士)、鈴木ひでる(日本初の女性薬学博士)らは、わが国の女子教育の発展に大きく貢献する。

長井の研究・教育者としての姿勢は上野彦馬とホフマンの教えを実践した実験第一主義によって貫かれ、学生に対しては常に自主的な問題解決能力を求めた。

晩年

昭和2年、83歳の長井は老躯を駆ってドイツ旅行を行う。ベルリンではドイツ化学会、薬学会合同歓迎会に出席し、「日本の化学はドイツと同様に薬学をもって始まり薬学をもって進んだ」と感動的な講演を行う。その席上で、長井はホフマンの肖像を鑄したプラケッテ(写真6)を贈られ、ドイツ薬学会名誉会員に推挙された。同年ベルリンにおいてヒンデンブルグ大統領に謁見し、独逸国赤十字第一等名誉章を贈られた。

昭和4年、長井は咽頭癌のため84年の生涯を終える。逝去後、ローマ法王庁より「聖セブルクロ勲一等大十字章」が伝達された。これらは主として第一次世界大戦におけるドイツ化学会への人道的支援活動に対する感謝によるものである。

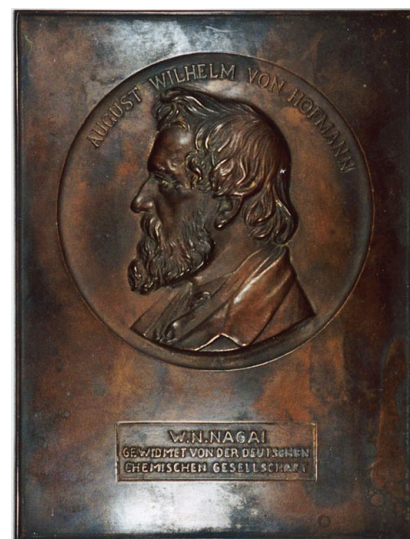


写真6. 昭和2年10月17日、長井はベルリンで講演を行い、ドイツ化学会からホフマン像を鑄したプラケッテを贈られた。

【参考文献】

- 1) 橋爪権椰子：「医科学の三巨人」(潮文閣)(1943)。
- 2) 根本曾代子：「草藥太平記 長井長義先生の巻 第133回～第215回」(日薬新聞)(1955)。
- 3) 金尾清造：「長井長義傳」(社団法人日本薬学会)(1960)。
- 4) の原博武：「この人長井長義」(ヒューマン・クリエイティブ)(2008)。
- 5) 今村壽明：化学大家 359 長井長義, 和光純薬時報, 60(1), 2(1992)。
- 6) 渋谷雅之：「阿波の偉人伝 長井長義」(株式会社阿波銀行)(2016)。
- 7) 徳島大学薬学部長井長義史料委員会編：「長井長義長崎日記：原本解説版」(徳島大学薬学部長井長義資料委員会)(2006)。
- 8) 緒方章：「一粒の麦：老薬学者の手記」(廣川書店)(1960)。
- 9) 小澤健志：「お雇い独逸人科学教師」(青史出版)(2015)。
- 10) 徳島大学薬学部長井長義史料委員会編：「長井長義ベルリン通信」(徳島大学薬学部長井長義資料委員会)(2005)。
- 11) 石黒敬章：「幕末明治の肖像写真」(角川学芸出版)(2009)。

ジスルフィド結合形成試薬

Wako

Npys-OMe

本品は、東京薬科大学の林良雄教授の研究グループが開発したジスルフィド形成試薬です。

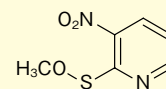
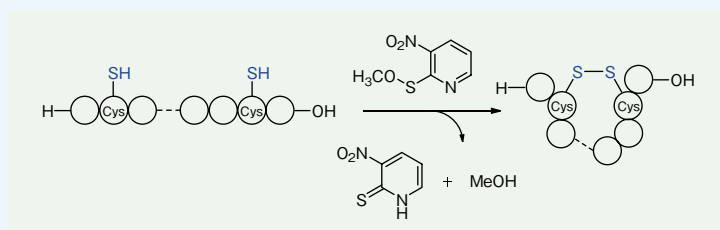
SH基を複数有する化合物と反応し、ジスルフィド結合形成により選択的な分子内環化反応が進行します。有機合成、特に、ペプチド合成に効果的な試薬です。創薬研究にご検討下さい。

特長

- SH基を複数有する化合物と反応してジスルフィド結合を形成
- 選択的な分子内環化反応が可能
- 空気酸化と比較して高濃度かつ迅速に反応
- よう素酸化と比較して穏和な条件下で反応

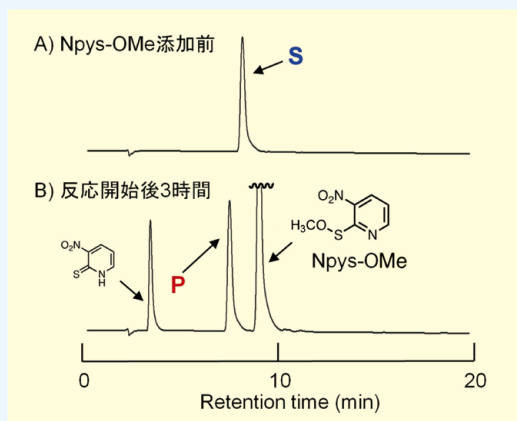
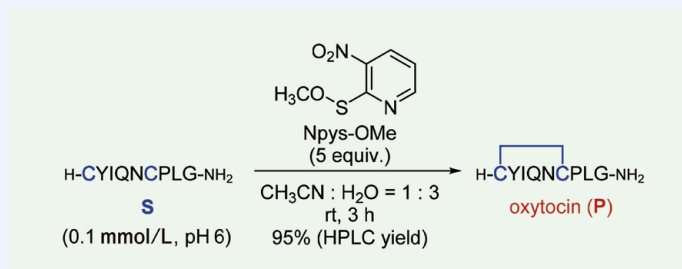
基本反応

〈「Npys-OMe」を用いた分子内環化の基本反応〉



$C_6H_6N_2O_3S=186.19$
CAS RN® 68118-08-1

反応例



コード No.	品名	規格	容量	希望納入価格(円)
NEW 148-09791	Npys-OMe[2-(Methoxythio)-3-nitropyridine]	ペプチド合成用	100mg	22,000

RF…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。
 特定 1…特定毒物 2…毒物 3…劇物 4…毒薬 5…劇薬 6…危険物 7…向精神薬 8…特定麻薬向精神薬原料
 9…化審法第一種特定化学物質 10…化審法第二種特定化学物質 11…化学兵器禁止法第一種指定物質 12…化学兵器禁止法第二種指定物質 13…カルタヘナ法
 14…覚せい剤取締法 15…国民保護法
 掲載内容は、2018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。

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. 86 No. 3

2018年7月15日発行

発行責任者 糸 博之

編集責任者 鎌田裕子

発行所 富士フィルム和光純薬株式会社

〒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://ffwk.fujifilm.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 ffwk-jjho@fujifilm.com

●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.

■富士フィルム和光純薬株式会社 (Japan)

<http://ffwk.fujifilm.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 ffwk-labchem-tec@fujifilm.com

■Wako Overseas Offices :

・FUJIFILM Wako Chemicals U.S.A. Corporation <http://www.wakousa.com>

Toll-Free (U.S. only) +1 877 714 1920

Tel +1 804 714 1920 / Fax +1 804 271 7791

・FUJIFILM Wako Chemicals Europe GmbH <http://www.wako-chemicals.de>

European Office (Neuss, Germany) : Tel +49 2131 311 0 / Fax +49 2131 311 100