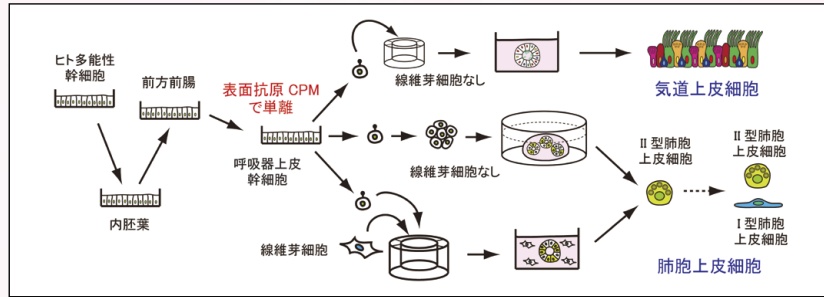


和光純薬時報

January 2019
Vol.87 No.1



〔総説〕

- 「再生研究における細胞単離用抗 CPM 抗体の活用」 後藤 慎平…………… 2
- 「動物を用いない高感度な皮膚感受性評価法 "ADRA" の紹介」 山本 裕介、藤田 正晴、笠原 利彦、勝岡 尉浩…………… 12
- 「第 34 回 Wako ワークショップ見聞録 神経科学：基礎から臨床」 岩崎 広英…………… 22

〔連載〕

- 〈アミノ酸分析 ～新たな潮流～〉
- 「第 3 回 アミノ酸分析の新しい潮流② キラルに着目したアミノ酸分析」 唐川 幸聖、原田 真志…………… 5
- 〈核酸医薬合成 基礎講座〉 **番外編**
- 「オリゴヌクレオチドの精製」 佐藤 健太郎…………… 8
- 〈エクソソームと生命現象〉
- 「第 4 回 エクソソーム糖鎖プロファイリングのススメ」 松田 厚志…………… 10

〔化学大家〕 **特別編**

- 「宮沢 賢治」 桜井 弘…………… 25

〔製品紹介〕

有機合成

- 有機 EL 関連製品 …………… 20
- 核酸合成用反応補助試薬…………… 20

分析

- キラルカラム CROWNPAK CR/ CROWNPAK CR- I …… 7
- ADRA キット …………… 14
- ポジティブリスト関連標準品 …………… 17

機器

- 3カラーデジタル PCR ナイカシステム …………… 15
- セルモーションイメージングシステム SI8000 …………… 19

培養

- 抗CPM, モノクローナル抗体 (WK) …………… 4
- CultureSure® 3,3',5-トリヨード-L-チロニンナトリウム …… 17
- iCell® 心筋細胞 2.0-01434、
iCell® ドーパミン神経細胞 -01279 …………… 18
- 心毒性陽性化合物…………… 19

細胞生物

- 透明化試薬 SCALEVIEW®-S、SeeDB2、CUBIC …… 16

遺伝子

- MagCapture™ エクソソームアイソレーションキット PS …… 11
- ScreenFect™ UP-293 …………… 28

はじめに

ヒト多能性幹細胞 (ES および iPS 細胞) が誕生して以来、様々な臓器細胞に分化させる技術が確立され、再生医療もようやく現実的なものになりつつある。特にヒト iPS 細胞を用いた網膜色素変性症の細胞移植治療に加え、重症虚血性心筋症やパーキンソン病に対する臨床研究・治験も始まろうとしており、呼吸器を含むその他の臓器の再生医療についても期待が高まっている。まだ基礎的な研究の域ではあるが、人工気管の研究¹⁾や、脱細胞化肺を用いた肺の臓器再生研究²⁾は臨床工学的な視点も組み合わせて研究が進められており、一定の成果を収めてきている。これらの研究においては近い将来、臨床応用に向けてヒト由来の細胞が必要となる。再生医療において細胞の供給方法が重要なことは言うまでもないが、特にヒト多能性幹細胞を用いた再生医療では、安全性、機能性、確実性が求められ、優れた分化誘導法はこれらすべてに関わる必須技術と言える。ヒト多能性幹細胞は培養皿内での分化誘導を基本とするが、多くの臓器細胞において発生学の知見が大いに参考となってきた。肺は内胚葉臓器であるが、ヒト多能性幹細胞から内胚葉系臓器細胞への分化誘導において最初のマイルストーンは、2006年にさかのぼり、ヒト ES 細胞から膵臓β細胞への分化誘導について、発生の段階を培養皿内で再現することが有効と報告されたことに始まる³⁾。以降は、肝臓⁴⁾や腸管細胞⁵⁾など他の内胚葉系臓器細胞の分化誘導においても発生学的な段階を再現して分化を促進することが合理的と報告されたが、肺への分化誘導法の研究成果の報告は遅れ、2011年になってようやく内胚葉から肺に向かう第一歩となる前方前腸への分化誘導法が初めて報告された⁶⁾。

呼吸器細胞の分化誘導法の開発経緯

肺は一見複雑に見える構造をしているが、規則正しく分岐する精細な気管支の枝で構成された気道領域と末梢に位置し数億個の肺胞からなる肺泡領域に大きく分けることができる。前者は異物や病原体の除去、後者はバレーコート⁷⁾の半面分ともされる十分な表面積を確保してガス交換の役割を担っている。肺を構成する細胞には上皮細胞のほかにも線維芽細胞や免疫細胞、血管内皮細胞などの多種類の細胞が挙げられるが、外界と接する上皮細胞が、その他の細胞との相互作用を通じて、発生過程や様々な呼吸器疾患の病態において重要な役割を果たすことが示唆され、気道および肺胞上皮細胞を用いた病態モデリングが期待されてきた。これまでこういった研究には遺伝子改変マウスを用いた病態モデルが中心的役割を果たしてきたが、ゲノム背景の違いなどから必ずしもヒトの病態を反映しない可能性も明らかとなってきている。特に近年は細胞に立体構造を形成させて培養する「ミニ臓器」とも表現されるオルガノイド培養の研究が進み、生体組織から得られるデータとの整合性も検討されつつあることから、ヒト由来細胞とオルガノイド培養を組み合わせた疾患モデリングが期待されるようになってきている⁷⁾。従来の呼吸器分野では、上述の臓器再生や疾患モデリングの検討に使えるヒト由来細胞が限られており、がん細胞を由来とする細胞株は依然重要なツールではあったものの、本来の細胞機能の多くが失われており、本来の細胞機能を再現するには組織から回収できる初代細胞を入手してオルガノイド培養を行なう必要があった。初代細胞の入手のためには、本邦では倫理的問題を避けるため、肺がんのため一定の術式に沿った肺切除がやむを得ない場合に、診断に影響しないレベルで臨床検体から、わ

ずかな健常細胞を得るよりほかに難しく、肺胞上皮細胞については未だに長期培養する技術も確立されていなかったことから、研究を進めることは容易ではなかった。ヒト多能性幹細胞はこうした細胞供給の問題を解決できる可能性が期待されている⁸⁾。また、末梢血があればヒト iPS 細胞の樹立が可能なため、稀少疾患であっても採血さえ協力を得ることができれば、iPS 細胞を樹立することができ、そこから肺に分化させ疾患病態を再現できる可能性がある。こういった背景のもと、ヒト多能性幹細胞から呼吸器細胞への分化誘導法が期待されてきた⁹⁾。

分化誘導における CPM 抗体の有用性

次に分化誘導法について述べる。肺は発生学的に内胚葉、前方前腸と分化した後、前方前腸の一部に「腹側化」が起こり、将来の肺を構成する芽となる細胞成分が出現したところから発生する。この時に肺の代表的な分化マーカーの1つである NKX2.1 (TTF1) が発現することが目印となる¹⁰⁾。培養皿内でヒト多能性幹細胞から分化誘導した前方前腸をいかに効率よく「腹側化」させるかが重要となり、多くの研究者によって試みられてきたが、筆者らはトレチノイン (ATRA)、BMP4、CHIR99021 の濃度の組み合わせによって「腹側化」の条件を整えることに成功した¹¹⁾。この ABC 三因子によって「腹側化」の条件を最適化すると細胞株によっては 80% 程度の NKX2.1 陽性率を得ることができた。しかし、分化効率には細胞株によって一定なものではなく、せいぜい 50% 程度しか NKX2.1 が陽性にならない細胞株もあり、その後の分化誘導を安定したものにするためには NKX2.1 陽性細胞だけを単離する方法が必要になった。筆者らは当初、NKX2.1 が陽性になると蛍光を発するレポーター細胞を作ろうとしたが、特異的な表面抗原を

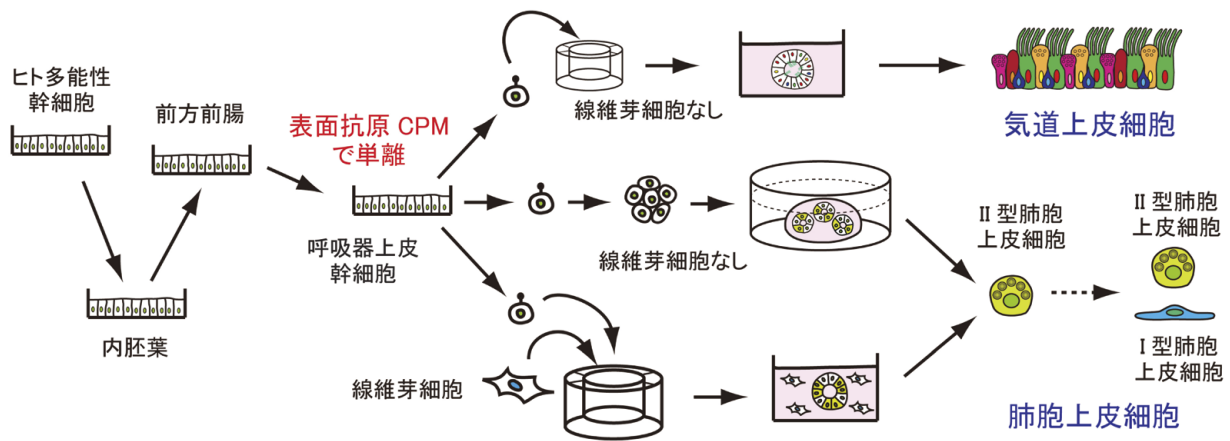


図 A. ヒト多能性幹細胞から呼吸器細胞への段階的分化誘導

見つけた方が細胞株ごとにレポーター細胞を樹立しなくても済むため、方針を変えて表面抗原の同定に取りかかった。そこで筆者らはヒト iPS 細胞から分化させた前方前腸と効率よく「腹側化」させた後の細胞からそれぞれ RNA を抽出し、網羅的遺伝子発現解析で比較し、複数の候補となる表面蛋白質を同定した。NKX2.1 陽性細胞における発現を免疫染色で順番に調べていったところ、GPI アンカー型蛋白質として細胞表面に存在すると報告されていた Carboxypeptidase M (CPM) が、NKX2.1 とよく共発現することが分かり、CPM 抗体で標識すれば NKX2.1 陽性細胞を単離できることを見出した。単離した細胞は、細胞外基質 (マトリゲル) のなかで培養すると三次元構造を形成し、培養条件を変えることで気道上皮細胞にも肺胞上皮細胞にも分化促進できることが分かった (図 A)。気道上皮細胞に分化させたい場合は FGF10 や古典的 Wnt シグナル経路を刺激する GSK3β 阻害剤である CHIR99021 などを含む培地で培養し、オルガノイドがある程度育ってから初代細胞用の市販培地に切り替える¹²⁾。すると繊毛細胞だけでなく粘液産生細胞、クラブ細胞、基底細胞、神経内分泌細胞など代表的な気道上皮細胞成分が含まれる気道上皮細胞

に効率よく分化し、繊毛運動が観察され主たる機能である粘液繊毛輸送能を有することも証明された¹²⁾。次に、肺胞上皮細胞に分化させたい場合は、研究用に市販されている胎児肺由来の線維芽細胞と共培養を行ないながら、肺胞への分化促進作用がある Dexamethasone や KGF (FGF7) などを含む培地で培養する¹¹⁾。当初、肺胞の組織幹細胞である II 型肺胞上皮細胞への分化効率は 10 - 15% と低かったが、「腹側化」のあと、CHIR99021、FGF10、KGF (FGF7)、Notch シグナル経路を阻害する γセクレターゼ阻害剤 DAPT を含む培地で 1 週間培養する段階を加えた¹³⁾。その後、NKX2.1 陽性細胞を単離し胎児肺線維芽細胞との三次元共培養を行なうと、II 型肺胞上皮細胞への分化効率は 50% 程度にまで上昇することを見出した。また、II 型肺胞上皮細胞は肺サーファクタントの主成分であるリン脂質を細胞外から取り込む機能を持つが、蛍光標識したリン脂質を培地に加えると II 型肺胞上皮細胞のラメラ体へ集積することから機能的な II 型肺胞上皮細胞に分化できていることを確認した¹³⁾。さらに NKX2.1 陽性細胞を単離したあと、胎児肺線維芽細胞との共培養を少なくとも CHIR99021、SB431542 などの組成を含んだ培地で三次元培養をす

ると一定の割合で II 型肺胞上皮細胞に分化することが証明できた¹³⁾。

今後の展望

以上より、NKX2.1 陽性細胞を表面抗原 CPM で単離することにより、ヒト多能性幹細胞から機能的に成熟した気道や肺胞上皮細胞に安定的に効率よく分化誘導できる方法が確立できたと筆者らは考えている。海外からも気道や肺胞上皮細胞を分化誘導できたとする報告が蓄積されつつあるが、肺に分化する NKX2.1 陽性細胞を表面抗原を用いて単離する方法として報告されてきたのは CPM 以外には、最近報告された CD47^{high}CD26^{low} で単離する手法のみである¹⁴⁾。様々な分化誘導法が報告されてきたが、今後真価が問われるのはいかに応用が可能かであり、異なる細胞株であっても目的の細胞まで安定的に分化誘導できる表面抗原を利用した筆者らの分化誘導技術は必ず役立つと確信している。今後展開が予想されるのは、これまで実験動物では実現の難しかった疾患病態モデルの開発であり、特に稀少な難治性呼吸器疾患についてヒト iPS 細胞を用いた研究が活発になるであろう。また、ヒト多能性幹細胞を用いた細胞移植、人工気管、脱細胞化肺などの臓器再生の技術

開発、薬剤や喫煙や環境汚染物質への曝露に対する肺毒性試験といった多岐にわたる応用が予想される。

謝 辞

最後に述べておきたいこととして、NKX2.1 陽性細胞の表面抗原として筆者らが CPM を同定してまもなく、当時某社で市販され細胞単離に使っていた唯一の抗 CPM モノクローナル抗体は一斉に販売中止となってしまった。残っていた抗体でしのぎながら当初独自で CPM 抗体の開発に着手したがなかなかうまくいかず、当時の和光純薬工業株式会社（現 富士フイルム和光純薬株）が細胞単離に使える抗 CPM 抗体の開発を快諾していただいたことで、結果的に筆者らの研究は滞りなく前進することができた。筆者らは現在、以前と同等の細胞単離ができるように開発された抗 CPM モノクローナル抗体（WK）を用いて肺の分化誘導研究を続けることができている（図 B）。この場を借りて御礼申し上げたい。

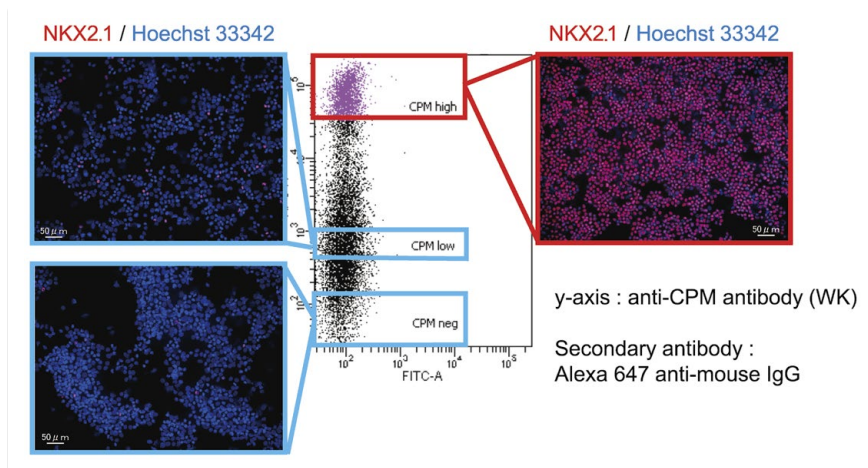


図 B. CPM 抗体（WK）を用いた呼吸器上皮幹細胞の単離

多能性幹細胞

三胚葉すべての体細胞に分化できる能力があり、ES 細胞や iPS 細胞の総称。

GPI アンカー型蛋白質

翻訳後の蛋白質 C 末端に糖脂質である GPI 基の修飾を受けて細胞膜表面に結合した蛋白質。ヒトには150種類程度の GPI アンカー型蛋白質が存在し、様々な役割を果たしている。

ES 細胞

胚盤胞の内部細胞塊から樹立される細胞株。1981年に Evans 博士らによって初めて報告された。

iPS 細胞

体細胞に複数種類の遺伝子を発現させることで分化多能性と自己複製能を獲得した細胞。2006年に山中博士らによって初めて報告された。

【参考文献】

- 1) Sakaguchi, Y. *et al.* : *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.*, **156**, 1264 (2018).
- 2) Nichols, J. E. *et al.* : *Sci. Transl. Med.*, **10**, eaao3926 (2018).
- 3) D'Amour, K. A. *et al.* : *Nat. Biotechnol.*, **24**, 1392 (2006).
- 4) Sullivan, G. J. *et al.* : *Hepatology*, **51**, 329 (2010).
- 5) Spence, J. R. *et al.* : *Nature*, **470**, 105 (2011).
- 6) Green, M. D. *et al.* : *Nat. Biotechnol.*, **29**, 267 (2011).
- 7) Nikolić, M. Z. *et al.* : *Development*, **145** (2018).
- 8) Yiangou, L. *et al.* : *Cell Stem Cell*, **22**, 485 (2018).
- 9) Somers, A. *et al.* : *Stem Cells*, **28**, 1728 (2010).
- 10) Kimura, S. *et al.* : *Genes Dev.*, **10**, 60 (1996).
- 11) Gotoh, S. *et al.* : *Stem Cell Reports*, **3**, 394 (2014).
- 12) Konishi, S. *et al.* : *Stem Cell Reports*, **6**, 18 (2016).
- 13) Yamamoto, Y. *et al.* : *Nat. Methods*, **14**, 1097 (2017).
- 14) Hawkins, F. *et al.* : *J. Clin. Invest.*, **127**, 2277 (2017).

気道・肺胞前駆細胞のマーカー 抗CPM, モノクローナル抗体 (WK)

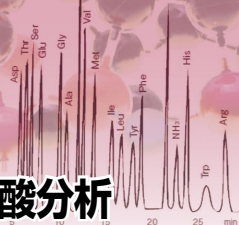
Wako

製品概要

- 組成：りん酸緩衝液、50w/v%グリセロール及び 0.05w/v%アジ化ナトリウム
- 濃度：1.0mg/mL（初回生産ロット実測値）
- サブクラス：マウス IgG2b
- 用途：フローサイトメトリー（1：100～200）
免疫染色（1：100～1,000）
ウエスタンブロット（1：1,000）

コード No.	品 名	規 格	容 量	希望納入価格(円)
014-27501	Anti CPM, Monoclonal Antibody (WK)	フローサイトメトリー用	100 μ L	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、2019年1月時点での情報です。最新情報は、当社HPをご参照下さい。



第3回 アミノ酸分析の新しい潮流② キラルに着目したアミノ酸分析

味の素株式会社 イノベーション研究所 唐川 幸聖、原田 真志

はじめに

生体を構成している化合物の多く、例えば糖、核酸、アミノ酸、タンパク質など、これらのほとんどは「キラルな化合物」である。不思議なことに、現存する生命の多くがキラル化合物の一方の立体を選択的に利用しており、この偏った状態のことを「ホモキラリティ」と呼んでいる。一对のキラル化合物（エナンチオマー）は、旋光性以外の物理的、化学的性質が全く同じであることが知られているが、「ホモキラリティ」の状態である生体中では全く違う働きをするものが多い。例えば、医薬品サリドマイドの光学異性体の一方が催眠作用を持つが、もう一方の立体は生体内での働きが全く異なり、その催奇形性が判明したことはとても有名な話である。医薬品だけでなく、より身近な例としてはアミノ酸のキラリティがある。タンパク質を構成するアミノ酸はアミノ基α位の炭素にキラル中心を持っており、エナンチオマーはL体、D体として区別される（図1）。タンパク質の構造として用いられるものも含め、生体中のアミノ酸の大部分はL体であり、マイナーなD体の存在に関しては「意味のないもの」として古くから議論されてこなかった。しかしながら近年、D-アミノ酸が細菌のペプチドグリカン構成成分として産生、利用されていることや、環境応答因子として機能していることが明らかとなってきた¹⁾。また、D-アミノ酸は身近な発酵食品や醸造酒中に多く含まれていることや²⁾、アミノ酸のL体とD体で味が異なることが知られている³⁾。さらには、哺乳動物においてもD-セリンが脳で記憶や学習に機能していること^{4,5)}など、L-アミノ酸とは異なる機能を有することが様々な生物種で明らかとなり、アミノ酸をD体とL体に分けて分析する重要性が高まってきている。

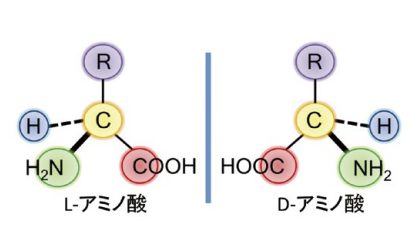


図1. L-およびD-アミノ酸の構造

キラルなアミノ酸を区別する

これまで様々な方法でキラルなアミノ酸を区別することが試みられてきた。エナンチオマーの唯一の物理的性質の違いである「旋光性」を利用した旋光度計、円二色性検出器を用いた検出法では光学純度を直接測定することができる。また、エナンチオマーを分離し個々に検出する方法では、「別のキラル化合物」を用いて「キラルを認識」させることによって、キラル化合物を区別し、分離している。これは例えるならば、差し出された手（＝キラル化合物）が右手か左手かを区別するとき、こちらが右手を出して正しく握手できたら右手、できなければ左手である、という方法と似ている。分析の世界では、認識に用いる「別のキラル化合物」のことを「キラルセクター」と呼んでおり、汎用的分離手法は、キラルセクターの使い方によって大きく2つに分類される。

一つは、キラルセクターを固定相に担持（または移動相に添加）することにより、カラム中にキラルな環境を持たせたキラル固定相法（またはキラル移動相法）であり、直接法ともいわれる。もう一つの方法は、キラルセクター自体を誘導体化試薬として分析種と反応させる方法がある。この方法はキラル誘導体化法、もしくは間接法と言われており、性質が同じで分離できないエナンチオマーを、化学的性質の異なる立体異性体であるジアステレオマーに変換することができ、分離に

はキラルでないカラムを用いる。どちらの方法も、液体クロマトグラフィー（LC）、ガスクロマトグラフィー（GC）、超臨界クロマトグラフィー（SFC）、キャピラリー電気泳動（CE）など様々な分離方法が用いられる⁶⁾。

本稿では、特に食品や生体試料中の微量なD-アミノ酸を、多量に含まれるL-アミノ酸や夾雑成分と分けて分析する方法について、LCを用いた直接法、間接法それぞれの長所、短所と合わせて紹介したいと思う。

キラルカラムを用いたD, L-アミノ酸分析

キラルなアミノ酸をキラルカラムで分離する方法は古くから検討されており、非常に信頼性が高い方法である。この方法では、キラルな分子が固定相に担持されたキラルカラムを用いて、水素結合、静電相互作用、 π - π 相互作用、疎水性相互作用などにより分析種のキラル化合物を認識し、分離する。キラルセクターの選び方次第では、これらの相互作用がうまく噛みあい、非常に良好なキラル分離を達成することが可能であるため、ある特定の化合物をキラル分離する場合には非常に便利な方法である。一方で、バラエティに富んだ構造を有するアミノ酸を幅広くキラル分離できる固定相は、非常に限られている。さらに、L-アミノ酸やその他の夾雑成分が多量に存在する食品や生体試料から微量なD-アミノ酸を分析するためには、選択性や感度が不足するケースも多い。そのため、プレカラム誘導体化、多次元LC、質量分析計（MS）など、選択性や感度を向上させる工夫をキラルカラムでの分離と組み合わせる方法が近年開発されている。

代表例として、プレカラム誘導体化と2次元LCを組み合わせることで選択性、感度ともに優れた分析法が報告されている⁷⁾。本法は、本連載第2回



でも述べられているアミノ基と選択的に反応する誘導体化試薬、4-フルオロ-7-ニトロ-2,1,3-ベンズオキサジアゾール (NBD-F) を用いて化合物を誘導体化する。その後、1次元目の逆相カラムで各アミノ酸を分離、オンライン分取した後、2次元目のキラルカラムに分取したアミノ酸を順次導入していくことにより、アミノ酸のD,L体を分離する。本分析法では幅広いアミノ酸を一斉にキラル分析するため、独自に設計、作製されたキラルカラムを使用している⁸⁾。このような多次元LCを用いた分析法は、1サンプルの分析に数時間から十数時間と長時間かかるが、非常に選択性が高く、夾雑成分の多い生体試料の分析では非常に信頼性が高く有用な手法である。

一方、キラルカラムを用いた非誘導体化での網羅的D,L-アミノ酸分析法も開発されている。キラルなアミノ酸を一斉にキラルカラムにて分離しMSに導入することにより、質量(正確には m/z)の違いによりアミノ酸ごとの分離、検出を行う。代表例として、キラルクラウンエーテルを固定相に有するカラム(CROWNPAK CR-I(+), ダイセル)を用い、HILICモードの移動相で分析を行うことでプロリンなどの第二級アミノ酸を除く幅広いアミノ酸の良好なキラル分離を達成した分析法が報告されている⁹⁾。本法では、1サンプルの分析時間が非常に短時間であり、誘導体化を行わないため、前処理がより簡便であるという特徴がある。高感度なMSを用いることにより微量なD-アミノ酸を検出できる一方で、マトリックス効果や、複雑な試料の分析では同じ m/z を有する夾雑成分の妨害を受けやすいことに注意する必要がある。

キラル誘導体化試薬を用いたD,L-アミノ酸分析

誘導体化試薬にキラルな構造を持た

せてキラルセレクトターとする、というのがキラル誘導体化法である。キラル化合物とキラル化合物を反応させることにより、キラルな化合物はジアステレオマーとなり、化学的性質が異なる化合物となる。そのため、キラルな環境を有さないカラムでもジアステレオマーを分離することが可能になる。キラル誘導体化法は、キラルセレクトターが固定相側に存在するキラルカラムを用いる方法よりも、より空間的に近い場所でキラルを認識することができ、誘導体化試薬の選択次第では非常に高い分離度でD,L-アミノ酸を分離することができる。また、誘導体化試薬の骨格として、「特定の官能基と選択的に反応する反応基」、「検出器に合わせて高感度に検出するための検出基」を持たせることにより、高選択的かつ高感度な分析が可能となる。

これまで様々なキラル誘導体化試薬が開発されてきた¹⁰⁾。多くの試薬のキラル骨格として、アミノ酸や糖といった天然由来の化合物が利用されており、用途に合わせて様々な試薬が使用されている。代表的なものにオルトフタルアルデヒド(OPA)とキラルチオールを用いてD,L-アミノ酸をジアステレオマーに誘導体化する方法が知られている²⁾。しかしながら、前述の通りアミノ酸は多様な構造と性質を持つため、幅広くアミノ酸をD,L-分離することが難しかった。単一の試薬、単一の分離条件でのD,L-アミノ

酸の一斉分析はキラル誘導体化法の課題であった。

最近、軸不斉骨格を有するLC-MS/MS分析用に設計された新しいキラル誘導体化試薬、(R)-BiAC(図2)が開発された¹¹⁾。この試薬は第一級または第二級アミノ基を有する化合物と選択的に反応する。アミノ酸の不斉点付近に軸不斉骨格による良好な不斉場が構築されるため、D,L-アミノ酸の立体を良好に識別することが可能である。その結果、分離度 R_s 1.9以上の高い分離度ですべてのタンパク質構成アミノ酸19種類のキラル分離が11.5分という短時間で可能となった(図3)。この試薬の最大の特徴は、D,L-アミノ酸の溶出順であり、すべてのアミノ酸においてD体→L体の溶出順となっている。この溶出順は、生体試料中に微量に含まれるD-アミノ酸の検出に適した方法であるといえる。また、MSでの感度を向上させるためのジエチルアミノ基を有しており、1インジェクションあたりattoモルレベルでの高い感度が実現できる。本分析法では、高い光学純度の誘導体化試薬を準備する必要があることや、MSの分析に伴うマトリックス効果の補正のため安定同位体標識された内標準物質を準備する必要があるものの、誘導体化試薬とカラムを準備すれば、汎用のLC-MS/MS装置でD,L-アミノ酸の一斉分析を実施することができるというメリットがある。今後、本(R)-BiAC

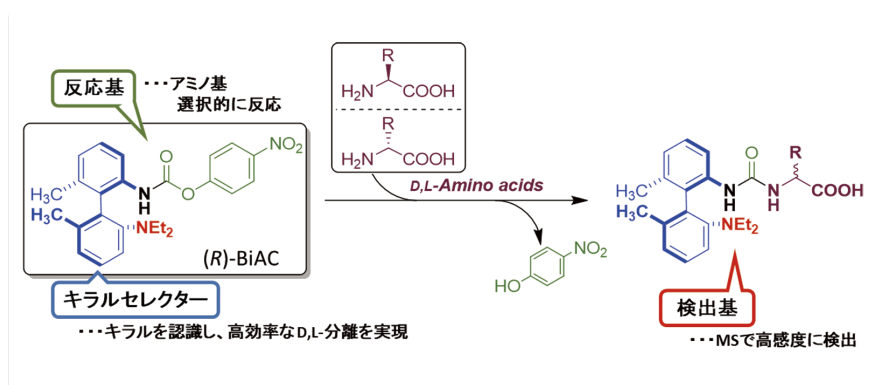


図2. (R)-BiACの構造の特徴とアミノ酸との反応



を用いる分析法は様々なサンプルの D、L-アミノ酸をはじめとするキラル化合物の分析に応用されていくと期待される。

おわりに

これまでのシリーズで、非常に多様なアミノ酸分析の方法が紹介されてきた。キラルアミノ酸分析はさらに多様であり、測りたいサンプルの種類、アミノ酸の種類、必要な精度や感度などに合わせてこれらの分析法を選択する必要がある。今後のキラルアミノ酸分析法の発展と、それをういたさらなる D-アミノ酸の研究成果が、人々の暮らしに貢献できることを期待し、本稿を終えたい。

【参考文献】

- 1) Aliashkevich, A. *et al.* : *Front Microbiol.*, **9**, 683 (2018).
- 2) Gogami, Y. *et al.* : *J. Chromatogr. B*, **879**, 3259 (2011).
- 3) Kawai, M. *et al.* : *Amino Acids*, **43**, 2349 (2012).

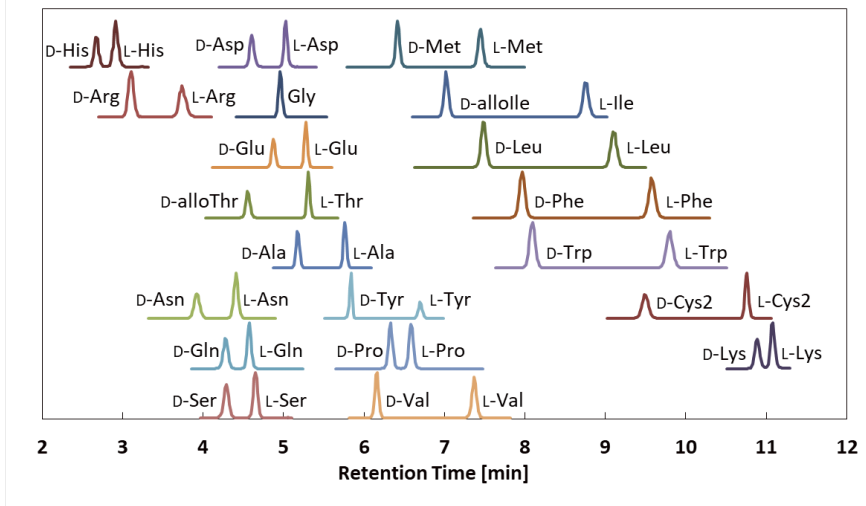


図3. (R)-BiAC によるアミノ酸標品 20 種類の抽出マスキログラム

- 4) Nishikawa, T. : *J. Chromatogr. B*, **879**, 3169 (2011).
- 5) Kakegawa, W. *et al.* : *Nat. Neurosci.*, **14**, 603 (2011).
- 6) Kirschner, D. L. *et al.* : *J. Sep. Sci.*, **32**, 2305 (2009).
- 7) Hamase, K. *et al.* : *Anal. Sci.*, **25**, 961 (2009).
- 8) Furusyo, A. *et al.* : *Chromatography*, **39**, 83 (2018).
- 9) Nakano, Y. *et al.* : *J. Biosci. Bioeng.*, **123**, 134 (2017).
- 10) Ilisz, I. *et al.* : *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **47**, 1 (2008).
- 11) Harada, M. *et al.* : 特願 2015-197070

次回 (第4回) は、vol. 87 No. 3 に掲載を予定しています。

キラルアミノ酸分析に使用する (R)-BiAC につきましては当社 お客様相談室までお問合せ下さい。
<https://labchem.wako-chem.co.jp/question/others/>

キラルカラム

CROWNPAK CR/ CROWNPAK CR-I



コード No.	メーカーコード	品名	内径×長さ×粒子径	容量	希望納入価格(円)
308-32121	27711	CROWNPAK CR Guard Column	0.4cm×1cm×5 μm	1本	30,000
305-08201	28714	CROWNPAK CR(-) Conventional Analytical Column	0.4cm×15cm×5 μm	1本	180,000
301-08203	28734	CROWNPAK CR(-) Semipreparative Column	1cm×15cm×5 μm	1本	600,000
302-08191	27714	CROWNPAK CR(+) Conventional Analytical Column	0.4cm×15cm×5 μm	1本	180,000
308-08193	27734	CROWNPAK CR(+) Semipreparative Column	1cm×15cm×5 μm	1本	600,000
382-02511	54784	CROWNPAK CR-I (-) Conventional Analytical Column	0.3cm×15cm×5 μm	1本	195,000
385-02501*	53784	CROWNPAK CR-I (+) Conventional Analytical Column	0.3cm×15cm×5 μm	1本	195,000

*本文中で使用されているカラム

☐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、2019年1月時点での情報です。最新情報は、当社HPをご参照下さい。

オリゴヌクレオチドの精製

前回までに、主に固相合成法によって、オリゴヌクレオチドを合成する方法について記してきた。固相担体に結びつけたヌクレオチド鎖を必要なだけ伸長し、脱保護及び担体からの切り出しを行うことで、合成は完了する。

ただし、こうしてできた合成ヌクレオチド鎖は、さまざまな不純物を含む。合成の途中で徹底的に洗浄を行うとはいえ、各種不純物の残存は完全には避けられない。

不純物の中でも一番厄介なのは、伸長反応や脱保護の失敗によって生じた、目的物よりも短いオリゴヌクレオチド類である。これらは性質が目的物に類似しているため、基本的に分離が難しい。キャッピング反応を各段階であらかじめ行うことで、精製困難な不純物の生成をかなり抑えられるが、場合によっては除去に苦勞するケースも多い。

どの程度こうした不純物の残存を許すかは、使用目的による。一般的なPCR（ポリメラーゼ連鎖反応）のプライマーに用いる場合であれば、神経質に高純度を求める必要はないが、用途によっては不完全なヌクレオチド鎖をできる限り除去する必要が出てくる。人体に投与する核酸医薬では、最高レベルの純度を求められるのはもちろんのことである。また、ヌクレオチド鎖長や修飾状態（蛍光タグなどが組み込まれているか否か）によっても、精製方法は変わってくる。

リボヌクレアーゼへの対策

オリゴヌクレオチドの中でも、RNA合成における特有の問題として、酵素による分解がある。リボヌクレアーゼ（RNase）は多くの生物に普遍的に存在し、効率よくRNAを分解してしまう。研究者の手に付着した細菌、空気中に浮遊する各種微生物もこのRNaseを持っており、大切な合成RNAを破壊してしまう。

これを防ぐため、研究者はラテックスなどの実験用手袋を着用し、使い捨てのプラスチック製容器（RNaseフリー）を用いて、無菌で操作を行わねばならない。ガラス製容器は200℃で一晩加熱するなどして、滅菌処理を行っておく必要がある。また水なども滅菌済みのものを用い、氷冷状態で取り扱うなどの配慮が必要となる。

脱塩処理

オリゴヌクレオチドの精製には、いくつかの方法が知られており、これらを使い分け、あるいは併用することで目的の純度の生成物を得ることができる。

前回までに述べたように、固相担体上で合成されたオリゴヌクレオチドは、アンモニア水で処理することで、側鎖の脱保護と担体からの切り出しが同時に行われる。この状態では、合成に用いた溶媒、保護基の残渣であるイソブチルアミド、ベンズアミドやアクリロニトリル、アンモニウム塩及び、塩基配列に欠損のあるオリゴヌクレオチドなどが不純物として残存する。

真空下で溶媒を留去することで、過剰のアンモニアは除かれる。この水溶液に酢酸ナトリウムなどの塩を加え、リン酸部分をナトリウム塩とする。ここにエタノールを加えていくことで、

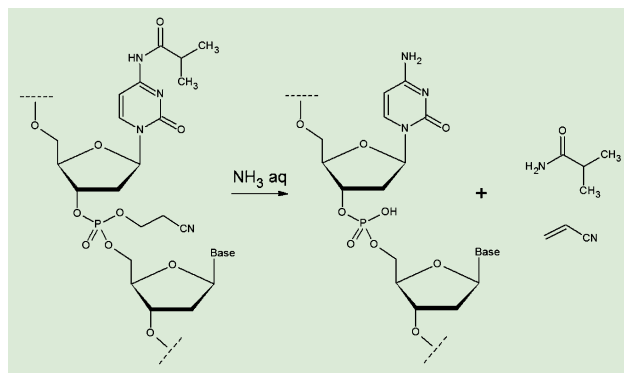


図1. オリゴヌクレオチドの脱保護

オリゴヌクレオチドが凝集してくる。これを遠心分離によって沈降させ、上澄みを捨てることで、無機塩や保護基由来の低分子などがある程度除去することができる。

順相または逆相シリカを充填した短いカラムを用いた、脱塩処理も広く行われる。逆相カラムを用いる場合、トリエチルアミン-酢酸緩衝液などに合成オリゴヌクレオチドを溶解し、カラムにチャージして各種緩衝液などで流し出すことにより、低分子や無機塩などの不純物を除くことができる。

この操作では、保護基残渣などの低分子は除かれるが、不完全なオリゴヌクレオチド鎖は除去されず残存してしまう。ただし、用途がPCRのプライマーなどであれば、この程度の精製でも十分利用可能である。またこの脱塩工程は、HPLCなど他の精製法の後に、塩類を除去する目的でも行われる。

高速液体クロマトグラフィー（HPLC）

さらに高い純度が求められる場合には、HPLCが用いられる。多くの場合、シリカにC₁₈の炭化水素鎖を結合させた逆相カラムが利用される。条件の一例として、不純物を含んだオリゴヌクレオチド鎖を水溶液としてチャージし、酢酸アンモニウム水溶液で溶出する。徐々に移動相のアセトニトリル含量を上げていくことで、不完全なオリゴヌクレオチド鎖との分離を行う。

トリチルオンと呼ばれる分離手法もある。固相担体上でオリゴヌクレオチド鎖を必要なだけ延伸し、すぐさまアンモニア水処理することで、5'末端保護基の4,4'-ジメトキシトリフェニルメチル（DMTr）基を残したまま切り出すことができる（トリチルオン）。

この状態のオリゴヌクレオチド鎖を逆相カラムにチャージすると、脂溶性の高いトリチル基のために目的のオリゴヌクレオチドは吸着され、キャッピング処理された不完全なオリゴヌクレオチド鎖は早く溶出してくる。こうして不純物を十分流し出した後で、アセトニトリル含量を増やし

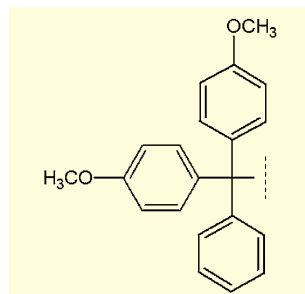


図2. 4,4'-ジメトキシトリフェニルメチル（DMTr）基



ていくことにより、目的のオリゴヌクレオチドを後から溶出させるというものである。

DMTr 基は酸処理で容易に切断できるので、これによって効率的な精製が可能となる。ただし、DMTr 基切断の際の酸処理により、アデニンやグアニンの脱アミノ化などの副反応が起きる可能性がある。

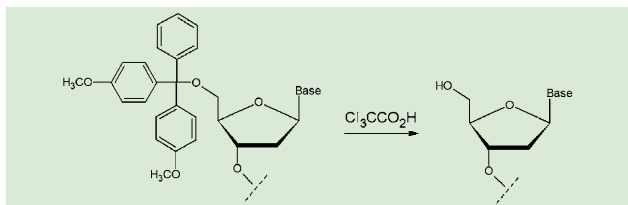


図3. DMTr 基の脱保護

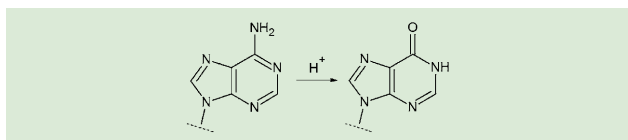


図4. アデニンの脱アミノ化

HPLC 精製に伴う問題点として、一本鎖オリゴヌクレオチドが分子内で水素結合を形成し、ヘアピンループなどの高次構造を作ってしまうケースがある。こうした場合には、ピークがブロード化するか、2本に分裂してしまう。アルカリ性溶液を用いるか、カラムオープンでカラムを温めることによって水素結合を破壊し、これを防ぐことができる。

また、核酸医薬を目指す場合に一般的に用いられる、ホスホロチオエートオリゴヌクレオチド（リン酸部分のP=O結合がP=S結合に変換されたもの）では、HPLCのピークがややブロードになることがある。これは、ホスホロチオエートのリン原子がキラリティを持つため、微妙に溶出時間が異なるジアステレオマーの混合物となるためである。

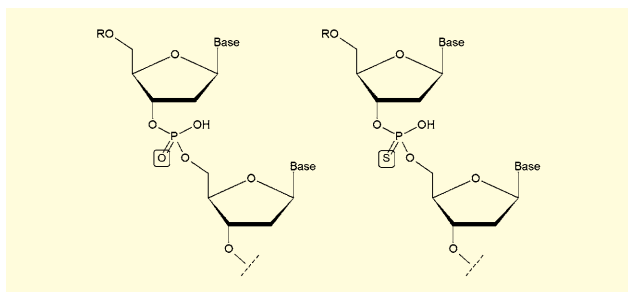


図5. 通常のオリゴヌクレオチド (左) とホスホロチオエートオリゴヌクレオチド (右)

HPLC 法は、サイズの大きなカラムを用いることで、大規模な精製にも対応できる利点がある。ただし一般に、HPLC による精製は 50 塩基程度が限界であり、それ以上の長いオリゴヌクレオチド鎖では分離が困難になるケースが出てくる。

イオン交換クロマトグラフィー

クロマトグラフィーの固定相として、四級アンモニウム塩部位を持ったゲルを用いる方法である。オリゴヌクレオチドのリン酸基は負に帯電しているため、長いものほど強くゲルと相互作用する。これを利用し、長さの異なるオリゴヌクレオチドを分離できる。ただし、あまりに長いオリゴヌクレオチドでは分離能が低下するため、この方法は 40 塩基程度の長さまでに限られる。

ポリアクリルアミドゲル電気泳動法 (PAGE)

オリゴヌクレオチドはリン酸基を持ち、マイナスの電荷を持つ。これを利用し、電気泳動を用いた精製法が可能になる。ポリアクリルアミドゲルは分子ふるい効果が大きく、分子量別に分離するのに適している。

フレーム内にアクリルアミド、ビスアクリルアミドなどを含んだ溶液を流し込み、重合開始剤を加えて重合させ、ゲルを作る。ここに精製したいオリゴヌクレオチド溶液を流し込んで電圧をかけると、オリゴヌクレオチドは陽極側に引かれて徐々に移動する。鎖長が異なると泳動する距離も変わるため、これを利用して不純物との分離が可能となる。

エチジウムブロマイドなどの蛍光剤は DNA に結合して紫外線照射で光るため、ゲル内のオリゴヌクレオチド検出を容易にする。目的物の分画をスライスして取り出し、これを洗い出すことによって、目的のオリゴヌクレオチド鎖を得る。目的のオリゴヌクレオチド鎖が長くなると、ゲルの網目からの回収が難しくなるが、ゲルをスパーテルなどでよくすりつぶすことで効率が向上する。

塩基数が 80 を超えると、他の方法での精製は難しいため、PAGE による精製がほぼ唯一の手段となる。ただし、ゲルからの完全な回収は困難であるため、必ずロスが出てしまうのがこの方法の難点である。

このように、オリゴヌクレオチドの精製法は複数あり、それらの特徴をよく知った上で使い分け、あるいは併用する必要がある。他のジャンルの実験同様、さまざまな方法を自分の手で試し、経験を積んでコツを掴むことが、結局は重要ということになるだろう。

核酸合成関連試薬

当社では、脱保護反応試薬など、核酸合成後の分離・精製に用いる試薬をラインアップしています。詳しくは、当社 HP をご覧下さい。

Wako

第4回 エクソソーム糖鎖プロファイリングのススメ

慶應義塾大学 医学部医化学 松田 厚志

細胞が分泌する細胞外小胞の中でも、粒径 100 nm 前後の小胞はエクソソームと呼ばれ、固有のタンパク質や microRNA などを内包している。さらに、その表層には脂質や糖タンパク質などが存在することから、血中循環腫瘍細胞や血中循環 DNA に次ぐ第三のリキッドバイオプシー標的として注目されており、現在、microRNA、プロテオーム解析を中心に世界的な開発競争が展開されている。エクソソームの最外殻は細胞と同様、糖鎖で覆われており、糖鎖はエクソソームマーカー開発における格好のターゲットになる。临床上利用されている腫瘍マーカーは糖鎖構造の違いを認識するものが多く、疾患特異的なエクソソーム上の糖鎖変化を捉えることができれば、有用なバイオマーカー開発につながるものと期待される。

タンパク質はほとんどが糖鎖をはじめとする様々な翻訳後修飾を受け機能性タンパク質として働く。ゲノム、タンパク質に次ぐ第三の生命鎖と呼ばれる糖鎖は細胞増殖、分化、細胞応答など様々な生命現象に関与すると考えられている。また、がん、免疫、感染症、アルツハイマー病など糖鎖が関わっているとされる疾患は数多く、特にがんでは、がんの転移、浸潤、増殖などでその重要性が明らかにされている。がんの診断・治療法の開発において、糖鎖研究への期待度は高く、糖鎖の分子生物学的意義を明らかにすることは重要課題の一つである。

糖鎖は一筆書きの核酸やアミノ酸配列と比べて、枝分かれや異なる結合様式 (α , β -結合) の多様性が存在し、核酸のように増幅ができず、タンパク質のような有用なプローブ (抗体) が限られていることもその解析をより一層困難なものにさせる。しかし昨今の質量分析、マイクロアレイ基盤技術を中心とした糖鎖解析技術の革新は目覚ましく、これまでに新たな糖鎖腫瘍マーカーおよび開発アプローチも数

多く報告されている。これら技術革新によって糖鎖は数居の高い研究分野から、誰もが気軽に糖鎖解析を行える時代になった。これまでに著者らは、糖鎖を構造特異的に認識し結合するタンパク質、レクチンを数十種類固相化したレクチンマイクロアレイシステムを活用し¹⁾、各種糖鎖バイオマーカー開発を推し進めてきた^{2,3)}。本法最大の利点は、質量分析による解析に比べて感度・スループットの面で秀でていることである (図1)。これまで、本システム応用の一環として、様々な生体試料からの解析を可能とするプロトコル開発を実施してきた結果、現在、体液、組織、細胞などレクチンアレイ解析の対象は多岐にわたる。粒子状のエクソソームは、細胞に比べてその粒径こそ小さくはあるが、その表面には無数の糖タンパク質、糖脂質糖鎖が存在する。よって格好のレクチンアレイ解析対象となる。レクチンアレイ解析は数十種類のレクチン結合パターンから糖鎖構造を推定し、比較対象と差異のある糖鎖 (レクチン) パターンを見出す。これを糖鎖プロファイリングと呼ぶ。我々が採用するエクソソーム解析プロトコルでは、精製したエクソソーム粒子上タンパク質を蛍光標識する。

そのため粒子形状を保ったままエクソソームを回収することが重要となる。また、レクチンマイクロアレイは高感度であるため回収量はそれほどなくても解析は可能であるが、他の糖タンパク質が混入するとそれがノイズとなるため正確なエクソソーム糖鎖プロファイリングに支障をきたす。よって精製エクソソームの純度も要求される。エクソソームの精製は高純度にかつ粒子状態を保ったまま回収可能な MagCapture™ Exosome Isolation Kit PS (以後 MagCapture) を使用した。本 Kit の使用は、特に後述する血中エクソソーム糖鎖解析の際に抜群の効力を発揮する。

まず我々は培養細胞をモデルとして培養上清からエクソソームを単離・精製しレクチンマイクロアレイによる比較糖鎖プロファイリングを試みた。比較対象として、同一細胞株のペレットから細胞膜タンパク質を精製し、そのタンパク質上糖鎖プロファイルと比較した (図2)。3種の膀胱がん細胞株 (Capan-1,2, HPAF-II) から得られたレクチンアレイデータから、階層型クラスター解析を実施すると、これらプロファイルは株間ではなく、膜タンパク質・エクソソーム間で見事に分かれ

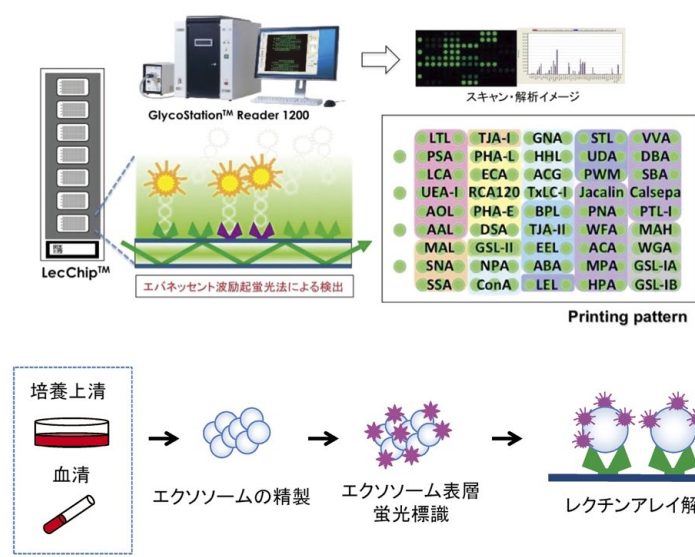


図1. レクチンマイクロアレイシステムとエクソソーム糖鎖プロファイリングの流れ

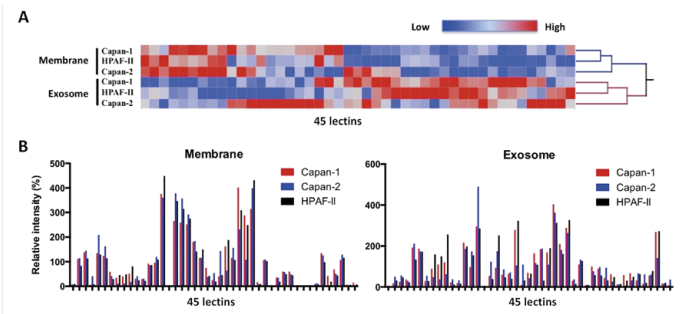


図2. 膵臓がん細胞由来エクソソームと細胞膜糖タンパク質の比較糖鎖プロファイリング
 (A) 階層型クラスター解析によるクラスタリング
 (B) 各細胞株由来細胞膜タンパク質、エクソソーム表層糖鎖のレクチンアレイ結合パターン

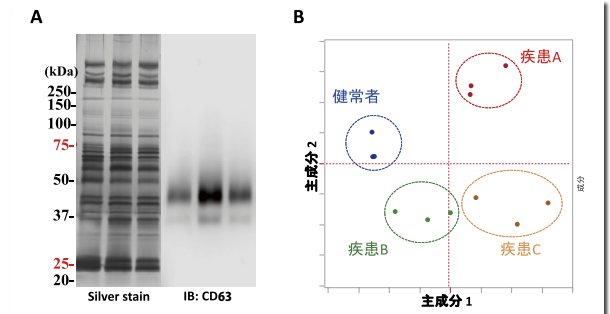


図3. 血清エクソソームの比較糖鎖プロファイリング
 (A) 各プール血清からの精製エクソソームの銀染色と抗 CD63 抗体ウエスタンブロット
 (B) レクチンアレイ解析データを用いた主成分解析

た (図2A)。つまり、たとえ同じ細胞株であっても細胞膜タンパク質上糖鎖と分泌されるエクソソーム上糖鎖はその構造は異なることを示している。また同じエクソソームでもその詳細な糖鎖プロファイルは異なることから (図2B)、エクソソームを標的とした比較糖鎖プロファイリングが可能であることが示された。

培養上清をモデルとしたエクソソーム解析にはある程度目処がたった。血清での比較解析を実施する場合、夾雑する糖タンパク質が多量に含まれるためより慎重を期する。つまり、血中エクソソーム糖鎖解析には高純度にエクソソームを精製することが重要となる。血清エクソソーム精製法として超遠心法やポリマー沈殿法、MagCaptureを使用した際の糖鎖プロファイリング法を比較した。超遠心法やポリマー沈殿法で精製した場合、健康者とがん患者間で糖鎖プロファイルに差は認められなかった。その要因として、本法にて精製したエクソソーム画分を電気泳動で確認すると、過剰なグロブリ

ンタンパク質をはじめとする血清糖タンパク質のバンドが確認され、比較糖鎖プロファイリングに支障をきたしており、血清エクソソーム糖鎖解析にはエクソソームを高純度に精製可能な MagCapture が最適な Kit であることが判明した。最終的に MagCapture をエクソソーム精製に使用する Kit としたプロトコルにより、レクチンアレイ解析に必要な量として、血清量換算すると数 μL に相当するエクソソーム量が検出可能な高感度血中エクソソーム比較糖鎖解析プロトコルを確立した。本 Kit はエクソソームを粒子状態が保たれたまま回収可能なことも心強い。本プロトコルに従い、実際に健康者・疾患群 (A, B, C) プール血清中エクソソームの比較糖鎖プロファイリングを実施した。主成分解析の結果、これら血清エクソソーム表層糖鎖プロファイルは疾患ごとに異なることが示され (図3)、エクソソーム糖鎖が新たなエクソソーム診断ターゲットとなる可能性が示唆された。

現在臨床応用を念頭に糖鎖エクソ

ソームマーカーの開発を試みている。ゲノム・プロテオーム解析を中心にエクソソームの本質が徐々に明らかにされつつある。近年、革新的な血中エクソソーム測定法の開発により、エクソソームの定量的計測が可能となりはじめている。臨床応用へ向けたイメージも尚一層つくようになった。疾患特異的エクソソーム糖鎖が見出せれば、このような革新的エクソソーム定量デバイスに応用し、より実践的マーカーの開発につながるものと期待される。他のオミクス解析との融合や、見出した特異的糖鎖のバリデーション法など改良を重ねる余地は多分にあるが、エクソソーム糖鎖マーカー開発へ向けた第一歩は踏み込めた。

【参考文献】

- 1) Kuno, A. et al. : *Nat. Methods*, **2**, 851 (2005).
- 2) Matsuda, A. et al. : *Hepatology*, **52**, 174 (2010).
- 3) Matsuda, A. et al. : *Anal. Chem.*, **87**, 7274 (2015).
- 4) Yoshioka, Y. et al. : *Nat. Commun.*, **5**, 3591 (2014).
- 5) Kabe, Y. et al. : *Clin. Chem.*, **64**, 1463 (2018).

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

☐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、2019年1月時点での情報です。最新情報は、当社HPをご参照下さい。

動物を用いない高感度な皮膚感作性評価法 "ADRA" の紹介

富士フイルム株式会社 環境・品質マネジメント部 安全性評価センター
山本 裕介、藤田 正晴、笠原 利彦、勝岡 尉浩

はじめに

動物福祉の観点から世界的に動物実験に対する規制が進んでいる。海外ではEUにおいて、1993年より段階的に化粧品原料に対する動物実験の規制が実施されており、2013年以降EU加盟国における動物実験を使用した原料を含む化粧品類の販売が全面的に禁止¹⁾となった。

このような背景から、動物を使わない安全性試験（動物実験代替法）の開発が喫緊の課題となり、皮膚刺激性、眼刺激性、皮膚腐食性、皮膚感作性、光毒性などの動物実験代替法が、国際的に合意された試験方法として経済協力開発機構（OECD）のテストガイドライン（TG）に記載されている。国内では2006年に動物愛護管理法が改訂・施行²⁾され、以降実験動物における3Rs^{*}の強化が進められてきた。これを受けて、国内でも動物実験代替法の開発が盛んに進められており、眼刺激性試験代替法のShort Time Exposure in vitro test method³⁾（STE）（OECD TG491）、皮膚感作性試験代替法のhuman Cell Line Activation Test⁴⁾（h-CLAT）（OECD TG442E；ANNEX I）およびInterleukin-8 Reporter Gene Assay⁵⁾（IL-8 Luc assay）（OECD TG442D；Appendix IA）がTGとして記載されている。また、代替法に使用される材料の開発も国内において行われており、3次元培養皮膚モデルを用いた皮膚刺激性試験代替法のReconstructed Human Epidermis Test Method⁶⁾（OECD TG439）や3次元培養角膜モデルを用いた眼刺激性試験代替法のReconstructed Human Cornea-like Epithelium Test Method⁷⁾（RhCE）（OECD TG492）にジャパン・ティッシュ・エンジニアリング社製の皮膚モデルおよび角膜モデルが採用されている。

上記の化粧品業界に加えて、近年ではEUにおける化学品の登録・評価・認

可および制限に関する規則であるREACH規則においても、2016年6月にREACH付属書VIIおよびVIIIの改訂がなされ、年間10トン以下製造・輸入する物質は、皮膚腐食性および刺激性、眼刺激性、皮膚感作性試験について、動物実験代替法を標準の試験法とすることが義務づけられている。

本稿では、筆者らが新たに開発した皮膚感作性試験代替法であるAmino acid Derivative Reactivity Assay（ADRA）について説明する。

皮膚感作のメカニズムと代替法

皮膚感作性とは、皮膚が化学物質に暴露されることで引き起こされるアレルギー反応のことである。皮膚感作性は、体内の免疫系が化学物質を異物として記憶してしまうため、再度化学物質に暴露した際に過剰な反応を示し、紅斑（発赤）、浮腫（腫れ）および水疱（水膨れ）のような症状となって現れる。また、皮膚感作性は、皮膚刺激性の反応と異なり、免疫系の過剰な反応により重篤な症状を引き起こすことがある。さらに、免疫系を介するため、皮膚が感作性物質に暴露されてから症状が現れるまで複雑な過程がある。OECDでは、このステップのうち4つのKey event（1. タンパク質と感作性物質の結合、2. 角化細胞の活性化、3. 樹状細胞の活性化、4. T細胞の増殖）が定義されている⁸⁾。現在、最も幅広く使用されている*in vivo*皮膚感作性試験法としてマウスを使用したLocal Lymph Node Assay（LLNA）が知られており、この試験法はKey event 4に基づいた評価法となっている。動物実験代替法ではKey event 4を除く3つのKey eventに基づいた試験法と

して、Key event 1では、Direct Peptide Reactivity Assay⁹⁾（DPRA）（OECD TG442C）、Key event 2では、ARE-Nrf2 luciferase test method¹⁰⁾（KeratoSensTM）（OECD TG442D；Appendix IA）およびARE-Nrf2 Luciferase LuSens¹¹⁾（OECD TG442D；Appendix IB）、Key event 3では、h-CLAT⁴⁾、U937 Skin Sensitization Test¹²⁾（U-SENS）（OECD TG442E；ANNEX II）およびIL-8 Luc assay⁵⁾の計6試験が記載されている。

感作性物質は、体内に入った後、タンパク質と結合して複合体を形成し、この複合体を免疫細胞の一つである樹状細胞が取り込むことで抗原（異物）として認識される。このタンパク質と感作性物質が結合して複合体を形成する過程がKey event 1であり、2015年にTGに記載されたDPRAと同様に、筆者らが開発したADRAもこの過程での反応性を評価する試験法である。

ADRAとDPRAの原理と比較

タンパク質と感作性物質の結合は、主にタンパク質に含まれるシステインのチオール基またはリジンのアミノ基との共有結合によるものであることが知られている^{13, 14)}。そのため、DPRAではシステインを含むペプチド（システイン含有ペプチド）とリジンを含むペプチド（リジン含有ペプチド）の2種類を用い、それぞれに対する被験物質の反応性からタンパク質との結合性を評価している¹⁵⁾。

これに対し、ADRAはシステインとリジンの2つのアミノ酸に、それぞれナフタレン環を導入した新規アミノ酸誘導体であるN-(2-(1-Naphthyl)acetyl)-L-cysteine（NAC）および α -N-(2-(1-Naphthyl)acetyl)-L-lysine（NAL）を用い（図1）、

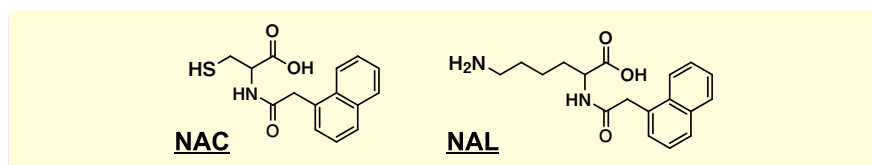


図1. NAC、NALの構造式

これらと被験物質の反応性からタンパク質との結合性を評価する^{14, 15, 16}。

試験手順を次に示す。まず、96 ウェルプレート上で NAC または NAL と被験物質をそれぞれ 1:50 のモル比で混合した反応液を調製し、24 時間 25°C で遮光状態にてインキュベートする。24 時間後、反応停止液であるトリフルオロ酢酸 (TFA) 水溶液を添加して反応を停止した後、HPLC にて被験物質と未反応の NAC、NAL の量を測定することで、被験物質の NAC、NAL に対する反応性を算出する (図 2)。DPRA も ADRA と同様、ペプチドと被験物質を 24 時間反応させた後、未反応のペプチドを HPLC で定量して、被験物質の反応性を算出する。この ADRA や DPRA は培養細胞や生体由来成分を用いる *in vitro* 試験とは異なり、物質の化学反応のみを評価する試験法 (*in chemico* 試験) であるため、*in vitro* 試験と比較して、簡便かつ再現性や定量精度の高い試験法であると言える。

しかし、基本的な原理や試験手順は同じであるものの、ペプチドの代わりに NAC および NAL を用いていることにより、ADRA は DPRA よりも多くの点で優れている (表 1)。DPRA では、反応液中の被験物質濃度が 5~20 mM と高いため、しばしば被験物質の析出が見られることや、2 種のペプチドを 220 nm の短波長で定量する必要があるため、被験物質由来のピークと重なり (共溶出)、正しく評価できないこと等の問題がある。これに対し、NAC および NAL はナフタレン環を持つため、DPRA よりも約 60 nm 長波長である 281 nm で定量することが可能である。そのため、被験物質由来のピークと共溶出することがほとんどない。その上、HPLC での検出感度が高く、反応液における被験物質の濃度は 0.2 mM と DPRA のおよそ 1/100 の濃度で試験ができるため、被験物質の析出がほとんどない。このほかにも DPRA では、システイン含有ペプチドのチオール基が酸化されて二量体化することによる定量精

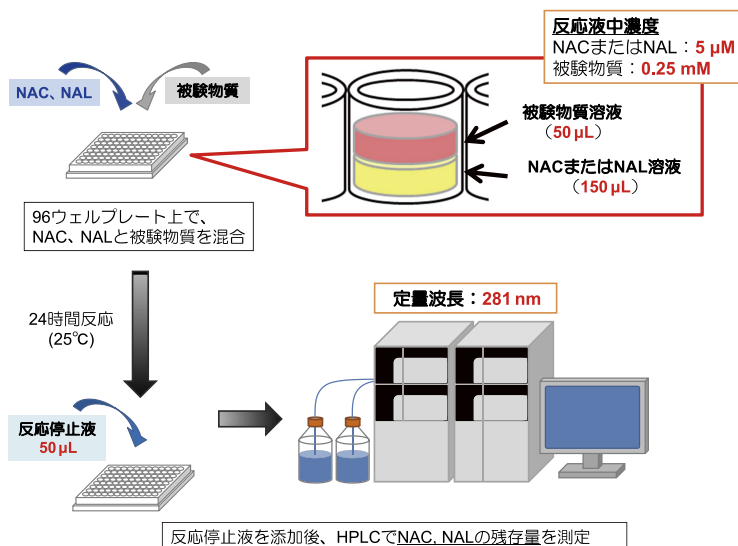


図 2. ADRA の試験法の流れ

表 1. ADRA と DPRA の比較表

試薬	求核試薬	種類	ADRA		DPRA	
		反応液中濃度 酸化防止剤	NAC	NAL	Cysteine peptide	Lysine peptide
被験物質溶液	種類	5 μM	0.2 μM EDTA	不要	500 μM	
	溶媒の種類		①水、②アセトニトリル、③アセトン、④DMSO/アセトニトリル		①アセトニトリル、②水、③アセトニトリル/水、④イソプロパノール、⑤アセトン、⑥アセトン/アセトニトリル、⑦アセトニトリル/DMSO	
	反応液中濃度	0.25 mM			5 mM	25 mM
	緩衝液	種類	リン酸緩衝液		リン酸緩衝液	酢酸アンモニウム緩衝液
	pH	8.0	10.2		7.5	10.2
反応	反応容器	96 ウェルプレート				
	求核試薬必要量	約 0.3 μg/ウェル				
	被験物質必要量 (分子量 200 として算出)	0.01 mg/ウェル				
	反応液総量	200 μL				
	温度	25°C				
	時間	24 時間				
反応停止	反応停止液	溶液	TFA 溶液			
		添加量	50 μL			
HPLC 測定	検出波長 分析時間	281 nm			220 nm	
		20 分間 / 試料			20 分間 / 試料	

EDTA : エチレンジアミン四酢酸

TFA 溶液 : 2.5% (v/v) トリフルオロ酢酸水溶液

度の低下が認められるが、筆者らはチオール基の酸化に金属イオンが関係していることを見出し、ADRA における NAC の反応液に極微量の EDTA を添加することで NAC の安定性を向上させている¹⁸。また、DPRA におけるシステイン含有ペプチドの二量体は反応液中で析出するため、HPLC の測定に対する影響が懸念される上に、どれくらい二量体化されたかを定量することができない。こ

れに対し、NAC の二量体は析出することなく、HPLC で定量することが可能であるため、万が一 NAC が酸化されても、試験系への影響を容易に判断することができる。以上の点に加え、ADRA では反応停止液を添加することにより、HPLC の測定中における反応の進行を抑えられると考えられるため、DPRA と比較してばらつきが少ない安定したデータの取得が可能であること、HPLC 用バイアル中で

反応液調製を行うDPRAと異なり、ADRAでは96ウェルプレートとマルチチャンネルピペッターでの操作を基本にすることにより、スループット性にも優れていることなど、ADRAは高い試験精度のほか汎用性や操作性にも優れた試験法であると言える。

ADRAの感作性評価性能

動物実験代替法には、動物実験と同等の安全性評価ができることが求められる。ADRAにおいても、動物実験と同様に化学物質の皮膚感作性評価が可能を確認するため、DPRAの試験法確立に使用された82物質を用いて、LLNAに対する予測精度評価を実施している。その結果、ADRAの予測精度は87%と非常に高い値であった¹⁸⁾。

以上より、ADRAが非常に有用な試験法であることが確認できたため、2016年からOECDのテストガイドライン収載を目指した取り組みを行っている。2017年には4施設の研究機関参加による試験の再現性と妥当性を評価するバリデーション試験を実施し、非常に高い施設内再現性と施設間再現性が得られている。現在、この結果に基づきテストガイドライン申請を行っている。

今後の展望

本稿ではADRAがDPRAよりも多くの点において優れていることを説明してき

たが、培養細胞を使用しないため、他の*in vitro*代替法試験と比較すると、特別な施設や設備および無菌操作などの技術が不要であること、試験期間が短く安価に実施できること、再現性が良いことなど、多くの利点が挙げられる。

EUにおける化粧品原料に対する動物実験禁止の背景から、動物実験代替法は化粧品業界におけるニーズが最も高いが、REACH規則の改正など化粧品原料以外の一般化学物質における安全性評価にも動物実験代替法が取り入れられてきているため、今後、化粧品業界に限らず幅広い分野で利用されることを期待している。

【参考文献】

- 1) EU化粧品指令(第7次改正) European Commission: "DIRECTIVE 2003/15/EC OF THE EUROPEAN PARLIAMENT AND OF THE COUNCIL of 27 February 2003, amending Council Directive 76/768/EEC on the approximation of the laws of the Member States relating to cosmetic products", *Official J. European Union*, L66/26 (2003).
- 2) 環境省告示、「動物の愛護及び管理に関する施策を総合的に推進するための基本的な指針」, 平成25年8月30日, 第80号 (2013).
- 3) OECD: "Short Time Exposure In Vitro Test Method for Identifying I) Chemicals Inducing Serious Eye Damage and II) Chemicals Not Requiring Classification for Eye Irritation or Serious Eye Damage", *OECD Guideline for the Testing of Chemicals 491* (2018).
- 4) OECD: "ANNEX I: In Vitro Skin Sensitisation: Human Cell Line Activation Test (h-CLAT)", *OECD Guideline for the Testing of Chemicals 442E* (2018).
- 5) OECD: "ANNEX III: In Vitro Skin Sensitisation: IL-8 Luc assay", *OECD Guideline for the Testing of Chemicals 442E* (2018).
- 6) OECD: "In Vitro Skin Irritation:



※3Rs: 「Replacement: 動物を使用しない方法への置換え」、「Reduction: 使用動物数の削減」、「Refinement: 実験に伴う動物に対する苦痛の削減」の3つから成る動物実験における原則。

Reconstructed Human Epidermis Test Method", *OECD Guideline for the Testing of Chemicals 439* (2013).

- 7) OECD: "Reconstructed human Cornea-like Epithelium (RhCE) test method for identifying chemicals not requiring classification and labelling for eye irritation or serious eye damage", *OECD Guideline for the Testing of Chemicals 492* (2018).
- 8) OECD: *OECD Series on Testing and Assessment*, **168**, 1 (2014).
- 9) OECD: "In Chemico Skin Sensitisation: Direct Peptide Reactivity Assay (DPRA)", *OECD Guideline for the Testing of Chemicals 442C* (2015).
- 10) OECD: "Appendix IA: In Vitro Skin Sensitisation: The ARE-Nrf2 Luciferase KeratinoSens™ Test Method", *OECD Guideline for the Testing of Chemicals 442D* (2018).
- 11) OECD: "Appendix IB: In Vitro Skin Sensitisation: The ARE-Nrf2 Luciferase LuSens Test Method", *OECD Guideline for the Testing of Chemicals 442D* (2018).
- 12) OECD: "ANNEX II: In Vitro Skin Sensitisation: U937 Cell Line Activation Test (U-SENS™)", *OECD Guideline for the Testing of Chemicals 442E* (2018).
- 13) Roberts D. W. et al.: *Chem. Res. Toxicol.*, **20**, 1019 (2007).
- 14) Ahlfors, S. R. et al.: *Skin Pharmacol. Appl. Skin Physiol.*, **16**, 59 (2003).
- 15) Gerberick, G. F. et al.: *Toxicol. Sci.*, **97**, 417 (2007).
- 16) Fujita M. et al.: *J. Pharmacol. Toxicol. Methods*, **70**, 94 (2014).
- 17) Yamamoto Y. et al.: *J. Appl. Toxicol.*, **35**, 1348 (2015).
- 18) Fujita M. et al.: *J. Appl. Toxicol.*, in press, (2018).

ADRAキット

キット内容

- NAC 10mL用×2本
- NAL Buffer (pH 10.2) (premixed) ... 300mL用×2本
- NAL 10mL用×2本
- 0.01 mol/L EDTA Solution 1mL×2本
- NAC Buffer (pH 8.0) (premixed) ... 300mL用×2本

コード No.	品名	規格	容量	希望納入価格(円)
296-80901	ADRA Kit	皮膚感作性評価用	1キット	75,000

本キットは富士フィルム株式会社よりライセンスを受け製造・販売を行っています。



Refrigerated (2~10°C), Frozen (-20°C), Frozen (-80°C), Frozen (-150°C), Room temperature (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、2019年1月時点での情報です。最新情報は、当社HPをご参照下さい。

3 カラーデジタル PCR



ナिकासシステム

フランス Stilla 社の Naica™ System (ナिकासシステム) は、クリスタルデジタル PCR という次世代技術による新しいデジタル PCR システムです。マイクロ流体技術により、デジタル PCR のプロセスをサファイアチップ1つで実現します。

特長

- 3 カラー検出により、コントロールを除いて2ターゲットを同時に検出可能
- 25,000 ~ 30,000 ドロップレットを作製し、高感度にターゲットを検出
- サファイアチップにサンプル PCR ミクスチャーを入れるだけの簡単操作
- 2.5 時間 (PCR 反応を含む) で結果取得
- ユーザーフレンドリーな解析ソフト

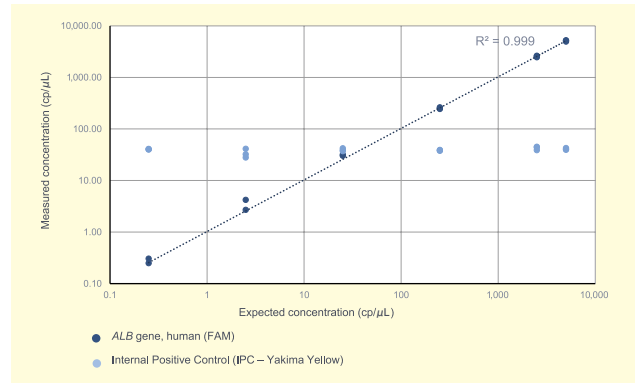


ナिकासシステムは、ナイカジョード・ナイカプリズム3・クリスタルマイナーのセットです。

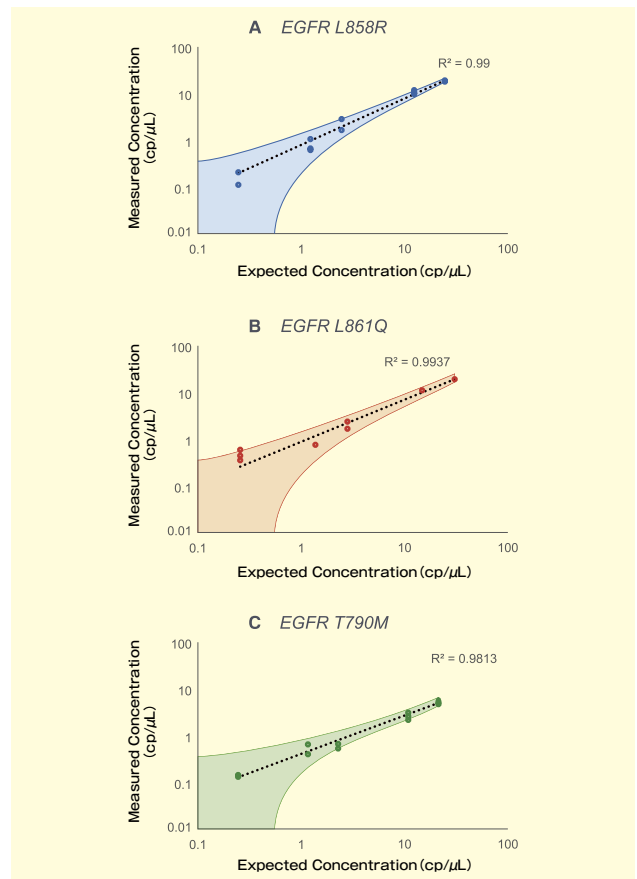
製品概要

処理数	12 サンプル / ラン
検出カラー数	3 カラー (Blue, Green, Red)
ドロップレット数	25,000 ~ 30,000
装置専用の消耗品	サファイアチップのみ
測定時間 (PCR 含む)	2.5 時間 / 12 サンプル
サイズ (W × D × H)	ナイカジョード: 35 × 37 × 29 cm ナイカプリズム3: 44 × 34 × 21 cm

データ



ナिकासシステムでのダイナミックレンジと直線性を評価した。10 倍希釈系列のヒトゲノム DNA サンプルにてアルブミン遺伝子 (ALB) の定量を行った。コントロールとして Yakima Yellow を使用した。



EGFR 遺伝子変異である EGFR L858R (A)、EGFR L861Q (B)、EGFR T790M (C) について 25 ~ 0.25 copy/μL のタイトレーションを調製し測定した。コントロールとして野生型 EGFR 遺伝子を用いた。3 カラー検出により各遺伝子変異量の検出を行った。

コード No.	品名	容量	希望納入価格 (円)
556-33061	Naica™ System	1セット	19,800,000
553-33071	Sapphire Chips (12個入)	1箱	72,000

☐2...2 ~ 10℃保存 ☐E...-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、2019年1月時点での情報です。最新情報は、当社HPをご参照下さい。

脳科学を革新する光学的アプローチ

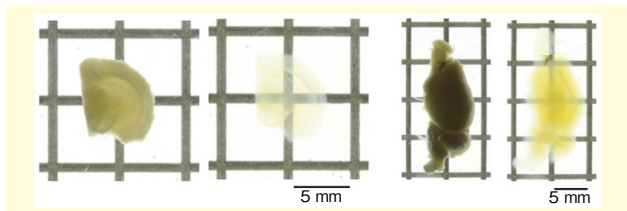
Wako

SCALEVIEW®-S

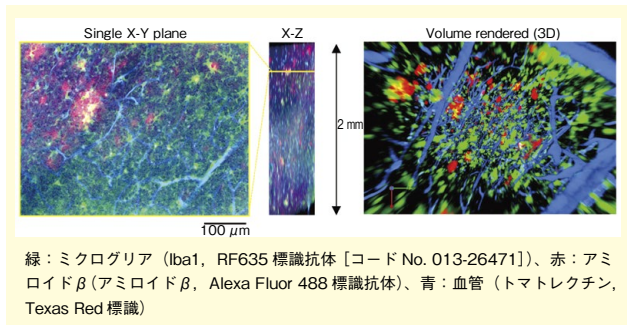
本品は、蛍光タンパク質を含む生体標本を透明化する試薬です。また、分厚い標本を抗体や蛍光色素で標識する工程においても使用することができます。特に脳組織病理標本の解析ツールとして活躍することが期待されます。

使用例

SCALEVIEW®-S Trial Kitを用いたマウス脳の透明化



アルツハイマーモデルマウス（17ヶ月齢）脳スライス（2 mm厚）のAbScale法による免疫組織染色



コード No.	品名	規格	容量	希望納入価格(円)
299-79901	SCALEVIEW®-S Trial Kit	組織透明化用	1キット	45,000

※ Trial Kit は SCALEVIEW®-S0 ~ S4 及び -Smt にて構成されています。また、deScale Solution[コード No. 041-34425]が別途必要です。

※ 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。

関連商品

コード No.	品名	規格	容量	希望納入価格(円)
041-34425	deScale Solution	組織透明化用	500mL	12,000
193-18455	SCALEVIEW®-A2	組織透明化用	500mL	10,000
196-18521	SCALEVIEW®-S0	組織透明化用	250mL	12,000
193-18531	SCALEVIEW®-S1	組織透明化用	250mL	12,000
190-18541	SCALEVIEW®-S2	組織透明化用	250mL	12,000
197-18551	SCALEVIEW®-S3	組織透明化用	250mL	12,000
194-18561	SCALEVIEW®-S4	組織透明化用	250mL	12,000
191-18571	SCALEVIEW®-Smt	組織透明化用	250mL	15,000

Ref. 2 ~ 10°C 保存 F 20°C 保存 S 80°C 保存 S 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、2019年1月時点での情報です。最新情報は、当社HPをご参照下さい。

組織深部を高解像・高輝度解析

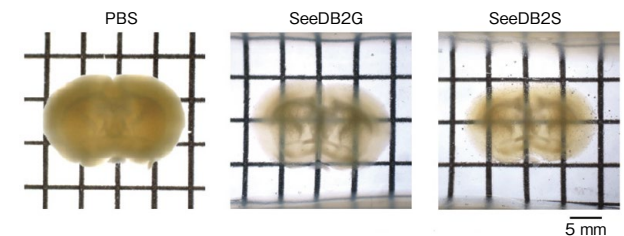
Wako

SeeDB2

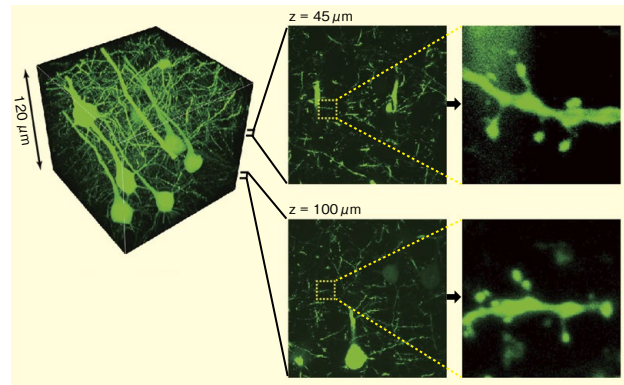
本品は、新しいタイプの組織透明化試薬です。特に蛍光タンパク質によって標識されたサンプルの3次元高解像イメージングに最適です。キット中のSeeDB2Gはグリセリンの屈折率(1.46)に、SeeDB2Sはオイルの屈折率(1.52)に合わせてあり、それぞれグリセリン浸レンズ、油浸レンズを用いた観察において、深部でも球面収差によるボケ(分解能の低下)が生じないように最適化されています。

使用例

SeeDB2を用いたマウス脳の透明化



Thy1-YFP H line マウス脳スライスの共焦点顕微鏡観察



SeeDB2S、NA 1.4 の油浸レンズを使用。レーザーパワーを変えなくても、上から下までほぼ一定の輝度が得られる。スケールバーは2 μm。

コード No.	品名	規格	容量	希望納入価格(円)
294-80701	SeeDB2 Trial Kit	組織透明化用	1キット	55,000

1細胞レベルでの解像度で解析可能

Wako

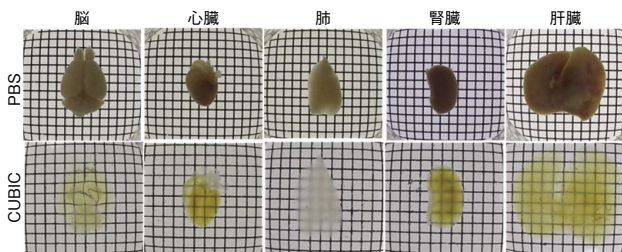
CUBIC

CUBIC で使用する組織透明化試薬 (ScaleCUBIC 試薬) は尿素にアミノアルコールを加えた水溶性透明化試薬であり、サンプルを試薬に浸すだけの簡便かつ効果的で再現性の良い手法です。CUBIC は動物の全身・臓器などを丸ごと透明化することが可能です。さらに、シート照明型蛍光顕微鏡 (LSFM) を用いることで、全身の細胞を1細胞解像度で3次元イメージとして取得することができます。

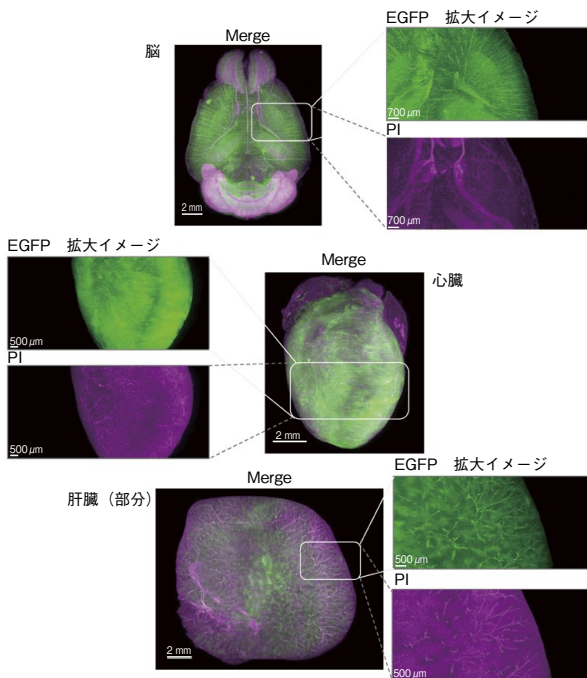
[次頁に続く]

使用例

■ CUBICを用いたマウス臓器（丸ごと）の透明化



■ LSMFを用いたCUBIC処理（PI染色）したCAG-EGFP Tgマウスの臓器（丸ごと）の観察



コード No.	品名	規格	容量	希望納入価格 (円)
290-80801	CUBIC Trial Kit	組織透明化用	1キット	45,000

再生医療分野の研究に

Wako

CultureSure® 3,3',5-トリヨード-L-チロニンナトリウム

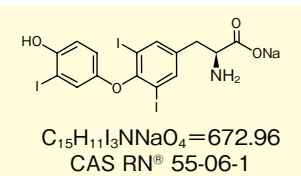
本品は、甲状腺ホルモンの一種で T3 とも呼ばれており、*in vitro* における間葉系幹細胞の脂肪細胞への分化誘導の促進や、ヒト iPS 細胞由来の心筋細胞の成熟の促進などが報告されています。

特長

- エンドトキシン試験済み
- マイコプラズマ否定試験済み
- 動物由来原料不使用の化学合成品

製品概要

- 含量 (HPLC) : 98.1% (初回ロット実績値)
- 外観 : 白色～うすい黄褐色 又はうすい赤褐色、結晶性粉末～粉末
- 溶解性 : 水酸化ナトリウム、DMSO に可溶
- マイコプラズマ : 陰性
- エンドトキシン : 0.1 EU/mg 未満 (初回ロット実績値)



コード No.	品名	規格	容量	希望納入価格 (円)
038-25541	CultureSure® 3, 3', 5-Triiodo-L-thyronine Sodium Salt	細胞培養用	50mg	15,000

CultureSure® 低分子化合物シリーズは、ES・iPS 細胞の分化誘導に使用される低分子化合物にエンドトキシン試験、マイコプラズマ試験などを行っているため、細胞培養に安心してご使用頂けます。ラインアップは、当社 HP をご覧下さい。

追加品目のお知らせ

ポジティブリスト関連標準品

当社では、ポジティブリスト制度の対象となる農薬標準品を品揃えしています。下記品目を新たに発売しました。

農薬標準品

- アセタミプリド標準品
- イブロジオン代謝産物標準品
- ベンスリド標準品
- MEP 標準品
- ベンゾフェナップ標準品
- メプロニル標準品
- ビフェントリン標準品
- MPP 標準品
- シモキサニル標準品
- ナプロパミド標準品
- シプロジニル標準品
- ピリダフェンチオン標準品
- ジメピレレート標準品
- トリフロキシストロビン標準品
- フェンプロバトリン標準品

Wako

コード No.	品名	規格	容量	希望納入価格 (円)
NEW 010-16493	Acetamidiprid Standard	残留農薬試験用	100mg	12,000
NEW 021-07673	Bensulide Standard	残留農薬試験用	100mg	11,000
NEW 021-16223	Benzofenap Standard	残留農薬試験用	100mg	26,000
NEW 021-12703	Bifenthrin Standard	残留農薬試験用	100mg	18,000
NEW 032-16793	Cymoxanil Standard	残留農薬試験用	100mg	20,000
NEW 037-17723	Cyprodinil Standard	残留農薬試験用	100mg	20,000
NEW 043-25173	Dimepiperate Standard	残留農薬試験用	100mg	20,000
NEW 068-03503	Fenpropathrin Standard	残留農薬試験用	100mg	10,000
NEW 099-02394	Iprodione Metabolite Standard	残留農薬試験用	100mg	15,000
NEW 130-05534	MEP Standard	残留農薬試験用	100mg	8,000
NEW 131-07904	Mepronil Standard	残留農薬試験用	100mg	10,000
NEW 130-06634	MPP Standard	残留農薬試験用	100mg	9,000
NEW 144-05893	Napropamide Standard	残留農薬試験用	100mg	11,000
NEW 169-10914	Pyridaphenthion Standard	残留農薬試験用	100mg	8,400
NEW 207-15783	Trifloxystrobin Standard	残留農薬試験用	100mg	22,000

Ref...2~10℃保存 F...-20℃保存 S...-80℃保存 IS...-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、2019年1月時点での情報です。最新情報は、当社HPをご参照下さい。

ヒト iPS 細胞由来分化細胞



iCell® 心筋細胞 2.0-01434

iCell® ドーパミン神経細胞 -01279

本品は、FUJIFILM Cellular Dynamics, Inc. が開発・製造したヒト iPS 細胞由来分化細胞です。創薬スクリーニングや毒性試験など医薬品の安全性評価にご使用頂けます。本品は、50 誌以上の論文で取り上げられ、有用性が実証されています。

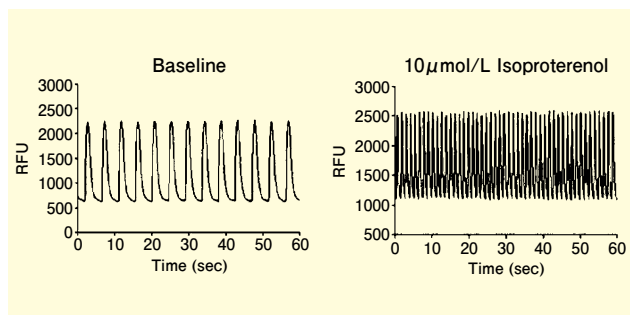
特長

- ヒト由来細胞
ヒト細胞に似た機能的特徴を示します。
- 均質で再現性がある
純度が高いため、生物学的に適切で再現性のある結果が得られます。
- 急性及び長期の試験が可能
培養液中で長期間生存し純度を保つため、急性及び長期反応の両方を評価することが可能です。
- 簡単なハンドリング
各細胞専用の培地とともに凍結保存されているため、融解するだけで使用できます。

iCell® Cardiomyocytes² 01434

本品は、凍結からのリカバリーが早く、播種後 4 日目から使用でき、薬理安全性評価、薬効評価などに最適です。また、ヒト iPS 細胞応用安全性評価コンソーシアム (CSAHi) において、多点電極アレイ (MEA) システムを用いた不整脈作用を検出するための試験細胞として採用されています。

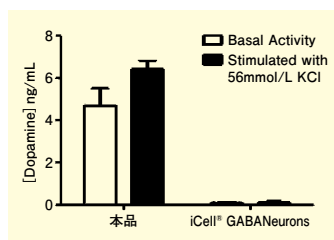
データ



β 作用薬であるイソプロテレノール (10 μmol/L) で処理した結果、カルシウム電流の増加が確認された。

iCell® DopaNeurons 01279

本品は、ヒト iPS 細胞株から分化誘導したフロアプレート由来ドーパミン神経細胞です。パーキンソン病などの神経変性疾患の研究に最適です。



56mmol/L KCl の刺激により、iCell® DopaNeurons でドーパミンの放出が検出された。

コード No.	メカ-コード	品名	容量	希望納入価格 (円)
iCell® Cardiomyocytes² 01434				
-	C1016	iCell® Cardiomyocytes ² 01434 5M Cells ^a	1Vial	258,000
-	M1001	iCell® Cardiomyocytes Plating Medium [F°]	30mL	52,000
-	M1003	iCell® Cardiomyocytes Maintenance Medium [F°]	100mL	20,000
iCell® DopaNeurons 01279^{a,b}				
-	C1028	iCell® DopaNeurons 01279 5M Cells ^a	1Vial	236,000
-	M1010	iCell® Neural Base Medium 1 [Ref°]	100mL	10,000
-	M1029	iCell® Neural Supplement B [F°]	2mL	25,000
-	M1031	iCell® Nervous System Supplement [F°]	1mL	29,000

* a: 保管輸送温度: 液体窒素 (気相)

* b: 分化誘導法を開発した Memorial Sloan Kettering Cancer Center の Lorenz Studer lab. からライセンスを供与されています。そのため、ご購入の際には、同意書に署名が必要です。

初めてお使い頂く方のために、お試し頂きやすい小包装サイズもラインアップしました。詳細は、当社 HP をご覧下さい。

〈お知らせ〉

この度、当社は、セルラー・ダイナミクス・インターナショナル・ジャパン株式会社より本品の輸入販売業務を事業譲受しました。すべての製品を単品販売へ変更しましたので、培地・サプリメントと同様に細胞を単品でご購入頂くことができます。細胞・培地・サプリメントを組合せ頂くと、従来のキット品と同じ構成内容となります。

お問い合わせ先

製品のご購入: 当社代理店、または当社営業担当者
 テクニカルサポート: 富士フイルム和光純薬株式会社
 培養試薬開発部
 TEL: 03-3270-6320 (ダイヤルイン)

[Ref°]... 2 ~ 10°C 保存 [F°]... -20°C 保存 [30°]... -80°C 保存 [150°]... -150°C 保存 表示がない場合は室温保存です。その他の略号は、巻末をご参照下さい。
 掲載内容は、2019 年 1 月時点での情報です。最新情報は、当社 HP をご参照下さい。

薬剤の毒性評価コントロール化合物

心毒性陽性化合物

Wako

本品は、心室性不整脈 (torsade de points : TdP) 誘発リスクを持つ化合物です。

新規医薬品候補化合物の中には、開発の過程でQT間隔を延長させ、致死性のTdPを誘発するものがあり、これが原因で開発を断念した化合物が数多くあります。そのため、開発初期段階からTdP誘発リスクを予測することが重要となっており、リスク因子であるhERGチャネルの抑制作用やQT間隔延長作用で検証されています。これらの化合物は近年、ヒトiPS細胞由来心筋細胞による、ヒトにおけるTdP誘発リスクを精度よく評価できるツールとして期待されています。

また、当社ではヒトiPS細胞由来心筋系細胞 iCell[®] Cardiomyocytes (FUJIFILM Cellular Dynamics, Inc 社) も取扱っています。併せてご使用下さい。

コードNo.	品名	作用	規格	容量	希望納入価格(円)
NEW 030-25501	Cisapride F	hERGチャネル (Ikr) 阻害	細胞培養用	10mg	40,000
NEW 037-25491	Chromanol 293B F III	KCNQチャネル (Iks) 阻害	細胞培養用	10mg	40,000
059-08451	E-4031 n-Hydrate F	hERGチャネル (Ikr) 阻害	細胞	10mg	30,000
055-08453			生物学用	50mg	120,000
132-17581	Mexiletine Hydrochloride Ref	Naチャネル及びhERGチャネル (Ikr) 阻害	生化学用	1g	7,800
NEW 162-28471	Pilsicainide Hydrochloride F	Naチャネル阻害	細胞培養用	10mg	25,000
222-00781	Verapamil Hydrochloride III	Caチャネル阻害	生化学用	1g	4,500
228-00783			生化学用	10g	24,200

関連商品

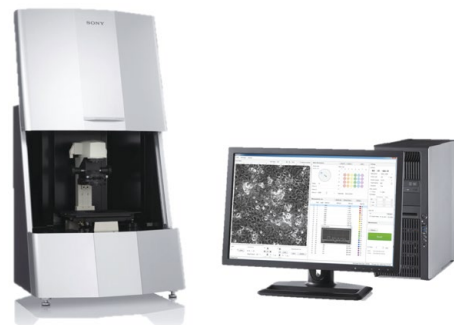
コードNo.	メーカーコード	品名	作用	メーカー	容量	希望納入価格(円)
512-45291	D525700	Dofetilide F	Kチャネル阻害	Toronto Research Chemicals	10mg	14,400
557-29321	3948/50	Terfenadine Ref	hERGチャネル (Ikr) 阻害	Tocris	50mg	14,000

Ref…2~10℃保存 F…-20℃保存 III…-80℃保存 Ref…-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、2019年1月時点での情報です。最新情報は、当社HPをご参照下さい。

次世代のライブセルイメージングシステム SONY

セルモーションイメージングシステム SI8000

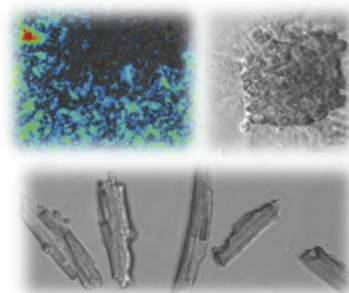
本品は、細胞の動きを非染色・非侵襲で定量評価する、独自の画像解析技術を応用した新しいコンセプトの細胞分析用ソリューションシステムです。



特長

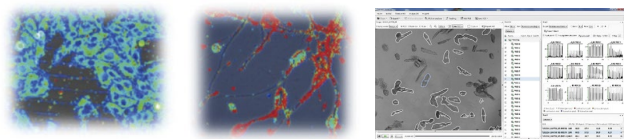
- 生理的環境下での高解像度細胞撮影
 - ノンラベルで細胞の形態、動きを定量化・可視化
 - 高速撮影による細胞の速い運動の解析 (筋細胞など)
 - 自動細胞認識による複数ROI*の一括設定と解析
 - Dynamic ROI機能による、形態トラッキング解析
- *ROI (region of interest)

心筋細胞の拍動・伝播解析



製品ページはこちら

その他さまざまなアプリケーション・機能が充実



細胞内小器官の動き 神経細胞の動き 自動認識機能なども

主要モデル	希望納入価格(円)
Basic model	6,000,000 ~
All-in-one model	14,000,000 ~

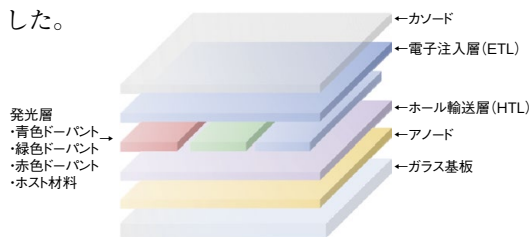
高純度発光材料

有機 EL 関連製品

Wako

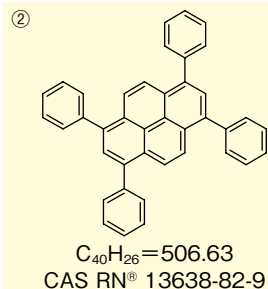
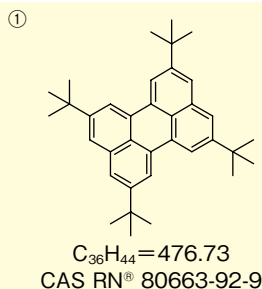
有機 EL (OLED: Organic Light-Emitting Diode) は発光層が有機化合物から構成される発光ダイオードで、電子と正孔の再結合によって生じた励起子によって発光します。これまで発光層には蛍光材料やりん光材料が使用されてきましたが、蛍光材料は電気エネルギーの最大 25%しか使用する事ができず、一方、りん光材料は希少な貴金属を含むためコスト、資源の両面から課題が残ります。最新の研究では第三の発光材料として熱活性化遅延蛍光材料 (TADF: Thermally Activated Delayed Fluorescence) が報告され、新規材料の研究が盛んに行われています。

この度、高純度な蛍光材料とホスト材料をラインアップしました。

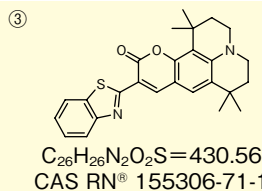


有機 EL の概略図

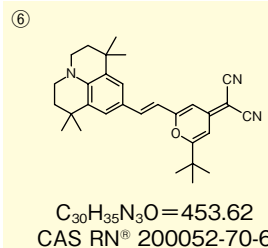
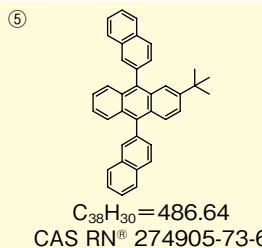
■ 蛍光青色ドープバント



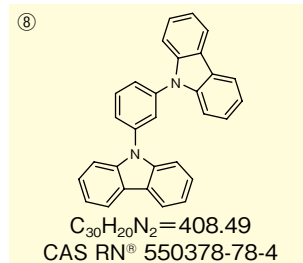
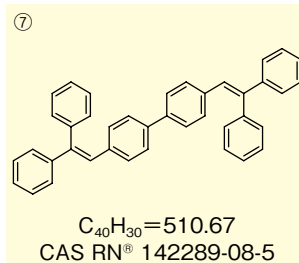
■ 蛍光緑色ドープバント



■ 蛍光赤色ドープバント



■ ホスト材料



No.	コード No.	品名	規格	容量	希望納入価格 (円)
蛍光青色ドープバント					
①	200-20881	TBPe [2,5,8,11-Tetra- <i>t</i> -butylperylene]	機能性有機材料用	250mg	照会
②	200-20901	TPPy [1,3,6,8-Tetraphenylpyrene]	機能性有機材料用	250mg	照会
蛍光緑色ドープバント					
③	037-25511	Coumarin 545T [10-(2-Benzothiazolyl)-2,3,6,7-tetrahydro-1,1,7,7-tetramethyl-1 <i>H</i> ,5 <i>H</i> ,11 <i>H</i> -[1]benzopyrano[6,7,8- <i>ij</i>]quinolizin-11-one]	機能性有機材料用	250mg	15,000
④	039-25571	Coumarin 481 [7-(Diethylamino)-4-(trifluoromethyl)coumarin]	機能性有機材料用	250mg	照会
蛍光赤色ドープバント					
⑤	203-20871	TBADN [2- <i>t</i> -Butyl-9,10-di(naphth-2-yl)anthracene]	機能性有機材料用	250mg	25,000
⑥	047-34461	DCJTb [2- <i>t</i> -Butyl-4-(dicyanomethylene)-6-[2-(1,1,7,7-tetramethyljulolidin-9-yl)vinyl]-4 <i>H</i> -pyran]	機能性有機材料用	250mg	20,000
ホスト材料					
⑦	041-34481	DPVBi [4,4'-Bis(2,2-diphenylvinyl)biphenyl]	機能性有機材料用	500mg	照会
⑧	131-18891	mCP [1,3-Bis(<i>N</i> -carbazolyl)benzene]	機能性有機材料用	1g	照会

使い切りに便利な 100mL 包装追加

Wako

核酸合成用反応補助試薬

核酸の合成手法であるホスホロアミダイト法に使用する反応補助試薬シリーズに、この度、少・中量合成機での合成に便利な 100mL 包装を追加しました。開封後の品質劣化を避けるため 1 回で使い切りたい場合に便利です。また、水分値を保証しているため、低水分が求められる核酸の合成に最適です。

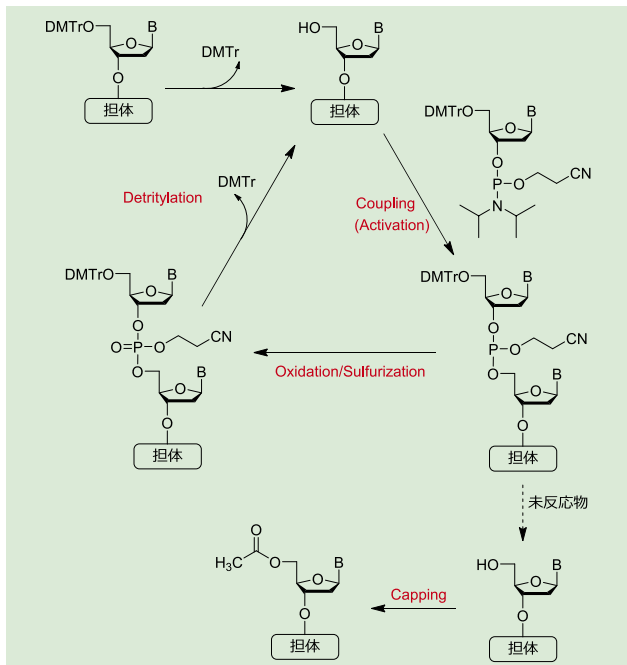
特長

- ホスホロアミダイト法で使用される反応補助試薬をフルラインアップ
- 低水分保証 (一部製品除外)
- 試薬の取り違いを防ぐため、種類別にラベルを色分け

[次頁に続く]

RF... 2 ~ 10°C 保存 F... -20°C 保存 30... -80°C 保存 150... -150°C 保存 表示がない場合は室温保存です。その他の略号は、巻末をご参照下さい。掲載内容は、2019年1月時点での情報です。最新情報は、当社HPをご参照下さい。

■ オリゴヌクレオチドの合成



デブロッキング試薬

コードNo.	品名	水分値	規格	容量	希望納入価格(円)
ジクロロメタン溶媒					
046-28924	Deblocking Solution-1 (3w/v% Trichloroacetic Acid, Dichloromethane Solution)	≤40ppm	核酸合成用	100mL	4,000
トルエン溶媒					
049-34443	Deblocking Solution [Dichloroacetic Acid-Toluene (3:97)]	≤40ppm	核酸合成用	100mL	6,000

アクチベーター試薬

コードNo.	品名	水分値	規格	容量	希望納入価格(円)
017-20014	Activator Solution-3 (0.25mol/L 5-Benzylthio-1H-tetrazole, Acetonitrile Solution)	≤30ppm	核酸合成用	100mL	7,500
014-19693	Activator Solution-4 (0.25mol/L 5-Ethylthio-1H-tetrazole, Acetonitrile Solution)	≤30ppm	核酸合成用	100mL	6,000

キャッピング試薬

コードNo.	品名	水分値	規格	容量	希望納入価格(円)
THF溶媒					
036-19013	Cap A Solution-2 [Tetrahydrofuran/Acetic Anhydride/Pyridine (8:1:1) Solution]	≤100ppm	核酸合成用	100mL	5,000
033-19023	Cap B Solution-2 (10vol% 1-Methylimidazole/Tetrahydrofuran Solution)	≤100ppm	核酸合成用	100mL	5,000

コードNo.	品名	水分値	規格	容量	希望納入価格(円)
アセトニトリル溶媒					
037-25393	Cap A Solution [1-Methylimidazole-Acetonitrile (2:8)]	≤100ppm	核酸合成用	100mL	6,000
030-25383	Cap B1 Solution [Acetic Anhydride-Acetonitrile (4:6)]	-	核酸合成用	100mL	6,000
033-25373	Cap B2 Solution [2,6-Lutidine-Acetonitrile (6:4)]	≤100ppm	核酸合成用	100mL	7,000
030-25403	Cap B Solution [Acetic Anhydride-2,6-Lutidine-Acetonitrile (2:3:5)]	-	核酸合成用	100mL	8,000

関連商品

DNA/RNA合成機*に直結可能 日本テクノサービス株式会社 NIHON TECHNO SERVICE CO.,LTD

ボトルキャップ

当社の核酸合成用補助試薬に採用している 100mL ガラス瓶・3L ガロン瓶専用のボトルキャップです。

日本テクノサービス社製の DNA/RNA 合成機と直結できる仕様になっています。試薬とセットでご使用下さい。

*日本テクノサービス社製の DNA/RNA 合成機専用です。



反応試薬用ボトルキャップセット (100mL 用) (右) を容器に装着した状態 (左) (瓶はボトルキャップセットに付属していません。)

コードNo.	メーカーコード	品名	容量	希望納入価格(円)
対応容器 100mL				
632-44521	M2P-RCFSET	F-Wako Bottle Cap Set for Reaction Reagent (アウター、インナー、O-リング、ガス・試薬ラインのセット)	1セット	32,000
638-44501	M2P-RCFIN	F-Wako Bottle Cap (Inner Side) for Reaction Reagent	1個	12,000
635-44511	M2P-RCFOUT	F-Wako Bottle Cap (Outer Side) for Reaction Reagent	1個	7,000
635-44491	M2P-RCF-OL	F-Wako Bottle Oring for Reaction Reagent	1個	3,500
対応容器 3L				
630-44561	M2P-RCGIN	Bottle Cap (Inner Side) for 3L-4L Gallon Bottle	1個	20,000
637-44571	M2P-RGFOUT	F-Wako Bottle Cap (Outer Side) for 3L Gallon Bottle	1個	7,500
633-44551	M2P-RCG-OL	Oring for 3L-4L Gallon Bottle (Long Life)	1個	9,800
636-44541	M2P-RCG-O	Oring for 3L-4L Gallon Bottle	1個	1,300
対応容器 100mL・3L				
639-44531	M2P-RPLSET	Portline Set for Reaction Reagent (試薬、ガスラインのセット)	1セット	10,000

インナー・アウターの材質は PEEK (ポリエーテルエーテルケトン樹脂) です。

☐F…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、2019年1月時点での情報です。最新情報は、当社HPをご参照下さい。

神経科学：基礎から臨床

群馬大学大学院 医学系研究科 機能形態学分野 岩崎 広英

第34回 Wako ワークショップ「神経科学：基礎から臨床」が2018年11月14日に東京・秋葉原にある秋葉原コンベンションホールにおいて開催されました。開催に先立ち、本ワークショップを企画された順天堂大学の内山安男先生が、ワークショップの主旨についてお話になりました。内山先生は、免疫やがんなどの分野において、近年、基礎医学の研究者が治療を目指した研究に積極的に関わっていることに言及され、神経科学においてもそのような基礎と臨床を結ぶ研究が必要となりつつあることを強調されました。実際、今回講演された先生方のご講演も基礎と臨床を結ぶようなお話となっていたことが印象的でした。

最初の演者である順天堂大学の谷田以誠先生は「脳・神経細胞におけるオートファジーを視る」というタイトルで講演されました。まずオートファジー・リソソーム分解系に関して概説された後、神経変性との関連に焦点を当て、オートファゴソーム形成に関わる Atg7 や Atg9 の脳神経系特異的なノックアウトマウスではアストロサイトの増加やブルキンエ細胞の脱落、ユビキチン陽性凝集体の増加が認められること、神経突起進展に異常が認められることを示されました。また、リソソーム機能と神経変性疾患との関連について、リソソームの主要タンパク質

分解酵素であるカテプシン D のノックアウトマウスや、カテプシン B と L のダブルノックアウトマウスにおいて、脳内にセロイドリポフスチン顆粒の蓄積が認められることを示されました。また、谷田先生が新たに作製された PK (pHluorin-mKate2 tandem fluorescent protein)-LC3 では、従来観察できなかった脳や腎臓でのオートファジーの可視化が可能となることを示されました。最後にオートファジーの可視化に関連して、光学顕微鏡と電子顕微鏡での同一試料の観察を可能とするような、いわゆる「光-電子相関顕微鏡法 (CLEM)」に関する新しい手法について紹介されました。谷田先生は CLEM-Red と命名された蛍光タンパク質がオスミウム酸固定で消光するものの、その後 TUK solution で処理することで蛍光が回復し、電子顕微鏡用試料作製処理を施しても蛍光が残存することを示されました。CLEM-Red および TUK solution は近日中に富士フイルム和光純薬株式会社から発売されるそうですので、発売されたらぜひ試してみたいと思います。CLEM-Red は赤色の蛍光タンパク質ですが、今後は緑色でも同様の性質を持つ蛍光タンパク質の開発が望まれます。

次に講演された東京大学の岡部繁男先生は「かたちを見て機能と病態を探る—新しいシナプス形態学を目指し

て」というタイトルで、生後早期に見られるシナプス形成・除去過程とシナプスの安定化のメカニズム、および興奮性シナプスの形成の場であるスパインの形態解析に関して講演されました。ヒトの脳は2歳頃までに急速に発達し、この間に樹状突起上のスパイン数は増大します。その後、思春期に向けて漸減し、成人期に入るとシナプス数は安定になります。こうしたシナプス数の変化は、自閉症、統合失調症、アルツハイマー病といった様々な精神神経疾患・発達障害の発症時期と密接に関連していると考えられます (Penzes *et al.*, 2011)。安定に維持されるシナプスは長期的な記憶の維持にとって重要と考えられますが、一方でシナプスは外界からの変化に応じて可塑性を示す必要があります。今回は特に、シナプス不安定化因子として最近同定された BMP4 について中心にお話されました。EGFP で標識した BMP4 を海馬神経細胞に発現させると EGFP-BMP4 は速い軸索輸送で運ばれ、神経活動を上げると輸送が止まること、軸索から放出された BMP4 はシナプス前部付近に係留されること、細胞膜上の BMP4 のクラスターがシナプスを不安定化することを示されました。また、二光子顕微鏡を用いた *in vivo* イメージングでは生きたままの動物を用いてスパインの動態を経時



オーガナイザーの内山安男先生



講演風景

的に観察することが可能ですが、生後早期のスパイン動態を3種類の自閉症モデルマウスで解析したところ、3種類すべてに共通してスパインの形成・除去が亢進していることを示されました。こうしたスパイン動態の亢進が安定な神経回路の形成を阻害し、自閉症の病態を誘起している可能性が考えられます。最後に、超解像顕微鏡を用いたマウス海馬分散系におけるスパイン形態の解析について示されました。超解像顕微鏡の一種である構造化照明法(SIM)で撮影したスパインの画像を用いて主成分分析や機械学習によりスパイン形態を分類し、スパイン形態と可塑的变化との関係について示されました。

3番目の演者である山梨大学の太塚稔久先生は、「神経シナプス・アクティブゾーン：分子構造から脳病態の理解へ」というタイトルでお話されました。アクティブゾーンはシナプス前部にある電子密度の高い部位であり、シナプス小胞の開口放出との関連が示唆されています。太塚先生はラット脳からアクティブゾーンに局在する分子としてCASTとELKSを同定されました。さらに神経終末に局在するSADキナーゼがCASTを直接リン酸化し、このリン酸化のオン・オフがシナプスの短期可塑性を制御することを示されました。また、CAST/ELKSは網膜のシナプスや脳幹のCalyx of Heldシナプスにおいてカルシウムチャネルの局在を調節し、シナプス小胞の放出を制御していることを明らかにされました。病態との関連については、ELKSが自閉症患者ゲノムにおいてレア変異として見出されていること、CASTのノックアウトマウスでは母親マウスの養育行動に異常が見られ、ネグレクトとの関連が示唆されることについて示されました。

前半の3つのご講演は分子・細胞レベルからのアプローチを主体としたお話でしたが、後半の3演題は個体・行動レベルからのアプローチに関するお



谷田 以誠 先生



岡部 繁男 先生



太塚 稔久 先生



伊佐 正 先生



服部 信孝 先生



笠井 清登 先生

話でした。まず京都大学の伊佐正先生は、「機能回復を促す脳の働き」というタイトルで、脊髄損傷により手指の精密把持運動が障害され、餌を取ることが困難となったマカクザルの機能回復について講演されました。一般に手指の巧緻運動は皮質脊髄路による制御が知られていますが、この経路に障害が生じた場合には、脳幹を介した間接経路や脊髄固有ニューロンを介した間接経路などが代償的に働くことで機能回復することを示されました。実際、脊髄を損傷したサルが餌を取る行動が、数週間ほどで回復していく様子を動画で示され、大変印象的でした。さらに脊髄損傷の手法として従来の外科手術的なアプローチよりも精密に脊髄損傷を行うことが可能な分子生物学的手法について示されました。具体的には逆行性のウイルスベクターと順行性のウイルスベクター2種類を用い、二重感染した細胞でのみ経路が遮断されるという系を開発されました。この系を用いて脊髄固有ニューロンの特異的遮断を行った結果、脊髄固有ニューロンを阻害すると手指の巧緻運動は回復

しないものの、一旦治癒してしまうと脊髄固有ニューロンを阻害しても効果が無いことが明らかとなりました。また、PETを用いた脳機能解析から、脊髄損傷後は大脳皮質運動野や運動前野が活性化されることや、動機づけなどの中枢として機能する側坐核などの辺縁系が活性化されることが明らかにされました。興味深いことに、一旦手指の把持機能が回復したと思われるサルでも、側坐核にムシモルを注入して機能低下させると再び手指の麻痺が生じ、把持運動が正確に行えなくなる様子を動画で示されました。筆者には、脊髄損傷により失われた機能が全く別の脳部位によって代償されるという現象が興味深く思われたのですが、脳梗塞・脳出血等でリハビリに励む患者さん達にとって、こうした機能回復のメカニズムの解明は切実な問題であり、その臨床的応用の早期の実現が強く望まれることと思われます。

次に順天堂大学の服部信孝先生は、「パーキンソン病の発症機序：遺伝性パーキンソン病からヒントを得て」というタイトルで講演されました。まず

Wako ワークショップ 見聞録

パーキンソン病研究の歴史について概説された後、最新の研究成果や治療法などについて紹介されました。特にパーキンソン病と酸化ストレスとの相関について言及され、これまでにパーキンソン病の原因遺伝子として同定されている遺伝子のうち、parkin や pink1 は不良ミトコンドリアの除去 (mitophagy) に関わることを示されました。これと関連して、カフェインが酸化ストレスの除去に効果的であり、パーキンソン病のリスク軽減因子であることを紹介されました。この他、臨床医学の研究室でありながら、ショウジョウバエを用いた研究も展開されており、例えば Park14 をノックアウトしたショウジョウバエではリン脂質の代謝に異常が見られることを示されました。時折ユーモアを交えてのご講演は門外漢の私にとってわかりやすく、興味深く拝聴しました。ご講演の中で引用された、「上医は国を医 (いや) し、中医は人を医し、下医は病を医す」(陳延之『小品方』) という言葉は特に印象に残りました。2007 年生まれの子供の 50% は 107 歳まで生きると推定されているそうです。このように長寿化が進めば、パーキンソ

ン病の罹患率はますます増大することが懸念されます。パーキンソン病の発症メカニズムを解明し、発症メカニズムに基づいた治療法を確立することで「国を医す」のだという、服部先生の強いご意思が感じられました。

最後にご講演された東京大学の笠井清登先生は「精神疾患のリバーストランスレーショナルリサーチ」というタイトルで、特に統合失調症の病態関連神経回路の同定に関してお話になりました。まず統合失調症についての簡単なご説明の後、統合失調症患者に見られる大脳皮質上側頭回の灰白質体積の減少や、この部位を発生源とする聴覚ミスマッチ陰性電位 (mismatch negativity, MMN) の進行性振幅減衰について示されました。さらに、MMN の発生にグルタミン酸受容体の一種である NMDA 受容体が関与していることなど、血中グルタミン酸濃度と統合失調症との関連について示されました。また統合失調症患者脳では、GABA 神経伝達系が関与すると考えられている auditory steady state gamma-band oscillatory responses (40Hz ASSR) に異常が認められることについてもお示しになりました。さらに MRI 大規

模メタ解析の結果、統合失調症の患者では左淡蒼球増大が認められたことをお示しになりました。これらの特徴はヒト以外の動物でも計測・評価可能であることから、異種間でトランスレーション可能な (=トランスレータブル) 指標を確立し、精神神経疾患の客観的な評価・診断に役立てることの有用性について強調されました。最後に精神疾患と遺伝子変異との関連として、22q11.2 欠失症候群について紹介されました。22q11.2 症候群は 22 番染色体の微細欠失により生じる遺伝性の疾患であり、幼少期にはファロー四徴症をはじめとする心疾患を合併し、思春期以降において統合失調症様の精神病症状を高率で発症することを示されました。

本ワークショップでは、各分野における第一線の先生方が、50 分間という比較的長い時間に亘ってお話くださったことで、それぞれの分野の歴史的経緯や背景についても充分理解することができ、大変勉強になりました。今回のワークショップを企画された内山先生、演者の諸先生方、ならびにワークショップを運営された富士フィルム和光純薬株式会社の皆様に厚く御礼申し上げます。

第34回 Wakoワークショップ 「神経科学：基礎から臨床」

日 時：2018年11月14日(水)
会 場：秋葉原コンベンションホール
オーガナイザー：内山 安男 順天堂大学大学院医学研究科 神経疾患病態構造学
主 催：富士フィルム和光純薬株式会社

〈講演プログラム〉

- 脳・神経細胞におけるオートファジーを視る 順天堂大学医学部 神経生物学・形態学講座 谷田 以誠
- かたちを見て機能と病態を探る—新しいシナプス形態学を目指して 東京大学大学院医学系研究科 神経細胞生物学 岡部 繁男
- 神経シナプス・アクティブゾーン：分子構造から脳病態の理解へ 山梨大学大学院総合研究部医学域 生化学講座第一教室 大塚 稔久
- 機能回復を促す脳の働き 京都大学大学院医学研究科 高次脳科学講座 神経生物学分野 伊佐 正
- パーキンソン病の発症機序：遺伝性パーキンソン病からヒントを得て 順天堂大学医学部附属順天堂医院 脳神経内科 服部 信孝
- 精神疾患のリバーストランスレーショナルリサーチ 東京大学医学部附属病院 精神神経科 笠井 清登

宮沢 賢治 (1896.8.27~1933.9.21)

京都薬科大学名誉教授 桜井 弘

『春と修羅』や『銀河鉄道の夜』など不思議なそして素晴らしい作品を著した宮沢賢治(写真1)は詩人、童話作家として広く知られています。作品群をよく読んでみると、宇宙、4次元空間、星座、星、山野、植物、動物、鉱物、分子、元素、物理化学的現象や実験器具などの言葉がいたるところに現れ、科学(化学)が底流にあることを感じます。さらに、賢治は自らをサイエンティストととらえていたことも、手紙から知ることができます。宮沢賢治の作品群から、サイエンティスト宮沢賢治を紹介しましょう。



写真1. 宮沢賢治
[1896(明治28)年-1933(昭和8)年](資料提供:林風舎)

宮沢賢治の生涯

賢治は、1896年8月27日に岩手県花巻で生まれました。生まれる約2ヵ月前に明治三陸地震(1896年6月15日、マグニチュード8.2-8.5、死者・行方不明者約22,000人)が、そして亡くなる1933年9月21日の6ヵ月前には昭和三陸地震(1933年3月3日、マグニチュード8.1、死者・行方不明者約3,000人)が起きています。賢治は、この二つの大震災の間の37年間を生きました。川口尋常小学校、続いて盛岡中学校で学び、鉱物・植物採集や山登りに熱中しました。家業の質屋・古着商の継承を勧める父との葛藤のなか盛岡高等農林学校へ進学し、島地大等編の「漢和対照 妙法蓮華経」を読み感銘を受けました。高等農林学校では、関豊太郎教授の指導を受け、得業論文「腐植質中ノ無機成分ノ植物ニ対スル価値」を著し、その後2年間研究を続けました。研究科修了後、日蓮宗(法華経)の国柱会に入会し、家出しました。法華経を広めるために詩や童話(法華文学)を書きはじめたと伝えられています。25歳のときに花巻農学校の教諭に採用されますが、その翌年に妹のトシが亡くなります。4年後に農学校を依願退職し、農民とともに生きる決意をして「羅須地人協会」を設立しますが、病に倒れ活動を

やめてしまいます。病が回復して東北砕石工場の技師となりますが、再び病に倒れ療養生活を余儀なくされました。この時期に『雨ニモマケズ』を手帳に書き残しました。1933年9月、病態が悪化し、21日に亡くなりました(写真1)。

宮沢賢治の化学知識

図1に、宮沢賢治の生涯を簡単にまとめています。賢治は幼少のころから石を集めるのが好きで「石っこ賢さん」とよばれていました。この石採集が、賢治の生涯をつらぬく原点となりました。高等農林学校では、ドイツのクラント社などから多数の鉱物や岩石標本が購入されていました。新しい標

本で鉱物を学び、詩や童話を書くための強いインスピレーションを得て、鉱物や岩石を多数の作品に取り入れました。研究科修了後、東京への家出、妹の死、そして農学校での教師生活をきっかけに『春と修羅』と『注文の多い料理店』を自費出版し、『銀河鉄道の夜』、『風の又三郎』など多数の童話や小説を怒涛のように書きました。『楢ノ木大学士の野宿』、『十力の金剛石』や『気のいい火山弾』などには、多くの鉱物や宝石類がキラキラと顔を出します。

鉱物の化学組成シールには、必ず元素記号が書かれています。たとえば、緑柱石の化学組成は $Be_2Al_2Si_6O_{18}$ と記されています。賢治は多数の標本を見て、それらの化学組成、つまり元素に関心を示したと思われます。高等農林学校の関教授の教えを受けて学んだ片山正夫著の『化学本論』(1915年)(写真2)は、賢治の座右の書のひとつでした。この本には72種類の元素を含む短周期型の「週期系の表」が掲載されています。しかし、賢治は高等農林学校へ入る前から、短歌の中に多くの元素を使っています。なぜ、中学生時代に元素名を知っていたのでしょうか?調べてみると、賢治が中学へ入学した1909年に近藤清次郎著『中等化学本論講義』が出版されていることがわかりました。ここには、80種類の元素からなる長周期型の「元素週期表」(図2)が掲載されています。賢治は、この本を用いて講義をした先生から化学

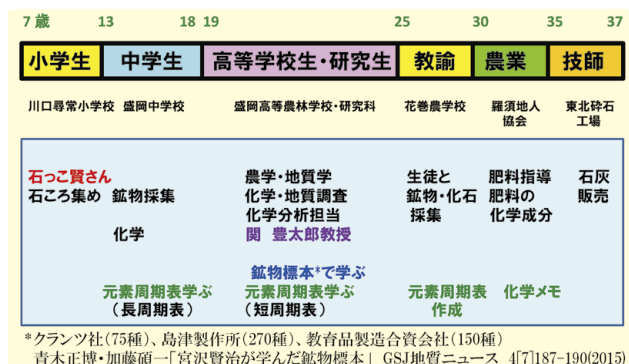


図1. 宮沢賢治の生涯

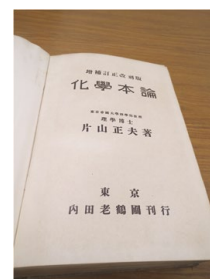


写真2. 片山正夫著『化学本論』(大阪市立科学館所蔵)

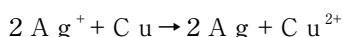
ラスの部分は溶液で満たされレンズのように透明で、まるで水族館の窓のように見えます。小説『三人兄弟の医師と北守り将軍』では、キップの装置が発砲装置としてユーモアたっぷりに使われています。

・ソックスレット 光る加里球 並んでかかるリービッヒ管

ソックスレイ抽出器やリービッヒ冷却器は今でも使われていますが、カリ球 Kalli Kugel (写真4) は、あまり見かけることはありません。ドイツのユスタス・リービッヒ (1803 - 1873) が元素分析に用い、後にアメリカ化学会のシンボルマークになりましたので、ご存知の方も多でしょう。

・ひばり ひばり 銀の微塵 (みじん) の
ちらばるそらへ たったいまのぼった
ひばりなのだ
くろくてすばやくきんいろだ そらで
やる Brownian movement

硝酸銀溶液に銅片を加えてしばらくして棒をかき混ぜると、キラキラしたダイヤモンドのようなうずがでる様子をひばりにたとえて美しい詩を読みました。これは、イオン化傾向: $H > Cu > Hg > Ag > Pt > Au$ により、



で示される反応が進み、無色の溶液が銅イオンの生成で青くなり、同時に析出する銀粒子が動き回ってブラウン運動をしている様子をうたっています。

宮沢賢治は、化学の知識のみならず物理学、とくに相対性理論や4次元世界にも関心を持ち、自らの自然観を築きました。現代の私たちに、自然を愛し、広い展望と深い思考を持つようにとメッセージを送っているようです。

サイエンティスト宮沢賢治

花巻農学校の教諭をしていたころ、賢治は1924年4月に詩集『春と修羅』を、12月に『注文の多い料理店』を出版しました。中国で詩集を読んで感動した詩人の草野心平 (1903-1988)

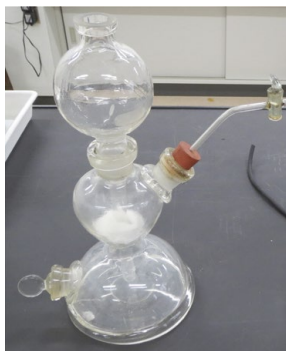


写真3. キップの装置

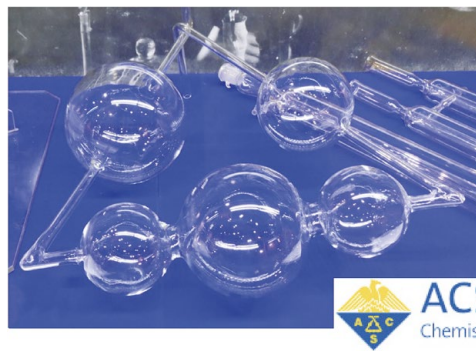


写真4. カリ球 (大阪市立科学館蔵) とアメリカ化学会 (ACS) のシンボルマーク

は、帰国した翌年1925年7月に賢治を同人誌『銅羅』に誘いました。賢治は9月に返信し、その中で

「私は詩人としては自信がありませんけれども、一個のサイエンティストとしてだけは認めていただきたいと思っています。」

と書きました。多少のためらいと自負が重なっているような自己表現です。

詩はあまり上手くはないが、せめてサイエンティストとして認めて欲しいと訴えています。さらに12月には、岩波書店の社長岩波茂雄に手紙を送り、

「わたくしは岩手県の教師をしておりますが、(中略) あとで勉強するときの仕度にと、それぞれの心もちをそのとほり科学的に記載しておきました。」

と『春と修羅』の“心象スケッチ”は科学的に描いていると科学を相当意識した表現をとっています。

このような状況を見ると、賢治は自らをサイエンティストとしてとらえていたことは間違いなさそうです。賢治は先端的な科学者 (化学者) ではありませんでしたが、常日頃、物事を科学 (化学) 的に考えて、自然の美や自らの心を誠実に描こうとしていたと想像できます。科学 (化学) と文学を融合させました。さらに、次のような『思索メモ』“科学より信仰への小さな橋梁” (1927 - 1931 ?) (図3) からも、宇宙や自然界を階層構造としてとらえ、人間は原子的な存在であることを

科学より信仰への小さな橋梁

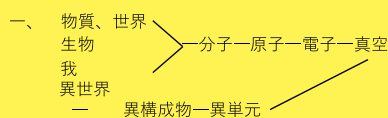


図3. 『思索メモ』“科学より信仰への小さな橋梁” (1927 - 1931 ?)

忘れてはならないと、現代の私たちに呼びかけているように思われます。

【参考文献】

- 1) 宮澤賢治:「新校本 宮澤賢治全集 全16巻 別巻1」(筑摩書房) (1995-2009).
- 2) 宮澤賢治:「校本 宮澤賢治全集 全14巻」(筑摩書房) (1973 - 1977).
- 3) 宮沢賢治:「宮沢賢治全集 全10巻、ちくま文庫」(筑摩書房) (1986-1995).
- 4) 加藤碩一:「宮澤賢治地学用語辞典」(愛智出版) (2011).
- 5) 草野心平編:「宮澤賢治研究」(筑摩書房) (1958). ; 草野心平:「宮沢賢治覚書」(講談社) (1991).
- 6) 堀尾心史:「年譜 宮沢賢治伝」(中公文庫) (1991).
- 7) 関 登久也:「新装版 宮沢賢治物語」(学習研究社) (1995).
- 8) 片山正夫:「化学本論」(内田老鶴圃) (1915).
- 9) 近藤清次郎:「中等化学本論講義」(東京高岡書店) (1909).
- 10) 板谷英紀:「宮沢賢治と化学」(裳華房) (1988). ; 板谷栄城:「宮沢賢治の宝石箱」(朝日文庫) (1991).
- 11) 斎藤文一:「科学者としての宮沢賢治」(平凡社) (2010).
- 12) 加藤碩一、青木正博:「賢治と鉱物」(工作舎) (2011).
- 13) 桜井 弘編:「元素118の新知識 ブルーバックス」(講談社) (2017).
- 14) 桜井 弘著、豊 遥秋写真:「宮沢賢治の元素図鑑」(化学同人) (2018).

組換えタンパク質大量発現システム用遺伝子導入試薬



ScreenFect™UP-293

本品は、FreeStyle293 Expression System 及び Expi293 Expression System 用のトランスフェクション試薬です。組換え抗体やタンパク質の大量発現に適しています。トランスフェクション後に添加する ScreenFect™UP-293 Booster が細胞のタンパク質発現量を大きく高めます。

特長

- 安価
- 組換えタンパク質を高発現
- トランスフェクション試薬を変えるだけ

キット内容

構成試薬	100mL 用	1L 用
ScreenFect™UP-293 Transfection Reagent	200 μL × 1 本	1mL × 2 本
ScreenFect™UP-293 Dilution Buffer	6.7mL × 1 本	67mL × 1 本
ScreenFect™UP-293 Booster	500 μL × 1 本	5mL × 1 本

本品はトランスフェクション試薬のみで構成されており、細胞及び培地は含まれません。

【別途必要な試薬】

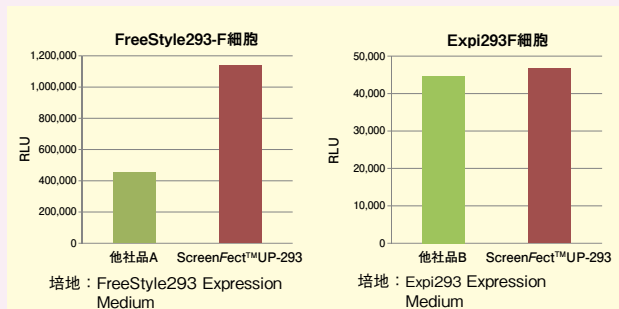
FreeStyle293 Expression System	
細胞	FreeStyle293-F Cells
培地	FreeStyle293 Expression Medium
希釈バッファー	Opti-MEM I Reduced Serum Medium

Expi293 Expression System	
細胞	Expi293F Cells
培地	Expi293 Expression Medium
希釈バッファー	不要*

* ScreenFect™UP-293 付属の Dilution Buffer で希釈します。

データ

■ ルシフェラーゼ発現量の比較



FreeStyle293-F細胞及びExpi293F細胞へ分泌型Luc発現ベクターを各種トランスフェクション試薬を用いて導入した。培養スケールは30mLで実施し、96時間後に培養上清を回収後、ルシフェラーゼアッセイによって発光強度を測定した。

FreeStyle293-F 細胞：他社品 A よりも高いルシフェラーゼ発現量を示した。

Expi293F 細胞：他社品 B と同等のルシフェラーゼ発現量を示した。

サンプル提供中

サンプル (100mL スケール培養用) をご希望の方は、下記 ScreenFect™ 専用 HP の「サンプルお申し込み」よりご依頼下さい。

<https://screenfect.jp/ja>

コード No.	品名	規格	容量	希望納入価格 (円)
294-80201	ScreenFect™UP-293 <small>Ref. 図</small>	遺伝子研究用	100mL用	7,500
290-80203			1L用	63,000

Expi293、FreeStyle、Expi293F、Opti-MEMは、Thermo Fisher Scientific 社の商標または登録商標です。

Ref. 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 毒物 劇物 毒薬 劇薬 危険物 向精神薬 特定麻薬向精神薬原料
 化審法 第一種特定化学物質 化審法 第二種特定化学物質 化武 化学兵器禁止法 第一種指定物質 化武2 化学兵器禁止法 第二種指定物質 カルタヘナ法
 覚せい剤取締法 国民保護法
 掲載内容は、2019年1月時点での情報です。上記以外の法律及び最新情報は、当社HP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. 87 No. 1
 2019年1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)
 試薬 URL <https://labchem.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 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 311 271 / Fax +49 2131 311 100