

水平型共培養容器「UniWells™」の
模式図（左）と実物の写真（右）

【総説】

「生体暗証番号」解読のための共培養研究とエクソソーム

島崎 猛夫…………… 2

〈テクニカルレポート〉

「新規組織化学染色脱色法」

小澤 秋沙…………… 8

「Wakopak® Core C18 ADRA を用いた皮膚感作性評価法“ADRA”の習熟化合物の分析例」

須藤 勇紀…………… 10

【連載】

〈ペプチド医薬合成基礎講座〉

「第3回 ペプチド合成の新展開 山本法とNCL」

佐藤 健太郎…………… 12

〈エクソソームと生命現象〉

「第7回 エクソソームとがん」

小坂 展慶…………… 14

〈基礎から応用までよくわかる組織透明化技術〉

「第3回 CUBIC を用いた組織透明化と3次元観察」

洲崎 悦生…………… 16

【化学大家】

「セント=ジェルジ・アルベルト」

仲野 徹…………… 29

【製品紹介】

有機合成

ゼオライトパック …………… 23

核酸合成用 反応補助試薬 …………… 23

環境・分析

ADRA 用カラム、試薬キット …………… 11

OA・DTX1 混合標準液 …………… 20

高純度 NMR 溶媒 …………… 20

ポジティブリスト関連農薬・動物用医薬品標準品 …… 21

ICP 分析用単元素標準液…………… 22

HM1000A 用 8 種フタル酸エステル混合試料 …… 22

L A L

リムルス ES- IIシリーズ、PYROSTAR™ ES-F シリーズ … 32

細胞生物

りん酸化 Tau T181 ELISA キットワーク、Tau ELISA キットワーク… 24

貴金属ナノコロイド「i-colloid®」シリーズ …………… 27

遺伝子

Cas9 タンパク質 /gRNA トランスフェクション試薬
「GenomONE®-GE」…………… 26

培養

水平型共培養容器「UniWells™」…………… 6

ヒト iPS 細胞由来疾患モデル細胞「iCell® DDP」………… 28

病理

組織標本脱色試薬…………… 9

CUBIC Trial Kit …………… 19

【お知らせ】

第35回 Wako ワークショップ開催のご案内 …………… 7

農薬・動物用医薬品標準品・混合標準液カタログのご案内 …… 21

神経科学研究用試薬カタログのご案内…………… 25

はじめに

近年、生物学においてエクソソームを含めた細胞外小胞が各種細胞のコミュニケーションに大きな役割を果たしていることが明らかになり、論文数は劇的に増加してきている。現在のエクソソーム研究の主流は、各種疾患に関係すると思われるエクソソームを抽出・解析する手法であり、Liquid Biopsy と表現されている手法の一つである。しかし、エクソソームは細胞間相互作用のキープレイヤーであり、真にエクソソームを介した細胞が持つ機能や疾患の特性を解析するには、エクソソームを抽出し解析するといった体力測定的な研究だけでなく、練習試合のように生体内で起きている現象を *in vitro* でも再現し、相互作用研究を行う必要がある。

というのも、これまでのエクソソームに関する機能解析を目的とした基礎研究では、大雑把に表現すれば、例えば、がん細胞から抽出したエクソソームを他の細胞に投与して、その細胞の挙動を観察・解析し、そのエクソソームが持つ機能を論じていることが多い。その上で、そのエクソソームに含まれる内包物を解析し、その内包物の機能について分子生物学的手法を駆使してさらに解析する。このような手法

のメリットは、まさに基本的な機能解析であり、機械に例えばスイッチを押すとどうなるか試してみたということである。しかし、このような研究手法は、ただスイッチを押すだけであり、実際の生体では、多量の抽出エクソソームが投与されたのと同じことが起こるのか？ 言い換えれば、それ程の強いスイッチが押されているかも不明である。また、この研究手法では生体に「暗証番号のような仕組み」(Figure 1.) があり、その強さ、順番などが大きく関係している場合には、全く役に立たない。

論文投稿を予定しているため詳細は割愛するが、我々は生体には「生体暗証番号のような仕組み」が存在していることを確認している。エクソソームを抽出し、他の細胞に投与する研究は単独のスイッチ機能の解析には有用であり、これからも基本的な解析手法であることに変わりはない。しかし、「生体暗証番号」を解析するには、抽出手技を伴わず、細胞同士の自然な相互作用観察を可能とする共培養研究が有用である。これまでに共培養を利用した研究は多く行われているが、現時点で共培養技術を利用したエクソソーム研究は比較的少ない。エクソソームの本態である相互作用を解析するためには、共培養技術の活用は重要であり、エクソソームについての詳細な解説は多くの総説をご一読いただくとして、本稿では、生体における暗証番号を解読するためのエクソソーム研究手法における注意点と解読ツールとしての共培養システムについて解説する。

エクソソーム研究の注意点について

これまでに、エクソソーム研究では、血液などの生体由来の検体や細胞培養上清に含まれるエクソソームを抽出して解析する研究が主流を占めており、Liquid Biopsy として数多くの報告がある¹⁻⁵⁾。これらは、エクソソ-

ム内に含まれる機能性物質の解析により、疾患マーカーとして、治療ターゲットとして、治療応用としての研究が盛んになっている。特に miRNA がエクソソームに含まれ細胞間を移動する可能性が示されて以来^{6,7)}、エクソソーム内 miRNA の解析研究が盛んになっており、疾患をスクリーニングできるとする報告が相次いでいる。エクソソーム研究は、主に3つのアプローチで行われていることが多い。①エクソソームを取り出し、内包物を解析する研究、②取り出したエクソソームを他の細胞などに投与して反応を確かめる研究、③エクソソームをラベルして細胞内での動態解析及び①~③の組み合わせの研究である。これらの手法をもっと単純に分類すると、エクソソームを抽出するか否かで大分類が可能である。

ここで重要な点は、エクソソームを抽出・精製し、別の細胞に添加し、細胞への取り込みや細胞の変化を解析する実験において、1) 抽出する際の手法によるエクソソーム集団の特徴に注意が必要であり、2) 抽出した多量のエクソソームによる現象が生体内での現象をシミュレーションしているかどうかは明らかでない、ということである。

1) 抽出手法による影響について

エクソソームを抽出した解析を行う場合は、回収されたエクソソームは抽出方法により性質の偏った集団になる場合がある。というのも、各種抽出手法は、その回収効率について議論されることが多いが、そもそも回収したエクソソームの性質も抽出方法に影響を受けたものしか集められていないという点に注意が必要である。

エクソソームの抽出法には、超遠心を利用したサイズ分画、あるいは、フィルターや微細孔をもつ構造物による分画、ゲルろ過を用いた抽出速度の違い、表面に発現している蛋白質やテトラスパニンを利用した抗体や親和性

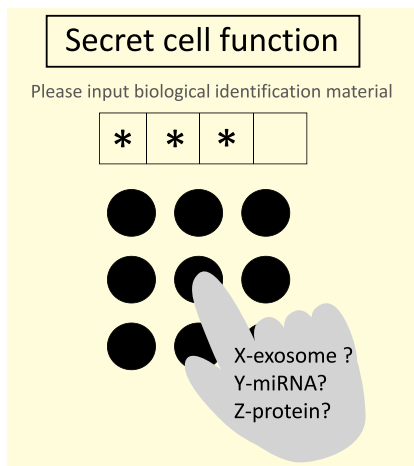


Fig 1. 生体暗証番号の概念図

物質による分離など、エクソソームの抽出方法は乱立している。

抽出方法が乱立している理由は、エクソソームの何たるかがわかっていないことである。エクソソームを含めた細胞外小胞は、初期の報告では、血小板や赤血球から分泌され、細胞のゴミとして理解されていた^{8,9)}。1983年にJohonstone博士が羊の網状赤血球から分泌された小胞に対してエクソソームと命名した¹⁰⁾。多くの細胞がエクソソームを分泌し、血液などの体液にも存在する。エクソソームは、多くの機能が未知で、蛋白質や核酸などを内包している。脂質二重膜を持ち細胞膜を4回貫通する構造を持つ膜蛋白質ファミリーであるテトラスパニン、膜輸送蛋白質、インテグリンなどの接着分子を持つ。エクソソーム以外に、細胞が分泌する細胞外小胞には、エクソソームよりやや大型サイズで形質膜由来のマイクロベシクルや、細胞がアポトーシスを起こす際に放出されるアポトーシス小体なども含まれる¹¹⁾。用語の定義が研究者間で統一されていないため、混乱していた時期もあるが、近年は、国際細胞外小胞学会を中心にエクソソームの概念が統一されつつある。細胞外小胞は、現在主に3つのグループに分けられている。(1) 直径50nm-150nmのサイズの脂質二重膜を含むエクソソーム、(2) 100nm-1000nmの細胞から直接分泌された小胞のマイクロベシクル、(3) アポトーシスを起こした細胞から生じるアポトーシス小体である¹¹⁾。特にプレイクスルーな出来事として、2006年から2007年にかけてmiRNAやRNAがエクソソームに含まれており、エクソソームを介して細胞間を移動する可能性が示されたことである^{6,7)}。以後世界中の研究者が細胞外小胞に注目し、様々な分野におけるエクソソーム研究が飛躍的に発展した。しかし、依然としてエクソソームは、脂質二重膜を持つ何かであり、表面にCD9や

CD63などのテトラスパニンが検出される小胞であること以外の絶対的な指標は存在せず、それゆえ、これまでは超遠心を用いてある一定のサイズ分画に検出される小胞であるか、あるいは、各種市販抽出キットで処理を行った小胞で、そのサイズを確認して、テトラスパニンが検出されることをもって「エクソソームを抽出した」としている研究が多い。

我々の解析では、表面のテトラスパニン量は一定ではなく、細胞種や細胞の状態によって発現の有無、発現量は大きく異なっており、さらには薬剤によってその発現量も変化する。そのため、CD9やCD81などのテトラスパニンに対する抗体反応を利用して定量するキットの場合は、そのようなことを念頭に置いた解析をお勧めしたい。つまり「見たいものしか見ていない」可能性に注意を払う必要がある。我々は、出来るだけ表面マーカーが特定の集団のエクソソームにならないように、超遠心法あるいは脂質への接着を利用した簡便なキット(MagCaptureTMエクソソームアイソレーションキットPS)を用いて解析を行っている。

2) エクソソームの投与実験における 注意点

抽出したエクソソームを標識して他の細胞や動物に投与して解析する手法も用いられている。蛍光プローブを用いて標識し、エクソソームのイメージングによる解析^{12,13)}や、酸化鉄ナノ微粒子をプローブとしたエクソソームの標識方法^{14,15)}も用いられている。しかし、精製されたエクソソームが大量に投与されたことによる結果は、本来の生理的な機能とは異なる結果を導き出している可能性に注意が必要である。量が多いと逆の反応を示す経路も存在するため、濃度的な確認も重要な要素である。しかし、これまでに多く行われている投与実験である「スイッチを押したらどうなるか？」的な解析研究は、一つの確立したエクソ

ソーム研究方法であることは間違いのない¹⁶⁻²¹⁾。

「生体暗証番号」 解読のための共培養研究

これまでに注意点として述べたエクソソーム研究の課題をクリアする研究手法が存在する。それは、抽出を行わず、細胞が分泌したものをそのまま間接的に相互作用させる系である細胞共培養である。細胞共培養は、それぞれの細胞の自然な相互作用を観察することができる。また、細胞同士の自然な相互作用は、あたかも細胞同士で「生体暗証番号」を押しあっている研究であり、単なるスイッチを押しただけのような現象とは異なる現象が観察されることも多い。つまり、「生体暗証番号」を解読するためには、まずは細胞同士の相互作用研究である共培養研究をお勧めしたい。

共培養研究は細胞間コミュニケーション研究として1980年代に広まり、以後各領域研究において使用されてきた。共培養システムを研究に用いる主な動機は、細胞や微生物間の相互作用を研究することや²²⁾、そのような相互作用を利用した新たな細胞工学の手法を開発するためである^{23,24)}。エクソソームに関する共培養研究において、エクソソームの表面マーカーであるCD63やCD81、CD9などを蛍光標識し、細胞内動態や細胞への取り込みを研究する方法がある。これらの研究の利点は、エクソソームを介した自然な作用を観察することができる点にある。しかし、CD63などの表面マーカーの発現は、細胞の種類や状態によっても異なり、一部の表面マーカーは発現していない細胞も存在する。また、蛍光標識を使った研究についても、標識分子の識別精度といった光学特性上の課題も残っている。しかしこれらの手法は、生体内で行われている細胞間相互作用を研究するための重要な研究手法である。共培養システムを

利用したエクソソーム研究は増えてきており、例示すると、エクソソーム表面に局在する蛋白質である CD63 と GFP との融合蛋白質を利用して、エクソソームの挙動の可視化を試みた報告¹¹⁾、Mesenchymal stroma stem cells (MSC) 由来のエクソソームが乳がん細胞に取り込まれ、MSC 由来の細胞能力を獲得した報告²⁵⁾、MSC 由来の CD90 が共培養で発現したことを明らかにした報告²⁵⁾、蛍光標識を用いた実験として、エクソソームの交換・移行を確認した報告²⁵⁻²⁷⁾がある。これまでも、細胞を混ぜない培養研究として、上下タイプの共培養容器を使用した実験は、一つの重要なモデルである。糖尿病モデルラット心筋細胞とマウス心筋内膜細胞との共培養で血管増生が抑制され、エクソソーム及びエクソソーム中の miR-320 が関与していることを証明した報告²⁷⁾や、Virus 由来の miRNAs がエクソソームを介して、他の細胞に伝達されることを証明した報告もある²⁸⁾。また、Transwell[®] co-culture plate の膜の上下で細胞を培養し、直接細胞が接触しない条件で、エクソソームを介して細胞の性質が変化することも報告されている^{29, 30)}。In vitro BBB モデルでは、Transwell[®] co-culture plate を使用した報告がある¹³⁾。脳血管内皮細胞、ペリサイト、アストロサイトの 3 種類の細胞を共培養したモデルであり、血液脳関門 (BBB) を模擬している。これらは、co-culture plate を上手に利用している。

共培養研究の方法について

既存の共培養システムは、一般的に細胞同士の接着の状態により、接触型の直接共培養と非接触型の間接共培養の 2 つのグループに分けられる。細胞を混ぜる方法は、直接共培養であり、細胞同士は直接接触している。直接共培養は一般的によく行われるが、一つ一つの細胞を解析するのが困難であ

り、細胞集団として解析することができるのみである。また接触による直接の作用だけでなく、実際には、液性因子による影響も混ざっている点に注意が必要である。そのため、手軽ではあるが、結果の解釈が難しくなる。一方、間接共培養は、細胞を別々の環境におき、細胞間相互作用は、液性因子を介して行われる。培養容器やフィルター、ゲルなどを用いて細胞が直接物理的に接触しない状態に置いてから細胞同士の作用を観察するため、間接的な液性因子による作用を明らかにすることができる。間接共培養の技術は、主に 3 つの方法に分けられる³¹⁾ (Figure 2)。①フィルターで分離するタイプ、②ゲルなどの半固形物を利用して細胞同士を分離し、ゲルを介して因子を交換するシステムタイプ、③完全な分離はできないが、段差や水滴などを利用して細胞をコロニー状に培養し、分離物を用いない方法である。

これら以外に培養液を交換する方法³²⁾もバクテリアなどの研究では用いられている。フィルターを使い上下方向に容器が接続するタイプの共培養容器は、Boyden chamber³³⁻³⁵⁾あるいは、Boyden chamber を改変した Transwell[®] co-culture plate が標準的に使用されてきた。Boyden chamber は、1962 年に Stephan Boyden により開発され、上下で培養容器を接続し、上側の培養容器の底面をフィルターにすることにより、フィルターを介して共培養する方式である。Transwell[®] co-culture plate 以外に、一般名として Cell culture insert と呼称されることも多い。初期は、invasion などの評価に用いられたが、これまで多くの間接共培養の方法として標準的に用いられるようになった。しかし、上側にある培養容器の細胞は、顕微鏡の焦点距離の問題により、精細な画像を得ることが難しく、また上側の細胞培養容器の底面の素材

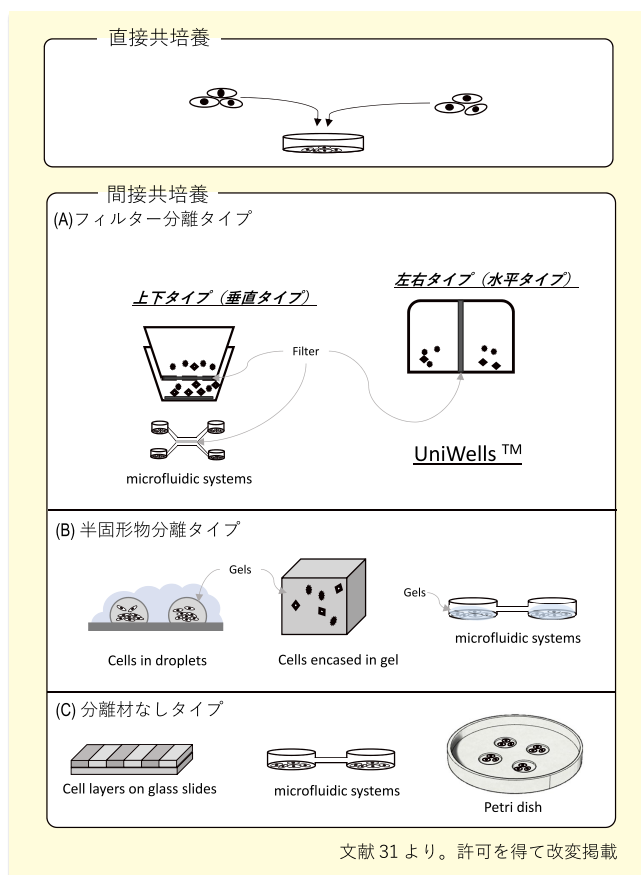


Fig 2. 共培養方法の概略

が、下側の細胞培養容器の素材と異なるといった不利な点がある。細胞の挙動は、底面の素材により影響を受けることも多く、底面の素材が異なる影響は大きい。また、フィルターを一体化して容器を作る必要があるために、フィルターの種類は少なくなってしまう。

また、共培養に関する効率の点でも、上下タイプの共培養容器は、その構造上の特性からどうしても、バケツの中にバケツを入れたような構造となってしまう。そのため、容器の容積比が1：3といったように大きく異なり、細胞が分泌した液性因子の希釈が起こってしまう。また、上側の容器の細胞はフィルターの上に位置するため、細胞密度が高くなるとフィルターの穴を塞ぐことになり、共培養効果が時間とともに低下してしまう。

意外なことに、横方向に接続するタイプのフィルター分離タイプの容器は存在しなかった。最近、バクテリア研究のための横方向の容器の報告があるが³²⁾、観察を目的としていない。我々は、横方向接続型の新しい細胞培養容器で、顕微鏡で観察が可能な水平型共培養容器を開発した (UniWells™: 富士フイルム和光純薬株式会社より販売)。

我々が開発した共培養容器³¹⁾であるため、本稿にてご紹介すると、容器と容器の間に市販の任意のフィルターを入れることができる培養容器であり、それぞれの容器は単体でも培養でき、任意の時点で2つの容器を結合することができる。別々の環境で培養してから共培養に持ち込み、培養液の量をコントロールすることで容易に共培養状態をコントロールすることもできる (Figure 3)。この水平型共培養容器の最大のメリットは、細胞とフィルターの位置関係が離れていることから、前述のデメリットであった細胞高密度による液性因子の移動性低下も認めず、また容器の容積比も1：1であることから、共培養効果は最大の効率

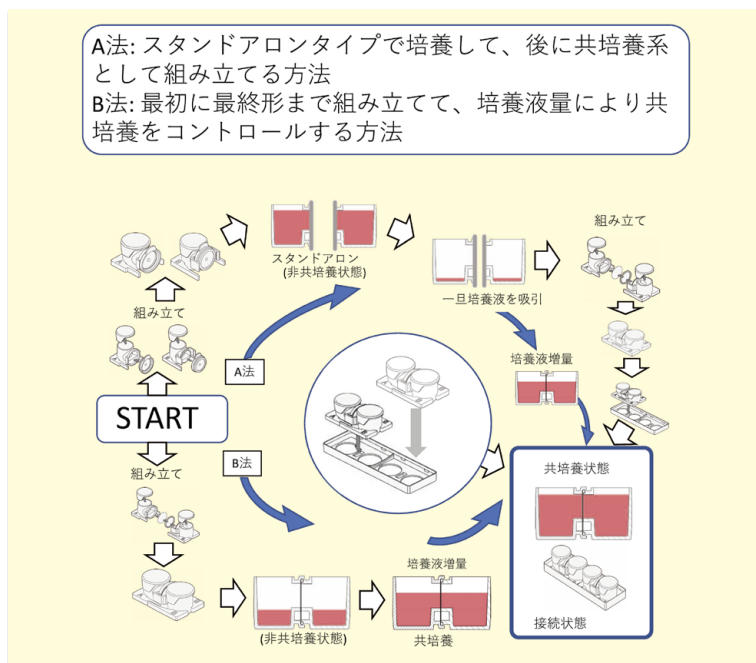


Fig 3. 共培養容器の使い方

となり、かつ両者の細胞を下面から同時観察が可能なことである。使い方には、2つの方法があり、1つは、単体で培養した後、2つの容器を接続 (結合) して共培養する方法である。もう1つは、最初から2つの容器を接続して組み立てておき、接続面までの高さを利用して、共培養状態をコントロールする手法である。組み立ては容易であり、研究者は任意の2つの方法を選択して使用することができる。ゲルなどを利用して3D培養を行えば、3D培養での共培養も可能である。セルカルチャーインサートタイプの容器は、上下方向で培養容器を繋いでいるため、顕微鏡で両方の細胞を同時には観察できないが、我々の開発した共培養容器は、水平方向に接続させているため、両方の細胞を同時に観察することができる。いずれのシステムを用いるにせよ、Co-culture systems は、細胞間相互作用を観察する研究や、細胞の相互作用を利用する細胞工学技術にとって有効である。共培養システムは、細胞工学にとって様々な手法を提供可能にし、薬剤探索にも大変有効と

考えられる²⁴⁾。

エクソソーム研究の今後について

様々な研究が展開されているが、免疫疾患、神経疾患、再生医療分野だけでなく、現在は原因やメカニズムが未知の疾患についてもエクソソームの関与が明らかになってきている。エクソソームと疾患に関する研究は、エクソソームの抽出方法が標準化していないという注意点はあるものの、疾患とエクソソーム内包物の関係が明らかになってくると思われる。しかし、エクソソームに関する生理学的機能、分泌・取り込みの基礎的なメカニズムに関する知見がまだまだ不足しており、特に生体内に於いても暗証番号のような相互作用システムが存在する可能性を考えると、革新的な研究を成し遂げるためには、共培養システムを用いたエクソソーム研究が重要であると考えている。共培養システムを利用した先駆的な研究が多く行われることにより、今後エクソソームを介した「生体暗証番号」が解明されることを期待する。

【参考文献】

- 1) Taylor, D. D. and Gercel-Taylor, C. : *Gynecol. Oncol.*, **110**, 13 (2008).
- 2) Murakami, Y. et al. : *PLoS One*, **7**, e48366 (2012).
- 3) Moon, P. G. et al. : *Proteomics*, **11**, 2459 (2011).
- 4) Hoshino, A. et al. : *Nature*, **527**, 329 (2015).
- 5) Kosaka, N. et al. : *J. Clin. Invest.*, **126**, 1163 (2016).
- 6) Valadi, H. et al. : *Nat. Cell Biol.*, **9**, 654 (2007).
- 7) Ratajczak, J. et al. : *Leukemia*, **20**, 847 (2006).
- 8) Chargaff, E. and West, R. : *J. Biol. Chem.*, **166**, 189 (1946).
- 9) Wolf, P. : *Br. J. Haematol.*, **13**, 269 (1967).
- 10) Johnstone, R. M. et al. : *J. Biol. Chem.*, **262**, 9412 (1987).
- 11) Yanez-Mo, M. : *J. Extracell. Vesicles*, **4**, 27066 (2015).
- 12) Smyth, T. et al. : *J. Control. Release*, **199**, 145 (2015).
- 13) Wiklander, O. P. et al. : *J. Extracell. Vesicles*, **4**, 26316 (2015).
- 14) Busato, A. et al. : *Int. J. Nanomedicine*, **11**, 2481 (2016).
- 15) Hu, L. et al. : *Magn. Reson. Med.*, **74** (1), 266 (2014).
- 16) Chen, Y. et al. : *Oncogene*, **36**, 4692 (2017).
- 17) Yuyama, K. et al. : *J. Neurochem.*, **105**, 217 (2008).
- 18) Rappa, G. et al. : *Mol. Cancer*, **12**, 62 (2013).
- 19) Chowdhury, R. et al. : *Oncotarget*, **6**, 715 (2015).
- 20) Saeed-Zidane, M. et al. : *PLoS One*, **12**, e0187569 (2017).
- 21) Ekstrom, K. et al. : *J. Extracell. Vesicles*, **1** (2012). doi: 10.3402/jev.v1i0.18389
- 22) Cottet, S. et al. : *J. Biol. Chem.*, **277**, 33978 (2002).
- 23) Tanouchi, Y. et al. : *Curr. Opin. Biotechnol.*, **23**, 791 (2012).
- 24) Moraes, C. et al. : *Ann. Biomed. Eng.*, **40**, 1211 (2012).
- 25) Yang, Y. et al. : *Int. J. Oncol.*, **47**, 244 (2015).
- 26) Hergenreider, E. et al. : *Nat. Cell Biol.*, **14**, 249 (2012).
- 27) Wang, X. et al. : *J. Mol. Cell. Cardiol.*, **74**, 139 (2014).
- 28) Shin, Y. et al. : *Nat. Protoc.*, **7**, 1247 (2012).
- 29) Su, M. J. et al. : *Sci. Rep.*, **6**, 30110 (2016).
- 30) Li, Y. et al. : *Stem Cell Res. Ther.*, **8**, 198 (2017).
- 31) Shimasaki, T. et al. : *Biol. Pharm. Bull.*, **41**, 1311 (2018).
- 32) Moutinho, T. J., Jr. et al. : *PLoS One*, **12**, e0182163 (2017).
- 33) Boyden, S. : *J. Exp. Med.*, **115**, 453 (1962).
- 34) Thomsen, R. and Lade Nielsen, A. : *Glia*, **59**, 1782 (2011).
- 35) Albin, A. et al. : *Cancer Res.*, **47**, 3239 (1987).

共培養が変わる

水平型共培養容器 UniWells™



本品は、細胞間相互作用研究用の新しい培養容器です。従来は、一般的に上下タイプの共培養容器が用いられていました。上下タイプの共培養容器の問題として、両細胞を同時に顕微鏡などで観察できない、培養容器底面の素材が異なるため細胞の挙動が変わる可能性がある、細胞でフィルターが詰まる点が挙げられます。本品は、これらの欠点を解消する「横に接続する方式の細胞培養容器」です。

特長

- 2細胞の顕微鏡観察が容易
- 同時観察が可能
- 2細胞を同一条件で培養可能
- ウェル間のフィルターが目詰まりしにくい
- それぞれの細胞を独立して培養可能
- 滅菌済み



UniWells™ Horizontal Co-Culture Plate 1個

コード No.	メーカーコード	品名	用途	容量	希望納入価格(円)
384-14421	2501-02FW	UniWells™ Horizontal Co-Culture Plate	培養容器本体 (材質: ポリスチレン)	10セット (計20個)	58,000
388-14441	2525-06FW	UniWells™ Filter 0.6μm	専用フィルター (孔径0.03μm)	50枚	23,000
381-14431	2525-003FW	UniWells™ Filter 0.03μm	専用フィルター (孔径0.6μm)	50枚	35,000
385-14451	2596-01FW	UniWells™ Adapter 96	96ウェルプレートサイズのホルダー UniWells™本体を8個セット可能	1個	30,000

関連商品

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

Wako

Ref…2~10℃保存 F…-20℃保存 Q…-80℃保存 H…-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10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35回 Wako ワークショップ

「ミクログリア研究の最前線 —基礎から臨床へ—」

日 時：2019年11月12日（火）10：00～17：00（終了時間は変更になる場合があります。）

場 所：秋葉原コンベンションホール

〒101-0021 東京都千代田区外神田1丁目18-13 秋葉原ダイビル2F

オーガナイザー：津田 誠 九州大学 大学院薬学研究院 ライフイノベーション分野

主 催：富士フイルム和光純薬株式会社

定 員：250名（申し込みは先着順で、定員になり次第、締め切らせていただきます。）

参 加 費：無料（事前登録制）

申 込 方 法：下記ホームページ「応募フォーム」よりお申し込み下さい。

ホームページ：<https://labchem-wako.fujifilm.com/jp/seminar/019824.html>

Wako セミナー

お 問 合 せ 先：Wako ワークショップ係

TEL：06-6203-1788 e-mail：ffwk-seminar@fujifilm.com



〈講演プログラム〉

■ミクログリアの発生・起源と脳疾患細胞治療への応用

京都薬科大学 統合薬科学系 高田 和幸

■ミクログリアによるシナプス貪食の可視化とそのメカニズムの解明

東京大学 大学院薬学系研究科 薬品作用学教室 小山 隆太

■脳梗塞におけるミクログリアの機能解析

東京都医学総合研究所 脳卒中ルネサンスプロジェクト 七田 崇

■ミクログリアサブセットと慢性疼痛

九州大学 大学院薬学研究院 ライフイノベーション分野 津田 誠

■ヒト血液を用いた精神疾患ミクログリア仮説解明のための橋渡し研究

九州大学 大学院医学研究院 精神病態医学分野 加藤 隆弘

■ミクログリアーアストロサイト連関と脳機能

山梨大学 大学院総合研究部医学域 基礎医学系 薬理学講座 小泉 修一

本法は組織化学染色として臨床検査及び研究で最も汎用されているヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色またはマッソン・トリクローム (MT) 染色で染色された組織切片を脱色し、他の染色への再利用を可能にする方法である。

これまで1つの組織化学染色につき最低組織切片1枚を用いることが一般的であり、そのため組織化学染色の方法の数だけの組織切片を用意することが必要である。しかし、組織切片作製には手技の熟練及び組織サンプルの状態・大きさ等多数の要因によって評価に適した複数の組織切片を揃えることが困難な場合がある。また、同一細胞の評価をする場合は隣接した切片を用いる方法が一般的だが、たとえ隣接の組織切片が適切に得られたとしても、観察したい同一の組織構造や同一の細胞内構造が2つの隣接した組織切片にまたがって存在していないこともある。そのような場合には、すでに観察したい特徴を持った細胞や構造があることがわかっている組織切片の再利用は大変有用である。HE染色は組織の大まかな特徴を捉えるために最初に行われる代表的な染色法の1つであり、HE染色で認められた目的の構造をもつ組織切片が再染色可能になることは、臨床検査や研究の結果の精度を向上させることにつながる。

これまで、組織切片の脱色にはアルコールと塩酸の混合溶液、シュウ酸、過マンガン酸カリウム含有溶液等が用いられてきた。しかし、これらの脱色方法では脱色後の再染色性に問題が生じることがあった。実際にアルコールに塩酸を加えた溶液ではヘマトキシリン等の色素は脱色が不十分であるし、また、過マンガン酸カリウム、シュウ酸による脱色では組織切片へのダメージが大きく、再染色の際に切片の剥離等により組織構造が崩れてしまうことがあり、再染色方法が限定され、組織切片の再利用に制限がある。そのた

め、組織切片にほとんどダメージを与えずに多くの染色法による再染色を可能にする脱色方法が開発されることが望まれてきた。

今回、我々が開発した deColorizing Solution は、HE 染色を施しその組織の状態 (特定の構造や細胞の存在) を確認した後に、異なる染色への再利用を行うことで、同一組織切片からより多くの情報を得ることを可能にする方法である。本方法の特徴はこれまで脱色が困難であったヘマトキシリン、鉄ヘマトキシリンを脱色することができることである。

使用方法はまず染色・封入されたスライドガラス標本からカバーガラスが自然に剥がれ落ちるまでキシレン等

の有機溶媒に浸漬する。この際に無理にカバーガラスを外そうとすると組織切片が崩れてしまうことがあるので注意する必要がある。また、封入剤が組織切片上に残留した状態で次の手順に進むことで、水溶性色素が水和後に落ちていない状態になり、その後の deColorizing Solution による脱色効果が弱くなるので、キシレン等の有機溶媒に十分に浸漬することがポイントとなる。古い標本ほど、封入剤の固化が進んでいるので、封入剤がとれづらいに注意する。次に、組織切片を各濃度のエタノールで順次水和し、最後は蒸留水に浸漬する。この水和のときにエオジン等の水溶性色素のほとんどが脱色され、ヘマトキシリンの染色が

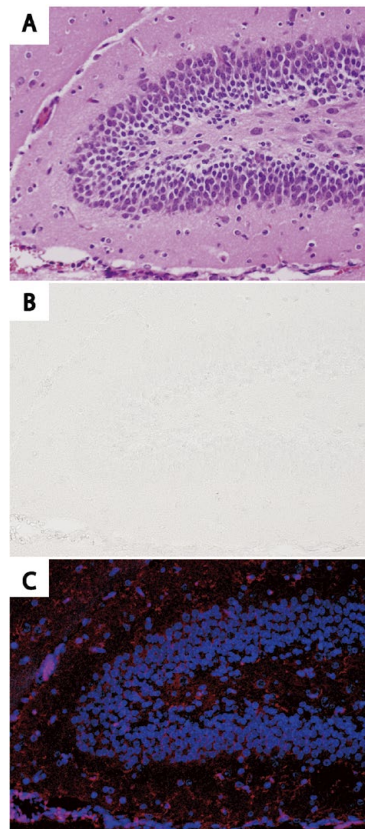


図1. deColorizing Solution 1 を用いた HE 染色後組織切片の脱色と再染色
A: HE 染色したマウス海馬の組織像
B: deColorizing Solution 1 を用いて脱色した後の A と同一箇所組織像
C: 脱色後に抗 IBA1 抗体を用いて蛍光免疫組織化学染色した A 及び B と同一箇所組織像

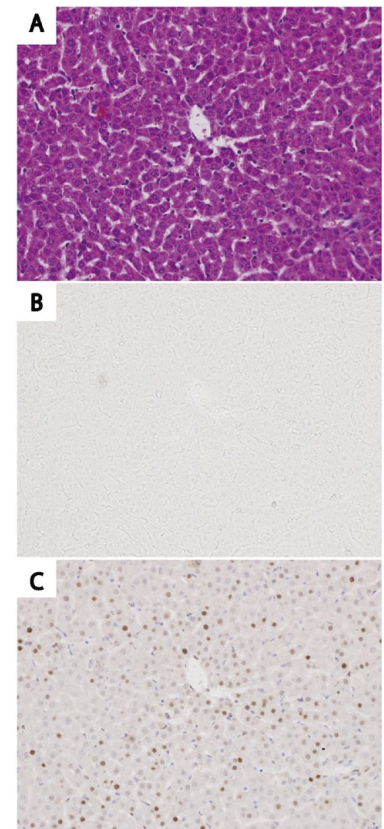


図2. deColorizing Solution 1 を用いた HE 染色後組織切片の脱色と再染色
A: HE 染色したマウス肝臓の組織像
B: deColorizing Solution 1 を用いて脱色した後の A と同一箇所組織像
C: 脱色後に抗 PCNA 抗体を用いて免疫組織化学染色した A 及び B と同一箇所組織像

組織切片上に残っている状態になる。このヘマトキシリンによる染色が残っている組織切片を使用濃度に希釈した deColorizing Solution 1 に浸漬する。脱色する組織切片の染色されてからの経過期間によるが、室温で1時間の deColorizing Solution 1 への浸漬によって、ほとんどのヘマトキシリンが脱色される。鉄ヘマトキシリンを脱色する場合には deColorizing Solution 1 への1時間の浸漬後、蒸留水で3回洗い、次に deColorizing Solution 2 へ浸漬する。脱色の程度（残留した染色）が次の染色への影響がないかを光学顕微鏡で確認し、蒸留水に浸漬して3回洗い、この時点で次の染色へと用いる事ができる。

これまでに、deColorizing Solution を用いた脱色後の再染色として、HE 染色、PAS 染色、MT 染色、免疫組織化学染色が可能であることを確認している。

図1と図2はそれぞれマウスの海馬または肝臓の HE 染色後に上述の手順で deColorizing Solution を用いて脱色した図である。図1A及び図2Aで見られるように核を含むヘマトキシリンで染色されていた部分のほとんどの染色が、図1B及び図2Bでは脱色されていることがわかる。また、図3はマウスの肝臓または腎臓を MT 染色したあとに deColorizing Solution 1 及び2を用いて脱色した図である。図3A及びCでは鉄ヘマトキシリン

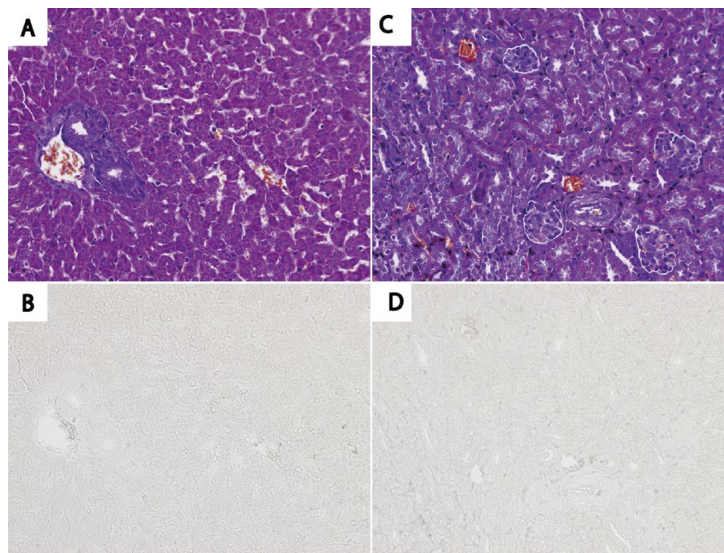


図3. deColorizing Solution 1 及び2を用いた MT 染色後組織切片の脱色
 A: MT 染色したマウス肝臓の組織像
 B: deColorizing Solution 1 及び2を用いて脱色した後の A と同一箇所組織像
 C: MT 染色したマウス腎臓の組織像
 D: deColorizing Solution 1 及び2を用いて脱色した後の C と同一箇所組織像

で染色されていた核を含む殆どの色素が図3B及びDではきれいに脱色されている。

図1Cはマウスの海馬を脱色した後抗 IBA 1 抗体（富士フイルム和光純薬株式会社）で免疫組織化学染色した図である。図1A及びBと同一の箇所の図である。脱色後の海馬切片でも IBA 1 陽性のマイクログリアの突起が検出されていることがわかる。同様に図2Cはマウスの肝臓を脱色後に抗 PCNA 抗体で免疫組織化学染色した図である。PCNA 陽性が主に肝細胞の核で認められる。

また、脱色による組織切片の崩れ等

のダメージは認められていない。

本方法を用いる利点として、これまで長期にわたり大学、研究所、病院等で保存、蓄積されている希少な組織切片をその組織切片が作製された時点では開発されていなかった染色方法や新規抗原に対する抗体を用いて、再評価することで新しい情報が得られることが可能になると考えられる。

現時点では、deColorizing Solution の適用は HE 染色または MT 染色となっているが、本方法の適用を拡大することで、脱色という方法がさらに組織切片の再利用による有用性を高めるであろう。

組織標本脱色試薬

deColorizing Solution 1 deColorizing Solution 2

HE 染色標本を脱色する場合は、deColorizing Solution 1 のみを使用します。一方、MT 染色標本を脱色する場合は、deColorizing Solution 1 と 2 の両方が必要となります。本品を使用し、脱色した後に、異なる染色を行うことにより、1つの組織標本から複数の染色情報を得ることができます。

コード No.	品名	規格	容量	希望納入価格(円)
043-34561	deColorizing Solution 1	病理研究用	250mL	8,500
046-34551	deColorizing Solution 2	病理研究用	250mL	8,500

Wako

Wakopak® Core C18 ADRA を用いた皮膚感作性評価法 “ADRA” の習熟化合物の分析例

富士フィルム和光純薬株式会社 機能性材料研究所 須藤 勇紀

1. はじめに

今般、動物愛護や動物実験に関する 3Rs (Reduction : 削減、Refinement : 苦痛の軽減、Replacement : 置き換え) の観点により動物実験に対する規制が進んでいます。特に EU では 1993 年から化粧品に対する動物実験が段階的に禁止、2003 年には 2013 年以降に EU 域内では動物実験を行った原料を含む化粧品販売禁止の指令¹⁾が出され、2009 年には規則化²⁾されました。

このような背景から動物実験代替法の開発が世界的に求められており、日本でも 2005 年に日本動物実験代替法評価センター (JaCVAM) が設立され、多くの日本発の動物実験代替法が経済協力開発機構 (OECD) のテストガイドラインに記載されています³⁾。

今回上市した Wakopak® Core C18 ADRA は、富士フィルム株式会社が開発し、2019 年 6 月 18 日に OECD テストガイドラインに記載された皮膚感作性試験代替法である Amino acid Derivative Reactivity Assay (ADRA)⁴⁾ の要件に適合するカラムです。ADRA では *N*-(2-(1-Naphthyl)acetyl)-L-cysteine (NAC) 及び α -*N*-(2-(1-Naphthyl)acetyl)-L-lysine (NAL) (図 1) をそれぞれ対象薬物と反応させ、その減少率を評価します。本稿では ADRA の技術習得として実施することが必要である 10 個の習熟化合物の分析例を紹介します。

なお、ADRA に関する詳細や既存手法である Direct Peptide Reactivity Assay (DPRA) との違いについては参考文献をご参照下さい⁵⁻⁹⁾。

2. 実験方法

本稿では ADRA キット (コード No. 296-80901) 及びそのプロトコルを用いて実験を行いました。ただし、今回は本来の ADRA とは異なり、96

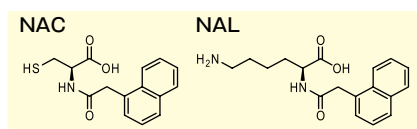


図 1. NAC と NAL の構造式

表 1. LC 条件

機器	Agilent UHPLC 1290 infinity II (Agilent 社)
カラム	Wakopak® Core C18 ADRA 3.0 × 150mm (D)
移動相 A	0.1% トリフルオロ酢酸-水溶液
移動相 B	0.1% トリフルオロ酢酸-アセトニトリル溶液
NAC のグラジエント条件	0min. (A : B=70 : 30) → 9.5min. (45 : 55) → 10.0min (0 : 100) → 13.0min. (0 : 100) → 13.5min. (70 : 30) → 25.0min. (70 : 30)
NAL のグラジエント条件	0min. (A : B=80 : 20) → 9.5min. (55 : 45) → 10.0min (0 : 100) → 13.0min. (0 : 100) → 13.5min. (80 : 20) → 25.0min. (80 : 20)
流量	0.3mL/min.
ミキサー容量	35 μL
カラム温度	40°C
検出波長	UV 281nm
注入量	10 μL

well plate ではなく、PP 製マイクロチューブを用いて反応を行いました。次に LC 条件を表 1 に示します。分析時間における 13.5 分間以降の平衡化時間は装置の構成やミキサー容量によって異なりますのでご注意ください。

3. 結果

習熟化合物の評価結果を表 2 に、ク

ロマトグラム例を図 2 に示します。今回、Wakopak® Core C18 ADRA を用いて ADRA における習熟化合物のガイドラインで示されている範囲内の減少率が得られました。

当社のホームページ¹⁰⁾にはキットを用いた実験操作の動画やプロトコルの資料も掲載していますので、皆様の

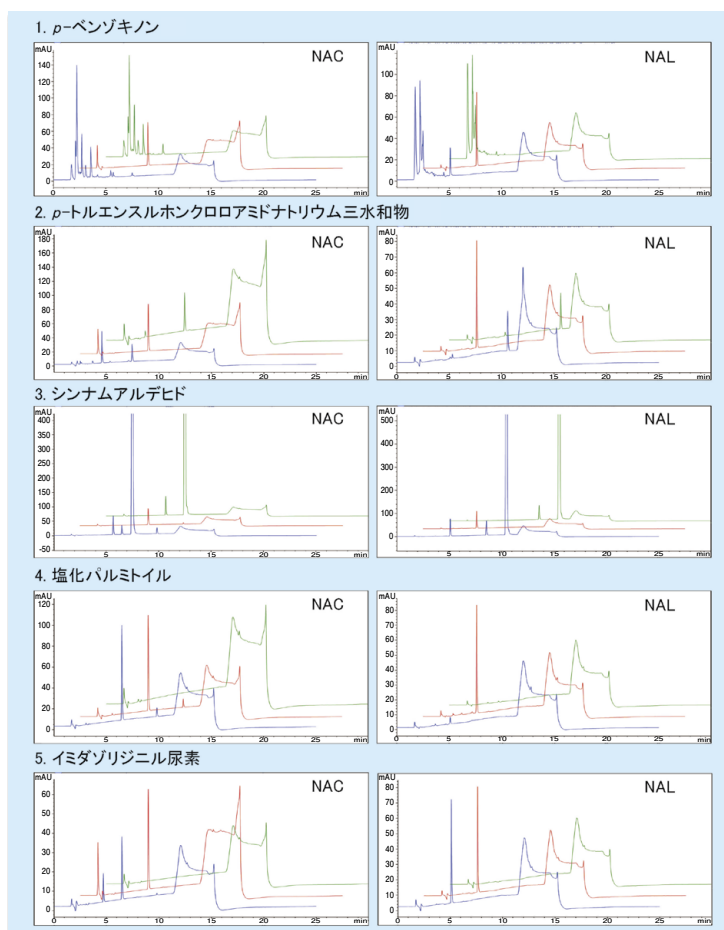


図 2-1. 習熟化合物のクロマトグラム

緑 : 薬物、赤 : NAC または NAL、青 : 薬物 + NAC または NAL

表2. 習熟化合物の一覧と評価結果

No.	テスト薬物	CAS No.	性状	分子量	評価溶媒	ADRAによる予測	既知の減少率 (%)		減少率の結果 (%)	
							NAC	NAL	NAC	NAL
1	p-ベンズキノン	106-51-4	固体	108.09	水	陽性	90-100	40-70	100	61
2	p-トルエンスルホンクロロアミドナトリウム三水和物(クロラミンT)	7080-50-4	固体	281.69	水	陽性	90-100	90-100	100	97
3	シナナムアルデヒド	14371-10-9	液体	132.16	アセトニトリル	陽性	40-100	≤ 20	43	1
4	塩化パルミトイル	112-67-4	液体	274.87	アセトニトリル	陽性	≤ 10	50-100	2	93
5	イミダゾリジニル尿素	39236-46-9	固体	388.29	水	陽性	10-45	≤ 10	35	1
6	ファルネサル	19317-11-4	液体	220.35	アセトニトリル	陽性	10-40*	≤ 15	15	2
7	グリセリン	56-81-5	液体	92.09	水	陰性	≤ 7	≤ 7	0	0
8	ベンジルアルコール	100-51-6	液体	108.14	アセトニトリル	陰性	≤ 7	≤ 7	0	0
9	イソフタル酸ジメチル	1459-93-4	固体	194.19	アセトニトリル	陰性	≤ 7	≤ 7	0	0
10	p-ヒドロキシ安息香酸プロピル	94-13-3	固体	180.20	アセトニトリル	陰性	≤ 7	≤ 7	0	0

*現在のガイドラインに記載の値と異なりますが改正予定です。

ADRA を用いた分析にご活用頂けますたら幸いです。

【参考文献】

- 1) 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) European Commission : "REGULATION (EC) No 1223/2009 OF THE EUROPEAN PARLIAMENT AND OF THE COUNCIL of 30 November 2009 on cosmetic products", *Official J. European Union*, L 342/59(2009).
- 3) 宮崎博之, 吉山友二: 日薬理誌, **151**, 48 (2018).
- 4) OECD : "In Chemico Skin Sensitisation : Amino acid Derivative Reactivity Assay (ADRA)", *OECD Guideline for the Testing of Chemicals 442C* (2019).
- 5) 山本裕介 他: 和光純薬時報, **87** (1), 12 (2019).
- 6) Fujita, M. et al. : *J. Pharmacol. Toxicol. Methods*, **70**, 94 (2014).
- 7) Yamamoto, Y. et al. : *J. Appl. Toxicol.*, **35**, 1348 (2015).
- 8) Fujita, M. et al. : *J. Appl. Toxicol.*, **39**, 191 (2019).
- 9) Fujita, M. et al. : *Toxicol. in Vitro*, **59**, 161 (2019).
- 10) 富士フィルム和光純薬株式会社ホームページ: ADRAキット, <https://labchem-wako.fujifilm.com/jp/category/01294.html>

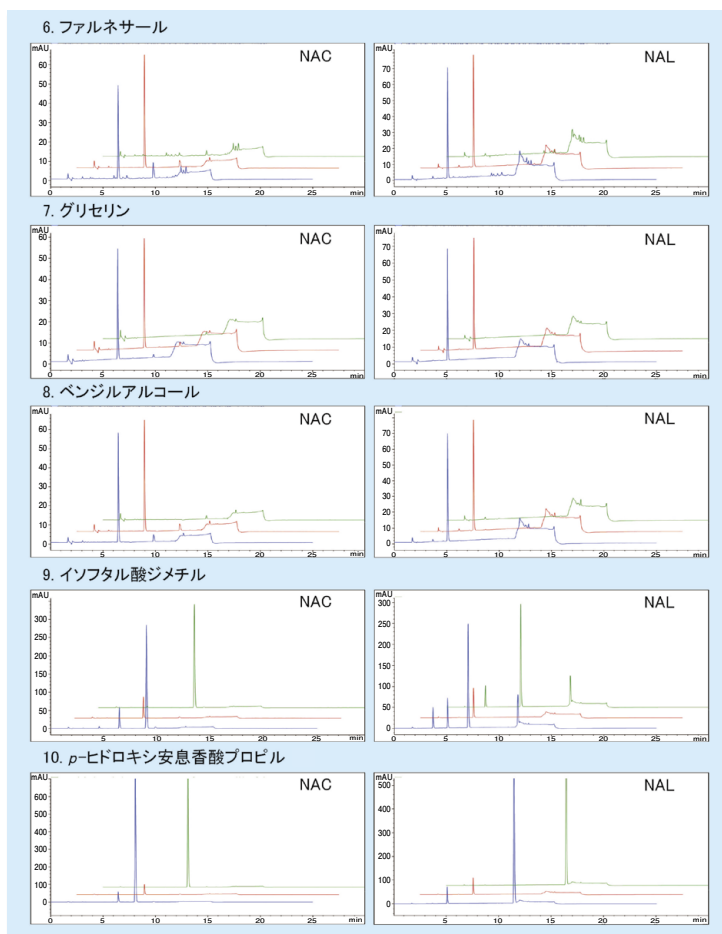


図2-2. 習熟化合物のクロマトグラム

緑: 薬物、赤: NAC または NAL、青: 薬物+NAC または NAL

本品は、ADRAの分析に最適な、粒子径2.6 μmのコアシェル型充てん剤を使用した専用カラムです。カラム1本ごとにNAC、NAL、薬物の分離を確認し、Column Performance Reportを添付しています。

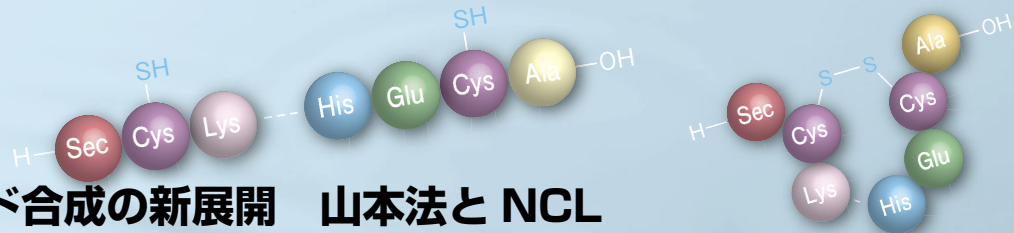
コード No.	品名	容量	希望納入価格(円)
233-63991	Wakopak® Core C18 ADRA Φ 3mm*150mm	1本	98,000



ADRAを簡便に実施できる試薬キットです。

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

☐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10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 ペプチド合成の新展開 山本法とNCL

サイエンスライター 佐藤 健太郎

ルイス酸触媒によるペプチド合成

ペプチド合成の新しい手法について紹介する本シリーズであるが、ごく最近中部大学の山本尚・村松渉らのグループから、全く新しいアプローチのペプチド合成法¹⁾が発表されたので、こちらをまず紹介したい。

これまでのペプチド合成におけるアミド縮合反応は、全てカルボキシ基側を何らかの形（酸ハロゲン化物、酸アジド、活性エステルなど）に変換して活性化し、ここにアミノ基が攻撃してくるという形で結合形成が行われていた。しかしこの方法では、アミノ酸α位のエピ化を起しやすいため、*tert*-ブチルオキシカルボニル基（Boc基）などのカルバマート系保護基で保護されたアミノ酸を結合させる場合にはこの問題は小さいが、長鎖フラグメント同士を結合させる場合には顕著となる。

このため、ペプチド鎖を伸ばしていく際には、液相法でも固相法でも、N端へ向けて一アミノ酸ずつ結合させていくことがほとんどだ。必然、ペプチド合成の工程数は長くなり、総収率は低下し、分離困難な欠陥ペプチド（途中のアミノ酸が抜けたもの）が生成するといった、種々の問題を引き起こしていた。

これに対し、山本らの方法ではN-保護アミノ酸のメチルエステルなど、活性化されていないアミノ酸誘導体を用いる。これを無溶媒でアミノ基無保護のアミノ酸*tert*-ブチルエステルと混合し、触媒としてルイス酸性のタンタル(V)メトキシド（Ta(OMe)₅）を加えて加熱することで、アミド結合が生成するというものだ。アミノ酸はどちらか一方を2～2.5当量、Ta(OMe)₅は10mol%を用いて、40～70℃、72時間程度で反応は完結する。

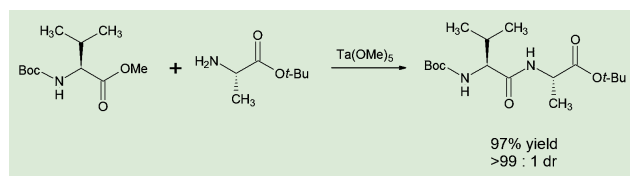


図1. タンタル触媒によるアミノ酸縮合反応

アミノ酸誘導体同士を無溶媒で混合するというのは意外な条件だが、ジクロロメタンや*N,N*-ジメチルホルムアミド（DMF）などの溶媒を用いると、収率は低下もしくは全く生成物が得られなくなる。無溶媒であるので、反応終了後は適当な溶媒を加え、そのままシリカゲルカラムで精製を行うという簡便な操作で目的物が得られる。

N端側のアミノ基保護基としては、Boc、ベンジルオキシカルボニル基（Z）、アリルオキシカルボニル基（Alloc）、2, 2, 2-トリクロロエトキシカルボニル基（Troc）、*p*-トルエンシルホニル基（Ts）などが利用可能で、触媒となる

タンタルは、この保護基のカルボニル基酸素と、エステルカルボニル基の酸素にキレートされる形で、反応を触媒するものと考えられる。ただし9-フルオレニルメチルオキシカルボニル基（Fmoc）やフタロイル基（Pht）は、タンタルのルイス酸性のため脱保護されてしまい、この反応には適用できない。

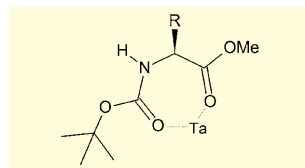


図2. タンタル触媒の配位

タンパク質を構成する20種のアミノ酸のほとんどで、良好な収率でジペプチドが得られている。ただし*tert*-ロイシンなど、立体障害の大きいアミノ酸では収率の低下が見られた。また特筆すべきこととして、ジペプチド合成の際にアミノ酸α位のエピ化はほとんど起こらない。

さらに山本・村松らは、この手法をフラグメント同士の結合に展開している。検討の結果、こちらの場合はチタン(IV)イソプロポキシド（Ti(OPr)₄）が触媒として好適であることが示されている。たとえばBoc-Ala-Met-Ala-OHとH-Gly-Ala-Ala-O*t*-Buをクロロホルム溶媒中で結合させ、収率98%でほとんどエピ化なしに目的のヘキサペプチドが得られている。

今までのペプチド合成では、当量の高価な縮合試薬を用いて、一残基ずつ延長していくことになるため、極めて高コストであった。しかし今回の方法では、シンプルなタンタルまたはチタン化合物を触媒量用いるだけであり、溶媒も不要であるので、低コストかつ環境負荷も小さい。また、収束的合成によって合成工程を大幅に減らすことも可能となっており、従来に比べて1000分の1以下の価格でペプチドを供給できると山本は述べている。触媒として用いられるタンタルやチタンは毒性が低い元素であり、使用や廃棄に特別の配慮は不要であることもメリットだろう。

反応時間など課題もあるものの、全体として非常にポテンシャルの高い方法であることは間違いなく、今後の進展が待たれる。この後に述べるNCL法との組み合わせなどにより、さらに効率的に複雑なペプチドを作れる可能性もあるだろう。今まで供給面に難のあったペプチド医薬はもちろん、繊維材料や化粧品など広く影響を与えそうだ。

NCL法の展開

NCL法は、無保護のペプチド鎖同士を結合させる手法で、1994年にKentらによって発表された²⁻⁴⁾。チオールエステルとシステインの持つメルカプト基とのエステル交換反応を利用し、分子内でアシル基が転位することで目的のペプチドが得られる。

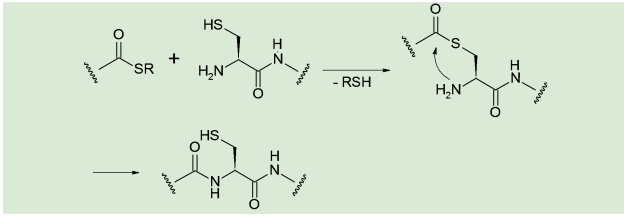
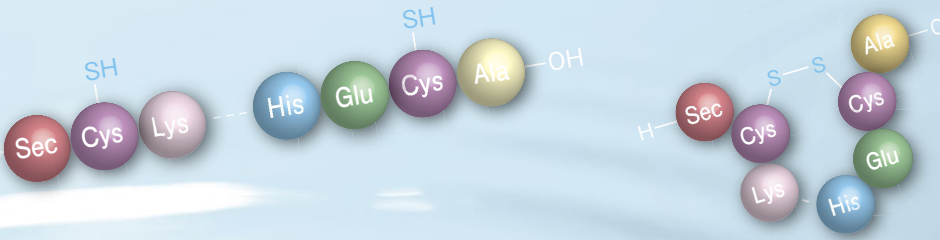


図3. NCL法によるアミド結合生成

この方法は、結合生成できるのがシステイン残基の位置のみに限られるが、特殊な試薬などが必要ないというメリットがある。類似の方法として、アジドとホスフィンの反応 (Staudinger 反応) を利用する方法、 α -ケト酸とヒドロキシルアミンの反応を利用するKAHA法などが考案されているが、簡便なNCL法が最もよく使われている。NCL法は発表から四半世紀を経てさまざまな応用展開がなされており、その一部は以前に富士フイルム和光純薬(株)発行Organic Square Vol. 53で紹介しているので、そちらも参照していただきたい。

チオエステル部分は、S-アルキル型よりS-アリアル型の方が置換反応が速いが、安定性などの問題もあるため、場合によって使い分けられる。チオグリコール酸メチルなどは、水溶性が高いために除去しやすい。

NCL法に必要なチオールエステルの合成法も、種々開発されている。たとえばペプチドのC末端をヒドラジドとし、ここに亜硝酸塩を作用させてアジドに変えた上で、チオールとの置換を行う方法がある⁴⁾。

また最近、ペプチドヒドラジドにアセチルアセトンを作用させてN-アシルピラゾールとし、ここにチオールを作用させる方法が報告された⁵⁾。酸化剤などを使用せずマイルドで、ワンポットでチオールエステルへの変換が行えるため、今後使用が増えそうだ。

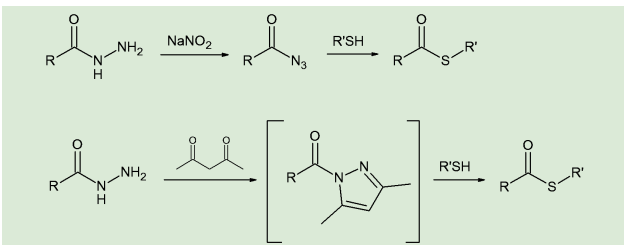


図4. チオールエステルの合成

その他、固相法で合成したペプチド鎖を、チオールエス

テルの形で切り出す方法もいくつも発表されている。これらは総説^{3a)}にまとめられているので、参考にされたい。

NCL法の最も大きなネックとなるのは、システイン残基のある位置でしかペプチド鎖同士の接合を行えない点だ。そこで、NCLを行った後にシステインを脱硫し、アラニンに変える方法が広く用いられている。アラニンはタンパク質内に最も多く存在するアミノ酸なので、これによって合成戦略の自由度が大幅に上がった。脱硫方法としては、Raney ニッケルがよく用いられていたが、効率などの点で問題がある。近年では、水溶性のラジカル開始剤VA-044とホスフィン類の組み合わせによって脱硫を行うケースが多い。

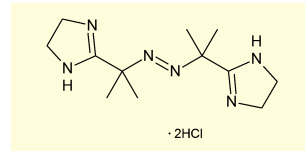


図5. VA-044

こうした手法の組み合わせにより、以前では考えられなかったサイズのポリペプチドが化学合成できるようになっている。さらに近年では、遺伝子組み換えの手法で生産したペプチド鎖に、NCLで合成ペプチド鎖を導入する合成法も行われるようになっている。この方法によれば、遺伝子組み換え法だけでは不可能な糖タンパク質や、蛍光タグでラベルしたタンパク質の合成も可能になる。たとえばPrattらは、140残基から成り、87番目のセリンに糖が結合したタンパク質である、 α -シヌクレインの全合成に成功している⁶⁾。

またCamareroらは、18残基から成る環状ペプチド θ -ディフェンシン1の合成を行っている⁷⁾。遺伝子組み換え法で作ったペプチド鎖をペプチダーゼで処理し、NCLの手法でN端とC端を結合させ、環化に成功している。環状ペプチドは医薬の骨格として有望であるから、NCLの応用として注目すべきアプローチといえるだろう。

【参考文献】

- 1) Muramatsu, W. et al. : *J. Am. Chem. Soc.*, **141**, 12288 (2019).
- 2) Dawson, P. E. et al. : *Science*, **266**, 776 (1994).
- 3) NCLの総説 : a) Agouridas, V. et al. : *Chem. Rev.*, **119**, 7328 (2019). ; b) Conibear, A. C. et al. : *Chem. Soc. Rev.*, **47**, 9046 (2018).
- 4) Fang, G. et al. : *Angew. Chem. Int. Ed.*, **50**, 7645 (2011).
- 5) Flood, D. T. et al. : *Angew. Chem. Int. Ed.*, **57**, 11634 (2018).
- 6) Lewis, Y. E. et al. : *ACS Chem. Biol.*, **12**, 1020 (2017).
- 7) Gould, A. et al. : *Mol. BioSyst.*, **8**, 1359 (2012).

当社では、ペプチド合成用試薬をラインアップしています。詳しくは、当社HPをご覧ください。
 試薬事業トップ→製品情報→合成・材料→ペプチド合成

Wako

第7回 エクソソームとがん

東京医科大学 医学総合研究所 分子細胞治療研究部門 小坂 展慶

がん細胞は、微小環境に存在する細胞と常にコミュニケーションをとっており、それによってがんの悪性化が進展している。このがん細胞と周辺細胞の細胞間コミュニケーションを明らかにすることは、Nivolumabのような画期的ながんの治療薬の開発につながる。これまでの研究では、細胞間コミュニケーションに関わる因子として、接着分子、細胞外基質、サイトカインやケモカインなどが中心に研究されてきたが、最近、エクソソームが新たな細胞間コミュニケーション因子として注目されてきている。細胞外に分泌される小胞であるエクソソームは、脂質の二重膜で構成されており蛋白質や核酸が含まれている。エクソソームは、様々な生理活性物質の複合体であるという点において、これまでに報告されてきた他のコミュニケーション因子と違っている。特にこれまでコミュニケーションツールとして考えられてこられなかった細胞内蛋白質や、核酸分子などがエクソソームにより運搬される。発見当初、細胞内の不要物を排出するゴミ袋のような機能を果たしていると考えられてきた。しかし多くの研究により、生体の様々な生理機能や、その破綻による疾患に関わることが明らかとなっていった。特にがんにおいては、がんの悪性化のすべての段階において重要な役割に関わっている¹⁾。以下に当研究室がこれまでに報告してきたがんの悪性化におけるエクソソームの機能に関して簡単に紹介する。

がん細胞は非常に速く分裂するため、生存のために栄養を必要としている。そのためがん細胞は、腫瘍内に血管を誘導することで、栄養を獲得している。我々は、がん細胞から分泌されるエクソソームが、腫瘍血管を誘導することを明らかにした²⁾。また、セラミド合成酵素の一つであるnSMase2(中性スフィンゴミエリナーゼ2)の発現を抑えることによりがん細胞のエクソソームの分泌を減少させた結果、腫瘍内の血管が誘導されなくなり、結果的にがんの転移が抑制された。

卵巣がんは、がんの悪性化が進行すると、腹部にがんが広がる腹膜播種を生

じ治療が困難となる。この卵巣がんによる腹膜播種にもエクソソームが関わっている³⁾。卵巣がんから分泌されたエクソソームは、腹膜を形成している中皮細胞に取り込まれ、それらの細胞にアポトーシスを誘導する。これにより腹膜に穴が開き、がん細胞の腹膜播種が促進される³⁾。一方、同じように治療が困難ながんの転移であるがんの脳転移に関してもエクソソームが関係している。血液脳関門と呼ばれる生体バリアーは、栄養以外の物質の脳への自由な移行を制限しているが、がん細胞はこのバリアーを突破し転移を成立させている。我々は、脳転移性乳がん細胞株のエクソソームが、血液脳関門を形成する細胞の一つである血管内皮細胞に入り込み、血管内皮細胞同士の強い細胞間相互作用を緩めることにより、がんの転移を成立させることを示した⁴⁾。

また乳がんは、5年や10年と長期にわたる再発リスクが存在することが知られている。その理由の一つとして、乳がん細胞が骨髄中に入り、長期間の休眠に入るというメカニズムが提唱されているがその分子機構に関しては不明な点が多い。我々は、骨髄中の間葉系幹細胞のエクソソームによって、乳がん細胞が休眠することを明らかにし、乳がんの再発におけるエクソソームの重要性を示した⁵⁾。

このようにこれまでに紹介してきた我々の研究だけでなく、世界中の多くの研究者によりがんの悪性化におけるエクソソームの役割が報告されている(図1)。もちろんがんの悪性化には、がん細胞から分泌されるエクソソームだけではなく、がん微小環境に存在するがん以外の細胞から分泌されるエクソソームも、がんの悪性化に関わっている。これまでのサイトカインやケモカインといった分泌因子や接着分子なども含めると、がん細胞とその微小環境に存在する周辺細胞との細胞間コミュニケーションは非常に複雑であると言える。しかし、がん細胞のエクソソームによって、がんの悪性化が進展するのであれば、そのエクソソームを標的とした治療法が、がんの転移の抑制に有効である

可能性がある。そこで以下にがんの悪性化に関わるエクソソームを標的にしたがん治療法の例に関して概説する(図2)。

1. がん細胞のエクソソーム分泌を抑える

我々や他のグループの研究により、がん細胞のエクソソーム分泌を阻害することでがんの転移が抑制される可能性が示された¹⁾。そのためがん細胞におけるエクソソームの分泌を抑制する方法が研究されている。しかし、エクソソームは生体内の多くの細胞から分泌されており、免疫細胞由来のエクソソームのように、がんの悪性化に抑制的に働くエクソソームも存在するため、全てのエクソソームを抑制するような方法では、有効ながんの治療法にならない。またエクソソームは様々な生理学的な機能も持っているため、全てのエクソソームの分泌を抑制する方法では、思わぬ副作用が出る可能性もある。そこで、がん細胞といった疾患特異的なエクソソームの分泌経路を明らかにすることで、その疾患特異的なエクソソーム分泌経路を標的とした治療法を確立する必要がある。エクソソームの分泌経路はわからないことが多いが、がん細胞は正常細胞に比べてエクソソームの分泌量が明らかに多い。このことからがん細胞のエクソソームの分泌は正常細胞と違う分子機構が存在すると考察される。そのためそれらの分子を同定し、その分子を標的としてエクソソームの分泌を抑制することがこのアプローチによる治療の実現に向けて重要である。

2. がん細胞由来の血中のエクソソームを除去する

血中に存在するがん細胞由来のエクソソームを除去するというアプローチは、前転移ニッチ形成や薬剤耐性などに関わるエクソソームの機能を阻害する方法である。前転移ニッチ(pre-metastatic niche)は、がん細胞が転移予定の臓器に転移する前に、がん細胞が生存しやすいように予め整備された環境のことであ

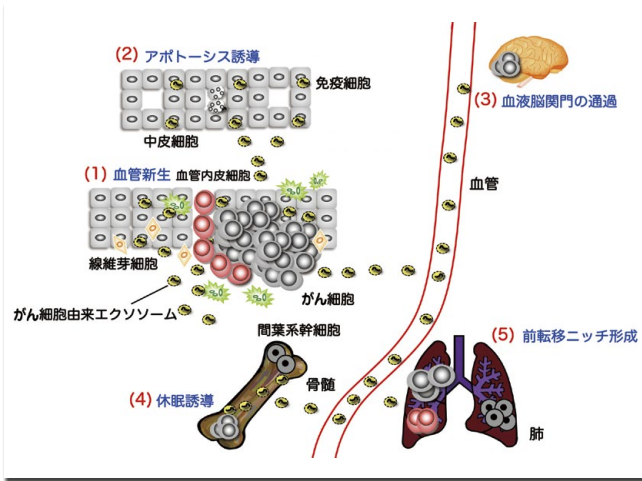


図1. がんの悪性化におけるエクソソームの役割

エクソソームは、がんの悪性化の多段階に関わる。がん細胞は増殖を繰り返すため、絶え間なく変化する環境に適応するために、自身の利益になるような微小環境に作り変える。この際、サイトカインやケモカインの他にエクソソームが関わっている。例えば栄養の摂取や低酸素環境下の場合には血管新生を促すために血管内皮細胞にエクソソームを送り込み腫瘍血管を作成する(1)。がん転移においては、生体バリアーとなっている腹膜の中皮細胞のアポトーシスを誘導し、自身の遠隔転移を可能にする(2)。さらに同じように生体バリアーとして重要な血液脳関門における血管内皮細胞の細胞間結合を緩めるようなエクソソームを送っている(3)。また骨髄中に存在するがん細胞は、間葉系幹細胞のエクソソームを受け取ることで休眠状態になり、がんの長期再発の一因になっていると考えられている(4)。さらにがん細胞由来のエクソソームが前転移ニッチ形成に関わっていることも報告されている(5)。

る。これまでの研究により、様々なサイトカインやケモカインが前転移ニッチ形成に重要であることが報告されてきたが、がん細胞由来のエクソソームも前転移ニッチ形成に関わっていることが報告されている^{6,7)}。血液中のエクソソームによるがん悪性化の他の例として、トラスツズマブのようにHER2を標的とした抗体医薬が血液中に循環しているHER2陽性のエクソソームに結合してしまい、腫瘍まで届かず薬効を示せない可能性も示唆されている⁸⁾。そこで、このような血液中に循環しているエクソソームを除去するがん治療の可能性が研究されている。

我々のグループでは、ヒト乳がん細胞株をマウスに移植し、エクソソーム上のCD63もしくはCD9を標的とする抗体を投与した結果、乳がん細胞株の転移を有意に抑制した⁹⁾。これにより、血液中

のエクソソーム除去によるがん治療の可能性が示唆されたが、本論文ではCD63やCD9といった多くのエクソソームで発現が確認されている分子を標的としているため、正常細胞のエクソソームにも結合する可能性が存在している。そのため実際の臨床の現場では、がん細胞特異的なエクソソームの抗原を同定し、その分子を標的にする必要がある。

エクソソーム研究が世界中で盛んになってから、まだ10年ほどであるため、エクソソームにはまだわからないことが多い。エクソソームは、複数の分子から成り立つ複合体であり、また細胞や細胞の置かれている環境によって分泌されるエクソソームの質が変わる。さらにエクソソームが100nmという大きさであるため、これまでの生命科学の研究で用いられてきた機器や技術を、そのままエクソソームの解

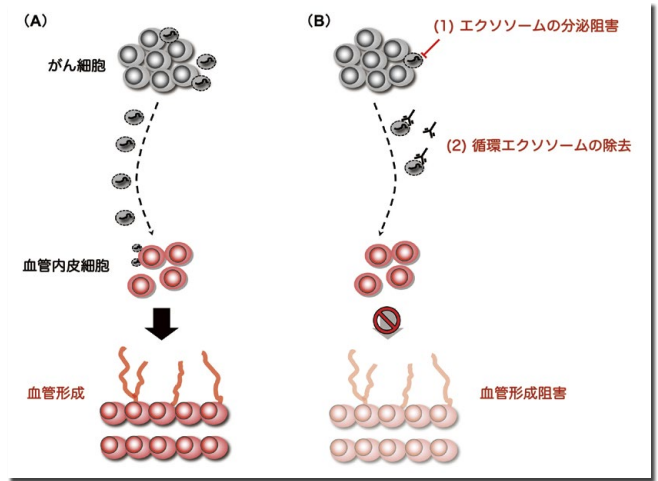


図2. がん細胞由来エクソソームに対する新規のがん治療

がん細胞から分泌されたエクソソームを標的とした新規のがん治療として以下の2通りを例示する。例えば、がん細胞のエクソソームを受け取った血管内皮細胞は、血管新生を誘導し、がん細胞への酸素と栄養の供給に関わっている(A)。この時、(1)エクソソームの分泌の阻害、(2)循環エクソソームの除去、を行い、がん細胞由来のエクソソームが血管内皮細胞に届かなくすることで、新規の血管新生阻害剤の開発へとつながる(B)。

析に用いることができない。これらの背景により、エクソソーム研究は複雑かつ困難な状況にある。しかし、がん細胞の情報を多く持ち、がんの悪性化に関わっているエクソソームは、新規のがん診断・治療の非常に魅力的な研究対象であり、今後のさらなる研究の発展が期待されている。

【参考文献】

- 1) Kosaka, N. et al. : *J. Clin. Invest.*, **126** (4), 1163-72 (2016).
- 2) Kosaka, N. et al. : *J. Biol. Chem.*, **288** (15), 10849-59 (2013).
- 3) Yokoi, A. et al. : *Nat. Commun.*, **8**, 14470 (2017).
- 4) Tominaga, N. et al. : *Nat. Commun.*, **6**, 6716 (2015).
- 5) Ono, M. et al. : *Sci. Signal.*, **7** (332), ra63 (2014).
- 6) Peinado, H. et al. : *Nat. Med.*, **18** (6), 883-91 (2012).
- 7) Hoshino, A. et al. : *Nature*, **527** (7578), 329-35 (2015).
- 8) Ciravolo, V. et al. : *J. Cell. Physiol.*, **227** (2), 658-67 (2012).
- 9) Nishida-Aoki, N. et al. : *Mol. Ther.*, **25** (1), 181-191 (2017).

当社では、エクソソーム研究関連試薬を多数取扱っています。
当社HPをご覧ください。

エクソソーム Wako 検索

第3回 CUBIC を用いた組織透明化と3次元観察

東京大学大学院医学系研究科システムズ薬理学教室 洲崎 悦生

はじめに

今から100年以上も前、ドイツのSpalteholzは有機溶剤のベンジルアルコールとサリチル酸メチルを混合した組織透明化試薬を開発し、ヒト組織を3次元的に観察した例を報告した¹⁾(これらのサンプルの一部は現在でもドレスデンの公衆衛生博物館で見ることが出来る)。その後1980年代に入るまで、組織透明化技術の目立った発展や応用例は見られなかったが、1989年にDentがMurray's clearまたはBABB法と呼ばれる改良Spalteholz試薬の利用例を報告²⁾、さらには1990年代以降にロシアのTuchinら、台湾のChiangらが水溶性化合物による組織透明化法を報告し^{3,4)}、近代的な組織透明化技術の開発に道を開いた。特に、2007年のDodtら⁵⁾、2011年の濱ら⁶⁾による蛍光3次元イメージングへの適応例が端緒となり、ここ10年で数十に及ぶ組織透明化手法が開発されるとともに、主要な組織観察手法の一つとして一般化されつつある。我々のグループでは2014年にCUBICと名付けた全臓器・全身スケール細胞解析技術のコンセプトを発表し^{7,8)}、そのコンセプトを実現する重要な技術要素の一つとして高度な組

織透明化手法の開発を継続している。本項ではその詳細とアプリケーション例を紹介したい。

CUBIC技術のコンセプトと開発経緯

CUBIC (Clear, Unobstructed Brain/Body Imaging Cocktails and Computational Analysis) は、臓器全体、あるいは全身のすべての細胞を観察対象とし、細胞種、細胞機能、細胞同士の接続などの情報をノンバイアスかつ網羅的に収集し解析する技術コンセプトである(図1)。細胞解像度の画像データを収集するためには光のモダリティが適切であり、不透明な大型組織サンプルを3次元観察するためには組織を光学的に透明にする必要がある。特に、CUBICが対象とする臓器全体や全身を現実的な時間スケールで光学観察するには、ライトシート顕微鏡と呼ばれる光学切片をサンプル内に作製し2次元画像スタックを収集できる特殊な顕微鏡が適している⁵⁾(図1、「臓器全体の3Dイメージング」部分)。しかし、ライトシート顕微鏡は横から励起光を照射し上部から蛍光シグナルを観察するため、サンプル全体が高度に(理想的には文字通り見えないほどに)透明化されている必要がある。当

然、観察のための蛍光シグナルは透明化後も残存している必要がある。これらの仕様要件を満たす組織透明化技術は、筆者らがCUBIC開発をスタートさせた2010年から2011年ごろには存在しておらず、新規の技術を開発する必要があった。折しも、理化学研究所の濱・宮脇らのグループが、蛍光タンパク質のシグナル保存に適した水溶性化合物ベースの組織透明化試薬「Scale」を発表したこと⁶⁾、我々は直感に頼らずベストな水溶性化合物を選択するための独自のスクリーニング法を立ち上げ、40化合物の定量的スクリーニングを行なった。その結果、最終的にScaleの主要成分である尿素に我々が新規に発見したアミノアルコールを加えた「ScaleCUBIC試薬」を開発するに至った⁷⁾。さらに我々は、アミノアルコールが組織中の主要な吸光物質であるヘムを除去し、後述する「脱色」の過程で重要な働きをもつことを見出した⁸⁾。これらの特徴により、ScaleCUBIC試薬はマウス脳、マウス全身、ヒト組織などの高度な透明化と3次元観察を可能とした。

その後我々のグループは、マウス全脳全細胞観察のための膨潤透明化法「CUBIC-X」、1600以上の水溶性化合物をスクリーニングし成分を刷新した

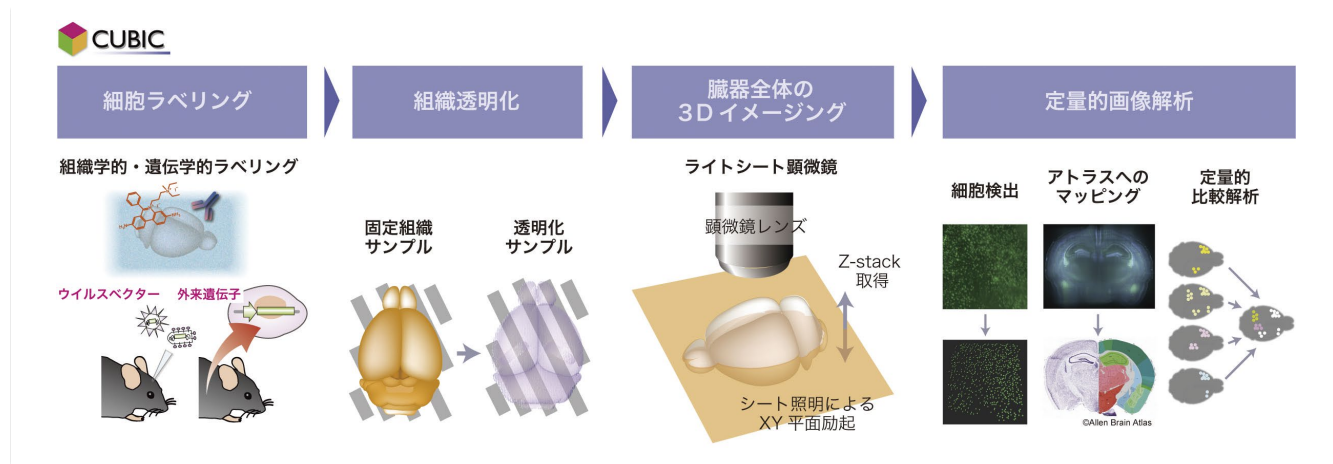


図1. CUBICの技術コンセプト概略

CUBICは、臓器全体・全身の網羅的細胞解析を実現する技術コンセプトである。蛍光ラベルを施した組織サンプルを光学的に透明にし、大型サンプル全体を高速に撮像可能なライトシート顕微鏡を用いて細胞解像度の画像取得を行う。取得した画像の定量解析により、細胞種・細胞活動・細胞ネットワーク構造などの情報を抽出する。アトラスの図はAllen Brain Atlas (<http://portal.brain-map.org>)より使用。

表1. CUBIC 試薬一覧

第2世代試薬は Scale の主成分である尿素を使用していないため、「CUBIC-○○」の表記に統一した。

	試薬の世代	役割	主要な成分	文献
ScaleCUBIC-1	第1世代	脱脂・脱色	アミノアルコール (クアドロール)、尿素、Triton X-100	13)
ScaleCUBIC-1A	第1世代	脱脂・脱色	アミノアルコール (クアドロール)、尿素、Triton X-100	http://cubic.riken.jp
ScaleCUBIC-2	第1世代	屈折率調整	アミノアルコール (トリエタノールアミン)、尿素、スクロース	13)
CUBIC-X	第1世代	膨潤+屈折率調整	アンチピリン、イミダゾール	9)
CUBIC-L	第2世代	脱脂・脱色	アミノアルコール (N-ブチルジエタノールアミン)、Triton X-100	11)
CUBIC-P	第2世代	脱色	1-メチルイミダゾール、アミノアルコール (N-ブチルジエタノールアミン)、Triton X-100	11)
CUBIC-B	第2世代	骨脱灰	EDTA、イミダゾール	11)
CUBIC-HL	第2世代	脱脂・脱色 (一部のヒト組織)	1,3-ビス (アミノメチル) シクロヘキサン、ドデシルベンゼンスルホン酸ナトリウム	11)
CUBIC-R	第2世代	屈折率調整	アンチピリン、ニコチンアミドまたは N-メチルニコチンアミド	11)

「第二世代 CUBIC 試薬 (CUBIC-L/R ほか)」、マウス全脳解析基盤としての 1 細胞解像度アトラス「CUBIC-Atlas」などの要素技術を発表した⁹⁻¹¹⁾ (表1)。さらに現在では、高度な 3 次元染色プロトコル、マウス全脳 1 細胞解析基盤、高速全細胞観察顕微鏡などの最新の要素技術についても発表準備中である。CUBIC 技術の利用を検討されているユーザーの方々には、これらの最新の開発成果もフォローいただきたい。

CUBIC による組織透明化

物体が光学的に透明であるということは、入射した光が内部で散乱・吸収されずにほぼ直進して射出されるということである。組織が不透明であるのは、組織中のさまざまな成分が光学的に不均一で入射光が強く散乱されるからであり、また血液のヘムのように可視光を強く吸収する色素が含まれているからである。このため、組織透明化は 1) 組織中の光散乱・光吸収物質の除去、2) 組織成分と周囲の溶媒成分の光学的特性 (特に屈折率) の均一化、の 2 つのステップによって達成される。CUBIC 試薬では界面活性剤

(Triton X-100) とアミノアルコールが 1) のステップに重要である。また、2) のステップにおいては、ScaleCUBIC 試薬ではスクロースが、第二世代 CUBIC 試薬ではアンチピリンとニコチンアミド誘導体が重要である。屈折率調整剤はタンパク質などの生体物質の屈折率に近い 1.5 前後の高い屈折率を持っており、「透明化」はこの屈折率調整剤への置換を以て完了する。しかしながら、ScaleCUBIC-1 試薬でもアミノアルコールと尿素の組み合わせにより比較的高い屈折率 (1.43) が達成されており、単剤でも比較的明瞭な透明化が達成されるため、全く透明化手法に馴染みのないユーザーや、小型のサンプルを短時間で透明化し、共焦点顕微鏡や 2 光子顕微鏡で観察したいユーザーがはじめにトライする試薬として推奨できる。より高度な透明化には脱脂・脱色剤+屈折率調整剤の 2 ステップによる透明化を推奨する。また骨組織についてはさらに脱灰も必要である。我々は 1600 以上の大規模化合物スクリーニングを実施するにあたって脱灰化合物も探索対象とし、EDTA にイミダゾールを加えた脱灰試薬 (CUBIC-B) を報告している。ヒトを

含む霊長類組織はげっ歯類組織より脱脂の難易度が高いため、同じく大規模スクリーニングによりさらに高い脱脂能力を達成した試薬 (CUBIC-HL) も開発した¹¹⁾。CUBIC 試薬は多くの蛍光タンパク質 (GFP バリエーション、mCherry、tdTomato、mKate2 など) の保存性に優れるが、発現量が非常に少ない場合は十分なシグナルが得られないこともある。また、一部の蛍光タンパク質とは相性が悪い。このため、実サンプルを用いて蛍光シグナルの残存を評価することを推奨する。サンプルを最小限のサイズにして処理時間を短くするとともに、脱脂を 37℃ではなく室温で行うと蛍光シグナルの改善が見られる。また、ScaleCUBIC-1 試薬の蛍光シグナル保存性をさらに高めた ScaleCUBIC-1A (Reagent-1A) 試薬のレシピも公表している (<http://cubic.riken.jp>)。最新の CUBIC-L 試薬と合わせてご検討いただきたい。

組織透明化過程の概略を図 2 にまとめた。組織透明化は固定組織サンプルに適応される手法であり、プロトコルに応じた固定法を選択する必要がある。CUBIC では通常 4% パラホルムアルデヒド固定を推奨する。固定剤の pH は中性を保ち、固定温度、架橋時間は原則的にサンプル間で条件が揃うようにする。脱脂・脱色期間はサンプルによって異なるため、推奨プロトコルに実施例のない組織については条件検討が必要である。脱脂・脱色後のサンプルはスポンジ状になるため、サンプルのダメージを避ける操作が必要である。筆者らは薬さじにサンプルを乗せてハンドリングしている。また、この段階のサンプルは防腐剤を入れた PBS などで長期保存が可能である。屈折率調整剤は非常に高濃度の試薬であるため、先に蒸留水で 50% に希釈した試薬で 1 日以上置換したのち、100% の試薬に置換する。希釈した屈折率調整剤の処理時間が不十分だと、内部の透明化が達成されない、組織の

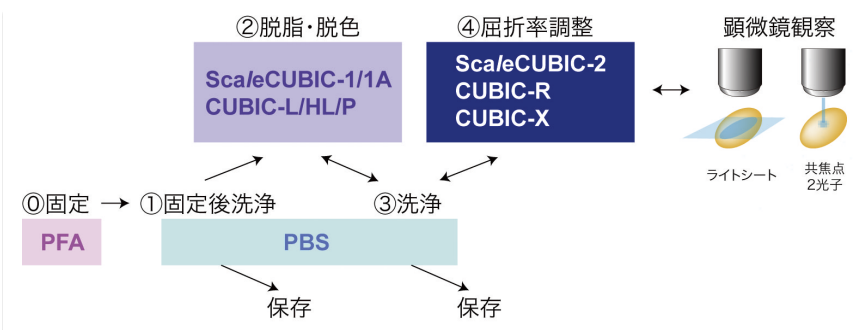


図2. CUBIC を用いた組織透明化・イメージングの流れ
CUBIC 試薬はパラホルムアルデヒド (PFA) 固定組織に最適化されている。固定組織は脱脂・脱色をへて屈折率調整により透明化される。間の洗浄過程でサンプルの保存が可能である。試薬の詳細については表1を参照。

変形が起こるなどのトラブルが起こりうる。観察後の組織はPBSで洗浄することで、脱脂・脱色後のサンプルと同等に保存することが可能である。

CUBIC のアプリケーション例

医学生物学研究における組織透明化技術の使用例は年々急速に拡大しており、文献を検索すればさまざまな生物種や組織への適応例を見つけることができる。例えば“CUBIC tissue clearing”でgoogle scholarを検索すると8000件余りがヒットし、対象サンプルも幅広い。中にはダンゴムシ・カニなどの甲殻類への適応例¹²⁾など、

筆者らが想定していなかったようなアプリケーション例も散見される。このため、利用を検討しているユーザーには、まず文献などを検索し適用例を探していただくのがスムーズな導入の一助になると思われる。ここでは特に筆者らのグループから報告したCUBICの適応例について報告する。

上述のように、CUBICは「臓器全体・全身の網羅的細胞解析」をコンセプトとしており、最初の論文^{7,13)}にて、まず光刺激ありなしの2個体2条件によるマウス全脳神経活動比較解析の例を報告している(図3A)。その後サンプル数を拡張し、薬物投与下マウスを時系列サンプリングし全脳神経

活動を解析した例も報告している¹⁴⁾。この例では計8条件で20匹のマウス脳を使用し、最終的にマイクロレイ解析などで汎用されるクラスタリング解析を行なって、特定の時間帯・実験条件で特異的に活動している神経細胞群を同定することに成功した。興味のある方は原著論文を参照いただきたい。さらに、第二世代CUBIC試薬を用いて高度にマウス全身を透明化し、がん転移モデルマウスの全身解析を行なった例についても報告している¹⁰⁾。この例では全身の3次元イメージングデータから、臓器中に散見される微小転移巣ももれなく検出できることを示し(図3B)、CUBICによる全身解析アプローチの有用性を証明した。

CUBICは核染色や免疫染色などの組織学的手法にもコンパチブルであり、一部の抗体については脳や消化管、腎臓などの臓器を丸ごと染色しイメージングできることを報告している^{8,10,15)}(図3C)。また、ヒト組織についても透明化や免疫染色、パラフィン包埋法とのコンパチビリティを検討し、3次元病理学の例として大腸癌リンパ節転移の検出率を100%まで向上させることができることを報告している¹⁶⁾。3次元の抗体染色を実施するに

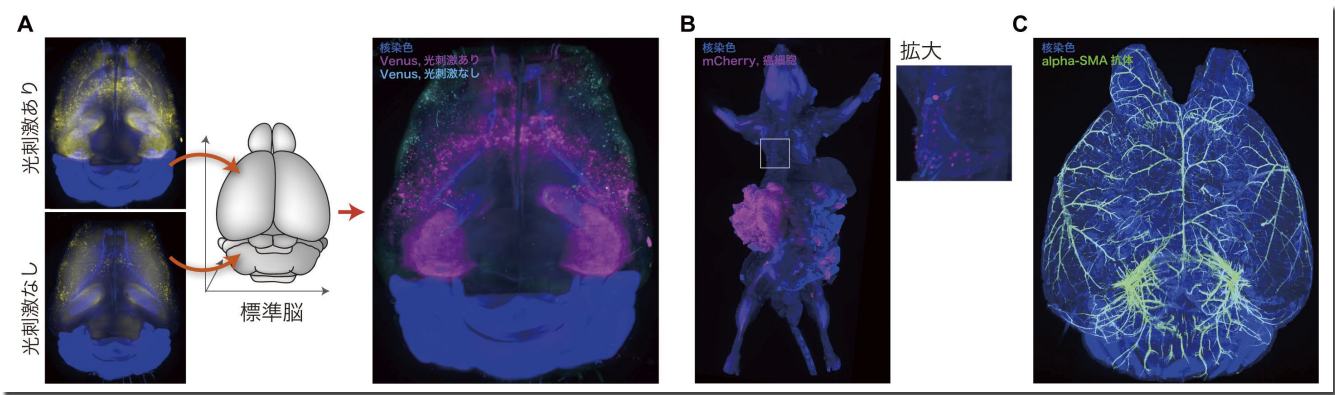


図3. CUBIC を用いたアプリケーション例
A: 神経活動を蛍光タンパク質 Venus の発現でラベリングできるトランスジェニックマウス (Arc-dVenus Tg)¹⁹⁾ に光刺激を与えたのちサンプリングを行い、光刺激なしのコントロールと比較する実験を行なった。標準脳データに双方のデータをレジストレーションし標準化を行なったのち、重ね合わせ画像を作成して直接比較を行なった。データは文献13)より改変して使用。
B: がん転移モデルマウスの全身を透明化・3D イメージングした例。mCherry でラベルされた癌細胞の微小転移も漏らさず検出可能である。データは文献10)より改変して使用。
C: マウス全脳免疫染色の例。血管平滑筋をラベリングする α -Smooth Muscle Actin (SMA) 抗体で脳全体を染色後、透明化・3D イメージングを行なった。データは文献10)より改変して使用。

あたっては、抗体のシグナルノイズ比が高く染色性が良好なモノクローナル抗体を使用することが望ましい。筆者らは脱脂・脱色後の組織で凍結切片を作製し、抗体の動作確認を行なっている。また、3次元浸透の行程を繰り返さないように、1次抗体に直接蛍光物質をラベリングした抗体を使用することを推奨する。抗体によっては屈折率調整剤中ではがれるものもあるため、染色後に1%程度のPFAで後固定を行うとよい。ただし、固定が強すぎると透明化が阻害されるため、抗体シグナルが残存する必要最小限の条件で実施することが望ましい。現在まで発表済みのプロトコルでは抗体の深部浸透の問題が完全に解決しておらず、筆者らはこの点を大きく改善させた最新のプロトコルを発表準備中である。興味のあるユーザーは今後の論文発表をフォローいただきたい。

おわりに

より詳しい情報が必要なユーザー向けに、透明化・3次元イメージングに関する英文総説を発表しているのご参照いただきたい^{17,18)}。組織透明化技術は優れたプロトコルが複数発表されており、ユーザーは目的に応じて最適なプロトコルを選択することができる状況にある。ただし、当研究チームも含め、開発グループの多くはなお技術を向上させており、最初の論文だけで

なく最新の文献をフォローすることを推奨する。CUBICに関する技術的な質問は筆者(esusaki@m.u-tokyo.ac.jp)までお問い合わせいただければ随時お答えする。本項が組織透明化技術を自身の研究へ活用しようと考えているユーザー各位の参考となれば幸いです。

【参考文献】

- 1) Spalteholz, W.: "Über das Durchsichtigmachen von menschlichen und tierischen Präparaten.", S. Hirzel, Leipzig (1914).
- 2) Dent, J. A., Polson, A. G. and Klymkowsky, M. W.: "A whole-mount immunocytochemical analysis of the expression of the intermediate filament protein vimentin in *Xenopus*.", *Development*, **105**, 61 (1989).
- 3) Tuchin, V. V. et al.: *Proc. SPIE*, **3863**, 10 (1999).
- 4) Liu, Y.-C. and Chiang, A.-S.: "High-resolution confocal imaging and three-dimensional rendering.", *Methods*, **30**, 86 (2003).
- 5) Dodt, H. U. et al.: "Ultramicroscopy: Three-dimensional visualization of neuronal networks in the whole mouse brain.", *Nat. Methods*, **4**, 331 (2007).
- 6) Hama, H. et al.: "Scale: a chemical approach for fluorescence imaging and reconstruction of transparent mouse brain.", *Nat. Neurosci.*, **14**, 1481 (2011).
- 7) Susaki, E. A. et al.: "Whole-brain imaging with single-cell resolution using chemical cocktails and computational analysis.", *Cell*, **157**, 726 (2014).
- 8) Tainaka, K. et al.: "Whole-body imaging with single-cell resolution by tissue decolorization.", *Cell*, **159**, 911 (2014).
- 9) Murakami, T. C. et al.: "A three-dimensional single-cell-resolution whole-brain atlas using

- CUBIC-X expansion microscopy and tissue clearing.", *Nat. Neurosci.*, **21**, 625 (2018).
- 10) Kubota, S. I. et al.: "Whole-body profiling of cancer metastasis with single-cell resolution.", *Cell Rep.*, **20**, 236 (2017).
- 11) Tainaka, K. et al.: "Chemical Landscape for Tissue Clearing based on Hydrophilic Reagents.", *Cell Rep.*, **24**, 2196 (2018).
- 12) Konno, A. and Okazaki, S.: "Aqueous-based tissue clearing in crustaceans.", *Zoological Lett.*, **4**, 13 (2018).
- 13) Susaki, E. A. et al.: "Advanced CUBIC protocols for whole-brain and whole-body clearing and imaging.", *Nat. Protoc.*, **10**, 1709 (2015).
- 14) Tatsuki, F. et al.: "Involvement of Ca²⁺-Dependent Hyperpolarization in Sleep Duration in Mammals.", *Neuron*, **90**, 70 (2016).
- 15) Hasegawa, S. et al.: "Comprehensive three-dimensional analysis (CUBIC-kidney) visualizes abnormal renal sympathetic nerves after ischemia/reperfusion injury.", *Kidney Int.*, **96**, 129 (2019).
- 16) Nojima, S. et al.: "CUBIC pathology: three-dimensional imaging for pathological diagnosis.", *Sci. Rep.*, **7**, 9269 (2017).
- 17) Tainaka, K. et al.: "Chemical Principles in Tissue Clearing and Staining Protocols for Whole-Body Cell Profiling.", *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, **32**, 713 (2016).
- 18) Susaki, E. A. and Ueda, H. R.: "Whole-body and Whole-Organ Clearing and Imaging Techniques with Single-Cell Resolution: Toward Organism-Level Systems Biology in Mammals.", *Cell Chem. Biol.*, **23**, 137 (2016).
- 19) Eguchi, M. and Yamaguchi, S.: "In vivo and in vitro visualization of gene expression dynamics over extensive areas of the brain.", *Neuroimage*, **44**, 1274 (2009).

CUBIC Trial Kit

Wako

本キットは、1) ScaleCUBIC-1 Solution、2) ScaleCUBIC-2 Solution、3) Mounting Solution 1、4) Mounting Solution 2 の4成分で構成されています。キット成分を調製し、透明化を行うことが可能です。

透明化プロトコル例、アプリケーション例は、当社HPをご覧ください。

CUBIC Wako

検索

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

☑️...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10月時点での情報です。最新情報は、当社HPをご参照下さい。

下痢性貝毒標準液

OA・DTX1 混合標準液

Wako

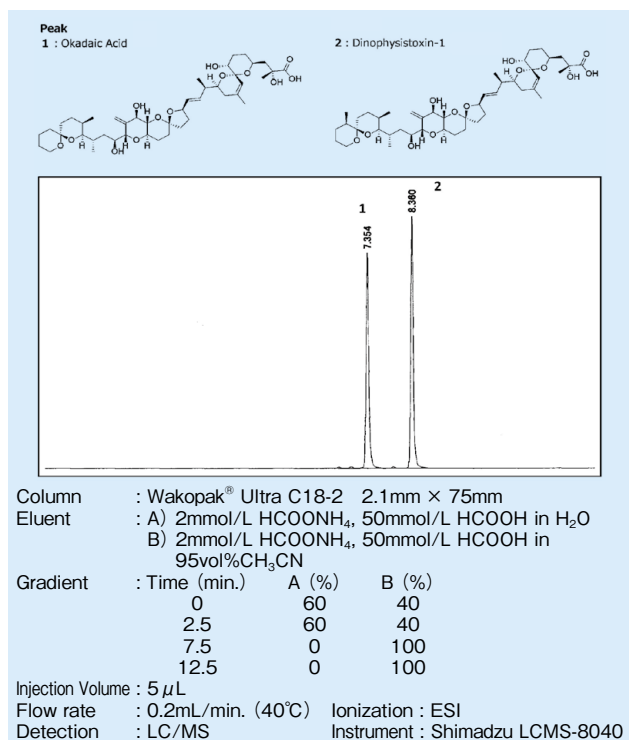
海洋生物由来毒素は、魚介類がもつ自然毒で食中毒の原因となります。海洋生物由来毒素は魚介類だけでなく、海洋微生物やプランクトンなどの微細藻類あるいは海藻にも存在し、食物連鎖により生物濃縮され、それを口にしたヒトに中毒を引き起こします。日本では、主にフグ毒（テトロドトキシン）や二枚貝（牡蠣、ホタテなど）による食中毒が毎年発生し、食品衛生法で規制・管理されています。

本品は、下痢性貝毒として知られるオカダ酸（OA）、及びジノフィシストキシン-1（DTX1）を各 1mg/L（1ppm）混合した標準液です。NMIJ CRM のオカダ酸、及びジノフィシストキシン-1 にトレーサブルであり、二次標準としてご使用頂けます。

〈マリントキシンの分類と毒性成分〉

分類		成分
魚類	フグ毒	テトロドトキシン
	シガテラ毒	シガトキシン(CTX1B・CTX3C)
	その他魚毒	パリトキシン
藍藻類	藍藻類毒	マイクロシチン(LR・RR)
海綿動物	海綿毒	カリクリン A、ミクロライド B
二枚貝	下痢性貝毒	オカダ酸(OA)、ジノフィシストキシン-1(DTX1)

分析測定例



コード No.	品名	規格	容量	希望納入価格(円)
156-03551	OA・DTX1 Mixture Standard Solution (each 1mg/mL Methanol Solution) [F] [国]	食品分析用	2mL	24,000

関連製品

NMIJ CRM

コード No.	メーカーコード	品名	容量	希望納入価格(円)
637-32001	NMIJ CRM 6206-a	Okadaic Acid Standard Solution [F] [国]	1mL	8,775
634-32011	NMIJ CRM 6207-a	Dinophysistoxin-1 Standard Solution [F] [国]	1mL	8,775

下痢性貝毒 原体

コード No.	品名	規格	容量	希望納入価格(円)
152-03271	Okadaic Acid [F]	生化学用	25μg	16,000
158-03273	Okadaic Acid		100μg	46,000
155-03381	Okadaic Acid Sodium Salt [F]	生化学用	100μg	55,100
042-33671	Dinophysistoxin-1 [F]	生化学用	100μg	54,000

不純物確認試験や定量試験に最適な重溶媒

Wako

高純度 NMR 溶媒

本品は、NMR 測定に影響する不純物を低減した NMR 測定用溶媒です。水分と軽水素溶媒以外のシグナル*を認めません。他の溶媒などの不純物を含まず、低水分値を保証しているため医薬品の品質試験や定量 NMR などを実施する際に有用な高純度 NMR 溶媒です。

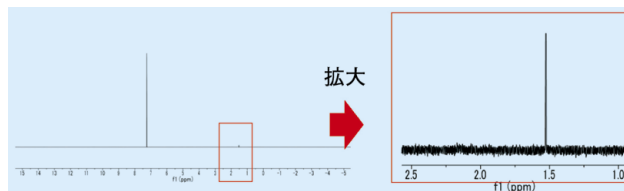
*ベースラインとの強度差が 30% 以上のシグナル

製品規格 クロロホルム-d, 99.8%(高純度)

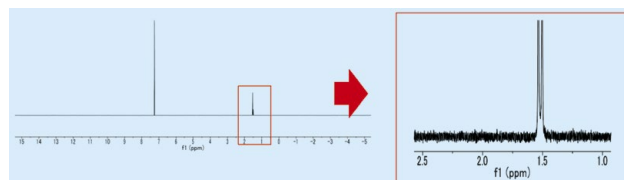
試験項目	規格値
外観	無色澄明の液体
水分	0.003%以下
重水素化率	99.8%以上
含量 (GC)	99.9%以上
不純物 (NMR) (¹ H)	試験適合
不純物 (NMR) (¹³ C)	試験適合
不純物 (NMR) (³¹ P)	試験適合
不純物 (NMR) (¹⁹ F)	試験適合

¹H NMR チャート例 クロロホルム-d, 99.8%(高純度)

当社高純度 NMR 溶媒



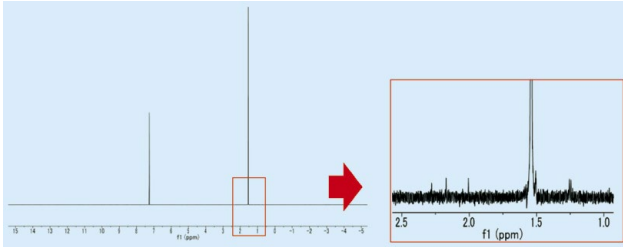
A 社品



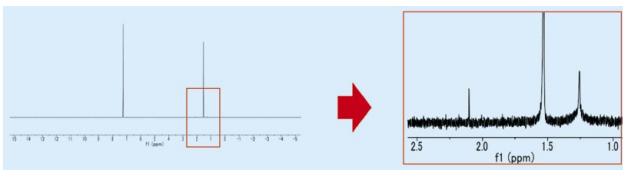
[次頁に続く]

[F]…2～10℃保存 [E]…-20℃保存 [国]…80℃保存 [ISO]…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10月時点での情報です。最新情報は、当社HPをご参照下さい。

B 社品



C 社品



〈各社比較表〉

	当社高純度 NMR 溶媒		A 社品	
	実測値	規格	実測値	規格
水分	0.000% (0.00015%)	0.003%以下	0.005%	0.02%以下
含量 (GC)	100%	99.9%以上	100%	—
不純物 (NMR) (H)	試験適合		備考: 1.49ppm 付近 (水分) 由来のシグナルが大きい	
	B 社品		C 社品	
	実測値	規格	実測値	規格
水分	0.0013%	0.01%以下	0.0015%	0.01%以下
含量 (GC)	100%	99%以上	100%	99%以上
不純物 (NMR) (H)	備考: 1.24, 1.51, 2.00, 2.16, 2.27ppm 付近に不純物ピークを確認		備考: 1.25, 1.51, 2.10ppm 付近に不純物ピークを確認	

コード No.	品名	規格	容量	希望納入価格 (円)
018-27901	Acetonitrile-d ₃ , 99.8% (High purity)	NMR用	1mL×5A	照会
031-25531	Chloroform-d, 99.8% (High purity)	NMR用	1mL×5A	20,000
044-34471	Deuterium Oxide, 99.8% (High purity)	NMR用	1mL×5A	20,000
040-34571	Dichloromethane-d ₂ , 99.8% (High purity)	NMR用	1mL×5A	35,000

品目は順次追加予定です。

農薬・動物用医薬品標準品・混合標準液 カタログ発行!

ポジティブリスト一斉試験法に活用いただける「PL シリーズ」や水道法に対応した「水質シリーズ」など、当社の農薬・動物用医薬品標準品・混合標準液を一冊にまとめたカタログを発行しました。

- 当社の全混合標準液・標準品を収録
- 各混合標準液について、分析例・公定法情報を掲載
- カラムや溶媒などの豊富な関連製品情報
- 成分名・CAS RN[®]と製品の対応リストを掲載



詳細・カタログのご請求はこちら↓
<https://labchem-wako.fujifilm.com/jp/catalog/index.html>



追加品目のお知らせ

ポジティブリスト関連農薬・動物用医薬品標準品

当社では、ポジティブリスト制度の対象となる農薬標準品、動物用医薬品標準品を取扱っています。下記品目を新たに発売しました。

農薬標準品

- アクリナトリン標準品
- アラクロール標準品
- ベンゾエピンスルフェート標準品
- ブタミホス標準品
- カルボフラン標準品
- クロロネブ標準品
- N-2,4-ジメチルフェニルホルムアミド標準品
- フサライド標準品
- インドキサカルブ-MP標準品
- MCPP標準品
- メフェナセット標準品
- メタラキシルM標準品
- 2,4-PA標準品
- プロフェノホス標準品
- ピラジフルミド標準品
- セトキシジムM2-SO₂標準品
- チフルザミド標準品
- トルフェンピラド標準品

動物用医薬品標準品

- モエノマイシンA標準品

Wako

コード No.	品名	規格	容量	希望納入価格 (円)
014-16653	Acrinathrin Standard	残留農薬試験用	100mg	25,000
012-16333	Alachlor Standard	残留農薬試験用	100mg	9,000
026-06763	Benzoepin Sulfate Standard	残留農薬試験用	100mg	20,000
026-10933	Butamifos Standard	残留農薬試験用	100mg	10,000
039-16323	Carbofuran Standard	残留農薬試験用	100mg	10,000
036-14493	Chloroneb Standard	残留農薬試験用	100mg	15,000
048-34491	N-2,4-Dimethylphenylformamide Standard	残留農薬試験用	100mg	20,000
061-01594	Fthalide Standard	残留農薬試験用	100mg	7,000
095-04993	Indoxacarb-MP Standard	残留農薬試験用	100mg	10,000
132-10423	MCPP Standard	残留農薬試験用	100mg	15,000
133-11673	Mefenacet Standard	残留農薬試験用	100mg	12,000
134-15623	Metalaxyl M Standard	残留農薬試験用	100mg	29,000
163-18153	2,4-PA Standard	残留農薬試験用	100mg	6,000
169-17653	Profenofos Standard	残留農薬試験用	100mg	10,000
168-28571	Pyraziflumid Standard	残留農薬試験用	50mg	25,000
190-18781	Sethoxydim M2-SO ₂ Standard	残留農薬試験用	100mg	15,000
204-14774	Thifluzamide Standard	残留農薬試験用	100mg	32,000
209-16843	Tolfenpyrad Standard	残留農薬試験用	100mg	26,000
131-18911	Moenomycin A Standard	高速液体クロマトグラフ用	20mg	45,000

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

試薬事業トップ→分析→食の安全・安心→残留農薬分析(標準品)→ポジティブリスト制度 関連試薬 取り扱い標準品一覧

<https://labchem-wako.fujifilm.com/jp/category/00370.html>

有機溶媒の脱水処理に便利

Wako

ゼオライトパック

ゼオライトは有機溶媒の脱水処理に用いられます。本品は、各重量の合成ゼオライトを不織布で小分けしたゼオライトパックです。不織布に包むことで、ゼオライトの粉末が溶媒に混入するのを防ぎます。使用後は、不織布ごと瓶から取り出せるので、廃棄処理が簡単です。

製品概要

- ゼオライトの粒形は球状
- サイズは3g・10g・50gの3種類
⇒容器のサイズに合わせて選択可能
- 保存袋は吸湿性の低いアルミ袋を採用
- アルミ袋内は脱気
⇒未開封状態での吸湿防止
- 不織布の材質：ポリプロピレン / ポリエチレン



各ゼオライトパックの外観

<サイズ>

- 3g : 60mm × 65mm
- 10g : 120mm × 65mm
- 50g : 120mm × 65mm

コード No.	品名	規格	容量	希望納入価格(円)
NEW 261-02271	Zeolite Packs		3g×20	4,000
NEW 267-02273	[Zeolite Synthetic, A-3, Beads, 1.40~2.36mm (8~12mesh)]	乾燥用	10g×20	6,000
NEW 265-02274			50g×10	7,500

お求めやすい1本販売になりました!

Wako

核酸合成用 反応補助試薬

当社では、核酸合成法であるホスホロアミダイト法に用いられる反応補助試薬を取扱っています。これまで4本単位での販売でしたが、お客様のご要望にお応えして1本単位でお求めいただけるようになりました。小~中量合成の際、便利にお使いいただけます。

コード No.	品名	規格	容量	希望納入価格(円)
デブロッキング試薬				
043-34441	Deblocking Solution [Dichloroacetic Acid-Toluene (3:97)]	核酸合成用	3L	22,000
042-28921	Deblocking Solution-1 (3w/v% Trichloroacetic Acid, Dichloromethane Solution)	核酸合成用	3L	11,000
アクチベーター試薬				
011-19681	Activator Solution-1 (0.25mol/L 4,5-Dicyanoimidazole, Acetonitrile Solution)	核酸合成用	3L	22,000
011-19701	Activator Solution-2 (0.45mol/L 1H-Tetrazole, Acetonitrile Solution)	核酸合成用	3L	25,000
013-20011	Activator Solution-3 (0.25mol/L 5-Benzylthio-1H-tetrazole, Acetonitrile Solution)	核酸合成用	3L	27,000
018-19691	Activator Solution-4 (0.25mol/L 5-Ethylthio-1H-tetrazole, Acetonitrile Solution)	核酸合成用	3L	35,000
キャッピング試薬				
030-19011	Cap A Solution-2 [Tetrahydrofuran/Acetic Anhydride/Pyridine (8:1:1) Solution]	核酸合成用	3L	22,000
037-19021	Cap B Solution-2 (10vol% 1-Methylimidazole/Tetrahydrofuran Solution)	核酸合成用	3L	22,000
031-25391	Cap A Solution [1-Methylimidazole-Acetonitrile (2:8)]	核酸合成用	3L	22,000
034-25381	Cap B1 Solution [Acetic Anhydride-Acetonitrile (4:6)]	核酸合成用	3L	22,000
033-25633	Cap B2 Solution [Pyridine-Acetonitrile (6:4)]	核酸合成用	3L	照会
037-25371	Cap B2 Solution [2,6-Lutidine-Acetonitrile (6:4)]	核酸合成用	3L	25,000
034-25401	Cap B Solution [Acetic Anhydride-2,6-Lutidine-Acetonitrile (2:3:5)]	核酸合成用	3L	29,000
酸化試薬				
156-02451	Oxidizing Solution-2 [0.1mol/L I ₂ -THF:Pyridine:Water (78:20:2) Solution]	核酸合成用	3L	22,000
158-03511	Oxidizing Solution [Iodine Solution (abt. 0.05mol/L)] [Pyridine:Water (9:1)]	核酸合成用	3L	22,000

☐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10月時点での情報です。最新情報は、当社HPをご参照下さい。

アルツハイマー病研究に

Wako

りん酸化Tau T181 ELISAキットワコー

Tau ELISA キットワコー

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。また、脳脊髄液中の Total 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。

当社ではりん酸化Tau (T181) と Total Tau を簡便に測定可能なELISA キットを取扱っています。アルツハイマー病の研究にご活用下さい。

りん酸化Tau測定用

りん酸化Tau T181 ELISAキットワコー

特長

- 少量検体で測定可能
- 高感度

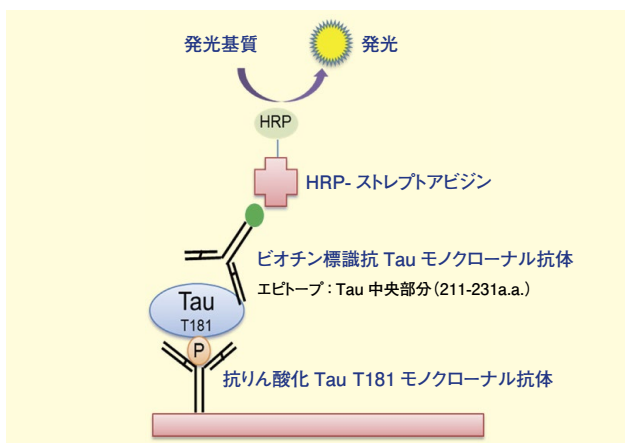
性能

検量線範囲	4.4 ~ 500pg/mL
測定対象	りん酸化Tau T181
検体	ヒト脳脊髄液 (CSF) *1
必要検体量	20 μL ~
測定時間	20時間
検出系	発光系*2

*1 血漿、血清サンプルでの測定不可

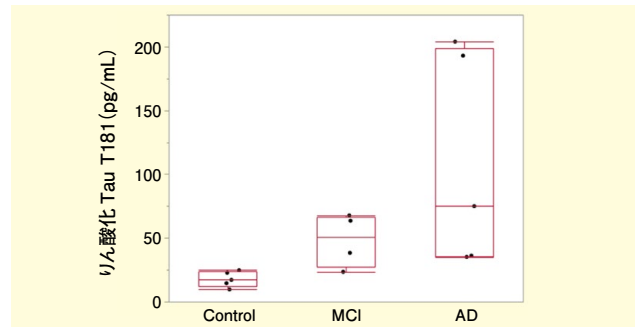
*2 測定には発光プレートリーダーが必要です。

測定原理



データ

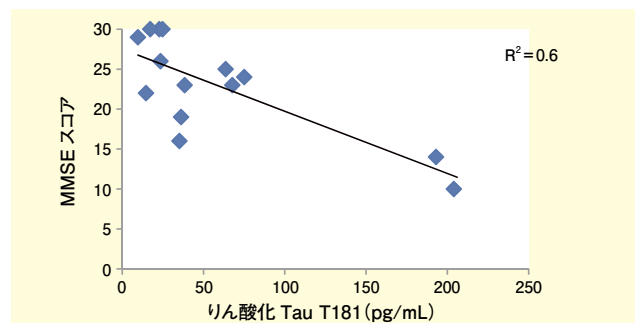
ヒト脳脊髄液での測定



非認知症患者 (Control)、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。

非認知症患者 (Control)、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



本キットで測定した脳脊髄液中のりん酸化Tau T181 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。

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

りん酸化Tau T181 の濃度とMMSEスコアに相関が見られた。

Total Tau測定用

Tau ELISAキットワコー

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
検体	ヒト脳脊髄液 (CSF) *3
必要検体量	10 μL ~ *4
測定時間	3時間
検出法	発光系*5

*3 血漿、血清サンプルでの測定不可

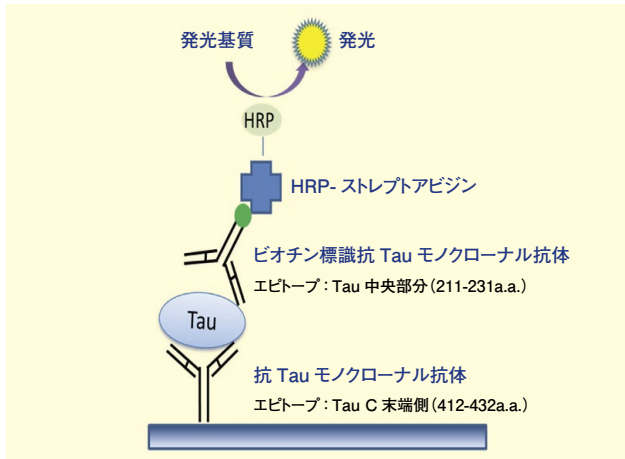
*4 希釈の正確さを考慮して検体量は50 μLを推奨します。

*5 測定には発光プレートリーダーが必要です。

[次頁に続く]

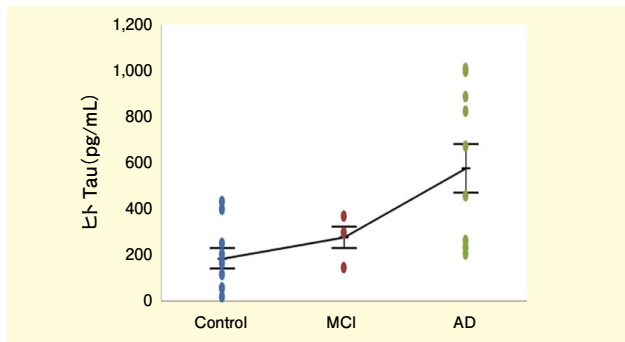
冷蔵: 2 ~ 10°C 保存 冷蔵: 20°C 保存 冷蔵: 80°C 保存 冷蔵: 150°C 保存 表示がない場合は室温保存です。その他の略号は、巻末をご参照下さい。
掲載内容は、2019年10月時点での情報です。最新情報は、当社HPをご参照下さい。

測定原理



データ

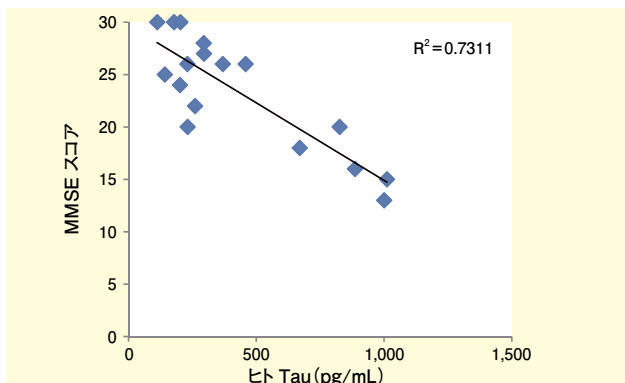
ヒト脳脊髄液での測定



非認知症患者 (Control)、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。

非認知症患者 (Control)、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



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。

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

Tau の濃度と MMSE スコアに相関が見られた。

コード No.	品名	規格	容量	希望納入価格 (円)
298-81701	Phosphorylated Tau T181 ELISA Kit Wako	免疫化学用	96回用	98,000
296-80401	Tau ELISA Kit Wako	免疫化学用	96回用	98,000

関連製品

Tau抗体

コード No.	品名	規格	容量	希望納入価格 (円)
011-26891	Anti Human/Mouse/Rat Tau, Rat Monoclonal Antibody (RTM38)	免疫化学用	10μL	10,000
017-26893	Anti Human/Mouse/Rat Tau, Rat Monoclonal Antibody (RTM38)	免疫化学用	50μL	35,000
019-26951	Anti Human Tau, Rat Monoclonal Antibody (RTM49)	免疫化学用	10μL	10,000
015-26953	Anti Human Tau, Rat Monoclonal Antibody (RTM49)	免疫化学用	50μL	35,000
016-26961	Anti Mouse Tau, Rat Monoclonal Antibody (RTM47)	免疫化学用	10μL	10,000
012-26963	Anti Mouse Tau, Rat Monoclonal Antibody (RTM47)	免疫化学用	50μL	35,000
017-27351	Anti 2N-Tau, Rat Monoclonal Antibody (2C2)	免疫化学用	10μL	10,000
013-27353	Anti 2N-Tau, Rat Monoclonal Antibody (2C2)	免疫化学用	50μL	30,000
012-26583	Anti 3R-Tau, Rat Monoclonal Antibody (2A1-1F4)	免疫化学用	10μL	10,000
016-26581	Anti 3R-Tau, Rat Monoclonal Antibody (2A1-1F4)	免疫化学用	50μL	30,000
019-26593	Anti 4R-Tau, Monoclonal Antibody (3E8-1A6)	免疫化学用	10μL	10,000
013-26591	Anti 4R-Tau, Monoclonal Antibody (3E8-1A6)	免疫化学用	50μL	30,000
012-26603	Anti Phosphorylated Tau T181, Rat Monoclonal Antibody (2E2-A6)	免疫化学用	10μL	10,000
016-26601	Anti Phosphorylated Tau T181, Rat Monoclonal Antibody (2E2-A6)	免疫化学用	50μL	30,000
019-26613	Anti Phosphorylated Tau S199, Rat Monoclonal Antibody (5B8-1E2)	免疫化学用	10μL	10,000
013-26611	Anti Phosphorylated Tau S199, Rat Monoclonal Antibody (5B8-1E2)	免疫化学用	50μL	30,000
014-27121	Anti Phosphorylated Tau S262, Rat Monoclonal Antibody (TIP1-35)	免疫化学用	10μL	10,000
010-27123	Anti Phosphorylated Tau S262, Rat Monoclonal Antibody (TIP1-35)	免疫化学用	50μL	35,000
016-27681	Anti Phosphorylated Tau S422, Monoclonal Antibody (AP422)	免疫化学用	10μL	12,000
012-27683	Anti Phosphorylated Tau S422, Monoclonal Antibody (AP422)	免疫化学用	50μL	50,000

AβオリゴマーELISAキット

コード No.	品名	規格	容量	希望納入価格 (円)
298-80101	High Molecular Amyloid β Oligomer ELISA Kit Wako	免疫化学用	96回用	98,000

神経科学研究用試薬カタログ

アルツハイマー病研究を含む、神経科学研究に関する試薬・機器などをまとめたカタログです。



【掲載内容】

- 透明化試薬・イメージング試薬
- 神経細胞培養関連試薬
- キット
- 抗体
- タンパク質・低分子化合物・ペプチド
- 神経栄養因子・神経新生関連サイトカイン
- キナーゼ
- 生体試料
- 蛍光色素・病理染色試薬
- 機器

当社 HP より、PDF 版をダウンロード頂けます。

神経科学研究用試薬カタログ Wako

検索

Cas9 タンパク質 /gRNA トランスフェクション試薬

ISK 石原産業株式会社

GenomONE®-GE

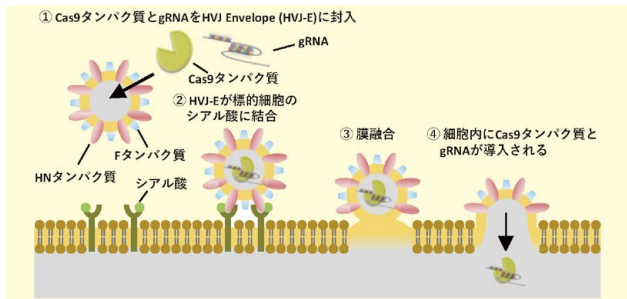
GenomONE®-GE は、Cas9 タンパク質及びガイド RNA (gRNA) を細胞に導入するトランスフェクション試薬です。簡便な操作で Cas9 タンパク質と gRNA を細胞へ導入でき、エレクトロポレーションのように特別な装置は必要ありません。これまでトランスフェクションが困難であった免疫細胞に対しても、高効率で Cas9 タンパク質と gRNA を導入することが可能です。

特長

- 導入が難しい免疫細胞にも Cas9 タンパク質、gRNA の導入が可能
- 試薬の混合と遠心のみの簡便な操作で、短時間に導入ベクターの調製が可能
- ドナー DNA をあわせて使用することでノックインが可能
- バイオセーフティーレベル 1 の実験室で使用可能

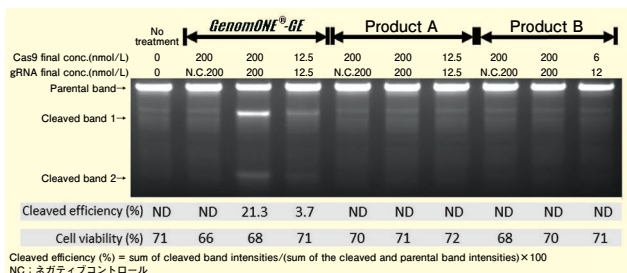
原理

GenomONE®-GE はセンダイウイルスのエンベロープ (HVJ-E) がもつ膜融合能を利用したトランスフェクション試薬です。



使用例

Mouse primary T cellへのCas9タンパク質及びgRNAの導入

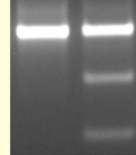


T cell は BALB/c マウスから採取した Splenocytes を PMA/ionomycin で 1 日間刺激後、カラムを用いて分離した。GenomONE®-GE、他社製品 A、他社製品 B を用いて Cas9 タンパク質及び Cyclophilin B 標的 gRNA を導入した。

2 日後、T7 Endonuclease I アッセイでゲノム編集効率を検証した。

Cas9 タンパク質、gRNA、ドナー DNA の導入 (ノックイン)

Cas9 final conc. (nmol/L)	60	60
gRNA final conc. (nmol/L)	60	60
ssODN final conc. (nmol/L)	0	240



Knock-in efficiency (%) N.D. 21

GenomONE®-GE を用いて Cas9 タンパク質、gRNA、制限酵素 BamHI サイトを付加したドナー DNA (ssODN) を HeLa 細胞に導入した。

2 日後、ターゲット遺伝子を含む断片を PCR で増幅後に制限酵素 BamHI 処理したサンプルをアガロースゲル電気泳動にて解析した。

使用可能回数

容量	使用可能回数 (Wells)			
	6wells	24wells	48wells	96wells
1セット	16	65	130	325
4セット	65	260	520	1,300
16セット	260	1,040	2,080	5,200

コード No.	メーカーコード	品名	容量	希望納入価格 (円)
384-15261	GG001	GenomONE®-GE ^{Ref}	1セット	28,000
380-15263	GG004		4セット	75,000
388-15264	GG016		16セット	280,000

関連製品

Cas9 タンパク質

コード No.	品名	メーカー	容量	希望納入価格 (円)
319-08641	Cas9 Nuclease protein NLS (3μg/μL) ^F	ニッポンジーン	75μg	23,000
316-08651	Cas9 Nuclease protein NLS (15μg/μL) ^F	ニッポンジーン	300μg	75,000

gRNA 合成キット

コード No.	品名	メーカー	容量	希望納入価格 (円)
314-08691	CUGA ⁷ gRNA Synthesis Kit ^F ^国	ニッポンジーン	50回用	54,000

T7 Endonuclease Reaction Mix

コード No.	品名	メーカー	容量	希望納入価格 (円)
313-08801	T7 Endonuclease I reaction Mix ^F	ニッポンジーン	50μL	15,000

GenomONE® シリーズ

コード No.	メーカーコード	品名	用途	容量	希望納入価格 (円)
388-15281	GS001	GenomONE®-Si ^{Ref}	in vitro における siRNA/miRNA のトランスフェクションキット	1セット	28,000
384-15283	GS004			4セット	75,000
382-15284	GS016			16セット	280,000
388-15286	GS040			40セット	650,000
385-15291	GX001	GenomONE®-GX ^{Ref}	in vitro におけるプラスミド DNA のトランスフェクションキット	1セット	11,000
381-15293	GX004			4セット	40,000
389-15294	GX016			16セット	150,000
385-15296	GX040			40セット	310,000
381-15271	GN01F	GenomONE®-Neo (FD) ^{Ref}	in vivo におけるプラスミド DNA・siRNA/miRNA・タンパク質のトランスフェクションキット	1セット	20,000
387-15273	GN04F			4セット	60,000
385-15274	GN16F			16セット	195,000
381-15276	GN40F			40セット	440,000
387-15251	CF001	GenomONE®-CF ^{Ref}	細胞融合キット (ハイブリドーマの作製、脱核未受精卵への核移植)	1セット	18,000
383-15253	CF004			4セット	55,000
381-15254	CF016			16セット	190,000

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

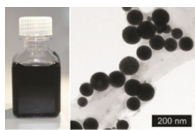
分散性に優れたレーザ製ナノコロイド iMRA

i-colloid[®] シリーズ

輸入元：アイシン精機(株)

貴金属ナノコロイドは、数十ナノメートルの直径を持つ金属微粒子です。その特徴的な色彩と抗体修飾の容易さから、インフルエンザ検査薬などにおいて広く利用されています。通常、貴金属ナノコロイドは化学合成法で作製されますが、界面活性剤や反応副産物などの不純物の混入による分散性の低下が課題であり、また、合金コロイドの作製も困難でした。

i-colloid[®] は、水中の金属板にパルスレーザを照射し、プラズマを発生させることで作製される貴金属ナノコロイドです。界面活性剤、反応副産物などをほとんど含まず高純度なため、表面が清浄で粒子荷電量が大きく、分散性に優れます。このユニークな特性は生体分子修飾に適しており、さまざまなバイオ研究に使用されています。i-colloid[®] は独自技術により粒子径及び光学特性の品質が確保されています。金コロイド及び、視認性に優れた黒色の金-プラチナ合金コロイドを販売しています。



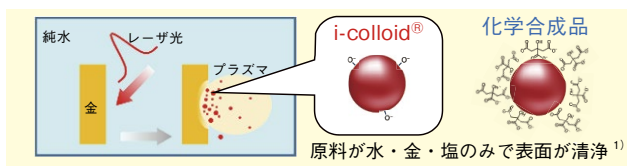
i-colloid[®] AuPt

抗体修飾が容易かつ黒色のためラテラルフローの視認性向上に最適です。また金と併用して多項目検出も可能です。

特長

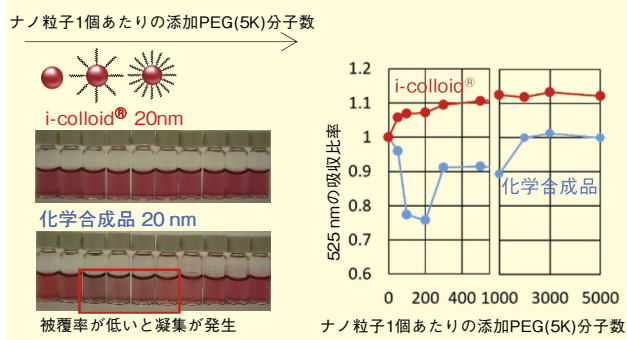
- 化学添加物を含まない
- 高い分散性と分子修飾率
- 制御性の高い表面修飾

製造法



データ

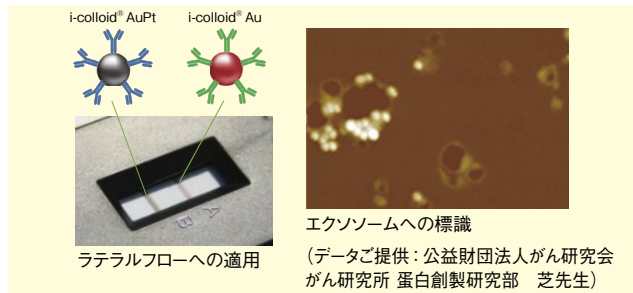
分散性比較



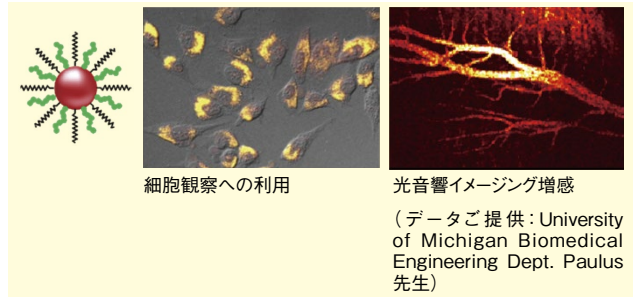
使用例

生体分子修飾コロイド

〈抗体修飾^{*1)}〉



〈PEGとペプチドマルチリガンド修飾^{*1)}〉



*1 修飾プロトコルは <https://nano.imra.com> よりダウンロードして下さい。

【参考文献】

- 1) Qian, W. et al. : *J. Phys. Chem. C*, **115**, 23293 (2011). [分散性比較]
- 2) Cederquist, K. B. et al. : *Colloids Surf. B Biointerfaces*, **149**, 351 (2017). [ラテラルフローへの適用]
- 3) Matsumura, S. et al. : *J. Extracell. Vesicles*, **8**, 1579541 (2019). [エクソソームへの標識]
- 4) Wu, P.-H. et al. : *Int. J. Nanomedicine*, **12**, 5069 (2017). [細胞観察への利用]
- 5) Tian, C. et al. : *Adv. Sci.*, **3**, 1600237 (2016). [光音響イメージング増感]
- 6) Nguyen, V. et al. : *Sci. Rep.*, **9**, 5945 (2019). [光音響イメージング増感]

コードNo.	品名	粒子径	濃度 ²⁾	容量	希望納入価格(円)	
AU20-1-50W	i-colloid [®] Gold Nanoparticles 【i-colloid [®] Au】	20nm	OD1	50mL	22,000	
AU20-1-100W				100mL	33,600	
AU20-5-50W			OD5	50mL	64,000	
AU20-5-100W				100mL	96,000	
AU40-1-50W			40nm	OD1	50mL	22,000
AU40-1-100W					100mL	33,600
AU40-5-50W	OD5	50mL			64,000	
AU40-5-100W		100mL	96,000			
AP40-1-50W	i-colloid [®] Gold-Platinum Nanoparticles 【i-colloid [®] AuPt】	40nm	OD1	50mL	34,000	

*2 Au の場合は吸収が最大となる波長の光 (粒径 20nm : 521 ± 2.5nm、粒径 40nm : 524 ± 2.5nm) が試料 1cm を透過した時の光学濃度 (Optical Density : OD)。AuPt の場合は波長 400nm における試料 1cm 時の OD。

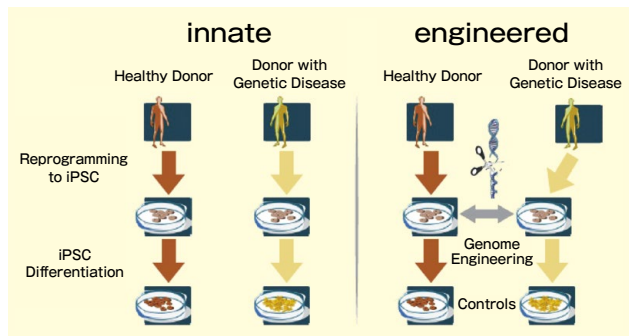
上記以外のデータ、使用例なども多数 IMRA America, Inc の HP に掲載していますので、ご覧下さい。

<https://nano.imra.com>

疾患メカニズム研究・創薬スクリーニング用 ヒト iPS 細胞由来疾患モデル細胞

iCell® DDP (Disease Diversity Products)

本品は、iPS 細胞技術を用い疾患の特徴を *in vitro* (細胞レベル) で再現した細胞です。疾患メカニズムの解明や医薬品候補物質の創薬スクリーニング、薬効評価などの創薬研究におけるさまざまな用途でご利用いただけます。iCell® DDP 製品群は、患者由来 iPS 細胞を樹立後分化誘導する“innate”法、及び、健康人由来 iPS 細胞に疾患や薬剤反応性に関与する変異を遺伝子編集により導入後分化誘導する“engineered”法を用いて作製しています。また、engineered 法を患者由来 iPS 細胞にも適用し、疾患遺伝子変異を修復後分化誘導することで遺伝的背景が同一なコントロール細胞“isogenic”も樹立しています。



iCell® DDP 製品群の iPS 細胞技術：患者由来 iPS 細胞の innate 及び健康人由来 iPS 細胞に疾患遺伝子編集した engineered

特長

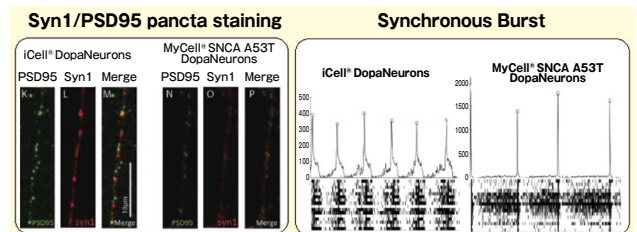
- 疾患の特徴を *in vitro* (細胞レベル) で再現し、創薬研究に適切な研究材料を提供
- “isogenic” コントロール細胞の利用により、遺伝的変異の結果を直接的に研究することが可能
- iCell® DDP のラインアップはパーキンソン病、ALS、アルツハイマー病及び肥大型心筋症をカバー

各 iPS 細胞株のドナー

ドナー情報	01178 株	01279 株	01434 株
性別	女性	男性	女性
年齢層	50-59 歳	55-59 歳	18 歳以下
民族性	Caucasian	Caucasian	Caucasian
組織起源	PBMC	PBMC	線維芽細胞
リプログラミング方法	エピソーマルベクター	エピソーマルベクター	レトロウイルスベクター

使用例

SNCA A53T ドーパミン神経細胞 (engineered 法) の使用例



SNCA A53T ドーパミン神経細胞のシナプス関連タンパク質の syn1 (synaptophysin 1) 及び PSD95 (post synaptic density 95) の陽性シグナルは、コントロールである iCell® DopaNeurons に比べ減少していた。また、SNCA A53T ドーパミン神経細胞の同期バースト発火の回数も減少を示した。

コード No.	メーカーコード	品名	遺伝子型【疾患】	容量(細胞数 / vial)	希望納入価格(円)	コントロール細胞 ^{※2} コード No. (メーカーコード)
遺伝子編集疾患 iPS 細胞由来分化細胞 “engineered”						
ドーパミン神経細胞						
553-34791	C1112	1M MyCell® DNC (SYN A53T) 01279 Cells ^{※1}	SNCA(A53T)【パーキンソン病】	1Vial(≥1.0 × 10 ⁶ cells)	130,000	551-33511 (C1087)
556-34801	C1113	5M MyCell® DNC (SYN A53T) 01279 Cells ^{※1}		1Vial(≥5.0 × 10 ⁶ cells)	457,000	551-33371 (C1028)
心筋細胞						
550-34821	C1153	4M iCell® CMC (CACNA1C G490R) 01434 Cells	CACNA1C(G490R)【心臓不整脈、ブルガダ症候群3】	1Vial(≥4.0 × 10 ⁶ cells)	457,000	552-33301 (C1006)
運動神経細胞						
554-34841	C1160	3M iCell® MNC (SOD1 G93A) 01434 Cells	SOD1(G93A)【筋萎縮性側索硬化症(ALS)】	1Vial(≥3.0 × 10 ⁶ cells)	457,000	-
551-34851	C1161	3M iCell® MNC (TDP43 Q331K) 01279 Cells	TDP43(Q331K)【筋萎縮性側索硬化症(ALS)】	1Vial(≥3.0 × 10 ⁶ cells)	457,000	557-33471 (C1048)
558-34861	C1162	3M iCell® MNC (TDP43 M337V) 01279 Cells	TDP43(M337V)【筋萎縮性側索硬化症(ALS)】	1Vial(≥3.0 × 10 ⁶ cells)	457,000	557-33471 (C1048)
GABA 抑制性神経細胞						
559-34911	C1175	4M iCell® NRC (APOE4/4) 01434 Cells	APOE4/4【APOE4/4対立遺伝子変異アルツハイマー病】	1Vial(≥4.0 × 10 ⁶ cells)	457,000	556-33321 (C1012)
疾患 iPS 細胞由来分化細胞 “innate”						
心筋細胞						
556-34781	C1081	4M MyCell® CMC (MYH7 R403Q) 01178 Cells ^{※1}	MYH7(R403Q)【肥大型心筋症】	1Vial(≥4.0 × 10 ⁶ cells)	457,000	553-34811 (C1119)
遺伝子修復コントロール細胞 “isogenic”						
心筋細胞						
553-34811	C1119	4M MyCell® CMC (MYH7 corR403Q) 01178 Cells ^{※1}	MYH7(corR403Q) 変異を修復	1Vial(≥4.0 × 10 ⁶ cells)	457,000	-

※1 MyCell® は在庫が無くなり次第、品名が iCell® に切り替わります。

※2 コントロール細胞は別売です。

☐¹…2 ~ 10℃保存 ☐²…-20℃保存 ☐³…-80℃保存 ☐⁴…-150℃保存 表示がない場合は室温保存です。その他の略号は、巻末をご参照下さい。
掲載内容は、2019年10月時点での情報です。最新情報は、当社HPをご参照下さい。

セント=ジェルジ・アルベルト (1893.9.16 ~ 1986.10.22)

大阪大学大学院生命機能研究科 仲野 徹

セント=ジェルジ・アルベルトほど波瀾万丈の生涯を送った科学者はいない。ビタミンCの発見によるノーベル生理学・医学賞の受賞と、第二次世界大戦中のスパイ活動でヒトラーに名をあげて罵られたこと。このふたつの出来事だけで十分かもしれない。しかし、それだけではない。研究面では、クエン酸回路発見の直前まで達していたし、アクチンとミオシンによる筋収縮の発見も行っている。さらに、第二次世界大戦直後には、祖国ハンガリーの大統領候補にもなった。いやはや信じられない人生だ。

セント=ジェルジは、1893年にハンガリーのブダペストで生まれた。母方のレノセック家はハンガリーきっての学者一家で、ブダペスト大学の解剖学教授を伯父に持つ。子どものころは成績が悪かったが、ギムナジウムの頃から急速に成績が向上した。医学生になって、「直感的に核心に迫る質問をすることのできる能力」に気づき、「何か偉大な発見ができるのではないか」という自信を持つようになった。

第一次世界大戦に招集されるが、「戦争自体がベテレン師まがいの軍人によって支配され」ていることに我慢ができなくなり、戦線からの離脱を決意する。そのために、自らの左腕に向けて発砲し、戦傷を装った。目的のためには手段を問わない若者であった。

戦争終結後、ポゾニ（現在のブラチスラバ）からプラハ、ベルリン、ハンブルク、ライデン、グローニンゲンへと場所を変えながら研究を行った。そのテーマも、伯父に指導をうけた解剖学から、生理学、物理化学、薬理学と移ろい、最終的には生化学へと至った。ベルリンでは、愛知医科大学（いまの名古屋大学医学部）に職を得る前のミハエリス — 酵素反応速度論のミハエリス・メンテン式のミハエリスだ — とも知遇を得ている。

副腎に還元物質が存在することを発見したセント=ジェルジは、後にノー



図1. セント=ジェルジ・アルベルト（ウィキペディア*から）

* <https://ja.wikipedia.org/wiki/セント=ジェルジ・アルベルト> (2019年7月22日閲覧)

ベル賞を受賞することになるアセチルコリンの同定を行いつつあったヘンリー・デールの研究室に押しかけて還元物質の単離を試みるも失敗。失意のうちに自殺しようとして思い詰める。しかし、最後の思い出にと参加した1926年の国際生理学会議で、これも後に成長促進ビタミンの発見でノーベル賞を受賞するフレデリック・ホプキンスと出会い、ケンブリッジの研究室に参加することになった。

1. ノーベル賞に輝いたビタミンCの発見

困難の末、オレンジジュースから還元物質を抽出・結晶化することに成功し、 $C_6H_8O_6$ の組成を持った弱酸性の炭水化物であることを明らかにする。*Biochemical Journal*に投稿するにあたり、ラテン語の「わからない」を意味するイグノスコと、糖の接尾辞オースから、イグノースと名付けるが、編集主幹のアーサー・ハーデンに軽薄な命名をとがめられた。懲りずに神のみぞ知るゴッドノースとして投稿した

が、適切な名前をつけないと却下するとの怒りの返事をうけるとはめになる。そして、最終的には1928年にヘキサロン酸として発表された。

ケンブリッジから祖国のセゲド大学医化学の教授に就任した1931年の秋、米国ピッツバーグ大学の生化学者、ビタミンCの研究をしていたチャールズ・キングの研究室で経験を積んだジョー・スワーベリが留学してきた。ヘキサロン酸がビタミンCである可能性を考えたこともあったセント=ジェルジであったが、ビタミンのことが好きでなかったため、その方面での研究を行っていなかった。しかし、スワーベリには「これを試してごらん。これはビタミンCだと思うよ」と、ヘキサロン酸の入った小瓶を渡した。

瞬間に研究は進み、その年の暮れには、ヘキサロン酸がビタミンCであることがほぼ確定した。旧師キングとの板挟みになって悩むスワーベリに、セント=ジェルジは「君はキングに手紙を書いて、君の発見を知らせたら良い」と伝える。その手紙をうけとったキングは、大急ぎで“THE CHEMICAL NATURE OF VITAMIN C (ビタミンCの化学的性質)”という論文を*Science*に投稿した。ただし、これはデータなど全く示されてない、ごく短いメモみたいなものであった。

これを知ったセント=ジェルジは「誰が発見しようと、科学にとっては取るに足らない」と言いながらも激怒し、“Hexuronic Acid as the Antiscorbutic Factor (抗壊血病因子としてのヘキサロン酸)”という短報を*Nature*に投稿した。掲載されたのは、キングの論文が1932年の4月1日、わずかに遅れてセント=ジェルジとスワーベリの論文が同16日だった。

このような事情から、ビタミンC発見の先取権争いが勃発する。スワーベリとキングの手紙のやりとりなどから、セント=ジェルジの発見と正しく

Letters to the Editor

The Editor does not hold himself responsible for opinions expressed by his correspondents. Readers can be understood to return, not to correspond with the writers of signed communications intended for this or any other part of NATURE. No notice is taken of anonymous communications.

Hexuronic Acid as the Antiscorbutic Factor

EXPERIMENTS are being carried out in order to decide whether 'hexuronic acid' is the antiscorbutic factor. So far as is known, the distribution of this acid in the animal body is also found in relatively high concentrations in the suprarenal cortex. Its chemical properties closely agree with the known properties of the vitamin. It was discovered and isolated several years ago at the Biochemical Laboratory, Cambridge.

The hexuronic acid used in the present series was prepared in crystalline form from beef suprarenal glands two years ago, at the Chemical Department of the Mayo Clinic.¹ As is known, 1.5 cc. of lemon juice is the minimum protective dose for guinea-pigs against scurvy. This quantity of lemon juice contains approximately 90 mgm. of hexuronic acid. 1 mgm. of the acid has been given to our test animals since coming to the long exposure to air since of all substances used preparations may have been decomposed.

The general procedure used in studying the antiscorbutic activity of hexuronic acid was that recommended by Sherman and co-workers.² The test period in the first experiment consisted of 24 days. At the end of that time the guinea-pigs which had been receiving hexuronic acid, as well as the positive controls which received 1 cc. of lemon juice, were chloroformed. The positive controls showed mild scurvy on autopsy, while the animals receiving hexuronic acid showed no symptoms of scurvy at all. The negative controls which received 1 cc. of distilled water had a severe outbreak of scurvy and had typical symptoms of scurvy. In this experiment, however, only a small number of animals were used and the animals receiving hexuronic acid, as well as the positive controls, were being weight continuously because the basal diet employed at that time consisted on milk powder (it consisted of solid case, butter fat, and salt). For this reason we decided to repeat the experiment.

In the test which is in progress at the present time the diets mentioned above have been modified. A large number of animals has been used, and skinned and weighed before being placed on the diet. The test was composed of the following groups: (1) Negative controls receiving the basal diet only, 9 animals. (2) Positive controls receiving 1 cc. of lemon juice daily, 8 animals. (3) Two animals receiving the basal diet and 1 mgm. of hexuronic acid daily, 10 animals. (4) Controls receiving mixed diet, 10 animals.

The negative controls all died between the time limits of 20-24 days, with an average survival of 22 days after a continuous and big drop of weight. They all had symptoms of severe scurvy.

At the end of 25 days all the animals receiving hexuronic acid, as well as the positive controls which received lemon juice or mixed diet, were being apparently in good health and were gaining weight normally. At the time these animals were chloroformed, all but two animals which received lemon juice were chloroformed. Mild symptoms of scurvy were present

No. 3259, Vol. 129]

in the positive controls with lemon juice, but no signs of scurvy in the animals receiving hexuronic acid. The diet will be continued until the autopsy period is over, and full details will be published later.

This research was supported by the Ellis Lusk Price Foundation.
J. L. SHERMAN,¹
A. SHERMAN-GROSSER,²
Institute of Medical Chemistry,
University of Szeged, Hungary.

At the wish and by the courtesy of Prof. A. Szent-Gyorgyi, I attempted to examine in my laboratory the hexuronic acid which he isolated while working in the Biochemical Laboratory, Cambridge. All the work had been prepared in the chemical laboratory of the Mayo Clinic, Rochester, U.S.A. Owing to the value and scarcity of this material, it has been necessary to carry out each experiment with very small quantities, and to establish with much deliberation and care the experimental conditions and controls. This work is still in progress and is being directed to the elucidation of the constitution and the mechanism of the synthesis of the substance; this has involved the study of its chemical properties, and the formation of a crystalline derivative. The preliminary results now communicated show that the hexuronic acid is most probably the enantiomer of acid in a hexuronic, which does not appear to be related either to D-fructose or to the lactone corresponding to D-glucose. This work has been conducted by my colleague Dr. E. L. Hirst, assisted by Mr. F. W. Reynolds, whose report is given in the accompanying note. W. N. HAWORTH,
University of Birmingham.

The hexuronic acid¹ prepared from suprarenal glands by Prof. Szent-Gyorgyi was a cream-colored microcrystalline powder, m.p. 149-150° (decolor). On recrystallization from methyl alcohol-ether the substance was obtained in irregular aggregates of rectangular crystals, which were almost colorless. No change in the analysis, or other properties was observed even after several successive crystallizations. The crystals showed brilliant colors when observed between crossed nicols in a polarizing microscope. Before and after recrystallization no size analytical figures were obtained (found: C, 41.0; H, 2.7; O, 56.3; requires C, 40.9; H, 4.5 per cent). Neither infrared nor melting-point tests. In aqueous solution the rotation $[\alpha]_D^{20}$ (c. 1) increased slowly to +31° (3 days) and then decreased to zero (14 days).

The hexuronic acid reduced Fehling's solution, formed silver nitrate, and reacted with potassium permanganate in the cold. It gave the Molish test and the orcinol reaction, but failed to show the naphthoresin colour test characteristic of glycuronic acid. Sodium molybdate-sulphate 172 mgm. of substance—only for $\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{17}$ (170).

Microchemical tests for nitrogen, sulphur, phosphorus, and a trace of copper as catalyzed, introduced one carbonyl group in place of a primary alcohol

THE CHEMICAL NATURE OF VITAMIN C

The concentration of vitamin C from lemon juice has been continued in a manner similar to that recently described by Svirbel and King,¹ with the additional procedure of recrystallization from organic solvents (e.g., ethyl acetate + petroleum ether). The recrystallized substance corresponds in chemical and physical properties to a hexuronic acid, and is apparently identical with the hexuronic acid described by Szent-Gyorgyi² and reported as a reducing factor in adrenal cortex, cabbage and other sources. Feeding approximately 0.5 mg daily protects growing guinea-pigs from scurvy and permits normal vitality in the animals when on a vitamin C-free diet. A detailed account of the experimental work will be published in the near future, but this involves only a few steps beyond the work previously published.

As in all such work, there is a possibility that contaminating active material has adhered to the crystals fed, but that seems unlikely, since the maximum activity has reached an approximate constant with recrystallization, and much of our previous work has indicated such a chemical nature for the active factor.

The recent report of isolation and synthesis of vitamin C by Dr. Ottar Rygh³ is not in accord with many of our findings, and we believe his experimental results were misinterpreted. It is perhaps sufficient to point out from his paper: (a) That experimental animals receiving his synthetic o-diphenol derivative of narceotine in addition to their basal vitamin C-free diet survived no longer than those receiving the basal diet only; and (b) That the animals receiving a partial supply of vitamin C in addition to the synthetic compound showed a physiological response not greatly different from that of the group which received only the partial supply of natural vitamin.

C. G. KING
W. A. WAUGHDEPARTMENT OF CHEMISTRY,
UNIVERSITY OF PITTSBURGH

図3. キングのビタミンCについての Science 論文 (文献4)

れたクレブスだが、ホプキンスの助けでケンブリッジにリクルートされ、ついで、シェフィールド大学へと移る。そこで成し遂げたのが、クエン酸回路、別名クレブス回路の発見だ。この成果は1937年に発表され、1953年のノーベル医学生理学賞に輝いている。

じつは、セント=ジェルジはクエン酸回路のほとんどを発見している。クレブスが「この回路を組み立てる個々の知見は数名の研究者の努力によって明らかにされてきた。中でもセント=ジェルジの発見は大きかった」と述べているほどだ。セント=ジェルジは、「細胞呼吸の自己調節的な連鎖経路」を見出していたが、最も重要なことに思いつけなかった。

1924年、セント=ジェルジはすでに細胞呼吸についての論文を出していた。その論文を引用したことが、1926年の国際生理学会議でセント=ジェルジがホプキンスに招かれるきっかけになったのである。その時、ホプキンス

は「水素の受容体、供与体と代わるがわる作用する中間体の存在」を指摘し、セント=ジェルジは、それが生体酸化の本質だと見抜いた。

同時に25もの研究テーマを行っていたというセント=ジェルジである。細胞呼吸の研究も続けていた。鳩胸筋のミンチを使った実験で、呼吸速度は次第に低下するが、少量のコハク酸や

フマル酸を加えると元通りに回復することを見出した。この結果から、コハク酸やフマル酸が触媒であると考えた。ただ、残念ながら、代謝が回路になっているとは想像しなかったのだ。

この話は、ビタミンCのような先取権争いなどではない。セント=ジェルジが先駆者で、クレブスが発見者である。クレブスがセント=ジェルジをはじめとする巨人の肩に乗って大発見を行った、というところだ。おそらく、オルニチン回路の発見のことがあったので、クレブスには「回路」という思考が頭にこびりついていたのだろう。ホプキンスの同門である二人の関係はずっと良好で、セント=ジェルジは「この仕事で、科学者として最高の知的満足味わった」と語っている。

3. 最大の貢献、ミオシンとアクチンによる筋収縮

うまくいっている時は極端に快活であるが、ダメな時は自殺しようとも考える。セント=ジェルジはかなりの躁鬱気質であった。1937年にノーベル生理医学賞を受賞したが、ビタミンCやクエン酸回路以上に魅力的なテーマが見つからず、完全に元気をなくしていた。しかし、そのような状態も長くは続かなかった。

1939年、Natureに掲載された、ミオシンがATPを分解する作用があるという論文を読んで、ミオシンとATPの相互作用が筋収縮の鍵であるとひらめいた。これは論理的な思考の結果ではなく、あくまでも直感であった。セント=ジェルジのこういうとこ

図2. セント=ジェルジのビタミンCについての Nature 論文 (文献3)

認められ、ノーベル医学生理学賞は1937年、セント=ジェルジの単独受賞を発表する。

ビタミンCを大量に含み、セント=ジェルジがその単離に使ったパブリカの歌が作られ、セグドではたいまつ行列ができるほどの大騒ぎになった。一方の米国では、ノーベル賞がひとつ掠られたというように取り上げられた。ただし、当事者の反応はクールで、キングは何も批判がましいことは言わなかったし、セント=ジェルジは「先取権の問題は、後代の人たちによって公平に扱われるべきである」と述べるにとどまった。

2. あと一歩だったクエン酸回路

クレブス・サイクルに名を残すハンス・クレブスはユダヤ系ドイツ人医学者だ。医師免許取得後、カイザー・ウィルヘルム研究所の偉大なる生化学者オットー・ワールブルクの研究室で研究を開始する。四年後に研究室を追い出されてしまうが、フライブルク大学で臨床医をしながら研究を続け、尿素のオルニチン回路を発見する。

ナチスが台頭するドイツで職を追わ

ろは本当にすごい。「これこそ、私たちの生命を理解する道だ」と叫びましたという。そして、その直感はある程度正しかった。

セゲド大学は研究環境に恵まれておらず、コールドルームや分光光度計などもなかった。ATPも市販されておらず、ウサギの筋肉から精製する必要があった。研究は人海戦術で行われた。ミオシン糸を精製し、ATPを加えたところ、顕微鏡下で糸はゆっくりと収縮した。「筋収縮をガラス器内で捕らえた！」発見は、数多くの発見をしたセント＝ジェルジにとって「生涯の中で最大の発見」であった。

女性の実験助手イロナ・バンガがミオシンを抽出せずに一晩放置したところ、溶液がねばねばになっていた。この現象は重要であると、またしてもひらめくセント＝ジェルジ。ねばねばの溶液にATPを加えると粘度が著しく低下した。

そして、この研究はブルーノ・ストラウブにゆだねられた。呼吸酵素の研究をしぼしぼ中断してミオシンの研究を開始したストラウブだったが、粘性の高い溶液には別のタンパク質が存在することを発見する。このタンパク質は、ミオシンに活性 (activity) を与えることから、セント＝ジェルジによってアクチン (actin) と命名され、1942年にストラウブの単名で報告された。

この研究は、セント＝ジェルジの生命科学における最大の貢献とされている。しかし、セント＝ジェルジは満足していなかった。これを生命の本質とまで考えることができなかったのだ。いやはや、レベルが違いすぎる。

4. その後

第二次世界大戦が始まったところから、反ナチの姿勢で政治活動に巻き込まれていく。ハンガリーは親独の立場であったが、時の首相ミクロシュ・カーライは同盟国側との関係も維持し

たかった。その秘密交渉役として、セント＝ジェルジに白羽の矢がたった。そして親書を携え、イスタンブールで英国諜報機関の長官と接触する。

「私の政治活動のピークは、ヒットラーが私の名を大声で怒鳴ったことです」と述懐するセント＝ジェルジ。立派にスパイの役目を果たしたのだ。ハンガリーがソ連によって解放された1945年には、国民的英雄として民主ハンガリー国家の初代大統領と期待されるまでになる。親ソ連だったセント＝ジェルジだが、ハンガリーでの占領ソ連軍の蛮行を目の当たりにし、政治に嫌気がさして研究へと舞い戻る。

しばらくはハンガリーのために働いたが、友人がソ連に捕らえられて国外追放になったことを機に米国への移住を決意する。ウッズホール海洋生物学研究所やNIHで研究を進めたが、それ以後は先の3つに匹敵するような成果はあげていない。

90歳を越えても、「研究できなきや生きてはおれんのだ。だから今、何を研究するかを考えているんだ」と言っていたセント＝ジェルジであったが、1986年に腎不全でなくなった。第二次世界大戦後のセント＝ジェルジには物足りなさを感じないでもないが、それは望みすぎというものだろう。

Discovery consists of seeing what everybody has seen and thinking what nobody has thought. (発見は、誰もが見てきたことを観察すること、誰も思いつかなかったことを考えることによって成立する)

A discovery is said to be an accident meeting a prepared mind. (発見とは準備された心がでくわす偶発事みたいなものだ)

その研究を振り返ると、セント＝ジェルジの残した名言がじつに味わい深く思えてくる。



図4. 『朝からキャビアを 科学者セント＝ジェルジの冒険』(文献1)

この原稿は、参考文献1を元にしており、括弧でくくったコメントはその本からの引用です。ちなみに、その『朝からキャビアを』というタイトルは、第二次世界大戦後にソ連に招かれたセント＝ジェルジは最大級の賓客であったので三食すべてにキャビアが供された、というエピソードに由来します。また、拙著『生命科学者たちのむこうみずな日常と華麗なる研究』(河出文庫)でも、もう少し詳しく紹介していますので、ご参照いただければ幸いです。

【参考文献】

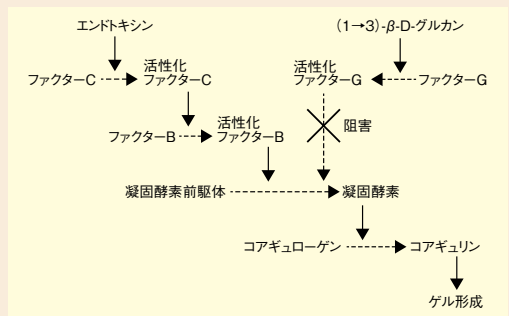
- 1) ラルフ・W・モス著、丸山工作訳：『朝からキャビアを 科学者セント＝ジェルジの冒険』(岩波書店) (1989)。
- 2) Hughes, R. E.: "From ignore to hexuronic acid to vitamin C", *Trends Biochem. Sci.*, **8**, 146 (1983).
- 3) Szent-Gyorgyi, A.: "Hexuronic Acid as the Antiscorbutic Factor", *Nature*, **129**, 943 (1932).
- 4) King, C. G. and Waugh, W. A.: "THE CHEMICAL NATURE OF VITAMIN C", *Science*, **75**, 357 (1932).
- 5) Krebs, H. A.: "The citric acid cycle and the Szent-Gyorgyi cycle in pigeon breast muscle", *Biochem. J.*, **34**, 775 (1940).
- 6) Rall, J. A.: "Generation of life in a test tube: Albert Szent-Gyorgyi, Bruno Strab, and the discovery of actin", *Adv. Physiol. Educ.*, **42**, 277 (2018).

エンドトキシン特異的反応試薬



リムルス ES- II シリーズ PYROSTAR™ ES-F シリーズ

エンドトキシン試験には、カプトガニの血球抽出物から作られるライセート試薬を使用します。試料中にエンドトキシンが含まれる場合、セリンプロテアーゼ前駆体であるファクター C、ファクター B、凝固酵素前駆体が順次、増幅活性化されていきます。最終的にコアギュロゲンが水解されてコアギュリンとなり、不溶性のゲルが形成されますが、試料中に(1→3)-β-D-グルカンが含まれる場合、ファクター G の活性化により、凝陽性反応が生じます。



リムルステストの反応カスケード



リムルス ES- II
シングルテストワークー

ライセート試薬 ES シリーズは、反応系に大過剰の(1→3)-β-D-グルカン (カルボキシメチル化カードラン) を共存させることにより、β-グルカンによるライセート試薬の活性化を阻害し、エンドトキシンを特異的に検出することが可能です。

この度、従来の製品に加え、新たに表示感度 0.03EU/mL、0.25EU/mL をラインアップしました。

特長

- 検体中の(1→3)-β-D-グルカンの影響を受けることなく、エンドトキシンを特異的に検出可能
- ES- II シリーズ：日本薬局方収載「エンドトキシン試験法」に適用
- ES-F シリーズ：米国輸出品目の最終製品試験に適用 (※米国食品医薬品局 (FDA) の認可を取得)
- トキシノメーター® による比濁法では、高感度な検出が可能 (※定量範囲は 0.01 ~ 10EU/mL (表示感度 0.015 の製品の定量下限は 0.0078EU/mL))
- 測定試料の pH の影響を受けにくい、安定したエンドトキシン測定が可能

ES-II シリーズ ■ シングルテスト

コード No.	品名	表示感度 (EU/mL)	規格	容量	希望納入価格 (円)
290-81401	Limulus ES-II Single Test wako 0.03 (CSE付)	0.03	エンドトキシン検出用	25回用	32,000
296-81501	Limulus ES-II Single Test wako 0.25 (CSE付)	0.25	エンドトキシン検出用	25回用	32,000

CSE : Control Standard Endotoxin

■ マルチテスト

コード No.	品名	表示感度 (EU/mL)	規格	容量	希望納入価格 (円)
298-81201	Limulus ES-II Test wako 0.03 (CSE付)	0.03	エンドトキシン検出用	50回用 (5.2mL 用×1本)	31,000
290-51214	Limulus Amebocyte Lysate ES-II, Lyophilized	0.015	エンドトキシン検出用	50回用 (5.2mL 用×1本)	29,000
293-35841	Limulus Amebocyte Lysate ES-II, Lyophilized 0.03	0.03	エンドトキシン検出用	50回用 (5.2mL 用×1本)	26,000
298-35911	Limulus Amebocyte Lysate ES-II, Lyophilized 0.25	0.25	エンドトキシン検出用	50回用 (5.2mL 用×1本)	26,000

ES-F シリーズ ■ シングルテスト

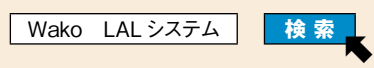
コード No.	品名	表示感度 (EU/mL)	規格	容量	希望納入価格 (円)
292-81601	Limulus Amebocyte Lysate PYROSTAR™ ES-F Single Test 0.03 (CSE付)	0.03	エンドトキシン検出用	25回用	32,000

CSE : Control Standard Endotoxin

■ マルチテスト

コード No.	品名	表示感度 (EU/mL)	規格	容量	希望納入価格 (円)
298-35891	Limulus Amebocyte Lysate PYROSTAR™ ES-F MULTI TEST 0.03	0.03	エンドトキシン検出用	50回用 (5.2mL 用×1本)	26,000
294-81301	Limulus Amebocyte Lysate PYROSTAR™ ES-F MULTI TEST 0.03 with CSE	0.03	エンドトキシン検出用	50回用 (5.2mL 用×1本)	31,000
295-35921	Limulus Amebocyte Lysate PYROSTAR™ ES-F MULTI TEST 0.25	0.25	エンドトキシン検出用	50回用 (5.2mL 用×1本)	26,000

上記新製品以外の製品は、当社 HP をご覧下さい。



Ref... 2 ~ 10℃ 保存 F... -20℃ 保存 C80... 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... II... 毒物 3... III... 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... 化武1... 化学兵器禁止法 第一種指定物質 12... 化武2... 化学兵器禁止法 第二種指定物質 13... カルタヘナ法
 14... 賞せい剤取締法 15... 国民保護法
 掲載内容は、2019年10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. 4
 2019年10月15日発行
 発行責任者 吉井陽市
 編集責任者 大西礼子
 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.fujifilm.com>
 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