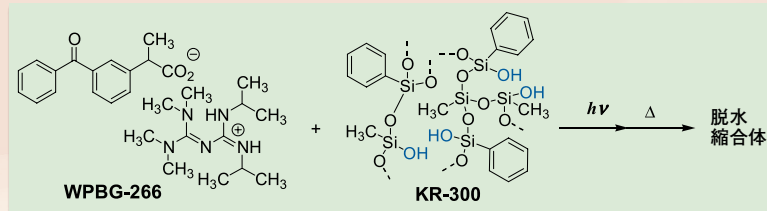


# 和光純薬時報

January 2020  
Vol.88 No.1



WPBG-266 を用いたシラノール含有樹脂の硬化促進

## 【総説】

- 「光塩基発生剤を用いた UV アニオン硬化」 酒井 信彦…………… 2  
 「細胞内に発現する miRNA を検知し、目的の細胞を選別する RNA スイッチ™ 技術」 進 照夫…………… 5

## 〈テクニカルレポート〉

- 「QTOF を用いた水質 LC-MS/MS 対象農薬の一斉分析 (水道法 水質管理目標設定項目 別添方法 20 の 2)」 秋山 愛子、会田 祐司…………… 14

- 「第 35 回 Wako ワークショップ見聞録 ミクログリア研究の最前線 - 基礎から臨床へ -」 河野 敬太…………… 29

## 【連載】

- 〈基礎から応用までよくわかる組織透明化技術〉  
 「第 4 回 骨組織に囲まれた内耳イメージングのための透明化法、Modified Sca/eS」 浦田 真次、岡部 繁男…………… 8

- 〈ペプチド医薬合成基礎講座〉 **最終回**  
 「第 4 回 環状ペプチド合成の新潮流」 佐藤 健太郎…………… 12

- 〈アミノ酸分析 ~新たな潮流~〉 **最終回**  
 「第 5 回 SI トレーサブルなアミノ酸測定に向けた取り組み」 加藤 愛、山崎 太一、井原 俊英…………… 17

- 〈エクソソームと生命現象〉  
 「第 8 回 エクソソームを利用した診断」 植田 幸嗣…………… 20

## 【化学大家】

- 「片山 正夫」 小野 昌弘…………… 32

## 【製品紹介】

<b>有機合成</b>	<b>培 養</b>
光塩基発生剤「WPBG-266、WPBG-300、WPBG-345」… 4	ヒト iPS 細胞 / ヒト iPS 細胞由来心筋細胞の 選別試薬「RNA スイッチ™」…………… 7
ジスルフィド結合形成試薬「Npys-OMe」…………… 13	<b>遺 伝 子</b>
オリゴマーイオン液体「OIL2PF <sub>6</sub> 、OIL4PF <sub>6</sub> 、OIL4TFSI」… 28	MagCapture™ エクソソームアイソレーションキット PS … 22
<b>環境・分析</b>	PS Capture™ エクソソーム ELISA キット(ストレプトアビジン HRP) … 22
農薬混合標準液…………… 16	エクソソーム, COLO201 細胞由来, 精製品 …… 23
アミノ酸混合標準液…………… 19	抗CD9, ラットモノクローナル抗体(30B), ビオチン結合 … 24
局方生薬試験用試薬…………… 27	核酸染色試薬「SAFELOOK™」…………… 25
ポジティブリト関連標準品…………… 27	<b>免 疫</b>
ICP分析用 ジスプロシウム標準液、ユウロピウム標準液… 28	抗Iba1, ヤギポリクローナル抗体…………… 26
水道法対応 JCSS	レビス® ELISA スキルチェック…………… 26
かび臭物質 2 種混合標準液、銀標準液…………… 36	
<b>病 理</b>	
組織透明化試薬「SCALEVIEW®-S」…………… 11	

## 【お知らせ】

- エクソソームガイドブック (Research Product Ver. 2) のご案内…………… 23

### 1 はじめに

光開始剤は、光照射によってさまざまな活性種が発生する化合物群の総称であり、塗料、インキ、接着剤、フォトレジストなど、さまざまな分野で活用されている。光開始剤は発生する活性種によって、①光ラジカル発生剤、②光酸発生剤、③光塩基発生剤（本稿では Photo Base Generator、以下 PBG と省略）に大別される。これらの活性種を用いた UV 硬化のうち、UV ラジカル硬化と UV カチオン硬化は古くから検討されており、迅速に硬化反応が進むことから生産性を高める点で非常に優れている。しかし発生する活性種に起因する問題を種々抱えている。例えば UV ラジカル硬化は、発生するラジカルが空気中の酸素により失活されやすく、UV カチオン硬化は超強酸を活性種とするため、金属材料の周辺に使用した際に腐食が起こる可能性がある。一方で PBG は、UV 照射によってアミンなどの有機塩基を発生する化合物であり、他の光開始剤が抱える問題点を克服しうる新たな材料として注目されている。PBG から発生する塩基は、ラジカルと異なり露光後も活性を維持するため、後硬化を進行させることが可能である。また強酸と異なり金属材料の腐食の心配がない（図1）。

### 2 PBG が得意とする重合系

アクリレートのラジカル重合や強酸を触媒に用いたエポキシのカチオン重合は、同じ種類の官能基が連続的に反応して重合末端が伸長していく連鎖重合系であるのに対し、塩基の場合は官能基が1対1で反応して反応末端が閉じるいわゆる逐次重合系を得意としている。逐次重合には副生成物の生じない付加反応、水やアルコールなどの副生成物が生じる縮合反応がある。付加反応では、求電子種として既に販売さ

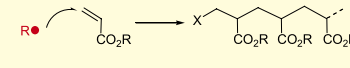
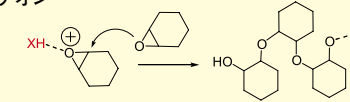
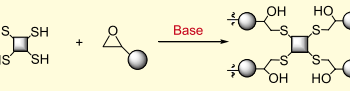
代表的なUV硬化反応	重合阻害要因	UV後硬化	金属腐食
<b>ラジカル</b> 	O <sub>2</sub>	不可	なし
<b>カチオン</b> 	H <sub>2</sub> O	可	あり
<b>アニオン</b> 	なし	可	なし

図1. 光開始剤の比較

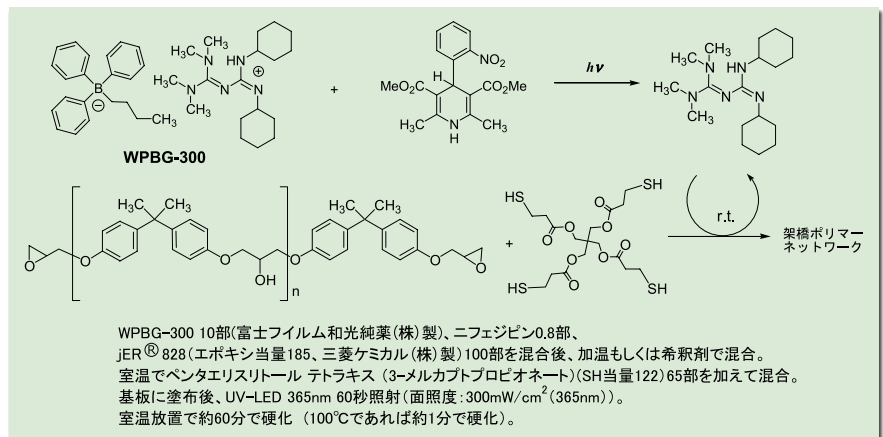


図2. エポキシオリゴマーと多官能チオールによる UV アニオン硬化

れているエポキシ、アクリレート、イソシアネートなどのモノマーを利用することができ、さまざまな求核種を反応させることで、既存の材料に新たな機能を付与することが可能である。一方、縮合反応の代表例としては、シラン含有ポリマーを前駆体として用い、無機骨格であるポリシロキサンを形成する反応が知られている。あらかじめ有機側鎖が導入されているシラン前駆体を用いれば、有機成分と無機成分が均質に混ざり合った有機無機ハイブリッド材料を作製できる。また一部の PBG は、UV 照射によってラジカルと塩基を発生することから、2つの異なった活性種を用いた硬化系も報告されている<sup>1)</sup>。本稿では PBG を用いたさまざまな硬化系や新しい応用例について報告する。

### 3 エポキシ・チオール

エポキシ・チオール中に触媒量の塩基を発生させることで付加反応が促進される。WPBG-300 は、ほう素アニオンで安定化されており、エポキシ中でも安定に存在できる。WPBG-300 自体は、長波長域に吸収帯を有さないが、各種増感剤を併用することで、365nm などの光源にも感光が可能となる。2官能エポキシオリゴマーと4官能チオール中に WPBG-300 と光増感剤のニフェジピンを添加し、基材に塗布したのち UV-LED 365nm を照射することで室温にてゆっくりと硬化が進行する（図2）。エポキシ・チオール系は、硬化物の密着性が優れる点、適度な柔軟性を有する点、硬化に高温・長時間

を必要としない点から UV 後硬化型接着剤としての応用展開が期待されている。種々のパラメータ（露光時間、露光後加熱の有無）によって硬化時間の調整が可能であることから、塗工～貼り合わせに時間を要する部材、被着体が高温に弱いプラスチック、UV を透過しない材料、複雑形状の材料の組み立てに適していると考えられる。

## 4 イソシアネート・チオール

イソシアネート類は、求電子剤としては非常に反応性が高く、チオール化合物と混和後に塩基を発生させると迅速に硬化が進行する。前述の WPBG-300 は、少ない添加量でも硬化が可能であり、UV 照射後、室温 10 分程度で硬化が進行する（図 3）。本組成は必要な原料がすべて試薬レベルで入手可能であり、UV 光源さえあれば、気軽に UV アニオン硬化を試すことができる。ただし本組成は安定性に欠けることから、使用直前の 2 液の混合や保存安定剤（スルホン酸類）の添加及び冷凍保管が必須である。現在、UV クリアコーティングへの応用が検討されている。

## 5 シラノール

アルコキシシリル基を有する化合物の加水分解によって生じるシラノールは、縮合が進行することによってシロキサンとなる。シロキサンは、強固な Si-O-Si 結合で耐候性にも優れることから幅広く応用されている。一般的にシラノールの縮合は、酸触媒では反応速度が遅く、塩基触媒の方が反応速度が速い。シラノール樹脂中に、高高い有機側鎖が含まれると、シラノール同士の重縮合が進みにくくなる。立体的に高高い置換基の付いたシラノールの脱水縮合では、アミンの塩基性が低いと触媒として十分な機能を果たさないため、強塩基を発生する PBG が好

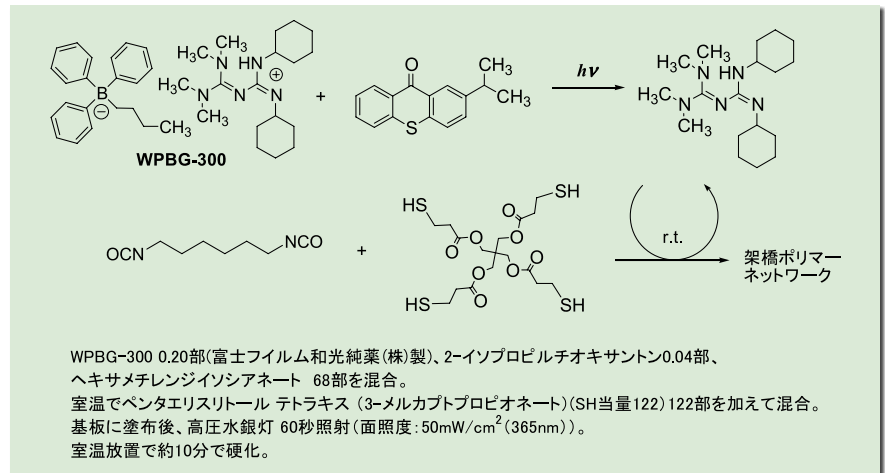


図3. イソシアネートと多官能チオールによる UV アニオン硬化

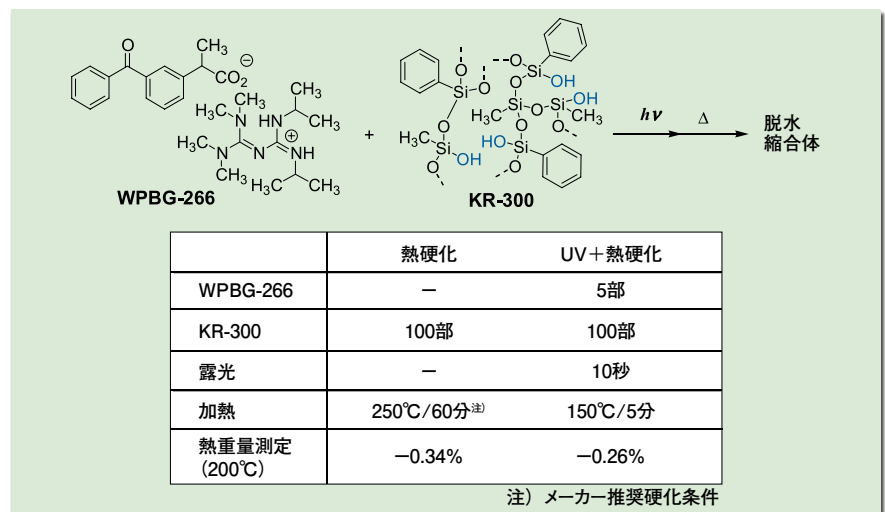


図4. WPBG-266 を用いたシラノール含有樹脂の硬化促進

ましい。メチルフェニルシリコーンレジンである KR-300（信越化学工業(株)製）は、立体的に高高いフェニル基を有するシラノール含有ポリマーであり、完全硬化させる場合、触媒を無添加の状態では 250°C/60 分が必要である。KR-300 に WPBG-266 を加えて露光することで、硬化温度を低下させ、短時間で硬化が可能となる。得られた硬化膜の 200°C における熱重量変化を測定すると、メーカーが推奨する条件で熱硬化させて得られた硬化物とほぼ同等の値であったことから、十分な重縮合が進行していると示唆された（図 4）。

## 6 ビニルスルホン誘導体

ビニルスルホンは優れた求電子体として作用し、さまざまな求核剤と反応する。ビスビニルスルホン誘導体 VS-C は、スルホンとアミドの間に活性プロトンをもつ炭素が存在している。そのため、触媒量の塩基が存在することで VS-C 自体が単独で架橋してゲル化する。分子内に求核種と求電子種が共存しているため当量数を合わせる必要がない。ビニルスルホンはラジカル重合性も有していることから、従来の UV ラジカル硬化系へ添加するこ

とで UV 照射のみでは表面が硬化しにくい系において、表面硬化性を改善できる。本系には UV 照射によってラジカルと塩基が発生する WPBG-266 が使用できる (図5)。また VS-C は、水溶性を有しており水系組成にも適用可能である。

## 7 光潜在化Redoxフロンタル重合

有機過酸化物は、アミンのような還元性のある化合物と反応すると分解してラジカルが発生する。ベンゾイルパーオキシド (BPO) 存在下、PBG から塩基を発生させると酸化還元反応が起こりラジカルが生じる。周囲にアクリレートモノマーが存在するとラジカル重合を開始するが、この際に発生する重合熱によってさらに BPO の分解が進行して、露光部分から未露光部分へと重合界面が移動する「フロンタル重合」が進行する<sup>2)</sup>。通常の UV ラジカル硬化は、UV 照射部分しか硬化しないが、本系であれば影部分や未露光部分の硬化が可能となる。Redox フロンタル重合には WPBG-345 を使用することができる (図6)。

## 8 おわりに

近年では、中国や欧州において PBG を活用した研究が活発化しており、本稿

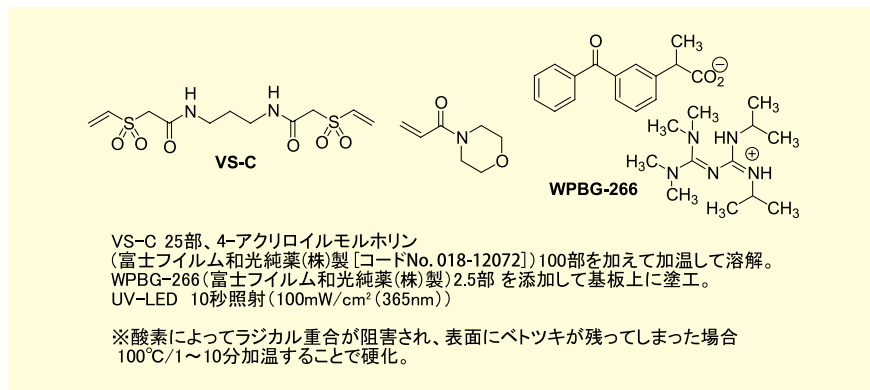


図5. ビスビニルスルホン誘導体 VS-C を用いた UV 硬化

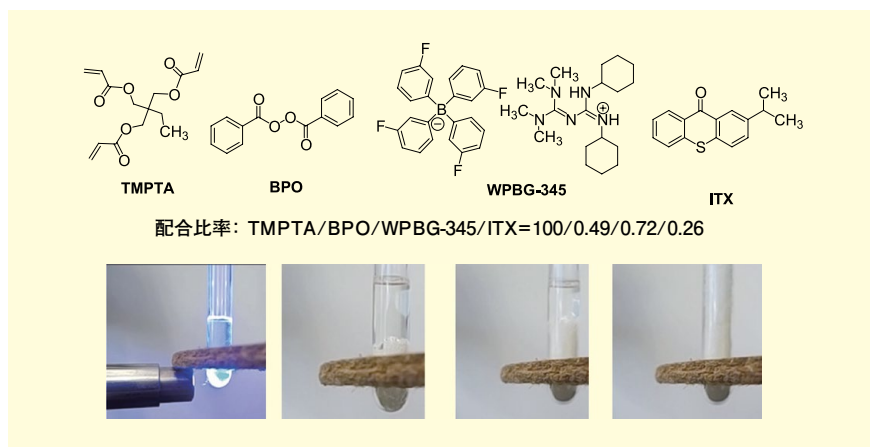


図6. PBG と BPO を用いたアクリレートの光潜在化 Redox フロンタル重合

で紹介した以外にもさまざまな応用事例が開拓されつつある。今後も、新たな PBG の開発を通して、科学技術の振興と学術研究の進展に寄与し、人々の豊かな暮らしに貢献していきたい。

### 【参考文献】

- 1) Shin, J. et al. : *Chem. Mater.*, **22**, 2616 (2010).
- 2) He, M. et al. : *J. Polym. Sci., Part A Polym. Chem.*, **51**, 4515 (2013).

## WPBG-266、WPBG-345、WPBG-300

富士フィルムワコーケミカル株式会社

コード No.	品名	容量	希望納入価格 (円)
355-44341	1,2-Diisopropyl-3-[bis(dimethylamino)methylene]guanidium 2-(3-Benzoylphenyl)propionate 【WPBG-266】	5g	38,000
352-44731	(Z)-[Bis(dimethylamino)methylidene]amino]-N-cyclohexyl(cyclohexylamino)methaniminium Tetrakis(3-fluorophenyl)borate 【WPBG-345】	5g	38,000
352-44351	1,2-Dicyclohexyl-4,4,5,5-tetramethylbiguanidium n-Butyltriphenylborate 【WPBG-300】	5g	38,000

その他の WPBG 製品は、当社 HP をご覧下さい。

試薬事業トップ→合成・材料→高分子重合→光酸・光塩基発生剤→光塩基発生剤『WPBG シリーズ』

<https://labchem-wako.fujifilm.com/jp/category/00203.html>



### はじめに

京都大学 iPS 細胞研究所の齊藤博英教授らが発明した「RNA スイッチ™」技術は、細胞内に存在し、生命現象の様々な作用機序を制御すると言われている miRNA（マイクロ RNA）を検知して、細胞の遺伝子発現を制御することを可能とします。細胞内の miRNA の活性状態を細胞が生きたまま識別できることが大きな特徴の1つであり、この技術により判明した細胞種特異的な活性 miRNA に対応する RNA スイッチ™ を使うことにより、再生医療に用いる心筋細胞など、iPS 細胞/ES 細胞から分化誘導した目的細胞の同定及び選別または疾患に関連する miRNA の探索ツールとしての応用を可能とします。

自殺遺伝子を組み込んだ RNA スイッチ™ では、細胞に導入するだけで特別な機械などを使用せず、迅速かつ簡単に細胞選別を行うことが出来ます。また、蛍光タンパク質遺伝子を組み込んだ RNA スイッチ™ では、蛍光の発光・消失を指標に疾患ターゲット探索に寄与することが期待されます。

### 1 RNA スイッチ™ とは？

RNA スイッチ™ とは、図1に模式的に示したように、「miRNA を認識する配列」と自殺遺伝子や蛍光タンパク質遺伝子などの「マーカー遺伝子」から構成された mRNA（メッセンジャー RNA）を指しています。

RNA スイッチ™ は、タンパク質複合体を形成した活性型の miRNA により、特定の miRNA ナンバーに相応して切断を受けます。miRNA は、細胞内に存在し、生命現象の様々な作用機序を制御すると言われており、データベースで報告されている miRNA の数は、重複を除いて 2,657 種類存在して

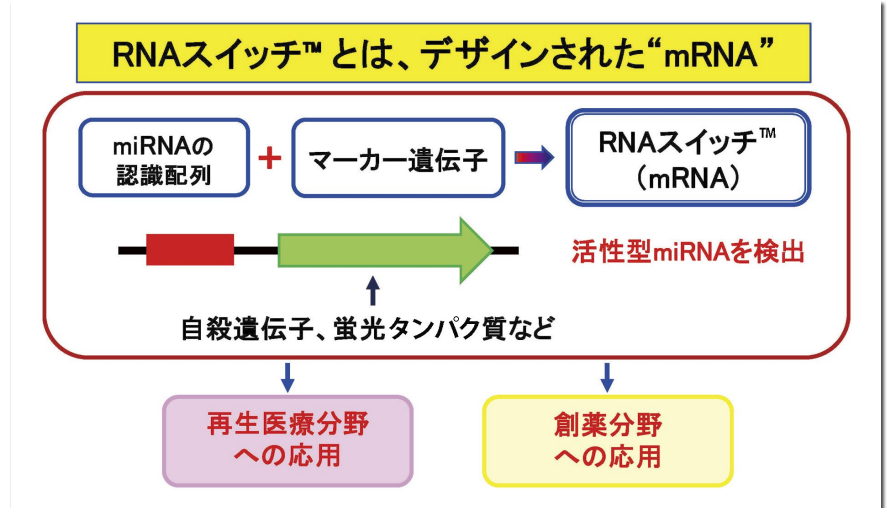


図1.

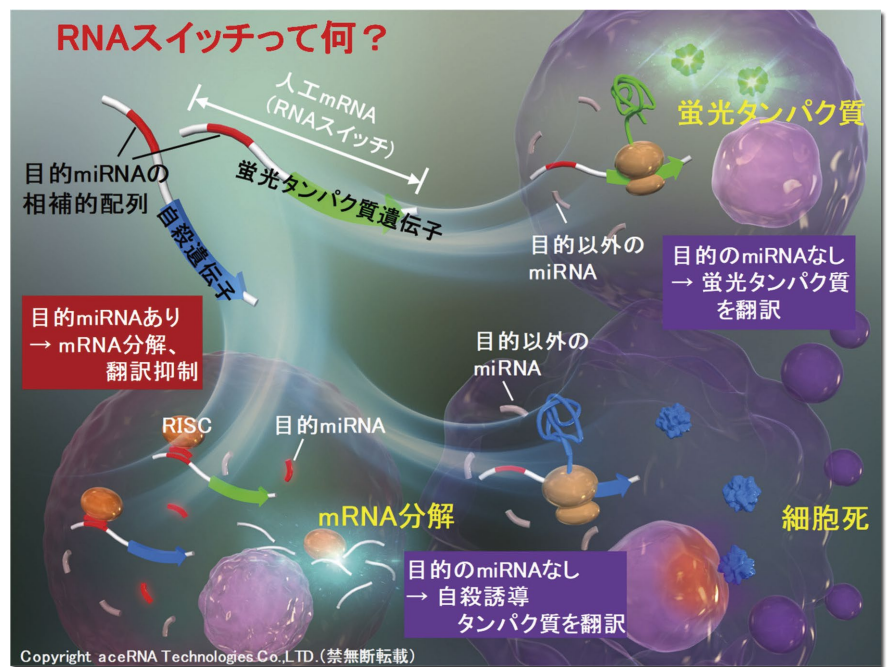


図2.

います(株式会社 aceRNA Technologies でリストアップ)。データベースにある全ての miRNA に対応する RNA スイッチ™ をライブラリーとして準備することにより細胞種毎に特有の活性型 miRNA を検出するツールとして使用することが可能となります。

### 2 RNA スイッチ™ の機序

RNA スイッチ™ は細胞内に導入さ

れた後、目的の miRNA が存在すれば分解されますが、目的の miRNA が存在しなければ、タンパク質が発現し、マーカー遺伝子が蛍光タンパク質の場合は光るとい現象になります。または自殺遺伝子の場合、細胞死という形で細胞の識別・選別が可能となります(図2参照)。

再生医療分野では、RNA スイッチ™ ライブラリーを用いて、細胞の分化状態で特異に発現する miRNA を探索

し、その miRNA をターゲットとした RNA スイッチ™ を使用することで、例えば iPS 細胞/ES 細胞から分化誘導した心筋細胞を純化するために心筋以外の細胞を除去することが可能です。創薬分野への応用としては、疾患の状態で活動している miRNA を探索することで疾患関連の miRNA を検出することも可能となります。

### 3 製品の概要

#### (1) 製品名：RNA スイッチ™ シリーズ (表1)

例えば、iPS 細胞から心筋細胞に分化誘導した際に、分化誘導効率によっては、心筋細胞以外の邪魔な細胞が混入しています。図3のアプリケーションデータでは、RNA スイッチ™ により、心筋細胞に邪魔な細胞が混入している状態から、細胞選別を実施した結果として心筋細胞のみを抽出したことを示しています。

また、Control detector RNA Switch™ を使用することで、目的の細胞への RNA スイッチ™ の導入効率を確認しながら実験を進め、細胞選別を実施することが可能です。

#### (2) 特長

- ・特定の細胞種だけを識別または選別することができる試薬です。第一弾として、心筋細胞用、iPS 細胞用それに関連する製品を販売します。
- ・セルソーターなどの細胞選別する特殊な装置を使用せず、簡便な操作でトランスフェクション効率の確認や細胞選別などを行うことができます。
- ・「RNA スイッチ™」自体は人工の mRNA であるため、細胞への導入により、速やかな遺伝子発現が観察されます。

#### (3) 製品開発の背景

これまでの細胞を選別するための技術では、目的の細胞種を高純度で得るために、細胞表面の抗原を識別する抗

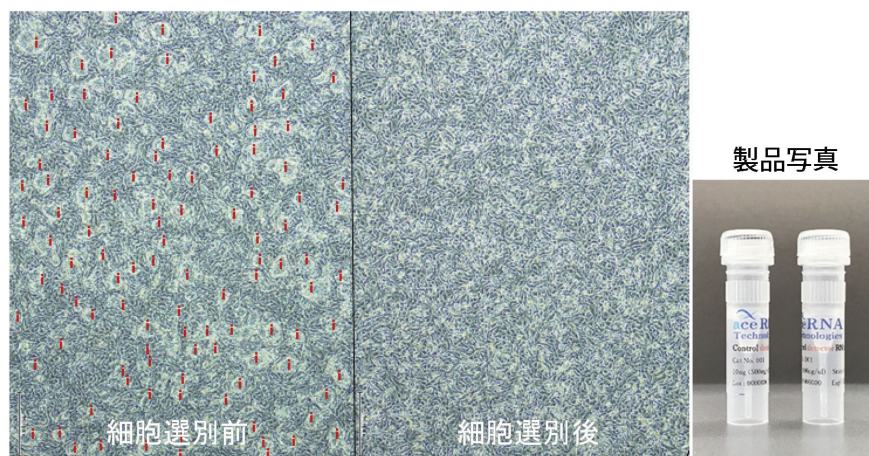


図3. アプリケーションデータ：RNA スイッチ™ による細胞選別の結果  
RNA スイッチ™ による細胞選別の結果；細胞選別前の“i”で示した部分は、除去すべき細胞。RNA スイッチ™ による細胞選別後にはなくなっている。

表1. RNA スイッチ™ シリーズ製品リスト

品名	製品コード	用途
Control detector RNA Switch™	P-0001	検出用コントロール、導入効率の確認
CM detector RNA Switch™	P-0002	検出用（心筋細胞）
iPSC detector RNA Switch™	P-0003	検出用（iPS 細胞）
CM purifier RNA Switch™	P-0004	選別用（心筋細胞）
iPSC eliminator RNA Switch™	P-0006	除去用（iPS 細胞）
puro resistant mRNA™	P-0007	ピュアロマイシン耐性

体を利用したセルソーターなどの装置により選別しています。しかし、適当な表面抗原が同定されていない細胞種も多く、このような細胞を選別することは容易ではありません。京都大学の研究グループでは、細胞内の miRNA を検知することで細胞を識別する方法の開発を試みました。細胞内に発現している多数の miRNA の集団のなかから、心筋細胞に特徴的な miRNA を同定し、人工の mRNA (RNA スイッチ™) を用いて、目的の RNA が存在しない時にだけ蛍光タンパク質が光る仕組みを構築しています。このような研究成果を基に、以下の内容を含んだ RNA スイッチ™ 製品の開発を行いました。

- ・iPS 細胞から分化・誘導した細胞には、未分化状態の細胞も残ってお

り、望まない細胞を形成する可能性があります。その為、分化・誘導後の細胞だけを選別して取得することが課題となります。

- ・再生医療の実現に向けては、細胞選別に膨大な時間とコストが掛かることが予想されます。今後の再生医療の発展の為に、より安価で高効率な細胞選別方法が求められています。

### 4 おわりに

この RNA スイッチ™ 技術は、細胞内に発現する miRNA の活性化の状態を可視化するツールとして使用できます。そのツールをどのような場面で使用するかで、例えば再生医療の分野では、細胞選別・細胞純化に応用が可

能となります。また別の場面では、病態を示す細胞に適用することで、疾患に関連する miRNA 探索することも可能であると思われます。

その他では、例えば薬物を添加する前の細胞の状態をレファレンスに取り、薬物添加後の miRNA 発現状態の変化を捉える手法など、毒性評価や有効性評価にも応用可能であり、今後の miRNA 研究への応用範囲は非常に大きいものと期待されます。この RNA スイッチ™ の製品開発を通して、今後も RNA スイッチ™ 技術の応用研究を推進していきたいと考えています。

#### 【参考文献】

- 1) Miki, K. et al.: *Cell Stem Cell*, **16**, 699 (2015).
- 2) Parr, C. J. et al.: *Sci. Rep.*, **6**, 32532 (2016).



#### RNA スイッチ™

miRNA を認識する配列とマーカー遺伝子からなる mRNA の構造物を指しています。細胞内の活性型 miRNA を検知して、マーカー遺伝子の発現を制御する人工的な mRNA です。認識する miRNA の存在下で遺伝子発現が抑制される「OFF スイッチ」と、活性化される「ON スイッチ」の2種類のスイッチが考えられます。

#### mRNA (メッセンジャー RNA)

遺伝子から読みだされ、タンパク質配列情報と構造を含んだ RNA の配列です。

#### miRNA (マイクロ RNA)

タンパク質発現の制御を通して、分化、細胞増殖、アポトーシスなど生命現象に深く関与しており、生物にとって必須の因子と考えられています。

#### RNA

リボ核酸。リボヌクレオチドがホスホジエステル結合で繋がった核酸であり、mRNA を合成するために必要な要素です。

## Products



### ヒトiPS細胞 / ヒトiPS細胞由来心筋細胞の「選別」・「除去」・「検出」に

#### RNA スイッチ™

コード No.	メーカーコード	品名	用途	容量	希望納入価格(円)
NEW 637-46891	P-0001	Control detector RNA Switch™	検出コントロール、導入効率の確認	9 μg	60,000
NEW 630-46901	P-0002	CM detector RNA Switch™	検出 (心筋細胞)	9 μg	60,000
NEW 637-46911	P-0003	iPSC detector RNA Switch™	検出 (iPS 細胞)	9 μg	60,000
NEW 634-46921	P-0004	CM purifier RNA Switch™	選別 (心筋細胞)	9 μg	60,000
NEW 631-46931	P-0006	iPSC eliminator RNA Switch™	除去 (iPS 細胞)	9 μg	60,000
NEW 638-46941	P-0007	puro resistant mRNA™	ピューロマイシン耐性	9 μg	60,000

#### 〈ご購入の前に〉

本品のご購入に関しては事前に注文内容及び使用条件などを確認させて頂いています。

当社 HP より使用承諾書フォーマットをダウンロード頂き、必要事項をご記入の上、当社担当営業または販売代理店へお渡し下さい。

<https://labchem-wako.fujifilm.com/jp/category/01745.html>

和光純薬 RNA スイッチ 使用承諾書

検索

☑️…2～10℃保存    📦…20℃保存    ❄️…80℃保存    🧊…150℃保存    表示がない場合は室温保存です。その他の略号は、巻末をご参照下さい。  
掲載内容は、2020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4回 骨組織に囲まれた内耳イメージングのための透明化法、Modified Sca/eS

東京大学大学院医学系研究科 浦田 真次、岡部 繁男

### 1. 研究バックグラウンド

本研究の目的は蝸牛全有毛細胞を観察する手法の開発になります。蝸牛は異なる機能を持つ細胞が複雑に配置されて構成される極めて精巧な組織であり、骨包に囲まれているために解析法は限定的でした。従来の蝸牛有毛細胞の組織解析は切片作成や surface preparation による観察が主流でした<sup>1,2)</sup>。しかし、切片作成は蝸牛軸と水平面で行う為、コルチ器から側壁までの観察が可能です但有毛細胞の観察できる領域は極めて限定的でした。一方、幼若マウスの蝸牛の surface preparation では大多数の有毛細胞の観察が可能です剥離される蝸牛側壁の観察は不可能でした<sup>1)</sup>。成体マウスでの surface preparation では成長に伴う蝸牛軸周囲の骨を含めた骨包の骨化によって蝸牛を分割する必要があるだけでなく、断片化された蝸牛の側壁除去を行う際に一部の有毛細胞を犠牲にせざるをえませんでした。さらにライスネル膜と蓋膜の除去処理には側壁処理以上に極めて繊細な手技を要する為、熟練した研究者のみ可能な手法でした。蝸牛正常生理及び病態生理の解明には3次元構造を温存した状態での解析が不可欠であり、「蝸牛の解剖学的制約」と「研究者の手技的制約」を補完する技術開発が必要とされています。

### 2. 内耳を透明化しようとした背景

内耳の蝸牛内にはコルチ器と呼ばれる感覚装置があり、この組織の重要な細胞要素である、有毛細胞と呼ばれる感覚細胞の機能を評価することはヒトの耳の機能を評価する上で極めて重要です。コルチ器には異なった周波数の音に対応して反応する有毛細胞が高い音から低い音に向かって順番に整然と配列しており、これらの多数の細胞全体の空間的なアトラスを作成でき

ば、難聴などの耳の疾患の研究に広く利用することができます。しかしながら、これまでコルチ器の有毛細胞の状態を調べるには組織切片を使って全体の細胞のほんの一部を解析する手法が主に使われてきました。あるいはヒトの手によって微細なコルチ器を複雑な骨の迷路の中から取り出してくる方法もありますが、非常にデリケートなコルチ器を無傷で取り出す事は大変難しく、一般的な解析方法にはなっていません。このような背景から、耳の機能の研究を進展させるには、コルチ器全体を傷を付けない状態でイメージングし、中に存在する有毛細胞を全て検出して、一個一個の細胞レベルでその細胞に障害が起こっているのかを判断する技術が必要だと考えました。

### 3. 内耳の全感覚細胞透明化により得られた新規知見

本研究では、コルチ器に存在する数千個の有毛細胞全てを高い精度で自動的に検出し、一個一個の細胞の障害程度などを評価できる技術が提案されています<sup>3)</sup>。このような解析を実現させるために、新しい技術である組織の透明化手法を骨に囲まれたコルチ器にも応用できるように改良しました。その結果として、組織深部からの蛍光シグナルを検出できる二光子顕微鏡によるイメージングと組み合わせることで、

コルチ器を含む内耳の組織全体の3次元画像を取得できるようになりました。次に得られた3次元画像から自動的に全ての細胞の位置や細胞毎の情報を抽出するためのプログラムを、機械学習の手法を活用して開発しました。これまで人の眼で行っていた一個一個の細胞の同定や計測をプログラムによって自動化することができ、サンプル作成から全細胞データの取得までを5日間で終えることが可能になりました。この自動化プログラムはヒトの眼による有毛細胞の検出や細胞死によって細胞が抜け落ちた部位の同定を代替することが可能で、その正確度や精度も人間による測定と同レベルにありました。新しいコルチ器の細胞アトラス作成法を用いると、加齢や騒音によって引き起こされるコルチ器の障害を短時間で詳細に解析することが可能になり、障害の原因によって異なった細胞死を起こす細胞の空間的な配置に違いがあることもわかりました。またこの方法は細胞を同定するだけでなく、細胞内の構造や特定のタンパク質、有毛細胞が神経細胞と形成するシナプス構造の検出も可能です。解析の応用例の一つとして障害を受けて死んでいく細胞の周囲の細胞にも、細胞骨格レベルでの変化が生じている事が示唆されました。

### 4. 透明化プロトコルとアプリケーションデータ

#### Modified Sca/eS プロトコル<sup>4)</sup>

##### A. 蝸牛摘出

- 4%パラホルムアルデヒド (PFA) による経心灌流を行った後、側頭骨を摘出する。頭蓋底側に露出した三半規管をメルクマールに内耳を同定する [Figure 1A]。骨裂にそって内耳を摘出する [Figure 1B]。摘出された内耳を4%PFAに浸透させて4℃で一晩インキュベートする。
- リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) で15分×3回洗浄を行う。
- エチレンジアミン四酢酸 (EDTA) で37℃で45時間インキュベートする。
- リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) で15分×3回洗浄を行う。
- 内耳周囲に付着している組織を除去する。
- 三半規管と前庭を切り離し、蝸牛を摘出する [Figure 1C,D]。

##### B. 脱脂

Solution 1 に浸透させて37℃で2時間インキュベートする。



C. 免疫組織染色 (GFP 発現サンプルは Skip)

- 0.1% Triton X-100 を含有する PBS (PBST) に置換し 30 分洗浄する。
- 一次抗体を 37°C で 2 時間から 48 時間インキュベートする。
- PBST で 15 分 × 3 回洗浄を行う。
- 二次抗体を 37°C で 12 時間から 48 時間インキュベート後、PBST で 15 分 × 3 回洗浄を行う。

D. サンプル準備

- Blu-Tack を円柱状に形成する [Figure 2 (i)]。  
注 1) 円直径の長さと同様に蝸牛をスライドグラスに置いたときの高さが同じ (もしくは円柱が少々高い程度) にする。
- Basukoku をスライドグラス上に馬蹄形に塗る [Figure 2 (ii)]。
- 馬蹄形に塗布された Basukoku の上に D-a で作成した Blu-Tack をのせる [Figure 2 (iii, iv)]。
- 馬蹄形の Blu-Tack の内側のスライドグラス上に少量の Basukoku を塗布する [Figure 2 (v)]。
- 塗布した Basukoku 上に蝸牛を置く [Figure 2 (vi)]。  
注 2) 全有毛細胞観察の為に蝸牛軸がスライドグラスに垂直であることが望ましい [Figure 3 (次ページに掲載)]。
- Blu-Tack 上にカバーグラスを置き [Figure 2 (vii)]、蝸牛表面に接するまでカバーグラスを圧迫する [Figure 2 (vii-a)]。  
注 3) カバーグラスが蝸牛表面に接したことは目視でも確認できる。カバーグラスの破損を防ぐ為に圧迫する力は均等になるよう慎重に行う。カバーグラスが破

損した場合は新しいスライドグラスを用いて D-a 工程からやり直す。

注 4) サンプルの固定が不十分な場合、イメージングができなくなる場合があるので D-f 工程は極めて重要である。

g. スライドグラスに沿わせて Solution 2 を充填する [Figure 2 (viii)]。

注 5) サンプルが移動する場合は Solution 2 を吸引し D-f 工程からやり直す。

h. Basukoku で密閉する [Figure 2 (ix)]。

注 6) 気泡はイメージングでの視野障害になるだけでなくサンプル保存の際に乾燥する原因となる為、気泡が入らないように注意する。

注 7) Solution 2 浸透後、速やかに透明化が開始する。約 20 分で透明化工程は終了する。自然光では蝸牛輪郭や血管条の色味は残る。スライドグラス後方に指をかざし透視できればイメージングを行う。

試薬調製

A. Solution 1 (20 mL)

- 5.7g グアニジン塩酸塩
- 7g D-ソルビトール
- 3g D-グルコース
- 800 μL (w/v) Triton X-100 含有 PBS (pH 6.0-8.0)

B. Solution 2 (20 mL)

- 5.7g グアニジン塩酸塩 (もしくは 4.8g 尿素)
- 12g D-ソルビトール
- 20 μL Triton X-100 含有 PBS (pH 7.1)

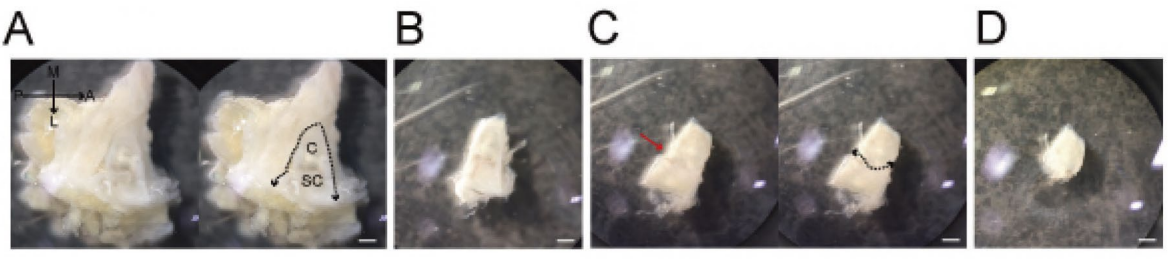


Figure 1. 蝸牛抽出

A: 側頭骨を抽出し頭蓋底を観察すると球状の三半規管 (SC) が観察できる。SC の内側に蝸牛 (C) が存在する。内耳の外周に沿って (点線) 組織の剥離を行い内耳を抽出する。B: 内耳抽出図。C: 蝸牛と三半規管の間の裂隙 (赤矢印) に沿って半割を行い蝸牛を抽出する。D: 蝸牛抽出図。Scale bar: 1mm、使用顕微鏡: Nikon A1MP、使用レンズ: N25X-APO-MP (NA1.10, WD2.00), VC 20x (NA0.75, WD1.00)

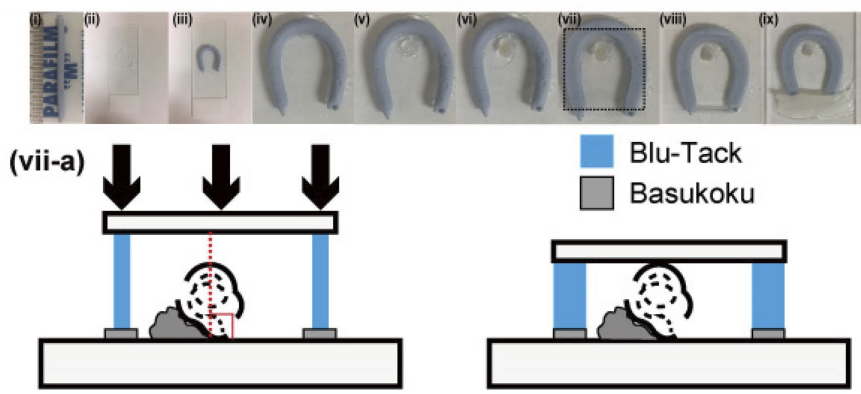


Figure 2. サンプル準備工程

Basukoku を塗布したスライドグラスに Blu-Tack でサンプル高さに合わせて土手を作成し、Basukoku 上にサンプルを静置 [蝸牛軸がスライドグラスに垂直になるよう (vii-a) に] する。次にカバーグラスを静置し蝸牛表面と接着するまで圧迫し Solution 2 を充填し密閉する。使用顕微鏡: Nikon A1MP、使用レンズ: N25X-APO-MP (NA1.10, WD2.00), VC 20x (NA0.75, WD1.00)

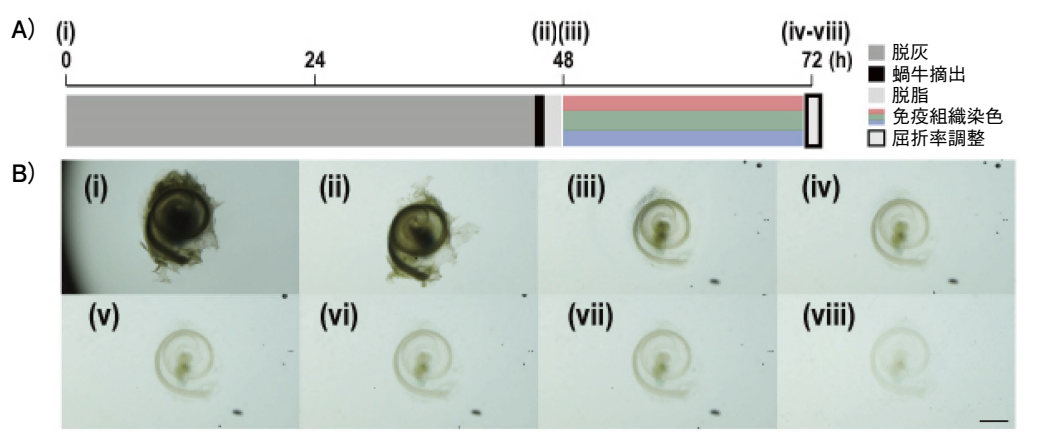
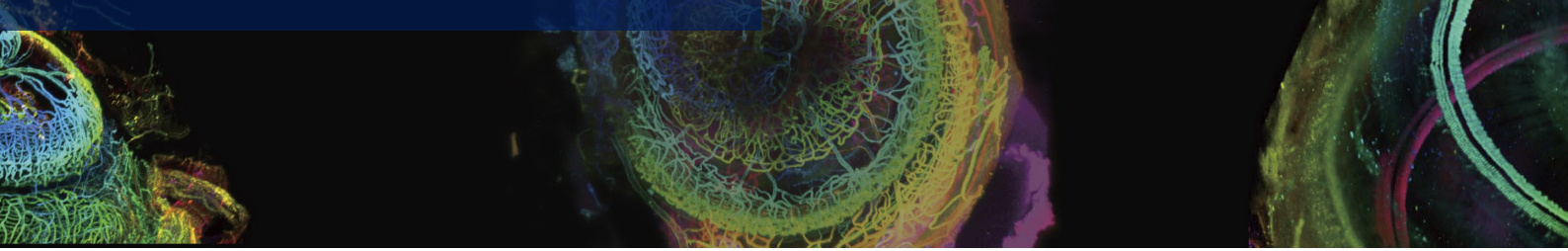


Figure 3. Modified Sca/eS  
 時間変化 (A)、透明性変化 (B)。(iv) から (viii) は Solution 2 浸透後 5 分毎の変化を示す。  
 Scale bar : 1mm、使用顕微鏡:Nikon A1MP、使用レンズ:N25X-APO-MP (NA1.10, WD2.00), VC 20x (NA0.75, WD1.00)

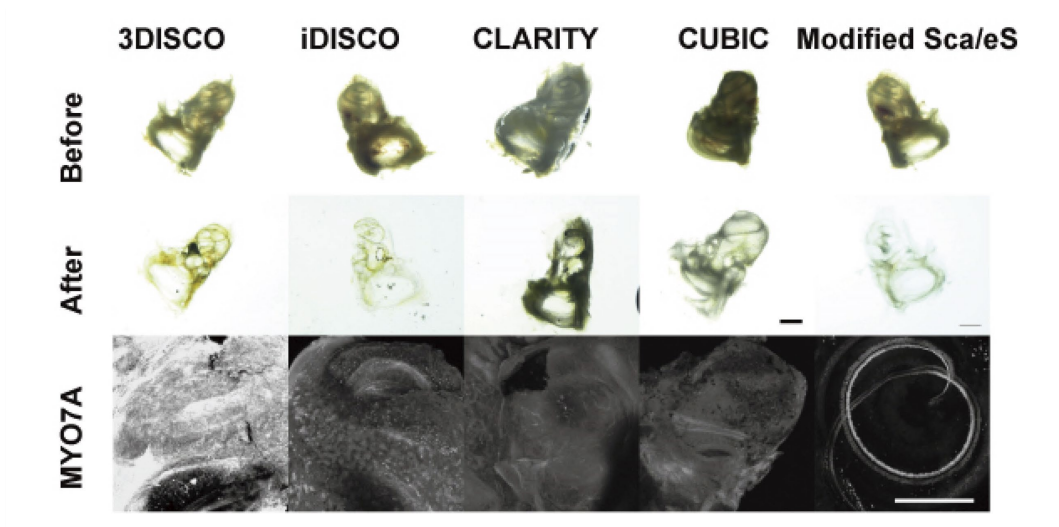


Figure 4. 従来法との比較  
 Modified Sca/eS のみで有毛細胞 (MYO7A) を観察することができる。Scale bar : 500  $\mu$ m、使用顕微鏡 : Nikon A1MP、使用レンズ : N25X-APO-MP (NA1.10, WD2.00), VC 20x (NA0.75, WD1.00)

### 5. 各種透明化技術の比較例 (Figure 4)

従来の透明化手法 (3DISCO<sup>5)</sup>, iDISCO<sup>6)</sup>, CLARITY<sup>7)</sup>, CUBIC<sup>8)</sup>) では蝸牛の透明度は上昇しますが、MYO7A によって標識化された蝸牛有毛細胞を観察することはできません。Modified Sca/eS を用いることでラセン状に配列している有毛細胞群を観察することができるようになりました。

### 6. 透明化技術を用いた今後の展望

本成果により、これまで解析することが困難だった難聴のモデル動物の内耳に起こっている変化を、短時間の内に網羅的かつ一細胞レベルで解析することが可能になりました。難聴を表現型とする疾患動物のモデルは多く存在しますが、これまではコルチ器での有毛細胞の病態を効率良く検出する技術が存在しなかった為に、細胞レベルで

どのような変化が初めに起こるのかはほとんど明らかになっていません。本成果を活用することで、様々な難聴のモデル動物での有毛細胞における初期の変化を特定することが可能です。現在、我々は Modified Sca/eS を用いて有毛細胞以外の蝸牛内細胞群の観察においても有効性があることを見出しています (Figure 5)。様々な難聴モデルマウスでの研究を通じて、乳幼児を悩ます先天性難聴や高齢者を悩ます老人性難聴の病態の解明やそれに基づく



治療戦略の開発が将来的に加速すると期待されます。

【参考文献】

1) Fujimoto, C. *et al.* : *Cell Death Dis.*, **8** (5), e2780 (2017).  
 2) Mizushima, Y. *et al.* : *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **493** (2), 894 (2017).  
 3) Urata, S. *et al.* : *eLife*, **8**, e40946 (2019).  
 4) Urata, S. *et al.* : *Bio-protoc.*, **9** (16), e3342 (2019).  
 5) Ertürk, A. *et al.* : *Nat. Protoc.*, **7** (11), 1983 (2012).  
 6) Renier, N. *et al.* : *Cell*, **159** (4), 896 (2014).  
 7) Chung, K. *et al.* : *Nature*, **497**, 332 (2013).  
 8) Susaki, EA. *et al.* : *Cell*, **157** (3), 726 (2014).

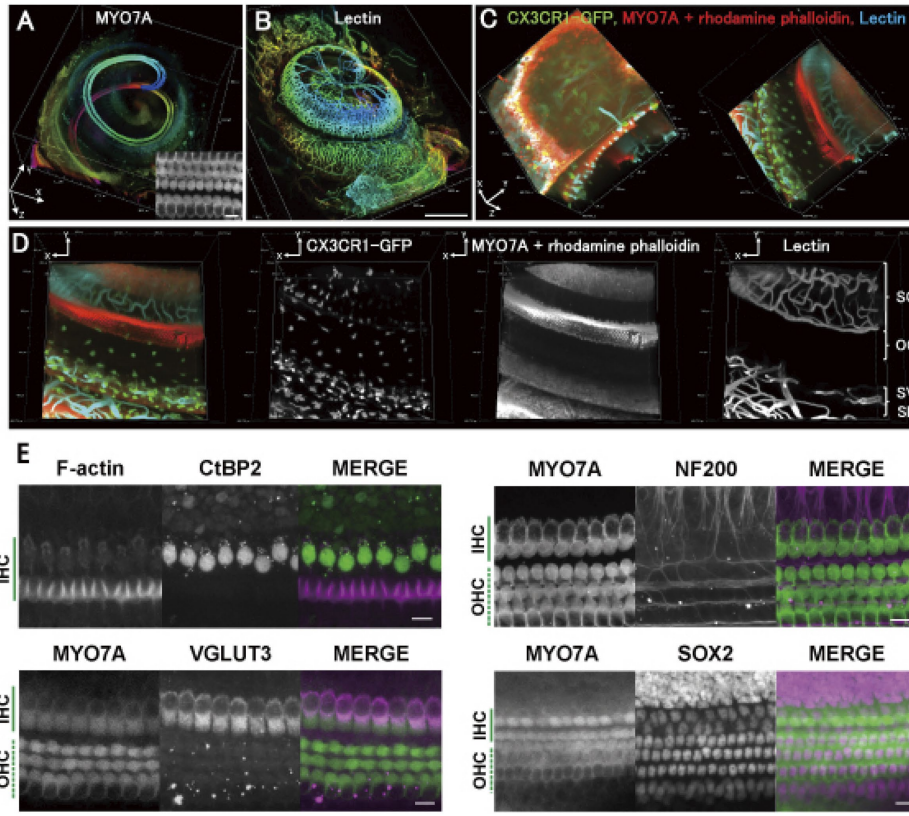


Figure 5. 蝸牛全解析

蝸牛内における有毛細胞 (A)、血管 (B) を観察することができる。蝸牛管 (C) を拡大するとラセン神経節 (SG)、コルチ器 (OC)、血管条 (SV)、ラセン靭帯 (SL) 内の血管、組織マクロファージ (CX3CR1-GFP) を観察することができる (D)。また、リボンシナプス (CtBP2)、ニューロフィラメント (NF200)、グルタミン酸トランスポーター (VGLUT3)、支持細胞核 (SOX2) などの免疫染色も可能である。使用顕微鏡：Nikon A1MP、使用レンズ：N25X-APO-MP (NA1.10, WD2.00), VC 20x (NA0.75, WD1.00)

関連製品

組織透明化技術は、Modified ScaleSのように論文発表された方法をベースに用途に合わせた技術開発や応用方法が多数報告されています。当社の組織透明化試薬 SCALEVIEW-S も同様に、用途に合わせた応用が可能です。

Wako

SCALEVIEW<sup>®</sup>-S

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
196-18521	SCALEVIEW-S0	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
041-34425	deScale Solution	組織透明化用	500mL	12,000

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

当社では、さまざまなタイプの透明化試薬をラインアップしています。

富士フイルム和光純薬 透明化

検索

詳細は当社HPをご覧ください。

☑️…2~10℃保存    Ⓕ…-20℃保存    ☑️…-80℃保存    ☑️…-150℃保存    表示がない場合は室温保存です。その他の略号は、巻末をご参照下さい。掲載内容は、2020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4回 環状ペプチド合成の新潮流

サイエンスライター 佐藤 健太郎

### 注目を受ける環状ペプチド

本連載の第1回で述べた通り、ペプチド医薬の可能性が改めて注目されている。低分子合成医薬は低コストかつ経口投与が可能であるなど多くの利点を持つが、昨今行き詰まりを指摘されている。また抗体医薬をはじめとしたバイオ医薬は製造コストが高くつき、経口投与は不可能である上、巨大分子であるタンパク質は細胞内に入り込めないことなどから、適用可能な疾患は限られている。ペプチド医薬が期待されるのは、この両者の「いいとこ取り」ができると考えられるためだ。

ただしペプチドとてアミノ酸が連結してできている以上、胃酸や消化酵素の攻撃で分解されてしまうことや、細胞膜の透過性が悪いといった問題は、タンパク質と変わらない。しかし、免疫抑制剤として用いられるシクロスポリンは、ペプチド骨格でありながらこれらの問題点をクリアし、経口投与で利用可能な医薬品となっている。

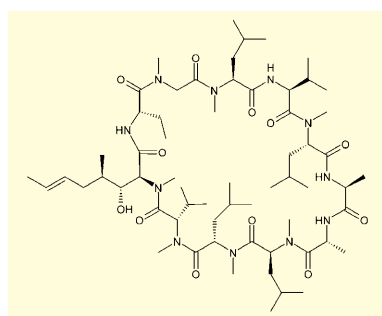


図1. シクロスポリン

これは、シクロスポリンがペプチドとしては特殊な構造を持つためだ。シクロスポリンは11のアミノ酸が環状骨格を成しており、*N*-メチル

アミノ酸やD-アミノ酸など、通常のタンパク質には含まれないアミノ酸を多く含有する。このため消化酵素にペプチドと認識されにくく、攻撃を受け付けない。また、環状のしっかりした骨格で、*N*-メチル基によって脂溶性も上がっていることから、膜透過性が改善されると考えられる。

ただしこうしたペプチドは、合成難度が高いという問題がある。*N*-メチルアミノ酸は反応性が低く、通常的手法ではカップリングの効率が低下する。それ以上に問題なのは大環状骨格の形成で、有機合成の手法が大いに進んだ現代においても極めて厄介な問題として残されている。長い直鎖状の前駆体の両端が出合い、望み通りに反応する確率は低く、多量化が起りやすくなる。これを防ぐためには、溶媒を多量に用いて環化を行う(高度希釈法)必要がある。こうした事情のため、環状ペプチド骨格を持った化合物の合成は長時間・高コスト及び高い技術を要し、スクリーニングサンプルとして多数の化合物を供給するのは難しいと考えられてきた。

### フレキシザイムによる環状ペプチド合成

こうした常識を覆し、多種多様な環状ペプチドの供給を可能にしたのが、菅裕明・東京大学教授らの開発した一連の技術だ。その手法は、既存のペプチド合成やタンパク質発現技術な

どとは全く異なる、極めて独創性の高いものだ。

よく知られている通り、DNAの持つ遺伝情報は3塩基が1組となり、1つのアミノ酸に対応している。この情報がmRNAに写し取られ、リボソームにおいて対応するタンパク質が合成される。この時、タンパク質の原料となるアミノ酸はtRNAに結合する形で運ばれ、リボソームにおいて連結されてゆく。

昔らは、人工的に「進化」させることで創り出したRNA触媒「フレキシザイム」を用い、tRNAに任意のアミノ酸を導入することに成功した<sup>1)</sup>。このtRNAを用いれば、天然の20種のアミノ酸に限らない、多様なアミノ酸(*N*-メチルアミノ酸やβ-アミノ酸を含む)を連結させることが可能になる。いわば、自然が創り出したタンパク質合成システムを改造してしまうことで、好きなアミノ酸鎖を合成するという手法だ。

ただしこれだけでは、単に珍しいアミノ酸を含んだ直鎖状ペプチドが得られるに過ぎない。そこで昔らは、*N*-クロロアセチルアミノ酸とシステインを導入する手法を考案した。両官能基は自発的に反応し、大環状骨格を持ったペプチドを与える。また、アルキン部位を持ったアミノ酸と、アジド基を持ったアミノ酸を導入することで、いわゆるクリック反応で環化を行うことも可能である。

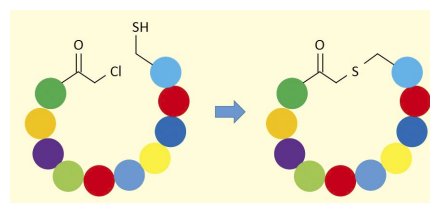


図2. クロロアセチル基とシステイン残基間の環化反応

またこの両者を併用することで、二環性骨格のペプチドの合成にも成功している。抗がん剤ロミデプシンなど、天然の生理活性物質に二環性骨格のペプチドが多く存在していることを考えれば、この手法は有用であろう。

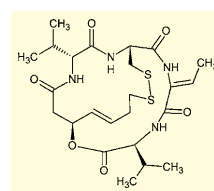
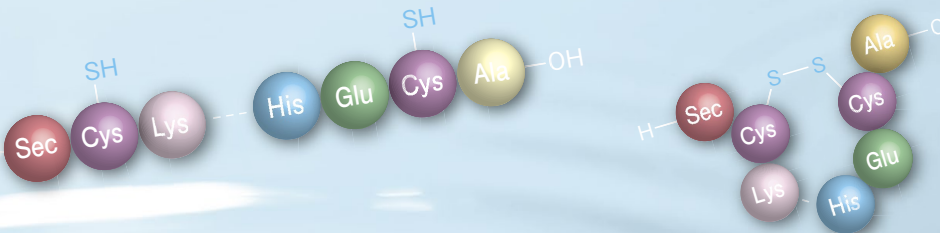


図3. ロミデプシン

ランダムな配列のDNAを多数用意すれば、これに対応した多様な環状ペプチドを一挙に作り出し、ライブラリを構築することができる。昔らはこうしたシステムを整備し、標的タンパク質に対して高い活性を示すペプチドを、素早く創出する強力な創薬プラットフォームを築き上げた<sup>2)</sup>。この技術をもとに設立されたバイオベンチャーであるペプチドリーム社は、内外の製薬企業と提携を進め、注目を集める存在となっている。

こうして得られたペプチドは、抗体に匹敵する基質特異性を示すものもあり、医薬候補化合物として十分な活性を示す。タンパク質間相互作用(PPI)の阻害など、合成低分子では難しい標的も、環状ペプチドでは対象になりうる。また、薬理作用を持った低分子を、標的タンパク質に親和性を持った環状ペ





チドと結合させ、標的に送り込む「ペプチド-医薬複合体」(PDC)などの手法も研究されている。

### 環状ペプチドの化学合成

こうした生化学的手法でなく、化学合成による環状ペプチドの合成も、もちろん数多く研究されている。前述の通り、大環状骨格を形成するには、分子間反応を防ぐために高度希釈法を用いる必要があり、この点がネックとなる。

そこで、ペプチドの側鎖部分を担体に結合させた後に必要なアミノ酸鎖を伸ばし、環化させた上で切り出す手法が試されている。ポリマーに担持させた状態で環化を行うため、二量化を防ぐことができるという考えだ。たとえばNicolasらは、固相上でPyBOP-HOAtによる環化反応を行い、環状ペプチドをほぼ定量的に得ることに成功している<sup>3)</sup>。

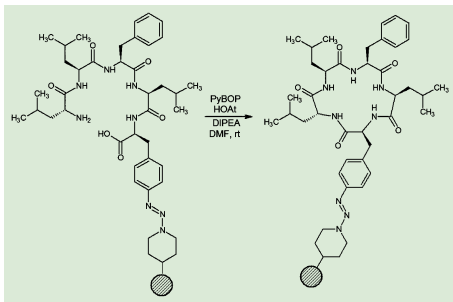


図4. 固相上でのペプチド環化反応

ただしこの方法では反応性が十分でなく、液相での高度希釈法の方がよい結果を与えるケースも少なくない。たとえばMalesevicらは、固相上での環化反応と、高度希釈法による液相での環化反応を比較し、前者が収率1%であったのに対し、後者では収率が36%であったケースを報告している<sup>4)</sup>。固相でも液相でも、環化の際に両端の反応点が近づくコンホメーションを取りうるか否かが重要と考えられる。

千葉らは、脂溶性タグを取りつけたペプチドが、THFなどの溶媒にはよく溶けるものの、高極性溶媒では沈殿してくることを利用し、効率的なペプチド合成技術 (molecular hiving) を編み出している。この脂溶性タグは環化反応においても有効に働く。たとえばアミド窒素に対してタグを導入したヘプタペプチドは、低極性溶媒中でペプチド鎖部分が折り畳まれて、環化に有利なコンホメーションとなる。このため、ペプチドが20 mMという比較的高濃度で反応を行っているにもかかわらず、収率よく環化反応が進行する<sup>5)</sup>。タグの存在により、この後の精製操

作も簡便であり、トリフルオロ酢酸による処理でタグの除去も容易である。

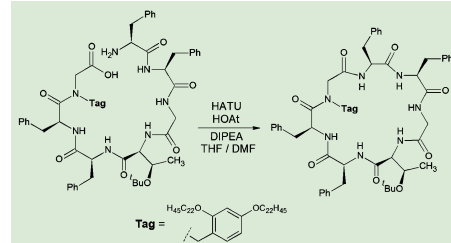


図5. 脂溶性タグを活用した環化反応

大環状ペプチドはアミド結合のみで形成されるものでなく、シスチン結合のように側鎖を介した骨格のものも多数知られている。こうした骨格を、できるだけ簡便に構築しようという試みもなされている。たとえばKaleらのグループは、無保護のN末端アミノ基及びシステイン残基を持ったペプチドに対し、各種のビス求電子剤を作用させることで、効率よく大環状骨格を構築できることを報告している<sup>6)</sup>。

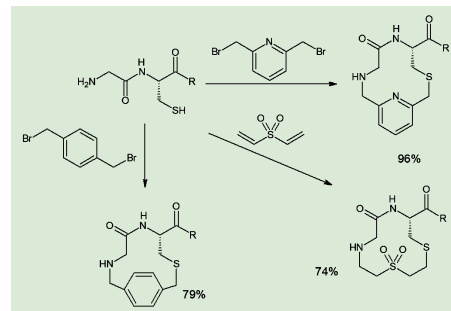


図6. ビス求電子剤による環化反応

ペプチド側、求電子剤側とも多様な化合物が適用可能であり、反応条件も比較的容易なものであるため、ライブラリ構築も可能である。また、合成された化合物の中から、プロテアーゼの一種であるトロンビンの阻害剤が見つまっているなど、医薬候補化合物としてのポテンシャルを備えた骨格といえよう。

その他、ネイティブケミカルライゲーション法を環化反応に適用する方法など、多くの手法が研究されている。環状ペプチドの医薬としての応用が注目を集めると同時に、その合成法も大いに進歩しており、今後さらに新たな手法が出てくるであろう。

### 【参考文献】

- 1) Ohuchi, M. *et al.* : *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **11**, 537 (2007).
- 2) 小嶋達矢 他: *生物物理*, **52**, 4 (2012).
- 3) Torres-Garcia, C. *et al.* : *J. Org. Chem.*, **79** (23), 11409 (2014).
- 4) Malesevic, M. *et al.* : *J. Biotechnol.*, **112**, 73 (2004).
- 5) Fujita, Y. *et al.* : *Org. Lett.*, **15**, 1155 (2013).
- 6) Kale, S. S. *et al.* : *Sci. Adv.*, **5**, eaaw2851 (2019).

## ジスルフィド結合形成試薬

Wako

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

## QTOF を用いた水質 LC-MS/MS 対象農薬の一斉分析 (水道法 水質管理目標設定項目 別添方法 20 の 2)

SCIEX アプリケーションサポート部 秋山 愛子、会田 祐司

### ◆はじめに

水道水の安全管理のため、多種多様な検査が日々実施されている。その中には、水道法による水質基準を始め、水質管理上留意すべき項目として水質管理目標設定項目、さらには毒性評価が定まらない物質や水道水中での検出実態が明らかでない項目が要検討項目と位置づけられている。水質管理目標設定項目として測定・評価されている農薬類（水質管理目標設定項目 15）のうち、固相抽出による前処理後に GC-MS や LC-MS で測定を行っている農薬が、平成 30 年 3 月 28 日改訂の別添方法 20 の 2、LC-MS/MS による一斉分析法へ測定対象農薬として追加された。これら農薬類の測定には、トリプル四重極質量分析計（QqQ）である LC-MS/MS を用いた MRM 測定が広く実施されている。MRM 測定の場合、対象化合物ごとに測定条件を予め作成する必要があるため、それら対象化合物以外の物質は測定することができない。一方、同じ液体クロマトグラフィー質量分析計の 1 つである四重極飛行時間型質量分析計（QTOF）の LC-QTOF

を用いた測定においては、事前の条件検討を必要とせず、且つ対象外の化合物の測定も可能である。また、QTOF の特長である高分解能測定により、バックグラウンドの低減による高感度化も期待できる。今回、QTOF である SCIEX X500R QTOF システムを用いて、別添方法 20 の 2 に検査法が定められている農薬類の一斉分析の検討を行った。

### ◆SWATH<sup>®</sup> Acquisition について

ノンターゲット分析で使用されるデータ依存的プロダクトイオンスペクトル取得（Data Dependent Acquisition: DDA）では、微量成分を取り逃す事例が報告されている。一方、ターゲット分析に使用される MRM は選択性が高い反面、ノンターゲット分析や網羅的な解析を行うことが難しい。そこで今回の検討では、従来型のデータ取得に代わり、微量成分の取り逃しを極力減らした包括的な分析が可能なデータ非依存的プロダクトイオンスペクトル取得（Data Independent Acquisition: DIA）である SWATH<sup>®</sup> Acquisition を用いた。一度の測定で全

てのイオンのプロダクトイオンスペクトルを取得できる SWATH<sup>®</sup> では定性分析はもちろん、プレカーサーイオンを用いた定量、さらにはプロダクトイオンを用いた定量解析も実施することができる。TOF-MS を用いた高分解能のプロダクトイオン情報からの定量となるため、選択性が高く、夾雑イオンの排除による LOQ の向上が期待できる。さらに MRM と異なり対象化合物ごとの条件検討の必要がなく、一度の測定ですべての情報が取得できることから、基本的に再分析することなく、対象外の化合物についても再解析で検出・定量が可能である。SWATH<sup>®</sup> の測定は、Q1 セル（四重極）でプレカーサーイオンを一定の Window（取り込み幅。図 1 では 25 Da であるが可変）で通過させ、コリジョンセルで開裂させる。生成したプロダクトイオンは TOF-MS で測定する。この Window を連続的に繋げ（例えば  $m/z$  400-425、425-450、450-475、・・・1175-1200）、非常に早いスキャンスピードで測定していくことで全てのイオンのプロダクトイオンスペクトルを取得することができる。

## 方法

### 〈測定試料〉

標準液として下記の原体及び市販の農薬混合標準溶液を用いて、各濃度が 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  になるよう混合標準液を調製した。この混合標準液を 10% アセトニトリルを用いて濃度 0.005, 0.01, 0.02, 0.05, 0.1, 0.2, 0.5, 1, 2, 5, 10, 20, 50  $\text{ng}/\text{mL}$  に調製した。

### 〈原体〉

アミトラズ、(5Z)-オリサストロビン、チオファネートメチル、プロパルギット、2-ベンズイミダゾールカルバミン酸メチル、ベンフラカルブ、DPA、ホセチル（いずれも富士フィルム和光純薬製）

### 〈農薬混合標準溶液〉

66 種農薬混合標準液 水質-1-2、15 種農薬混合標準液 水質-2、28 種農薬混合標準液 水質-3、63 種農薬混合標準液 水質-4、農薬混合標準液 水質-6、29 種農薬混合標準液 水質-9（いずれも富士フィルム和光純薬製）

### 〈測定条件〉

高速液体クロマトグラフ：SCIEX ExionLC<sup>TM</sup> AD システム

カラム：InertSustain C18 1.9  $\mu\text{m}$ , 2.1 mm  $\phi$  × 100 mm (GL サイエンス製)

移動相 A：0.5 mM 酢酸アンモニウムを含む精製水

移動相 B：0.5 mM 酢酸アンモニウムを含むメタノール

グラジエント条件：B：5% (0 min) -30% (1 min) -45% (2 min) -75% (11min) -98% (14 min) -98% (16 min) -5% (16.1 min) -5% (20 min)

流速：0.3 mL/min

注入量：30  $\mu\text{L}$

カラムオープン：40°C

質量分析計：SCIEX X500R QTOF システム

イオン化法：ESI 法

測定モード：SWATH<sup>®</sup> Acquisition

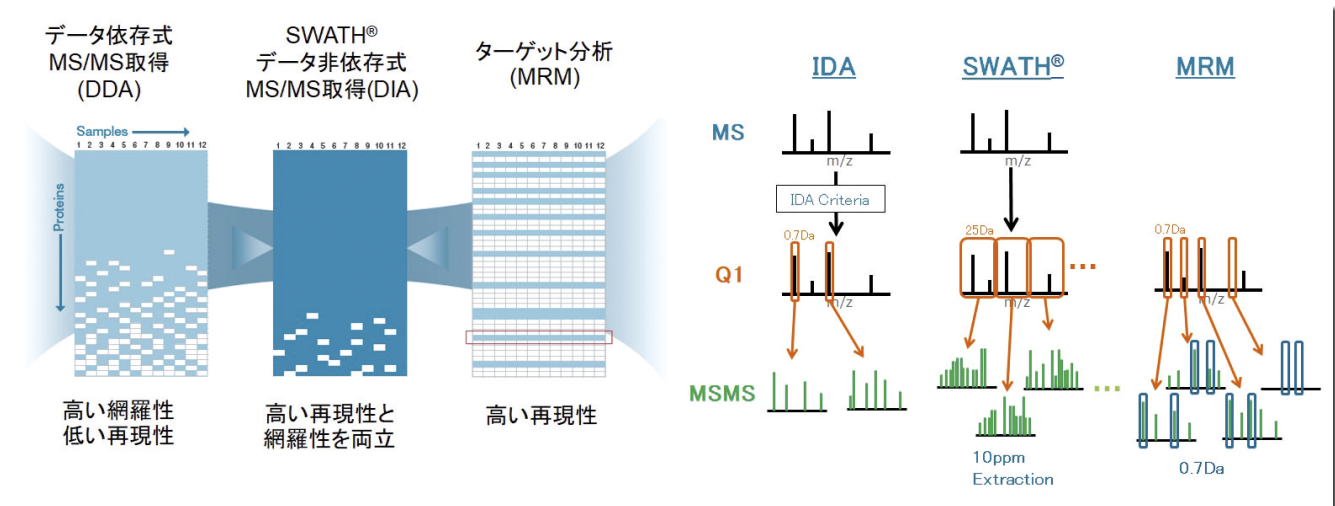


図1. SWATH® Acquisition

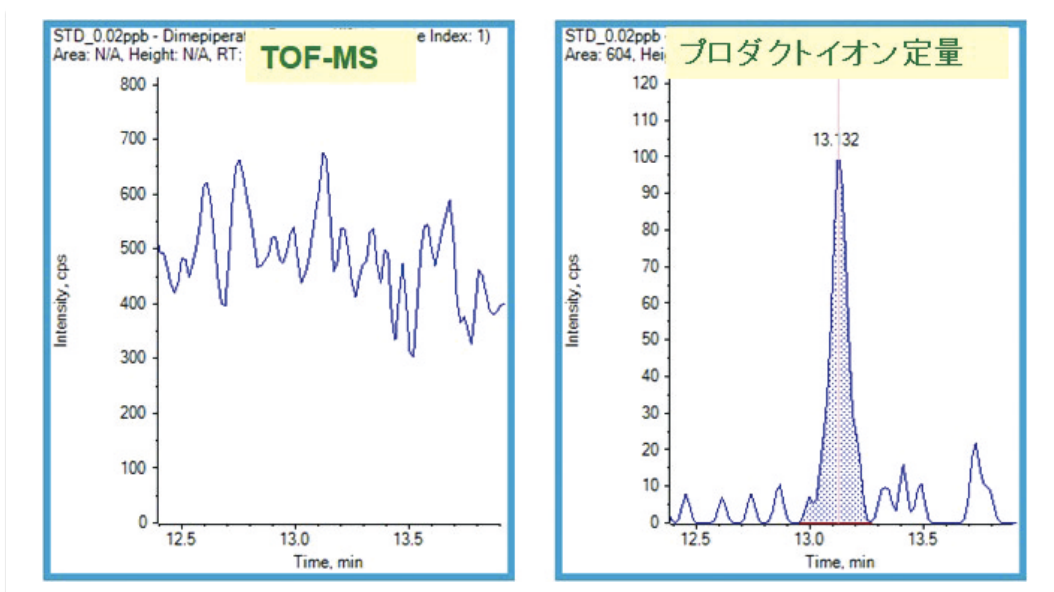


図2. ジメピペレートのカロマトグラム比較 (0.02ppb)

◆結果と考察

SCIEX X500R QTOF システムを用いて SWATH® Acquisition を行うことにより、事前の測定条件の検討をほとんど必要とせず、水質管理目標設定項目の別添方法 20 の 2 に記載の農薬類の内、198 種の化合物で目標値の 1/100 以下の濃度から検量線を作成できた。また、目標値の 1/100 以下の濃度で CV 値 (n=5) が 7% 以下と良好な再現性を確

認できた。

198 成分の内、ほとんどの化合物については、TOF-MS で取得した精密質量の抽出イオンクロマトグラムを用いて定量が可能であったが、ジメピペレートなど 11 成分でバックグラウンドが高く、目標値の 1/100 の濃度で定量下限を満たさなかった。そこで、SWATH® で同時に取得していたプロダクトイオンスペクトルを用いて再解析を行ったところ、バックグラウンドが

低減し、上記 11 成分全てで目標値の 1/100 以下の濃度で定量できることが確認できた (図 2)。また、SWATH® は TOF-MS スペクトルだけでなくプロダクトイオンスペクトルも同時に取得しているため、同位体の理論パターンと併せて、プロダクトイオンスペクトルライブラリとの比較による定性確認が可能である。今回の分析のような多成分の一斉分析では、異性体など組成式が全く同じ化合物も多く含まれる



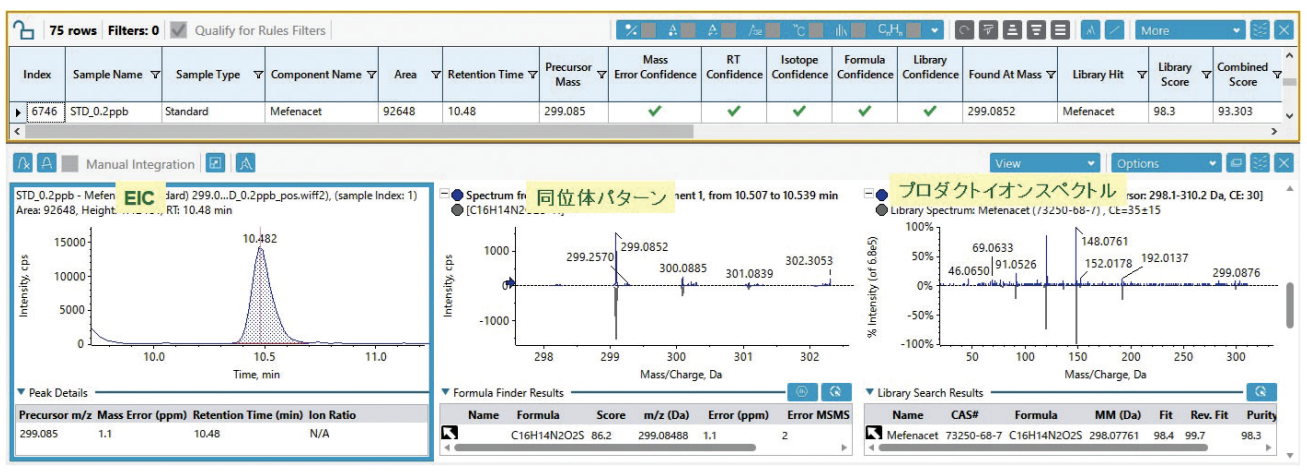


図3. メフェナセットの抽出イオンクロマトグラム、同位体パターン及びプロダクトイオンスペクトル  
(青：実測値、グレー：理論パターン(同位体パターン)・ライブラリ(プロダクトイオンスペクトル))

が、プロダクトイオンスペクトルを用いて同定確認することで各化合物を識別できた(図3)。実サンプルでピークが検出された場合においても、同時に取得したプロダクトイオンスペクトルを用いて同定確認ができるため、陽性・擬陽性の判断を再測定不要で即時に行うことが可能である。

#### ◆おわりに

SCIEX X500R QTOF システムを用い

たSWATH® Acquisitionは、別添方法20の2農薬類の一斉分析において、TOF-MSで取得した精密質量のプロダクトイオンスペクトルによるさらなる高感度定量と同時に、同位体の理論パターン、プロダクトイオンスペクトルライブラリとの比較による定性確認もできる有用な測定手法であることが示された。

#### 【参考文献】

- 1) 水質管理目標設定項目の検査方法(平成15年10月10日付健水発第1010001号)(最終改正 平成30年3月28日)厚生労働省医薬・生活衛生局水道課
- 2) QTOF用いた水質LC-MS対象農薬の一斉分析(第26回環境化学討論会、佐藤 香代、ポスター発表)
- 3) QTOF用いた水質LC-MS対象農薬の一斉分析(別添方法20の2)(第28回環境化学討論会、秋山 愛子、ポスター発表)

© 2019 AB Sciex. For Research Use Only.

The trademarks mentioned herein are the property of AB Sciex Pte. Ltd. or their respective owners. AB SCIEX™ is being used under license.

## 農薬混合標準液

コード No.	品名	規格	容量	希望納入価格(円)
168-26631	66種農薬混合標準液 水質-1-2	残留農薬試験用	1mL	19,000
164-26633	(各20μg/mLアセトン溶液)		1mL×5A	59,000
169-23883	15種農薬混合標準液 水質-2	残留農薬試験用	1mL	10,000
163-23881	(各20μg/mLアセトン溶液)		1mL×5A	30,000
166-23893	28種農薬混合標準液 水質-3	残留農薬試験用	1mL	11,000
160-23891	(各20μg/mLアセトニトリル溶液)		1mL×5A	35,000
168-26011	63種農薬混合標準液 水質-4	残留農薬試験用	1mL	20,000
164-26013	(各20μg/mLアセトニトリル溶液)		1mL×5A	60,000
164-27613	農薬混合標準液 水質-6	残留農薬試験用	1mL	9,000
168-27611	(各20μg/mLメタノール溶液)		1mL×5A	18,000
160-28433	29種農薬混合標準液 水質-9	残留農薬試験用	1mL	16,000
164-28431	(各20μg/mLアセトニトリル溶液)		1mL×5A	42,000

Wako

QTofMS用溶媒も取揃えています。詳細は当社HPをご覧ください。

試薬事業トップ→分析→溶媒・溶離液→液体クロマトグラフィー用溶媒→QTofMS用溶媒

<https://labchem-wako.fujifilm.com/jp/category/00962.html>

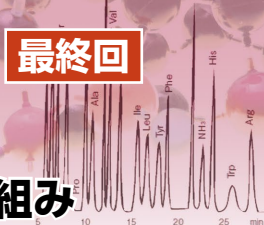


☐…2~10℃保存 ☐…20℃保存 ☐…80℃保存 ☐…150℃保存 表示がない場合は室温保存です。その他の略号は、巻末をご参照下さい。掲載内容は、2020年1月時点での情報です。最新情報は、当社HPをご参照下さい。



## 第5回 SIトレーサブルなアミノ酸測定に向けた取り組み

産業技術総合研究所 計量標準総合センター 加藤 愛、山崎 太一、井原 俊英



### 1. はじめに

アミノ酸は私たちの身の回りにあるありふれた化合物でありながらも、その構造の多様性や分析の難易性により、クロマトグラフィーを主体とした多くの分析法の開発が試みられてきた。クロマトグラフィーの発展はアミノ酸分析法の適用拡大において欠かせないものであったと言っても過言ではない。近年はアミノ酸分析法が、従来の生化学分野や食品分野のみならず、臨床化学分野や医学分野においても多用されるようになってきており、それらの測定結果に対して信頼性の向上が叫ばれている。産業技術総合研究所・計量標準総合センター (AIST/NMIJ) は、アミノ酸測定の機器校正において肝となるアミノ酸標準液について、国際単位系 (SI) にトレーサブルなアミノ酸混合標準液を供給すべく、この10年にわたって活動を行ってきた。このたび富士フイルム和光純薬株式会社より、SIにトレーサブルなアミノ酸混合標準液の発売が開始されるにあたり、本稿ではそれにまつわる NMIJでの基礎検討～標準物質開発～混合標準液調製の技術移転までの具体的な取り組みについて概要を紹介する。

### 2. アミノ酸 CRM の開発

アミノ酸測定における計量トレーサビリティを確保するため、17種類のタンパク質加水分解アミノ酸については、計量学的に最高の品質を有するアミノ酸認証標準物質 (Certified Reference Material; CRM) の開発を行った。CRMの形状としては、安定性に優れている点や、ユーザーが任意の種類や濃度、溶媒で溶液調製できるといったメリットを勘案し、固体粉末での供給を選択した。

アミノ酸 CRMの純度決定法としては、アミノ酸の塩基性を利用した非水

滴定法とアミノ酸に含まれる窒素を利用した窒素分析法という、一次標準測定法 (Primary method) に該当する滴定法を二つ用いた。いずれの方法においても、滴定用試薬である過塩素酸/酢酸溶液や硫酸の規定度は、それぞれフタル酸水素カリウム認証標準物質 (NMIJ CRM 3001-a) や炭酸ナトリウム認証標準物質 (NMIJ CRM 3005-a) により標定を行い、測定結果のSIへのトレーサビリティを確保した<sup>1)</sup>。

非水滴定法と窒素分析法を用いたアミノ酸の定量においては、塩としての純度ならびに窒素としての純度が求まるが、いずれも他の類縁不純物 (主成分以外のアミン類) を併せて測り込む可能性がある。実際、一部の候補標準物質は、無視できないレベルの類縁不純物を含んでいた。そのため、滴定法を利用したアミノ酸の純度決定においては、類縁不純物を見落としなく精確に定量する必要があった。我々はポストカラム誘導体化検出法 (OPA法など) やプレカラム誘導体化検出法 (AQC法)、LC/MSなど、複数の分離分析法を組み合わせることで、類縁不純物を見落としなく精確に定量できるような評価系を構築し<sup>2)</sup>、これらの定量結果を滴定値に加味することで、アミノ酸純度を求めた。

非水滴定法と窒素分析法それぞれをベースに求めたアミノ酸純度を重み付き平均したところ、17種類全てのアミノ酸について拡張不確かさ0.3%以下の精確な純度決定を行うことができ、純度もすべて99.7%以上であった。また、アミノ酸は光学異性体分析への需要も見込まれることから、グリシン以外のアミノ酸については、D体についての評価も行い、「L体アミノ酸としての純度」と「光学異性体を考慮しない場合のアミノ酸純度」の2つを認証値とした。

このようにして純度評価を行った17種類のアミノ酸CRMはNMIJのウェブサイト (<https://unit.aist.go.jp/>

qualmanmet/refmate/index.html) に掲載されている、「取扱事業者」より入手可能である。CRMに付属の認証書には、認証値、認証値の決定方法、計量計測トレーサビリティのほか、参考情報として認証時のアミノ酸関連不純物含量やD体の含量についても記載されているため、参考にされたい。

### 3. アミノ酸 TRM の開発

タンパク質性アミノ酸類等 (尿素および塩化アンモニウムを含む) については、当所の認証標準物質 (NMIJ CRM) の整備が進められてきたが、非タンパク質性アミノ酸類については、リソースの観点から当所単独では早期開発が困難であったことなどから、NMIJ CRMは整備されてこなかった。非タンパク質性アミノ酸類においては、混合標準液としての供給が主な用途であったことから、最高の計量学的品質を目指したNMIJ CRMを開発するのではなく、試薬メーカーが事前に小分け・瓶詰めした原料物質の純度を評価して、校正証明書を発行する「依頼試験型のスキーム」で開発を行うこととした。また、2年間で22種類の開発という要請から、計量トレーサビリティを確保しつつも迅速性を重視する必要があり、タンパク質性アミノ酸類とはやや異なる値付け方法を選択した。すなわち、測定条件の最適化に時間のかかる滴定法を一つにし、定量核磁気共鳴分光法 (qNMR) による純度評価を組み合わせることで、計量トレーサビリティの確保と迅速性を両立した。22種類の非タンパク質性アミノ酸類にqNMRを適用したところ、純度の不確かさとしては0.5%～1.9% (95%の信頼水準) と精確さの点で滴定法にはおよばないものの、滴定法で得られた純度と不確かさの範囲で一致する良好な結果が得られた<sup>3)</sup>。なお、タンパク質性アミノ酸類と同様に、不純物として含まれる一定濃度



(0.01 % 以上) のアミノ酸類を LC/MS およびポストカラム誘導体化液体クロマトグラフィーを併用することにより定性・定量し、滴定法により得られた測定値から差し引いたものを滴定法による純度とした。

原料物質の小分け・瓶詰めや純度評価、さらには後述する混合標準液の調製を正確に行ううえで重要なのが、安定に秤量できることである。しかしながら、非タンパク質性アミノ酸類に関しては湿度環境と吸湿速度の関係についての定量的なデータがほとんど無かった。そこで、温度と湿度の両者が制御できる熱重量測定装置を用いてそれらの評価を行ったところ、7種類の非タンパク質性アミノ酸類において有意な吸湿が認められたため、上限湿度を規定して安定的に取扱えるような工夫を行った<sup>4)</sup>。

このようにして純度評価を行った22種類の非タンパク質性アミノ酸類は、富士フィルム和光純薬株式会社において実施された均質性と安定性の評価結果を加味し、計量トレーサビリティの保証された標準物質である TRM (Traceable Reference Material) として、同社から供給が行われている。

#### 4. 国際比較における国際整合性確保

NMIJ のような世界各国の計量機関の測定能力については、BIPM (国際度量衡局) における CCQM (物質量諮問委員会) で実施される国際比較で測定能力の同等性を評価し、国際的な相互承認を行っている。ここでは、純度測定、濃度測定、成分分析など多岐にわたる物質を対象とした国際比較が実施されており、得られた比較試験結果は BIPM でデータベース化され、広く閲覧できる<sup>5)</sup>。アミノ酸に関する純度測定および混合標準液の調製・測定能力については、L-バリンの純度測定 (CCQM-K55.c) やアミノ酸混合標

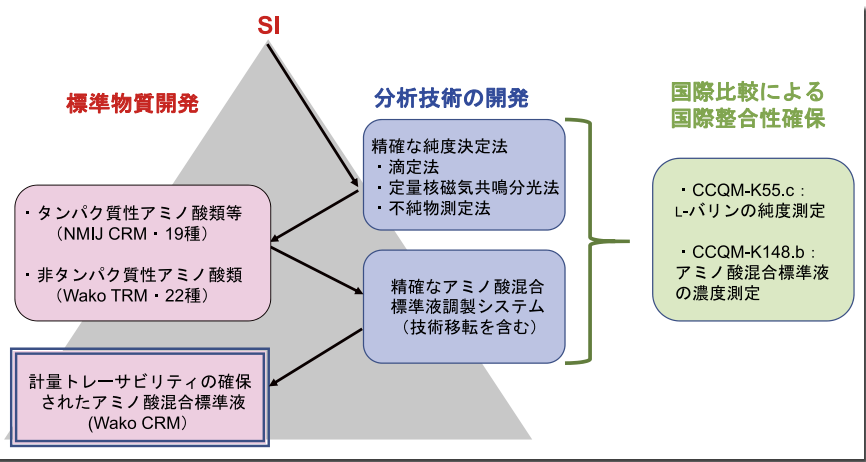


図. 本プロジェクト成果のトレーサビリティ体系における位置づけ

準液の濃度測定 (CCQM-K148.b) に関する比較試験が実施された。NMIJ もこれらの国際比較に参加し、参加機関の中でも非常に良好な結果を報告している。

#### 5. 精確な混合標準液調製のためのシステム構築および安定性についての基礎的検討

計量トレーサビリティの確保されたアミノ酸混合標準液の供給を目指すにあたり、開発した高純度標準物質である NMIJ CRM19 種類および TRM22 種類の計41種類のうち、後述する標準液中での長期安定性などの観点から、レグルタミン、L-アスパラギン、L-トリプトファンおよび2-アミノアジピン酸を除いた37種類のアミノ酸類を対象に、精確な混合標準液調製システムの構築を行った。

アミノ酸類は人に含まれることから実験操作中に比較的容易にコンタミネーションを起こしうるばかりでなく、混合標準液の調製では多くのアミノ酸類を同時に扱うことから相互のコンタミネーションにも注意する必要がある。また、吸湿防止の観点から天秤でのほかり取りを規定した上限湿度以下で行う必要がある。さらには、これらの操作が調製者の熟練度に大きく依存せずに迅速かつ堅牢に実施できるこ

となどを念頭に、自動粉体分注ユニットを備えた天秤を恒温恒湿チャンバーに設置したシステムを用意した。当該システムはアミノ酸類を個別に分注カートリッジ内に封入しておくことができるため、人からのコンタミネーションおよび相互のコンタミネーションの両者を最小限にすることができる。加えて、分注カートリッジを交換するだけで連続的に任意の量のアミノ酸類を自動計量できるため、ハンドリングがしやすいなどの利点がある。そこでアミノ酸混合標準液を当該システムを用いて調製したところ、従来は熟練者であっても半日以上を要していた調製が1~2時間で実施可能であり、全ての成分において相対標準偏差0.3%以内で調製可能であることが確認できた。

次に、アミノ酸混合標準液の認証標準物質を開発するにあたって重要なポイントの一つである、混合標準液中における各成分の安定性について基礎的検討を行った。評価に着手する時点において、これまで市販されてきたアミノ酸混合標準液では、いずれの先行品においても個々のアミノ酸の混合標準液中における安定性は十分に示されていなかった。そこで、先述した調製システムを用いて、先行品と同様の調製条件 (各アミノ酸濃度が2.5 mMとなるよう0.1 Nの希塩酸に溶解) でアミノ酸 (17種類) 混合標準液を調製し、





加速試験を行ったところ、保存温度が上昇するにつれグルタミン酸が環化し、ピログルタミン酸に変化していることが確認された。加速試験結果をもとにグルタミン酸の分解速度を予測したところ、冷蔵保存では、1年間で最大2%の濃度低下が起こることが推測された。一方、より希薄な塩酸を用いて混合標準液を調製した場合、グルタミン酸の安定性は改善し、かつグルタミン酸以外の加水分解アミノ酸の安定性には影響を及ぼさなかった。したがって、グルタミン酸のpKa近傍における溶媒pHの最適化は、グルタミン酸の安定性を確保する上で非常に重要であることが分かった。グルタミン酸以外にも側鎖にカルボキシル基を有する、2-アミノアジピン酸は同様に環化が起きることを確認しており、このような構造のアミノ酸の安定化をはかるうえでも溶媒のpHの最適化は重要であると考えられる<sup>6)</sup>。

## 6. 混合標準液調製の技術移転

上記のような検討結果をもとに、産業技術総合研究所では富士フィルム和光純薬株式会社からの受託研究に基づいて、アミノ酸混合標準液におけるア

ミノ酸濃度、溶媒のpHの最適化後に、各成分の安定性を評価して5処方のアミノ酸混合標準液の最適化を進め、混合標準液の調製方法およびアミノ酸濃度の評価方法を確立した。確立した調製方法は同社へ技術移転し、2機関での共同試験を実施することで、実際にアミノ酸混合標準液を製造する現場における調製能力に問題がないことを確認した。また、技術移転先の同社においては、2019年10月に、アミノ酸類混合標準液の生産能力について、ISO 17034の第三者認定を取得している。

## 7. おわりに

計量トレーサビリティの確保されたアミノ酸類の供給要請に応えるため、高純度標準物質として41種類のNMIJ CRMおよびTRMを開発した。また、それらを混合した混合標準液についても、精確な混合標準液の調製方法ならびに評価方法を確立し、また、標準液中での成分の安定性に関する基礎的検討により、安定性に問題のあった一部の成分における長期安定性の向上を図ることができた。このようにして開発を行ったアミノ酸混合標準液は、富士フィルム和光純薬株式会社よ

り、計量トレーサビリティの確保されたCRMとして供給が行われる運びとなっており、世界的にも類を見ない計量学的品質と種類のアミノ酸混合標準液が誕生したことで、SIトレーサブルなアミノ酸測定に向けた基盤が整備されたと言える。

## 8. 謝辞

本研究の一部は富士フィルム和光純薬株式会社より産業技術総合研究所への受託研究に基づき実施されたものです。味の素株式会社、富士フィルム和光純薬株式会社および、産業技術総合研究所の関係者の皆様をはじめ、本研究の遂行に共に取り組んでくださった多くの方々、ならびに本研究に関してご指導、ご協力くださいました全ての方々々に感謝申し上げます。

### 【参考文献】

- 1) Kato, M. *et al.* : *Anal. Sci.*, **31**, 805 (2015).
- 2) Kato, M. *et al.* : *Accred. Qual. Assur.*, **18**, 481 (2013).
- 3) Saito, N. *et al.* : *Bunseki Kagaku*, **63** (11), 909 (2014).
- 4) Kato, H. *et al.* : *Bunseki Kagaku*, **66** (5), 375 (2017).
- 5) [https://kcdb.bipm.org/AppendixB/KCDB\\_ApB\\_search.asp](https://kcdb.bipm.org/AppendixB/KCDB_ApB_search.asp)
- 6) Kato, M. *et al.* : *Anal. Sci.*, **33**, 1241 (2017).

## 「アミノ酸分析～新たな潮流～」シリーズ終了にあたって

味の素株式会社 宮野 博

本連載は、HPLCの最高傑作の一つであるニンヒドリン法によるアミノ酸分析に始まり、LC/MS/MSによる高速・高感度分析、D,L-アミノ酸分離分析、ペプチド・タンパク質分析まで、アミノ酸に関連する分析技術の最新情報を提供してきた。この連載の根底にあったのは、対象を「精確に定量する」ための技術開発であった。

最終回は、まさにその最後を飾るにふさわしい「SIトレーサブルなアミノ酸測定」に向けた取り組みに関する総説である。SIトレーサブルなアミノ酸混合標準液の商品化はアミノ酸を「精確に定量する」ことの根幹を形作るに必要不可欠な大きな技術進歩である。

アミノ酸のみならず、人々の食や栄養に不可欠なあらゆる成分分析やメタボロミクス研究において、「精確に定量する」ことの重要性が、この連載を通じて再認識されれば、幸いである。

## SIトレーサブルなアミノ酸混合標準液

Wako

コード No.	品名	規格	容量	希望納入価格(円)
015-27891	Amino Acids Mixture Standard Solution, Type AN	アミノ酸自動分析用	1mL×5A	照会
011-27871	Amino Acids Mixture Standard Solution, Type B	アミノ酸自動分析用	1mL×5A	照会
018-27881	Amino Acids Mixture Standard Solution, Type H	アミノ酸自動分析用	1mL×5A	照会
017-27851	APDSTAG <sup>®</sup> Wako Amino Acids Mixture Standard Solution No.1	アミノ酸自動分析用	2mL×5A	48,000
014-27861	APDSTAG <sup>®</sup> Wako Amino Acids Mixture Standard Solution No.2	アミノ酸自動分析用	2mL×5A	48,000

Refr...2~10°C保存 [E]...20°C保存 [B]...80°C保存 [H]...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、2020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8回 エクソソームを利用した診断

公益財団法人がん研究会 植田 幸嗣

従来、細胞間コミュニケーションや細胞周辺環境の恒常性維持には細胞外に放出される液性因子（サイトカインなど）が機能していると考えられてきたが、近年の研究により微小分泌小胞もこれらにとって重要な役割を果たしていることが明らかになってきた。特にエンドサイトーシスを起点とする細胞内小胞輸送経路を経て生成される細胞外小胞の一種、エクソソームに関しては基礎生物学的な機能解明に留まらず診断、治療、ドラッグデリバリーのツールとして臨床応用に向けた開発研究も非常に活発化している。本稿ではこのうちエクソソーム内包分子を利用した疾患の新しい診断技術開発について世界的な動向を概説する。

エクソソームは直径数十～百ナノメートルほどの脂質二重膜構造を持ち、特定のタンパク質群（テトラスパンファミリー、Rabファミリー、Tsg101、Alix など）や miRNA が細胞内構成比率と比して特に多く含まれる小胞とされる。これらに加え、病因細胞由来のエクソソームにはその細胞において特異的に発現している分子群が包含され、かつこれらが血液や尿といったあらゆる体液から検出が可能であることから、生検を行わずとも非侵襲的な体液診断で疾患の分子病態を読み取れる「リキッドバイオプシー」の有望なツールであると考えられている。

現在エクソソームを利用した診断法の開発が最も進んでいる疾患領域はがんである。実際、血清中エクソソームから肺がん特異的 *EML4-ALK* 融合遺伝子転写物を検出する検査 (ExoDx™ *Lung* (*ALK*), Exosome Diagnostics, Inc.) や、尿中エクソソームから前立腺がん特異的 2 種 mRNA (*SPDEF*, *ERG*) と 1 種 ncRNA (*PCA3*) を検出する検査 (ExoDx™ *Prostate* (*IntelliScore*), Exosome Diagnostics, Inc.) が既に米国で上市されている。また同社は 2019 年 4 月、血漿中エクソソームに

含まれる DNA、RNA (ExoNA) を利用して肺がん細胞で見られる代表的な *EGFR* 遺伝子変異 L858R、T790M、exon 19 indels をそれぞれ感度 90%、83%、73%、特異度 100%、100%、96% で検出可能であったと報告している ( $n = 110$ )<sup>1)</sup>。エクソソーム中からがん特異的遺伝子変異を検出した他の例としては、リンパ節郭清を行った悪性黒色腫患者から得られた滲出リンパ液 (exudative seroma, ES) よりエクソソームを単離して解析したところ *BRAF*<sup>V600E</sup> 変異の検出に成功し、その検出頻度は再発リスクと相関があったとするものがある<sup>2)</sup>。

筆者らの研究グループによる腎がん特異的エクソソームタンパク質バイオマーカー開発の例では、手術切除した腎がん部および隣接正常部を採取し培養した無血清培地から生存ヒト組織由来エクソソームを抽出、最先端質量分析技術を用いた詳細な解析を行った。20 症例由来腎組織を用いた本解析からは 3,781 種のエクソソームタンパク質が定量的に検出され、このうち 106 種タンパク質が腎がん部由来エクソソームにおいて腎正常部由来エクソソーム中と比較して有意に発現亢進しており ( $p < 0.05$ , Fold-change  $> 2.0$ )、特に azurocidin (*AZU1*) タンパク質が最も顕著な発現上昇を示すことが分かった ( $p = 2.85 \times 10^{-3}$ , Fold-change = 31.6)。エクソソーム上 *AZU1* (Exo-*AZU1*) は腎がん患者血清中からも腎がん特異的に検出が可能であり、通常のサンドイッチ ELISA と同様の測定系でハイスループット計測が可能なることから、現在、体外診断用キット化が民間企業主導で進められている<sup>3)</sup>。

超高感度質量分析技術を駆使したエクソソームのメタボローム解析も盛んに試みられており、Falcón-Pérez らは前立腺がん患者および前立腺肥大症患者の尿中エクソソームから 248 種の代謝物を定量検出することに成功して

いる。とりわけステロイドホルモンである  $3\beta$ -Hydroxyandros-5-en-17-one-3-sulphate (Dehydroepiandrosterone sulphate) が前立腺がん患者尿中エクソソームにおいて有意に高値であること、アンドロゲンレベルとよく相関する特徴があることなどを示し、非侵襲的な尿中エクソソームを利用した前立腺がんの特異的存在診断マーカー、治療選択マーカーとしての可能性を提言している<sup>4)</sup>。

これら以外にも次世代シーケンサーや質量分析計をはじめとするオミクス分析技術の飛躍的な発達に伴って、がん細胞由来エクソソームに含まれるあらゆる生体分子 (mRNA、miRNA、ncRNA、タンパク質、表面糖鎖、脂質、代謝物、微量元素など) の詳細な定量的プロファイル解明に基づくがんエクソソームバイオマーカー開発事例が次々と報告されている<sup>5)</sup>。

エクソソームを含むリキッドバイオプシー診断技術開発が最も期待されている疾患分野の一つはアルツハイマー病やパーキンソン病を代表とする脳神経変性疾患である。これらの疾患は生検によって病変組織を採取して診断することが困難であり、画像診断や血液、髄液バイオマーカーの情報と認知、行動テストの結果から総合的に病勢や進行度を判断しなければならないが、精度の高い画一的な診断法は確立されていない。そこで、ニューロンやグリア細胞といった中枢神経系細胞が分泌するエクソソームに注目が集まっている。これらが診断に利用可能な脳脊髄液中から捕捉可能であり、さらに一部は血液脳関門を透過して末梢血からも検出が可能であることが分かったからである。重要なことに、アミロイド  $\beta$ 、 $\alpha$  シヌクレイン、タウといった神経変性疾患の発症に深く関わるタンパク質群も脳脊髄液、血液中エクソソームから検出されている<sup>6)</sup>。脳脊髄液中からアミロイド  $\beta$  やタウ、リン酸化タウを測定する検査は実用化されて



表 1

疾患カテゴリー	疾患名	測定試料	エクソソームバイオマーカー	原著論文
脳神経変性疾患	パーキンソン病	血漿	DJ-1, $\alpha$ -Synuclein	<i>Front. Aging Neurosci.</i> , <b>10</b> , 438 (2018).
脳神経変性疾患	アルツハイマー病	血漿	A $\beta$ 42, T-tau, and P-T181-tau	<i>Alzheimers Dement.</i> , <b>15</b> , 1071 (2019).
脳神経変性疾患	アルツハイマー病	血清	miR-135a, miR-193b, miR-384	<i>Biomed. Environ. Sci.</i> , <b>31</b> , 87 (2018).
脳神経変性疾患	免疫性脱髄疾患	脳脊髄液	hsa_circ_0087862, hsa_circ_0012077 (環状 RNA)	<i>Front. Genet.</i> , <b>10</b> , 860 (2019).
循環器系疾患	急性心筋梗塞	血清	miR-192, miR-194, miR-34a	<i>Circ. Res.</i> , <b>113</b> , 322 (2013).
循環器系疾患	冠動脈硬化症	血漿	miR-30e, miR-92a	<i>Mol. Med. Rep.</i> , <b>19</b> , 3298 (2019).
腎疾患	菲薄基底膜病	尿	CD13, VASN, A1AT, Cp	<i>Proteomics</i> , <b>11</b> , 2459 (2011).
腎疾患	巣状分節性糸球体硬化症	尿	miR-193a	<i>Biomed. Res. Int.</i> , <b>2017</b> , 7298160 (2017).
腎疾患	原発性アルドステロン症	尿	sodium-chloride cotransporter (NCC)	<i>Journal of the American Society of Nephrology</i> , <b>28</b> , 56 (2017).
腎疾患	間質性腎線維症	尿	miR-29c	<i>Exp. Mol. Pathol.</i> , <b>105</b> , 223 (2018).
口腔疾患	歯周炎	唾液	PD-L1 mRNA	<i>Front. Genet.</i> , <b>10</b> , 202 (2019).
がん	食道がん	唾液	Chimeric GOLM1-NAA35 RNA	<i>Clin. Cancer Res.</i> , <b>25</b> , 3035 (2019).
がん	膵がん	血清	LysoPC 22:0, PC (P-14:0/22:2) and PE (16:0/18:1)	<i>Metabolomics</i> , <b>15</b> , 86 (2019).

いるが、原則的にこれらは病態が進行し、死んだ細胞から漏出してくるものと考えられており、生存状態の細胞が分泌するエクソソームに包含されるこれらマーカー分子群を検出できれば、より早期の病態変化（軽度認知障害 (MCI) など) も捉えられるのではないかと期待されている。また、血液中に含まれる脳神経細胞由来エクソソームは微量であると考えられるため、より高深度で特異性の高いバイオマーカー開発を実現する目的で同エクソソームを特異的に濃縮精製可能な技術の開発も盛んに行われている。GoetzlらはL1CAM分子を標的とする免疫捕捉法で神経細胞由来エクソソームを血中から濃縮し、同エクソソーム中 cathepsin D、LAMP-1、ユビキチン化タンパク質レベルがアルツハイマー病患者群で有意に上昇すること、逆に HSP70 タンパク質濃度が低下するこ

とを明らかにしている<sup>7)</sup>。

一方、現在世界の死因第一位である心血管疾患分野においてもエクソソームの病態への関与やそれを応用した診断法は注目されつつある。一例として、心筋梗塞によりダメージを受けた心筋細胞からは特定の miRNA (miR-1, 208, 499) を含むエクソソームが放出され、これが骨髄単核細胞に取り込まれて CXCR4 の発現を抑制することで循環前駆細胞が増加、全身性の心筋修復を誘導することが報告された<sup>8)</sup>。こうした特徴的な心血管系細胞由来 miRNA (myo-miRs) が包含されたエクソソームは心筋障害の鋭敏なバイオマーカーとなる可能性があり、重篤な症状が顕在化する前に病変を認知できるようになる可能性がある。

以上の例以外にも、非常に多岐にわたる疾患を対象として様々な体液試料からエクソソームバイオマーカー候補

分子が報告されているが(表1)、複数の独立した研究によって再現性が確認されたものはまだわずかである。しかしながら、前述の Exosome Diagnostics 社をはじめ、ADAPT Biotargeting System<sup>TM</sup>を用いて乳がんのリキッドバイオプシーを開発する Caris Life Sciences 社や TauSome<sup>TM</sup> バイオマーカーによって慢性外傷性脳症のモニタリングマーカーを開発する Exosome Sciences 社など、産業界も活発にエクソソーム体外診断薬の開発を進めている。なお、Exosome Diagnostics 社は2018年8月に Bio-Techne Corporation (NASDAQ) が約 350 億円のマイルストーン契約を含む計約 620 億円で買収し、2019年6月には ExoDx<sup>TM</sup> Prostate (IntelliScore) 検査が FDA のプレイクスルーデバイス指定を受けるなど更に事業を加速させている。本稿はエクソソームの診断利用についてその一角

を紹介したが、今後はエクソソームを利用した新規治療法やドラッグデリバリーシステムなど一層多くのエクソソーム製剤が臨床応用されていくと期待される。これを加速し、また安全性や品質を科学的に保証できる厳密なエクソソームに関する基礎生物学的データ蓄積の重要性が一段と増している

と言える。

### 【参考文献】

- 1) Castellanos-Rizaldos, E. et al. : *Oncotarget*, **10**, 2911 (2019).
- 2) Garcia-Silva, S. et al. : *J. Exp. Med.*, **216**, 1061 (2019).
- 3) Jingushi, K. et al. : *Int. J. Cancer*, **142**, 607 (2018).
- 4) Clos-Garcia, M. et al. : *J. Extracell Vesicles*, **7**,

1470442 (2018).

- 5) Jalalian, S. H. et al. : *Anal. Biochem.*, **571**, 1 (2019).
- 6) Gamez-Valero, A. et al. : *Neurobiol. Aging*, **74**, 15 (2019).
- 7) Goetzl, E. J. et al. : *Neurology*, **85**, 40 (2015).
- 8) Cheng, M. et al. : *Nat. Commun.*, **10**, 959 (2019).

## 精製から解析までトータルサポート

Wako

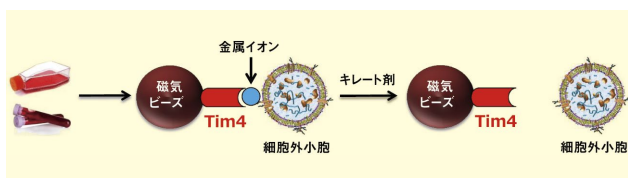
### 高純度細胞外小胞の精製ツール

#### ■ MagCapture™ エクソソームアイソレーションキット PS

#### 特長

- 高純度精製
- インタクトなエクソソームを精製
- 培養上清・血清・血漿・尿に対応
- 高い再現性
- 超遠心分離不要

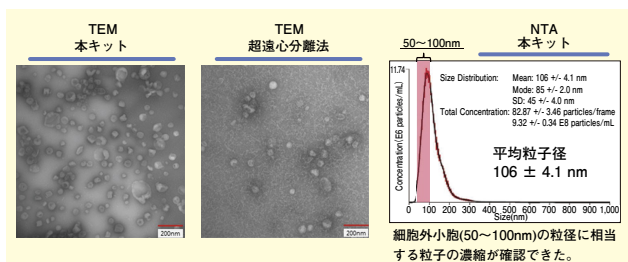
#### 原理



ホスファチジルセリン(PS) 結合分子 Tim4 を用いて細胞外小胞を金属イオン依存的に捕捉した後、キレート剤により溶出します。

#### データ

#### ■ 電子顕微鏡解析 (TEM) 及び粒子径解析 (NTA)



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		研究用	10回用	80,000

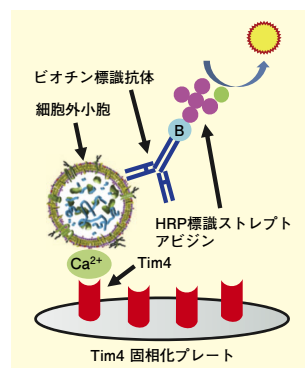
### 細胞外小胞の高感度解析ツール

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

#### 特長

- 培養上清・血液検体に対応
- 超高感度 (検体の節約)
- 検体から直接検出可能 (単離不要)

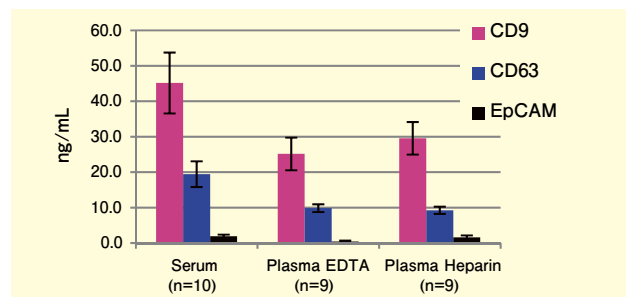
#### 測定原理



本キットでは、ビオチン標識抗体を一次検出、HRP 標識ストレプトアビジンを二次検出に用いています。そのため、抗体種に依存せずに細胞外小胞を解析できます。また、二次検出に HRP 標識ストレプトアビジンを採用しているため、血液成分への非特異結合が低く、血液サンプル中の細胞外小胞を高感度に検出できます。

#### データ

#### ■ 正常血液検体の各種エクソソームマーカー測定



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

Ref... 2 ~ 10℃ 保存    F... -20℃ 保存    30... -80℃ 保存    150... -150℃ 保存    表示がない場合は室温保存です。その他の略号は、巻末をご参照下さい。掲載内容は、2020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。

## エクソソーム実験のポジティブコントロールに エクソソーム, COLO201 細胞由来, 精製品

Wako

COLO201 細胞由来の高純度精製エクソソームです。COLO201 細胞の培養上清から PS affinity 法 (Tim4 とホスファチジルセリンのアフィニティー) を用いてエクソソームを単離しています。

### 特長

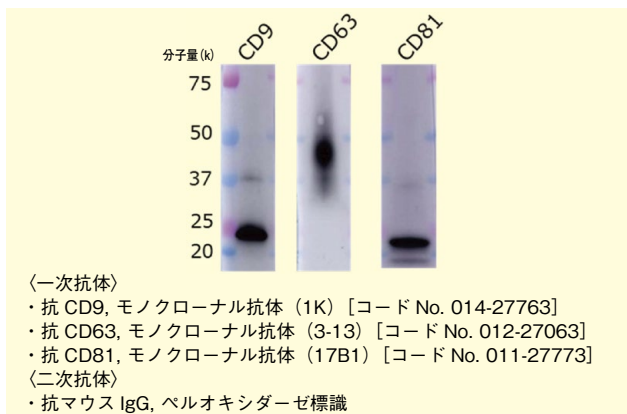
- 高純度
- 高い安定性
- 使いやすい溶液タイプ

### 製品概要

- 組成: エクソソーム, TBS (pH 7.4), EDTA, ポリマー (安定化剤)
- エクソソーム濃度: 10 $\mu$ g/mL (CD 63 シグナル値から補正したタンパク質濃度)

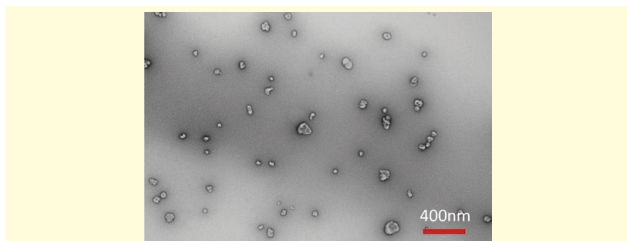
### データ

#### ■ ウェスタンブロットによるエクソソーム表面マーカータンパク質の検出



本品を 10ng/Lane となるよう非還元 SDS-PAGE を行い、エクソソーム表面マーカータンパク質である CD9、CD63、CD81 を抗体で検出した。10ng のサンプル量で 3 種類のエクソソーム表面マーカータンパク質の発現を確認できた。

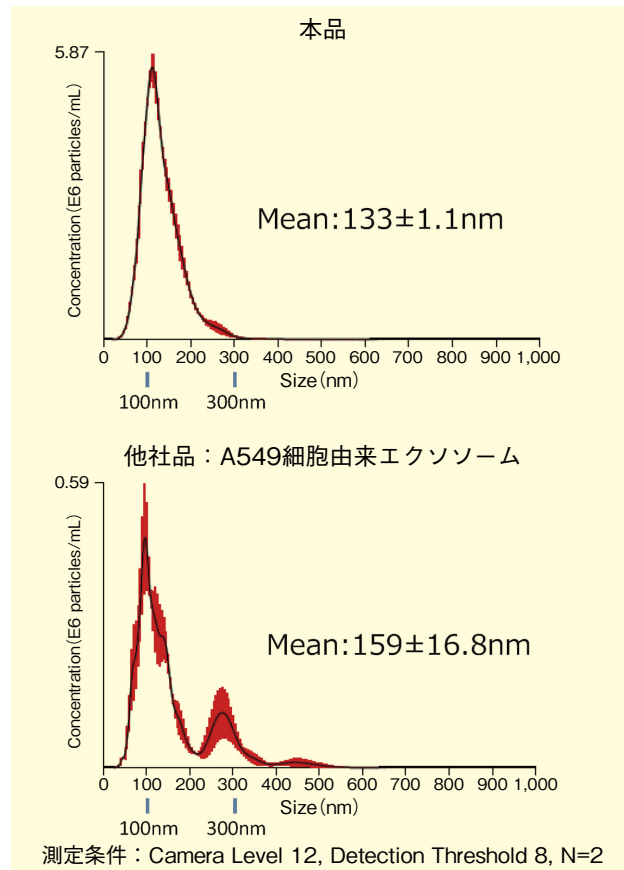
#### ■ 凍結融解耐性



−20℃での凍結と室温での融解を 15 回繰り返し、電子顕微鏡により本品の構造を観察した。

凍結と融解を繰り返しても構造が保たれることを確認できた。

#### ■ Nano Tracking Analysis (NanoSight) による粒子径分布



本品は他社品よりも均一な粒子径分布を示した。

コード No.	品名	規格	容量	希望納入価格 (円)
052-09301	Exosomes, from COLO201 cells, purified	遺伝子研究用	50 $\mu$ L	48,000

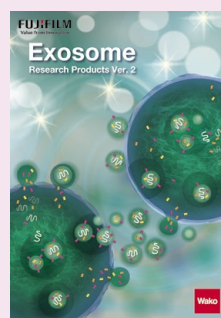
その他のエクソソーム研究試薬は当社 HP をご覧下さい。

Exosome研究 和光純薬

検索

### エクソソームガイドブック Ver. 2 を発行!

#### Research Product Ver.2



エクソソームの総説や、豊富なアプリケーションデータを掲載したカタログです。

当社 HP より、PDF 版をダウンロード頂けます。

<https://labchem-wako-pages.fujifilm.com/catalog-exosome-2019.html>



## エクソソーム解析に

### 抗CD9, ラットモノクローナル抗体(30B), ビオチン結合

Wako

CD9は4回膜貫通型ドメインを持つテトラスパニンと呼ばれる膜タンパク質の1つです。インテグリンや他のテトラスパニンタンパク質と複合体を形成することが知られており、CD9は細胞外小胞のマーカースとして知られています。本品は、DNA免疫法で樹立したCD9に対するラットモノクローナル抗体のビオチン標識品です。ELISAやウエスタンブロットなどのアプリケーションに適用可能です。エクソソーム解析にご利用下さい。

### 特長

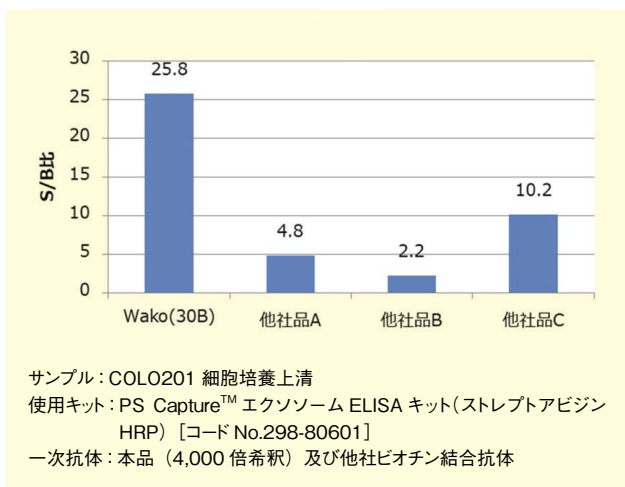
- 高感度
- 非還元サンプルを認識

### 製品概要

溶液組成	1 × TBS、50w/v% グリセロール、0.05w/v% アジ化ナトリウム
クローン No.	30B
免疫動物	ラット
サブクラス	IgG2b
交差性	ヒト (ラット CD9 とごくわずかに反応する)
適応	ELISA 1 : 2,000-1 : 8,000 ウエスタンブロット (非還元状態) 1 : 1,000-1 : 4,000

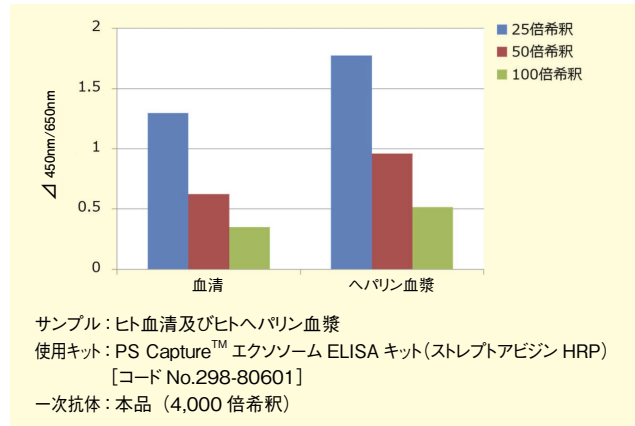
### データ

#### ■ エクソソームの検出精度



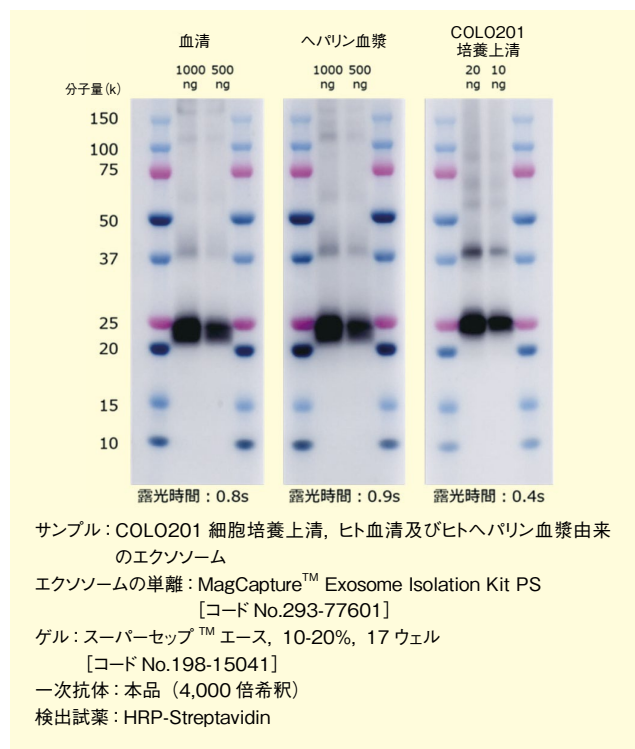
当社 ELISA キットの一次抗体として本品及び他社品を用い、検出精度比較を行った。本品は他社品に比べ、ブランクウェルの値が低く、S/B 比が優れていることが示された。

#### ■ 体液サンプル (血清・血漿) 由来エクソソームの検出



当社 ELISA キットの一次抗体として本品を用い、体液サンプル由来エクソソームの検出を行った。結果、サンプル濃度依存的なシグナル値の変動が確認され、ヒト血清、ヘパリン血漿中のエクソソームを検出できることが示された。

#### ■ ウエスタンブロット解析



当社キットを用いて単離したエクソソームのサンプルを非還元状態で電気泳動し、本品を用いてウエスタンブロットを行った。24k 付近にバンドが検出され、本品はウエスタンブロット解析に適用可能であることが示された。

コード No.	品名	規格	容量	希望納入価格 (円)
013-27951	Anti CD9, Rat Monoclonal Antibody	免疫	20µL	8,400
019-27953	(30B) Biotin Conjugated	化学用	100µL	30,800

☐: 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、2020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。

## 先染め・後染め両方に対応したリニューアル品を追加

Wako

### SAFELOOK™

SAFELOOK™ シリーズは、低変異原性かつ安価な核酸染色試薬です。変異原性が高いとされるエチジウムブロマイドに取って代わる核酸染色試薬として開発されました。SAFELOOK™ グリーン/レッド核酸染色液は先染めと後染めの両方に使用可能です。一方、SAFELOOK™ ロードグリーン/ロードレッドはローディングバッファーのようにサンプルと混合して使用します。

### 特長

- 従来の低変異原性核酸染色試薬と比較して優れたコストパフォーマンス
- 低変異原性のため、安心して使用可能
- 先染め・後染めタイプ、ローディングダイタイプの2種類をラインアップ

### 製品仕様

	SAFELOOK™ グリーン核酸染色液	SAFELOOK™ レッド核酸染色液
染色方法	先染め・後染め	
励起波長	490nm	540nm
蛍光波長	520nm(DNA) 635nm(RNA)	630nm
光源	LED/UV	LED/UV <sup>(※)</sup>
推奨ゲル	アガロース	
推奨サンプル	dsDNA/ssDNA/RNA	

	SAFELOOK™ ロードグリーン(6×)	SAFELOOK™ ロードレッド(6×)
染色方法	サンプル添加	
励起波長	490nm	540nm
蛍光波長	525nm	630nm
光源	LED/UV	LED/UV <sup>(※)</sup>
推奨ゲル	アガロース / ポリアクリルアミド	
推奨サンプル	dsDNA/ssDNA/RNA	

※SAFELOOK™ レッド核酸染色液/ロードレッドはUVでの観察を推奨します (LEDでの観察は条件検討が必要です)。

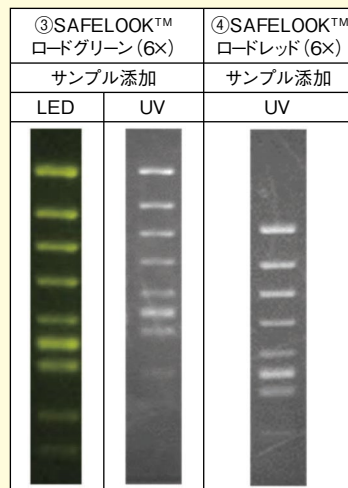
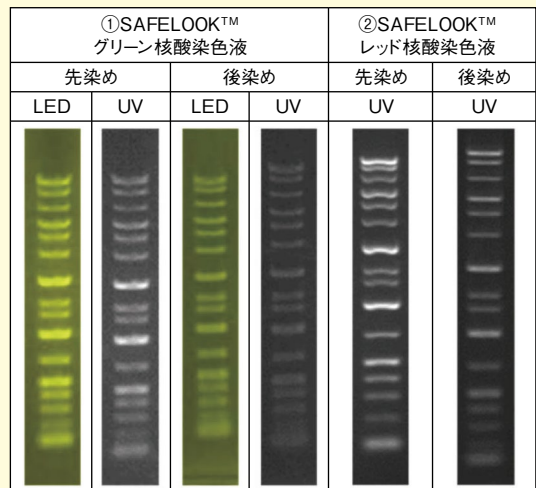
### 使用量

先染め : ゲル溶液100mLにつき、SAFELOOK™ を5μL添加。必要に応じて泳動バッファー200mLあたり5-10μLを添加

後染め : バッファー100mLにつき、SAFELOOK™ を10-20μL (1:5,000-1:10,000) 添加

サンプル添加 : サンプル及びマーカーに、染色液: サンプル = 1:5の比率で添加

### 使用例



〈SAFELOOK™ 添加量〉

- ①SAFELOOK™ グリーン核酸染色液  
(先染め) 100 mL ゲル溶液あたり 5 μL+100 mL 泳動バッファーあたり 5 μL  
(後染め) 100 mL バッファーあたり 10 μL
- ②SAFELOOK™ レッド核酸染色液  
(先染め) 100 mL ゲル溶液あたり 5 μL+100 mL 泳動バッファーあたり 5 μL  
(後染め) 100 mL バッファーあたり 10 μL
- ③SAFELOOK™ ロードグリーン(6×)  
(サンプル添加) 染色液: サンプル = 1:5 の比率で添加
- ④SAFELOOK™ ロードレッド(6×)  
(サンプル添加) 染色液: サンプル = 1:5 の比率で添加

〈分子量マーカー〉

- ①、② Gene Ladder Wide1 [コード No. 313-06961]
- ③、④ DNA MW Marker 5 [コード No. 312-00674]

〈検出装置〉

LED: ゲルみえる [コード No.290-33891]

UV: Dolphin-View 2

〈ゲル〉 1% アガロースゲル

コード No.	品名	規格	容量	希望納入価格(円)
194-18843	SAFELOOK™ Green Nucleic Acid Stain	遺伝子研究用	500μL	10,000
197-18833	SAFELOOK™ Red Nucleic Acid Stain	遺伝子研究用	500μL	10,000
199-18153	SAFELOOK™ Load-Green (6×)	遺伝子研究用	1mL	13,600
196-18163	SAFELOOK™ Load-Red (6×)	遺伝子研究用	1mL	13,600

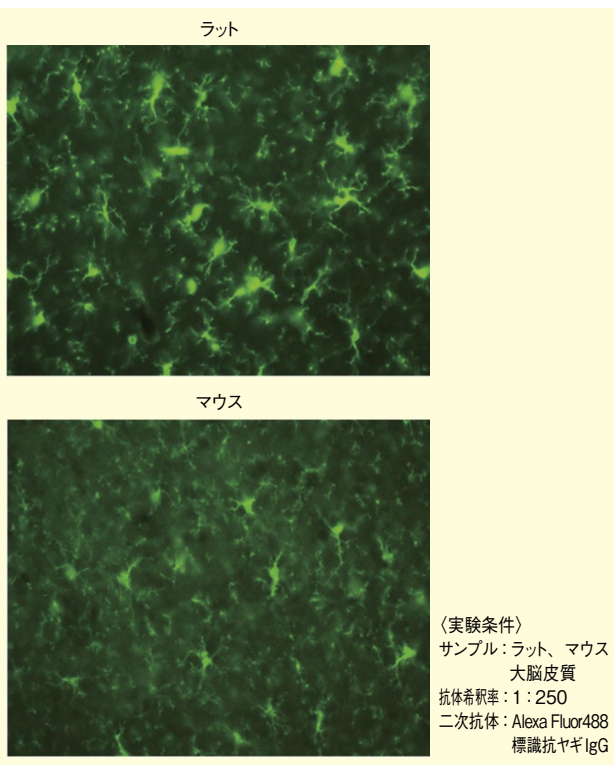
## マイクログリアマーカー

### 抗 Iba1, ヤギポリクローナル抗体

Wako

本品は、Iba1 を認識するヤギポリクローナル抗体です。Iba1 は神経系のマイクログリア特異的に発現している約 17kDa のタンパク質で、マイクログリアマーカーとして使用されます。

#### 使用例 (免疫組織染色)



(データご提供: 創価大学 中嶋一行先生)

#### 製品概要

抗原	合成ペプチド (Iba1 の C 末端相同配列)
溶液組成	TBS
交差性	マウス、ラット
抗体濃度	0.5-0.7mg/mL
適応	免疫組織化学 (凍結切片) 1:250-1:1,000 免疫組織化学 (パラフィン切片) 1:250-1:1,000 ウェスタンブロット 1:1,000

コード No.	品名	規格	容量	希望納入価格 (円)
011-27991	Anti Iba1, Goat	免疫化学用	100 $\mu$ L	45,000

その他 Iba1 抗体を多数取揃えています。当社 HP の Iba1 抗体シリーズをご覧ください。  
 試薬事業トップ→ライフサイエンス→抗体製品→神経関連抗体→Iba1 抗体シリーズ

富士フイルムワコーシバヤギ株式会社

## ELISA 測定精度評価 / 技能評価に

### レビス® ELISA スキルチェック

ELISA の手技はやさしそうですが、実際の操作には熟練が要求される手技が必要とされます。そのため ELISA 測定精度評価 / 技能評価を定期的の実施することにより、ELISA 測定従事者の技能を客観的に評価することができます。さらに、測定環境の改善点を見出す良い機会にもなります。

本キットでは、標準品、低濃度・高濃度の管理試料 (QC) を測定し、得られた標準曲線から QC 濃度を求めます。そのため各標準品や QC の真度、C.V. 値を比較することにより測定技量を確認することができます。

#### 特長

- 1キットで3名同時測定が可能
- 短時間で測定可能 (3時間)
- 高い再現性 (C.V. 値 10% 未満)
- 管理試料 2 濃度 (低・高)
- すべての試薬が溶液タイプで即座に使用可能



#### 推奨用途

- ELISA 測定における測定者 (室) の継続的な技能評価
- 測定者 (室) の問題点の把握、改善
- 測定室の付加的な信頼性の提供材料として
- 測定者の研修
- 測定室間差の把握

コード No.	メーカーコード	品名	容量	希望納入価格 (円)
639-46471	AKR-TR3	LBIS™ ELISA Skillcheck	96回用	24,800

【良い結果を出すためのポイント (動画) について】  
 動画で操作法のポイントを分かりやすく説明しています。測定を実施される前にご覧下さい。

<http://www.shibayagi.co.jp/movie.html>

シバヤギ 動画

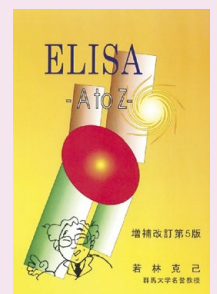
検索

## ELISA を行うすべての人に読んでほしい ELISA -A to Z- 増補改訂第5版

シバヤギ技術顧問をされていた、群馬大学名誉教授の若林克己先生が ELISA の原理、実技、測定技術向上のコツを詳しく解説。これから ELISA を始める人はもちろん、経験を積んだ方にもぜひ読んでほしい一冊です。

実習や教育の解説にも役立ちます。

上記キットを購入された方でご希望の方には無償で差し上げます。当社担当営業員または販売代理店までご請求下さい。





## 品目追加

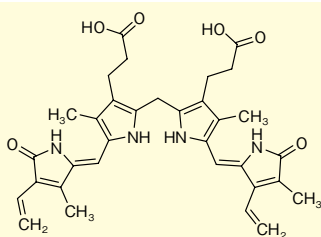
### 局方生薬試験用試薬

Wako

当社では、局方規格及び自主規格の生薬試験用標準品を多数取揃えており、新たにラインアップしました製品をご紹介します。

#### ■ ビリルビン

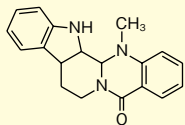
日本薬局方 一般試験法 試薬・試液に記載されている定量用ビリルビンとしてご使用頂けます。定量用ビリルビンは生薬「ゴオウ」の定量法に使用されます。



$C_{33}H_{36}N_4O_6=584.66$   
CAS RN® 635-65-4

#### ■ エボジアミン

日本薬局方 一般試験法 試薬・試液のエボジアミン、定量用に適合しています。「呉茱萸湯エキス」の純度試験に用いられます。



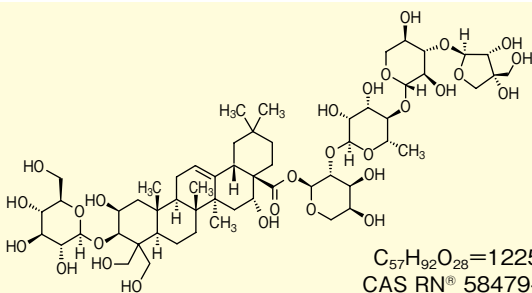
$C_{19}H_{17}N_3O=303.36$

#### ■ ペウケダヌム・レデボウリエルロイデス

日本薬局方 一般試験法 試薬・試液のペウケダヌム・レデボウリエルロイデス、純度試験用に適合しています。「ボウフウ」の純度試験に用いられます。本品は、ペウケダヌム・レデボウリエルロイデスの根及び根茎を粉末にしたものです。

#### ■ プラチコジンD

日本薬局方 一般試験法 試薬・試液のプラチコジンD、薄層クロマトグラフィー用に適合しています。「キキョウ」の純度試験に用いられます。



$C_{57}H_{92}O_{28}=1225.32$   
CAS RN® 58479-68-8

コード No.	品名	規格	容量	希望納入価格 (円)
NEW 025-19381	Bilirubin $[E^{\circ}]$	局方生薬試験用 (定量用)	50mg	40,000
NEW 059-09311	Evodiamine $[Ref]$	局方生薬試験用 (定量用)	20mg	18,000
NEW 165-28721	Peucedanum Ledebourielloides $[Ref]$	局方生薬試験用 (純度試験用)	10g	9,800
NEW 162-28731	Platycodin D $[E^{\circ}]$	局方生薬試験用 (薄層クロマトグラフィー用)	5mg	18,000

上記以外にも局方生薬試験用製品を取揃えています。詳細は当社HPをご覧ください。

試薬事業トップ→医薬品 製造・品質管理→一般試験法用試薬→試薬・試液→生薬

<https://labchem-wako.fujifilm.com/jp/category/00683.html>

## 追加品目のお知らせ

### ポジティブリスト関連標準品

Wako

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

#### 農薬標準品

- エチルチオメトン標準品
- フラザスルフロン標準品
- フルフェナセット代謝産物W標準品
- フルフェナセット標準品
- ヒドロキシイソキサゾール標準品
- イソキサチオン標準品
- ピコキシストロビン標準品
- セトキシジム M2-SO<sub>2</sub> 標準品

コード No.	品名	規格	容量	希望納入価格 (円)
NEW 055-03154	Ethylthiomethon Standard $[Ref]$ $[I]$ $[II]$	残留農薬試験用	100mg	15,000
NEW 060-03323	Flazasulfuron Standard $[Ref]$	残留農薬試験用	100mg	9,000
NEW 067-06851	Flufenacet Metabolite W Standard $[Ref]$	残留農薬試験用	100mg	22,000
NEW 063-06831	Flufenacet Standard $[Ref]$	残留農薬試験用	100mg	18,000
近日発売 084-06863	Hydroxyisoxazole Standard $[Ref]$	残留農薬試験用	100mg	照会
NEW 098-02244	Isoxathion Standard $[Ref]$ $[III]$ $[IV]$	残留農薬試験用	100mg	6,000
NEW 162-28611	Picoxystrobin Standard $[Ref]$	残留農薬試験用	100mg	15,000
NEW 190-18781	Sethoxydim M2-SO <sub>2</sub> Standard $[E^{\circ}]$	残留農薬試験用	100mg	15,000

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をご覧ください。

試薬事業トップ→分析→食の安全・安心→残留農薬分析(標準品他)→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>

$[Ref]$ …2~10℃保存  $[E^{\circ}]$ …-20℃保存  $[III]$ …-80℃保存  $[IV]$ …-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、2020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。

## ICP分析用単元素標準液

Wako

### ジスプロシウム標準液 (Dy 1000)

### ユウロピウム標準液 (Eu 1000)

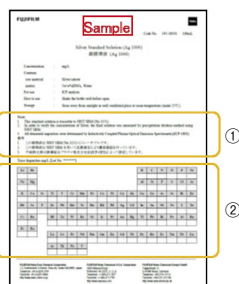
近年、電子材料や水質の他、食品や医薬品でも微量元素の管理が必要とされています。微量元素分析では多元素一斉分析が主流のため、使用する標準液中の不純物元素の情報は重要です。当社では不純物の少ない高純度な標準液を品揃えています。2019年7月より、不純物元素の測定法をICP-MSに変更し、より厳しい不純物元素保証になりました。

### 特長

- 不純物元素の測定をICP-MSで実施、目標値は0.05mg/L以下
- JCSS実用標準液またはNIST SRMにトレーサブル
- 現品説明書に不純物元素情報をロット毎に記載

### 《現品説明書（単元素標準液）》

- 製品に現品説明書を添付
- トレーサビリティ元、濃度測定の手法を記載 (①)
- 不純物元素情報を記載 (②)



### ラインアップ

ジスプロシウム標準液とユウロピウム標準液を新たに追加し、46元素をラインアップしています。今後も順次、追加予定です。

ICP分析用ラインアップあり																	
Li	Be											B	C	N	O	F	Ne
Na	Mg											Al	Si	P	S	Cl	Ar
K	Ca	Sc	Ti	V	Cr	Mn	Fe	Co	Ni	Cu	Zn	Ga	Ge	As	Se	Br	Kr
Rb	Sr	Y	Zr	Nb	Mo	Tc	Ru	Rh	Pd	Ag	Cd	In	Sn	Sb	Te	I	Xe
Cs	Ba		Hf	Ta	W	Re	Os	Ir	Pt	Au	Hg	Tl	Pb	Bi	Po	At	Rn
Fr	Ra																

コード No.	品名	規格	容量	希望納入価格 (円)
044-34591	Dysprosium Standard Solution (Dy 1000)	ICP分析用	100mL	15,000
056-09321	Europium Standard Solution (Eu 1000)	ICP分析用	100mL	15,000

その他の元素標準液は、当社 HP をご覧下さい。  
 試薬事業トップ→分析→元素分析→単品標準液→ICP分析用元素標準液  
<https://labchem-wako.fujifilm.com/jp/category/00442.html>

## 単層グラフェン製造用

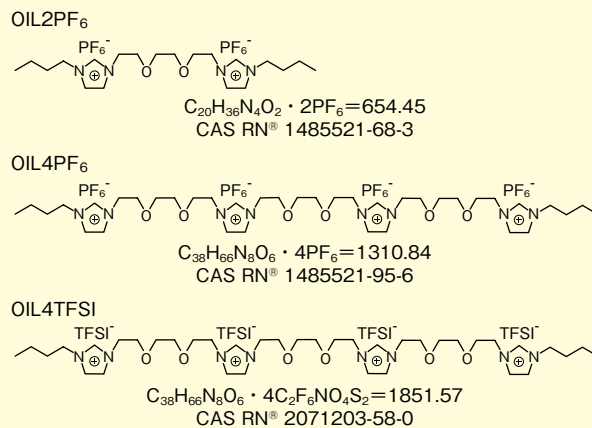
Wako

### オリゴマーイオン液体

イオン液体は、「イオンのみで構成され、100℃以下で液体状態の塩」と定義され、有機溶媒の極性と無機塩のイオン性を併せ持つ特殊な液体です。なかには融点が0℃以下の物質も存在します。

本品は東京大学の相田卓三教授の研究グループが開発した新規のイオン液体です。これらのイオン液体を使用し、グラファイトから単層グラフェンを製造することができます<sup>1,2)</sup>。

なお、本品の使用法と使用例を、2019年7月発行の本誌総説においてご紹介しています<sup>3)</sup>。



コード No.	品名	規格	容量	希望納入価格 (円)
155-03521	Oligomeric Ionic Liquid OIL2PF <sub>6</sub>	機能性有機材料用	5g	25,000
152-03531	Oligomeric Ionic Liquid OIL4PF <sub>6</sub>	機能性有機材料用	5g	60,000
159-03541	Oligomeric Ionic Liquid OIL4TFSI	機能性有機材料用	5g	60,000

※本品は東京大学から特許第6234922号のライセンスを受けて試験研究用を目的として製造・販売しています。  
 関連する用途特許として、特許第6122949号・特願2017-529952があります。当該特許をご確認の上、本製品をご使用下さい。

### 【参考文献】

- 1) 相田卓三 他：特許第6234922号
- 2) Aida, T. et al.: *Nature Chemistry*, 7, 730 (2015).
- 3) 松本道生、相田卓三：和光純薬時報, 87 (3), 5 (2019).

その他、約100種類のイオン液体を販売しています。当社HPにてカチオン種の構造ごとに分類してご紹介しています。  
 試薬事業トップ→合成・材料→イオン液体  
[https://labchem-wako.fujifilm.com/jp/category/synthesis/ionic\\_liquid/index.html](https://labchem-wako.fujifilm.com/jp/category/synthesis/ionic_liquid/index.html)

☑…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、2020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。

九州大学 大学院薬学府ライフイノベーション分野 河野 敬太

2019年11月12日に第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」が秋葉原コンベンションホールにて開催されました。ミクログリアは中枢神経系に存在する免疫担当細胞です。そのミクログリアが Hortega によって初めて解剖学的に記述されたのが、1919年のこと。そのため開催された2019年は、ミクログリアが発見されてちょうど100年というメモリアルな年であることがオーガナイザーの津田誠先生から紹介され、ワークショップの開会となりました。そんな100年の歴史を持つミクログリア研究ですが、近年の研究の進歩は特に目覚ましく、生理および病態における多彩な役割が次々と明らかになってきております。本ワークショップでは、異なる視点からミクログリア研究を行っている6名のスペシャリストから、未発表データを含めたまさに最先端の研究成果をご紹介頂きました。「-基礎から臨床へ」というサブタイトル通り、全ての演題で中枢神経系疾患（アルツハイマー病、てんかん、脳梗塞、慢性疼痛および精神疾患）とミクログリアの関わりが紹介されました。非常に知的好奇心が掻き立てられたのは特記するまでもなく、これまでに前例のない「ミクログリア創薬」への期待がより一層大きくなったワークショップでした。

最初の講演者である京都薬科大学の高田和幸先生には、全演題のイントロダクションということで、ミクログリアの歴史と機能について概説して頂いた後に、ミクログリアの発生・起源とiPS細胞を用いたアルツハイマー病治療の可能性についてご講演頂きました。アルツハイマー病は神経変性と脳萎縮を呈する認知症ですが、病態形成の引き金はアミロイド $\beta$  ( $A\beta$ ) の蓄積と考えられています。ミクログリアは $A\beta$ を貪食・除去する能力を持つため、アルツハイマー病の治療標的になりうると考えられています。しかしその一方で、ミクログリアの $A\beta$ 除去能力が加齢とともに減弱することや加齢ミクログリアそのものがアルツハイマー病を増悪させる可能性も報告されています。そこで高田先生らは、より原始的な(若い)ミクログリアの補填が病態改善に有効であると考え、幹細胞由来ミクログリア様細胞を用いた細胞治療というコンセプトを提案されています。その一環で、iPS細胞由来ミクログリア (iMicros) も開発されており、非常に興味深い画期的な技術の詳細についてもご紹介頂きました。現在は、臨床応用を目指したミクログリア移植法のアイデアも検討中とのことで、今後の研究成果からアルツハイマー病のメカニズムだけでなく、その治療も大きく前進することが期待されます。



オーガナイザーの津田 誠 先生

次に東京大学の小山隆太先生より「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解明」というタイトルでご講演頂きました。ミクログリアの重要な機能の一つにシナプスの貪食がありますが、貪食を受けた神経が細胞死を起こすのではないかという疑問や、貪食現象そのものにも懐疑的な意見がありました。小山先生はその議論に決着をつけることを目的に、リアルタイムでシナプス貪食の瞬間を捉えるため、ミクログリア・シナプス・神経の三者同時イメージングが行われています。この実験には生体に存在するミクログリアの機能や形態を*in vitro*で再現する必要があるため、小山先生はミクログリアの新しい*in vitro*培養技術の開発から行っておられます。*in vivo*ミクログリアと区別がつかないような美しい形態を持つミクログリアやそのミクログリアがシナプスを取り込む瞬間を捉えた動画(未発表データ)には感動を覚えました。この実験系を利用し、シナプス貪食のメカニズムとして、神経活動性と補体C1qの必要性を解明されており、さらにそのメカニズムが熱性けいれんモデルマウスにおいても生じていることを示されました。また、小山先生の研究は非常に多岐にわたり、精神疾患や環境汚染物質(シリカ微粒子)とミクログリアの関係についても、多数の未発



講演風景



# Wako ワークショップ 見聞録



高田 和幸 先生



小山 隆太 先生



七田 崇 先生



加藤 隆弘 先生



小泉 修一 先生

表データとともにご紹介頂きました。新しいミクログリア培養技術を利用したミクログリア機能の更なる解明と、そこで明らかになった分子メカニズムを基盤とした研究で、病態とミクログリアとの因果関係が解明されることが期待されます。

東京都医学総合研究所の七田崇先生には、脳梗塞時のミクログリアや血液細胞の挙動とそれら細胞の機能の変遷についてご講演頂きました。脳梗塞後の組織炎症は梗塞巣の拡大や病態の悪化を引き起こしますが、単純に炎症を抑制する治療では、脳梗塞後の予後は改善しません。これは炎症を引き起こすミクログリアやマクロファージが、炎症の収束期においては神経保護的な作用を持っており、炎症を抑制することでその神経保護作用も抑制されるためと考えられています。そこで七田先生は、脳梗塞後に生じる炎症を抑制するのではなく、収束を早めるという治療コンセプトを提案されています。その治療戦略に向けた研究結果として、脳梗塞後に炎症を惹起する物質(DAMPs)をミクログリアやマクロファージが除去することを見出し、その分子メカニズムも紹介して頂きました。具体的には、転写因子MAFBによって発現が制御されるMSR1とMARCOといったスカベンジャー受容体がDAMPsの排除と炎症の収束に必要であることが示されました。また、MSR1を高発現するミクログリアやマクロファージは、栄養因子IGF1を産生する組織修復細胞であることも

見出されています。さらに、既承認薬タミバロテンがMAFB→MSR1→炎症収束の経路を賦活化し、病態も改善することを示されました。七田先生は脳梗塞という複雑な病態において、病期や発現遺伝子が違うと各細胞の役割も違うことを詳細に調べられており、随所に網羅的解析を行うことで分子メカニズムまで明らかにする研究アプローチは大変勉強になりました。また、既承認薬によって病態を改善できるというデータから、今後の迅速な臨床応用に期待が高まるご講演でした。

本ワークショップのオーガナイザーである九州大学の津田誠先生からは「ミクログリアサブセットと慢性疼痛」というタイトルでご講演頂きました。末梢神経が損傷すると脊髄のミクログリアが活性化します。津田先生らは活性化ミクログリアに発現するP2X4受容体が疼痛発症に必要十分であることを示し、活性化ミクログリアの神経障害性疼痛に対する因果性が証明されました。また、P2X4受容体の下流に存在する脳由来神経栄養因子BDNFが痛み伝達神経の異常興奮を起こすことも示されています。さらに、P2X4受容体の発現を増加させるメカニズムとして、IRF8-IRF5転写因子カスケードも見出されています。このように疼痛発症におけるミクログリアの役割は詳細に解明されてきましたが、疼痛慢性期における役割はこれまでほとんど調べられていませんでした。そのような中、津田先生は、活性化終息期と考えられてきた疼痛慢性期から活性化

し始めるミクログリアサブセット(CD11c陽性ミクログリア)を見出し、その役割解明に挑んでいます。興味深いことに、CD11c陽性サブセットを除去すると疼痛状態が持続したため、同サブセットがこれまでのミクログリアとは異なり、疼痛の回復に重要な役割を持つことが示唆されました。これまで認識されていなかったミクログリアサブセットに注目することで、慢性疼痛病態の理解がさらに深まり、今後分子メカニズム等の解明や新規治療戦略の開発に繋がることも期待されます。

5人目のご講演者である九州大学の加藤隆弘先生の研究は、実験動物研究がメインであった他の5演題とは異なり、ヒトを対象としたもので、タイトルは「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」です。うつ病や自閉症スペクトラム障害患者や自殺者の脳でミクログリアの活性化が起きていることや抗精神病薬が活性化ミクログリアの炎症応答を抑制することから、加藤先生は精神疾患のミクログリア仮説を提唱されています。その解明のための一歩として、ミクログリアの活性化抑制薬ミノ



展示風景

サイクリンを投与し、無意識的行動を評価する臨床試験を行い、感情が意思決定に与える影響をミノサイクリンが調節するという興味深い結果をご紹介頂きました。精神疾患患者の脳ミクログリアの役割に関する研究における大きな課題の一つとして、その細胞機能を直接調べることが非常に困難であることが挙げられます。加藤先生はこの問題を解決するため、血中の単球細胞から遺伝子発現や形態がミクログリアに類似したミクログリア様細胞 (iMG) を作製することに成功されています。この技術を使用し、線維筋痛症患者の iMG においては ATP 刺激時の TNF- $\alpha$  の発現が疼痛スコアと相関することや、双極性障害患者の iMG の解析から遺伝子発現が躁状態とうつ状態で異なることを示されています。iMG は iPS 細胞由来ミクログリアに比べ、簡便に短期間で作製でき、多くの疾患研究に適用可能です。今後ヒトミクログリアサンプルが得づらい疾患のミクログリア解析や、バイオマーカーとして応用されることが強く期待されます。

最後の講演者は山梨大学の小泉修一

先生で、ミクログリアとの連関を切り口として、アストロサイトが脳梗塞時に虚血耐性を誘導するメカニズムについてご講演頂きました。虚血耐性とは、非侵襲的な虚血経験によって侵襲的虚血に対する抵抗性を獲得する現象です。非侵襲的虚血では神経細胞死は起きませんが、ミクログリアやアストロサイトは鋭敏に感知して活性化します。活性化したアストロサイトには P2X7 受容体が高発現しており、そのノックアウトマウスやアストロサイトの活性化を抑制したマウスでは虚血耐性が消失することから、活性化アストロサイトが P2X7 受容体を介して、虚血耐性を誘導していることが分かります。さらに、P2X7 受容体刺激によって誘導される転写因子 HIF1 $\alpha$  が虚血耐性に重要であることも見出されています。また、アストロサイトの活性化に先行してミクログリアが活性化することから、活性化ミクログリアがアストロサイトの虚血耐性を誘導することが想定されますが、小泉先生はアストロサイトを活性化するミクログリア由来分子が TNF- $\alpha$  であることを示さ

れました。虚血耐性という臨床的にも重要な現象に対して、多くの分子メカニズムを証明されており、大変興味深いご講演でした。特に、ご講演中に小泉先生が引用された「グリアは神経を救う手段を知っているのに、脳科学者は未だに知らない」という言葉 (Barres, 2008) は大変印象的で、グリア-グリア連関という新しい視点から病態解明を進める研究アプローチは大変勉強になりました。

以上6名のミクログリア研究者の最新の成果を拝聴させて頂いたのですが、その全てが情報量の多いご講演で、50分という比較的長い講演時間を忘れるほど聞き入ってしまいました。また、質疑応答の時間のみならず、休憩中やワークショップ終了後にも活発なディスカッションが行われており、私のみならず聴講された多くの先生方の知的好奇心を満たす、大変充実したワークショップでした。最後に、本ワークショップの開催にご尽力頂きました富士フイルム和光純薬株式会社の皆様へ深く御礼申し上げます。

## 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）  
会 場：秋葉原コンベンションホール  
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

### 〈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説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-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



片山 正夫 (1877. 9. 11 ~ 1961. 6. 11)

大阪市立科学館 小野 昌弘

1. はじめに

「兄の机の上には、いつも化学本論上下と法華経が載っていて、どれほどこの本を大切にしたらしくなかった。」

この言葉を語ったのは、宮沢清六氏。あの詩人・童話作家として有名な宮沢賢治の弟さんが兄の思い出の一つとして語った言葉です。宮沢賢治といいますと、「雨ニモマケズ」などの文章や、「銀河鉄道の夜」などの作品が思い浮かびますので、文系の人物では？ と思ひ込んでしまいます。「法華経」はまだしも、「化学本論」という言葉に違和感を抱く方が多いのではないのでしょうか。

何故、清六さんの言葉の中に「化学本論」という言葉が出てきたのでしょうか。そして化学本論はどのようなものだったのでしょうか。そして、その著者は？

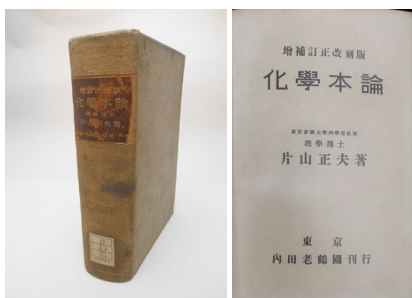


図1. 化学本論 (第7版) (大阪市立科学館蔵)

2. 片山正夫

宮沢賢治が「法華経」と同様に生涯大切に「化学本論」は、1915 (大正4) 年に発行された化学の教科書です。

著者は当時東北大学の教授片山正夫でした。ここで片山正夫がどのような化学者だったのかをみていきましょう。

片山は1877 (明治10) 年岡山県都窪郡 (現：倉敷市) 茶屋町早島新田に、父清吾の元、長男恒夫の後、次男として誕生しました。実家は、代々の庄屋を継ぐ名家でした。

岡山中学校へ入学するも、1891 (明治



図2. 片山正夫 (資料提供：東北大学)

24) 年に東京の共立中学校 (現：開成中学校・高等学校) へ兄の勧めもあり転校します。これは、その先に第一高等学校へ入学したことから、すでに自身の先を見据えての転校だったと思われる。そしてそこで当時東京大学教授でもあった一高の教師 (後に第4代京都大学総長)、久原躬弦の化学の授業を受けることもできました。久原は、出身が津山藩ということもあり、片山が東京で同郷の、しかも化学の専門家として活躍していた久原に対する強い憧れを抱いたことは想像に難くありません。

それは、東京大学に入ってから、その片山の進路が化学であったことから久原の化学の授業が影響を与えていたであろうことが想像できます。

東京大学に入学した片山は、化学科に進み、そこで櫻井錠二や池田菊苗らに物理化学を学ぶことになりました。櫻井は、特に日本に物理化学を最初に導入した人物として知られています。櫻井は、自身が東京開成学校時代に化学を学んだロバート・アトキンソンの師匠でもあるアレクサンダー・ウィリアムソンのいるイギリスのロンドン大学へ留学 (1876-1881) します。その当時イギリスをはじめとするヨーロッパは原子論の論争が起こっていたころです。

また、櫻井の弟子であり、義弟でもあった池田は物理化学の研究をしていましたが、ヨーロッパに留学した時、オストワルドの研究室にいたこともあり、当時のオストワルドの影響を受け、原子論は「仮定」であることを注意する必要があると、懐疑的な見方を示していました。もっとも、1911年ごろには池田も、原子論はエネルギー論の一部であると原子説を受け入れています。

さて、そのような環境の中、片山は、1900 (明治33) 年東京帝国大学化学科を卒業し、2年間大学院で研究を続け、1902 (明治35) 年に東京高等工業学校、現在の東京工業大学の教授として着任し、電気化学の講義を担当しました。

1905 (明治38) 年秋から1909 (明治42) 年初めにかけて文部省在外研究員としてヨーロッパに留学します。

まず、チューリッヒ工科大学のリチャード・ローレンツのもとで主に電気化学の研究に従事し、可逆電池の起電力がギブスの自由エネルギーであることを示しました。次いで、ベルリン大学のヴァルター・ネルンストのもとでアーネスト・ボーデンシュタインとともに二酸化窒素および硫酸の分解を通じて、化学平衡の研究を行いました。

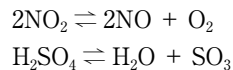


図3. 櫻井錠二 (ウィキペディア\*から)   
 \*<https://ja.wikipedia.org/wiki/櫻井錠二> (2019年10月18日閲覧)



帰国後は、再び東京高等工業学校に戻りますが、1907（明治40）年の東北帝国大学設立の勅令により発足した東北大学において、1911（明治44）年理科大学が開設されたことから、片山は、その化学科教授として着任しました。1911年開設当時の化学科は、第一講座（無機化学）が、幻の元素“ニッポニウム”を発見し、のちに東北大学総長も務めた小川正孝、第二講座（有機化学）は、漆の研究によるウルシオールの構造決定と合成の成功をはじめとする、日本の有機化学の創始者として知られ、のちの大阪大学総長も務めた真島利行が担当しました。

そして第三講座（理論化学）に片山正夫が就任したのです。この東北大学で片山はそれまで自身が深く関わった研究者たち、すなわち、化学を「明快」に示した久原躬茲、化学は究極的には「原子の運動である」と喝破した櫻井錠二、「最先端」の化学を学んだローレンツ、ネルンストら先達の教えと自身の研究から得たことをまとめるような形で1915（大正4）年に物理化学の教科書「化学本論」を出版しました。この「化学本論」は、熱力学、エネルギー論、<sup>こうろうしつ</sup>膠朧質の優れた記述以外にも、当時最先端の原子論を取り上げその内容を解説しています。

### 3. 東北大学時代 化学本論 片山の式

化学本論は10編35章からなる1000ページを超える大作です。内容は、それまでに書かれた「科学」分野全体の教科書としても最新・最善のものであると言われました。現在の私たちが読んでも、ほぼそのまま十分通用するものです。

内容は、片山がヨーロッパで研究を行っていた電気化学も詳しく書かれています。特に注力して書かれたと思われる部分は、自由エネルギーを取り上げて解説する熱力学、特にその第二法則に関する部分と原子分子論についてです。

	O		I		II		III		IV		V		VI		VII		VIII							
1	H 1.008																							
2	He 4.00	Li 6.94		Be 9.1	B 10.6		C 12.00	N 14.008		O 16.00	F 19.0													
3	Ne 20.2		Na 23.00		Mg 24.32		Al 27.1		Si 28.3		P 31.04		S 32.07		Cl 35.46									
4	Ar 39.9	K 39.10		Ca 40.07		Sc 45.1		Ti 48.1		V 51.0		Cr 52.0		Mn 54.93		Fe 55.84			Co 58.97		Ni 58.68			
5			Cu 63.57		Zn 65.37		Ga 70.1		Ge 72.5		As 74.96		Se 79.2		Br 79.92									
6	Kr 82.92	Rb 85.45		Sr 87.63		Y 89.33		Zr 90.6		Nb 93.1		Mo 96.0						Ru 101.7		Rh 102.9		Pd 106.7		
7			Ag 107.88		Cd 112.40		In 114.8		Sn 119.0		Sb 120.2		Te 127.5		I 126.92									
8	Xe 130.2	Cs 132.91		Ba 137.37		La 139.0		Ce 140.2																
9			Pr 140.9		Nd 144.3		— Sm 150.4		Eu 152.0		Gd 157.3		Tb 159.2		Dy 162.5		Ho 163.5							
10			Er 167.7		Tm 169.9		Yb 173.5		Lu 175.0		—		Ta 181.5		W 184.0		—		Os 190.9		Ir 193.1		Pt 195.2	
11			Au 197.2		Hg 200.6		Tl 204.0		Pb 207.10		Bi 208.0		Po —											
12	Nt 222.4			Ra 226.4		Ac —		Th 232.15		Bv —		U 238.5												

図4. 化学本論の中の周期表

表. 化学本論項目

化学本論 1915(大正4)年 第1版		
第一編 総論		
第一章 緒論	第二章 基本的化学量	第三章 週期律及び同形律
第二編 エネルギー論		
第四章 エネルギー、熱及び仕事	第五章 比熱及び反応熱	第六章 熱と仕事の変移
第七章 理想気体と熱力学	第八章 分子運動説	
第三編 気相論		
第九章 気体の混合	第十章 質量作用の定律	第十一章 親和力と温度
第十二章 気体液体の関係		
第四編 液相論		
第十三章 液体	第十四章 稀薄溶液	第十五章 電気解離
第十六章 電離の平衡		
第五編 固相及び多相論		
第十七章 個体の平衡	第十八章 純相及び稀薄溶液の多相系	第十九章 化学親和力と反応熱
第六編 一般平衡論		
第二十章 相律	第二十一章 二成分系の平衡	第二十二章 三成分系の平衡
第七編 速度論		
第二十三章 均一系の反応速度	第二十四章 不均一系の反応速度	第二十五章 反応速度の計算
第八編 界面化学		
第二十六章 界面の平衡及び運動	第二十七章 散乱系	第二十八章 膠朧液
第九編 電気化学		
第二十九章 濃淡電池	第三十章 電溶圧	第三十一章 熱量と電動力
第三十二章 分極及び電気分解		
第十編 原子分子論		
第三十三章 電子及び放射能	第三十四章 光化学	第三十五章 化学構造及び化学量論
索引		

化学本論の第1版の序文に片山は、「～今や放射能の研究、電子説、量子説等の発達は、飛行機の襲来の如く学者を悩ましつつある。」と記しました。

初版発行は1915（大正4）年ですが、片山がこの化学本論を執筆していたのはおそらく東北大学に赴任した1911年以降のことになります。この時期は、放射線の存在や、原子・分子

の証明など、現代の化（科）学を支える基礎の部分が明らかにされつつあった、とても熱く激しい時代でした。

そして、原子論については、アインシュタインの「ブラウン運動の理論」が発表され（1905）、ペランによる実証実験（1908）が行われたばかりの時代で、ようやく原子・分子が実在するものとして、化学の中で取扱われるよう

になってきたころです。先に紹介したように、片山がヨーロッパに留学していたのは、まさにこの1905～1909年のことですから、当時の科学が大きく変換されつつあった真ただ中で、片山はじかに原子や分子の実在性を示す議論や論文に触れていたと思われる。惜しむらくは、化学本論では、その後、科学の発展にもう1つ大きなステップを踏んだ量子論にまでは踏みこめなかったことです。例えば、1913年にニールス・ボーアが発表した水素の原子模型に表される量子論などは序文に示されている程度です。なぜそんなことになったのかというと、1914年に始まった第1次世界大戦のせいです。

戦争のため、その前後の科学的な情報はなかなか国内に入ってこなくなりました。当時の量子論の情報が片山にどこまで届いており、理解されていたのでしょうか。

なお、この点は片山も気にしていたらしく、のちの著作「分子熱力学総論」で量子論を取扱っています。

それでも、片山は、「化学本論」の中で細心の注意を払いながら、放射能の発見が原子構造の解明に役立つこと、また、原子の中心には正電気を持つ重い中心があり、その周りに電子が土星環のように運動しているであろうことなどを記しています。

熱力学においては、主に第二法則を取り上げ、ヘルムホルツの自由エネルギーとギブスの自由エネルギーを中心に語り、その内容が何章にもわたって繰り返し登場してきます。

そして1915年は、もう1つ片山にとって重要な研究成果を発表しています。それが片山の式 (Katayama's equation) です。これは、液体の表面張力に対して、温度の依存性をもつことを示す式です。

調べようとしている物質の表面張力を  $\sigma$ 、分子量を  $M$ 、液体の密度を  $\rho_l$ 、飽和蒸気の密度を  $\rho_v$ 、臨界温度を

$T_c$ 、絶対温度を  $T$  としたとき

$$\sigma \left( \frac{M}{\rho_l - \rho_v} \right)^{2/3} = k(T_c - T)$$

と示すことができます。(  $k$  : 液体の種類によらない定数) この式は、まさに、原子分子論に関心を寄せ、その後の化学に欠くことのできない理論になることを見越していた片山が、液体表面の分子によって生じる表面張力についての見事な考察をしていた式といえるでしょう。

#### 4. 化学本論と宮沢賢治

片山の描いた化学本論は、その後の化学で活躍する様々な学者だけでなく、宮沢賢治にも大きな影響を与えました。

宮沢賢治が盛岡高等農林学校 (現: 岩手大学) に入学したその年に化学本論が発行されました。そして、賢治は、化学そのものをこの教科書できちんと学んだことも事実ですが、片山の記した熱力学の理論や膠朧質という言葉、そしてその内容に強くインスピレーションが刺激され、賢治の作品に反映されています。

例えば、「農民芸術概論綱要」という文章にはこのような一文があります。「……われらに要るものは銀河を包む透明な意志 巨きな力と熱である……」という一文。これは何を意味しているのでしょうか。賢治が記した文章なので、そう簡単には解釈できませんけれども、賢治は法華経の影響を強く受けていますから、法華経と化 (科) 学の融合によって生み出された世界観、思想であることは容易に想像がつかます。

そして、賢治が大事にしていた「化学本論」に示されていた化学熱力学第二法則を想像して記したのでは? と考えられます。「一般に自然な状態にある物体系は熱平衡の状態に移る。そして、熱平衡になれば、外からの作用がない限り、変化は起きない」これは、

自然における熱力学の不可逆性を言っています。つまり、自然の抗いがたい一つの法則、賢治が記した「透明な意志」です。

賢治の作品には、このような熱力学に関連する過冷却、気圏 (稀薄気体)、可逆過程などの言葉が出てきます。賢治は、化学熱力学を学ぶことで、この世を貫通し、統率しているもの「透明な意思 = 自然界の法則」をとらえようとしていたのかもしれませんが。

おそらくこの自然科学を解き明かそうとしている熱力学の記載内容が、強く賢治をひきつけ、座右の書となっていたのではないかと思います。

他にも片山の造語である膠朧質 = コロイドについても賢治の作品にはよく出てきます。当時は、膠状質、朧状質などの表記がありましたが、片山が化学本論を執筆するにあたってこの膠朧質という言葉を作り出したのです。他の当時の教科書にはこの表記はないようですから、化学本論が賢治に大きな影響を与えたといってもよいでしょう。

例えば、詩集「春と修羅 第三集」の「停留所にてスキトンを喫す」という詩の中で、

雲の形の膠朧体  
などと記しています。もちろんこの一か所だけでなく、他の作品でもよく



図5. 宮沢賢治 (資料提供 林風舎)

使っています。

## 5. 東京大学教授そして理化学研究所

片山は、その後1919（大正8）年に東京大学に異動し、櫻井錠二の後継者として、理学部化学科第2講座の担任となり、教育指導と研究に励み昭和13年に定年退官しています。そして、1922（大正11）年には理化学研究所の主任研究員を兼務します。理化学研究所はこの年から研究室制度を発足させ、その主任研究員は、テーマ設定だけでなく、予算、人事に大幅な自由裁量が与えられ、さらに帝国大学教員との兼任が認められ、研究室を帝国大学に設置することも認めていました。

この研究室制度は理化学研究所をとても活性化しましたが、財政難にもなるという問題点がありました。しかしこの点に関しては、鈴木梅太郎らによるビタミンAの発見とそれを販売し利益を得るというシステムを作った当時の理化学研究所所長、大河内正敏の努力により、解消されました。

片山のこの東京大学教授兼理化学研究所主任研究員時代には、プランクの量子化説、ボーア原子模型などに始まる量子論がさらに発展していた時代です。

1926年のシュレーディンガー方程式による、水素原子の理解、1927年のハイトラーとロンドンによる水素分子の理解。いわゆる化学結合を量子力学的に取扱った最初の理論が発表されました。

1928年には、ディラックが電子の相対論的な量子力学を記述する方程式としてディラック方程式を作り出すなど怒涛のように量子論が構築されました。片山はこれら理論を理解することだけでなく、化学に量子論を組み込むことを行った最初の人物です。その片山の下で学んだのは、玉虫文一、水島三一郎、千谷利三などその後の化学会を背負って立つ人物が多くいらっしゃいます。



図6. 片山正夫とハイゼンベルグ並びにディラックらと  
（左から）仁科芳雄、片山正夫、大河内正敏、ハイゼンベルグ、長岡半太郎、ディラック、本多光太郎、杉浦義勝 1930年9月理化学研究所にて（写真提供：理化学研究所）

片山は自身の研究もさることながら、後進の者が研究の道に進みやすく、また活躍できるように力を注いでもいたといわれています。それは、定年後に出身中学校であった開成中学校の校長を8年ほど勤めていたことからわかります。

自身の研究と後進のために「化学本論」を執筆し、当時の最先端の原子論や量子力学についても慎重かつ大胆に取り込み日本の物理化学そして化学全体を発展させた片山正夫。日本の化学界にとって、とても重要な人物です。

### 【参考文献】

- 1) 片山正夫：「化学本論」（内田老鶴圃）（1915、1924）。
- 2) 宮沢清六：「兄のトランク」（ちくま文庫）（1991）。
- 3) 斎藤文一：「宮沢賢治とその展開：氷室素の世界」（国文社）（1976）。
- 4) 太田進：「片山正夫」（岡山県立岡山朝日高等学校）（2015）。
- 5) 廣瀬正明：「片山正夫著『化学本論』と賢治作品の接点」, 花巻宮沢賢治学会イーハトーブセンター, **19**, 119 (2009)。
- 6) 小野昌弘、桜井弘：「化学と宮沢賢治」（大阪市立科学館）（2016）。



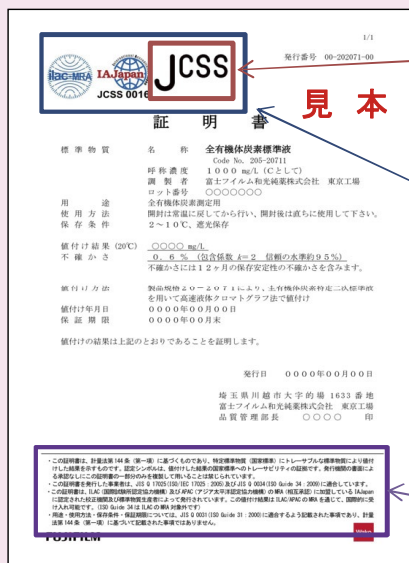
# 水道法対応JCSS実用標準液 ラインアップ追加

Wako

## かび臭物質 2 種混合標準液 銀標準液

水質基準に関する省令の一部改正により、試薬における標準原液の規定として、計量法に基づく証明書が添付され、かつ各号の別表に定める標準原液と同一濃度のものを水道法の試験に用いることができるようになりました。今回、水道法に対応した「かび臭物質 2 種混合標準液」と「銀標準液」を JCSS (Japan Calibration Service System) として追加しました。

JCSS は計量法トレーサビリティ制度のことであり、国家計量標準にトレーサブルな計量標準の供給を目的とした日本独自のシステムです。当社は校正事業者かつ標準物質生産者として NITE/IA Japan (独立行政法人製品評価技術基盤機構 / 認定センター) から認定を受けており、当社の JCSS 実用標準液には校正証明書が添付されています。



### JCSS標準

校正結果が国家計量標準へと繋がっていることを公に証明しています。

### JCSS認定シンボル

国際MRA (相互承認) 対応の認定事業者が発行できる証明書であることを示します。

ILAC (国際試験所認定協力機構) 及びAPAC (アジア太平洋認定協力機構) とMRA (相互承認) しているIA Japanに認定を受けていることから、国際的に受け入れ可能です (ISO 17034:2016はILACのMRA対象外です) ということに記載しています。

コード No.	品名	組成	規格	容量	希望納入価格(円)	対応する検査方法
134-18901	かび臭物質2種混合標準液(メタノール溶液)	2-メチルイソボルネオール ジェオスミン 各 100mg/L	JCSS	2mL	14,000	水質基準 (別表) 25、26、27、27 (2)
191-18691	銀標準液 (Ag 1000)	Ag : 1,000mg/L 5w/w% HNO <sub>3</sub>	JCSS	100mL	照会	要検討

上記以外にも多数のJCSS対応品を取揃えています。詳細は当社HPをご覧ください。

試薬事業トップ→分析→JCSS標準液

<https://labchem-wako.fujifilm.com/jp/category/analysis/jcss/index.html>

☐…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。  
 特定 ☐…特定毒物 ☐…毒物 ☐…劇物 ☐…毒薬 ☐…劇薬 ☐…危険物 ☐…向精神薬 ☐…特定麻薬向精神薬原料  
☐…化審法第一種特定化学物質 ☐…化審法第二種特定化学物質 ☐…化学兵器禁止法第一種指定物質 ☐…化学兵器禁止法第二種指定物質 ☐…カルタヘナ法  
☐…賞せい剤取締法 ☐…国民保護法  
 掲載内容は、2020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。

取載されている試薬は、試験・研究の目的にのみ使用されるものであり、「医薬品」、「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. 88 No. 1

2020年1月15日発行

発行責任者 吉井陽市

編集責任者 鎌田裕子

発行所 富士フイ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](mailto: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.

■富士フイ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](mailto: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