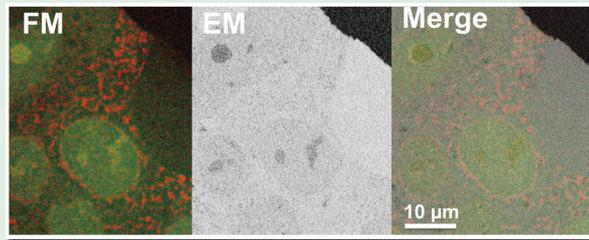


和光純薬時報

April 2021
Vol.89 No.2



【総説】

「エポキシ樹脂包埋生物試料のマルチカラー In-resin CLEM」

谷田 以誠、山口 隼司、角田 宗一郎、内山 安男…………… 2

〈テクニカルレポート〉

「創薬の安全性試験におけるヒト iPS 細胞由来心筋細胞を用いた評価の重要性」

森村 馨…………… 6

「エクソソーム除去 FBS 中に残存するエクソソーム量の評価—高感度エクソソーム検出技術が可能にした新たな品質保証—」

笹本 宏大…………… 8

【連載】

〈遺伝子解析 新技術とその応用〉 **最終回**

「第 4 回 トランスクリプトーム・エピゲノムの統合解析」

古賀 友紹、中尾 光善…………… 10

〈ミクログリア研究の最前線—基礎から臨床へ—〉

「第 4 回 ミクログリア・マクロファージによる脳梗塞後の炎症と修復の制御メカニズム」大谷 健人、七田 崇…………… 12

〈ヒト iPS 細胞由来分化細胞の創薬応用〉 **新連載**

「第 1 回 ヒト iPS 細胞由来心筋細胞を用いた心収縮評価システムの最新動向」

澤田 光平…………… 15

【化学大家】

「フェリックス・ホッペ=ザイラー」

根矢 三郎…………… 29

【製品紹介】

有機合成

水溶性アクリルアミドモノマー…………… 18

核酸合成用アクチベーター…………… 19

分析

ICP 分析用単元素標準液…………… 20

水道法対応 JCSS…………… 20

合成ゼオライト…………… 22

ポジティブリスト関連農薬・動物用医薬品標準品…………… 22

酸性プロテアーゼ測定キット…………… 23

イメージング

マルチカラー In-resin CLEM 関連製品…………… 5

細胞生物

Tau 凝集阻害剤「KT-430」…………… 23

COA-CI…………… 25

その他

除菌ドライシート…………… 19

免疫

Mature BDNF ELISA キットワーク、高感度品…………… 24

レビス® Human IL-7 ELISA Kit…………… 24

遺伝子

エクソソーム関連製品…………… 9

次世代シーケンス受託サービス…………… 11

MagCapture™ エクソソームアイソレーションキット PS Ver.2…………… 26

EV-UP™ MSC EV産生用基礎培地, AF、

EV-UP™ MSC EV産生用サプリメント, AF…………… 27

CD9/63/81-Capture ヒトエクソソーム ELISA キット

(ストレプトアビジン HRP)…………… 32

培養

医薬品候補化合物の心毒性評価試験サービス…………… 7

iCell® 心筋細胞…………… 17

SRV™ iPSC Vector シリーズ…………… 28

【お知らせ】

水質試験用試薬カタログ 2020年版のご案内…………… 21

和光純薬時報 Vol.89 No.1 訂正案内…………… 21

はじめに

光線-電子相関顕微鏡法 (Correlative Light and Electron Microscopy ; CLEM) は、同一試料を蛍光顕微鏡および電子顕微鏡で観察し、蛍光顕微鏡による蛍光タンパク質により標識された標的タンパク質・オルガネラの細胞内局在情報 (あるいは、標的細胞の組織内位置情報) と電子顕微鏡による超微形態情報を相関し解析する方法である。近年、超解像蛍光顕微鏡により蛍光タンパク質の局在が1分子単位で解析できるようになり、CLEMにおける微細レベルの一致精度は、より厳密になる必要が出てきた。そのため樹脂包埋した生物試料から作成した同一の超薄切片から蛍光顕微鏡と電子顕微鏡で同時観察し、より相関性を高める In-resin CLEM の必要性が出てきた。In-resin CLEM においては、理論上は電子線と蛍光波長の差による違い以外は相関性が担保される。しかしながら、これまでの In-resin CLEM では、超微形態の保持性が高いエポキシ樹脂ではなく、免疫電子顕微鏡に汎用されるメタアクリレート系の Lowicryl 樹脂、アクリル系の LR-white 樹脂やヒドロキシエチルメタアクリレート系 Technovit 樹脂などを用いた方法であった。そのため、超微形態保持性と汎用性に難があり、エポキシ樹脂包埋試料を用いた In-resin CLEM が待たれていた。近年、エポキシ樹脂包埋試料の In-resin CLEM に利用できる蛍光タンパク質として、mEosEM あるいは mKate2-GGSGSL (CLEM-Red) を使った単色 In-resin CLEM が報告された^{1,2)}。しかしながら、共局在やオルガネラ局在解析など蛍光顕微鏡で汎用されているような細胞生物学的解析のためには、少なくとも2色以上のマルチカラー In-resin CLEM が必要である。今回は、緑色蛍光タンパク質および遠赤色蛍光タンパク質を用いて、

エポキシ包埋樹脂生物試料を用いたマルチカラー In-resin CLEM について概説する。

エポキシ樹脂生物試料での解決すべき問題点

エポキシ樹脂は生物試料の形態保持性に関しては、歴史的・汎用的に超微形態観察に最も適した樹脂の一つである。In-resin CLEM におけるエポキシ樹脂の問題点は、自家蛍光を持つことであった。しかしながら、100nm 厚の超薄切片を作成して自家蛍光を観察すると、緑色の自家蛍光はそれほど強くなかった。おそらく100nm という薄さのためだと考えられる。そこで、エポキシ樹脂包埋試料をブロックのまま観察することは難しくても、エポキシ樹脂包埋試料作成まで緑色蛍光タンパク質の蛍光が保持できれば、超薄切片での緑色蛍光タンパク質の蛍光を観察できる可能性があると考えた。このために、必要な蛍光タンパク質の条件としては、グルタルアルデヒド耐性、四酸化オスミウム処理耐性、エタノールによる脱水耐性、エポキシ樹脂重合反応 (60℃、72時間) 耐性である。特に四酸化オスミウム処理耐性とエポキシ樹脂重合反応は、蛍光タンパク質にとっては、蛍光を大きく失活させる条件であるため、In-resin CLEM を行うための大きな問題点となっていた。

マルチカラー In-resin CLEM のために必要な蛍光タンパク質の選定

これまで、エポキシ樹脂包埋試料の In-resin CLEM に使える緑色蛍光を発する蛍光タンパク質として、mEosEM が報告されていた¹⁾。mEosEM はサボテンサンゴ由来の EosFP からの改変タンパク質で光変換可能な蛍光タンパク質 mEos4b のエポキシ樹脂耐性変異体である。緑色蛍光として最大励起波長 505nm、最大蛍光波長 516nm、

赤色蛍光として最大励起波長 570nm、最大蛍光波長 580nm である。エポキシ樹脂内では緑色蛍光を示し、赤色蛍光を示さない、と報告されている。mEosEM が利用できれば、話は簡単であったが、HeLa 細胞内に mEosEM を発現させて、電子顕微鏡試料作成に必要な固定条件 (通常、2~4% パラホルムアルデヒド+0.2~2.5% グルタルアルデヒド固定液) と四酸化オスミウム処理での緑色蛍光の変化を観察したところ、mEosEM は四酸化オスミウム処理で蛍光が著しく減衰した。少なくとも通常 GFP や FITC 観察に用いられている汎用フィルターセットを用いた観察条件では、mEosEM は四酸化オスミウム処理後のエタノールによる脱水処理、エポキシ樹脂重合反応 (60℃、48-72時間)、エポキシ樹脂の自家蛍光のバックグラウンドに対抗できるほどの蛍光強度が保持できないと判断した。

そこで、2.5% グルタルアルデヒド処理後に蛍光強度が mEosEM よりも強く、四酸化オスミウム処理後の蛍光保持率が mEosEM より高い蛍光タンパク質をスクリーニングした。このときに、グルタルアルデヒド固定・四酸化オスミウム処理の際の洗浄液として、HB 溶液を用いた³⁾。その結果、四酸化オスミウム処理後でも、細胞内で CLEM-Green (CoGFP variant 0) と mWasabi が比較的よく緑色蛍光を保持できていた^{3,4)}。CLEM-Green は、ウミサボテンから単離された緑色蛍光タンパク質 CoGFP の単量体型に改変された亜種で、酸性条件下でも蛍光が強く保持される性質を持つ⁴⁾。mWasabi はウミトサカから単離された青緑色蛍光タンパク質 cFP484 から改変された単量体型緑色蛍光タンパク質である⁵⁾。遠赤色蛍光タンパク質も同様のスクリーニングを行った結果、CLEM-Red に加えて、mCherry2 も四酸化オスミウム処理後でも明るい蛍光を保持できた⁶⁾。

エポキシ樹脂包埋試料の作成には、四酸化オスミウム処理後にエタノール脱水、エポキシ樹脂重合反応が必要である。そのために、脱水処理前に行うだけで、蛍光を回復する必要があった。TUK for multicolor 溶液で固定細胞を処理すると、緑色蛍光および赤色蛍光が部分的に回復できたため、この処理を四酸化オスミウム処理後に行うことにした。これまでにLR-white樹脂包埋の植物試料でNa₂CO₃や蛍光退色防止剤によりGFPの蛍光が回復するとの報告がある⁷⁾。しかしながら、Na₂CO₃は蛍光がある程度回復するが、数十分～数時間で蛍光が減衰するためにエポキシ樹脂重合反応(60℃、72時間)に耐えられないと判断した。また、蛍光退色防止剤の場合は、蛍光回復以前に、塩の析出と粘性が問題であった。

マルチカラー In-resin CLEM の実際

CLEM-Green、mWasabi、mCherry2がCLEM-Red同様にIn-resin CLEMに応用可能か否かを調べるために、それぞれのタンパク質をHeLa細胞に発現させて、グルタルアルデヒド固定、四酸化オスミウム処理後に、エタノール脱水、エポキシ樹脂重合反応まで行い、100nm厚の超薄切片を作成し、蛍光顕微鏡によりそれぞれのタンパク質の蛍光が観察されるか否かを調べた。蛍光観察の際には、退色防止剤の代わりに、TUK for multicolor 溶液を用いて観察した。その結果、いずれのタンパク質でも蛍光が観察され、同時に電子顕微鏡を用いて、電子顕微鏡観察が可能であった(図1)。

更に、オルガネラ局在型蛍光タンパク質を作成し、これらのタンパク質をHeLa細胞に発現させ、蛍光タンパク質標識したオルガネラのIn-resin CLEMが可能か否かを調べた。エポキシ樹脂包埋生物試料の100nm厚の超薄切片において蛍光顕微鏡を用いて、ミトコ

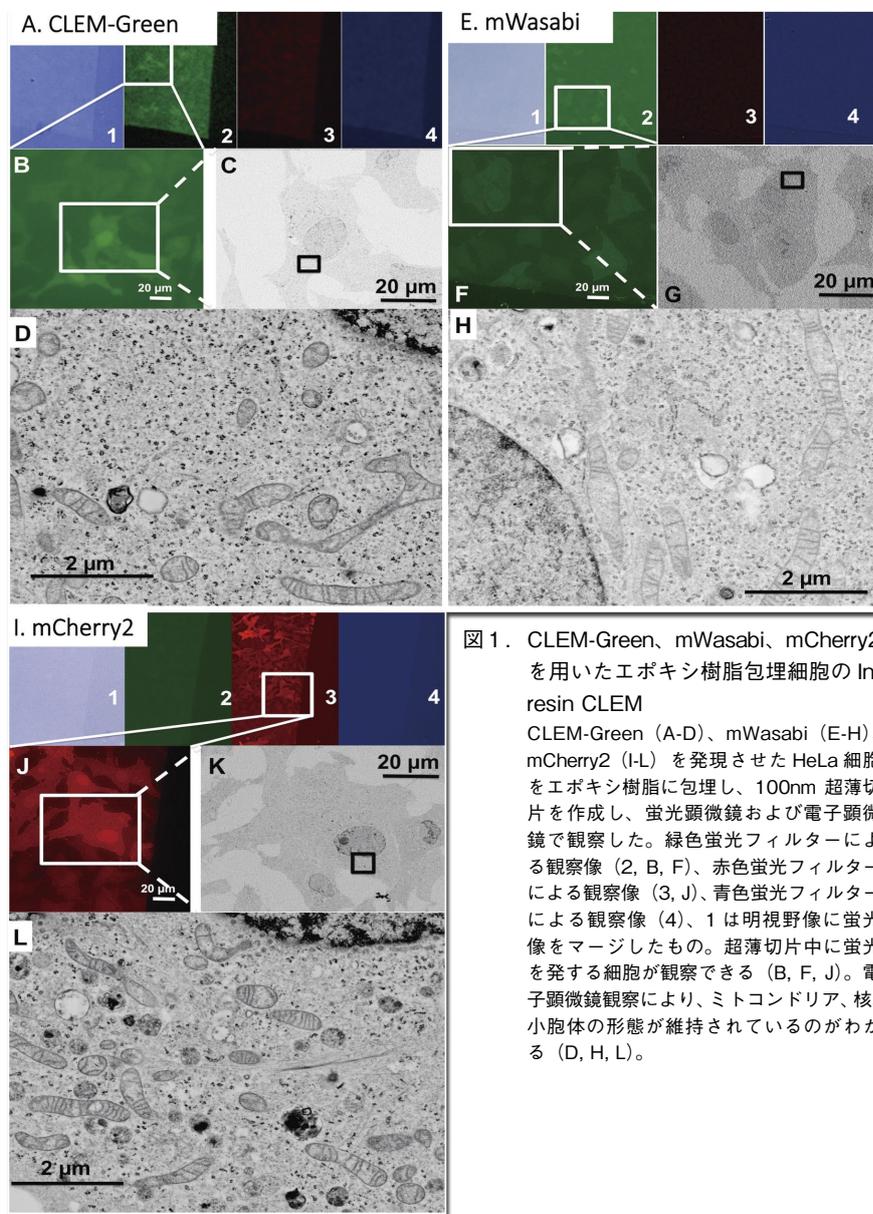


図1. CLEM-Green、mWasabi、mCherry2を用いたエポキシ樹脂包埋細胞のIn-resin CLEM

CLEM-Green (A-D)、mWasabi (E-H)、mCherry2 (I-L)を発現させたHeLa細胞をエポキシ樹脂に包埋し、100nm超薄切片を作成し、蛍光顕微鏡および電子顕微鏡で観察した。緑色蛍光フィルターによる観察像(2, B, F)、赤色蛍光フィルターによる観察像(3, J)、青色蛍光フィルターによる観察像(4)、1は明視野像に蛍光像をマージしたもの。超薄切片中に蛍光を発する細胞が観察できる(B, F, J)。電子顕微鏡観察により、ミトコンドリア、核、小胞体の形態が維持されているのがわかる(D, H, L)。

ンドリア(図2および3)、核(図2および4)、小胞体(図3および4)について多色蛍光観察が可能であった。また、同一切片を用いて、電子顕微鏡観察を行ったところ、ミトコンドリア、核、小胞体特有の形態が観察された(図2-4)。培養細胞において、小胞体の超微形態は形態保持が難しいオルガネラであるが、きちんと形態保持されていた。これらの蛍光シグナルと電子顕微鏡像を相関させると、良い相関性が得られた。このことは、緑色蛍光タンパク質と遠赤色蛍光タンパク

質を用いてエポキシ樹脂包埋生物試料を用いたマルチカラーIn-resin CLEMが可能となったことを示している。

おわりに

このように緑色蛍光および赤色蛍光タンパク質を用いて、エポキシ樹脂包埋試料を用いたマルチカラーIn-resin CLEMが可能となった。同一切片を用いて、蛍光顕微鏡像と電子顕微鏡像を観察するため、CLEMの相関精度は、飛躍的に上昇した。理論的には電

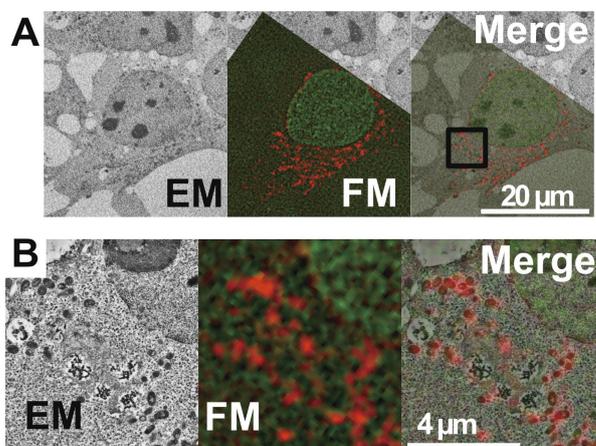


図2. 核局在 CLEM-Green とミトコンドリア局在 mCherry2 を用いた In-resin CLEM
核局在 CLEM-Green とミトコンドリア局在 mCherry2 を発現させた HeLa 細胞を用いた In-resin CLEM。電子顕微鏡像 (EM) と蛍光顕微鏡像 (FM) が良い相関を示している (Merge)。B は A の拡大図。

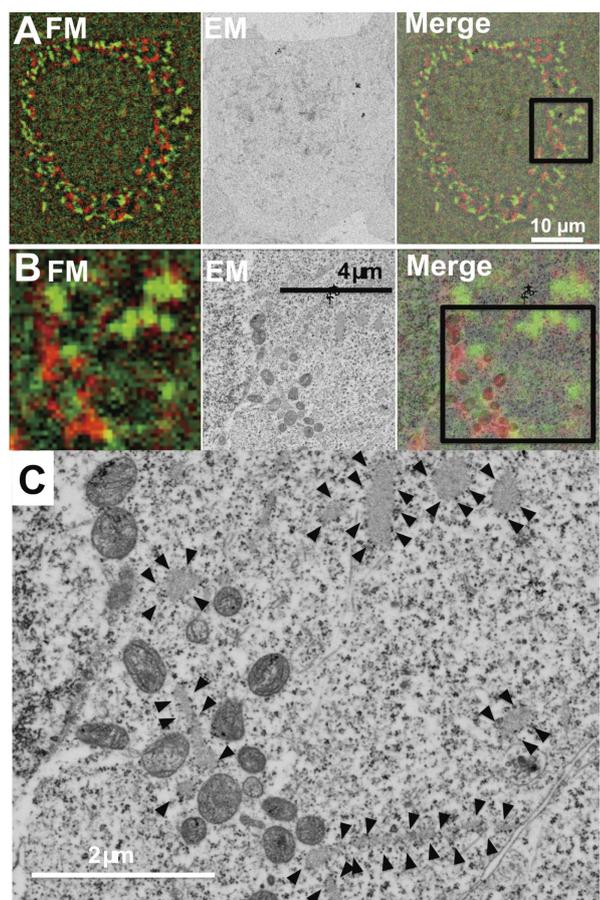


図3. 小胞体局在 mWasabi とミトコンドリア局在 mCherry2 を用いた In-resin CLEM
小胞体局在 mWasabi とミトコンドリア局在 mCherry2 を発現させた HeLa 細胞を用いた In-resin CLEM。電子顕微鏡像 (EM) と蛍光顕微鏡像 (FM) が良い相関を示している (Merge) (A, B)。C では小胞体 (矢頭) の形態が保持されているのがわかる。

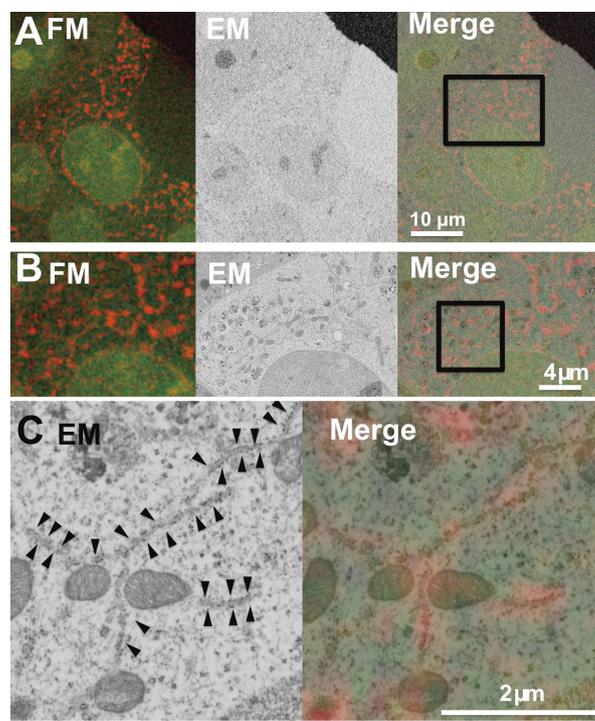


図4. 核局在 CLEM-Green と小胞体局在 mCherry2 を用いた In-resin CLEM
核局在 CLEM-Green と小胞体局在 mCherry2 を発現させた HeLa 細胞を用いた In-resin CLEM。電子顕微鏡像 (EM) と蛍光顕微鏡像 (FM) が良い相関を示している (Merge)。C では赤色蛍光に対応する位置の小胞体 (矢頭) の形態が保持されている。

子線と光線の波長の違いによる歪みに限定される。また、蛍光シグナルの Z 軸最大分解能が超薄切片的の厚みに限定されるために、3D In-resin CLEM への応用が現実的になってきた。

マルチカラー In-resin CLEM と称したが、まだ2色の蛍光タンパク質が利用できたにすぎない。CLEM-Green、mWasabi、mCherry2、CLEM-Red に共通の因子が何かわかれば、In-resin CLEM に利用できる蛍光タンパク質をより効率的にスクリーニングできるのであるが、共通因子は未だ不明である。青色-シアン系蛍光タンパク質もこれまでのところ、エポキシ樹脂包埋試料を用いた In-resin CLEM に利用可能な蛍光タンパク質は見つかっていない。エポキシ樹脂の自家蛍光が少ないと思われる遠赤外に近い遠赤色 (680nm - 720nm) の蛍光を持つ蛍光タンパク質も、多くは四酸化オスミウ

ムに感受性のものばかりであった。今後、エポキシ樹脂包埋試料を用いた In-resin CLEM に利用可能な新しい青色-シアン系あるいは遠赤外系蛍光タンパク質が発見されることを期待している。

【参考文献】

- 1) Fu, Z. *et al.* : *Nat. Methods*, **17** (1), 55 (2020).
- 2) Tanida, I. *et al.* : *Sci. Rep.*, **10** (1), 11314 (2020).
- 3) Tanida, I. *et al.* : *Sci. Rep.*, **10** (1), 21871 (2020).
- 4) Ogoh, K. *et al.* : *Luminescence*, **28** (4), 582 (2013).
- 5) Ai, H. *et al.* : *BMC Biol.*, **6**, 13 (2008).
- 6) Shen, Y. *et al.* : *PLoS One*, **12** (2), e0171257 (2017).
- 7) Toyooka, K. *et al.* : *Microscopy*, **68** (5), 417 (2019).



CLEM

Correlative Light and Electron Microscopy の略で、光線-電子相関顕微鏡法とも呼ぶ。同一試料を光学顕微鏡と電子顕微鏡を用いて観察し、それぞれの像を比較することにより、細胞内における細胞小器官・細胞分子の局在および形態を解析する手法である。通常の CLEM では蛍光観察した後に電子顕微鏡試料用の固定を行い、四酸化オスミウム処理、エタノール脱水処理、エポキシ樹脂包埋を行うため、電子顕微鏡観察前に化学的・物理的に形態の歪みが生じる。このため、局所観察に限定され、画像もデジタル的補正が必要になる。

In-resin CLEM

通常の CLEM が蛍光顕微鏡観察と電子顕微鏡観察を樹脂包埋前後に行うのに対し、In-resin CLEM では、同一超薄切片で蛍光顕微鏡観察と電子顕微鏡観察を行うために、化学的・物理的に形態の歪みを避けることができる。

エポキシ系樹脂

電子顕微鏡で生物試料を観察する場合に最も汎用される樹脂である。細胞内小器官を超微形態観察するのに適している。おもに Epon812 が汎用されている。

Lowicryl 樹脂、LR-white 樹脂、Technovit 樹脂

いずれもエポキシ樹脂とは異なり水溶性樹脂。低温重合も可能であるため、抗原となるタンパク質の変性を抑制する可能性があり、樹脂内での免疫反応が可能となるため、免疫組織染色や免疫電子顕微鏡用の試料作成に汎用される。エポキシ樹脂に比べて、柔らかい傾向がある。

Products

Wako

マルチカラー-In-resin CLEM関連製品

コード No.	品名	規格	容量	希望納入価格(円)	
NEW 208-21161	TUK Solution for multicolor	℞ ^o	電子顕微鏡用	10mL	40,000
NEW 080-10591	HB Solution	℞ ^o	電子顕微鏡用	100mL	40,000
NEW 163-28901	pCLEM-Green-nuc	℞ ^o	電子顕微鏡用	20 μg	80,000
NEW 160-28891	pCLEM-Green-C	℞ ^o	電子顕微鏡用	20 μg	80,000
NEW 163-28881	pCLEM-Green-N	℞ ^o	電子顕微鏡用	20 μg	80,000
166-28631	pCLEM-Red-ER	℞ ^o	電子顕微鏡用	20 μg	80,000
169-28621	pCLEM-Red-gol	℞ ^o	電子顕微鏡用	20 μg	80,000
163-28641	pCLEM-Red-lyso	℞ ^o	電子顕微鏡用	20 μg	80,000
165-28461	pCLEM-Red-mito	℞ ^o	電子顕微鏡用	20 μg	80,000
160-28651	pCLEM-Red-C	℞ ^o	電子顕微鏡用	20 μg	80,000
167-28661	pCLEM-Red-N	℞ ^o	電子顕微鏡用	20 μg	80,000

詳細は当社 HP をご覧下さい。

CLEM 和光

検索

℞^o…2~10℃保存 ℞^o…20℃保存 ℞^o…80℃保存 ℞^o…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、2021年4月時点での情報です。最新情報は、当社HPをご参照下さい。

創薬の安全性試験におけるヒト iPS 細胞由来心筋細胞を用いた評価の重要性

富士フイルム株式会社 バイオサイエンス&エンジニアリング研究所 森村 馨

◆安全性薬理試験のガイドライン

現在、医薬品開発において実施すべき安全性試験は、その実施時期とともに ICH^{*1} で定めた国際ガイドラインに規定されている¹⁾。

安全性試験の中でも、安全性薬理試験は生命維持機能に関わる心血管系、中枢神経系及び呼吸器の安全性を評価する極めて重要な試験であり、ヒト臨床試験の前に行われるべき試験として ICH S7A/S7B で規定されている²⁾。ICH S7A には、安全性薬理試験の一般原則と推奨事項が記載されており、ICH S7B は、特に被験物質の心室再分極延長を評価するための非臨床試験の進め方について述べられている³⁾。

◆実際の医薬品開発における安全性薬理試験の進め方

実際の医薬品開発においては、ICH S7A/S7B に従い、探索早期ではスクリーニング試験として、培養細胞を用いた hERG 試験^{*2}を実施し、臨床試験手前の探索後期では化合物の見極めとして、大動物（イヌやサルなど）を用いたテレメトリー試験^{*3}を実施している。

hERG 試験は、心電図における QT 間隔の延長に関わる IKr チャンネルの阻害作用を評価する試験である。電流の阻害のみを見るため結果が明瞭であり、自動で測定できる機器も普及している。

しかしながら、心室筋の活動電位には IKr チャンネル以外にも様々なイオンチャンネルが関与しており、hERG 試験の結果と臨床結果が一致しないケースも報告されている⁴⁾。その為、hERG 試験の結果だけで判断してしまうと、有用な医薬品候補を開発初期に除外してしまう可能性やヒトでの QT 間隔延長リスクを正確に評価できない可能性が示唆されている。

実際に、hERG 試験では陰性だったものの、大動物のテレメトリー試験で心電図 QT 間隔の延長や心臓の収縮・弛緩などへの影響が見られ、医薬品開発が中止となることがある。テレメトリー試験は hERG 試験に比べて必要な化合物量も多く、この段階での開発中止は時間とコスト

の大幅なロスになり得る。

このような開発後期の医薬品開発中止を避けるため、hERG 試験とテレメトリー試験を繋ぐ様々なフォローアップ試験が実施されている。その代表例として、IKr チャンネル以外の心室筋の活動電位に関わる Na チャンネルや、Ca チャンネルのイオンチャンネル阻害試験、摘出心臓を用いた APD 試験^{*4} やランゲンドルフ灌流心試験^{*5} などを実施し、統合的なリスク評価をしている。非臨床試験間または、臨床-非臨床試験間で結果が異なる場合は、ICH のガイドライン上でもフォローアップ試験を推奨しており、フォローアップ試験は統合的リスク評価を構成する重要な要素となる。

しかし、複数のイオンチャンネルに対する阻害評価は、コストが増加する一方、複数チャンネルへの複合作用による臨床での影響までは評価できていない。また、摘出した組織を用いた試験(APD 試験やランゲンドルフ灌流心試験)は実験手技の熟練を要し、スループットも低いことが課題となっている。

以上のことから、早期に臨床予測性が高く統合的なリスク評価が可能な細胞 (*in vitro*) 試験系が求められている。

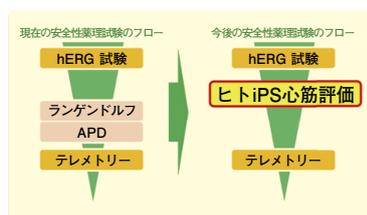
◆ヒト iPS 細胞由来心筋細胞を用いた QT 間隔延長評価

そのような背景から、2013 年 12 月に、日本製薬工業協会を母体としたヒト iPS 細胞応用安全性評価コンソーシアム（以後 CSAHi と記載）^{*6} が発足した。発足以来 CSAHi では、医薬品の安全性で特に問題となる心臓、肝臓、神経について、ヒト iPS 細胞由来分化細胞を用いた各種

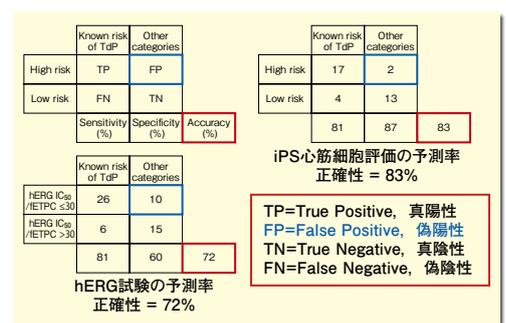
安全性評価技術開発とその応用可能性を検証し、実用化に向けた活動を行ってきた。

特にヒト iPS 細胞由来心筋細胞（以後 iPS 心筋と記載）を用いた心毒性評価系の構築が推し進められてきた。その中でも MEA^{*7} を用いた培養 iPS 心筋の細胞外電位波形の評価系は高精度でリスク予測ができる系として確立されつつある。MEA 評価系は、iPS 心筋に存在する様々なイオンチャンネルの電気活動を複合した波形で取得するため、QT 間隔の評価だけでなく、動物実験でしか検出できなかった致死性不整脈 (TdP^{*8}) の原因となる EAD (early afterdepolarization: 早期後脱分極) も検出できる。実際、日本国内で行ったバリデーション試験において、MEA 評価系の臨床予測精度は 83% となっており、hERG 試験 (72%) に比べ、精度が向上していることが分かっている^{5,6)} (右下図: iPS 心筋評価の臨床予測率)。その一方、使用する iPS 心筋の種類によって、イオンチャンネルの発現が大きく異なることが報告されていることから⁷⁾、iPS 心筋の種類及びロットの選択は MEA を用いた心毒性評価の予測精度を向上する上で重要であると考えている。

iPS 心筋を用いた心毒性評価は、CSAHi の活動だけではなく、国立医薬品食品衛生研究所を母体とする JiCSA^{*9}、FDA が母体の CiPA^{*10} などと協力して国際的バリデーション試験が実施されてきた。これらの活動が実を結び、2020 年 10 月に iPS 心筋の利用などが記載された ICH E14/S7B の Q&A 案が公開された。



安全性薬理試験のフロー



iPS 心筋評価の臨床予測率⁶⁾

ガイドラインの案文にはフォローアップ試験の項目にiPS心筋を用いたMEA評価系も記載されている⁸⁾。今後、ICH E14/S7BのQ&Aが最終化され、iPS心筋を用いた心毒性評価の実用化が促進されると考えられる。

◆今後の展望

現在、iPS心筋を用いた心毒性評価の研究は更に進んでおり、今まで動物実験でしか評価ができなかった、収縮・弛緩系の評価系構築も進められている。収縮・弛緩系の評価についても、QT評価と同様に国内外でバリデーション試験が実施されることが予想され、iPS心筋を用いた収縮・弛緩系の評価が可能になれば、現況のフォローアップ試験で実施されているランゲンドルフ灌流心試験の代替としてさらなる活用が期待できる（前頁左下図；安全性薬理試験のフロー）。

まずはスタート地点に立ったiPS心筋を用いた安全性評価であるが、今後は様々な薬剤の開発に利用され、これまでhERG試験の偽陽性判定により除外されていた薬剤の救済や、hERG以外のチャンネルによる心毒性リスクを提示できれば、医薬品開発の成功確立の向上に貢献できるであろう。iPS心筋を用いた評価の実績が積み重ねられていくことで、動物実験の削減や評価効率化に繋がり、より良い医薬品が早く世に送り出されることを期待したい。

【参考文献】

- 1) ICH-M3「医薬品の臨床試験のための非臨床安全性試験の実施時期についてのガイドライン」, 医薬審第1019号, 2000.12.27 改正.
- 2) ICH-S7A「安全性薬理試験ガイドライン」, 医薬審第902号, 2001年.
- 3) ICH-S7B「ヒト用医薬品の心室再分極遅延(QT間隔延長)の潜在的可能性に関する非臨床的

- 評価」, 薬食審査 発 1023 第 4 号, 2009 年.
- 4) Gintant, G. : *Pharmacol. Ther.*, **129** (2), 109 (2011).
- 5) Nozaki, Y. et al. : *Regul. Toxicol. Pharmacol.*, **88**, 238 (2017).
- 6) Ando, H. et al. : *J. Pharmacol. Toxicol.*

- Methods*, **84**, 111 (2017).
- 7) Kodama, M. et al. : *J. Pharmacol. Sci.*, **140** (4), 325 (2019).
- 8) Gintant, G. et al. : *Regul. Toxicol. Pharmacol.*, **117**, 104756 (2020).



※1. ICH (International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use) : 医薬品規制調和国際会議

医薬品規制当局と製薬業界の代表者が協働して、医薬品規制に関するガイドラインを科学的・技術的な観点から作成する国際会議のこと。ここで決まったガイドラインは、世界の標準的な指針となる。

※2. hERG (human ether-a-go-go-related gene) 試験

心筋細胞に存在するカリウムチャンネルの1つであるhERGチャンネルに対して医薬品候補化合物の阻害作用を確認する試験。hERGチャンネルが化合物に阻害されるとQT間隔が延長し、不整脈が起きる可能性が高くなる。

※3. テレメトリー試験

イヌやサルなどの大動物に送信機を埋め込み、医薬品候補化合物が心臓へ与える影響を測定する。近年、ジャケットを被せて測定する非侵襲的な方法や、ミニプタを用いる検討なども進められている。

※4. APD (Action Potential Duration) 試験

活動電位持続時間の延長を検出する試験。モルモットなど動物から摘出した乳頭筋標本を用いた試験が広く行われている。

※5. ランゲンドルフ灌流心試験

モルモットなどの動物から摘出した心臓を用い、QT間隔延長だけでなく伝搬や収縮・弛緩など、心臓への様々な影響を総合的に評価する実験方法。

※6. CSAHi (Consortium for Safety Assessment using Human iPS Cells)

ヒトiPS細胞由来分化心筋・肝臓・神経細胞を用いた各種安全性評価技術について、新規医薬品開発への応用可能性を実験的に検証し、将来的展望も含め実用に向け世の中に提言することを目的とした組織。2021年1月29日現在、国内外の47の企業・機関が加盟している。

※7. MEA (Microelectrode array)

微小電極アレイシステム法。アレイ状に配置された電子センサ上に細胞を培養したり、組織を置くことで、細胞外電位を測定する。

※8. TdP (Torsades de Pointes)

重症型不整脈の一例であり、突然死の原因となる特徴的な多型性心室頻脈。心電図上でねじれながら振動するように見えることから名付けられた。市場から医薬品が回収される理由の一つ。

※9. JiCSA (Japan iPS Cardiac Safety Assessment)

ヒトiPS細胞由来心筋細胞を医薬品の安全性評価に応用することを目的に、産・官・学で構成されたオールジャパン体制の研究グループ。

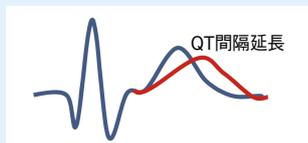
※10. CiPA (Comprehensive in vitro Proarrhythmia Assay)

米国FDA(食品医薬品局)を中心に組織された国際コンソーシアムで、ヒトiPS心筋細胞などを含めた統合的な不整脈リスク予測法の確立を目指している。

医薬品候補化合物の心毒性評価試験サービス

FUJIFILM

本サービスは、iCell心筋細胞を用いた、hERG試験に代わるものと期待されている高精度な心毒性評価方法による受託サービスです。



標準化プロトコルに富士フイルム(株)のノウハウを加え、再現性の高いデータを迅速に提供!

詳しくは、当社HPをご覧ください。

和光 心毒性評価

検索

エクソソーム除去FBS中に残存するエクソソーム量の評価 —高感度エクソソーム検出技術が可能にした新たな品質保証—

富士フイルム和光純薬株式会社 ライフサイエンス研究所 笹本 宏大

◆はじめに

種々の細胞から放出される小胞、エクソソームは生命現象の理解のための基礎研究だけでなく、近年診断や治療といった研究分野でも注目を集めている。培養細胞由来のエクソソームの取得及び解析を行うにあたっては、細胞培養時にエクソソーム除去処理したウシ胎児血清 (Fetal Bovine Serum : FBS) を添加した培地が多く用いられているが、その残存の有無の詳細な検証や、その後の実験への影響を議論するようなことはあまり行われていない。そこで、本稿では当社が所有する高感度エクソソーム検出技術を用いて、エクソソーム除去後の FBS における残存エクソソーム量を比較解析した結果を紹介する。

◆エクソソーム

エクソソームは、細胞から放出される直径 30-100nm 程度の膜小胞であり、CD9、CD63、CD81 をマーカータンパク質として有している¹⁾。エクソソームはタンパク質や核酸 (DNA、RNA、miRNA)、さらには脂質といった細胞由来成分を含有しており、これらを離れた細胞へ受け渡すことによる細胞間情報伝達を行うと考えられている。細胞外に放出されるという特徴から、血液 (血清・血漿)、尿、唾

液などの体液にも存在が確認されており、さらにはがんなどの疾患のバイオマーカーを有しているという報告もあることから、ここ数年で注目度が大きく上昇している^{2,3)}。

◆エクソソーム研究における FBS

エクソソーム研究において、培養上清から精製した細胞由来エクソソームを解析に用いることが一般的に行われている。通常の細胞培養には FBS を添加した培地が幅広く使用されているが、細胞由来エクソソームの取得を目的とした培養においては、FBS に多量に含まれるウシ由来エクソソームの混入を避けるために無血清培地かウシ由来エクソソームを除去した FBS を添加した培地が使用されている。エクソソームを除去した FBS には、超遠心分離法にてエクソソーム除去を行った自家調製 FBS や、ウシ由来エクソソーム除去済みと謳っている市販品が一般的に使われている。そして、これらの品質保証としては、残存エクソソームの粒子数や miRNA 量の測定、ウエスタンブロットや ELISA キットなどによるマーカータンパク質の検出によって残存エクソソーム量の確認が行われている。

◆PS アフィニティー ELISA による FBS 中ウシ由来エクソソームの高感度検出

当社はエクソソームの表面に存在する

ホスファチジルセリン (Phosphatidylserine : PS) とカルシウムイオンの存在下で結合する Tim4 タンパク質を使用した PS アフィニティー法というエクソソーム精製技術及びこれを応用した PS アフィニティー ELISA というエクソソーム定量解析技術を有している⁴⁾。PS アフィニティー ELISA は、Tim4 タンパク質を固相化したプレートに培養上清や血清などのエクソソーム含有サンプルを添加し、カルシウムイオン存在下でエクソソームを捕捉させ、エクソソーム表面マーカータンパク質に対する抗体反応によりエクソソーム検出を行うものであり、ウエスタンブロットのおよそ 1,000 倍以上、エクソソーム表面マーカー抗体を固相化した既存の ELISA キット (検出感度は数 ng ~ 数 μg 程度) のおよそ 100 倍以上の検出感度を有することを確認している (図 1)。さらに、当社ではエクソソーム表面マーカータンパク質である CD9、CD63、CD81 に対するモノクローナル抗体を樹立・製品化している。そのうちの抗 CD9、モノクローナル抗体 (1K) 及び抗 CD81、モノクローナル抗体 (17B1) は共にウシ抗原への交差性を有しており、上述の PS アフィニティー ELISA における検出抗体として用いることで、FBS に含まれるウシ由来エクソソーム

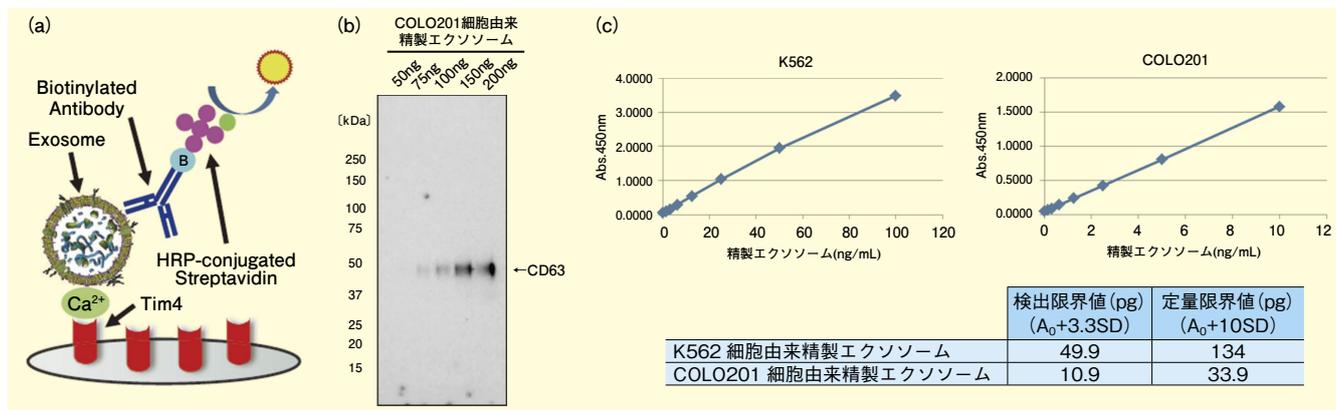


図 1. ウエスタンブロットと PS アフィニティー ELISA の検出感度比較

(a) PS アフィニティー ELISA の原理：固相化した Tim4 タンパク質で捕捉したエクソソームを、表面抗原を認識する抗体で検出することで定量解析を行う当社の独自技術。

(b) ウエスタンブロットによるエクソソーム検出感度：COLO201 細胞由来精製エクソソーム (MagCapture™ Exosome Isolation Kit PS 使用) をそれぞれ 50、75、100、150、200ng 電気泳動し、抗 CD63 抗体でウエスタンブロット検出した。検出限界は 75ng 程度。

(c) PS アフィニティー ELISA による検出限界値：K562 細胞及び COLO201 細胞由来精製エクソソーム (MagCapture™ Exosome Isolation Kit PS 使用) を段階希釈したサンプル及びバッファーのみのブランク値の活性を測定し、その結果を基に各サンプルの最低検出感度を算出した (各濃度ポイント n=6 で、A₀ ポイントは n=12 で測定した)。検出限界は K562 細胞由来エクソソームが 49.9pg、COLO201 細胞由来エクソソームが 10.9pg 程度。

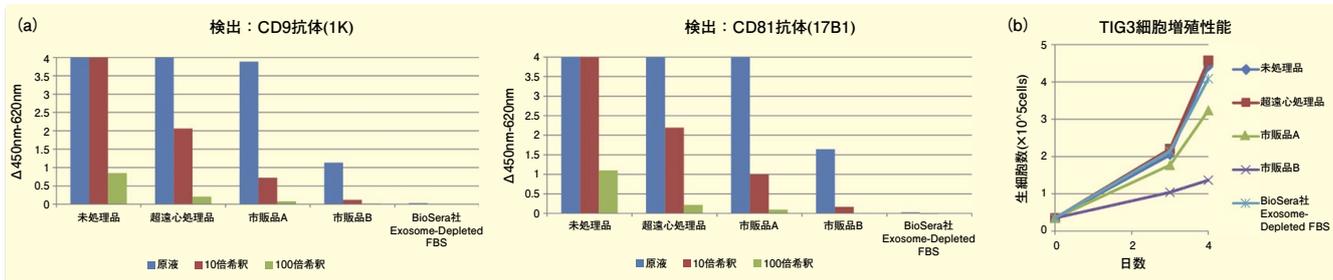


図2. エクソソーム除去 FBS の評価

(a) PS アフィニティー ELISA による FBS 中のウシ由来エクソソームの検出: 抗 CD9 抗体 (1K) [コード No. 014-27763]、抗 CD81 抗体 (17B1) [コード No. 011-27773] をビオチン標識し、PS Capture™ Exosome ELISA Kit (Streptavidin HRP) [コード No. 298-80601] の検出抗体と置き換えて実施。FBS は未処理品、超遠心処理品 (120,000 × g, 18h)、市販品エクソソーム除去 FBS2 種、BioSera 社 Exosome-Depleted FBS の原液、10 倍希釈品、100 倍希釈品を使用。シグナル値 4 以上は検出限界以上。

(b) エクソソーム除去 FBS の細胞増殖能評価: D-MEM (低グルコース) [コード No. 041-29775] に各 FBS (未処理品、超遠心処理品、市販品エクソソーム除去 FBS2 種、BioSera 社 Exosome-Depleted FBS) を 10% の濃度で添加した培地で TIG3 を 4 日間培養した。播種後 3 日後及び 4 日後に生細胞数をカウントした。

ムの高感度な検出が実現可能となった。

そこで今回、高感度エクソソーム検出技術を用いて、超遠心処理によりエクソソームを除去した FBS や市販品のエクソソーム除去済み FBS における残存ウシ由来エクソソーム量の比較解析を行った (図 2)。すると非常に興味深い事に、一般的に広く論文でエクソソーム除去法として用いられている超遠心処理にて除去を行った FBS や、エクソソーム除去済みを謳っている 2 つの市販品については、依然として多量のウシ由来エクソソームが残存していることが明らかにされた (図 2 (a))。一方、当社で新たに販売予定である BioSera 社 Exosome-Depleted FBS には、残存ウシ由来エクソソームがほぼ検出されないことが確認された (図 2 (a))。

加えて、ヒト胎児肺由来正常二倍体線維芽細胞 (TIG3) の培養による細胞増

殖能の評価を行ったところ、BioSera 社 Exosome-Depleted FBS は市販品と同等以上の細胞増殖能を持つことも明らかとなっている (図 2 (b))。

◆おわりに

今回我々は高感度な検出が可能な PS アフィニティー ELISA とウシ抗原への交差性を持つエクソソーム表面マーカータンパク質抗体を組合せることにより、FBS 中の残存ウシ由来エクソソーム量を高感度に検出できる測定系を確立した。そして、一般的に使用されているエクソソーム除去後 FBS においては、多量のウシ由来エクソソームの残存が明らかとなり、既存のエクソソーム検出技術を用いた品質保証ではエクソソーム残存の有無の証明が非常に困難であることが明らかとなった。当然ながら、細胞培養上清中に混入しているウシ由来エクソソームは、下流の実験や解析におけるバックグラウンドに多大

な影響を与えることが懸念される。そのため、高感度検出が可能な PS アフィニティー ELISA を用いて確かな品質が保証された FBS の使用や、エクソソームが限りなく除去されている BioSera 社 Exosome-Depleted FBS を用いることで、正確かつ明瞭な研究データを再現性良く取得することが可能になると我々は考えている。

以上、繰り返しのようですが、当社が提供する高感度検出が可能な PS アフィニティー ELISA や、BioSera 社 Exosome-Depleted FBS が有効活用されることで、今後のエクソソーム関連研究の発展に繋がっていくことを大いに期待している。

【参考文献】

- 1) Colombo, M. et al. : *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, **30**, 255 (2014).
- 2) Tkach, M. et al. : *Cell*, **164**, 1226 (2016).
- 3) Raimondo, F. et al. : *Proteomics*, **11**, 709 (2011).
- 4) Nakai, W. et al. : *Sci. Rep.*, **6**, 33935 (2016).

コード No.	品名	規格 / メーカー	容量	希望納入価格 (円)	
エクソソーム除去 FBS					
558-39501	Exosome-Depleted FBS	Ⓕ	Biosera	50mL	30,000
PSアフィニティー法対応 ELISA キット					
297-79201	PS Capture™ Exosome ELISA Kit (Anti Mouse IgG POD)	Ⓕ	遺伝子研究用	96回用	58,000
298-80601	PS Capture™ Exosome ELISA Kit (Streptavidin HRP)	Ⓕ	遺伝子研究用	96回用	58,000
エクソソームマーカー抗体					
014-27763	Anti CD9, Monoclonal Antibody (1K)	Ⓕ	免疫化学用	100 μL	30,000
011-27773	Anti CD81, Monoclonal Antibody (17B1)	Ⓕ	免疫化学用	100 μL	30,000

エクソソーム関連製品の詳細情報は当社 HP をご覧下さい。

和光 エクソソーム

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、2021 年 4 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 トランスクリプトーム・エピゲノムの統合解析

熊本大学発生医学研究所 細胞医学分野 吉賀 友紹、中尾 光善

エピゲノムは、DNAのメチル化、ヒストンの化学修飾、クロマチンの高次形成、非コードRNAによる調節などで構成されて、転写関連因子と協働することで、ゲノム上の全遺伝子発現が制御されると考えられる。エピゲノムには安定性と可逆性という両面があり、特定の遺伝子座を取り上げてもエピゲノム形成の特異性はほとんど未知である。近年のシーケンシング技術の革新により、ゲノムワイドなエピゲノム解析が急速に発展している。多様なエピゲノムを網羅的に検討し、トランスクリプトームのデータと合わせることで、表裏一体の遺伝情報を検証することが可能になった。本稿では、高速シーケンサーを用いた3種類の基本技術（RNA-seq、ATAC-seq、ChIP-seq）について、事例を交えながら概説したい。

1. RNA-seq

RNAシーケンス（RNA-seq）は、RNAからcDNAライブラリを作製し、高速シーケンサーを用いて取得したリード情報をもとにして、遺伝子の発現量を解析する手法である。イルミナ社やサーモフィッシュサイエンティフィック社などから解析機器が提供さ

れており、研究内容に合わせて選択する必要がある。RNA-seqでは、poly Aを利用してmRNAを回収しmRNA-seqを行ったり、rRNAを除去してwhole RNA-seqを行ったり、miRNAの網羅的解析を行ったりと、用途は様々である。例えば我々は、ホルモン療法耐性化モデルの乳がん細胞株MCF7を用いて、mRNA-seqとwhole RNA-seqの比較解析によって、エストロゲン受容体をコードするESR1遺伝子座から新規の非コードRNA群（Eleanorsと名付けた）を同定した（図1；Tomita, S. *et al.* : *Nat. Commun.*, **6**, 6966 (2015).; Abdalla, M. O. A. *et al.* : *Nat. Commun.*, **10**, 3778 (2019).)。MCF7細胞がエストロゲン枯渇に適応する過程で、ESR1遺伝子座の活性化にEleanorsが重要な役割を果たすことを明らかにした。また近年では、急速な分析技術の高度化により、1個の細胞を分離・標識・解析できるようになった（シングルセルRNA-seq、scRNA-seq）。この手法では、細胞集団の転写産物を1細胞ごとに網羅的な解析をするため、細胞集団の不均一性を解析するのに適しており、細胞集団を亜集団にクラスタリングしてそれぞれの集団の特徴遺伝子を抽出すること

ができる。最大の利点は、集団の平均値を見る通常のバルクRNA-seqでは検出が困難な希少細胞における特徴的な発現変化が、scRNA-seqでは感度良く捉えられることである。近年では、データベースも充実してきており、Tabula-Murisなどでは、20のマウス臓器におけるscRNA-seqの全データを公開している (<https://tabula-muris.ds.czbiohub.org>)。

2. ChIP-seq

ChIP-seqとは、クロマチン免疫沈降（chromatin immunoprecipitation: ChIP）と高速シーケンサーを組み合わせ、メチル化やアセチル化などの修飾型ヒストン、ヒストン修飾因子、クロマチンリモデラー、転写因子（DNA結合タンパク質）などの、ゲノム上での結合部位を網羅的に解析する手法である。現在、エピゲノム解析を行うための基本的な方法になっている。クロスリンクしたDNAを断片化してChIPし、脱クロスリンク、DNA抽出を行い、ライブラリー調製後、シーケンスをゲノムワイドに解読する。ChIP-seqには特異的な抗体が免疫沈降に必要なため、標的とするタンパク質もしくはヒストン修飾などが決まっていること、また、ChIPに適した抗体があることが必須になる。ChIP-seqでは、ゲノムワイドなDNA-タンパク質相互作用について詳細な情報が得られるが、十分な量のDNAライブラリー調製が必要なため、大量の細胞が必要になる（通常、 1×10^6 個程度）。最近では、少量の細胞からChIP-seqを可能とする手法も開発されており、ヒストン修飾（H3K4me3、H3K27me3、H3K4me1）は 5×10^3 個程度の細胞数があれば解析可能になっている。また、転写因子などDNAに直接結合するタンパク質は比較的感度の良いデータが得られやすいが、ヒストン修飾酵素など、間接的にDNAに集積する因子はタンパク質間のダブル

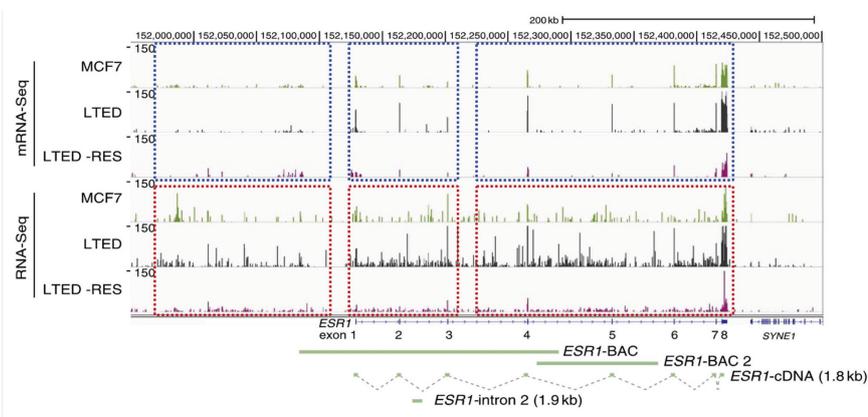


図1. エストロゲン受容体遺伝子座におけるmRNA-seqとwhole RNA-seqの比較 (Tomita, S. *et al.* : *Nat. Commun.*, **6**, 6966 (2015) より改変.)

mRNA-seqではexon部位にそのピークが集積している（青枠）。Whole RNA-seqではintronやpromoter, intergenic部位にもピークが見られる（赤枠）。ピークの高さから親株のMCF7よりもLTEDで非コードRNAの発現が高いことがわかる。MCF7: ヒト乳癌細胞株。LTED: MCF7を長期間エストロゲン欠乏培地で培養し、エストロゲン枯渇に適応した細胞株。LTED-RES: LTEDにエストロゲン様作用のあるポリフェノールであるレスベラトロールを処理した状態。

クロスリンクによる固定を用いるなど、予めの条件検討が必要である (Tanaka, H. *et al.* : *Aging Cell*, **19**, e13173 (2020).; Anan, K. *et al.* : *Nucleic Acids Res.*, **46**, 5441 (2018).)。また ChIP-Atlas は、公開されている既報の ChIP-seq データを再解析、またはユーザーデータを照合するウェブツールとして有用性が高い (<https://chip-atlas.org>)。

3. ATAC-seq

Assay for Transposase-Accessible Chromatin (ATAC)-seq は、高活性改変型 Tn5 transposase を用いて、DNA の断片化とタグ付けを行い、ゲノムワイドなクロマチン構造を解析するもので、2013 年に開発された (Buenrostro, J. D. *et al.* : *Nat. Methods*, **10**, 1213 (2013).)。アッセイ自体の簡便さと幅広いサンプルに適用できることから、オープンクロマチン領域の同定や転写因子の占有率を評価するために有効である (図 2)。個別のヒストン修飾の検討など、詳細なエピゲノム解析の前段階にも位置づけられる。同様の目的でこれまでに用いられていた DNase-seq や Formaldehyde-Assisted Isolation of Regulatory Elements (FAIRE)-seq が 1×10^6 個以上の細胞を必要とするのに比べて、必要な細胞数が $5 \times 10^2 \sim 10^4$ 個と大幅に少ないことも利点である。また近年では、Tn5

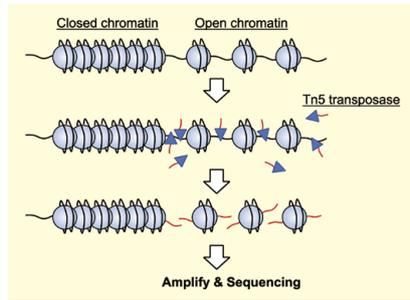


図 2. ATAC-seq の原理

Tn5 transposase がアクセスできるオープンクロマチン領域が切断され、オリゴ DNA が付加される。その後、DNA を抽出し、高速シーケンサーで解析する。

transposase に組み込むオリゴ DNA を蛍光色素で標識しクロマチンと反応させることで、オープンクロマチン領域を蛍光標識し 1 細胞レベルで可視化する ATAC-seq という方法が開発されている (Chen, X. *et al.* : *Nat. Methods*, **13**, 1013 (2016).)。この手法では、蛍光強度の高い細胞 (= オープンクロマチン領域が多い細胞) をフローサイトメトリーで分取した後、高速シーケンサーを用いてオープンなクロマチン領域を同定することができる。ATAC-seq 法ではフローサイトメトリーで解析できるため、異なる蛍光色素で標識した抗体と組み合わせることで、特定の細胞集団におけるクロマチン状態を解析するなど、応用範囲は広い。さらに、シングルセル ATAC-seq (scATAC-seq) を用いると、単一細胞解像度でオープンクロマチン領域を

評価できるため、scRNA-seq と組み合わせたゲノムワイドなシングルセル解析が加速している。

4. おわりに

エピゲノム解析の広さと深さは拡大し、生命現象の分子基盤を理解するために不可欠な技術に位置づけられる。今回紹介した RNA-seq、ChIP-seq、ATAC-seq に加えて、エピゲノムの構造・機能的な相互作用 (染色体コンフォメーションキャプチャ 3C/4C/HiC-seq、HiC と ChIP を組み合わせた HiChIP) なども含めると、様々なアプローチが可能である。バイオ情報の解析ツールも増えているので、これらのデータを照合して、統合的に理解することが重要であると考えられる。

— シリーズ終了にあたって —

2020年07月 (Vol. 88 No. 3) から始まり「遺伝子解析 新技術とその応用」は、本稿をもちまして最終回を迎えました。本誌に寄稿いただきました先生方にこの場を借りて御礼申し上げます。おかげさまで本シリーズでは遺伝子解析に関する情報をさまざまな視点でお届けできました。

読者の皆様におかれましては、全4回に渡って続いた本連載をご愛読いただき御礼申し上げます。皆様の遺伝子研究の一助になりましたら幸いです。

次世代シーケンス受託サービスのご案内



日本ジーンウィズ (株) は、ゲノミクス研究開発サービスを行っており、埼玉県川口市に所在し、オフィスとラボ、専門スタッフを設置・配備しています。

アメリカ、中国、ヨーロッパの十数か所の解析拠点と協力して GENEWIZ グローバルサービスネットワークを構築し、迅速かつ利便性に優れた品質の高いサービスをお客様に提供しています。

見積依頼・お問合せは、当社営業員までご連絡下さい。

エピジェネティクス関連受託サービス

- 全ゲノムバイサルファイトSeq (DNA シトシンメチル化解析)
- ATAC-Seq (活性クロマチン領域の同定)
- ChIP-Seq/RIP-Seq (タンパク質と核酸の相互作用解析)

第4回 ミクログリア・マクロファージによる脳梗塞後の炎症と修復の制御メカニズム

東京都医学総合研究所 脳卒中ルネサンスプロジェクト、慶應義塾大学薬学部生化学講座 大谷 健人
 東京都医学総合研究所 脳卒中ルネサンスプロジェクト、日本医療研究開発機構 七田 崇

はじめに

脳梗塞は本邦における脳卒中の約8割を占め、寝たきりや死亡の主な原因である。脳梗塞では、脳血流が低下することによって脳組織への酸素や栄養の補給が不足し、脳組織が虚血壊死（梗塞）に至る。脳虚血では様々な細胞ストレスが惹起されるが、炎症はそのようなストレスのひとつである。脳虚血後の炎症においては、脳組織に常在するマクロファージであるミクログリアや、血液脳関門の破綻に伴って脳組織に浸潤したマクロファージが炎症性サイトカインを産生する。ミクログリアやマクロファージによる脳梗塞後の炎症は数日間続くが、その後は炎症性サイトカインの産生がみられなくなり、その代わりに脳組織の修復を促進するようにミクログリアやマクロファージの役割が変化する。ミクログリアやマクロファージが炎症性細胞や修復性細胞として機能する分子メカニズムは近年様々に報告がなされている。そこで本稿では、脳梗塞後の炎症とマクロファージによる神経修復の分子メカニズムについて議論するとともに、脳梗塞におけるミクログリア・マクロファージの機能を標的とした治療薬開発の展望を述べる。

脳梗塞後の炎症におけるミクログリア・マクロファージの役割

血液中を循環しているマクロファージは、血液脳関門の破綻によって脳組織へ浸潤する。マクロファージの脳内浸潤にはケモカインの働きが必須であることが知られており、特にCCL2(C-C motif chemokine 2)とその受容体であるCCR2(C-C chemokine receptor 2)は脳組織内へマクロファージが浸潤するのに重要な役割を担う¹⁾。CCL2は虚血に陥った脳組織中の細胞から産生される。マクロファージにおいてCCR2を欠損させると脳組織内への浸潤が減弱し、脳梗塞発症後早期にマク

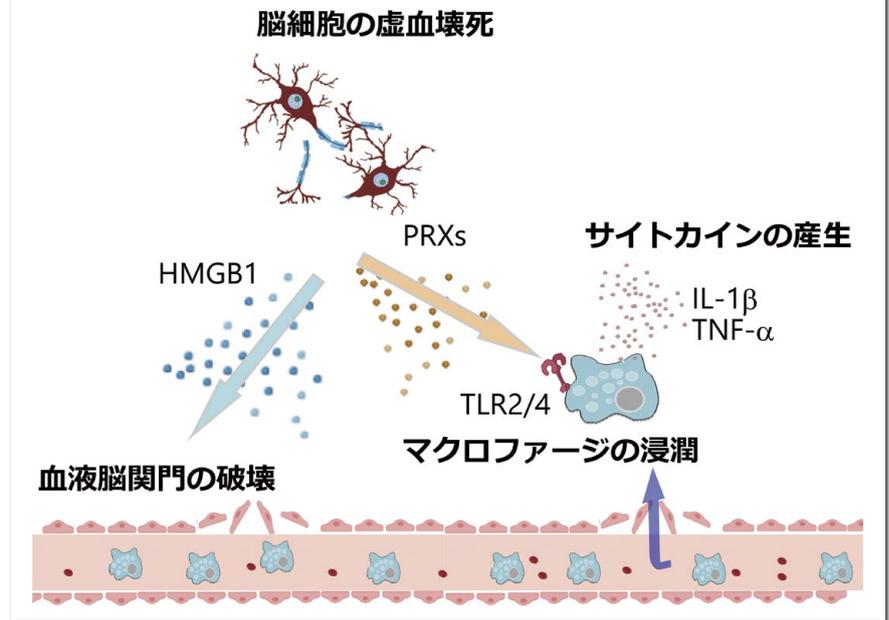


図1. 脳梗塞後における炎症の惹起

虚血壊死した脳細胞からはHMGB1やPRXなどのDAMPsが放出される。HMGB1は血液脳関門を破綻させ、血液中のマクロファージが脳組織内へ浸潤する。DAMPsはTLRsなどのパターン認識受容体を介してミクログリアやマクロファージを活性化することで炎症性サイトカインの産生を誘導し、脳梗塞後の脳浮腫やさらなる神経傷害を引き起こす。

ロファージの浸潤を抑制すると脳内炎症が減弱して脳保護効果が観察される²⁾。したがってCCL2-CCR2の相互作用は、炎症性マクロファージの脳内への浸潤に重要であると考えられる。

虚血によって組織が壊死を起こすと、組織を構成する物質が放出されるが、これらの物質の中には炎症を引き起こす分子が含まれておりDAMPs (Damage-associated molecular patterns) と呼ばれている³⁾。DAMPsは、ミクログリアやマクロファージに発現しているパターン認識受容体 (Pattern recognition receptors: PRRs) を活性化して脳梗塞後の炎症を引き起こすことが知られている (図1)。脳梗塞後の主要なDAMPsとしては、HMGB1 (High mobility group box1) やPRX (Peroxiredoxin) が知られている。

HMGB1は細胞の核内に存在するDNA結合タンパクとして発見された。脳組織では神経細胞がHMGB1を主に産生しており、脳虚血2~4時間後には神経細胞外にHMGB1が放出さ

れている様子が観察されている^{4,5)}。HMGB1は脳組織におけるMMP9 (Matrix metalloproteinase 9) の発現を増加させて血液脳関門の破綻を促進することにより炎症を増大させる⁶⁾。さらにHMGB1は好中球を活性化し、NETs (Neutrophil extracellular traps) と呼ばれる細胞外トラップの放出を誘導する⁷⁾。細胞外トラップは、ゲノムDNAとエラスターゼやミエロペルオキシダーゼなどの殺菌酵素で構成される複合体であり、感染や炎症病態において病原体の排除や組織における炎症を促進する役割があると考えられており、好中球やマクロファージから放出される⁸⁾。NETsは脳梗塞組織においても観察されており、脳梗塞後の炎症と神経傷害を促進すると考えられている。また、脳梗塞後の血管内においてもNETsが観察されるが、血管内でNETsが放出されると血栓の形成が促進され、梗塞巣周辺の脳血流をさらに減少させることにより神経症状の悪化を加速させる可能性がある。

PRXは細胞内で過酸化水素を水へと代謝する抗酸化タンパク質として知られている。PRXは虚血後の脳細胞内で発現が増加し、酸化ストレスに対して細胞保護的な機能を持つ⁹⁾。一方で、虚血壊死した細胞からは細胞内で蓄積したPRXが細胞外に放出されて、ミクログリアや脳組織内に浸潤したマクロファージのパターン認識受容体を活性化し、炎症性サイトカインの産生を誘導する。Myd88は、主要なパターン認識受容体として知られるToll様受容体(Toll-like receptors: TLRs)のシグナルの下流で機能するアダプター分子であり、Myd88を欠損したマウスではほとんどのTLRsの機能を欠損する。Myd88欠損マウスを用いて脳梗塞モデルを作製すると、脳内に浸潤した免疫細胞における炎症性サイトカイン産生が顕著に減少する¹⁰⁾。TLRsは本来、細菌やウイルスなどの病原体由来の分子を認識して免疫細胞を活性化するが、傷害を受けた組織から放出される自己由来の分子も認識して無菌的な炎症を惹起する役割も持つことが知られている。脳梗塞においては、細胞外に放出されたPRXはTLRsを活性化し、IL-1 β (Interleukin-1 β)やIL-23、TNF- α (Tumor necrosis factor α)などの炎症性サイトカインの産生を誘導する。齧歯類の脳梗塞モデルや脳卒中患者では、これらの炎症性サイトカインは虚血後の炎症を促進し、脳浮腫を引き起こし、さらなる神経傷害や予後不良につながると考えられている¹¹⁾。

脳梗塞後におけるマクロファージによる炎症収束

ミクログリアやマクロファージは脳梗塞後の炎症に重要な役割を持つが、炎症性サイトカインの産生は脳梗塞発症の数日後にピークを迎え、その後減少していく¹²⁾。脳梗塞発症数日から1週間程度経過するとマクロファージは、炎症収束を促し、神経修復に寄与

するように役割を変化させる¹³⁾。このようなマクロファージは、抗炎症性サイトカインであるIL-10やTGF- β (Transforming growth factor β)を産生して神経保護的な作用を持つことが知られている。脳組織においてアデノウイルスを用いてIL-10を過剰発現させると、脳梗塞後の神経細胞死と梗塞体積の拡大を防ぐ¹⁴⁾。TGF- β は炎症抑制に働く制御性T細胞の分化にも重要な因子であり、脳梗塞後の炎症を減弱する¹⁵⁾。以上のように、脳梗塞においてマクロファージは炎症抑制性の因子も産生している。

脳梗塞後の炎症収束には、脳組織内からDAMPsを排除することが重要である。ミクログリアやマクロファージに発現しているスカベンジャー受容体(MSR1やMARCO)はPRXやHMGB1などのDAMPsを認識して脳梗塞組織から排除する。MSR1やMARCOを欠損したマウスでは、脳梗塞組織からのDAMPsの排除が遅延して炎症状態が長引くことで、神経症状が野生型のマウスと比べて悪化する¹⁶⁾。ミクログリアやマクロファージにおけるMSR1の発現は、脳梗塞発症1日目から3日目にかけて上昇するが、このようなMSR1の発現上昇には、マクロファージの分化に重要な転写因子であるMafbが重要な役割を持つ。MSR1の発現が高いマクロファージでは、TNF- α 、IL-1 β 、IL-23といった炎症性サイトカインよりも、IGF-1 (Insulin-like growth factor1)のような神経栄養因子を主に産生している¹⁶⁾。脳梗塞を作製したラットにフタリド誘導体を投与すると、脳組織に浸潤したマクロファージにおけるMSR1の発現を増加させてDAMPsの排除を促進し、TNF- α の産生を減弱させることが示された¹⁷⁾。したがって、脳梗塞後におけるDAMPsの排除は炎症を収束させるための重要なプロセスである。

脳梗塞発症後7日程度経過すると、

ミクログリアやマクロファージは炎症を収束させて修復を促進することにより、脳梗塞後の回復に寄与することが知られている¹⁸⁾。マクロファージでCCR2を欠損したマウスでは、脳梗塞発症数日後における炎症は減弱するものの、発症5日目以降においては炎症がリバウンドして神経症状が悪化し、脳梗塞後の回復が不良になることが報告されている^{13,19)}。脳梗塞発症7日目以降には、ミクログリアやマクロファージからIGF-1やFGF-2などの脳保護的に作用する栄養因子が産生される^{20,21)}。これらの栄養因子は再髄鞘化やシナプス形成に関与するため脳梗塞後の回復に重要な役割を持つと考えられている²²⁾。このように、脳梗塞組織に浸潤したマクロファージは、炎症性から炎症収束・修復性へと形質が変化することにより脳梗塞後の機能回復にも寄与しているものと考えられる。

ミクログリアやマクロファージを治療標的とした脳梗塞後の炎症制御

脳梗塞の急性期治療では、rt-PA (Recombinant tissue plasminogen activator)の静脈内投与による血栓溶解や、血栓除去術が実施されている²³⁾。免疫抑制剤であるステロイドやシクロスポリン、タクロリムスなどは脳梗塞患者における機能予後の改善効果が証明されていない。したがって、脳梗塞後の炎症を抑制するだけでなく炎症の収束を早めて修復を促進する薬剤の開発が期待されている。

IL-10やTGF- β を治療標的とした薬剤は、抗炎症性サイトカインのみ発現誘導させることが困難である上に、脳梗塞において発現制御を行うべき適した時期が不明であることが問題となる。脳梗塞を作製したマウスにDHA (Docosahexaenoic acid)やIL-13、メイソインジゴを投与することで、ミクログリアやマクロファージを抗炎症性・修復性へと形質を変化させる²⁴⁻²⁶⁾。アンジオポエチンを投与すると炎症性サ

イトカインの産生が減少し、血管新生が促進されて脳保護的な効果がみられる²⁷⁾。最近の報告では、PPAR γ やSTAT6のような転写因子は脳梗塞後の炎症を収束させる治療標的分子である可能性が示されている²⁸⁾。

マイクログリアやマクロファージの炎症収束・修復作用を持続させるための分子メカニズムを解明できれば、脳梗塞を含め様々な臓器傷害における予後を改善させられる治療剤開発が可能となるであろう。さらに、脳梗塞発症後24時間以降に投与開始できる治療剤は少ないが、発症数日後に投与しても脳梗塞後の機能予後を改善させる治療薬が開発できる可能性が高い。

結論

マイクログリアやマクロファージは炎症性、抗炎症性、炎症収束性、修復性など多彩な機能を持ち、脳梗塞後の時期によって病態の進行に重要な役割を果たす(図2)。脳梗塞におけるマイクログリアやマクロファージによる炎症収束・修復の役割を促進させて持続させる次世代の治療剤開発が期待される。

Abbreviations

CCL2: C-C motif chemokine 2; CCR2: C-C chemokine receptor 2; DAMPs: Damage-associated molecular patterns; PRRs: Pattern recognition receptors; HMGB1: High mobility group box1; PRX: Peroxiredoxin; MMP9: Matrix metalloproteinase 9; NETs: Neutrophil extracellular traps; TLRs: Toll-like receptors; IL-1 β : Interleukin-1 β ; TNF: Tumor necrosis factor; TGF- β : Transforming growth factor β ; IGF-1: Insulin-like growth factor1; rt-PA: Recombinant tissue plasminogen activator; DHA: Docosahexaenoic acid

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

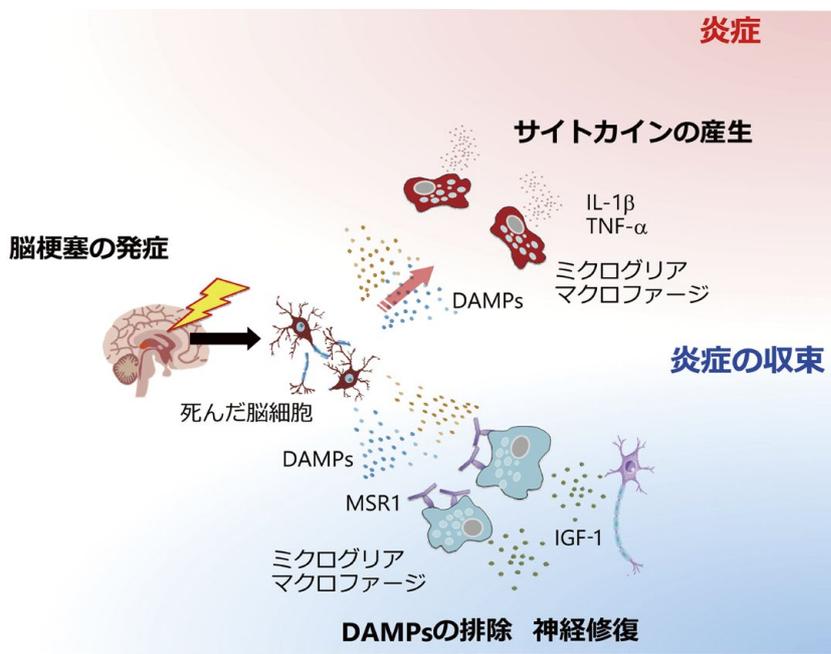


図2. 脳梗塞におけるマイクログリアやマクロファージの多彩な機能と役割

脳梗塞発症後、虚血壊死した脳細胞から放出される DAMPs によってマイクログリアやマクロファージが活性化され、IL-1 β や TNF- α などの炎症性サイトカインが産生される。一方、MSR1の発現が高いマイクログリアやマクロファージは脳梗塞組織から DAMPs を排除し、神経修復の働きを持つ IGF-1 を産生することで脳保護的な効果を示す。

【参考文献】

- Mildner, A. et al. : *Nat. Neurosci.*, **10**, 1544 (2007).
- Gliem, M. et al. : *Ann. Neurol.*, **71**, 743 (2012).
- Huang, J. et al. : *Ageing Res. Rev.*, **24**, 3 (2015).
- Qiu, J. et al. : *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, **28**, 927 (2008).
- Zhang, J. et al. : *Stroke*, **42**, 1420 (2011).
- Qiu, J. et al. : *Stroke*, **41**, 2077 (2010).
- Ma, Y. H. et al. : *Arthritis. Res. Ther.*, **18**, 2 (2016).
- Kim, S. W. et al. : *Acta Neuropathol. Commun.*, **7**, 94 (2019).
- Rashidian, J. et al. : *J. Neurosci.*, **29**, 12497 (2009).
- Shichita, T. et al. : *Nat. Med.*, **15**, 946 (2009).
- Shichita, T. et al. : *Nat. Med.*, **18**, 911 (2012).
- Clausen, B. H. et al. : *Neuroscience*, **132**, 879 (2005).
- Pedragosa, J. et al. : *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, **40**, S98 (2020).
- Ooboshi, H. et al. : *Circulation*, **111**, 913 (2005).
- Cekanaviciute, E. et al. : *Glia*, **62**, 1227 (2014).
- Shichita, T. et al. : *Nat. Med.*, **23**, 723 (2017).
- Zou, X. et al. : *J. Neuroimmune Pharmacol.*, (2020). doi:10.1007/s11481-020-09911-0.
- Wattanani, S. et al. : *J. Neurosci.*, **36**, 4182 (2016).
- Fang, W. et al. : *Theranostics*, **8**, 3530 (2018).
- Ikeda, N. et al. : *Stroke*, **36**, 2725 (2005).
- Zhu, W. et al. : *Stroke*, **39**, 1254 (2008).
- Leker, R. R. et al. : *Stroke*, **38**, 153 (2007).
- Hankey, G. J. : *Lancet*, **389**, 641 (2017).
- Ye, Y. et al. : *Front. Cell. Neurosci.*, **13**, 553 (2019).
- Cai, W. et al. : *Transl. Stroke Res.*, **9**, 669 (2018).
- Kolosowska, N. et al. : *Neurotherapeutics*, **16**, 1304 (2019).
- Venkat, P. et al. : *CNS Neurosci. Ther.*, **27**, 48 (2020).
- Zhang, W. et al. : *CNS Neurosci. Ther.*, **25**, 1329 (2019).

当社では、マイクログリアマーカー抗体を多数取扱っています。
詳しくは、当社 HP をご覧下さい。

マイクログリアマーカー抗体 和光

検索

第1回 ヒト iPS 細胞由来心筋細胞を用いた心収縮評価システムの最新動向

東京大学大学院 薬学系研究科 化学物質安全性評価システム構築社会連携講座 澤田 光平

初めに

心筋の収縮を正常に保つことは、全身に血液を送り出す心臓のポンプ機能にとって極めて重要である。心筋症などの心疾患、薬物誘発の心毒性、COVID-19などのウイルスによる心筋障害、更には環境汚染物質 PM2.5 など様々な原因が心筋の収縮性に障害をもたらす要因となる。これらの要因は心不全の誘発、悪化につながる臨床上重要な課題として認識されており、高齢者の心不全増加の原因に少なからず関与していると考えられる。これらの課題を解決するために、ヒト心筋細胞を用いた病態の解明、治療法の開発、薬剤の副作用軽減を目指した研究が今後とも必要であり、成体心筋に近づいたヒト iPS 細胞由来心筋細胞の重要性はますます増加してくる考えられる。

ヒト iPS 細胞由来心筋細胞は分化初期から電気的活動のみならず収縮機能を有することから、ヒト心機能に対する薬物作用予測に大きく役立つと考えられてきた。実際、心筋細胞として未成熟な状態であっても薬物による不整脈誘発リスクの予測においては、臨床における催不整脈リスクレベルにかなり一致した予測性を示すことが明らかとなった¹⁾。これは、薬物による催不整脈作用の作用点となる細胞膜上のイオンチャネルに関しては、未成熟性を有している iPS 細胞由来心筋細胞

でも成体心筋と同じように機能しているためと考えられる。

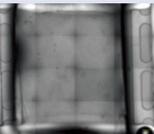
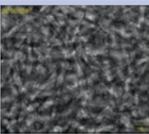
一方、収縮機能に関しては、iPS 細胞由来心筋細胞とヒト成体心筋標本で生理学的特性や薬理学的特性に関しての違いが、種々指摘されている²⁾。例えば、iPS 細胞由来心筋細胞では収縮力は小さく、成体心筋では収縮頻度と収縮力の関係（頻度-収縮関係、force-frequency relationship、FFR）が正の関係であるのに対し、iPS 細胞由来心筋細胞では負の関係を示す。また、成体心筋組織では β -受容体刺激により収縮力が大きく増加する陽性変力作用(positive inotropy)が認められるが、iPS 細胞由来心筋細胞では陽性変力作用が明確でないことも多い。これらの特性は iPS 細胞由来心筋細胞の収縮システムの未成熟性、特に細胞内 Ca 制御にかかわるタンパク質の低発現、エネルギー供給にかかわるミトコンドリアの未発達、更には筋線維のランダムな配向性などが原因であると推察されている。現在、これらの性質をより成体心筋に近づけるため成熟化の方法が様々検討されている³⁾。

2D/3D 収縮評価系の新たな展開

近年、iPS 細胞由来心筋細胞の収縮評価において、成体心筋に近い収縮性を示す標本を作製する目的で、成体の細胞外基質と同様な柔軟性を有する基材を

用いて 2D/3D の心筋モデルを作製することが進められている。プラスチックプレートのように固い素材上に播種された心筋細胞でも、長時間の高頻度電氣的ペーシング、配向性の付与あるいは成熟化促進物質を与えることによって、FFR や β 受容体刺激などに対する薬理的応答が改善されることが示されている。これらの方策に加え、柔軟な基材を用いることによって更に成熟化が促進され収縮特性が改善されることが期待される。表には柔軟な細胞外基質を用いた心筋組織標本作製法をまとめた。EHT (Engineered Heart Tissue) は 20 年以上前に心筋梗塞で失われた心筋組織に移植する目的で作製された人工的心筋組織で、ハイドロゲルマトリックスの中に心筋細胞を封じ込めたものである。この技術をヒト iPS 細胞由来心筋細胞に適用し、ハイドロゲルマトリックスとしては生体成分のフィブリン、コラーゲンあるいは人工的高分子を用い、心筋以外の線維芽細胞なども加えて、必要な形状に成形して、収縮評価に用いている。EHT 標本に長期ペーシングを行うことで、成体心筋組織に近い生理的、薬理的応答が得られることも報告されている⁴⁾。心筋シート標本はフィブリンゲルや PDMS (Polydimethylsiloxane) などで作られた柔軟なシート状基材の上に心筋層が張り付いた形状で、心筋細胞の収縮によってもたらされるシートの変形を

表. 柔軟な細胞外基質を用いた 2D/3D 心筋組織標本

タイプ	作製法	特徴	組織標本例	参考文献
3D EHT*	心筋細胞とコラーゲンやフィブリン、更には線維芽細胞などと混ぜ、型にはめ込んで、心筋組織様標本作製。	型の形を変えることにより、柱状、リング状、また心室チェンバー上の標本を作ることができる。		Stem Cell Reports j Vol. 7 j 29-42 j July 12, 2016 NATURE COMMUNICATIONS (2020) 11:75
2D/3Dシート	フィブリンゲルなどの柔軟なシート状基材と細胞シートが結合したもの。基材上に細胞を播種して作製、あるいは心筋シートを張り合わせる。	心筋シートを張り合わせて作製する場合、複数枚の心筋シートを重ね合わせることが可能。また、心筋以外の細胞シートを挟むこともできる。		Sasaki et. al, PLOS ONE 13(5): e0198026 2018 JPTM 105, September 2020, 106892
Fiber Net	コラーゲンやゼラチン繊維などからなる3次元網目構造体に心筋細胞を播種して作製。	繊維の太さ、架橋密度、あるいは編み方の違いなどで様々な強度の網目構造を作製可能。繊維方向によって細胞の配向性も制御。		https://doi.org/10.14869/toxpt.47.1.0_P-226 (JSOT abstract) Adv. Funct. Mater. 2020, 30, 1908612

* Engineered Heart Tissue



収縮力あるいは変異として検出するものである。再生医療応用のために開発された細胞シート作製技術を用いて作られた心筋シートを張り合わせる場合には、複数の心筋シートや他の細胞シートを重ね合わせた多層の心筋組織を作製することも可能である。コラーゲンやゼラチンなど柔軟な繊維をネット状に成形して作られた3Dの足場材を用いて心筋細胞の培養を行う取り組みも活発になっている。この技術では繊維の素材、太さ、方向性、密度などそれぞれの特性を変更することができ、組み合わせの自由度も大きいことから、様々な細胞や目的に応じた足場を作

ることができる。心筋は繊維長軸方向に沿って配向する特性がある。また網目構造のため厚い3D標本中心部でも十分に酸素や栄養成分を受け取ることができるなど非常に魅力的な技術である。心筋の収縮評価においては、まだ始まったばかりであるが、今後の発展が期待できる。次に3D網目構造足場材を用い現在行っている研究について紹介する。

ゼラチン繊維不織布を用いた収縮評価系の取り組み

これまでの研究から、成熟を促すとされている種々の方法を同時に与えることに

より、心筋細胞成熟が加速されることが予測される。ゼラチンは動物の皮膚などの結合組織の主成分であるコラーゲンから抽出されたアミノ酸ポリマーで、親水性、細胞接着性などに優れているため、細胞培養の基材として古くから用いられていた。心筋細胞が長軸方向に配向できるような直径を有したゼラチン繊維を3D網目構造に加工することにより、大きな収縮変化を得るだけでなく、成熟を促すことのできる足場材となることが期待される。日本毛織(株)が開発したゼラチンハイドロゲル繊維不織布(Genocel®)は繊維同士が結合したネットワーク構造を有し、長期

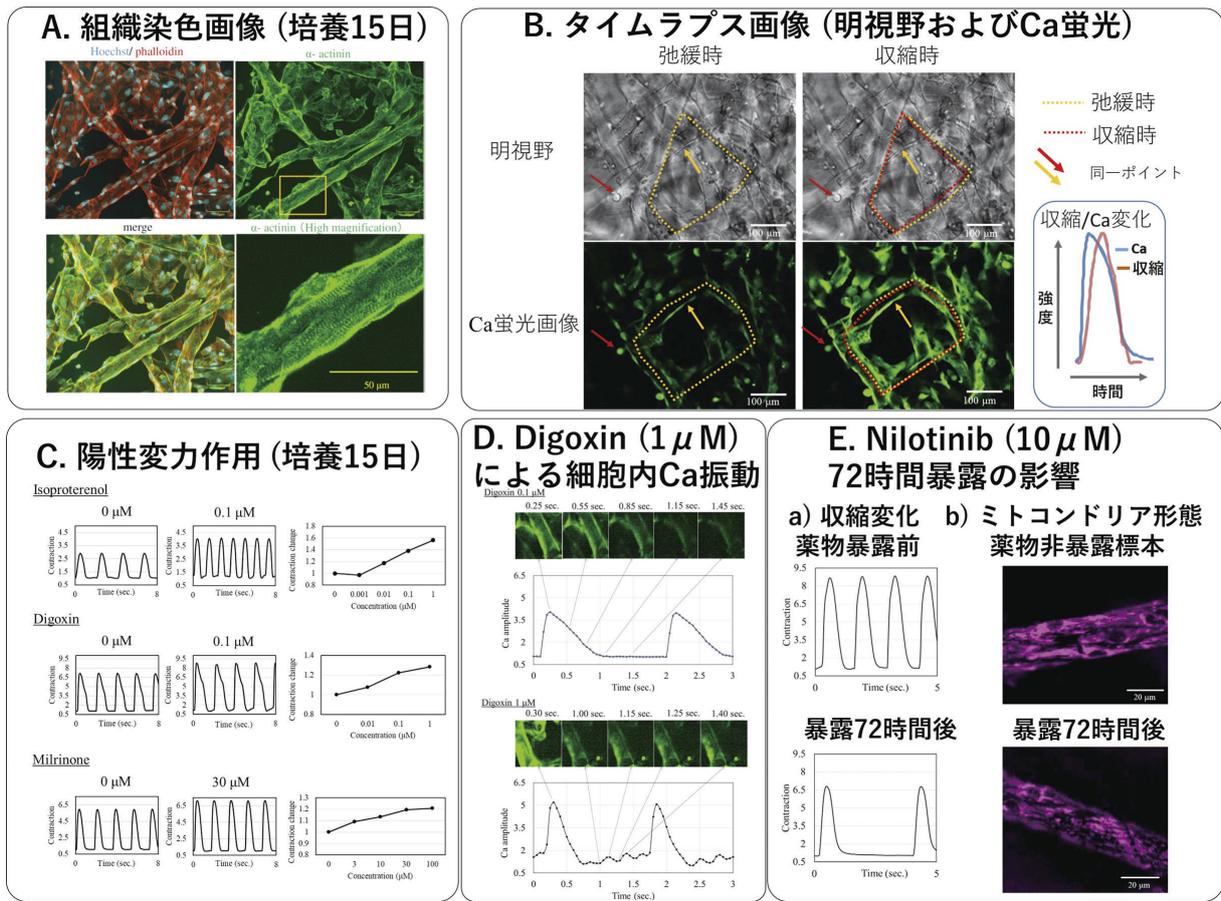


図. ゼラチンハイドロゲル繊維不織布 (GHFN) 上で培養したヒト iPS 細胞由来心筋細胞標本を用いた薬理評価
 実験には iCell® Cardiomyocytes² を GHFN 足場に対し、6,000 cells/mm² の濃度で播種し、2 週間培養した標本を用いた。画像記録および解析にはそれぞれ共焦点イメージング装置 (CQ1, 横河電機) および CellPathfinder (横河電機) を用いた。(A) 組織染色 (培養 15 日目): 細胞核 (Hoechst)、アクチンフィラメント (phalloidin)、アクチン結合タンパク質 (α -actinin) を蛍光染色。アクチンフィラメント画像より広範なネットワーク構造、 α -actinin 画像よりゼラチン繊維長軸方向に整列したサルコメア構造が確認できる。(B) 収縮および Ca 蛍光強度測定: 明視野 (上段) および Ca 蛍光 (下段、蛍光色素 EarlyTox) タイムラプス画像を同一視野から記録した (20 frame/秒)。収縮波形の数値化には MUSCLEMOTION Software⁵⁾ を、Ca 蛍光強度変化は CellPathfinder を用いた。細胞内 Ca の上昇に伴い細胞収縮が開始し、ゼラチン繊維の変形がみられる。(C) 陽性変力作用: 上段から β -受容体作動薬 (Isoproterenol)、強心配糖体 (Digoxin, Na-K ポンプ阻害薬) およびホスホジエステラーゼ 3 阻害剤 (Milrinone)。Isoproterenol および Milrinone は収縮力および拍動数を濃度依存的に増加させた。Digoxin は収縮力を濃度依存的に増加させた。(D) Digoxin 1 μ M による細胞内 Ca 振動: 0.1 μ M では細胞内 Ca は急速に増加した後、ゆっくりと減少し静止時には低値を維持した (上段)。一方、1 μ M では細胞内 Ca は急速に増加後、速やかに減少したが、その後小さな増減を繰り返した (下段)。(E) 抗がん剤 Nilotinib 72 時間暴露の影響: 収縮力は 72 時間後 25% 程度低下し、拍動数も低下した (a) 下段)。MitoTracker[®] によるミトコンドリアの形態観察において Nilotinib 暴露標本ではミトコンドリアの断片化の像が見られた (b) 下段)。

培養にも安定で、収縮変形能と変形回復能に優れていることも示されており、心筋収縮を評価する目的に適している素材であると考えられる。ただし、今回実験には心筋細胞が長軸方向に配向しやすいように市販の Genocel[®] より繊維径の細いゼラチン繊維から構成されたゼラチン繊維不織布 (GHFN) を用いた。ヒト iPS 細胞由来心筋細胞 (iCell[®] Cardiomyocytes²) を GHFN に播種すると、3 日目からゼラチン繊維長軸方向に縦長の心筋細胞が整列し、サルコメアの縞模様も観察できた。また、アクチン繊維はゼラチン繊維に沿って伸展し、ゼラチン繊維の交点を介して連結し、ネットワーク構造を形成した。培養7日目以降では GHFN 全体が同期拍動を示した。15 日間培養することで、心筋の拍動がより大きくなり、ゼラチン繊維長軸に沿って配向したサルコメア構造もさらに明確になり、サルコメア長はおおよそ 2 μ m で成体心筋細胞と同様な構造的特性を示した (図 A)。タイムラプス動画からカルシウムトランジェントと動きを同時に測定することで、1つの像からカルシウムレベルと心筋の動きを評価することが可能であった (図 B)。2 週間培養の標本において、Isoproterenol (β -受容体作動薬)、Milrinone (PDE3 阻害薬)

および Digoxin (Na-K ポンプ抑制薬) の陽性変力作用が確認できた (図 C)。iCell[®] Cardiomyocytes² を用いたこれまでの報告では、長期ペーシングなどで成熟化促進を行わない標本においては、これらの陽性変力作用はとらえにくいことが報告されている。今回の結果はゼラチン繊維 3D 足場材上で培養しただけでペーシングと同様の効果があることを示唆する。また、ゼラチンは無色透明で、薬物によるサルコメア、ミトコンドリアまた核など細胞内小器官への影響を調べる場合にも適していると考えられる。Digoxin 高濃度による細胞内局所での Ca 振動 (図 D、下段) は催不整脈性の副作用メカニズムと関連している可能性がある。また、抗がん剤 Nilotinib 長期暴露によるミトコンドリアの断片化の像 (図 E、b) 下段) は心毒性との関連性を示唆する。ゼラチン繊維 3D 足場材を用いた検討はまだ進行中であるが、今後さらに広い応用性が示されると考えられる。

最後に

心毒性をもたらすメカニズムは多様で、複雑に絡み合っている。臨床での心機能リスクを正しく予測するためには、収縮機能のみならず組織学的変化も併せて検討

できる総合的 *in vitro* 細胞実験システムの開発が重要であろう。また、抗がん剤などの薬物による心筋収縮力抑制を検討する時には長期の薬物暴露が必要であり、成熟化などを進めた心筋細胞でもその状態を長期に維持できるかなどの課題を解決することも重要である。

【参考文献】

- 1) Blinova, K. et al. : *Cell Rep.*, **24**, 3582 (2018).
- 2) Karbassi, E. et al. : *Nat. Rev. Cardiol.*, **17**, 341 (2020).
- 3) Guo, Y. and Pu, W. T. : *Circ. Res.*, **126**, 1086 (2020).
- 4) Feric, N. T. et al. : *Toxicol. Sci.*, **172**, 89 (2019).
- 5) Sala, L. et al. : *Circ. Res.*, **122**, e5 (2018).

—シリーズ開始にあたって—

2007年にヒトiPS細胞技術が確立されて以来、現在まで種々のヒトiPS細胞由来分化細胞が報告されています。ヒト細胞であることから、種差の壁を越え臨床予測性向上の期待のもと、創薬応用が展開されています。

本号からの「ヒトiPS細胞由来分化細胞の創薬応用」は、全4回の連載で創薬に対するヒトiPS細胞由来心筋、神経細胞、オルガノイド、肝細胞の応用例を、トップランナーの研究者からご紹介頂きます。

本連載が読者の皆様のご研究の一助になりましたら幸いです。

iCell[®] 心筋細胞



コード No.	メーカーコード	品名	容量	希望納入価格 (円)
iCell[®] 心筋細胞 01434 株				
551-33491	C1056	iCell [®] Cardiomyocytes 01434	$\geq 1.0 \times 10^6$ cells/vial	131,000
552-33301	C1006	iCell [®] Cardiomyocytes 01434	$\geq 4.0 \times 10^6$ cells/vial	258,000
iCell[®] 心筋細胞 11713 株				
552-33541	C1105	iCell [®] Cardiomyocytes 11713	$\geq 1.0 \times 10^6$ cells/vial	131,000
559-33551	C1106	iCell [®] Cardiomyocytes 11713	$\geq 4.0 \times 10^6$ cells/vial	258,000
iCell[®] 心筋細胞 2.0 01434 株				
554-39721	C1058	iCell [®] Cardiomyocytes ² 01434*	$\geq 1.25 \times 10^6$ cells/vial	74,000
553-33331	C1016	iCell [®] Cardiomyocytes ² 01434	$\geq 5.0 \times 10^6$ cells/vial	258,000
iCell[®] 心筋細胞 2.0 11713 株				
553-40301	C1233	iCell [®] Cardiomyocytes ² 11713	$\geq 5.0 \times 10^6$ cells/vial	258,000

※本品のご購入は2バイアル単位となります。

関連製品 専用培地

コード No.	メーカーコード	品名	容量	希望納入価格 (円)
550-33581	M1001	iCell [®] Cardiomyocytes Plating Medium	30mL	52,000
557-33591	M1003	iCell [®] Cardiomyocytes Maintenance Medium	100mL	20,000

iCell[®] 心筋細胞のアプリケーション情報及び他の iCell[®] 製品情報は当社 HP をご覧下さい。

iCell Products

検索

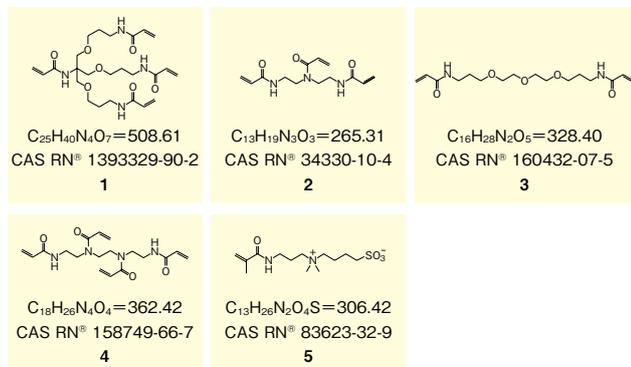
富士フイルムワコーケミカル株式会社

機能性ポリマー材料合成に 水溶性アクリルアミドモノマー

アクリルアミドモノマーから得られるポリマーは、UV塗料、接着剤、レンズコート材料などさまざまな用途に利用されています。特に、近年、アクリルアミドポリマーは生体適合性が高いことから、バイオマテリアルとしての応用が期待されています。当社では、アクリルアミド基を複数有した架橋剤、及び高い親水性を発現するベタイン構造とメタクリルアミド基を有するモノマーを新たにラインアップしました。新規のポリマー材料の開発にご利用下さい。

特長

- 水溶性が高く、安全性に優れている
- 高い安定性（耐加水分解性）
- ポリマーの用途として塗料、接着剤、レンズコート材料などに加え、生体適合性が高いことからバイオマテリアルとしても注目^{1,2)}
- バルク対応も可能



溶解性

溶解度 (wt%) (FOM-03010 は液温 25°C、それ以外は 30°C)

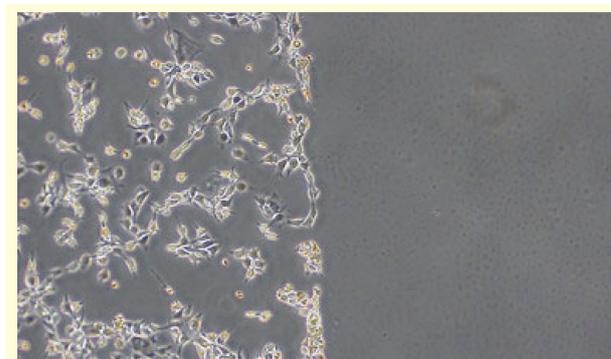
アクリルアミドモノマー 溶媒	FOM-03006 1	FOM-03007 2	FOM-03008 3	FOM-03009 4	FOM-03010 5
n-ヘキサン	0.1 未満	0.1 未満	0.1 未満	0.1 未満	—
トルエン	0.1 未満	0.1 未満	1~5	0.1 未満	—
酢酸エチル	0.1 未満	0.1~0.5	0.1~0.5	0.1~0.5	0.1 未満
メチルエチルケトン	0.1~0.5	0.1~0.5	0.5~1	1~5	—
アセトン	0.5~1	0.1~0.5	1~5	1~5	0.1 未満
イソプロピルアルコール	40~50	0.5~1	10~20	1~5	0.5~1
アセトニトリル	0.5~1	0.1 未満	0.5~1	1~5	—
エタノール	50 以上	50 以上	50 以上	30~40	10~20
メタノール	50 以上	50 以上	50 以上	50 以上	30~40
水	50 以上	50 以上	50 以上	40~50	50 以上

データ

FOM-03006 の安全性評価

試験項目	結果
皮膚刺激性・腐食性	PII = 0 無刺激
皮膚感受性	陰性
変異原性 (Ames)	陰性

マウス線維芽細胞の付着抑制確認試験



Glass

Coated

左：処理なし、右：FOM-03010 とメタクリル酸ブチルとの共重合体をガラスに塗布

細胞の付着抑制作用を示すため、生体内で異物反応が起きる可能性が低く、生体適合性が高いと考えられる。

【参考文献】

- 1) Matsuda, T., Kawakami, R., Namba, R., Nakajima, T. and Gong, J. P. : *Science*, **363**, 504 (2019).
- 2) 中島祐：高分子, **69**, 146 (2020).

No.	コード No.	品名	容量	希望納入価格 (円)
NEW 1	356-45851	N-[Tris(3-acrylamidopropoxymethyl)methyl]acrylamide 【FOM-03006】	5g	13,000
NEW 2	353-45861	N,N-Bis(2-acrylamidoethyl)acrylamide 【FOM-03007】	5g	7,000
NEW 3	350-45871	N,N'-[Oxybis(2,1-ethanediyloxy-3,1-propanediyl)]bisacrylamide 【FOM-03008】	5g	11,000
NEW 4	357-45881	N,N'-1,2-Ethanediybis[N-(2-(acryloylamino)ethyl)acrylamide] 【FOM-03009】	5g	20,000
NEW 5	354-45891	4-[(3-Methacrylamidopropyl)dimethylammonio]butane-1-sulfonate 【FOM-03010】	5g	7,000

その他のモノマー、重合開始剤などは当社の HP をご覧下さい。

試薬事業トップ→合成・材料→高分子合成

<https://labchem-wako.fujifilm.com/jp/category/synthesis/polymerization/index.html>

まとめ買いにも対応

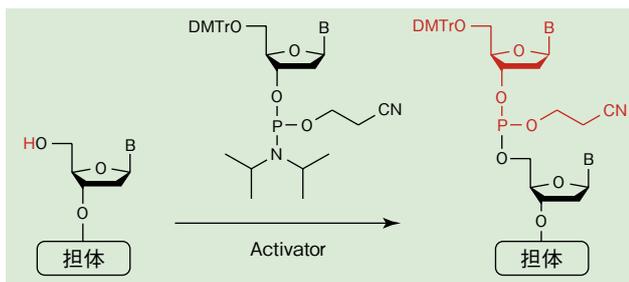
核酸合成用アクチベーター

Wako

本品は、核酸合成手法のホスホロアミダイト法におけるカップリング工程で使用するアクチベーター（活性化剤）です。定番のBTT、ETT他、4種類のアクチベーターを水分値を保証して販売しています。商用スケールでご使用のお客様には3L包装のまとめ買いにも対応します。

特長

- 粉末と溶液品の2タイプをラインアップ
- カップリング反応を阻害する水分を低減
水分値保証
粉末：300ppm以下、溶液：30ppm以下
- 豊富なスケールアップ実績：3L包装のまとめ買いに対応可能



粉末

コード No.	品名	CAS RN [®]	規格	容量	希望納入価格 (円)
016-27561	Activator-1 (4,5-Dicyanoimidazole)	1122-28-7	核酸合成用	5g	10,000
014-27562				25g	22,000
019-27551	Activator-4 (5-Ethylthio-1H-tetrazole)	89797-68-2	核酸合成用	5g	12,000
017-27552				25g	30,000

溶液

コード No.	品名	CAS RN [®]	規格	容量	希望納入価格 (円)
013-19685	Activator Solution-1 (0.25mol/L)			500mL	8,500
011-19681	4,5-Dicyanoimidazole, Acetonitrile Solution	1122-28-7	核酸合成用	3L	22,000
017-19683				3L×4	85,000
011-19701	Activator Solution-2 (0.45mol/L 1H-Tetrazole, Acetonitrile Solution)	288-94-8	核酸合成用	3L	25,000
015-20015	Activator Solution-3 (0.25mol/L 5-Benzylthio-1H-tetrazole, Acetonitrile Solution)	21871-47-6	核酸合成用	500mL	8,900
013-20011				3L	27,800
019-20013				3L×4	照会
018-19691	Activator Solution-4 (0.25mol/L 5-Ethylthio-1H-tetrazole, Acetonitrile Solution)	89797-68-2	核酸合成用	3L	36,100
012-19694				3L×4	照会

すこしの水で除菌ができるペーパータオル

除菌ドライシート

Wako

本品は、すこしの水^{*}で濡らすと、除菌効果を発揮するドライタイプのペーパータオルです。ドライタイプのため、長期保管に向いており、開封後も保管条件を気にすることなく、手軽にご使用いただけます。また、除菌成分であるCPC（塩化セチルピリジニウム）は、衛生関連製品を中心に多数の使用実績があり、汎用的に使用されている成分です。

※最適な水分量：小さじ約1/2程度（2g）



使用例

すこしの水で効果を発揮するため使用場所を選ばず、ご家庭や学校、高齢者施設や病院での日常生活から、防災備蓄用などさまざまなシーンでご使用いただけます。



除菌性能

一般財団法人日本衛生材料工業連合会の「ウェットワイパー類の除菌性能試験方法」に準拠し性能試験を実施しました。

【対象となる菌】

大腸菌・黄色ブドウ球菌

【試験方法】

主成分CPCを配合した除菌ドライシート全体にJIS硬水を一定量含浸させ、除菌性能試験を行い除菌効果を調べた。

【結果】

除菌ドライシート（JIS硬水2g含浸）

…大腸菌99.9%以上除菌／黄色ブドウ球菌99%以上除菌

※※すべての菌を除菌できるわけではありません。

コード No.	品名	規格	容量	希望納入価格 (円)
296-36311	Dry Antibacterial Sheet	除菌用	1箱(36パック [*])	10,000

* 1パック160枚入り

詳細は当社HPをご覧ください。

<https://labchem-wako.fujifilm.com/jp/category/02046.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、2021年4月時点での情報です。最新情報は、当社HPをご参照下さい。

関連製品

組成	水質基準に係る検査方法*
フェノール類 6 種混合標準液 (アセトン溶液)	
フェノール 2-クロロフェノール 4-クロロフェノール 2,4-ジクロロフェノール 2,6-ジクロロフェノール 2,4,6-トリクロロフェノール 各 1,000mg/L	水質基準 (別表) 29、29 (2)
亜塩素酸イオン標準液 (ClO ₂ ⁻ 1000)	
亜塩素酸ナトリウム: 1,000mg/L	水質管理目標 10、12
陰イオン 5 種混合標準液	
硝酸態窒素 (Nとして): 100mg/L 亜硝酸態窒素 (Nとして): 10mg/L ふっ化物イオン: 100mg/L 塩化物イオン: 200mg/L 塩素酸イオン: 100mg/L	水質基準 (別表) 13
ハロ酢酸 4 種混合標準液 (t-ブチルメチルエーテル溶液)	
クロロ酢酸 ジクロロ酢酸 トリクロロ酢酸 プロモ酢酸 各 1,000mg/L	水質基準 (別表) 17、17 (2)

※ 2021 年 3 月 1 日時点

コード No.	品名	規格	容量	希望納入価格 (円)
163-28521	フェノール類6種混合標準液(アセトン溶液) <small>Ref. ④ III ④</small>	JCSS	2mL×5A	19,000
036-25581	亜塩素酸イオン標準液 (ClO ₂ ⁻ 1000) <small>Ref.</small>	JCSS	100mL	7,800
012-28021	陰イオン5種混合標準液 <small>Ref. ④ III</small>	JCSS	50mL	9,800
084-10491	ハロ酢酸4種混合標準液(t-ブチルメチルエーテル溶液) <small>Ref. ④</small>	JCSS	2mL×5A	14,000

その他にも多数の JCSS 対応品を取扱っています。詳細は当社ホームページをご確認下さい。

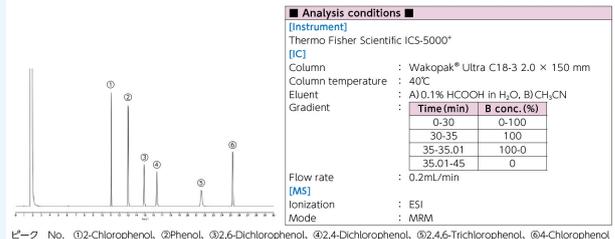
<https://labchem-wako.fujifilm.com/jp/category/analysis/referencematerial/jcss/index.html>

水質試験用試薬カタログ 2020 年版配布中!!



混合標準液について分析例をご紹介します

LC/MS Chromatogram



- 水質基準項目、水質管理目標設定項目、要検討項目など項目別に対応する試薬を収載 (2020 年度水道法対応)
- 混合標準液については分析例、分析条件の情報を追加

カタログをご希望の場合は、当社または当社代理店営業員までお問合せ下さい。

和光純薬時報 Vol.89 No.1 訂正案内

和光純薬時報 Vol.89 No.1 の記事中に誤りがございました。下記の通り訂正をご案内させていただくとともに、深くお詫び申し上げます。

記

〈訂正内容〉

掲載箇所: p.5

訂正箇所: 表 1

訂正内容: 表の項目名が以下の通り (左から4つ目が、「D」)

[誤]	A	B	C	C	E
OA	1.080	1.106	1.063	1.051	1.067
↓					
[正]	A	B	C	D	E
OA	1.080	1.106	1.063	1.051	1.067

尚、ホームページ掲載 PDF ファイルは訂正しています。

以上

Ref. ② ~ 10°C 保存 F... - 20°C 保存 ④... - 80°C 保存 ⑤... - 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、2021 年 4 月時点での情報です。最新情報は、当社 HP をご参照下さい。

リニューアル!

合成ゼオライト

Wako

合成ゼオライトは、アルカリ金属またはアルカリ土類金属の結晶性含水アルミノけい酸塩の結晶水を加熱により脱離させたものです。結晶水が脱離してできた空洞は強い吸着能を有します。またこれに通じる直径数オングストロームの均一な細孔は分子ふるい効果を持ちます。

本品は、粒子径 150 μm 以下の粉末タイプの製品です。

吸着特性

合成ゼオライト	A-3	A-4	F-9
化学組成	(0.4K+0.6Na) ₂ O·Al ₂ O ₃ ·2SiO ₂	Na ₂ O·Al ₂ O ₃ ·2SiO ₂	Na ₂ O·Al ₂ O ₃ ·2.5SiO ₂
細孔径 (Å)	3	4	9
水分吸着量 (wt%)	20	20	26
水	○	○	○
アンモニア	○	○	○
CO ₂	○	○	○
CO	○	○	○
硫化水素	○	○	○
亜硫酸ガス	○	○	○
C ₁ 、C ₂ パラフィン		○	○
C ₃ ~C ₂₂ n-パラフィン類			○
イソパラフィン類			○
C ₂ 、C ₃ オレフィン		○	○
C ₄ 以上 n-オレフィン類			○
イソオレフィン類			○
シクロプロパン			○
C ₄ 以上 ナフテン類			○
ベンゼン及び大部分の低級芳香族炭化水素類			○
C ₁ ~C ₃ n-アルコール		○	○
C ₄ 以上 n-アルコール類			○
C ₃ 以上 iso-、sec-、tert-アルコール類			○
ジ-n-プロピルアミン			○
ジ-n-ブチルアミン			○
結晶型	A 型	A 型	X 型

(○:吸着)

コード No.	品名	規格	容量	希望納入価格 (円)
260-02305	Zeolite, Synthetic, A-3, Powder, through 0.15mm (100mesh)	-	500g	6,000
267-02315	Zeolite, Synthetic, A-4, Powder, through 0.15mm (100mesh)	-	500g	4,900
264-02325	Zeolite, Synthetic, F-9, Powder, through 0.15mm (100mesh)	-	500g	5,450

〈従来製品〉

コード No.	品名	規格	容量	希望納入価格 (円)
269-00555	Zeolite, Synthetic, A-3, Powder, through 75μm (200mesh)	-	500g	5,350
267-00595	Zeolite, Synthetic, A-4, Powder, through 75μm (200mesh)	-	500g	4,900
261-00635	Zeolite, Synthetic, F-9, Powder, through 75μm (200mesh)	-	500g	販売終了

※ F-9は、販売を終了しました。A-3、A-4は在庫が無くなり次第、販売を終了します。 ※ 2021年3月29日時点

追加品目のお知らせ

Wako

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・動物用医薬品の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

- ベンズピリモキサン代謝物 M5 標準品
- フェンピロキシメート代謝物 M-3 標準品
- イブフルフェノキン標準品
- イソフェタミド代謝物 C 標準品
- MIPC 標準品
- オキサチアピプロリン標準品
- テトラニプロール標準品
- XMC 標準品

動物用医薬品標準品

- チルジピロシン標準品 (異性体混合物)

コード No.	品名	規格	容量	希望納入価格 (円)
NEW 023-19441	Benzpyrimoxan Metabolite M5 Standard ^{Ref}	残留農薬試験用	20mg	45,000
NEW 066-06941	Fenpyroximate Metabolite M-3 Standard ^{Ref}	残留農薬試験用	50mg	45,000
NEW 095-07411	Ipfufenquin Standard ^F	残留農薬試験用	100mg	29,000
NEW 098-07381	Isofetamid Metabolite C Standard ^{Ref}	残留農薬試験用	100mg	30,000
NEW 130-06813	MIPC Standard ^{Ref} ^{III}	残留農薬試験用	100mg	12,000
NEW 153-03561	Oxathiapiprolin Standard ^{Ref}	残留農薬試験用	50mg	30,000
NEW 204-21141	Tetraniliprole Standard ^{Ref}	残留農薬試験用	50mg	30,000
NEW 244-00503	XMC Standard ^{Ref} ^{III}	残留農薬試験用	100mg	8,000
NEW 205-21171	Tildipirosin Standard (mixture of isomers) ^F	高速液体クロマトグラフ用	50mg	10,000

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

試薬事業トップ→分析→残留農薬・動物用医薬品分析→標準品→残留農薬・動物用医薬品分析用標準品「製品一覧」
<https://labchem-wako.fujifilm.com/jp/category/01942.html>

^{Ref}…2~10℃保存 ^F…-20℃保存 ^{III}…-80℃保存 ^{III}…-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、2021年4月時点での情報です。最新情報は、当社 HP をご参照下さい。

麹菌 *Aspergillus oryzae* 由来の酸性プロテアーゼ簡易測定キット



酸性プロテアーゼ測定キット

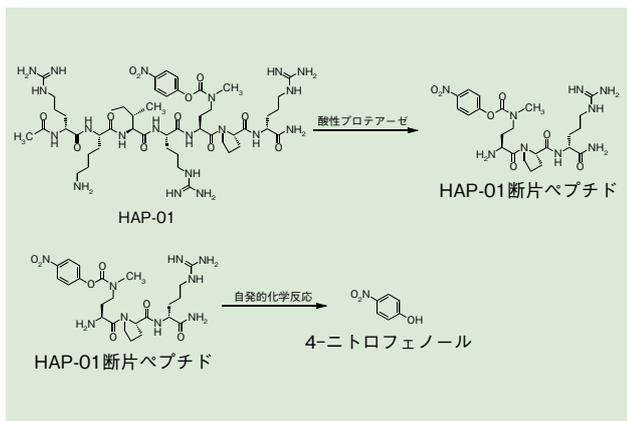
清酒醸造において重要な米麴の酸性プロテアーゼを、簡易に測定できるキットです。本キットは、*Aspergillus oryzae* 由来の酸性プロテアーゼに特異性が高い基質溶液と pH 調整液（炭酸ナトリウム水溶液）の 2 本で構成しています。国税庁所定分析法（以下、標準法）と比較して簡便かつ迅速に、米麴の酸性プロテアーゼ活性値を測定できます。

特長

- 簡便
混合と加熱だけで測定できます。測定は 3 ステップで終了します。
- 迅速
酵素反応は 20 分、失活反応は 5 分、発色反応は短時間で終了します。
- 相関性
標準法と高い相関が認められています。

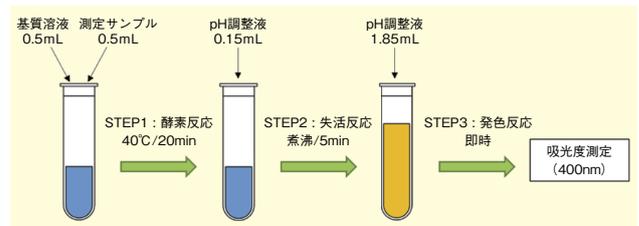
測定原理

基質溶液に含まれる合成基質 HAP-01 が、酸性プロテアーゼによって分解されます（酵素反応）。pH 調整液を加えて煮沸すると酸性プロテアーゼが失活し（失活反応）、同時に、酵素反応で生じた HAP-01 断片ペプチドから 4-ニトロフェノールが遊離します。未反応の HAP-01 から 4-ニトロフェノールは、ほぼ遊離しません。さらに pH 調整液を加えたアルカリ条件下で 4-ニトロフェノールを発色させた後（発色反応）、波長 400nm の吸光度を測定し、換算式により酸性プロテアーゼの活性値を求めます。



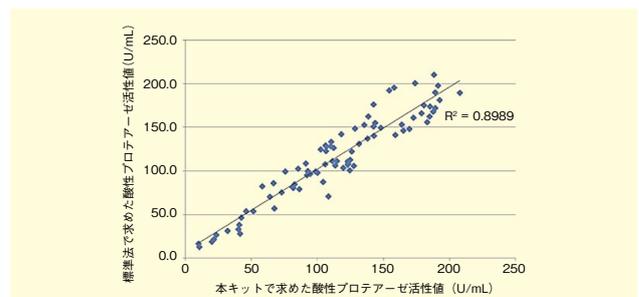
操作方法

測定は、酵素反応・失活反応・発色反応の 3 ステップで完了します。



標準法との相関性

種々の米麴 (n=82) を用いて、標準法と本法の測定結果を比較し、良好な相関性があることを確認しています。



コード No.	メーカーコード	品名	容量	希望納入価格 (円)
335-00921	L3780	Acid Protease Assay Kit <small>Ref</small>	50回	27,000

Tau 凝集阻害剤

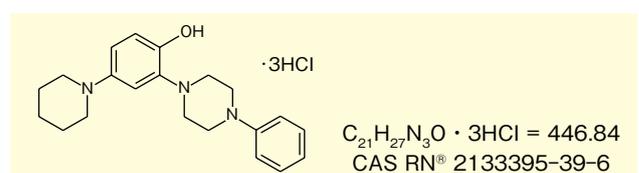
KT-430

Wako

KT-430 は、イソプロテレノール由来の低分子化合物で、Tau タンパク質の凝集を阻害する作用があります。これまでに Tau タンパク質凝集阻害作用が報告されていたメチレンブルーの約 20 倍の阻害作用を有します。

特長

- Tau タンパク質の凝集を阻害
- 高い凝集阻害活性
- 血液脳関門透過性
- *in vitro* 及び *in vivo* (マウス) で Tau タンパク質の凝集阻害作用を確認



コード No.	品名	規格	容量	希望納入価格 (円)
119-01141	KT-430	細胞生物学用	10mg	26,000

神経疾患研究に

Mature BDNF ELISA キットワコー、高感度品

Wako

BDNF (Brain-derived Neurotrophic Factor) は神経栄養因子の一つで、神経発生・神経保護作用・シナプス形成などに関与し、脳内で重要な役割を担うことが知られています。BDNF には前駆体である proBDNF が存在し、BDNF とは異なる作用を有することが報告されています。proBDNF はプロセッシングを受けることで mBDNF (mature BDNF) となります。

本品は、検体中の mBDNF 濃度を特異的に測定可能な ELISA キットです。発光検出系を用いることで既存品 (コード No. 296-83201 Mature BDNF ELISA キットワコー) の約 20 倍の感度を実現し、従来検出が難しかったマウス血中の微量な BDNF を測定可能です。

特長

- マウス血漿、血清中の微量な BDNF を測定可能
- mature BDNF を特異的に検出

性能

品名	Mature BDNF ELISA キットワコー、高感度品	Mature BDNF ELISA キットワコー
コード No.	298-83901	296-83201
測定対象	mature BDNF	mature BDNF
検体	マウス血清・血漿 ラット血清・血漿	ヒト血清・血漿
検量線範囲	0.205 ~ 50pg/mL	4.1 ~ 1,000pg/mL
ヒト proBDNF との反応性	< 0.5%	約 10%
必要検体量	13μL (4 倍希釈時)	ヒト血清:10μL (10 倍希釈時) ヒト血漿:5μL (20 倍希釈時)
測定時間	約 4 時間	約 4 時間
検出法	発光系	発色系

コード No.	品名	規格	容量	希望納入価格 (円)
298-83901	Mature BDNF ELISA Kit Wako, High Sensitive	免疫化学用	96回用	83,000

関連製品

ELISA キット

コード No.	品名	規格	容量	希望納入価格 (円)
296-83201	Mature BDNF ELISA Kit Wako	免疫化学用	96回用	69,000

BDNF 抗体

コード No.	品名	規格	容量	希望納入価格 (円)
017-28071	Anti BDNF, Monoclonal Antibody (2D7)	免疫化学用	100μL	50,000
014-28081	Anti BDNF, Monoclonal Antibody (3C8)	免疫化学用	100μL	50,000

レビス® シリーズに Human IL-7 が追加になりました!

ヒト血清(血漿)中の IL-7 を短時間・微量検体・高感度で測定可能 **LBIS**

レビス® Human IL-7 ELISA Kit

富士フイルムワコーシバヤギ (株) のレビス® サイトカイン ELISA キットシリーズに新たに Human IL-7 が追加されました。既存品では感度が得られず測定できなかった正常検体、低濃度検体を高感度に再現性良く測定可能です。

IL-7 は主に骨髄、胸腺、リンパ器官・組織のストロマ細胞などの非造血細胞によって産生され、幹細胞の免疫系細胞への分化を誘導するサイトカインです。成熟体は 152 アミノ酸で構成されています。CD4⁺、CD8⁺ 両細胞の増殖や発生、抗ウイルス活性を促進し、関節リウマチや慢性大腸炎発生、好酸球活性を介した喘息にも関係づけられています。また、抗がん剤と免疫チェックポイント関連薬剤の併用治療におけるブースター因子として、NK 細胞、B 細胞、T 細胞の増強作用物質の探索や研究に高感度 IL-7 測定の有用性が期待されています。

特長

- カルタヘナ法非該当 (バキュロウイルス不含有)
- 微量な検体で測定可能
- 短時間で測定可能 (全反応時間: 2 時間 50 分)
- 環境に優しい防腐剤を使用
- 高い精度と再現性

性能

検体	ヒト血清 / 血漿 (ヘパリン / EDTA)
検量線範囲	1.50 ~ 236pg/mL
アッセイ内変動 (5 重測定、2 検体)	平均 C.V. 値: 15% 未満
アッセイ間変動 (3 重測定、3 検体、4 日間)	平均 C.V. 値: 15% 未満

データ

ヒト検体測定 (例)

Sample No.	測定値	Sample No.	測定値
1	3.90	7	3.78
2	2.44	8	11.0
3	7.59	9	40.0
4	6.21	10	10.0
5	9.36	11	3.50
6	5.35		

ヒト正常血清、2 重測定、単位: pg/mL

[次頁に続く]

キット内容

- 抗体固相化96ウェルプレート 96 wells (8×12) / 1枚
- ヒトIL-7標準品 1本
- 緩衝液 60mL × 1本
- ビオチン結合抗IL-7抗体 1本
- ペルオキシダーゼ・アビジン結合物 150 μL × 1本
- 発色液 (TMB) 12mL × 1本
- 反応停止液 (1 mol/L H₂SO₄) 12mL × 1本
- 濃縮洗浄液 (10×) 100mL × 1本

コード No.	メーカーコード	品名	容量	希望納入価格 (円)
637-50441	AKH-IL7	LBIS Human IL-7 ELISA Kit <small>Ref</small>	96回用	70,000

関連製品

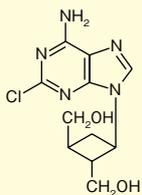
コード No.	メーカーコード	品名	標準曲線範囲 (pg/mL)	容量	希望納入価格 (円)
635-42311	AKH-IL6	LBIS Human IL-6 ELISA Kit <small>Ref</small>	1.16~500	96回用	70,000
632-42321	AKH-IL8	LBIS Human IL-8 (CXCL8) ELISA Kit <small>Ref</small>	0.686~500	96回用	70,000
639-42331	AKH-TNFA	LBIS Human TNF-α ELISA Kit <small>Ref</small>	2.05~500	96回用	70,000
631-40831	AKH-VEGF	LBIS Human VEGF ELISA Kit <small>Ref</small>	1.10~800	96回用	58,000
631-47891	AKH-IFNG	LBIS Human IFN-γ ELISA Kit <small>Ref</small>	0.768~75.0	96回用	70,000

容量・価格リニューアル VEGF/NGF like な活性を示す低分子化合物

Wako

COA-CI [2-CI-C.OXT-A]

COA-CI (コアクロル) は、血管新生促進作用を示す低分子化合物です。神経保護・栄養作用も示します。水溶性の低分子化合物であり、VEGF や NGF に代わり再生医療における血管や神経の構築に用いることができる可能性があります。また、Xeno-free 培地の添加剤として有用である可能性があります。



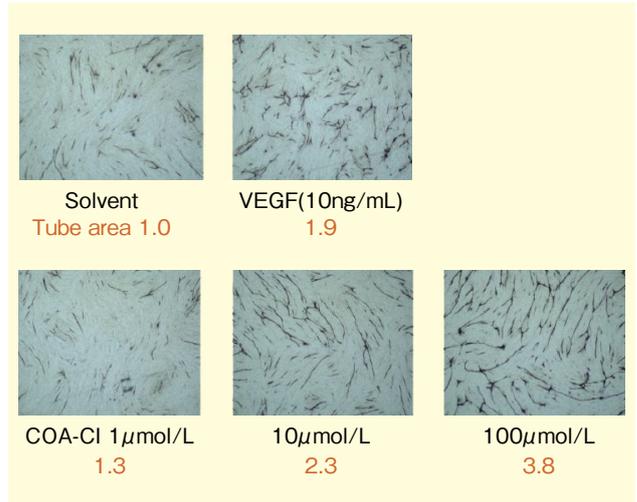
C₁₁H₁₄ClN₅O₂=283.71
CAS RN® 1253579-96-2

製品概要

- 外観：白色～わずかにうすい褐色、結晶性粉末～粉末又は塊
- 水溶状：試験適合

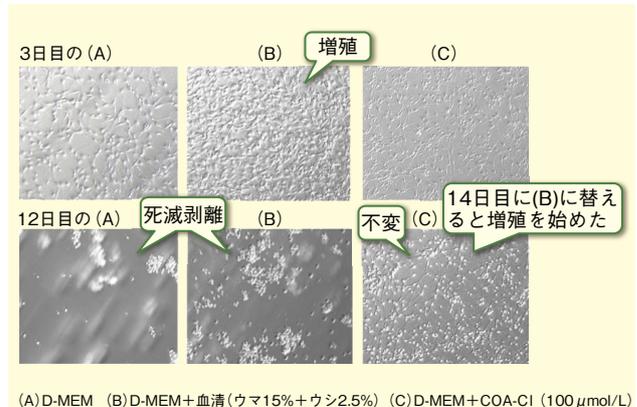
データ

血管内皮細胞と線維芽細胞の共培養系での使用例：血管新生促進作用



10日間培養後に形成される管腔面積が増加した。
(データご提供：香川大学医学部 塚本郁子先生)

ラットグリオーマ細胞 (C6) の培養例：細胞保護作用



ラットグリオーマ細胞 (C6) を 24 ウェルプレートに播種し、翌日、(A)、(B)、(C) に置換えし、16日間培養した (培地交換なし)。(A)、(B) では、12日目に細胞が死滅したが、(C) では12日目も変化なく、さらに14日目に培地を (B) に交換すると、増殖を始めた。
(データご提供：香川大学医学部 塚本郁子先生)

コード No.	品名	規格	容量	希望納入価格 (円)
038-21543	COA-CI	細胞生物学用	5mg	15,000
036-21544	[2-CI-C.OXT-A]		25mg	60,000

上記以外のデータは、当社 HP をご覧下さい。

COA-CI 和光

検索

回収率と精製純度を向上させた エクソソーム単離・精製キット

Wako

MagCapture™ エクソソームアイソレーションキット PS Ver.2

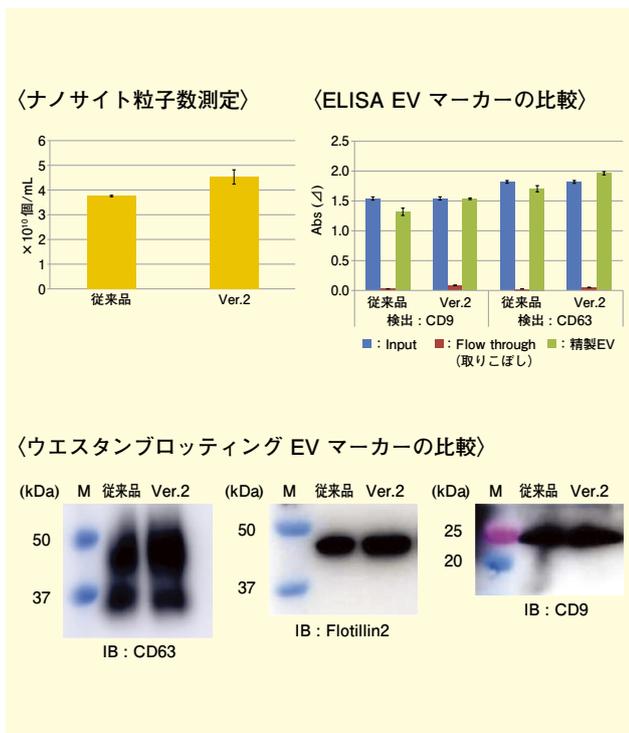
本キットは、従来品 (MagCapture™ エクソソームアイソレーションキット PS: コード No. 293-77601) よりもエクソソームの回収率と精製純度が向上し、実験操作時間の短縮を実現したエクソソーム単離・精製キットです。本キットで精製したエクソソームは、そのまま細胞添加実験にも使用できます。

特長

- エクソソームの回収率と精製純度が向上
- アフィニティー反応時間を短縮 (3時間→1時間)
- 精製エクソソームの細胞毒性を低減

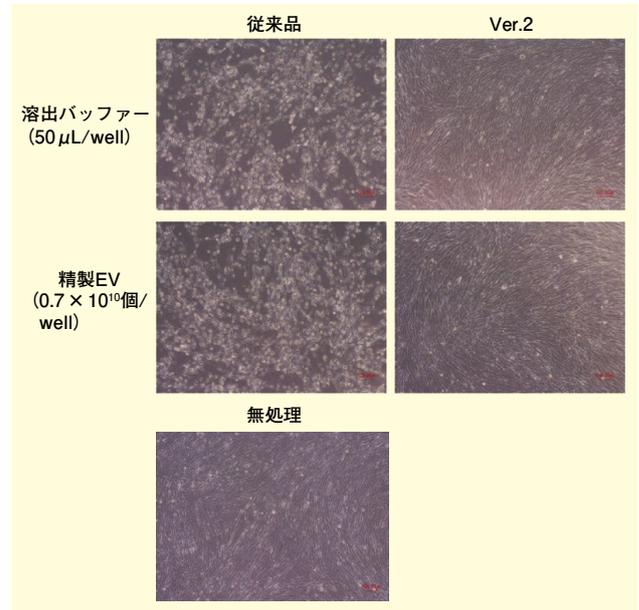
データ

■ エクソソーム回収率の比較



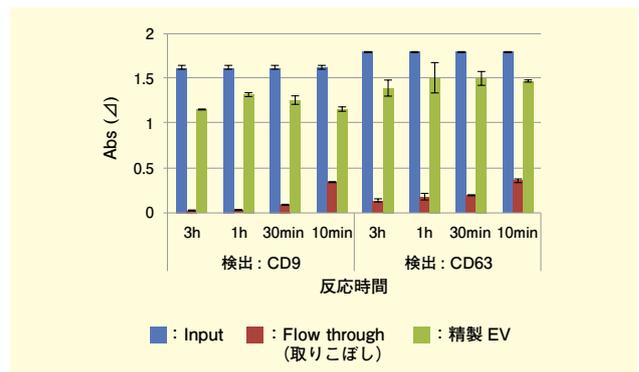
間葉系幹細胞 (MSC) の培養上清において、従来品及び本キット (以下、Ver.2) を用いて、エクソソームを含む細胞外小胞 (EV) の単離・精製を行った。その後、得られたサンプルについて、ナノサイトによる粒子数測定、及び PS Capture™ エクソソーム ELISA キット (ストレプトアビジン HRP) [コード No. 298-80601] とウエスタンブロットによる EV マーカーの比較を行った。Ver.2 では従来品と比較して回収率が向上した。

■ 精製エクソソームの細胞毒性比較



従来品及び本キット (以下、Ver.2) を用いて、COLO201 細胞培養上清よりエクソソームを含む細胞外小胞 (EV) の単離・精製を行った。その後溶出バッファのみ、もしくは精製エクソソームを、あらかじめ播種しているヒト正常線維芽細胞へ添加し、48 時間経過時点での細胞形態変化を観察した。従来品では添加後 48 時間経過時点で細胞死が起こるが、Ver.2 では顕著な細胞毒性は観察されなかった。

■ アフィニティー反応時間におけるエクソソーム精製回収率の比較



COLO201 細胞培養上清において、本キット (以下、Ver.2) のアフィニティー反応時間を 4 条件設定し、エクソソームを含む細胞外小胞 (EV) の単離・精製を行った。その後、得られたサンプルについて、PS Capture™ エクソソーム ELISA キット (ストレプトアビジン HRP) [コード No.298-80601] による EV マーカーの比較を行った。Ver.2 は、1 時間のアフィニティー反応で十分 EV を回収可能であることが確認できた。

コード No.	品名	規格	容量	希望納入価格 (円)
294-84101	MagCapture™ Exosome Isolation Kit PS Ver.2	遺伝子研究用	2回用	20,000
290-84103	MagCapture™ Exosome Isolation Kit PS Ver.2	遺伝子研究用	10回用	80,000

Refrigerated (2~10°C), Frozen (-20°C), Frozen (-80°C), Frozen (-150°C). Displayed without is room temperature. Other abbreviations refer to the back cover. Content is as of April 2021. For the latest information, please refer to our HP.

エクソソーム研究に！

Wako

EV-Up™ MSC EV産生用基礎培地, AF

EV-Up™ MSC EV産生用サプリメント, AF

本品は、間葉系幹細胞 (MSC) 専用のエクソソーム (EV) 産生用基礎培地とサプリメントです。EV-Up™ MSC EV産生用基礎培地, AFにEV-Up™ MSC EV産生用サプリメント, AFを添加することでEV産生用培地としてご使用いただけます。本品は、血清及びその他の動物由来成分を含みません。また、増殖培地の種類を問わずご使用いただけます。エクソソーム研究にお役立て下さい。

特長

- 血清培地より多くのエクソソームを分泌
- 高活性のエクソソームを産生可能
- MSCの生存率を高く維持

適用細胞例

- 骨髄由来MSC
- 脂肪由来MSC
- 臍帯マトリクス由来MSC

使用方法

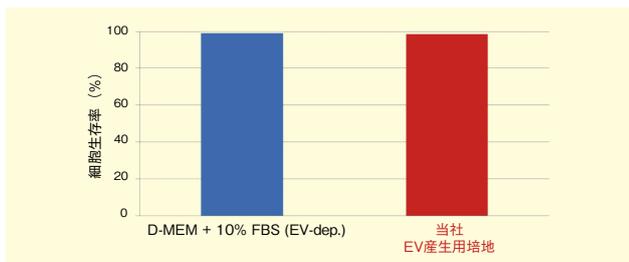


回収したエクソソームの精製はPS affinity法*を利用したMagCapture™ Exosome Isolation Kit PS (コードNo. 293-77601) がおすすめです。

*ホスファチジルセリン(PS)結合分子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する方法。

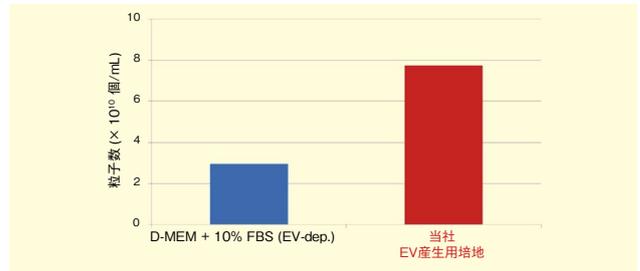
データ

細胞生存率



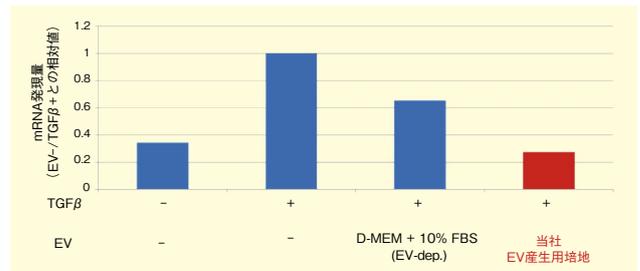
血清含有培地で拡大培養したヒト骨髄由来MSCを、各培地を用いて5日間培養しEVを産生させた後に生存率を測定した。その結果、当社EV産生用培地はD-MEM+10% EV depleted FBSと同様に高い生存率を示した。

EV粒子数



各培地で培養したMSC細胞培養上清からPS affinity法を用いて精製したEVの粒子数を、ナノサイトによるNano Tracking Analysis技術で測定した。その結果、当社EV産生用培地で培養したMSCが放出するEVの粒子数は、D-MEM+10% EV depleted FBSに比べて約2.6倍であった。

抗線維化活性



各培地で培養したMSC細胞培養上清からPS affinity法でEVを精製した。TGFβで刺激したヒト胎児肺由来線維芽細胞(TIG3細胞)に精製EV 5×10⁷ 個/mLを添加し、抗線維化活性を比較した。その結果、当社EV産生用培地で産生させたEVはTGFβによる線維化関連遺伝子であるαSMAの上昇を強力に抑制した。

サンプルを配布しています。詳しくは当社HPをご覧ください。

エクソソーム 和光

コードNo.	品名	規格	容量	希望納入価格(円)
NEW 053-09451	EV-Up™ EV Production Basal Medium for MSC, AF ^{Ref}	細胞培養用	95mL	12,000
NEW 298-84001	EV-Up™ MSC EV Production Supplement, AF ^{Ref}	細胞培養用	100mL用	18,000

関連製品

エクソソーム抽出・精製試薬

コードNo.	品名	規格	容量	希望納入価格(円)
058-09261	EV-Save™ Extracellular Vesicle Blocking Reagent ^{Ref}	遺伝子研究用	1mL	9,800
299-77603	MagCapture™ Exosome Isolation Kit PS ^{Ref}	遺伝子研究用	2回用	20,000
293-77601	MagCapture™ Exosome Isolation Kit PS ^{Ref}	遺伝子研究用	10回用	80,000
NEW 294-84101	MagCapture™ Exosome Isolation Kit PS Ver.2 ^{Ref}	遺伝子研究用	2回用	20,000
NEW 290-84103	MagCapture™ Exosome Isolation Kit PS Ver.2 ^{Ref}	遺伝子研究用	10回用	80,000

MagCapture™ Exosome Isolation Kit PS Ver.2の詳細は、26ページをご覧ください。

^{Ref}…2～10℃保存 ^F…-20℃保存 ^Q…-80℃保存 ^S…-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、2021年4月時点での情報です。最新情報は、当社HPをご参照下さい。

ヒト iPS 細胞樹立試薬

SRV™ iPSC Vector シリーズ



SRV™ iPSC-1 Vector

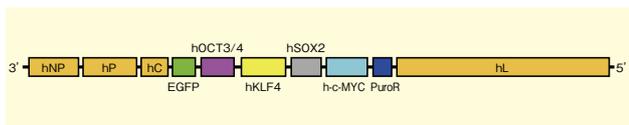
SRV™ iPSC-2 Vector

ステルス型 RNA ベクター (SRV™) は直径 240nm のウイルス様の粒子の中に、インターフェロン誘導を回避するためヒト細胞に最適化した人工核酸で構成された必要最低限の遺伝子を用いた RNA 転写系が封入されています。SRV は、安全な細胞リプログラミングに必要とされる 3 つの条件、(1) 複数遺伝子を同時にかつ効率よく導入して最適なレベルで発現でき、(2) これらの遺伝子を 1~3 週間程度安定に発現でき、(3) リプログラミングが完了したら速やかに導入した遺伝子を消去できることのすべてを満たす世界で唯一の遺伝子導入・発現系であり、再生・細胞治療の実用化にも極めて優れた技術です。

SRV™ iPSC-1 Vector は、線維芽細胞から iPS 細胞を作製するように遺伝子発現レベルを最適化した製品で、SRV を siRNA の導入により除去するベクターです。

SRV™ iPSC-2 Vector は、末梢血単球 / 単核球、CD34 陽性細胞から iPS 細胞を作製するように遺伝子発現レベルを最適化した製品で、SRV は miR-302 の発現に反応して自動的に消去されるベクターです。

2 種類のベクター共に、ヒト由来の初期化因子 (OCT3/4、KLF4、SOX2、c-MYC)、EGFP、Puro 耐性遺伝子を搭載しています。



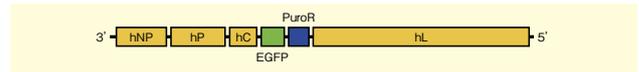
SRV™ iPSC-1 及び iPSC-2 Vector 模式図

特長

- SRV™ は染色体への挿入がなく細胞質で安定に発現
 - iPS 細胞へのリプログラミング後、SRV™ を短期間で消去することが可能
 - ヒト、マウスなど幅広い宿主域の分裂細胞・非分裂細胞に関わらず遺伝子を導入
 - 単一 RNA 上にすべての転写因子が搭載され、高効率でのリプログラミングを実現
 - EGFP 搭載で遺伝子導入の効率や消去の様子がすぐに判断可能
 - フィーダー細胞不要
 - 遺伝子導入以降の過程は BSL1 で取扱うことが可能
- ※ 遺伝子導入は BSL2 で取扱う必要がある。

SRV™ control Vector

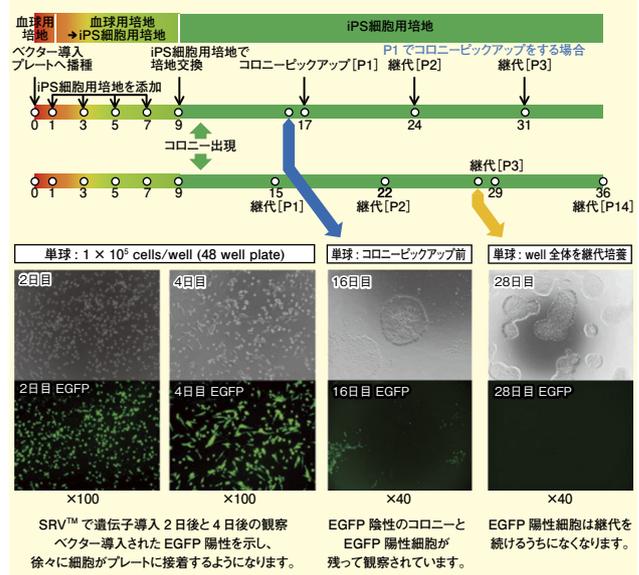
本品は、蛍光タンパク質 EGFP が搭載されたベクターです。種々の細胞に対する遺伝子導入活性を確認することができます。



SRV™ control Vector 模式図

iPS 細胞作製フロー

SRV™ iPSC-2 Vector を使って血球細胞 (単球) から iPS 細胞を誘導した実施例



※ 基質 (iMatrix511) と培地 (StemFit® AKO2N) を用いた、ときわバイオ (株) のデータです。他の基質と培地を用いる際は、プロトコルの最適化を検討いただく必要があります。

コード No.	メーカーコード	品名	対象	容量	希望納入価格 (円)
NEW 388-19061	S1011624A	SRV™ iPSC-1 Vector	非営利機関	0.1mL	90,000
NEW 385-19071	S1011624P	SRV™ iPSC-1 Vector (カルタナ)	営利機関	0.1mL	135,000
NEW 382-19081	S1011694A	SRV™ iPSC-2 Vector	非営利機関	0.1mL	90,000
NEW 389-19091	S1011694P	SRV™ iPSC-2 Vector (カルタナ)	営利機関	0.1mL	135,000
NEW 384-19041	S0011590A	SRV™ control Vector	非営利機関	0.1mL	30,000
NEW 381-19051	S0011590P	SRV™ control Vector (カルタナ)	営利機関	0.1mL	45,000
NEW 383-19131	S1011624T	SRV™ iPSC-1 Vector (Trial package) (カルタナ)	-	0.01mL	20,000
NEW 380-19141	S1011694T	SRV™ iPSC-2 Vector (Trial package) (カルタナ)	-	0.01mL	20,000

関連製品

コード No.	メーカーコード	品名	メーカー	容量	希望納入価格 (円)
385-07361	892011	iMatrix-511 solution	(株) マトリクソム	175µg × 2	28,000
381-07363	892012	iMatrix-511 solution (0.5mg/mL)	(株) マトリクソム	175µg × 6	72,000

☑️: 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、2021年4月時点での情報です。最新情報は、当社HPをご参照下さい。

フェリックス・ホッペ＝ザイラー (1825. 12. 26 ~ 1895. 8. 10)

千葉大学名誉教授 根矢 三郎

1. はじめに

生命とは何だろうか？この問いかけに、人びとは太古から興味を抱いてきた。すでに紀元前3世紀に古代ギリシャの哲学者であるアリストテレスは、今でいう「生氣論」に近い論調を唱えている。生氣論とは、生体は神秘的な生命力をもつとする考えである。しかし、彼の生命観はあくまでも思索の産物であり、物質的根拠とはかけ離れた哲学的思想であった。自然科学に基づく生命観が芽吹いたのは、それから2千年以上もの時を経た後である。19世紀になると、オパーリン（ロシア）、ダーウィン（イギリス）、メンデル（オーストリア）などの生命科学分野の碩学たちが現れ、生理学領域でも幕が開き始めた。生理学は英語で Physiology と書くが、語源は自然や存在を表すギリシャ語 Phúsis に由来するとされ、この言葉は物理学 Physics、体格 Physique（自然が与えた身体）、内科医 Physician（身体を治す人）などの派生英語となり今も活きている。医学でいう生理学は生体を調べる学問をさし、私たちが生きる仕組みを究明する分野である。つまり、生命現象の構成要素として身体を構成する器官、組織、細胞、生体物質などを対象とし、それらがどのように機能するかを解き明かす学問である。現代では医学に限らず、薬学、生物学、化学、物理学の知識を統合するより広範な領域となっている。多くの人々が生理学に魅了される理由には、科学的知識や技術が発展して、生命の謎に向けて多彩な分野からの参入が可能となった背景がある。

ホッペ＝ザイラー（図1）は19世紀後半に現れ、生理学の基礎を築いた生命科学の傑人である。彼の研究は20世紀以降の分子生物学や近代医学の発展に大きく貢献した。そこで、人物像、研究歴および業績に焦点を当てて彼を紹介しよう¹⁾。



図1. ホッペ＝ザイラー (参考文献1より)

2. 生い立ち

フェリックス・ホッペ＝ザイラーは1825年12月にドイツのチューリンゲン州のフライブルク市（図2）で、父エルンスト・ダンケゴット・ホッペ（教員）と母フレデリケ・ニッツ・ホッペの10番目の子供として生まれた。彼が6歳のとき母が亡くなり、父は9歳のときに他界した。その後10歳で、子どもがなかった長姉クララ・ザイラーと義兄ゲオルグ・ザイラー（牧師）の養子となった。やがてハレ市の養護施設で生活し、そこからギム



図2. ホッペ＝ザイラーに関連したドイツの地名

ナジウム（中高一貫校）へ通った。33歳の時、フランジスカ・ボルシュタインと結婚し、後にキール医科大学の教授となる一人息子ゲオルクが生まれた。なお、フェリックスは39歳でホッペ姓をホッペ＝ザイラーの複合姓に変えたが、それは孤児の頃から援助してくれたザイラー夫婦への謝意を込めてのことだった。

彼は19歳で医師を目指してライプツィヒ大学に進んで病理学や有機化学を学んだが、26歳のとき医学博士号をベルリン大学で得た。彼の博士論文題目は「軟骨の構造と軟骨質について」で、ルドルフ・ウィルヒョウ教授（白血病の発見者）が注目することとなった。やがて、ウィルヒョウが創立した病理学研究所で彼の助手となり、解剖医と化学研究室主任として軟骨に関する研究を開始した。しかし、ここでは学生達の指導に追われ、研究はなかなか進まない状態が続いた。ところが、35歳になると定員外教授（助教授相当）に指名され、やがて欧州有数の生理学研究室を主宰する道へとつながった。36歳でチュービンゲン大学化学科に異動し、まもなく正教授に昇進した。異動した研究室は丘の上にある古い城の元台所で狭く、大きな煙突側面が壁面を通り、焼き肉台を改造した化学実験台が備えつけられていたが、ここから彼の研究歴が始まった。彼の周りにはフリードリッヒ・ミーシェルやアルブレヒト・コッセルら多数の優秀な学生たちが参集した。チュービンゲンで10年を過ごした後、47歳でシュトラスブルク大学（現フランス領内）に新設された世界初の生理化学研究室に教授として赴任した。70歳で急性心不全により生涯を閉じるまでこの職位に留まった。

3. 人物像と研究業績

ホッペ＝ザイラーは若々しい容貌の持ち主で個性豊かで愛想がよく、態度も優しいため、とりわけ学生達には人

気があった。しかし元来は、自分に厳しくドイツ人らしく厳密さを求めて妥協を許さない性格だったと言われている。当初、彼は骨や軟骨に興味があったが、歯のエナメル質に興味を広げ、これが化石や動物の歯のアパタイト（リン灰石）と同一物質であると解き明かした。ベルリン大学で研究していた頃には、炎症部位などから染み出す体液である浸出液や漏出液の成分を調べ、体の部位による違い、ならびに毛細血管や血圧による浸出液成分差を検証した。また、尿やリンパ液においてインジカンやキトサンとよばれる糖や多糖類の存在を指摘した。しかし、彼の注目すべき成果は、血液中の血色素ヘモグロビンの発見であろう。血液中には鉄原子を含む特定の化学物質があり、体内で酸素を運搬している事実を見つけた。彼はこの物質にヘモグロビンの名称をつけた。さらに分光学を応用して、ヘモグロビンには2種類、つまりオキシ型（酸素化ヘモグロビン）とデオキシ型（非酸素化ヘモグロビン）がある事実を究明した（構造式、図3）。オキシ型とデオキシ型のどちらも還元鉄（II）原子が酸化されると酸化鉄（III）型ヘモグロビン（メトヘモグロビン）になり、酸素結合能力を失う現象も証明している。そのうえ、ヘモグロビンに結合するのは、酸素原子でなく酸素分子（O₂）であると解明し、大きな衝撃を与えた。また、ヘ

ミンは単に鉄（III）型ヘムの塩素結合物質であり（図3）、ヘモグロビンは酸化鉄（III）ヘムではなく還元鉄（II）型ヘムを分子内に取り込んで酸素運搬機能をもつと強調した。一酸化炭素を血液に通すと鉄原子に結合して鮮紅色に変わるが、一酸化炭素が血液の酸素運搬能を失わせる現象も見つけた。37歳の時にはヘモグロビンの結晶化に成功した。ヘモグロビンの結晶化は13年前に、カール・ライヒェルトがモルモットで成功していたが、ライヒェルトはそこに不純物混入があるとしていた。しかし、ホッペ=ザイラーは自分の結晶が純粋なヘモグロビンから成ると証明し、ヒトのヘモグロビン結晶の初めての調製者となった。一連の成果は、基本的な呼吸の仕組みを解明した重要事実であり、30報以上の学術論文として発表した。ホッペ=ザイラーは、潜水作業などで高圧を受けて働く人々が浮上して通常大気圧に戻ると突然死する問題にも挑戦した。深海で作業をすると、高圧で血液や組織により多くの空気が溶ける。しかし1気圧の海面に急浮上すると、溶け込んだ窒素が血管内で気泡となり、気泡で血管が詰まり脳梗塞に似た疲労感や血液滞留が発生するとつき止めた。彼の発表以降は、その抑制策としてゆっくりと海面へ浮上する手順がとられるようになった。現在では、ヘリウムを混ぜた血液に溶解しにくい潜水用ガスを使う

方法も利用されている。

ホッペ=ザイラーのヘモグロビン研究は、細胞の組成研究へと発展した。その結果、組織中には、レシチン、コレステロール、アルブミン、リン酸カリウム、グリコーゲンが多く含まれることを見つけた。彼の教え子であったフリードリッヒ・ミーシュル（スイス人）に細胞核中に存在するリン酸化化合物の検証を担当させスクレインとよばれる物質を検出し、核酸研究の糸口をつくった（図4）。ホッペ=ザイラーはこの時、卵黄中にビテリンというリントタンパク質も見つけている。

ホッペ=ザイラーはヘモグロビンに酸素分子が結合することに注意を払ったが、酸素分子そのものは活性が低く、体内で活性化される必要があり、膿は体の成分が活性化酸素で酸化をうけてできると考えていた。また、クロロフィルとヘムの構造類似性を認め、クロロフィルの結晶であるクロロフィランを結晶化した。彼はクロロフィランがヘムに類似した組成をもつものの、鉄に代わりマグネシウムを含むという結果も報告している。葉緑素であるクロロフィルは原子状酸素ではなく酸素分子を発生させる現象を次のように例証した。つまり、ヘモグロビンと緑色植物を密閉空間に共存させて日光を当てると、ヘモグロビンは植物から出る酸素分子によってオキシヘモグロビンに変化したのである。化学についての正確な知識、比色計や分光光度計、偏光計による正確な分析、および深い洞察力により、彼はヘモグロビンについて顕著な業績を残した。

4. 生理学研究に与えた影響

ホッペ=ザイラーの研究内容は、体内の酸化還元、呼吸、脂質・尿素の代謝と多岐にわたり、次世代の生化学、化学、医学、生物学に大きな影響を及ぼした。彼の考えの根底には、生体内にある化学物質の同定とその変換過程の知識が生命現象を解明するとの

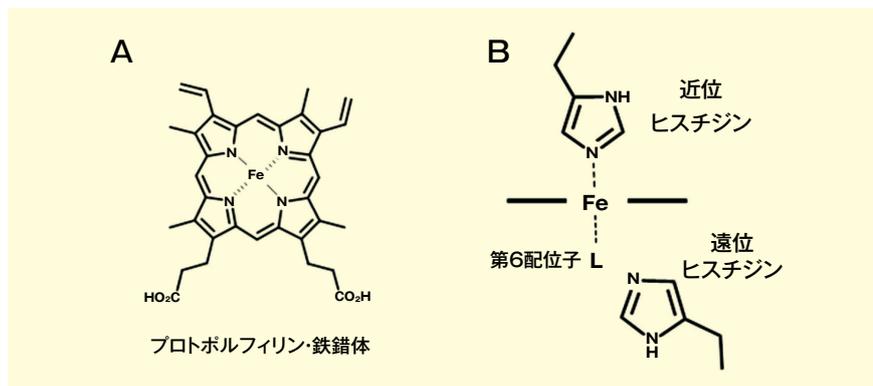


図3. ヘモグロビンの分子構造。(A) ヘム補欠分子、(B) 酸素結合部位の構造
太線はヘムを横から見たもの。いずれも、ホッペ=ザイラー没後に判明した。

洞察力があり、生理学を通じて人びとを疾病から救済したいとの熱意があった。ところが、彼の研究手法は同時代のドイツ人生理学者エデュアート・フリューガーたちからは批判された。伝統的ではない化学的手法を使っている、ドイツの生理学界を分断しようとしている、と責められて正当な評価を受けなかった。それでも、ホッペ=ザイラーの生理学は、スウェーデン、ノルウェー、スイス、オーストリア、ロシア、アメリカ、イギリス等へ国域を越えて広く認知されていった。当時、ドイツとフランスは国境戦争で険悪な関係にあったにも拘わらず、フランス科学アカデミーはホッペ=ザイラーを連絡会員（準会員相当）に選出している。

5. 生理学雑誌、Zeitschrift für Physiologish Chemie

ホッペ=ザイラーは生理学の発展を目指して、生理学雑誌 *Zeitschrift für Physiologish Chemie* (*Z. Physiol. Chem.*) を52歳で創刊した。創刊号の挨拶文で、彼は「*biochemistry*」の用語を初めて用いている。この雑誌はその後、名称を4回変えて140年間以上経た現在も発刊中で、名称の変遷は次のとおりである。1) 1877-1895年、第1-21巻、*Z. Physiol. Chem.*、2) 1895-1984年、第21-365巻、*Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*、3) 1985-1995年、第366-376巻、*Biol. Chem. Hoppe-Seyler*、4) 1996-2021年（現在）、第376-402巻、*Biol. Chem.*。第1期は1895年の彼の逝去で終了し、第2、3期の誌名には彼の名前があった。第3期以降、雑誌名称は英語化され、ドイツ語使用は1995年に終了し、第4期以降は英語使用のみとなった。現在はドイツ生化学分子生物学会の学会誌へと躍進している。

6. 影響を与えた人々

ホッペ=ザイラーは抜きんできた研究

能力を発揮しただけでなく、研究を通じて人材育成にも尽力し、生化学や分子生物学の創始者として、亡くなった後からも、多くの研究者に影響を与えた。その一人にフリードリッヒ・ミーシュエルがいる（図4）。彼はスイスのバーゼルで生まれ、バーゼル大学医学部を卒業後、ゲッチンゲン大学で有機化学を学び、チュービンゲン大学のホッペ=ザイラーの研究室で研究を開始した。研究テーマはリンパ球であったが、試料の大量入手が難しく、傷口を覆う膿のついた大量の包帯を病院から集めた。大量の膿つき包帯とはいささか奇妙だが、当時はペニシリンなどの抗生物質はなく傷口が化膿しやすい状況だった。膿には死んだ白血球の核がたくさん含まれ、そこからヌクレインとよばれる物質を1869年に単離した。ホッペ=ザイラーは2年間かけてその結果を確かめ、1871年に「膿の細胞の化学的な構成成分について」という標題でミーシュエルに博士論文の発表を許可した。ミーシュエルが見つけたヌクレインの正体は核酸つまり遺伝物質DNAであり、後年のDNA発見と分子生物学発展の根幹となるワトソンとクリックによるDNA二重らせん構造の発見（1962年ノーベル生理学・



図4. フリードリッヒ・ミーシュエル (1844-1895)。ヌクレイン (DNA) の発見者。(参考文献2より)

医学賞) につながった。

ドイツの生理学者であるアルブレヒト・コッセルも学生時代に核酸と分解産物についての研究でホッペ=ザイラーの指導を受けている。彼は細胞核の化学組成を追求した細胞化学者になった。タンパク質と核酸の研究で1910年にノーベル生理学・医学賞を受賞し、1895年から1927年に *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* 誌の編集長としても活躍した。

ホッペ=ザイラーによるヘモグロビンの結晶化は分子生物学の発展を促した重要功績である。イギリスのマックス・ペルーツはヘモグロビンやミオグロビンの結晶にX線を照射し、タンパク質には一定の立体構造があると証明して革新的成果をあげた。ペルーツはジョン・ケンドリューとともに1962年のノーベル化学賞に輝いた。ペルーツは1995年に *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* 誌の中で、ホッペ=ザイラーによるヘモグロビン結晶化の偉功を讃えている³⁾。

20世紀前半から分子生物学や生化学は飛躍的に発展し続けている。その源流を創り出したのが、生命現象を物質の言葉で理解しようとしたホッペ=ザイラーの熱意と努力である。彼の生涯は私たちが銘記すべき生命科学の歴史そのものである。

謝辞

本稿執筆を助けていただいた桜井弘先生（京都薬科大学名誉教授）に心より御礼申し上げます。

【参考文献】

- 1) A) https://en.wikipedia.org/wiki/Felix_Hoppe-Seyler. (2021年1月10日閲覧). B) Gamgee, A. : "The Late Professor Hoppe-Seyler.", *Nature*, **52**, 575 (1895).
- 2) https://en.wikipedia.org/wiki/Friedrich_Miescher. (2021年1月10日閲覧).
- 3) Perutz, M. : "Hoppe-Seyler, Stokes and Hemoglobin.", *Biol. Chem. Hoppe-Seyler*, **376**, 449 (1995).

ヒト由来細胞外小胞の定性・定量解析に



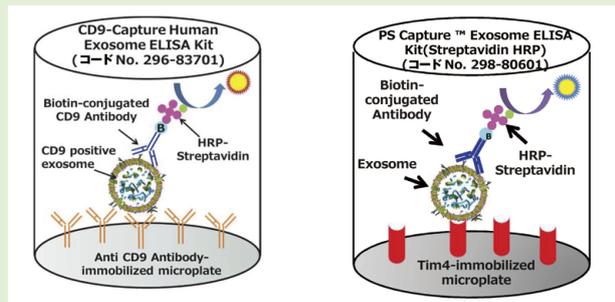
CD9/63/81-Capture ヒトエクソソーム ELISA キット(ストレプトアビジン HRP)

本キットは、細胞培養上清や体液検体中の細胞外小胞の定性・定量解析に利用できる酵素免疫測定試薬です。細胞外小胞表面マーカータンパク質として知られるヒトCD9/63/81特異的抗体を固相化しており、任意の細胞外小胞表面マーカータンパク質に対するビオチン標識抗体を一次検出に用いることで、ヒトCD9/63/81及び任意のマーカータンパク質を表面に有する細胞外小胞を高感度に検出することが可能です。

特長

- ヒト由来細胞外小胞を特異的に検出可能
- 細胞培養上清及び体液（血清、血漿）検体中の細胞外小胞を直接定性及び定量可能

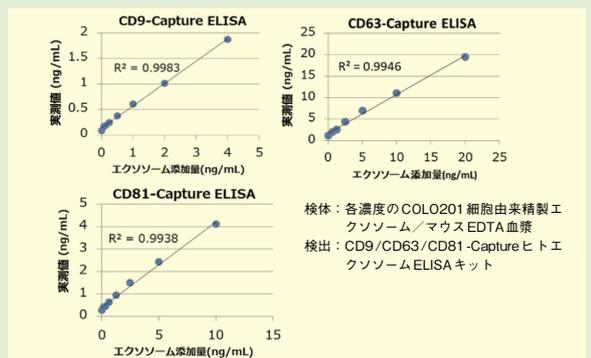
測定原理



PS Capture™ Exosome ELISA Kitシリーズ(図右)は動物種に依存することなくホスファチジルセリンを有する細胞外小胞を捕捉するのに対して、本キット(図左)はヒトCD9/63/81を有する細胞外小胞を特異的に捕捉できるため、マウスやラットなどの実験動物やFBSなどウシ由来の細胞外小胞が含まれるサンプルを用いた場合においても、ヒト由来CD9/63/81陽性細胞外小胞を特異的に捕捉・検出可能。

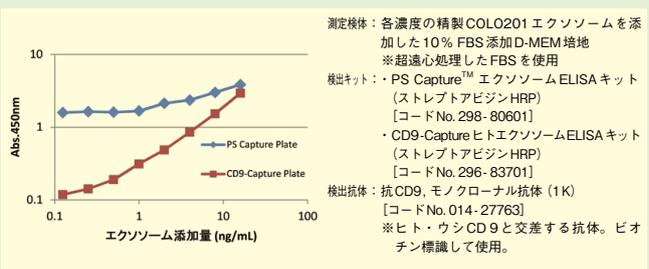
データ

■ マウスEDTA血漿中へのヒト由来エクソソーム添加実験



各濃度のエクソソーム、COLO201細胞由来、精製品 [コードNo. 052-09301] を添加した50%マウスEDTA血漿検体を本キットで測定し、希釈直線性を評価した。マウスEDTA血漿サンプルに添加したヒト由来エクソソームを良好な希釈直線性で検出できることが示された。

■ ヒト由来エクソソーム検出における特異性比較



各濃度のエクソソーム、COLO201細胞由来、精製品 [コードNo. 052-09301] を添加した10%FBS含有D-MEM検体(2倍希釈)を2種類のELISAキット付属のプレートに反応させ、ヒトとウシCD9に交差反応する抗CD9抗体 (Clone: 1K) [コードNo. 014-27763] を検出抗体に用いてヒト由来エクソソーム量を測定した。PS Capture™ ELISAではヒト由来エクソソームだけでなくFBS由来エクソソームも捕捉した。一方で、CD9-Capture ELISAでは、ヒト特異的な固相化抗体により、ヒト由来エクソソームを特異的・濃度依存的に検出できた。

コード No.	品名	規格	容量	希望納入価格(円)
296-83701	CD9-Capture Human Exosome ELISA Kit(Streptavidin HRP)	遺伝子研究用	96回用	90,000
290-83601	CD63-Capture Human Exosome ELISA Kit(Streptavidin HRP)	遺伝子研究用	96回用	90,000
292-83801	CD81-Capture Human Exosome ELISA Kit(Streptavidin HRP)	遺伝子研究用	96回用	90,000

その他のエクソソーム研究試薬は当社HPをご覧ください。

和光 エクソソーム 検索

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 毒1…特定毒物 毒2…毒物 劇1…劇物 劇2…劇物 毒薬…毒薬 劇薬…劇薬 危1…危険物 危2…危険物 向精…向精神薬 特麻…特定麻薬向精神薬原料
化審1…化審法 第一種特定化学物質 化審2…化審法 第二種特定化学物質 化兵1…化学兵器禁止法 第一種指定物質 化兵2…化学兵器禁止法 第二種指定物質 カルタ…カルタヘナ法
覚せい…覚せい剤取締法 国民…国民保護法
 掲載内容は、2021年4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. 89 No. 2
 2021年4月15日発行
 発行責任者 岡本訓明
 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://fujifilm.com/ffwk>
 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