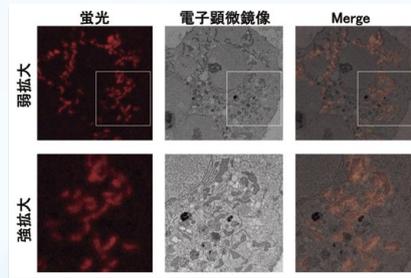


# 和光純薬時報

July 2019  
Vol.87 No.3



CLEM-Red を用いた精密 CLEM

## 【総説】

- 「赤色蛍光タンパク質を用いた精密 CLEM の開発」  
谷田 以誠、角田 宗一郎、内山 安男…………… 2
- 「多点相互作用を誘起するイオン液体・オリゴマーイオン液体  
— グラフェンの高効率合成・高キャパシタンス電解質の実現」  
松本 道生、相田 卓三…………… 5
- 「特定悪臭物質アルデヒド類 6 種及び多成分測定に対応した HPLC 用カラムの開発」  
久保田 守…………… 18

## 【連載】

- 〈ペプチド医薬合成基礎講座〉  
「第 2 回 ペプチド合成の基礎と近年の進歩」  
佐藤 健太郎…………… 8
- 〈基礎から応用までよくわかる組織透明化技術〉  
「第 2 回 高解像・高輝度蛍光イメージングのための透明化法、SeeDB2」  
今井 猛…………… 10
- 〈アミノ酸分析 ～新たな潮流～〉  
「第 4 回 ペプチド、タンパク質定量のための新技術」  
合田 竜弥…………… 13
- 〈エクソソームと生命現象〉  
「第 6 回 エクソソームとウイルス」  
柿崎 正敏、幸谷 愛…………… 16

## 【化学大家】

- 「池田 菊苗」  
井澤 邦輔…………… 28

## 【製品紹介】

- |   |   |
|---|---|
| <p><b>有機合成</b></p> <p>オリゴマーイオン液体 …………… 7</p> <p>核酸合成用 硫化剤 溶液タイプ …………… 20</p> <p>特殊アミダイト 架橋型人工核酸 …………… 20</p> <p><b>分析</b></p> <p>QToFMS用 アセトニトリル …………… 15</p> <p>ワコーパック® ワコーシル®-DNPH (4.6 × 250mm) …… 19</p> <p>ワコーシル® DNPH 溶離液 A、ワコーシル® DNPH 溶離液 B …… 19</p> <p>6 種アルデヒド-DNPH 混合標準液II<br/>(各 0.1mg アルデヒド /mL アセトニトリル溶液) …………… 19</p> <p>アルデヒド分析用 アセトニトリル…………… 19</p> <p>高純度 NMR 溶媒 …………… 24</p> <p>ポジティブリスト関連農薬標準品 …………… 24</p> <p>ワコーパック® コア C18 ADRA …………… 25</p> <p>14 種揮発性有機化合物混合標準液 …………… 25</p> <p><b>L A L</b></p> <p>リムルス ES- IIシリーズ …………… 23</p> <p>SLP-HS シングル試薬セットII …………… 23</p> | <p><b>細胞生物</b></p> <p>蛍光復活試薬 TUK Solution …………… 4</p> <p>アカルミネ® 塩酸塩 …………… 22</p> <p><b>遺伝子</b></p> <p>MagCapture™ エクソソームアイソレーションキット PS… 17</p> <p>PS Capture™ エクソソーム ELISA キット<br/>(ストレプトアビジン HRP) …………… 17</p> <p>KANEKA KanCap™ …………… 26</p> <p><b>免疫</b></p> <p>りん酸化 Tau T181 ELISA キットワコー …………… 21</p> <p><b>病理</b></p> <p>組織標本脱色試薬 deColorizing Solution 1、<br/>deColorizing Solution 2 …………… 32</p> <p><b>機器</b></p> <p>ディターニティ オンサイトアーカイブシステム …………… 27</p> <p><b>製造専用原料</b></p> <p>医薬品製造用原料 CertiPro シリーズ …………… 22</p> |
|---|---|

## 【お知らせ】

- メール会員 募集のご案内 …………… 26

## 赤色蛍光タンパク質を用いた精密 CLEM の開発

順天堂大学医学部 神経生物学・形態学 谷田 以誠  
 順天堂大学大学院医学研究科 研究基盤センター 角田 宗一郎  
 順天堂大学大学院医学研究科 老人性疾患病態・治療研究センター 内山 安男

### はじめに

蛍光タンパク質を用いて、細胞小器官あるいは標的タンパク質を標識し、細胞内局在を蛍光顕微鏡（あるいは共焦点レーザー顕微鏡）にて観察することは、細胞生物学においては常法の一つである。また最近、超解像蛍光顕微鏡が開発され、X-Y 軸方向の分解能が、共焦点レーザー顕微鏡の 180~250 nm から、超解像蛍光顕微鏡では 60~70 nm と著しく改善されてきた。イメージング技術の発展を背景に蛍光顕微鏡像による細胞内局在と電子顕微鏡像による超微形態との相関解析が求められる。CLEM（光線-電子相関顕微鏡法）は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。特に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局在一致はより厳密になる必要がある。

### これまでの CLEM の問題点とソリューション

従来の CLEM では、細胞をパラホルムアルデヒド（あるいはグルタルアルデヒド）か、グルタルアルデヒドとパラホルムアルデヒド混合液）で前固定後、蛍光像を観察

し、その後、四酸化オスmiumにより後固定を行う。前固定はタンパク質の固定に必要であり、後固定では膜形態の保持に必須である（図1）。その後、生物試料の脱水、エポキシ系樹脂による包埋を行う。包埋後、50~100 nm の超薄切片を作成し、電子顕微鏡観察を行う。最初に得られた蛍光顕微鏡像と電子顕微鏡像をソフトウェアにより連携させる。このため蛍光顕微鏡像取得から電子顕微鏡像取得に至るまでに、化学処理・物理的処理による歪みは避けられない。通常、細胞内の一部を拡大して、局所的に CLEM を行う場合はこの補正である程度対応可能であるが、細胞全体、細胞同士の間相互作用も含めて CLEM を行うとすると、補正が厳しくなってくる。近年、高分解能走査型電子顕微鏡で広い視野で透過型電子顕微鏡と同程度の電子顕微鏡観察が可能になってきたため、これらの化学的・物理的歪みは CLEM の大きな問題点となる。

蛍光顕微鏡のもう一つの問題点は、Z 軸方向の分解能である（図2）。超解像蛍光顕微鏡は X-Y 軸方向の分解能は 60~70 nm であるが、Z 軸方向の分解能は 300~700 nm であり、一般的な電子顕微鏡用の試料切片が 50~100 nm であることを考えると、Z 軸方向の分解能の低さは、より分解能が求められる可能性が高いマルチカラー CLEM や3次元 CLEM へと発展させる上で致命的な問題となる。これらの問題点を解決し、Z 軸方向の

解像度を上げるために一番単純で汎用性の高いソリューションは、同一切片上で蛍光顕微鏡像と電子顕微鏡像を同時に取得することである。これが可能になれば、試料作成における化学処理や物理的処理による歪みが解決され、Z 軸方向の分解能も 3 倍から 14 倍程度改善されるはずである。このような目的でこれまで、超薄切片を標的とした様々な CLEM が開発・報告されてきたが、特殊な装置が必要となる急速凍結法、特殊な固定・包埋条件などが必要であった。特に、膜の超微形態の保持性が担保されている電子顕微鏡に汎用される試料作成法（グルタルアルデヒドとパラホルムアルデヒド前固定、オスmium酸処理による後固定、エポキシ系樹脂による包埋）では、ほとんどの蛍光タンパク質の蛍光が消失するため、これらの処理のいずれかを避ける方法しか報告されていない。

### 精密 CLEM のための化学固定に耐性の蛍光タンパク質の選択

“超薄切片上で蛍光顕微鏡像と電子顕微鏡像を同時に観察する”精密 CLEM のためには、まず化学固定によって蛍光能が維持できるモノマータイプの蛍光タンパク質とその化学処理条件を検討する必要がある。そこで細胞内にオワンクラゲ由来の緑色蛍光タンパク質 mEGFP を発現させ、前固定処理による蛍光強度の維持条件を検討した。前固定液としては、2.5% グルタルアルデヒドと 2% パラホルムアルデヒドの混合液（Karnovsky の固定液、あるいは、half

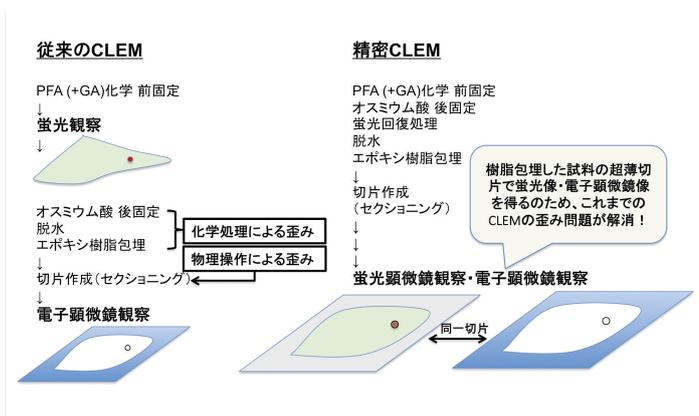


図1. 精密 CLEM では蛍光像と電子顕微鏡像間での歪みが激減する

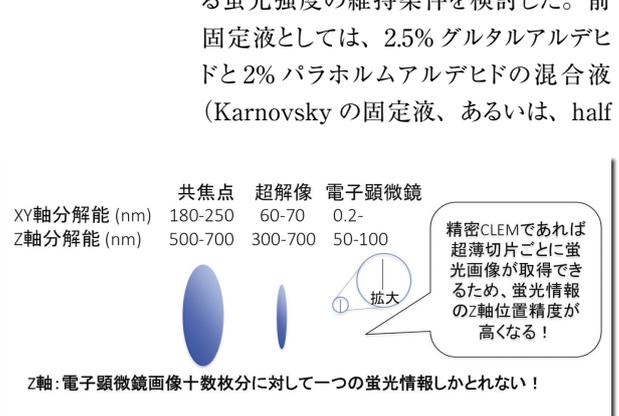


図2. 蛍光顕微鏡と電子顕微鏡のZ軸分解能の違い

Karnovsky の固定液)を採用した。通常、グルタルアルデヒドはホルムアルデヒドよりも強い固定剤で、タンパク質内外のアミノ基と強く反応して架橋するため、細胞内形態の維持には優れている。反面、多くのタンパク質の抗原性を失わせてしまう変性剤であるため、蛍光タンパク質の蛍光能も大きく減弱することが多い。そこでいくつかの条件を検討した結果、適切な緩衝液にて pH を 7.4-7.5 にすることで、Karnovsky の固定液で処理しても mEGFP の蛍光がかなり維持されることが判明した。ニシナメクジウオ由来の緑色蛍光タンパク質で mEGFP よりも 5 倍明るいと言われる mNeonGreen<sup>1)</sup> や、オオハナガタサンゴ由来でグルタルアルデヒド、パラホルムアルデヒド、四酸化オスミウムなどの固定液に耐性があるといわれる mEos4b<sup>2)</sup>、ヒトモシクラゲ由来の TagGFP2<sup>3)</sup> についても、同様の結果が得られた。また、サンゴイソギンチャク由来の赤色蛍光タンパク質 Katushka のバリエーションの CLEM-Red でも蛍光がよく保持されていた<sup>4)</sup>。イソギンチャクモドキ属 mushroom 由来の DsRed のバリエーションで同じ系統で mCherry よりも明るいと言われる mApple<sup>5)</sup> においては、あまり蛍光能維持の効果が認められなかった。

次に 1% 四酸化オスミウム固定液に耐性のある蛍光タンパク質の選択を行った。四酸化オスミウムは脂肪酸の炭素-炭素二重結合に付加する性質がある。そのため、脂質の二重結合に付加された四酸化オスミウムは電子顕微鏡観察するときの膜形態のコントラストをつけるのに重要である。しかしながら、四酸化オスミウムは強力な酸化剤として働くため、殆どの蛍光タンパク質の蛍光能を消失させてしまう。Karnovsky の固定液で蛍光能がよく保持されていた mEGFP、mNeonGreen、mEos4b、TagGFP2、CLEM-Red について、Karnovsky の固定液で前固定後、1% 四酸化オスミウム固定液で処理したときの蛍光能について調べた。その結果、mEGFP、mNeonGreen、TagGFP2、mEos4b は蛍光能がほぼバックグラウンド

レベルまで低下していた。mEos4b は精製した mEos4b を用いた *in vitro* 実験で、1% 四酸化オスミウム処理でも蛍光能が残ると報告されていたが、Karnovsky の固定液で前固定した後、四酸化オスミウムで後固定を行うと、蛍光は、ほぼバックグラウンドレベルまで低下した。唯一蛍光が検出可能であったのが、赤色蛍光タンパク質の CLEM-Red であった。

### エポキシ系樹脂包埋した切片からの CLEM-Red の赤色蛍光の検出

電子顕微鏡試料作成の最後の化学処理はエタノールによる段階的な脱水と、エポキシ系樹脂による包埋である。エポキシ系樹脂は透過型電子顕微鏡で生物試料作成に汎用されている Epon812 を用いた。CLEM-Red の蛍光は段階的脱水処理した後も、有意に観察された。その後、樹脂包埋を行い、100 nm の切片を作成した。切片をカバーガラスに回収し、顕微鏡観察を行った。位相差顕微鏡像ではただの透明なフィルムにしか見えないが、蛍光顕微鏡においては細胞内に

CLEM-Red 由来の赤色蛍光が観察された (図3A)。

さらに精密 CLEM が細胞内小器官レベルの解析が可能かどうかを検討するために、CLEM-Red にミトコンドリア局在シグナルをつけると、ミトコンドリアに CLEM-Red が局在した (図3B)。そこで上述の固定・脱水・樹脂包埋を行い切片を作成し、蛍光顕微鏡、および、電子顕微鏡で観察した。その結果、同一切片において、ミトコンドリア様局在を示す赤色蛍光が観察され、対応する電子顕微鏡像では、ミトコンドリアの形態が容易に観察された (図3C)。このことは、CLEM-Red により細胞内小器官、標的タンパク質を標識できれば、精密 CLEM が可能であることを強く示唆する。

CLEM-Red は遠赤色蛍光タンパク質で最大励起波長が 590 nm 付近、最大蛍光波長が 630 nm 付近にある。分子量は約 26kDa でモノマータイプである。現在、ミトコンドリア、核、小胞体、リソソームなどに局在できることがわかっているため、mEGFP 同様に蛍光タグとして使用でき、精密 CLEM へと応用できると考えられる。

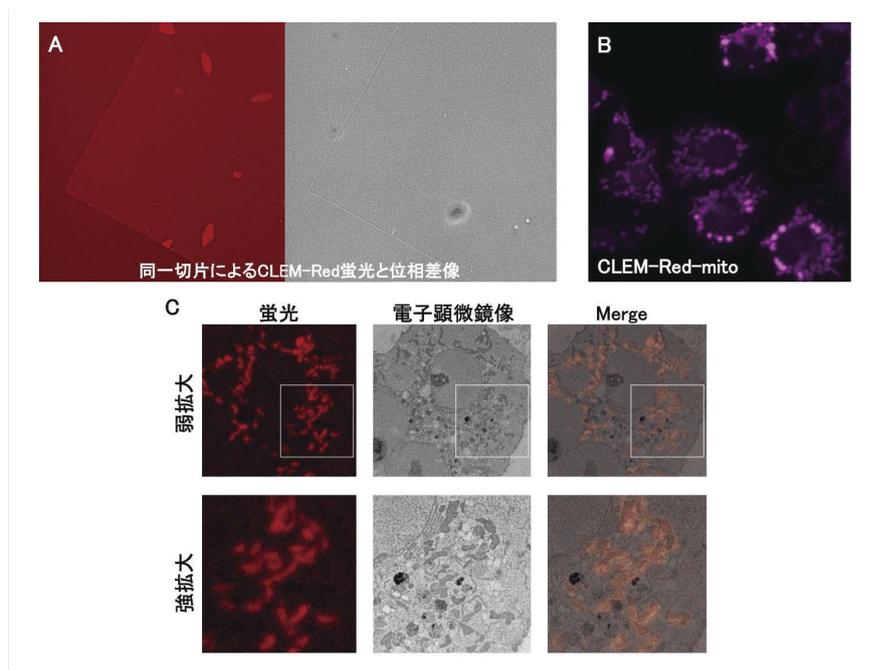


図3. CLEM-Red を用いた精密 CLEM

## 赤色蛍光を回復する試薬

CLEM-Redを発現させて、十分な蛍光強度が得られれば、Karnovskyの固定液で前固定、1% 四酸化オスミウムで後固定、エタノールによる脱水処理後、Epon812樹脂で包埋後に切片を作成することで、従来の方法で精密CLEMが可能となる。しかしながら、これらの化学処理、特に四酸化オスミウム処理により、CLEM-Redの蛍光は減弱する。この蛍光を回復する試薬があれば、CLEMもより容易になる。これまでGFPを発現させた生物試料をKarnovskyの固定液で固定後にアクリル系樹脂で包埋した切片に0.1N炭酸ナトリウム(pH 11.8)で処理するとGFPの蛍光が回復することが報告されていた<sup>6)</sup>。しかしながら、0.1N炭酸ナトリウム(pH 11.8)はKarnovskyの固定液で前固定後に、1% 四酸化オスミウムで後固定して減弱したCLEM-Redの赤色蛍光回復にはほとんど効果がなかった。四酸化オスミウム処理による蛍光の減弱は、Carbonate系のアルカリ処理では回復できない。そこでCLEM-Redの蛍光を回復する試薬としてTUK試薬を開発した。TUK試薬を四酸化オスミウム後固定後に使用すると速やかに蛍光が回復するが、その反面、特に薄い細胞膜のコントラストが減弱する傾向にある。そのため注意点としては、膜厚が6~8 nmである

小胞体や膜厚が6 nm程度のミトコンドリア内膜を観察する際には処理時間の検討が必要である。通常の使用法としては、樹脂包埋した切片を用いて、蛍光顕微鏡観察する直前にTUK試薬を使用するのが最善と考えている。

## おわりに

CLEM-Redを用いた精密CLEMは従来の電子顕微鏡試料作成法をほとんど踏襲する形で、試料作成が可能となり、その汎用性は高いと思われる。少なくとも、細胞の標識には十分使用可能であるので、たとえば脳における神経細胞の標識、腫瘍細胞を標識して浸潤していく細胞とその微小環境のCLEM解析など、その応用範囲は広い。さらには現状の手法と連続切片試料作成技術を組み合わせることで、3次元CLEMも十分に可能である。今後は、化学固定後でもCLEM-Redより明るい蛍光を維持できる蛍光タンパク質や赤色以外の蛍光タンパク質のスクリーニングが必要である。赤色以外の蛍光タンパク質が見つければ、マルチカラーCLEMが可能となるため、その応用範囲も広がると考えられる。

### 【参考文献】

- 1) Shaner, N. C. *et al.* : *Nat. Methods*, **10**, 407 (2013).
- 2) Paez-Segala, M. G. *et al.* : *Nat. Methods*, **12**, 215, 4 p following 218 (2015).
- 3) Subach, O. M. *et al.* : *Chem. Biol.*, **15**, 1116



### CLEM

Correlative light 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。

### 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。

### Karnovskyの固定液

2.5% グルタルアルデヒドと2% パラホルムアルデヒドの混合液で多くの電子顕微鏡用生物試料作成の前固定液として採用されている。原法の濃度の半量のため、half Karnovskyとも呼ばれる。タンパク質内外のアミノ基と架橋するためタンパク質の形態維持性が保持され、電子顕微鏡観察に適している。その反面、多くのタンパク質が抗原性を失うほどの変性作用がある。

(2008).

- 4) Merzlyak, E. M. *et al.* : *Nat. Methods*, **4**, 555 (2007).
- 5) Kremers, G. J. *et al.* : *Nat. Methods*, **6**, 355 (2009).
- 6) Toyooka, K. : *Plant Morphology*, **28**, 15 (2016).

## 光線-電子相関顕微鏡(CLEM)用 蛍光復活試薬

### TUK Solution

Wako

コード No.	品名	規格	容量	希望納入価格(円)
209-20851	TUK Solution	電子顕微鏡用	10mL	50,000

### 関連商品

#### TUK Solution 用蛍光タンパク質ベクター

コード No.	品名	規格	容量	希望納入価格(円)
165-28461	pCLEM-Red-mito	電子顕微鏡用	20 µg	80,000
169-28621	pCLEM-Red-gol	電子顕微鏡用	20 µg	80,000
166-28631	pCLEM-Red-ER	電子顕微鏡用	20 µg	80,000

コード No.	品名	規格	容量	希望納入価格(円)
163-28641	pCLEM-Red-lyso	電子顕微鏡用	20 µg	80,000
160-28651	pCLEM-Red-C	電子顕微鏡用	20 µg	80,000
167-28661	pCLEM-Red-N	電子顕微鏡用	20 µg	80,000

☑️…2~10℃保存    ☑️…20℃保存    ☑️…80℃保存    ☑️…150℃保存    表示がない場合は室温保存です。その他の略号は、巻末をご参照下さい。  
掲載内容は、2019年7月時点での情報です。最新情報は、当社HPをご参照下さい。

### はじめに

1992年にWilkesらによって1-エチル-3-メチルイミダゾリウムテトラフルオロボラートは常温で溶融した塩で、空気中でも安定な液体であると報告された<sup>1)</sup>。この報告は水系溶媒、有機溶媒に加わる、第三の溶媒として「イオン液体」という新しい研究分野を切り拓いた<sup>2)</sup>。イオン液体は「室温付近に融点を有する塩であり、イオンのみからなる液体」と定義される。イオン液体の特徴は(1)蒸気圧が低く不揮発性であること、(2)熱安定性が高くかつ難燃性であること、(3)極めて高いイオン雰囲気を作り、またイオン導電性であることなどがあげられる。それに加えて、特に有機化学者の注目を集めたのは、イオン液体としての性質を示す分子構造が多様で、分子設計の自由度が大きいことであった。イオン液体は溶融塩であるため、カチオンとアニオンの組み合わせで構成される。特に有機カチオンを構造に含むことが多く、カチオン、アニオンともに化学構造が大きく変化を加えられる。我々はこのイオン液体の化学構造の可変性と超分子化学の相互作用増強法である多点相互作用の考え方を組み合わせることで、オリゴマーイオン液体(OIL)を新たに開発した(図1)。OILの基本構造は有機カチオンのイミダゾリウムを連結させることで、一分子に複数のカチオンを持つ構造である。これは従来のイオン液体の多くが一分子につき、一つのカチオンを持つ

という点で大きく異なる。このOILを用いることで、グラファイトの剥離とイオン液体をゲート材料に用いるトランジスタ素子という全く異なるプロセスの高効率化に共に成功した。以下、開発の経緯について紹介する。

### グラファイトから単層グラフェンを超高効率に剥がし出す

2003年に、有機カチオンであるイミダゾリウムを分子構造に持つイオン液体がカーボンナノチューブ(CNT)を分散させるのに著しく優れた溶媒であることが相田研究室で見出された<sup>3)</sup>。市販のCNT粉末中ではCNT表面の $\pi$ 共役表面同士が $\pi$ - $\pi$ 相互作用によって会合するため、CNTが束になってバンドル化している。 $\pi$ - $\pi$ 相互作用は分子間相互作用の一種であり、一般にはその結合力は弱く、会合体は簡単に壊れる。しかしながら、CNTの束の場合、CNTの筒が同一方向に揃って束となるため、 $\pi$ - $\pi$ 相互作用をする曲面同士が接触する距離が長い。その結果、弱い力ながら結合する部位が非常に長く(多く)なるため、全体の結合は著しく強くなる。この一つずつは弱い力でありながら、相互作用を起こす点の数を増やすことで全体の会合を強める現象を多点相互作用と呼び、生体中などでも多く見つけられる超分子化学の考え方である<sup>4)</sup>。この多点相互作用による強い会合形成のため、CNTは溶媒和させずらく、液体媒質に高濃度に分散させることが著しく難しかった。福島らはイオン液

体中のイミダゾリウムが、CNTの $\pi$ 共役表面とカチオン- $\pi$ 相互作用を引き起こすことで、CNT同士のバンドル化を妨げ、さらにほぐし、同イオン液体中でCNTを高濃度に分散できることを見出した<sup>3)</sup>。この分散液はほぐれたCNTを著しく多く含むため、CNTが分散液中で絡み合い、ゲル化する。イオン液体はイミダゾリウムを溶融塩カチオンとして著しく高密度に含むことができる。これにより、強いCNT同士の結合を量論的に弱めることができ、CNTを高分散させることができた。

このCNTでの発見以降、イミダゾリウムを含む分子をCNT以外の炭素材料の分散にも用いる報告が数多くなされた。特に近年、注目を集める二次元炭素材料、グラフェンを、前述のCNTと同様に、積層体であるグラファイトから剥離させる試みは様々行われていた<sup>5)</sup>。しかしながら、前述のCNTを破格に分散させることができた、イミダゾリウムを持つイオン液体は、グラファイトを剥離させるのに十分な溶媒ではなかった。これはCNTでは $\pi$ - $\pi$ 相互作用が「曲面—曲面」で作用するため、比較的細い、「線」として作用するのに対して、グラファイトの場合は、「平面—平面」での相互作用のため、面積が大きい「面」として相互作用することに起因する。つまり、グラファイトはCNTよりも、はるかに多い点での相互作用があるため、多点相互作用のより強い寄与があり、会合状態がCNTよりも安定化している。結果、従来のイミダゾリウムを持つイオン液体をもってしても、グラファイトを剥離するのに十分でなかったのだ。ここで、我々はグラファイトの多点相互作用に対抗するため、「目には目を」の考えで、イオン液体の側にも多点相互作用を引き起こす化学構造を導入し、多点のカチオン- $\pi$ 相互作用をイオン液体- $\pi$ 共役表面で誘起させれば、グラファイトも剥離できるのではないかと考えた。

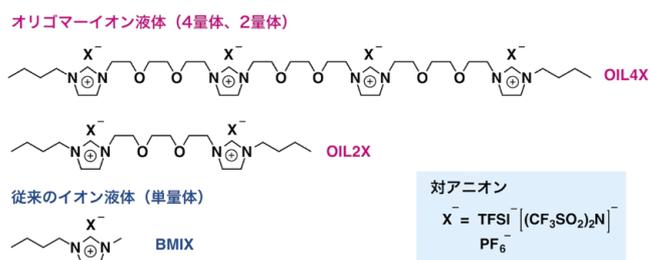


図1. オリゴマーイオン液体(OIL)と従来のイオン液体の化学構造

多点相互作用を導くイオン液体の構造として、イミダゾリウムを連結させたオリゴマーイオン液体、OILを合成した。イミダゾリウムをエチレングリコール鎖で繋ぐことにより合成した、イミダゾリウムを2つ (OIL2)、もしくは4つ (OIL4) 繋いだカチオンに対して、アニオンをヘキサフルオロフォスフェートイオン ( $\text{PF}_6^-$ ) もしくはビス [(トリフルオロメチル) スルホニル] イミドイオン ( $\text{TFSI}^-$ ) を選ぶことで、室温で液体として振る舞うイオン液体を得た (図1)。余談ではあるが、連結させる鎖の化学構造はイオン液体としての溶融挙動に大きな影響を及ぼす。エチレングリコール鎖の代わりに同様の長さのアルキル鎖で繋いだ構造は融点が著しく高く、特にアルキル鎖で繋いだ二量体カチオンと  $\text{PF}_6^-$  アニオンの組み合わせでは室温で固体となった。これはアルキル鎖の結晶性の良さに起因していると考えられる。

さて、我々は合成したオリゴマーイオン液体 OIL を用いて、グラファイト剥離を検討するため、OIL2 カチオンと  $\text{PF}_6^-$  アニオンを持つ OIL2 $\text{PF}_6$  と OIL4 カチオンと  $\text{PF}_6^-$  アニオンを持つ OIL4 $\text{PF}_6$  のそれぞれに、グラファイトを懸濁させ、それぞれにマイクロ波を照射した (図2)。マイクロ波を当てることでグラファイトの積層構造に由来する XRD ピーク (グラファイト (002) ピーク) が大きく減少し、グラファイトの剥離が起きていることが示唆された。この大きなピーク強度の減少は OIL4 $\text{PF}_6$  と OIL2 $\text{PF}_6$  のみ起こる。CEM 社のマイクロ波合成装置 Discovery を用いて、シングルモードのマイクロ波 30 W を 30 分照射したところ、懸濁液中のグラファイト (002) ピーク強度が OIL4 $\text{PF}_6$  と OIL2 $\text{PF}_6$  の懸濁液でそれぞれ 85%、91% 減少した (図3)。これは従来のモノマーイオン液体である、1-ブチル-3-メチルイミダゾリウムヘキサフルオロフォス

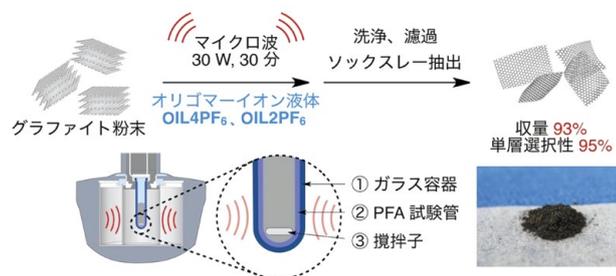


図2. OIL を用いたグラファイトの高効率剥離

フェート ( $\text{BMIPF}_6$ ) を懸濁液に用いたサンプルとは大きく異なる結果である。このマイクロ波照射した懸濁液から剥離片を取り出すため、複数の溶媒をソックスレー抽出の抽出溶媒として用いて、洗浄し固形残渣を回収した。OIL2 $\text{PF}_6$  を懸濁液に用いたサンプルから得られた黑色粉体は、原料のグラファイトに対して高収量 (95%) であり、さらに原子間力顕微鏡 (AFM) で観察されたシート化合物の 93% が、厚さ 1.0 nm 以下であることがわかった。液相剥離法で剥離されたグラフェンは一般に 1.0 nm 以下の厚さのものを単層グラフェンと評価されるため、93% が単層グラフェンであると結論づけた。本剥離グラフェンは不純物、構造的欠陥をほとんど含まないことをラマン分光法と X 線光電子分光法を用いて確認している。本手法はマイクロ波を 30 分当てるだけで、高品質な単層グラフェンを簡便に提供することができる<sup>6)</sup> (コラム参照)。

また、興味深いことにこの剥離現象は、OIL の対アニオンが  $\text{PF}_6^-$  であるときのみ観測され、OIL の対アニオンが  $\text{TFSI}^-$  では観測されなかった (図3 オレンジ)。イオン液体中の  $\text{PF}_6^-$  は  $\text{TFSI}^-$  と異なり、マイクロ波照射時にイオン液体中に混入する少量の水と反応し、少量のフッ化水素 (HF) が発生する。HF はグラファイトへの層間挿入が過去に報告されており、本系でも剥離初期の層間挿入に関与していると思われる。

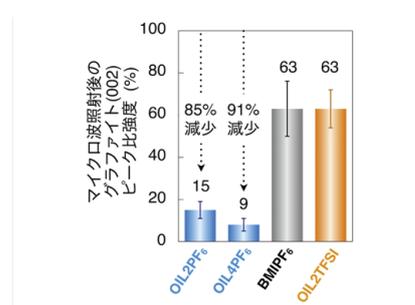


図3. イオン液体構造に依存したグラファイトの剥離効率の違い

## OIL の電解質としての利用とトランジスタ素子効率の向上

OIL による多点相互作用はグラファイト剥離のみでなく、イオン液体をゲート材料に用いるトランジスタ素子でも効果を発揮した。上述のグラファイト剥離では、多点相互作用の考え方を用いることで、イオン液体中のイミダゾリウムカチオンとグラフェンの  $\pi$  共役表面とのカチオン- $\pi$  相互作用を増強させ、単層グラフェンへの選択的なグラファイト剥離を実現した。さらに、我々はイオン液体を電解質として用いる系の、電解質 (イオン液体) - 電極の静電相互作用でも、多点相互作用による寄与が観測できるのではないかと考えた。イオン液体を電解質として用いる場合、電極に電圧を印加すると、電極電荷と反対の電荷を持つイオンが最近接し、その上にカチオンとアニオンの層が交互に積み重なる層状の電気二重層を形成すると言われてい<sup>7)</sup>。つまり、電極に負電荷が蓄積さ

れたときは、イオン液体のカチオンが、正電荷が蓄積されたときはアニオンが最近接すると考えられている。当然、電荷を持つ電極と最近接イオンとは静電相互作用によって相互作用する。我々はこの電極と最近接イオンとの静電相互作用も多点相互作用の概念で増強可能で、その結果、電気二重層としての静電容量向上に寄与するのではないかと考えた(図4)。電気化学インピーダンス法を用いて、金電極上でのOIL2TFSI、OIL4TFSI(電気化学的な安定性の観点からTFSI<sup>-</sup>を用いた)の静電容量についての電極電位依存性を調べた。オリゴマー構造を持つカチオンが近接する電極電位が負の時には、モノマーイオン液体に対して最大で6倍の静電容量の上昇がOIL4TFSIで観測されたのに対して、アニオンが近接する電極電位が正の時には静電容量の上昇は観測されなかった(図5)。このことからカチオンのオリゴマー構造が静電容量の上昇に寄与していることが示唆された。さらに、n型半導体であるSrTiO<sub>3</sub>上に電気二重層トランジスタ素子を作成し、ゲート材料としてのOILと従来のモノマーイオン液体の違いを検証したところ、OILを用いたトランジスタ素子は、より低い動作電圧でon-offのスイッチングを引き起こし、高い電荷導入率を示すことがわかった<sup>8)</sup>。このトランジスタ素子構造はFeSeのデバイスにも応用され、従来のイオン液体を用いた素子と比べて、FeSeの超伝導転移温度を6 K上昇させることができることも確認されている<sup>9)</sup>。

## おわりに

我々はOILを用いることで、グラファ

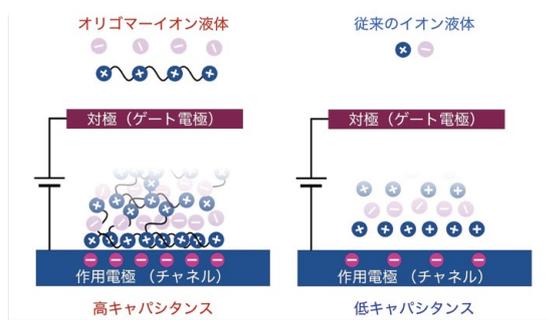


図4. OILを用いた高キャパシタンス電解質  
括弧外、括弧内のそれぞれの電極名称は電気化学測定、電気二重層トランジスタの電極呼称に対応する。

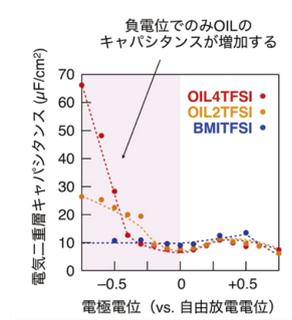


図5. イオン液体の電位に依存したキャパシタンス挙動

イトからグラフェンへの高効率剥離と電気二重層トランジスタの高効率化に成功した。多点相互作用を誘起する本構造は、高品質グラフェンを得る簡便な手法を提供するだけでなく、イオン液体を用いる様々な応用用途での効率の向上をもたらす可能性がある。二次元高分子の合成から物性物理の研究現場、電気二重層キャパシタとしての検討など、広くご利用いただけたら幸いである。

本研究を通して多くの共同研究者の協力を得た。特に、東京工業大学 福島孝典 教授、横浜国立大学 渡邊正義 教授、東京大学・理化学研究所 岩佐義弘 教授、東北大学 塚崎 敦 教授とそれぞれのグループには実際に実験を共同、もしくはOILを利用しての実験を行なっていただいた。謝意を表

す。それぞれの共同研究の詳細に関しては原著論文をご確認いただきたい。また、今回、OILの試薬販売にあたって富士フィルム和光純薬株式会社と株式会社東京大学TLOのそれぞれのご担当者様に多大なご助力をいただいたことに感謝する。

## 【参考文献】

- 1) Wilkes, J. S. and Zaworotko, M. J. : *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, **0**, 965 (1992).
- 2) 高分子学会編 : 「イオン液体」, 2巻 (共立出版) (2012).
- 3) Fukushima, T. et al. : *Science*, **300**, 2072 (2003).
- 4) Fasting, C. et al. : *Angew. Chem. Int. Ed.*, **51**, 10472 (2012).
- 5) Nicolosi, V. et al. : *Science*, **340**, 1226419 (2013).
- 6) Matsumoto, M. et al. : *Nat. Chem.*, **7**, 730 (2015).
- 7) Fujimoto, T. and Awaga, K. : *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **15**, 8983 (2013).
- 8) Matsumoto, M. et al. : *J. Am. Chem. Soc.*, **139**, 16072 (2017).
- 9) Miyakawa, T. et al. : *Phys. Rev. Mater.*, **2**, 031801 (2018).

## コラム

### グラファイト剥離の手順

グラファイト (12.5 mg) を OIL2PF<sub>6</sub> (0.5 mL) 中に懸濁させ、テフロン容器のいったマイクロ波照射試験管に攪拌子とともに導入する。シングルモードのマイクロ波照射装置で固化化しないようにマイクロ波照射を行う。(CEM社 Discoveryの場合コンプレッサー使用時、30 W, 30分、反応容器の温度が同装置上 170 °C程度で安定) マイクロ波照射後、5 mL のジメチルスルフォキシド (DMSO) で希釈し、その希釈液を PTFE 製のソックスレーフィルターに移し、ソックスレー抽出器を用いて洗浄した。抽出溶媒として DMSO (減圧 : ~30 mmHg)、2,2,2-トリフルオロエタノール、ジクロロメタンを順次使い、各溶媒で抽出液が色づかなくなるまで洗浄した。ジクロロメタンでの洗浄後、フィルター上の固体残渣を減圧条件下で乾燥し、黒色粉体を得た。

コード No.	品名	CAS RN <sup>®</sup>	規格	容量	希望納入価格(円)
155-03521	Oligomeric Ionic Liquid OIL2PF <sub>6</sub>	1485521-68-3	機能性有機材料用	5g	25,000
152-03531	Oligomeric Ionic Liquid OIL4PF <sub>6</sub>	1485521-95-6	機能性有機材料用	5g	60,000
159-03541	Oligomeric Ionic Liquid OIL4TFSI	2071203-58-0	機能性有機材料用	5g	60,000

※本品は、東京大学から特許第 6234922 号の非独占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 (関連特許 : 特許第 6122949 号・特願 2017-529952)。当該特許をご確認の上、ご使用下さい。



## 第2回 ペプチド合成の基礎と近年の進歩

サイエンスライター 佐藤 健太郎

本連載の第1回で述べたように、近年ペプチドを基本骨格とした医薬が脚光を浴びている。今回は、液相法・固相法によるペプチド合成の基礎と、近年の進歩について述べてゆく。

### ペプチド合成の概要

ペプチドの構成単位である $\alpha$ -アミノ酸は、アミノ基とカルボキシ基、そして側鎖に各種の官能基を持っている。狙った構造のペプチドを作り上げるためには、これら官能基を適切に保護し、反応性を抑えておく必要がある。ペプチド合成は、保護アミノ酸同士を結合させ、脱保護して反応点を露出させ、またカップリングを行い……という工程を繰り返し、最後に全体を脱保護することで完成する。

アミノ基の保護基としては、多くの場合*tert*-ブトキシカルボニル基 (Boc基) や9-フルオレニルメチルオキシカルボニル基 (Fmoc基) をはじめとしたカルバマート系の保護基が用いられる。Boc基はトリフルオロ酢酸 (TFA) などによる酸処理、Fmoc基はピペリジンなどの二級アミンによってすばやく脱保護される。またカルボキシ基は、メチルエステルなどの形で保護し、最後に加水分解によって脱保護を行う。

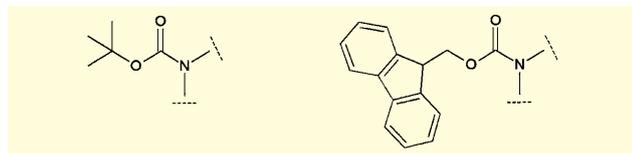


図1. Boc基 (左) と Fmoc基 (右)

また、アミノ酸の側鎖も、事前に適切に保護しておく必要がある。合成戦略により、保護すべき官能基は変わってくる。特殊なものでない限りは、多くの保護アミノ酸が市販されているので、入手は容易である。たとえば液相法による合成では、多くの場合 $\alpha$ -アミノ基の保護にBoc基を用い、酸処理に耐える保護基 (ベンジル基など) で側鎖を保護する戦略が採られることが多い。

ペプチド鎖の伸長は、C端側からN端側へ、すなわちカルボキシ側を保護したままの状態、アミノ基の保護基の切断、カップリングを繰り返していく戦略が一般的である。これは、アミノ基をカルバマート型保護基で保護したアミノ酸は、カップリングの際に $\alpha$ 位の不斉点のエピ化が起りにくいからである。

アミノ酸の不斉炭素のエピ化は、カップリング反応や脱保護の際に必ずつきまとう問題であり、ペプチド合成の歴史はエピ化との戦いの歴史であったといってもよい。たとえば、長いペプチド鎖同士を縮合させる「収束的合成」は効率の点で優れているが、カップリングの際にエピ化が起りやすい。このため、カップリング試薬を用いたペプチド

ド合成では、N端側へひとつひとつアミノ酸を継ぎ足してゆく方式が基本となる。

ただし、ネイティブケミカルライゲーションという手法により、エピ化なしに長いペプチド鎖同士を結合させる手法が開発され、長鎖ペプチドの合成に威力を発揮している。これについては、こちらの記事を参照されたい。

(<https://labchem-wako.fujifilm.com/jp/siyaku-blog/010987.html>)

### 固相法

初期のペプチド合成では、通常の有機合成と同様に、溶媒に基質と試薬を溶かす形で上記の過程を行っていた。しかしこの方法では、一段階ごとに後処理と精製を必要とし、時間と手間、熟練を必要とする。そこで、固体の担体にペプチド鎖を結合させ、その上で必要なだけペプチド鎖を伸長し、最後に担体から切り出す「固相合成法」が考案された。操作の簡便さなどから、現在ではこちらが一般的な手法となっている。

担体としては、ポリスチレンをベースとした合成樹脂がよく用いられる。樹脂に「リンカー」と呼ばれる原子団を導入したものが市販されており、ここに最初のアミノ酸のカルボキシ基を結合させる。リンカーは種類によって切断されやすさが異なるので、目的に合ったものを選択することができる。以下、ペプチド鎖N端の脱保護と、アミノ酸とのカップリングを繰り返して、ペプチド鎖を伸長させてゆく。

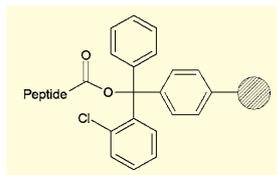
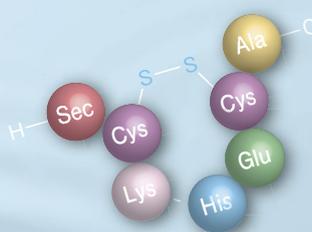
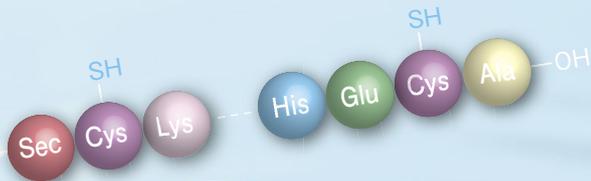


図2. リンカーの例 (2-クロロトリチルリンカー)。マイルドな酸処理でペプチドを切り出せる

固相合成法では、 $\alpha$ -アミノ基の保護基としてFmoc基を用い、酸で切除できる保護基で側鎖官能基を保護するケースが多い。最終段階で酸処理し、側鎖の脱保護と樹脂からの切り出しを同時に行う戦略が用いられる。

固相法は単純なステップの繰り返しでペプチド合成ができるため、有機合成に習熟していない者でも実施できる。機械化も可能であり、自動合成装置も市販されている。ただし、担体にペプチド鎖を縛りつけたままで最後まで合成を進めるため、途中で精製操作は一切できないという大きな制約がある。このため、各ステップの収率をできる限り向上させなければならない。

この目的のため、カップリングの際には保護アミノ酸と縮合剤を大過剰 (3当量程度) 用いて、完全に反応を進行させる必要がある。また、各ステップの後に徹底的に洗浄を行い、残留試薬を除去することも重要である。



## ペプチド合成試薬

溶媒としては、液相法・固相法ともに、*N,N*-ジメチルホルムアミド (DMF) がよく用いられる。ペプチドや保護アミノ酸の溶解力が高く、固相法で用いる樹脂をよく膨潤させるためである。ただし、DMFが分解してできるジメチルアミンが残存していると、目的とするペプチドの収率低下につながる。事前に蒸留精製するか、高グレードなものを新鮮なうちに用いることが望ましい。

アミド結合を生成させるカップリング試薬には、これまで多くの研究が積み重ねられてきた。古典的なWSCD-HOBt法も液相法では十分に有用であり、通常のアミノ酸のカップリングではほぼこれで問題なく合成が行える。

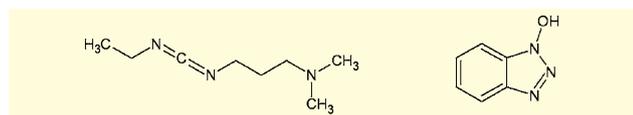


図3. 水溶性カルボジミド (WSCD、左) と1-ヒドロキシベンゾトリアゾール (HOBt、右)

固相合成の場合や、 $\alpha$ -二置換アミノ酸のような立体障害の大きなアミノ酸をカップリングに用いたいケースでは、1-[ビス(ジメチルアミノ)メチレン]-1*H*-ベンゾトリアゾリウム3-オキシドヘキサフルオロホスファート (HBTU) などのカップリング試薬が多用される。

その他、カップリングの効率改善、エピ化の抑制を目指して、多くのバリエーションが作り出されている。ベンゾトリアゾール部分に窒素原子を導入したHATU、塩素原子が置換しているHCTUなどは活性が高く、HBTUに代わる試薬としてよく用いられるようになってきている。これら縮合剤について詳細は、総説を参照されたい<sup>1)</sup>。

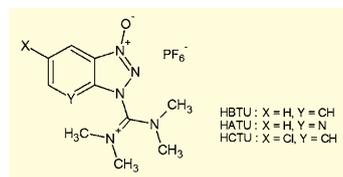


図4. HBTUとその誘導体

HBTU: X = H, Y = CH  
 HATU: X = H, Y = N  
 HCTU: X = Cl, Y = CH

## 疎水性タグの利用

これまで見てきたように、液相法と固相法はペプチド合成における二大流派として発展を続けてきた。しかし近年、これら両者の長所を取り入れた、新たな考え方の合成法が発展しつつある。

東京農工大の千葉らは、Molecular hivingと称する手法を発表している<sup>2)</sup>。ペプチドのC末端に疎水性タグ (2,4-

ビス (ドデシルオキシ) ベンジル基) を取り付けた上で、通常の液相法のようにペプチド合成を進めるといふものだ。この状態のペプチドは、テトラヒドロフラン (THF) には問題なく溶解するが、アセトニトリルを加えると不溶性の沈殿となる。つまり、カップリング反応をTHF溶媒で行い、アセトニトリルで沈殿させた上で洗浄することにより、高速かつ簡便に不純物や余剰試薬の除去が可能になる。

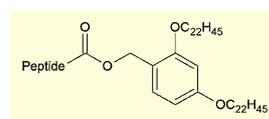


図5. Molecular hivingに用いられる疎水性タグ

この手法により、1日で5残基以上の伸長が可能になる。必要なだけペプチド鎖を伸ばしたら、10% TFA-CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>などの酸で処理することで、容易に疎水性タグを切除できる。溶解状態で反応を行えるため、反応効率は高く、固相法のように高価な試薬を過剰量用いる必要はない。また、必要に応じて途中での精製やNMR測定なども行える。また、固相法で用いる樹脂に比べて疎水性タグはずっと安価であるため、全体として非常に低コストでペプチド合成が可能となっている。

味の素社の研究陣も、同様の手法を開発しており、AJIPHASE法と名付けられている<sup>3)</sup>。こちらはタグとして長鎖アルコキシ基のついた9-フェニルフルオレニル基を用いる手法で、これを結合させたペプチドは、塩化メチレンなど塩素系溶媒には溶けるがメタノールには不溶であり、沈殿精製が可能になっている。

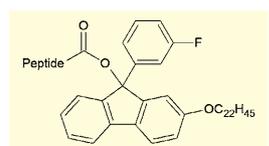


図6. AJIPHASE法で用いられる疎水性タグ

また最近、長鎖アルキル基を枝分かれのあるアルキル基に変えることで、溶媒抽出を行いやすくする改良法も登場した<sup>4)</sup>。これにより、ワンポットで20残基のペプチドを高純度で合成することに成功している。これらは、液相法と固相法の長所を併せ持った手法であり、低コストで大量のペプチドを合成する道を拓く。今後のペプチド医薬の進展にも、大きな影響を与えることだろう。

## 【参考文献】

- 1) El-Faham, A. and Albericio, F.: *Chem. Rev.*, **111**, 6557 (2011).
- 2) Okada, Y. et al.: *J. Org. Chem.*, **78**, 320 (2013).
- 3) Takahashi, D. and Yamamoto, T.: *Tetrahedron Lett.*, **53**, 1936 (2012).
- 4) Takahashi, D. et al.: *Angew. Chem. Int. Ed.*, **56**, 7803 (2017).

当社では、ペプチド合成用試薬をラインアップしています。詳しくは、当社HPをご覧ください。

試薬事業トップ→合成・材料→ペプチド合成 ([https://labchem-wako.fujifilm.com/jp/category/synthesis/peptide\\_synthesis/index.html](https://labchem-wako.fujifilm.com/jp/category/synthesis/peptide_synthesis/index.html))

## 第2回 高解像・高輝度蛍光イメージングのための透明化法、SeeDB2

九州大学大学院医学研究院 今井 猛

### はじめに

近年、様々なレーザー顕微鏡が開発されているが、生体組織を3次元的に捉えることは容易ではない。生体組織は光の散乱や吸収が生じ、深部に行けば行くほど観察が難しくなるためである。近年、こうした問題を克服する手段として、固定した生体組織を透明にする手法が注目されている<sup>1),2)</sup>。いずれも、光の吸収および散乱を減らすことで深部の観察を実現している。今や、組織や臓器の全体像を3次元的にとらえることも容易になってきた。

このように、透明化というと、多くの読者は大きな組織や臓器の観察に使う手法と捉えているかもしれない。それはそれで間違っていないのだが、透明化法は、「高解像度」イメージングにおいても非常に有用なツールである。そこで本稿では、透明化によって「高解像度」の3次元蛍光画像を得るための基礎知識と、我々が開発したSeeDB2について解説したい。

### 光学顕微鏡の分解能と開口数 (NA)、球面収差

はじめに、高解像イメージングについて考える上では、顕微鏡の分解能について説明しなければならない。共焦点顕微鏡などのレーザー蛍光顕微鏡において、水平方向の分解能  $d$  は以下のレーリーの式によって表される。

$$d = 0.61\lambda/NA$$

ここで、 $\lambda$ は光の波長、NAは対物レンズの開口数 (Numerical Aperture) を示す。この式によれば、 $d$ の値を小さくするにはNAの値を大きくすれば良いことがわかる。蛍光イメージングにおいて分解能を決めるのは倍率ではなく、NAである。NAの値は

$$NA = n \sin \alpha$$

で定義される。ここで、 $n$ は浸液の屈折率、 $\alpha$ は開口角の1/2の値である。このため、高開口数を持つ対物レンズの多くは、ドライレンズではなく、高屈折率の浸液、すなわちオイル (屈折率 1.52) やグリセリン (屈折率 1.45-1.46) を用いるよう

に設計されている。これにより、200 nm 程度の分解能が実現できる。NAが大きいと良いのは分解能だけではない。NAが大きいほど対物レンズに入ってくる光の量が多くなるため、明るい像が得られる。明るさはNAの二乗に比例するため、例えばNA1.4の油浸レンズはNA1.0の水浸レンズの2倍程度明るい。

このように、細かい構造を明るく観察するにはNAの大きな対物レンズが有効である。一方でうまく使用しないと像がボケて暗くなりやすいという問題がある。油浸レンズを用いて「標本の表面」を観察する場合、焦点位置までには屈折率 1.52の浸液と、同じく屈折率 1.52のカバーガラスがあるため、光はまっすぐ進んで、蛍光シグナルもまっすぐに戻ってくることになる。しかしながら、少し深いところを観察しようとするとき大きな問題が生じる。標本の屈折率は、水の1.33から、グリセリン系封入剤の1.46の間であることが多い (図1A)。この場合、カバーガラスと標本の界面では屈折率の違いから屈折が生じ、本来1点に収束するはずであった励起光は広がってしまうことになる。この結果、像がボケる。球面収差によるボケは水平方向 ( $x$ - $y$ ) よりも軸方向 ( $z$ ) でより顕著である。また、蛍光シグナルが対物レンズに戻ってくる際にも屈折し、ピンホールを通して検出器に戻ってくる光量が減ってしまう。この結果、像が暗くなる。このように、標本の屈折率の不一致から生じる収差「球面収差」があると、像がボケ、暗くなる。標本深部ではこの球面収差が大きくなるため、従来、高NAレ

ンズを使って標本深部を観察することは困難であった。

### SeeDB2による高解像・高輝度イメージング

球面収差を最小限にし、高NAレンズでの深部観察を実現するため、我々は新しい透明化試薬 SeeDB2を開発した<sup>3)</sup>。SeeDB2は油浸レンズ (SeeDB2Sを使用、屈折率 1.52) もしくはグリセリン浸レンズ (SeeDB2Gを使用、屈折率 1.45-1.46) の浸液と屈折率を一致させることができるため、球面収差を極限まで減らすことができる (図1B)。これにより、深部でも分解能を一定に保つことができるのみならず (図2A)、輝度も深さによらずほぼ一定となる (図2B)。また従来の透明化液のように標本の伸縮をもたらすことがないため、微細形態が高度に保持されている。こうしたことから、SeeDB2は微細形態の高解像観察には最適である。SeeDB2は大きな臓器・組織の観察だけでなく、比較的小さな昆虫などの組織や培養細胞の高解像観察においても大きな威力を発揮する。SeeDB2のプロトコルは我々のウェブサイト SeeDB Resources で公開されているほか<sup>4)</sup>、*bio-protocol*誌にも詳細なプロトコルを発表している<sup>5)</sup>。調製済みのSeeDB2試薬は市販されている。SeeDB2S (屈折率 1.52) を観察時の封入剤として使用する場合には、Super Clear Mount という名称で市販されているものをそのまま使用すればよい。

分解能だけでなく、蛍光タンパク質の安定性も SeeDB2S / Super Clear

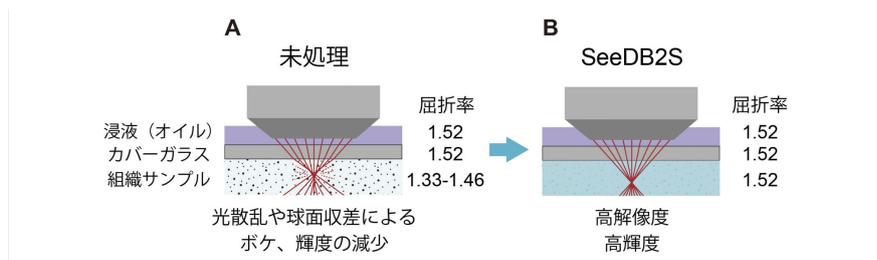


図1. SeeDB2を用いた高解像イメージングの原理<sup>3)</sup>

高解像度が要求される実験では、グリセリン浸 (NA1.3以上) や油浸 (NA1.4以上) レンズが有効である。しかしながら、屈折率が最適化されていない従来の封入剤では標本深部において球面収差が生じ、設計通りの分解能を得ることができない(A)。SeeDB2を用いて標本の屈折率を浸液と一致させることで、球面収差を抑え、高解像度・高輝度の画像を得ることができる(B)。

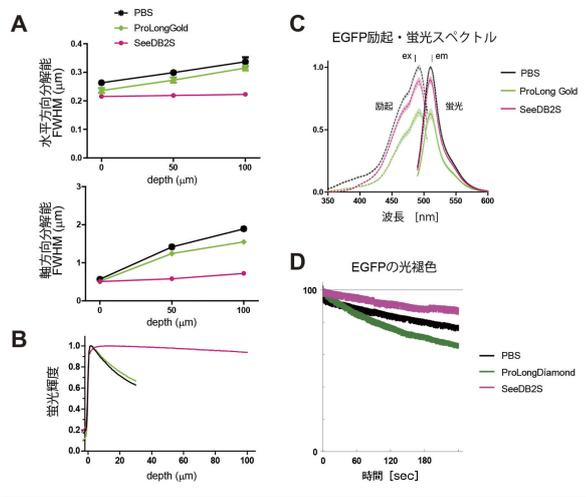


図2. SeeDB2による高解像・高輝度イメージング (A-Cは文献3)より転載)

- (A) 水平方向 (x-y) および軸方向 (z) の分解能 (FWHM)。SeeDB2を用いると標本深部でも分解能が一定である。
- (B) 球面収差を減らすと、深部においても高輝度の観察が可能となる。図はローダミン溶液を共焦点顕微鏡で観察し(油浸レンズ使用)、輝度を測定したもの。SeeDB2Sを使うと深部までほぼ一定の輝度が得られる。
- (C) SeeDB2は蛍光タンパク質の蛍光輝度がほとんど消光しない。一般的な市販の封入剤と比較。
- (D) SeeDB2では蛍光タンパク質の光褪色も抑えられている。蛍光タンパク質用に市販されている封入剤と比較。

Mountの特筆すべき利点である。意外と知られていない点であるが、市販の封入剤はフルオレセインやローダミン、Alexa色素といった合成色素の安定性という観点で最適化されているため、蛍光タンパク質の安定性は必ずしも良くない。実際、汎用されているグリセリン系のマウント剤で蛍光タンパク質標本をマウントすると、EGFPやEYFPの蛍光が3-7割も減少してしまう<sup>3)</sup>。更に、従来市販されている封入剤では蛍光タンパク質の光褪色も大きい。これに対し、SeeDB2S / Super Clear Mountを用いると、いずれの蛍光タンパク質もほとんど蛍光輝度が変化せず、光褪色も極めて起こりにくい(図2C, D)。こうしたことから、蛍光タンパク質の観察には最適である。一方、市販のマウント剤と比べると、DAPIやAlexa色素の光褪色が生じやすいのは欠点と言える。

**共焦点顕微鏡、超解像顕微鏡への応用**

SeeDB2が極めて有効な応用例の1

つとして、神経細胞のシナプスの定量解析が挙げられる。多くの神経細胞において、興奮性のシナプス入力には樹状突起スパインと呼ばれる小突起に局限している。樹状突起スパインはシナプスの可塑性に伴って大きさが変化するほか、その密度や形態の異常が精神疾患につながることも示唆されている。こうしたことから、2光子励起顕微鏡や共焦点顕微鏡を用いた樹状突起スパインの定量解析が広く行われている。しかしながら、樹状突起スパインは頭部の直径が0.1-1 μm程度と極めて小さく、正確な定量は容易ではない。われわれが開発したSeeDB2Sを用いると、共焦点顕微鏡と油浸レンズを使って

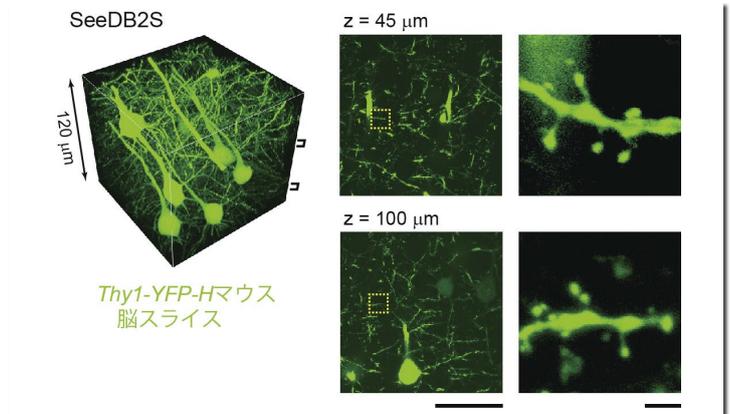


図3. 共焦点顕微鏡による深部高解像観察 (文献3)より転載)

Thy1-YFP-H line マウス脳スライスを見DB2Sで処理し、NA1.4の油浸レンズを使用して共焦点顕微鏡観察を行った。スライスの浅い部分と深い部分ではほぼ一定の分解能が得られる。またレーザーパワーを変えなくてもほぼ一定の輝度が得られる。右に示すのは樹状突起スパイン。スケールバーは左が50 μm、右が2 μm。

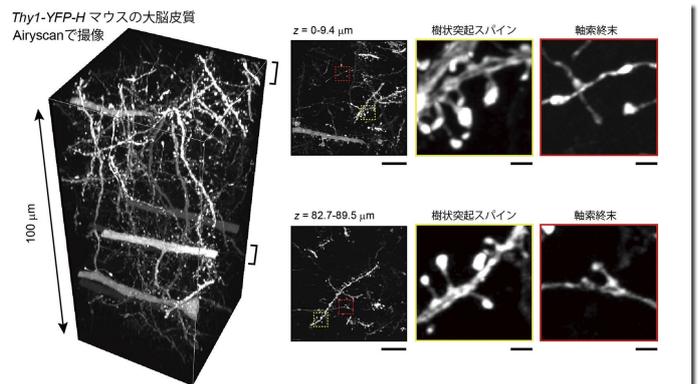


図4. Airyscan (Zeiss社)による脳スライスの観察例 (文献3)より転載) スケールバーは左が10 μm、中央と右が1 μm。動画をYouTubeにて公開 (<https://youtu.be/TakrFLY7pU4>)。

標本深部まで高解像画像を得ることができるようになった。高NA対物レンズは作動距離が100-300 μm程度であり、その範囲内であれば高解像度の画像を得ることができる(図3)。共焦点顕微鏡だけでなく、超解像顕微鏡でも深部の観察が可能である。STED顕微鏡(分解能約50 nm)やAiryscan(分解能120-150 nm、図4)でも深さ100 μm超まで高解像観察が可能である。神経突起の解析を行う上では、x-y方向の分解能だけでなく、z軸方向の分解能も極めて重要である。SeeDB2を用いると、従来法に比べてz軸方向の分解能が劇的に改善するため、神経突起のトレーシングや樹状突起スパイン

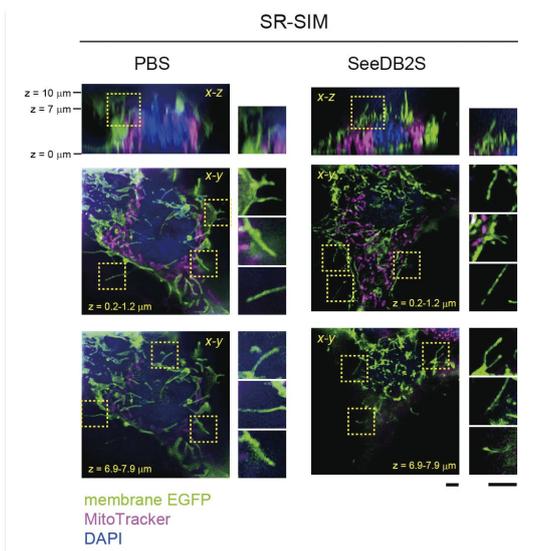
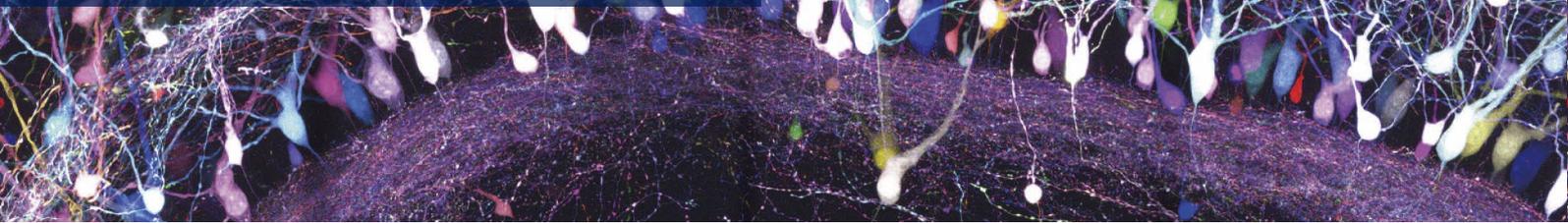


図5. SR-SIM (Zeiss 社) による培養細胞 (HEK293 細胞) の超解像イメージング例 (文献 3) より転載)。スケールバーは 2 μm。

ンの定量解析に有効である。

SeeDB2S / Super Clear Mount は、厚い標本だけでなく、培養細胞等の超解像イメージングのための封入剤としても極めて有効である。図 5 は HEK293 細胞を SR-SIM で撮像したものであるが、球面収差を減らすことで膜やオルガネラの構造がより鮮明に観察できている。

### Tetbow を用いた神経細胞の多色標識

蛍光イメージングにおいて、透明化試薬によるサンプル調製も重要であるが、同じくらい重要なのは標本の標識である。見たい対象物が高輝度染色されていないければ、いくらサンプル調製を工夫しても鮮明な画像を得ることはできない。ここでは、われわれが神経回路解析のために新たに開発した手法、Tetbow について紹介したい。

脳内では多くの神経突起が絡まり合っており、その配線の全容を明らかにすることは容易ではない。蛍光タンパク質を使っ

て一部の神経細胞を標識すれば、個々の突起の配線の様子を観察できるが、多くの神経細胞が同じ色で染色されてしまうと、それぞれを区別するのが困難になってしまう。こうした問題を克服するため、3 種類の蛍光タンパク質を組み合わせ、神経細胞を数 10 種類もの異なる色で染め分ける方法、Brainbow が報告されている<sup>(6,7)</sup>。しかしながら、Brainbow は蛍光輝度が十分ではなかったため、実用的ではなかった。そこで、われわれは Tet-Off システムを使うなどの工夫をし、従来よりも一桁程度高輝度な多色標識法 Tetbow 法を開発した (図 6)<sup>(8)</sup>。Tetbow 法はプラスミドやウイルスベクターを用いて神経細胞に導入可能である。CFP、YFP、RFP などの蛍光タンパク質はいずれも SeeDB2 中で極めて安定であるため、SeeDB2 を用いた透明化が最適である。また、蛍光タンパク質の代わりに SNAP、HaloTag、CLIP といったケミカルタグを使えば、任意の合成色素を使って多色標識を実現できる。実用に耐える輝度を

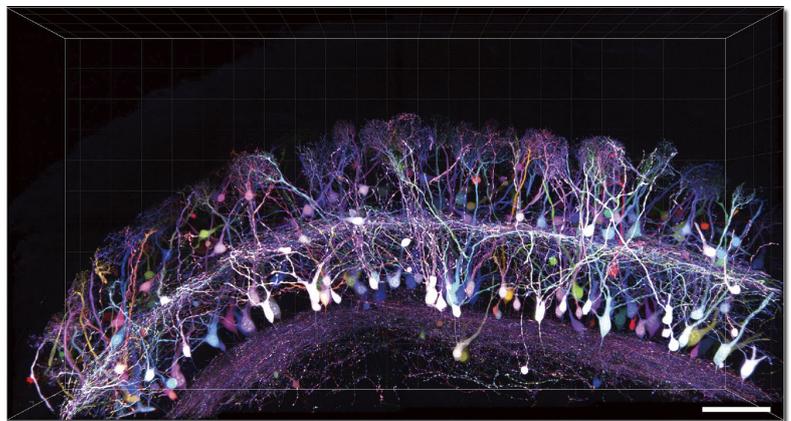


図 6. Tetbow による神経細胞の多色蛍光イメージング (文献 5) より転載) プラスミドを用いた *in utero* electroporation 法によって、嗅球僧房細胞を Tetbow で標識した。スケールバーは 100 μm。動画を YouTube にて公開 (<https://youtu.be/EHato3VVQTs>)。

実現できたことで、多色標識は今後の神経回路解析のための有用な手段になるものと期待される。

### おわりに

本稿では、特に SeeDB2 にフォーカスして、高解像・高輝度イメージングを行うための基礎知識と注意点について解説した。対物レンズの NA や標本の屈折率に留意して標本を調製することで、貴重な標本からより多くの情報を正確に引き出すことができる。本稿が今後の蛍光イメージング実験の一助となれば幸いである。

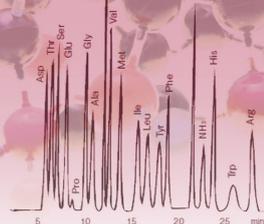
### 【参考文献】

- 1) Richardson, D. S. and Lichtman, J. W. : *Cell*, **162** (2), 246 (2015).
- 2) Richardson, D. S. and Lichtman, J. W. : *Cell*, **171** (2), 496.e1. (2017).
- 3) Ke, M. T. *et al.* : *Cell Rep.* **14**, 2718 (2016).
- 4) SeeDB Resources, <https://sites.google.com/site/seedbresources/>
- 5) Ke, M. T. *et al.* : *Bio-protocol*, **8** (20), e3046 DOI: 10.21769/BioProtoc.3046 (2018).
- 6) Livet, J. *et al.* : *Nature*, **450**, 56 (2007).
- 7) Cai, D. *et al.* : *Nat. Meth.*, **10**, 540 (2013).
- 8) Sakaguchi, R. *et al.* : *eLife*, **7**, e40350 DOI: 10.7554/eLife.40350 (2018).

当社では、SeeDB2 Trial Kit [コード No. 294-80701] と Super Clear Mount [コード No. 190-18661] を取扱っています。当社 HP をご覧下さい。

SeeDB2 富士フィルム和光純薬

検索



はじめに

アミノ酸から構成されるペプチド及びタンパク質は、遺伝子の最終産物であり、細胞の形態や機能を直接制御している。そのため、癌化等により細胞の形態や機能が変化する過程で、個々のペプチド及びタンパク質の発現量、翻訳後修飾等が変化する。これらの変化は、患者の層別化、疾患の早期診断、薬効評価等のためのバイオマーカーとして利用可能であり、病態の原因解明を目指した研究と共に盛んに行われている。これらの研究では、ペプチド及びタンパク質の個体内及び個体間変動を評価できるような、測定変動の極力小さい定量法が重要となる。

また、ペプチド及びタンパク質は、医薬品の新しいモダリティとしても活用されている。その代表例が抗体医薬品である。現在の医薬品開発研究は、低分子化合物を中心とした創薬から抗体医薬品に代表されるバイオ創薬へシフトしており、抗体医薬品の売上高はすでに世界におけるランキング上位を占めている。さらに、低分子医薬品や抗体医薬品では狙えない新しい標的分子を創薬ターゲットとした、分子量の小さいペプチド等を含む中分子創薬も積極的に展開されており、次世代の医薬品として高い期待が寄せられている。ここでも、ガイドラインに準拠した正確な真度及び精度を有するペプチド及びタンパク質の定量法が必要となる。

しかし、アミノ酸が複数つながったペプチド及びタンパク質は、様々な高次構造を形成することが可能であり、低分子化合物であるアミノ酸とは物性が大きく異なる。特に、吸着や凝集等の現象が強く認められ、取り扱いにも注意が必要となる。これらの性質は、通常のLC分析において、ピーク形状の悪さ、カラム充填剤からの回収率の低さ、高感度化の難しさ等の問題を引き起こすことから、ペプチド及びタンパク質定量のためには、低分子化合物であるアミノ酸分析とは全く異なる工夫が必要である。

ペプチド及びタンパク質定量のための新しい技術として、前処理法、使用容器やカラム等の素材検討をはじめ、分析現場では様々な工夫が行われているが、ここでは、ペプチド吸着制御LC (Peptide Adsorption-Controlled LC, PAC-LC) を紹介したい。

LC分析におけるペプチドの吸着の影響

先に述べた通り、ペプチド及びタンパク質の吸着は、正確な取り扱いを困難とし、結果として高感度定量を困難とする。

例えば、アミノ酸残基数40、分子量4,696のペプチドであるurocortinを用い、アセトニトリル含量の異なるurocortin溶液(1 nM) 100 μLをLCに導入した時に得られるSRMクロマトグラムを図1Aに、カラムに保持されたurocortinのピーク面積値を図1Bに示す。この時、水だけに希釈された溶液ではurocortinピークは確認できない。これは、添加した酸に関わらず、容器やチップ、ニードル等への吸着によってurocortinが失われていることを示しており、このような操作法ではnMレベルでの検出もできないことが分かる。

一方、アセトニトリルを添加することでurocortinのピークが検出されてくるが、カラムに保持したurocortinのピーク(以後、保持ピーク)の面積値は安定しない。

これは、アセトニトリル含量が30%までの場合、urocortinの容器やチップ、ニードル等に対する吸着を完全に回避できていないためである。一方、アセトニトリル含量が40%以上の場合、urocortinの容器等への吸着を回避できているものの、カラムに全く保持されていないurocortinピーク(以後、非保持ピーク)が発生し、これが保持ピークの面積値の減少を引き起こす。従って、urocortinを定量するためには、吸着を完全に回避しつつ、urocortinを1本のピークとして検出可能なアセトニトリル含量が30%の溶液を用いる必要がある。しかし、urocortinの吸着の程度は、時間の経過によって変化し、また、その他の共存成分によっても影響を受けることから、生体試料のような複雑なマトリクス中の測定においては、アセトニトリルの適切な含量を一義的に30%と決めることは難しいと考えられる。

ペプチドの吸着能の相転移現象

先に述べた現象は、分子量1,007～45kの様々なペプチド及びタンパク質において認められ、さらに、この現象を惹起する有機溶媒として、アセトニトリル以外に、メタノール、エタノール、酢酸及びギ酸等が確認されている<sup>1)</sup>。従って、試料溶液中の有機溶媒含量を増加させることによって、保持ピークに加えて非保持ピークが

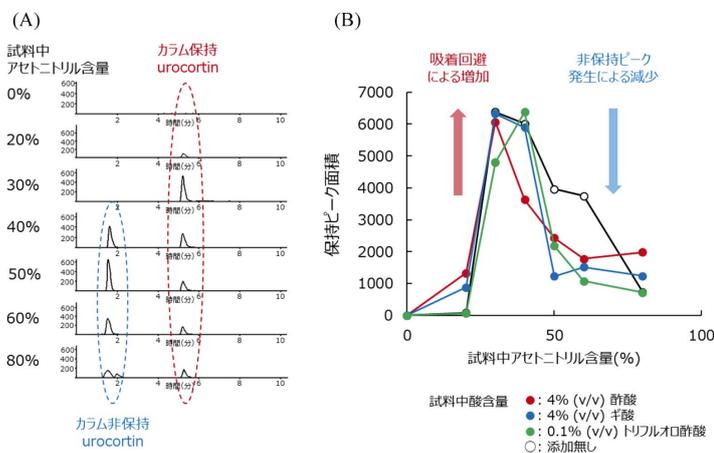


図1. アセトニトリル含量の異なるurocortin溶液(1 nM)のSRMクロマトグラム(A)及び保持ピーク面積(B)

本シリーズの企画・構成に際し、味の素株式会社 宮野博様にご協力頂きました。

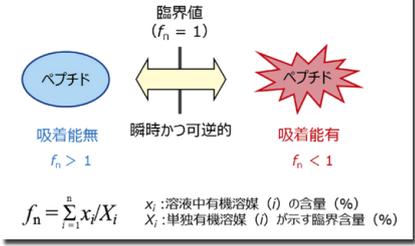


図2. ペプチドの吸着能の相転移理論

発生する現象は、ペプチド及びタンパク質にとって普遍的な現象であると考えられる。

この普遍的な現象を説明するためには、ペプチド及びタンパク質のカラム充填剤に対する吸着能が、特定の有機溶媒含量（臨界値）を境に急激かつ可逆的に変化（相転移）する（図2）と考える必要がある。

つまり、ライン内径及び流速等を考慮すると、LCに導入された100 μLのurocortin溶液のほとんどは導入時の溶液組成を保ったままカラムに到達しており、この場合、urocortinはカラム充填剤に対する吸着能を失ったままであるため、カラムを素通りして非保持ピークとして溶出されると考えられる。一方、カラム到達までの間に後ろを流れる移動相と混合してアセトニトリル含量が低下した溶液中のurocortinは、カラム充填剤に対する吸着能を瞬時に回復してカラムに保持された結果、保持ピークとして溶出されると考えられる。

この理論に従う場合、アセトニトリルがurocortinのカラム充填剤に対する吸着能に対して示す臨界値は、図1Aのクロマトグラムから30～40%の間に存在すると推定されるが、これは、アセトニトリルによって惹起されるurocortinの高次構造の変化の臨界値と同じであることがCDスペクトル解析により示されている<sup>2)</sup>。同時に、この高次構造変化が可逆的であることも示されていることから、urocortinのカラム充填剤に対する吸着能の急激な変化と可逆性は、その高次構造の変化に伴うものであると考えられる。

ペプチド及びタンパク質の吸着能の相

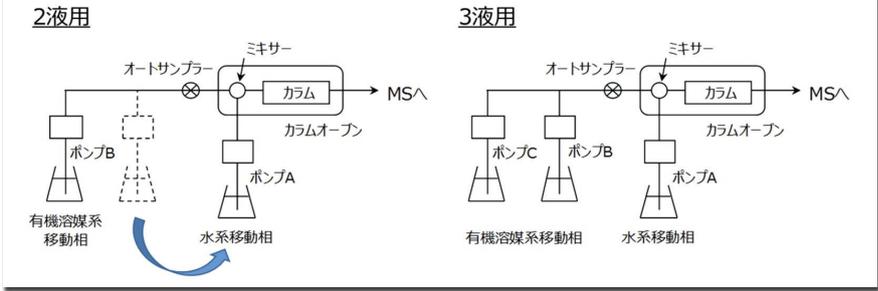


図3. 2液及び3液用 PAC-LC

転移現象は、従来、タンパク質及びペプチドの逆相分離で説明されてきた、『最初にカラム入口付近の固定相表面に分配保持されたタンパク質及びペプチドは、移動相中の有機溶媒濃度がある特定値に達したときに固定相からはじめて脱離し、一旦脱離したものはそれ以降固定相とは何ら相互作用せずにカラムから溶出される』、という考え方と基本的に同じである。しかし、高次構造の可逆性に伴う吸着能の可逆性を考慮すると、ペプチド及びタンパク質は、臨界値の有機溶媒含量の溶離液付近で固定相表面への保持と脱離を繰り返しながら溶出されているものと考えられる。

### ペプチド吸着制御 LC の開発

これまで述べてきた有機溶媒によって惹起されるペプチドのカラム充填剤に対する吸着能の相転移現象を利用することで、より正確に高感度なペプチド定量を可能とする、ペプチド吸着制御 LC (Peptide Adsorption-Controlled LC, PAC-LC) を開発した (図3)<sup>2,4)</sup>。

PAC-LCは、標準LCと比較して、水系移動相用のポンプ位置が異なり、カラム直前で水系移動相を混合するシステムになっている。2液用としても使用できるが、3液用の場合、標準LCとして利用する際にラインのつなぎ換えが必要とならないメリットがある。

このPAC-LCの特徴は、カラム入口前での水系移動相との混合により、導入されたペプチド周りの有機溶媒含量を強制的に変化させることにある。例えば、アセ

トニトリル含量50%のペプチド溶液を、水系100%の移動相Aと有機溶媒系移動相B（3液用の場合B及びC）との混合比が9対1の条件下で導入した場合、カラムに到達するペプチド周りのアセトニトリル含量は5%となる。これは、アセトニトリルがペプチドの吸着能に対して示す臨界値が20%である場合、導入時の溶液中でカラム充填剤に対する吸着能を失っていたペプチドが、アセトニトリル含量5%の溶液中でカラム充填剤に対する吸着能を瞬時に回復してカラムに保持されることを意味する。一方、アセトニトリル含量50%の溶液中のペプチドは、容器、ニードル、チップ等の固体への吸着能も失っていることから、操作及びLC導入時の定量性を担保できることを意味する。

実際に、PAC-LCを用いてアセトニトリル含量の異なるurocortin溶液を測定した場合、urocortinは常に1本の保持ピークとして検出され、臨界値（30～40%）より大きいアセトニトリル含量の溶液を用いた場合にほぼ同じピーク面積値が得られている（図4）。また、アセトニトリル含量50%の溶液で調製したurocortin検量線試料のピーク面積は濃度に比例し、10 pMから10 nMの濃度範囲で理論値の±15%以内の良好な真度を有する検量線が得られ<sup>2)</sup>、さらに、吸着を回避できるアセトニトリル含量の試料を繰り返し測定した時の測定精度は、アセトニトリル含量に関わらず良好な値（10%以下）を示している<sup>3)</sup>。これらは、臨界値以上のアセトニトリルを用いることで試料調製及び導入時の吸着を回避できること、及びPAC-LCにより1本のピークとして検出できる



ために精度の高い測定が可能であることを示している。

一方、標準 LC を用いた場合、標準溶液であるにも関わらず、非保持ピーク及び保持ピークの割合の不規則な変化により測定精度が損なわれることが確認されている<sup>3)</sup>。これは、カラム到達までの間に後ろを流れる移動相との混合が均一に起こらないことを示唆している。よって、正確な定量のためには1本のピークとして検出できる臨界値近辺の有機溶媒含量の溶液を使用する必要があることを示しており、この事実は、臨界値の大きく異なるペプチド及びタンパク質を高い精度で同時定量することが困難であることを表している。

以上のように、PAC-LC は、標準 LC と比較して、高い測定精度での定量を可能とする試料溶液中の有機溶媒含量範囲が広く、また、臨界値の異なる多成分ペプチドの同時測定を高精度で実施可能な点で大きく優れている。

### PAC-LC を用いた生体試料中ペプチド及びタンパク質の定量

抗体医薬品は、ヒトの生体防御に寄与するタンパク質である免疫グロブリン (IgG, IgM, IgD, IgE, IgA) を遺伝子組み換え技術等を応用して作成したものであり、上市されている全ての抗体医薬品は IgG を基としたアミノ酸配列を有している。近年、動物及びヒト血漿中の抗体医薬品をトリプシン消化法<sup>5)</sup>にて定量する方法が積極的に検討されているが、内在する IgG や夾雑成分と区別するために、最適なペプチド断片を選択する必要がある。PAC-LC を用いる場合、トリ

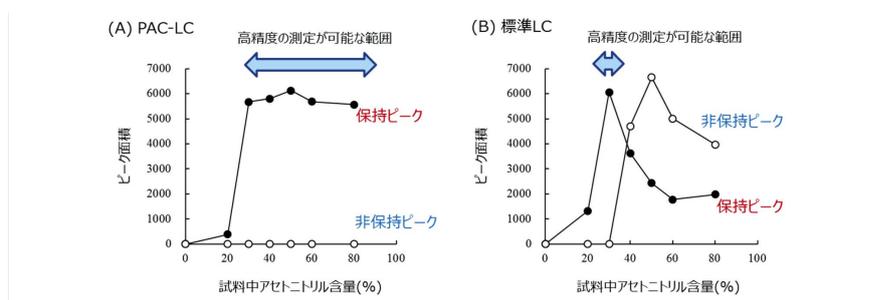


図4. アセトニトリル含量の異なる urocortin 溶液を測定した場合のピーク面積

プシン消化によって得られる様々な特性のペプチド断片の正確な同時測定が可能であるため、消化条件や LC 条件の最適化が容易に実施でき、最適なペプチド断片を効果的に獲得できるメリットがある。また、実試料測定においては、複数ペプチドの同時測定により抗体医薬品の生体内における構造変化 (バイオトランスフォーメーション) を評価できる可能性を秘めている。

また、認知症の一種であるアルツハイマー病の主な病理学的特徴の一つである老人斑の主な構成成分であるアミロイドペプチドの定量例では、吸着回避のために酸及び有機溶媒を含む溶液にて CSF を希釈するだけの簡単な前処理を用いて、イヌ CSF 中 4 種アミロイドβペプチドの同時定量が可能となっている<sup>4)</sup>。

このように、ペプチド及びタンパク質の吸着能の相転移現象を利用した PAC-LC は、生体試料中のペプチド及びタンパク質定量において有効なツールに成り得ると考えられる。

### おわりに

従来、ペプチド及びタンパク質の定量には、標的に特異的に結合する抗体を用

いたりガンド結合法が用いられてきた。しかし、抗体作製に時間を要する上に作製できる保証がないこと、交差性等の問題点が存在し、その定量値の解釈が複雑となる場合が存在する。一方、LC/MS 法は、 $m/z$  と保持時間に基づく高い選択性を有しており、標的を正確に定量するという観点では非常に優れた手法である。ペプチド及びタンパク質は、バイオマーカーとしてだけでなく新しい医薬品モダリティとしてますます期待が高まっており、それに伴い様々な測定技術が必要とされてきている。PAC-LC のような新技術の活用が進み、分析化学がこれらの研究の進展に大きく貢献することを期待したい。

### 【参考文献】

- 1) Goda, R. et al. : *Biomed. Chromatogr.*, **22**, 81 (2008).
- 2) Goda, R. et al. : *Biomed. Chromatogr.*, **21**, 1005 (2007).
- 3) Goda, R. et al. : *Biomed. Chromatogr.*, **22**, 857 (2008).
- 4) Goda, R. et al. : *J Chromatogr. B.*, **895**, 137 (2012).
- 5) Hashii, N. et al. : *Chromatography*, **39**, 7 (2018).

当社では、品質保証に多変量解析を用いた、高感度 MS 用の超高純度溶媒を販売しています。

コード No.	品名	規格	容量	希望納入価格 (円)
018-26225	Acetonitrile	QTofMS用	500mL	5,150
016-26221			1L	8,500

他にも LC/MS 用の高純度溶媒を取り揃えています。当社 HP をご覧下さい。

試薬事業トップ→分析→液体クロマトグラフィー用溶媒

[https://labchem-wako.fujifilm.com/jp/category/analysis/solvent\\_eluent/hplc\\_solvent/index.html](https://labchem-wako.fujifilm.com/jp/category/analysis/solvent_eluent/hplc_solvent/index.html)

☑️...2 ~ 10°C 保存    ☑️... 20°C 保存    ☑️... -80°C 保存    ☑️... 150°C 保存    表示がない場合は室温保存です。その他の略号は、巻末をご参照下さい。  
掲載内容は、2019年7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6回 エクソソームとウイルス

東海大学総合医学研究所造血腫瘍分野 東海大学医学部血液・腫瘍内科 柿崎 正敏、幸谷 愛

### はじめに

ウイルス感染症は有史以前から存在していたが、病原体としてウイルスが認識されるようになったのは、1898年に口蹄疫ウイルスが発見されてからである。ヒトの病気に関わるウイルスは数百種類とされており、日常でよく遭遇する呼吸器や消化器などの急性感染症から、AIDSやB型・C型肝炎、子宮頸がんなど慢性疾患としての経過をたどる感染症まで多種多様である。近年、ウイルスの生存戦略にウイルスと同様に細胞外小胞 (Extracellular vesicles: EVs) に属するエクソソームが関与していることが報告され注目を集めている。

本稿では、ウイルス感染細胞から放出されるエクソソームがウイルス性疾患に関連する報告を紹介し、さらに、我々が研究対象とするB型肝炎ウイルス (Hepatitis B virus: HBV) 感染細胞由来エクソソームの機能について概説する。

### エクソソームの分泌

エクソソームは、後期エンドソームである多胞性エンドソーム (Multi vesicular body: MVB) 中に出芽している腔内膜小胞 (intraluminal vesicles: ILVs) と呼ばれる~100 $\mu$ m程度の様々なサイズからなる小胞由来であると考えられている<sup>1)</sup>。ILVsの形成にはESCRT (endosomal sorting complex required for transport) と呼ばれるタンパク質複合体が関与している。MVBが細胞膜と融合し、エクソソームは細胞外に分泌される。

### ウイルスの出芽

ウイルスの出芽には、細胞膜から直接出芽する経路やMVB経路で出芽する経路など、いくつかの経路が存在している。レトロウイルス、フラビウイ

ルス、ラプトウイルスやパラミクソウイルスなどの多くのエンベロープを持つRNAウイルスは細胞膜からの出芽を円滑に進めるためにESCRT複合体およびESCRT関連タンパク質と相互作用することが報告されている<sup>2)</sup>。また、HBVやE型肝炎ウイルス (Hepatitis E virus: HEV) もESCRT複合体およびESCRT関連タンパク質と相互作用し、MVB経路で放出されることが報告されている<sup>2,3)</sup>。以上のことから、ウイルスはESCRT機構をハイジャックすることで出芽を円滑に進めていると考えられる。

### ウイルス感染細胞由来エクソソームの機能

出芽以外にも、ウイルスはESCRT機構をハイジャックすることで、エクソソームにウイルスゲノムやウイルス関連タンパク質などを輸送させることが知られており、エクソソームをウイルスの生存に有利に利用していると考えられている。実際に、HIV感染細胞由来のエクソソームには、HIVウイルスタンパク質の一つであるNefが内包されていることがわかっており、Nefを内包するエクソソームを取り込んだ細胞はHIVに対する感受性が亢進する<sup>4,5)</sup>。また、EBV陽性のB細胞リンパ腫由来のエクソソームには、EBVがコードするmiRNAを内包することがわかっており、このエクソソームを取り込んだマクロファージは腫瘍随伴マクロファージ様の性質変化を引き起こし、腫瘍細胞の増殖を促す<sup>6)</sup>。

上記の様に現在までに様々なウイルス感染細胞由来のエクソソームの機能解析が進んできている。以下の項目では、我々が研究を進めているHBV感染細胞由来のエクソソームの機能について概説する。

### HBV

HBVは全世界的な感染症であり、

HBV持続感染者は全世界でも4億人存在すると推定され、その大部分はアジア、アフリカ地域に集中しており、本邦でもHBVキャリアは約100万人と推定される。本邦では、母子感染予防策により新規感染は減り、核酸アナログによってウイルス複製は制御可能になりつつあるが、未だウイルスの完全排除に至る治療法はない。HBVを完全排除するための治療法開発には、まずB型肝炎が慢性化するプロセスの解明が必要であるが、慢性化に至るプロセスは不明な部分が多く残されている。近年、慢性B型肝炎患者の血中に存在する単球では、PD-L1の発現が上昇し<sup>7)</sup>、さらに、HBV特異的CD8陽性T細胞でPD-1の発現が上昇し細胞障害能が著しく低下していることがわかってきている<sup>8)</sup>。このことから、B型肝炎の慢性化の原因の一つとしてPD-1/PD-L1-axisが関与している可能性が考えられている。そこで、我々は、B型肝炎慢性化に至るプロセスにHBV感染細胞から放出されるエクソソームを含むEVsが関与しているのではと仮定し、研究を行ってきた。

### HBV感染細胞由来EVsの機能

HBV感染細胞からは、エクソソームの他に、HBs抗原のみを持つ非感染性の中空粒子が多量に放出される。この中空粒子は、HBs抗体のデコイとして機能していると考えられているが、実際の機能は未知のままである。本稿では、エクソソーム、中空粒子、HBVビリオンを含めてEVsと表記する。まず我々は、HBV感染細胞由来EVsがどのような細胞に取り込まれるかを検索するため、ヒトの末梢血単核細胞 (Peripheral blood mononuclear cells: PBMCs) の培養上清に蛍光ラベルしたHBV感染細胞由来EVsを投与し24時間後にFACSで解析した。その結果、単球に選択的にEVsが取り込まれることが明らかとなった (図

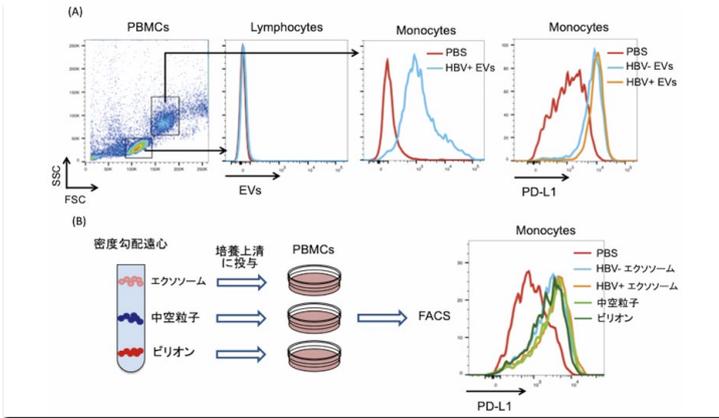


図 1.

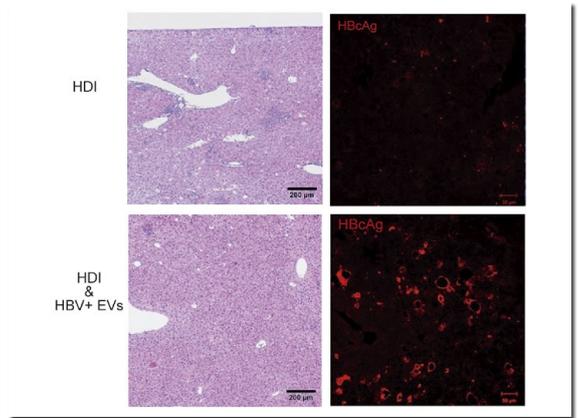


図 2.

1A)。さらに、EVsを取り込んだ単球では、PD-L1の発現が上昇し(図1A)、免疫細胞の活性化マーカーであるCD69の発現が減少した。次に、PD-L1とCD69の発現の増減に関与している粒子を特定するために、密度勾配遠心法を用いて、エクソソーム、中空粒子、HBVピリオンを分離し、それぞれの粒子をPBMCs培養上清に投与し24時間後にPD-L1の発現を確認した。その結果、すべての粒子でPD-L1の発現が上昇しCD69の発現が減少したが、特に、エクソソームと中空粒子がPD-L1の発現を上昇させ(図1B)CD69の発現を減少させた。以上のことから、HBV感染細胞由来のエクソソームと中空粒子は、取り込んだ単球に対して免疫抑制能を有している可能性が示唆された<sup>9)</sup>。

次に、*in vivo*においてもHBV感染細胞由来EVsが免疫抑制を誘導するかを調べるために、HBV感染マウスモデルを用いて検討した。マウス生体内で肝炎実験系を得るために、HBs抗原で3回免疫したマウスに野

生型HBVレプリコンプラスミドを、Hydrodynamic injection (HDI)法を用いて肝臓にトランスフェクションする。これより、HBV肝炎モデルが得られる。HDIをして2時間後にHBV感染細胞由来のEVsを尾静脈から投与し、3日後の肝臓における細胞浸潤とHBc抗原の発現を検索した。その結果、HBV感染細胞由来のEVsを投与しなかったマウスの肝臓では、多数の細胞浸潤が認められ、さらに、HBc抗原はほとんど確認できなかった(図2)。一方、HBV感染細胞由来のEVsを投与したマウスの肝臓では、細胞浸潤がほとんど確認できず、さらに、HBc抗原が多数認められた(図2)。以上の結果から、HBV感染細胞由来EVsが*in vivo*において免疫抑制を誘導することが示唆された。

### おわりに

発見された当初、エクソソームは不要なたんぱく質や核酸を細胞外に放出するための仕組みと考えられていた。ところ

が、今や、細胞間コミュニケーターとして機能し、様々な疾患の診断・治療のターゲットとして注目を集めている。本稿では、ウイルス感染細胞由来エクソソームの機能に関わるいくつかの報告を紹介したが、エクソソームはあらゆる生命現象に関与することが報告されている。多くの研究によりエクソソームの生物学的意義が明らかにされつつあるが、その作用機序や生成過程の詳細については、未解明の部分も多く残されている。我々の研究が今後のエクソソーム研究の一助となることを願う。

### 【参考文献】

- 1) Murk, J. L. *et al.* : *Semin. Cell Dev. Biol.*, **13** (4), 303 (2002).
- 2) Selzer, L. and Zlotnick, A. : *Cold Spring Harb. Perspect. Med.*, **5** (12), 0021394 (2015).
- 3) Nagashima, S. *et al.* : *J. Gen. Virol.*, **95**, 2166 (2014).
- 4) Campbell, T. D. *et al.* : *Ethn. Dis.*, **18** (2 Suppl 2), S2-14 (2008).
- 5) Arenaccio, C. *et al.* : *J. Virol.*, **88**, 11529 (2014).
- 6) Higuchi, H. *et al.* : *Blood*, **131** (23), 2552 (2018).
- 7) Huang, Z. Y. *et al.* : *Viral Immunol.*, **30** (3), 224 (2017).
- 8) Boni, C. *et al.* : *J. Virol.*, **81**, 4215 (2007).
- 9) Kakizaki, M. *et al.* : *PLoS One*, **13** (12), e0205886 (2018).

## エクソソーム関連キット

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	PS Capture™ Exosome ELISA Kit (Streptavidin HRP)	遺伝子研究用	10回用	80,000
298-80601	PS Capture™ Exosome ELISA Kit (Streptavidin HRP)	遺伝子研究用	96回用	58,000

詳細は当社HPをご覧ください。

エクソソーム 富士フイルム和光純薬

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、2019年7月時点での情報です。最新情報は、当社HPをご参照下さい。

## 特定悪臭物質アルデヒド類 6 種及び多成分測定に対応した HPLC 用カラムの開発

富士フイルム和光純薬株式会社 ケミカル開発本部 機能性材料研究所 久保田 守

悪臭は、人に不快感や嫌悪感を与えるにの総称で、騒音や振動と共に感覚公害と呼ばれる公害の一種です。悪臭防止法では、特定悪臭物質（現在 22 物質）及び臭気指数により排出規制を設けています。アルデヒド類は物質により刺激のかつ焦げたにおいを放ち、6 物質が特定悪臭物質に指定されています<sup>1,2)</sup>。同法においてこの 6 物質（表 1）の測定には、ガスクロマトグラフ（GC）法、ガスクロマトグラフ質量分析（GC/MS）法が定められていますが、2018 年 9 月に高速液体クロマトグラフ（HPLC）法が追加されました<sup>3)</sup>。

GC 法、GC/MS 法に対する HPLC 法のメリットは、試料前処理から測定までの操作として、

表 1. 特定悪臭物質のアルデヒド類 (6 物質)

1. アセトアルデヒド
2. プロピオンアルデヒド
3. ノルマルブチルアルデヒド
4. イソブチルアルデヒド
5. ノルマルバレールアルデヒド
6. イソバレールアルデヒド

1. イオン交換固相抽出カラムが不要
  2. 最終溶出液の溶媒転用が不要
- の 2 点が挙げられます。悪臭防止法の HPLC 法では分析カラムとして充てん剤の種類、カラムサイズが指定されておらず、6 物質の定量に適した分離性能を有するものと記載されています。また、HPLC メーカーから提供されている多くのアプリケーションでは逆相系 ODS (C18) カラムなどが用いられていますが、ノルマルブチルアルデヒド、イソブチルアルデヒドの分離が難しいとされています。

当社の HPLC 用カラム Wakopak<sup>®</sup> Wakosil<sup>®</sup>-DNPH は、2,4-ジニトロフェニルヒドラジン (DNPH) で誘導体化されたアルデヒド類を分離分析する専用カラムです。本品の特長、仕様を以下に示します。

### (特長)

1. カラム充てん剤は粒子径 5 μm 球状シリカゲルにトリアコンチル基を化学修飾
2. DNPH-*n*-ブチルアルデヒド、DNPH-*iso*-ブチルアルデヒドの分離に有効

3. 特定悪臭物質 6 種以外のアルデヒド類多成分一斉分析にも対応 ……16 種の一斉分析が可能\*  
(\* 16 種に DNPH-アセトンを含みます)

### (仕様)

1. カラムサイズ 4.6×250mm(D)、(W)
2. 特注カラムサイズの対応も可能
3. 2 種類の専用溶離液 A、B を用いたグラジエント溶出による測定  
専用溶離液 A、B はベースラインの変動、測定を妨害するピークの溶出を抑える効果があります。

Wakopak<sup>®</sup> Wakosil<sup>®</sup>-DNPH カラムによる 6 種、16 種混合標準液の測定例を図 1 と 2 に、16 種の再現性 (n=10) と検出限界を表 2 に示します。検量線は 16 種混合標準液の希釈液を 10 μL 注入することで、各成分 0 ~ 50ng の範囲で相関係数 (r) 0.999 の直線が得られました。また、Wakopak<sup>®</sup> Wakosil<sup>®</sup>-DNPH カラムを用いたグラジエント溶出法に対する ODS カラムでのイソクラティック溶出法の相関について、屋外大気中の①ホルムアルデヒド、②アセトアルデヒドの捕集、

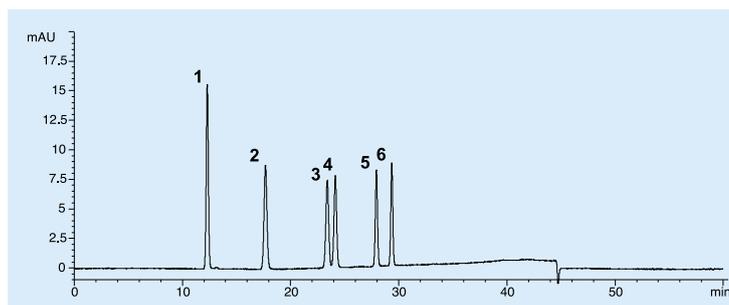


図 1. 6 種混合標準液のクロマトグラム

#### HPLC Conditions

**Column** : Wakopak<sup>®</sup> Wakosil<sup>®</sup>-DNPH, **Column size** : 4.6mm φ × 250mm, **Instruments** : Agilent 1100, **Eluent** : A ; Wakosil<sup>®</sup>-DNPH Eluent A, B ; Wakosil<sup>®</sup>-DNPH Eluent B, **Gradient** : High Press. gradient mode, 0-16min. B 10%, 16-35min. B 10-90%, 35-40min. B 90%, **Flow Rate** : 0.8mL/min at 35°C, **Detector** : UV360nm, **Inj. Vol.** : 10 μL, **Sample** : -2,4-DNPH/ 1. Acetaldehyde, 2. Propionaldehyde, 3. *iso*-Butyraldehyde, 4. *n*-Butyraldehyde, 5. *iso*-Valeraldehyde, 6. *n*-Valeraldehyde (each 0.625 μg/mL as aldehyde)

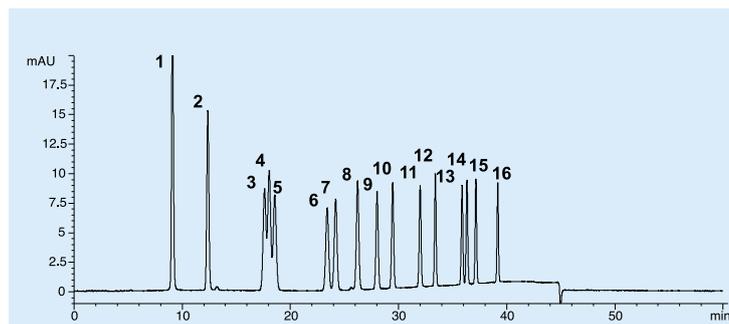


図 2. 16 種混合標準液のクロマトグラム

#### HPLC Conditions

**Column** : Wakopak<sup>®</sup> Wakosil<sup>®</sup>-DNPH, **Column size** : 4.6mm φ × 250mm, **Instruments** : Agilent 1100, **Eluent** : A ; Wakosil<sup>®</sup>-DNPH Eluent A, B ; Wakosil<sup>®</sup>-DNPH Eluent B, **Gradient** : High Press. gradient mode, 0-16min. B 10%, 16-35 min. B 10-90%, 35-40min. B 90%, **Flow Rate** : 0.8mL/min at 35°C, **Detector** : UV360nm, **Inj. Vol.** : 10 μL, **Sample** : -2,4-DNPH/ 1. Formaldehyde, 2. Acetaldehyde, 3. Propionaldehyde, 4. Acrolein, 5. Acetone, 6. *iso*-Butyraldehyde, 7. *n*-Butyraldehyde, 8. Crotonaldehyde, 9. *iso*-Valeraldehyde, 10. *n*-Valeraldehyde, 11. Benzaldehyde, 12. Hexaldehyde, 13. *o*-Tolualdehyde, 14. *m*-Tolualdehyde, 15. *p*-Tolualdehyde, 16. 2,5-Dimethylbenzaldehyde (each 0.625 μg/mL as aldehyde, ketone)

DNPH 誘導体化で、① r=0.999、② r=0.99 の良好な相関性を示しました。当社では上記のほかアルデヒド類測定用として、DNPH-アルデヒド類混合標準液（6種、16種）、アルデヒドの捕集及び DNPH 誘導体化が可能な試料捕集管 Presep®-C DNPH、Presep®-C DNPH (Short)、オゾン除去管 Presep®-C オゾンスクラバー、試料捕集管からの抽出用溶媒（アセトニトリル）を取揃えており、アルデヒド類を簡便に測定することができます。また、アルデヒド類を精度良く測定するための捕集から HPLC 測定までの操作ポイントを和光純薬時報のバックナンバーに収載しています。こちらを併せてご活用下さい。

#### （バックナンバー）

- 1) 和光純薬時報, Vol. 66, No. 4 (1998).
- 2) 和光純薬時報, Vol. 71, No. 4 (2003).
- 3) 和光純薬時報, Vol. 73, No. 1 (2005).
- 4) 和光純薬時報, Vol. 73, No. 2 (2005).

表2. Wakopak® Wakosil®-DNPH カラムによる 16 種の再現性と検出限界

成分名	変動係数(CV%*, n=10)			検出限界 pg(S/N=2)
	0.781ng**	6.250ng**	50.000ng**	
1. Formaldehyde	1.5	1.3	1.5	7.0
2. Acetaldehyde	1.8	1.2	1.5	9.8
3. Prpionaldehyde	1.5	1.4	1.6	15.6
4. Acrolein	1.2	1.2	1.7	14.2
5. Acetone	1.6	1.5	1.4	16.3
6. iso-Butyraldehyde	2.1	1.8	1.6	19.5
7. n-Butyraldehyde	1.9	1.3	1.5	18.6
8. Crotonaldehyde	1.4	1.3	1.4	13.9
9. iso-Valeraldehyde	2.1	1.2	1.7	17.0
10. n-Valeraldehyde	1.5	1.7	1.6	19.5
11. Hexaldehyde	1.6	1.2	1.5	15.0
12. Hexaldehyde	2.1	1.1	1.5	15.6
13. o-Tolualdehyde	1.3	1.4	1.8	17.7
14. m-Tolualdehyde	1.9	1.4	2.0	21.7
15. p-Tolualdehyde	1.8	1.3	1.6	21.2
16. 2,5-Dimethylbenzaldehyde	1.8	1.1	1.6	17.0

\*: CV%はピーク面積値より算出。測定条件は16種混合標準液のクロマトグラムに同じ。  
\*\*: 16種混合標準液を希釈した試料10μL中の各成分含有量。

#### 【参考資料】

- 1) 環境庁告示, 昭和47年5月30日, 9号, 特定悪臭物質の測定の方法 (1972).
- 2) 悪臭規制のあらまし: 鳥取県生活環境部水・大気環境課, 平成27年7月 (2015).

- 3) 環境省告示, 平成30年9月21日, 78号, 別表第4 (2018).

## Products

Wako

特定悪臭物質アルデヒド類6種のHPLC測定に使用頂けます。

コード No.	品名	タイプ	容量	希望納入価格(円)
<b>カラム</b>				
238-59411	Wakopak® Wakosil®-DNPH (4.6mm × 250mm)	D	1本	65,000
234-59413		W	1本	65,000
<b>溶離液</b>				
233-01611	Wakosil® DNPH Eluent A <span style="float:right">☐</span>	高速液体クロマトグラフ用	1L	5,000
230-01621	Wakosil® DNPH Eluent B <span style="float:right">☐III☐</span>	高速液体クロマトグラフ用	1L	1,500
<b>標準液</b>				
NEW 019-27811	6 Aldehydes-DNPH Mixture Standard Solution II <span style="float:right">☐II☐II☐</span> (each 0.1mg Aldehydes/mL Acetonitrile Solution)	悪臭物質試験 (HPLC) 用	2mL × 5A	16,000
<b>抽出用溶媒</b>				
011-17741	Acetonitrile <span style="float:right">☐II☐</span>	アルデヒド分析用	200mL	4,800

#### 関連商品

コード No.	品名	充てん量(g/個)	規格	容量	希望納入価格(円)
290-34251	Presep®-C DNPH <span style="float:right">☐Ref</span>	0.8	試料前処理用	20個	29,000
291-43951	Presep®-C DNPH (Short) <span style="float:right">☐Ref</span>	0.4	試料前処理用	20個	27,000
293-40351	Presep®-C Ozone Scrubber	1.3	試料前処理用	20個	13,500

☐Ref…2～10℃保存 ☐F…20℃保存 ☐80…80℃保存 ☐150…150℃保存 表示がない場合は室温保存です。その他の略号は、巻末をご参照下さい。掲載内容は、2019年7月時点での情報です。最新情報は、当社HPをご参照下さい。

## 核酸合成用

### 硫化剤 溶液タイプ

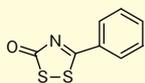
Wako

当社では、核酸の合成手法であるホスホロアミダイト法に使用する反応補助試薬を販売しています。この度、溶液タイプの硫化剤を追加しました。

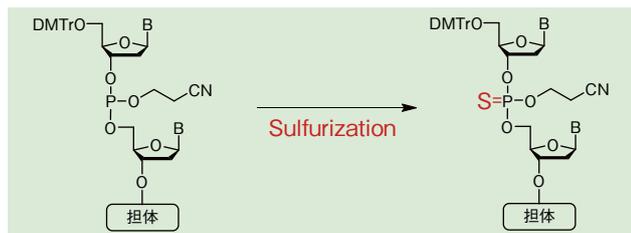
合成準備で手間となる用時調製や脱水処理が不要なため便利にお使い頂けます。

#### 特長

- 硫化剤（粉末）をアセトニトリルに溶かした溶液タイプ
- 水分値200ppm以下を保証
- 濃度は0.05 mol/Lと0.1 mol/Lの2種類



$C_8H_6NOS_2=195.26$   
CAS RN® 7047-10-1



コード No.	品名	規格	容量	希望納入価格(円)
199-18751	Sulfurizing Solution (0.05mol/L 5-Phenyl-3H-1,2,4-dithiazol-3-one, Acetonitrile Solution)	核酸合成用	100mL	18,000
192-18741	Sulfurizing Solution (0.1mol/L 5-Phenyl-3H-1,2,4-dithiazol-3-one, Acetonitrile Solution)	核酸合成用	100mL	20,000

粉末タイプも販売しています。当社 HP をご覧ください。  
試薬事業トップ→合成・材料→核酸合成→反応補助試薬→硫化試薬

<https://labchem-wako.fujifilm.com/jp/category/00163.html>

#### 関連商品

DNA/RNA合成機\*に直結可能

NIS 日本テクノサービス株式会社  
NIHON TECHNO SERVICE CO., LTD

#### ボトルキャップ

コード No.	メーカーコード	品名	容量	希望納入価格(円)
対応容器 100mL				
632-44521	M2P-RCFSET	F-Wako Bottle Cap Set for Reaction Reagent (アウター、インナー、O-リング、ガス・試薬ラインのセット)	1セット	32,000
638-44501	M2P-RCFIN	F-Wako Bottle Cap (Inner Side) for Reaction Reagent	1個	12,000
635-44511	M2P-RCFOUT	F-Wako Bottle Cap (Outer Side) for Reaction Reagent	1個	7,000
635-44491	M2P-RCF-OL	F-Wako Bottle Oring for Reaction Reagent	1個	3,500

コード No.	メーカーコード	品名	容量	希望納入価格(円)
対応容器 100mL・3L				
639-44531	M2P-RPLSET	Portline Set for Reaction Reagent (ガス・試薬ラインのセット)	1セット	10,000

インナー・アウターの材質はPEEK(ポリエーテルエーテルケトン樹脂)です。  
\*日本テクノサービス社製のDNA/RNA合成機専用です。  
詳細は当社HPをご覧ください。試薬事業トップ→合成・材料→核酸合成→消耗品・実験関連器具

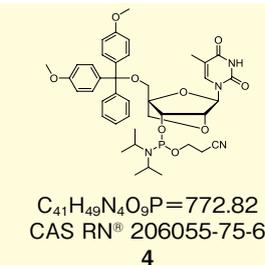
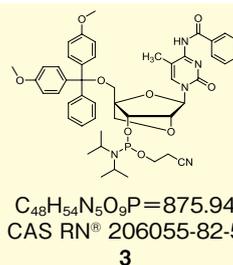
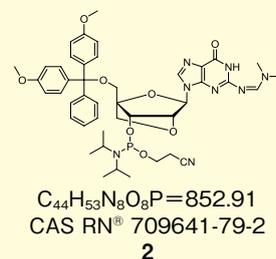
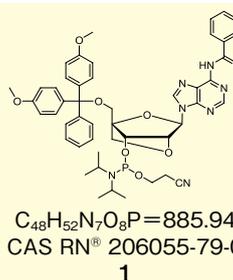
## 特殊アミダイト

### 架橋型人工核酸

Wako

本品は、リボース環の2'と4'が架橋した構造を持つ、架橋型人工核酸(Locked Nucleic Acid)です。この架橋型人工核酸を含むオリゴヌクレオチドはヌクレアーゼ(核酸分解酵素)耐性を示すため核酸医薬品への応用が期待されています。

この度、水分値200ppm以下を保証した架橋型人工核酸を発売しました。核酸医薬の合成検討にご使用下さい。



No.	コード No.	品名	規格	容量	希望納入価格(円)
1	128-06771	Locked Nucleic Acid-A (Bz) Cyanoethyl Phosphoramidite (mixture of isomers)	核酸合成用	1g	30,000
2	125-06781	Locked Nucleic Acid-G (DMF) Cyanoethyl Phosphoramidite (mixture of isomers)	核酸合成用	1g	30,000
3	122-06791	Locked Nucleic Acid-mC (Bz) Cyanoethyl Phosphoramidite (mixture of isomers)	核酸合成用	1g	30,000
4	125-06801	Locked Nucleic Acid-T Cyanoethyl Phosphoramidite (mixture of isomers)	核酸合成用	1g	30,000

☐: 2~10℃保存    ☐: 20℃保存    ☐: 80℃保存    ☐: 150℃保存    表示がない場合は室温保存です。その他の略号は、巻末をご参照下さい。  
掲載内容は、2019年7月時点での情報です。最新情報は、当社HPをご参照下さい。

## アルツハイマー病研究に

### りん酸化Tau T181 ELISAキットワーク

Wako

本品は、181番目のスレオニン（T181）がリン酸化されたTauを簡便に測定できるELISAキットです。

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

#### 特長

- 少量検体で測定可能
- 高感度

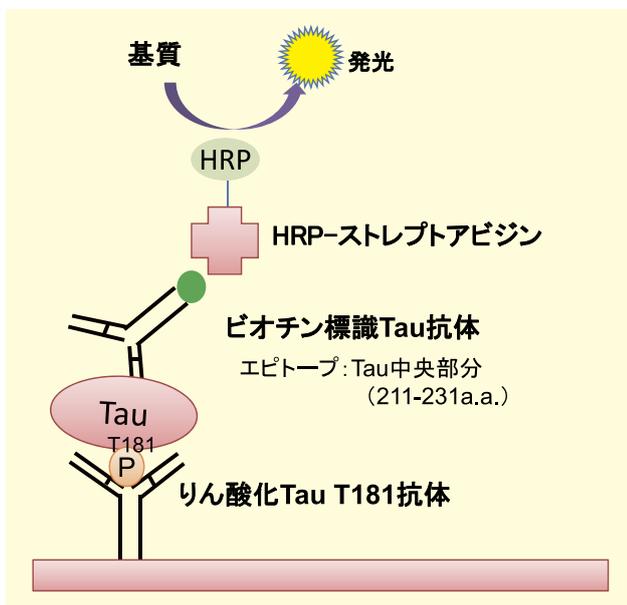
#### 性能

検量線範囲	4.4 ~ 500pg/mL
特異性	りん酸化 Tau T181
検体*	ヒト脳脊髄液 (CSF)
検体量	20μL
測定時間	約 20 時間
検出系	発光系**

\*血漿、血清サンプルの測定不可

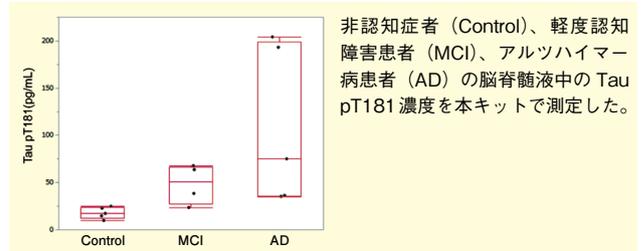
\*\*測定には発光プレートリーダーが必要

#### 測定原理



#### 測定例

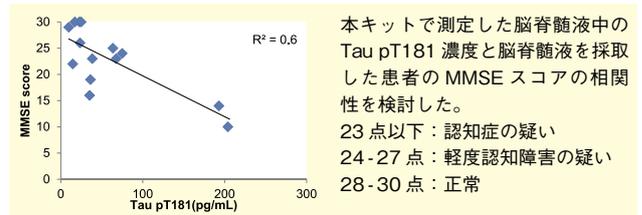
##### ヒト脳脊髄液での測定



非認知症者 (Control)、軽度認知障害患者 (MCI)、アルツハイマー病患者 (AD) の脳脊髄液中の Tau pT181 濃度を本キットで測定した。

非認知症者 (Control)、軽度認知障害患者 (MCI)、アルツハイマー病患者 (AD) の間で有意差が見られた。

##### MMSEとの相関性



本キットで測定した脳脊髄液中の Tau pT181 濃度と脳脊髄液を採取した患者の MMSE スコアの相関性を検討した。

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

Tau pT181 の濃度と MMSE スコアに相関が見られた。

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

#### 関連商品

コード No.	品名	規格	容量	希望納入価格 (円)
<b>Tau抗体</b>				
011-26891	Anti Human/Mouse/Rat Tau, Rat Monoclonal Antibody (RTM38)	免疫化学用	10μL	10,000
017-26893	Anti Human/Mouse/Rat Tau, Rat Monoclonal Antibody (RTM38)	免疫化学用	50μL	35,000
019-26951	Anti Human Tau, Rat Monoclonal Antibody (RTM49)	免疫化学用	10μL	10,000
015-26953	Anti Human Tau, Rat Monoclonal Antibody (RTM49)	免疫化学用	50μL	35,000
016-26961	Anti Mouse Tau, Rat Monoclonal Antibody (RTM47)	免疫化学用	10μL	10,000
012-26963	Anti Mouse Tau, Rat Monoclonal Antibody (RTM47)	免疫化学用	50μL	35,000
017-27351	Anti 2N-Tau, Rat Monoclonal Antibody (2C2)	免疫化学用	10μL	10,000
013-27353	Anti 2N-Tau, Rat Monoclonal Antibody (2C2)	免疫化学用	50μL	30,000
012-26583	Anti 3R-Tau, Rat Monoclonal Antibody (2A1-1F4)	免疫化学用	10μL	10,000
016-26581	Anti 3R-Tau, Rat Monoclonal Antibody (2A1-1F4)	免疫化学用	50μL	30,000
019-26593	Anti 4R-Tau, Monoclonal Antibody (3E8-1A6)	免疫化学用	10μL	10,000
013-26591	Anti 4R-Tau, Monoclonal Antibody (3E8-1A6)	免疫化学用	50μL	30,000
012-26603	Anti Phosphorylated Tau T181, Rat Monoclonal Antibody (2E2-A6)	免疫化学用	10μL	10,000
016-26601	Anti Phosphorylated Tau T181, Rat Monoclonal Antibody (2E2-A6)	免疫化学用	50μL	30,000
019-26613	Anti Phosphorylated Tau S199, Rat Monoclonal Antibody (5B8-1E2)	免疫化学用	10μL	10,000
013-26611	Anti Phosphorylated Tau S199, Rat Monoclonal Antibody (5B8-1E2)	免疫化学用	50μL	30,000
014-27121	Anti Phosphorylated Tau S262, Rat Monoclonal Antibody (TIP1-35)	免疫化学用	10μL	10,000
010-27123	Anti Phosphorylated Tau S262, Rat Monoclonal Antibody (TIP1-35)	免疫化学用	50μL	35,000
016-27681	Anti Phosphorylated Tau S422, Monoclonal Antibody (AP422)	免疫化学用	10μL	12,000
012-27683	Anti Phosphorylated Tau S422, Monoclonal Antibody (AP422)	免疫化学用	50μL	50,000
<b>Aβオリゴマー ELISAキット</b>				
298-80101	High Molecular Amyloid β Oligomer ELISA Kit Wako	免疫化学用	96回用	98,000

Ref... 2 ~ 10°C 保存    F... 20°C 保存    30... 80°C 保存    35... 150°C 保存    表示がない場合は室温保存です。その他の略号は、巻末をご参照下さい。掲載内容は、2019年7月時点での情報です。最新情報は、当社HPをご参照下さい。

## 生体内深部イメージングを実現

### アカルミネ® 塩酸塩

Wako

本品は、670nm～680nmに発光ピークをもつルシフェリンアナログです。水、ヘモグロビンの吸収を受けにくい生体の窓に発光ピークをもつため生体深部の *in vivo* イメージングに適しています。

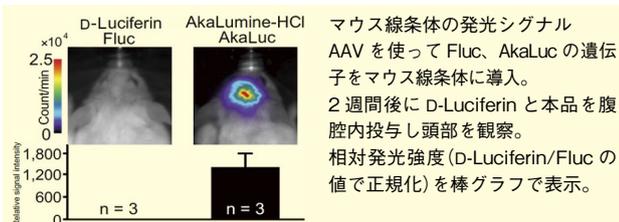
人工生物発光システム「AkaBLI」は、理化学研究所の宮脇敦史先生、岩野智先生らによって開発された新規生物発光システムです。AkaBLIは人工基質 AkaLumine-HCl と人工酵素 AkaLuc から構成されており、本システムを用いると深部からの発光シグナルを従来のシステムと比べ100倍～1,000倍の強さで検出可能です。ぜひ、イメージング実験の際にご活用下さい。

AkaLumine-HClは使用条件により、非特異的にバックグラウンドが生じる場合がありますので、ご注意下さい。

### 特長

- 近赤外発光基質：λ max 675nm
- 水・ヘモグロビンの吸収を受けにくく、*in vivo* イメージングに最適
- 従来品の AkaLumine よりも50倍以上の高い溶解性

### AkaBLIを用いたアプリケーション例



(データご提供：国立研究開発法人理化学研究所脳神経科学研究センター 細胞機能探索技術研究チーム 岩野智先生、宮脇敦史先生)

### 【参考文献】

- 1) Iwano, S. et al.: *Tetrahedron*, **69**, 3847 (2013).
- 2) Kuchimaru, T. et al.: *Nat. Commun.*, **7**, 11856 (2016).
- 3) Iwano, S. et al.: *Science*, **359**, 935 (2018).

コード No.	品名	規格	容量	希望納入価格 (円)
012-26701	AkaLumine <i>n</i> -Hydrochloride (AkaLumine-HCl)	F <sup>0</sup> 生化学用	1 mg	8,800
018-26703			10 mg	22,000
016-26704			50 mg	98,000
012-26706			1 g	照会

大入り包装がラインアップに加わりました。

### 関連商品

コード No.	品名	規格	容量	希望納入価格 (円)
035-22991	Coelenterazine h	F <sup>0</sup> 生化学用	1 mg	10,500
031-22993			10 mg	80,000
039-22994			50 mg	照会
035-22996			100 mg	照会

アカルミネ Wako

検索

## 医薬品製造用原料～日本薬局方、局外規、薬添規、その他～

Wako

### CertiPro シリーズ

本シリーズは、医薬品の製造工程に使用可能な製造用原料として、原薬 GMP ガイドラインに基づき生産しています。品質リスクアセスメントに対応し適切にレギュレーション管理された原料として提供しています。また、残留溶媒に関する証明書及び元素不純物に関する情報提供にも対応しています (一部有償)。

この度、日本薬局方第17改正第一追補に新規掲載された精製ブドウ糖を CertiPro シリーズとして新しくラインアップしました。精製ブドウ糖は、三薬局方での調和合意に基づき規定した医薬品として新しく日本薬局方に追加されました。

### 特長

- GMP管理を実施
- エンドトキシン試験を実施
- USP、Ph. Eur.の最新版管理
- ご要望により微生物限度試験が実施可能 (有償)

コード No.	品名	規格	規格適合		エンドキシン試験	微生物限度試験	容量
			USP	Ph.Eur.			
194-18505	塩化ナトリウム「製造専用」 <sup>Ⓢ</sup>	JP 国	○	○	3.1EU/g 未済	—	500g 10kg
032-25245	クエン酸水和物「製造専用」 <sup>Ⓢ</sup>	JP 国	○	○	8EU/g 未済	—	500g 10kg
038-25247	水酸化ナトリウム「製造専用」 <sup>Ⓢ</sup>	JP 国	○	○	10EU/g 未済	—	500g 10kg
190-18465	炭酸水素ナトリウム「製造専用」 <sup>Ⓢ</sup>	JP 国	○	○	10EU/g 未済	—	500g 10kg
197-18475	乾燥炭酸ナトリウム「製造専用」 <sup>Ⓢ</sup>	JP 国	—	○	10EU/g 未済	—	500g 10kg
193-18477	乾燥炭酸ナトリウム「製造専用」 <sup>Ⓢ</sup>	JP 国	—	—	10EU/g 未済	—	500g 10kg
049-34345	乳糖水和物「製造専用」 <sup>Ⓢ</sup>	JP 国	—	—	25EU/g 未済	○	500g
121-06685	精製白糖「製造専用」 <sup>Ⓢ</sup>	JP 国	○	○	10EU/g 未済	—	500g 10kg
198-18385	精製ブドウ糖「製造専用」 <sup>Ⓢ</sup>	JP 三薬局方調和 国	—	—	2EU/g 未済	—	500g 10kg
194-18387							
168-28515	硫酸マグネシウム水和物「製造専用」 <sup>Ⓢ</sup>	JP 国	—	—	10EU/g 未済	—	500g
164-28517							
130-18925	リン酸水素ナトリウム水和物「製造専用」 <sup>Ⓢ</sup>	JP 国	○	○	0.2EU/g 未済	—	500g 10kg
047-34385	リン酸二水素ナトリウム水和物	JP 国	○	○	2.0EU/g 未済	—	500g 10kg
043-34387							
191-18495	リン酸二水素ナトリウム水和物	薬添規	○	○	2.0EU/g 未済	—	500g 10kg
197-18497							

価格及び大容量の見積もり、その他品目につきましては、当社担当営業までお問合せ下さい。

※ USP、Ph. Eur. の注射用、透析用、輸血用の規格項目については適用除外となっています。ご要望によりオプション試験を承ります (有償)。

Ⓢ…医薬品：ご購入には、製造専用の医薬品販売時の確認書が必要です。

## エンドトキシン検出用試薬

### リムルス ES- IIシリーズ

Wako

エンドトキシン試験には、カプトガニの血球抽出物から作られるライセート試薬を使用します。試料中にエンドトキシンが含まれる場合、いずれもセリンプロテアーゼ前駆体である Factor C、Factor B、Proclotting enzyme が順次、増幅活性化されていきます。最終的に Coagulogen が水解されて Coagulin となり、不溶性のゲルが形成されます。しかし、試料中に (1→3)-β-D-グルカンが含まれる場合、Factor G の活性化により、同様の反応が生じます。

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

この度、新たに表示感度 0.03EU/mL の製品と新容量を追加しました。

### 特長

- 検体中の (1→3)-β-D-グルカンの影響を受けることなく、エンドトキシンを特異的に検出可能
- 日本薬局方記載「エンドトキシン試験法」に適合したキット及び試薬
- 日本薬局方標準エンドトキシン (JP-RSE) によるゲル化感度検定力価 (EU/mL) を表示
- トキシノメーター<sup>®</sup>による比濁法で表示感度 (ゲル化感度) より高感度な検出が可能  
(表示感度 0.03 の場合) 0.01EU/mL より測定可能  
(表示感度 0.015 の場合) 0.0078EU/mL より測定可能
- 測定試料の pH の影響を受けにくいいため、安定したエンドトキシン測定が可能

### シングルテスト

コード No.	品名	CSE <sup>®</sup>	表示感度 (EU/mL)	規格	容量	希望納入価格 (円)
295-51301	Limulus ES-II Single Test wako	○	0.015	エンドトキシン検出用	25回用	35,000

### マルチテスト

コード No.	品名	CSE <sup>®</sup>	表示感度 (EU/mL)	規格	容量	希望納入価格 (円)
299-51201	Limulus ES-II Test wako	○	0.015	エンドトキシン検出用	60回用 (2mL用×3本)	37,000
298-81201	Limulus ES-II Test wako 0.03	○	0.03	エンドトキシン検出用	50回用 (5.2mL用×1本)	31,000
290-51214	Limulus Amebocyte Lysate ES-II, Lyophilized	—	0.015	エンドトキシン検出用	50回用 (5.2mL用×1本)	29,000
292-51213	Limulus Amebocyte Lysate ES-II, Lyophilized	—	0.015	エンドトキシン検出用	100回用 (2mL用×5本)	58,000
293-35841	Limulus Amebocyte Lysate ES-II, Lyophilized 0.03	—	0.03	エンドトキシン検出用	50回用 (5.2mL用×1本)	26,000

※ CSE : Control Standard Endotoxin

## ペプチドグリカン、β-グルカン検出用試薬

### SLP-HS シングル試薬セットII

Wako

本品は、カイコの体液を無菌的に採取・調製したフェノール酸化酵素前駆体 (ProPO) カスケードの因子をすべて含んだ凍結乾燥品です。ペプチドグリカン (PG) 及び β-グルカンによって活性化され、セット中の基質剤に含まれる DOPA (L-3,4 ジヒドロキシフェルアラニン) を酸化し、メラニン色素を生成します。PG はほとんどの細菌の細胞壁に、また β-グルカンも多くの真菌の細胞壁に認められる成分であることから、生成したメラニン色素を指標とし、微生物全般の検出が可能です。医薬品や生物製剤などの菌体成分混入の検出にご利用頂けます。

### 特長

- トキシノメーター<sup>®</sup>を用いることにより、高感度にペプチドグリカン及び β-グルカンの定量が可能

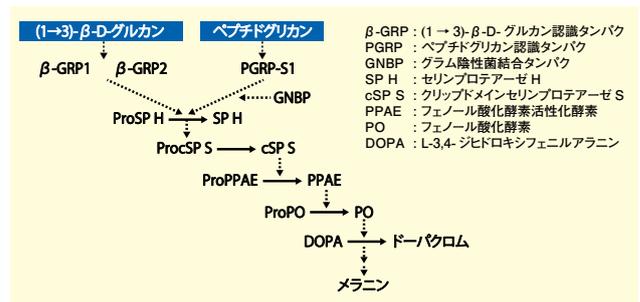


図1. カイコ血液のフェノール酸化酵素前駆体カスケード

### キット内容

- SLP-HS<sup>※1</sup> Reagent II  
[感度: 10pg/mL (PG)]…………… 0.1mL 用 × 20 バイアル
- SLP-Diluent …………… 5mL × 2 バイアル
- Standard (Digested Peptidoglycan from *S. aureus*)  
…………… 0.5mL × 1 バイアル

※ 1 : Silkworm Larvae Plasma High Sensitive

コード No.	品名	規格	容量	希望納入価格 (円)
296-81001	SLP-HS Single Reagent Set II	微生物検出用	20回用	照会

### 関連商品

コード No.	品名	規格	容量	希望納入価格 (円)
030-09903	Curdlan <sup>※2</sup>	生化学用	1g	2,000

※ 2 : (1→3)-β-D-グルカン

Wako LAL システムでは、エンドトキシンのお役立ち情報や、関連製品を多数掲載しております。是非ご活用ください。

Wako LAL システム

検索

Ref<sup>®</sup>…2~10℃保存 F…-20℃保存 S…-80℃保存 IS…-150℃保存 表示がない場合は室温保存です。その他の略号は、巻末をご参照下さい。  
 掲載内容は、2019年7月時点での情報です。最新情報は、当社HPをご参照下さい。

## 不純物確認試験や定量試験に最適な重溶媒

Wako

### 高純度 NMR 溶媒

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

<sup>\*</sup>ベースラインとの強度差が 30% 以上のシグナル。

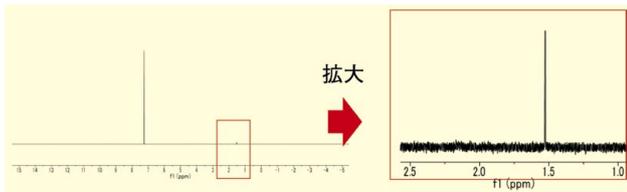
### ■ クロロホルム-d<sub>2</sub> 99.8% (高純度)

#### 製品規格

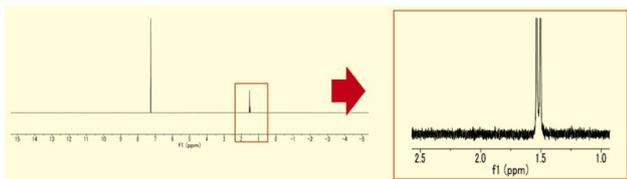
試験項目	規格値
外 観	無色透明の液体
水 分	0.003%以下
重水素化率	99.8%以上
含量 (GC)	99.9%以上
不純物 (NMR) ( <sup>1</sup> H)	試験適合
不純物 (NMR) ( <sup>13</sup> C)	試験適合
不純物 (NMR) ( <sup>31</sup> P)	試験適合
不純物 (NMR) ( <sup>19</sup> F)	試験適合

#### <sup>1</sup>H NMR チャート例

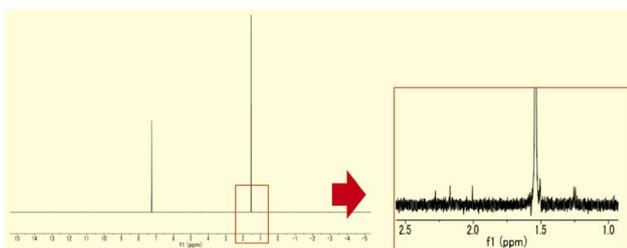
当社高純度 NMR 溶媒



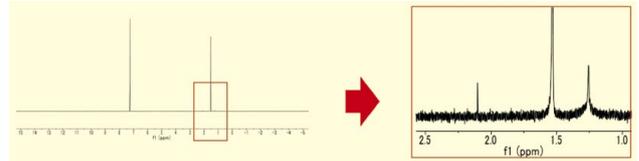
A 社品



B 社品



C 社品



#### 〈各社比較表〉

	当社高純度 NMR 溶媒		A 社品	
	実測値	規 格	実測値	規 格
水 分	0.000% (0.00015%)	0.003%以下	0.005%	0.02%以下
含量 (GC)	100%	99.9%以上	100%	—
不純物 (NMR) ( <sup>1</sup> H)	試験適合		備考: 1.49ppm 付近(水分)由来のシグナルが大きい	
	B 社品		C 社品	
	実測値	規 格	実測値	規 格
水 分	0.0013%	0.01%以下	0.0015%	0.01%以下
含量 (GC)	100%	99%以上	100%	99%以上
不純物 (NMR) ( <sup>1</sup> H)	備考: 1.24、1.51、2.00、2.16、2.27ppm 付近に不純物ピークを確認		備考: 1.25、1.51、2.10 ppm 付近に不純物ピークを確認	

コード No.	品 名	規 格	容 量	希望納入価格 (円)
NEW 044-34471	Deuterium Oxide, 99.8% (High purity)	NMR用	1mL×5A	照 会
NEW 031-25531	Chloroform-d <sub>2</sub> , 99.8% (High purity) <sup>Ref</sup> <sup>III</sup>	NMR用	1mL×5A	20,000
NEW 040-34571	Dichloromethane-d <sub>2</sub> , 99.8% (High purity)	NMR用	1mL×5A	照 会

品目は順次追加予定です。

## 追加品目のお知らせ

### ポジティブリスト関連農薬標準品

Wako

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

#### 農薬標準品

- ブロフェジン標準品
- ファモキサドン標準品
- クマホス標準品
- ピラゾキシフェン標準品
- ピリメタニル標準品
- テフルベンズロン標準品

コード No.	品 名	規 格	容 量	希望納入価格 (円)
NEW 022-08264	Bupropion Standard <sup>Ref</sup>	残留農薬試験用	100mg	7,000
NEW 033-16463	Coumaphos Standard <sup>Ref</sup>	残留農薬試験用	100mg	18,000
NEW 064-04203	Famoxadone Standard <sup>Ref</sup>	残留農薬試験用	100mg	20,000
NEW 164-16743	Pyrazoxyfen Standard <sup>Ref</sup>	残留農薬試験用	100mg	13,000
NEW 164-21753	Pyrimethanil Standard <sup>Ref</sup>	残留農薬試験用	100mg	17,000
NEW 204-12373	Teflubenzuron Standard <sup>Ref</sup>	残留農薬試験用	100mg	13,000

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

試薬事業 トップ → 製品情報 → 分析 → 食の安全・安心 → 残留農薬分析 (標準品) → ポジティブリスト制度 関連試薬 取扱い標準品一覧  
<https://labchem-wako.fujifilm.com/jp/category/00370.html>

<sup>Ref</sup>…2 ~ 10℃保存    <sup>F</sup>…-20℃保存    <sup>30</sup>…-80℃保存    <sup>150</sup>…-150℃保存    表示がない場合は室温保存です。その他の略号は、巻末をご参照下さい。  
 掲載内容は、2019年7月時点での情報です。最新情報は、当社 HP をご参照下さい。

## ADRA 専用カラム

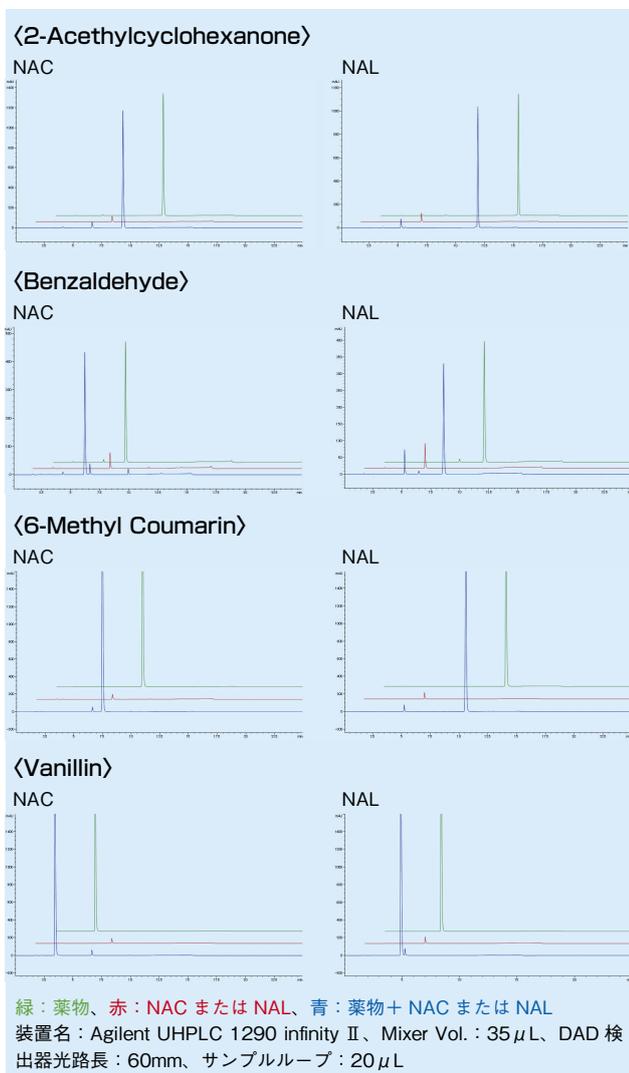
### ワコーパック® コア C18 ADRA

Wako

本品は、ADRA（皮膚感作性試験の動物実験代替法 OECD TG442C）の分析に最適な、粒子径 2.6 μm のコアシェル型充てん剤を使用した専用カラムです。

#### 分析例

各種化合物と求核試薬の NAC・NAL、また、化合物と NAC・NAL の反応物それぞれの分離能を示します。



コード No.	品名	容量	希望納入価格 (円)
233-63991	Wakopak® Core C18 ADRA φ3.0mm×150mm	1本	98,000

#### 関連商品

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

## トランス-1, 2-ジクロロエチレンを追加

### 14 種揮発性有機化合物混合標準液

Wako

平成 31 年 4 月 1 日より土壤汚染対策法施行令の一部を改正する政令に伴い第 1 種特定有害物質（揮発性有機化合物）にトランス-1, 2-ジクロロエチレンが追加され、土壤汚染調査対象物質となりました。

従来より「13 種揮発性有機化合物混合標準液」をご提供しておりましたが、今回の改正を受け、「トランス-1, 2-ジクロロエチレン」を加えた「14 種揮発性有機化合物標準液」を発売しました。

#### 第 1 種特定有害物質（揮発性有機化合物）

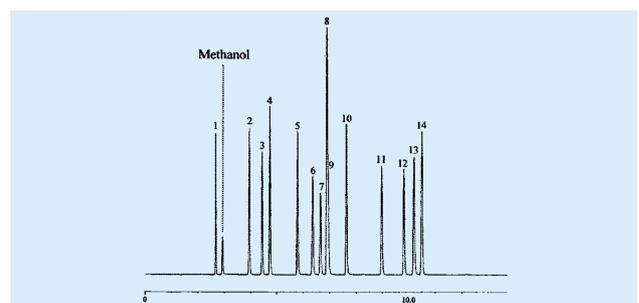
クロロエチレン	ジクロロメタン
四塩化炭素	テトラクロロエチレン
1,2-ジクロロエタン	1,1,1-トリクロロエタン
1,1-ジクロロエチレン	1,1,2-トリクロロエタン
トランス-1,2-ジクロロエチレン	トリクロロエチレン
シス-1,2-ジクロロエチレン	ベンゼン
1,3-ジクロロプロペン*	

※「1,3-ジクロロプロペン」について、当社商品では *cis* 体、*trans* 体を区別しているため 14 種となります。

#### 特長

- 「トランス-1, 2-ジクロロエチレン」を含む 14 種混合標準液
- 第 1 種特定有害物質（揮発性有機化合物）の混合標準液の原液として使用可能

#### 分析例



(GC 分析条件)  
装置：Shimadzu QP-2010Plus  
カラム：SGE 社製 BP624 長さ 60m 内径 0.32mm 液相膜厚 1.8 μm  
カラム温度：50 °C (2 分保持) → 10 °C/min → 100 °C → 5 °C/min → 130 °C → 10 °C/min → 190 °C (5 分保持)  
キャリアガス：He 1.7mL/min  
注入方法：スプリット比 1/100  
注入量：1 μL

Peak No.	成分名	Peak No.	成分名
1	Chloroethylene (Vinyl Chloride)	8	Benzene
2	1,1-Dichloroethylene	9	1,2-Dichloroethane
3	Dichloromethane	10	Trichloroethylene
4	trans-1,2-Dichloroethylene	11	cis-1,3-Dichloropropene
5	cis-1,2-Dichloroethylene	12	trans-1,3-Dichloropropene
6	1,1,1-Trichloroethane	13	1,1,2-Trichloroethane
7	Carbon Tetrachloride	14	Tetrachloroethylene

コード No.	品名	規格	容量	希望納入価格 (円)
220-02421	14 VOC Mixture Standard Solution (each 1mg/mL Methanol Solution)	環境省 国土汚染物質測定用	2mL×5A	35,000

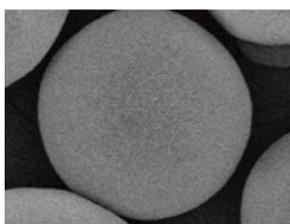
Refr... 2 ~ 10°C 保存 F... -20°C 保存 80... -80°C 保存 150... -150°C 保存 表示がない場合は室温保存です。その他の略号は、巻末をご参照下さい。  
掲載内容は、2019 年 7 月時点での情報です。最新情報は、当社 HP をご参照下さい。

## 抗体分子精製用アフィニティークロマトグラフィーレジン

### KANEKA KanCap™

Wako

本品は、独自の組換えリガンドと革新的な高架橋セルロースビーズを組合せた抗体分子精製用アフィニティークロマトグラフィーレジンです。生体試料や細胞培養上清から、免疫グロブリン、一本鎖抗体 (scFV)、F(ab')<sub>1</sub>、及び F(ab')<sub>2</sub> などの幅広い抗体フラグメントを精製することができます。



高架橋セルロースビーズ

### KanCapA™ (変型型プロテインA)

- アルカリ耐性
- マイルドな pH 範囲で溶出可能 (例: pH 3.5)
- 高い動的結合容量:  $\geq 35$  mg IgG/mL
- スケールアップが容易
- 再利用可能

### KanCapA™ 3G (変型型プロテインA)

- アルカリ耐性
- よりマイルドな pH 範囲で溶出可能 (例: pH 4.2)
- 高い動的結合容量:  $\geq 58$  mg IgG/mL
- 優れた不純物除去特性
- スケールアップが容易
- 再利用可能

### KanCap™ G (変型型プロテインG)

- CH1 領域や Fc 領域を含む抗体分子に対する高結合容量
- 抗体分子の高い回収率

### KanCap™ L (変型型プロテインL)

- $\kappa$  軽鎖を含む抗体分子に対する高結合容量
- $\kappa$  軽鎖を含む抗体分子に対する広い結合スペクトル

コード No.	品名	規格	容量	希望納入価格 (円)
114-01071	KANEKA KanCapA™	遺伝子研究用	2mL (net 1mL)	10,000
110-01073			10mL (net 5mL)	40,000
118-01074			50mL (net 25mL)	150,000
111-01081	KANEKA KanCapA™ Prepacked Column	遺伝子研究用	1mL	22,000
117-01083			5mL	60,000
115-01084			5mL×5	240,000

コード No.	品名	規格	容量	希望納入価格 (円)
111-01101	KANEKA KanCapA™ 3G Prepacked Column	遺伝子研究用	1mL	22,000
117-01103			5mL	67,000
115-01104			5mL×5	268,000
115-01121	KANEKA KanCap™ G Prepacked Column	遺伝子研究用	1mL	23,000
111-01123			5mL	65,000
119-01124			5mL×5	275,000
118-01111	KANEKA KanCap™ L Prepacked Column	遺伝子研究用	1mL	22,000
114-01113			5mL	67,000
112-01114			5mL×5	280,000

KanCap, KanCapA は (株) カネカの商標または登録商標です。製品に関する詳細は当社 HP をご覧下さい。

富士フィルム和光純薬 KanCap

検索

## メール会員 募集中!!

Wako

新製品情報やお得なキャンペーン情報、さらに、法規制改正に関する情報や、ワークショップなどの情報をお届けします!

特に、法規制に関する情報は、改正内容だけでなく、当社の対象製品もあわせて案内しており、皆様にご好評頂いています。

### 配信例

<https://labchem-wako.fujifilm.com/jp/melmaga/about.html>

(既にご登録いただいている方の登録内容変更も、上記 URL より可能です。)

富士フィルム和光純薬 メルマガ

検索

### バックナンバー

<https://labchem-wako.fujifilm.com/jp/melmaga/>

から、ご覧いただけます。

### siyaku.blog

研究の最前線、テクニカルレポート、実験のコツなどを幅広く紹介しています。

<https://labchem-wako.fujifilm.com/jp/siyaku-blog/>

Refrigerated (2~10°C), Cold (20°C), Chilled (80°C), Frozen (-150°C) storage conditions. If no symbol is shown, it is room temperature storage. For other abbreviations, please refer to the back cover. The content is as of July 2019. For the latest information, please refer to our website.

## 大容量データを低コストで安全に保管する磁気テープ+HDDストレージ

**FUJIFILM**  
Value from Innovation

### ディターニティ オンサイトアーカイブシステム

本品は、大容量データの長期保管（アーカイブ）に最適な磁気テープとHDDを組合せたハイブリッドストレージです。

次世代シーケンサーやハイスループット細胞イメージングシステムなど、実験機器の精度向上により生み出される膨大な量のデータの安全な長期保管方法として注目されています。

#### 特長

- 研究データなど、何十年と長期保管が必要な大容量データのアーカイブに有効
- データの利用頻度に応じて最適な保管先を自動選択
- 管理者用画面でポリシーを簡単設定(スタンダードモデル)
- 磁気テープに保管されたデータも、HDDと同じ感覚でアクセス可能



管理者とユーザーの画面イメージ

### ディターニティオンサイトアーカイブ

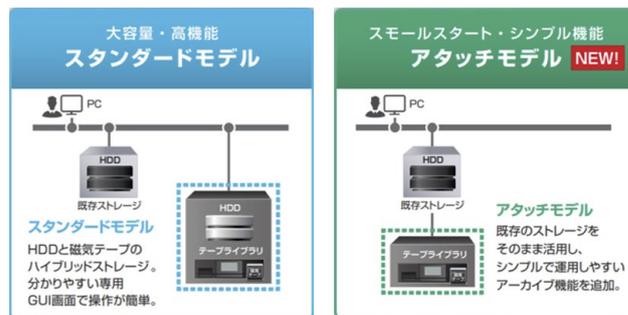
富士フイルム（株）は磁気テープの開発に加え、磁気テープとHDDを組合せてストレージコストの抑制と高い利便性を両立する「ディターニティ」を商品化しました。

ディターニティの機能として、利用頻度の低い長期保管データは磁気テープに、利用頻度の高いデータはHDDに、ポリシーに基づいて最適な保管先を自動で選択可能です。



ディターニティのシステム概要図

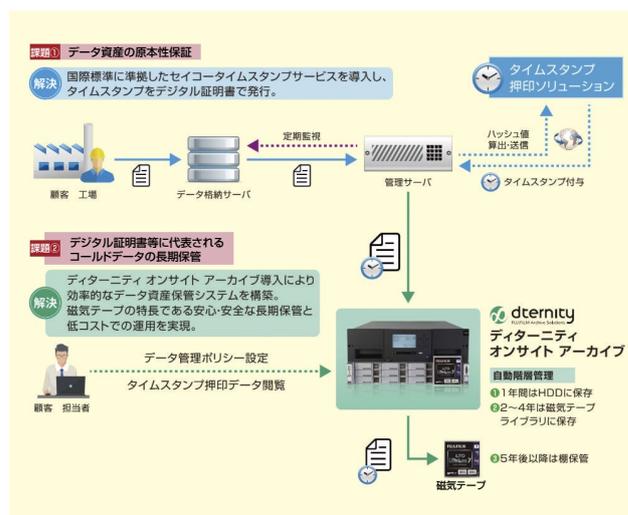
本年7月から、従来の「スタンダードモデル」に加え、「アタッチモデル」の販売を開始します。アタッチモデルはユーザーの既存ストレージに磁気テープを組合せるシンプルな構成でアーカイブ機能を提供します。



スタンダードモデルとアタッチモデルのイメージ図

### システム導入事例

製造業で、40年以上製品の品質保証データの原本性を担保する導入事例です。国際標準に準拠した電子的に認証された「タイムスタンプ」をデジタル証明書として発行することで、データの生成時期や内容に改ざんなどが生じていないことを示すことが可能となりました。タイムスタンプは、データインテグリティの観点で「医療・製薬業界の研究データや論文の保管への展開」が期待されています。



品質・保守データアーカイブのシステム構成  
※アタッチモデルとの組合せは、現在検証中

コードNo.	品名	容量	希望納入価格(円)
—	dternity on site archive system standard model (保守費、設置費は含まれません。)	一式	18,820,000
—	dternity on site archive system attach model	一式	12,920,000

タイムスタンプオプションなど仕様により、別途見積り。

Ⓜ…2～10℃保存 E…20℃保存 Ⓜ…80℃保存 Ⓜ…150℃保存 表示がない場合は室温保存です。その他の略号は、巻末をご参照下さい。  
掲載内容は、2019年7月時点での情報です。最新情報は、当社HPをご参照下さい。

## 池田 菊苗 (1864. 10. 8 ~ 1936. 5. 3)

浜理薬品工業株式会社 (元・味の素株式会社 理事) 井澤 邦輔

## 1. はじめに

池田菊苗(写真1)は昆布の「うま味」成分がグルタミン酸ナトリウムであることを発見したことでよく知られている。しかし、東京帝国大学理科大学教授の池田が何故そのような研究を行ったのか、他にどのような研究業績を上げたかについては意外と知られていない。池田については過去に多くの著作<sup>1-5)</sup>で紹介されているが、本稿ではその生涯を通して見ることで池田の人となりに触れてみたい。



写真1. 池田菊苗博士(出典:池田菊苗博士追憶録)

## 2. 生い立ち

池田菊苗は元治元年9月8日(1864年10月8日)京都において、池田春苗の次男として生まれた。父春苗は加賀藩士の山縣家に生まれたが、薩摩藩京都留守居役であった池田誠之助の養子となり池田春苗を名乗った。母とは3歳の時に死別しており、義母に育てられている。池田には12歳年上の兄がいたが、その兄は他家の養子となったため、長子同様に育てられた。その頃の好物が昆布で出汁をとった湯豆腐であったことが後の研究につながっている。明治5年(1872年)8歳になった池田は従兄とともに東京に行き私塾で英語等を学んでいる。明治8年、京都に戻った池田は英国婦人宣教師についてさらに英語を学び、草場船山の漢学塾にも通っている。後に発揮される語学の素養はこの頃育まれたと思われる。明治9年、京都府第一中学に入学するが、父が旅館業を始めたため中学を中退し、大阪に転居している。大阪で池田は自宅近くに住んでいた村橋次郎(大阪衛生試験所長兼造幣局技師、大阪大学村橋俊一名誉教授の曾祖父)から化学を学び、実験の指導を受けている。池田は後になって、この経験が純正化学と応用化学の区別なく興味をもつことにつながったと述懐している。村橋から東京に出て勉強するように勧められた池田は家出同然のように

大阪を後にする。明治14年の春、16歳であった。

## 3. 大学予備門から東京大学へ

明治15年、池田は大学予備門(後の第一高等学校)に入学する。成績優秀で授業料免除、奨学金の恩典を受けている。寄宿舎でも試験管を振って実験を行うほど、化学に傾倒する。

明治18年(1885年)、池田は東京大学理学部化学科に入学し、櫻井錠二(写真2)に師事する。櫻井は官費留学生としてロンドンに留学して有機化学を学び、3年前に24歳で化学科教授に就任したばかりであった。櫻井は松井直吉につぐ日本人2人目の教授であった。また、櫻井は加賀藩士の子であり、同じ元加賀藩士の子であった池田はつながりを感じていたかもしれない。池田は櫻井の勧めもあり、生まれて間もない物理化学の道に進む。彼の化学科での同級生は後に東北帝国大学総長となる小川正孝ただ一人であった。その頃の大学の実験室にはガスもきておらず、炭火で元素分析を行ったという記録もある。当時の化学科の卒業生は就職難であり、教育者になる道も狭いものであった。池田は当時のことを「応用面での成果をあげて純正化

学者が工業上でも無用の長物ではないことを示したかった」と書き残している。さらに、当時の池田にはもう一つ厳しい現実があった。大阪にいた家族が池田を頼って上京したため、学業を続けながら一人で一家7人の生活を担わなければならなかった。そこで、得意の英語を活かし、翻訳や英語教師のアルバイトで一家の生活を支えている。

明治22年(1889年)池田は優秀な成績で大学を卒業し大学院に進学するが、貧困生活は変わらず、東京英和学校(現青山学院大学)や共立学校(現開成学園)で英語の講義を行っている。その英語能力は高く評価され、国学院では坪内逍遙の後任講師としてシェークスピアの講義をしたという。明治23年、池田は研究生活を一時中断し、東京高等師範学校(現筑波大学)に採用され、理化学教授に任じられている。

写真2. 櫻井錠二教授(出典:ウィキペディア<sup>10)</sup>)

## 4. 教育者としての池田菊苗

師範学校に職を得た池田は、化学の教科書を書き、講義用の実験器具を作ったりして生徒に分かりやすく説明する工夫を重ねた。気体の体積組成を決める実験装置を考案し、池田式検気器と命名して実際に実験を楽しそうに見せている。後に東大池田研究室の後任教授となる鮫島實三郎(池田の娘婿

でもある)は大阪の市岡中学で池田の書いた中等化学教科書を使ったと振り返っている。また、英語教育においても英語読本を創案し、付属小学校でも自ら望んで英語の授業を受け持ったという。

明治25年(1892年)池田は旧加賀藩士の娘、岡田貞と結婚。貞は恩師櫻井錠二夫人の妹であり、櫻井と池田は義兄弟の関係になった。以降生涯を通じて櫻井は池田の支援者になる。

## 5. 東京帝国大学助教授就任とドイツ留学、漱石との出会い

明治29年(1896年)、池田は東京帝国大学理科大学助教授に就任する。当時の東大(理科大学)には櫻井以外に教授は無機化学の英国人ダイヴァースのみであり、有機化学と物理化学の両方を担当していた櫻井には片腕となる存在が欲しかったと思われる。池田は研究生生活に戻り、反応速度論や溶液論、浸透圧などの研究を進め、ドイツの雑誌に投稿している。廣田綱蔵(大阪大学教授)はその著書の中で加水分解の反応速度測定にガラス製膨張計を使用した池田の研究を高く評価している。

明治32年、34歳の池田はドイツ留学を命じられる。行先は物理化学で世界をリードしていたオストワルド(写真3)のいるライプツィヒであった。横浜から鎌倉丸で欧州に旅立ったが、見送りには後輩の眞島利行(有機化学者、後に東北大学教授)もかけつけたという。オストワルドの研究室では白金黒の触媒作用を研究し、共同研究者ブレディッヒと論文を発表している。また、その興味は生体触媒「酵素」にも向けられ、帰国後日本で最初の酵素学の講義をしている。オストワルドは触媒作用、化学平衡、反応速度の研究で1909年ノーベル賞を受賞するが、硝酸の製法(オストワルド法)を開発して特許も出願している。池田の滞在中にはその工業化研究を行っており、オ

ストワルドのこの姿勢は応用面で人の役に立ちたいと思う池田の考え方と一致するところがあったと思われる。

明治34年(1901年)、池田は一年半のドイツ留学を終え、ロンドンの王立研究協会ファラデー研究所滞在のため訪英する。ロンドンでの宿舎は当時国費留学生として英国にいた夏目漱石(写真4)の下宿であった。これは池田と一緒にドイツ留学をしていた大幸勇吉(京都帝国大学教授、池田とともに日本の物理化学の父と呼ばれる)の紹介とされている。大幸は漱石と大学予備門の同級生であった。漱石は池田と同宿してその学識の深さに驚き、心服したと寺田寅彦に手紙を送っている。漱石日記にも「英文学について話す。頗る多読の人なり」と書かれている。事実、池田の死後、味の素(株)に寄贈された蔵書には、哲学・英文学・漢籍・仏典・芸術・社会政策等々が含まれ、その博識のほどがしのばれる。

## 6. 教授昇任とうま味成分の発見

明治34年、帰国した池田は教授に昇任し、新設の化学第三講座を担当する。第二講座はダイヴァースの後任として埴和為昌教授が就任していた。この時点で東京大学でもようやく3つの講座が揃うことになる。池田は昇任と同時に反応速度に関する研究で理学博士を授与される。

帰国後すぐに櫻井とともに行った研

究で特筆されるのは国際原子量委員会に酸素を16とする原子量基準の提案である。これは炭素12に変更されるまで国際基準となっている。また、化学教育にも力を注ぎ、オストワルドの著作に詳しい説明をつけて「近世無機化学」を出版し、明治39年には帰山信順との共著で「化学教科書」を書き、初等教育にも貢献している。しかし、池田は純正化学の研究だけでは卒業生の就職先にも困るという当時の状況を憂い、自ら応用面で成果をあげて純正化学者が無用の長物ではないことを例示したいと思うようになる。

明治40年、池田はかねてより興味を抱いていた昆布の呈味物質の探索を開始する。通説として貞夫人が昆布を買って求めたのが研究の契機とされている。しかし、池田の学生時代を知る水田政吉(日本石油社長)によると、その頃既に台所で昆布を煮詰める姿を見ており、若い頃からの懸案のテーマであったと思われる。当時大学では教授以外に人手はなく、配島熊二郎という小使頭が実験の手伝いをしてきた。しかし、呈味物質の結晶化・分離はうまく行かず中断する。そんな時、三宅秀博士(元東京大学医科大学長、仁田勇大阪大学教授の祖父)の書いた「佳味が食物の消化を促進する」という記事を読み、「まずは栄養のある食物を美味しくする安価な調味料を開発すれば、国民の栄養状態を改善できる」と考えてうま味物質探索



写真3. F. W. オストワルド博士  
(出典: ウィキペディア<sup>11)</sup>)



写真4. 夏目漱石(出典: ウィキペディア<sup>12)</sup>)

の継続を決意する。そして、私的実験助手として栗原喜賢を雇って研究を続ける。

再開して間もない明治41年2月(1908年)、池田は約38kgの昆布から30gのグルタミン酸の結晶化に成功する。結晶を中和してなめると濃厚なうま味を呈し、元素分析や分子量測定からグルタミン酸塩がうま味物質の本体であることを明らかにした。当時、グルタミン酸は既にドイツのリットハウゼンにより小麦のグルテンから分離されており、フィッシャーは「グルタミン酸はまずい後味がある」と述べている。池田は当時の新学説の中心であった電気解離の考えを取り入れ、味はグルタミン酸イオンに帰することを明らかにしたと片山正夫(櫻井錠二の後任教授、理論化学担当)は述べている。ビタミンB1を発見した鈴木梅太郎(東京帝国大学農科大学教授)も「この仕事は自分の方でやるべき性質のものであったが、うまくやられた。グルタミン酸はなめたことはあるが、その塩はなめなかった」と片山に語っている。明治41年4月、池田は「グルタミン酸塩を主成分とする調味料製造法」と題する特許を出願し、7月に認可された(特許第14805号)。

## 7. 味の素の工業化と純正化学研究

池田が昆布からうま味成分を取り出したというニュースを知人から耳にした鈴木三郎助(二代目、写真5)は直



写真5. 二代目鈴木三郎助氏  
(出典：鈴木三郎助傳)

ちに池田を訪問した。鈴木家では明治23年頃から葉山の沖でとれる海藻を原料にヨードを製造していた。海藻つながらりて家業の発展につなげないかと思ったのであろう。明治41年末、池田と特許を共有するという条件で鈴木商店(現味の素株)での調味料事業がスタートする。まず、池田の私的助手であった栗原が麻布工場で中間試験を行い、さらに栗原は鈴木商店に入社し、逗子工場で生産が開始された。池田はうま味調味料の名前として「味精」を考えていたが、三郎助の提案した「味の素」となった。原料としては安価に入手できる小麦グルテンが選ばれた。ところが、濃塩酸でタンパク質を分解するのは当時の技術では至難の業であった。池田研の卒業生で鈴木商店に就職し、大正3年に新設された川崎工場の工場長になった鈴木六郎(三郎助の娘婿)は、「濃塩酸の使用で苦勞した。公害も問題になって生産制限にも及んだ。」と述懐している。塩酸との闘いはこれから昭和10年頃まで続くことになる。

その頃、池田は本業の大学教授の仕事として、溶液論や反応速度論の研究も続けている。(大正2年、日本化学会会長)。特に酵素反応速度論の研究は世界に先駆けたものであったと言われる<sup>2)</sup>。また、タンパク質加水分解液中のアミノ酸混合物の電気泳動法による分離法について1911年に特許を出願したが、学会誌には発表していない。1930年にチセリウスが同じ着想で電気泳動法を発展させ、1948年にノーベル賞を受賞したが、池田が20年も前に出願していたことを知る人は少ない。鮫島実三郎は、恩師の池田は研究成果の発表には興味を示さず、多くの未発表があると述べている。

池田のうま味成分への興味は味の素の開発で終わっていなかった。大正2年(1913年)、池田は研究生の小玉新太郎に鰹節のうま味成分がイノシン酸塩であることを解明させている。現

在、イノシン酸塩はグルタミン酸塩と組み合わせることでもうま味が飛躍的に増大する相乗効果があることが知られ、椎茸のうま味成分グアニル酸塩と共にうま味調味料として使用されている。

## 8. 応用化学者池田菊苗と理化学研究所

大正6年(1917年)、池田は東大教授と併任という形で財団法人理化学研究所(理研)の化学部長に就任する。所長は菊池大麓、副所長は櫻井錠二、物理部長は長岡半太郎であった。理研は大学よりも予算に恵まれており研究員も増やすことができたために、多くの新しい研究テーマに取り組んでいる。その頃には池田の名前で原著論文は発表されていないが、特許出願等からテーマが推察されるので例にあげると排煙脱硫法、製塩法の開発(多効式蒸発缶)、アドゾール(酸性白土:吸湿剤)の開発、砂鉄処理法、無機塗料レプトライト、リン酸肥料製造法と多岐にわたっている。1910年には日本化学会で太陽熱エネルギーを利用した温室栽培法も提唱している。これらには先見性のある内容が多く、いくつかは戦後になって実用化されている。池田が純正化学者と応用化学者の両面をもつと言われる所以であるが、現在の化学工学、冶金学の先駆け研究者でもあった。

## 9. 2度目のドイツ滞在

大正12年(1923年)、池田は定年を前に大学を依願退官する。恩師オストワルドがしたように「新進気鋭の人に席を譲り、自分ができることをする」を実行したのである。友人や門弟から寄せられた還暦祝賀金は全額日本化学会に寄付され、化学会欧文誌の発刊に充てられた。大正14年、池田は鈴木忠治(三郎助の弟、後に味の素社長)に同行して欧米に旅行する。米国で糖蜜からグルタミン酸ソーダが製造できるとの話があり、情報収集が目的

であった。翌年、池田はライブツィヒで実験室付きの住居を構える。オストワルドも大学を辞めてから色彩学などの新しい研究を行っており、それに触発されたためであるが、味の素製造の諸問題を解決するためでもあった。タンパク質の塩酸加水分解は金属容器で行うと腐食してしまうために、初期には道明寺甕が用いられ、製造量が増えてからは石釜が用いられていた<sup>6)</sup>。池田はライブツィヒで実験を重ねて耐酸塗料を開発し、特許を出願している。その後、味の素では特殊ゴムを張った耐酸設備をドイツから導入し、池田の特許技術と併用することでタンパク質分解時間の短縮、塩酸使用量の削減、連続生産が可能になり、製造時の悪臭も大幅に減少して増産に貢献した。

その頃の池田の人柄を表す逸話が残っている。昭和4年、東大理学部の水島三一郎(片山正夫の後任教授)はライブツィヒのデバイ教授のもとに留学しており、日本人が来ると一緒に池田をたびたび訪問し、食事をご馳走になったと回想している。昭和5年には柴田雄次(堺和為昌の後任教授)、仁田勇のほかハイゼンベルグのもとに留学中の物理学者の藤岡由夫、菊池正士らも同伴している。これ以外にも多くの学者がライブツィヒでお世話になったと書き残しており、池田が広く慕われていたことが分かる。

## 10. 私設研究所設立

昭和6年、帰国した池田は東京の戸越に居を構える。鉄筋コンクリート製の住居兼研究所(写真6)は自身の開発したアドゾールを用いた冷房が完備され、当時としては珍しいものであった。研究所には数名の実験助手がおり、調味料の研究のほかニコチンフリーのたばこ、Ni触媒の被毒作用、アンモニア合成、石炭の液化に興味を抱き、石炭液化では溶融触媒のアイデアに至っている。この触媒は戦後の改良フィッシャー法に使われており、池

田の着想の先見性がうかがえる。昭和7年櫻井錠二を理事長として日本学術振興会が創立され、池田はその中で触媒委員会を設立し初代委員長となっている。

一方、味の素の事業化で大成功を収めた鈴木三郎助は昭和6年に65歳で亡くなっている。その追悼文として、池田は「私は産みの親、君は育ての親」と書いている<sup>7)</sup>。池田は工業化後も何かと味の素の技術相談に乗っており、鈴木忠治が何度も自宅の研究所を訪問したことが池田の家族の記憶に残っている。

昭和11年5月1日、池田は切傷に効くという温泉水採取のために湯河原に行っている。しかし、池田はその研究を進めることなく、5月3日腸閉塞により71歳で急逝した。枕元には愛読書のディケンズの小説があったという。遺骨は漱石と同じ雑司ヶ谷霊園に埋葬された。

## 11. おわりに

ヒトの味覚は甘味、苦味、酸味、塩味の4つと考えられていた。それに5つ目の基本味である「うま味」を追加したのは池田菊苗である。海外では、長い間うま味は4つの基本味の組み合わせとされてきたが、2002年にうま味の受容体が発見され、うま味は「umami」として国際語になった。さらに、舌に続いて消化器粘膜細胞にもグルタミン酸受容体があることがわかり<sup>8)</sup>、三宅、池田が100年前に感じた「佳味が食物の消化を促進する」ということが本当であることが判明した。

戦後、グルタミン酸の製造は発酵法に転換され、その世界での生産量は200万トンを超えると推定される<sup>9)</sup>。1985年特許庁は池田菊苗を「日本の十大発明家」の一人として選定した。池田の目指した「化学で人の役に立ちたい」という思いは現実のものとなっている。



写真6. 池田博士旧宅兼実験室  
(現日本音楽高等学校1号館、平成31年3月筆者撮影)

## 【参考文献】

- 1) 池田菊苗博士追憶会編：「池田菊苗博士追憶録」(非売品)(1956)。
- 2) 廣田鋼蔵著：「化学者池田菊苗」(東京化学同人)(1994)。
- 3) 福江紀彦著：「うま味を解明した池田菊苗」, 近創史, 5, 3 (2008)。
- 4) 上山明博：「うま味を発見した男」(PHP研究所)(2011)。
- 5) 「東京大学理学部化学教室の歩み」東京大学大学院理学研究科・理学部化学教室雑誌会(2007)。
- 6) 味の素株式会社編纂：「味をたがやす、味の素80年史」(味の素株式会社)(1990)。
- 7) 故鈴木三郎助君傳記編纂会編：「鈴木三郎助傳」(非売品)(1932)。
- 8) 畝山寿之：「うま味物質の健康価値：グルタミン酸ナトリウムの生理機能」, 化学と生物, 53 (7), 432 (2015)。
- 9) 安枝 寿：「White Bio-industry から Emerald Bio-industry ? へ」, 生物工学, 84 (4), 190 (2011)。
- 10) 「櫻井錠二」[フリー百科事典 ウィキペディア日本語版], [https://ja.wikipedia.org/wiki/ファイル:Sakurai\\_Joji.jpg](https://ja.wikipedia.org/wiki/ファイル:Sakurai_Joji.jpg) (最終閲覧日：2019年5月20日)
- 11) 「Wilhelm Ostwald」[フリー百科事典 ウィキペディア日本語版], [https://ja.wikipedia.org/wiki/ファイル:Wilhelm\\_Ostwald.jpg](https://ja.wikipedia.org/wiki/ファイル:Wilhelm_Ostwald.jpg) (最終閲覧日：2019年5月20日)
- 12) 「夏目漱石」[フリー百科事典 ウィキペディア日本語版], [https://ja.wikipedia.org/wiki/ファイル:Natsume\\_Soseki\\_photo.jpg](https://ja.wikipedia.org/wiki/ファイル:Natsume_Soseki_photo.jpg) (最終閲覧日：2019年5月20日)

## 組織標本脱色試薬



### deColorizing Solution 1 deColorizing Solution 2

本品は、麻布大学 小澤秋沙先生と坂上元栄先生により開発された組織染色標本の新規な脱色試薬です。病理分野で汎用されているヘマトキシリン・エオジン染色（HE染色）や特殊染色であるマッソン・トリクローム染色（MT染色）を脱色します。

HE染色標本を脱色する場合は、deColorizing Solution 1のみを使用します。一方、MT染色標本を脱色する場合は、deColorizing Solution 1と2の両方が必要となります。

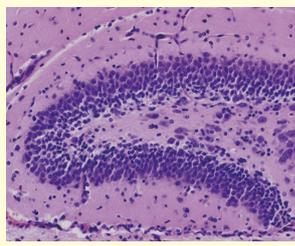
本品を使用し、脱色した後に、異なる染色を行うことにより、1つの組織標本から複数の染色情報を得ることができます。

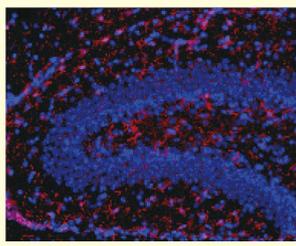
#### 特長

- HE染色・MT染色の脱色が可能
- 脱色後に抗体染色やHE染色などの再染色が可能
- 手順は簡単。本品に浸漬するのみ

#### アプリケーション

##### ■ マウス脳(海馬)のHE染色標本を用いた場合

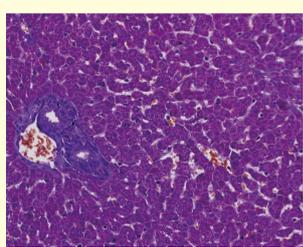
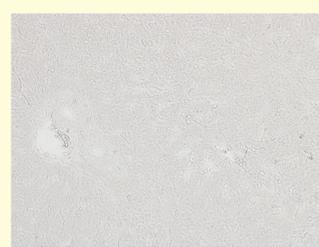
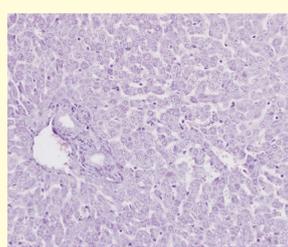

→

→


脱色に deColorizing Solution 1 を使用

抗体染色(赤色: Iba1、青色: DAPI)

##### ■ マウス肝臓のMT染色標本を用いた場合


→

→


脱色に deColorizing Solution 1 と 2 を使用

(データご提供：麻布大学 小澤秋沙先生、坂上元栄先生)  
プロトコルやアプリケーションの詳細は当社HPをご覧ください。

組織標本脱色試薬 富士フイルム和光 検索

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

Ref...2~10℃保存 F...-20℃保存 S...-80℃保存 I...-150℃保存 表示がない場合は室温保存です。  
 特定 毒物 劇物 毒薬 劇薬 危険物 向精神薬 特定麻薬向精神薬原料  
 化審法 第一種特定化学物質 化審法 第二種特定化学物質 化学兵器禁止法 第一種指定物質 化学兵器禁止法 第二種指定物質  
 覚せい剤取締法 国民保護法  
 掲載内容は、2019年7月時点での情報です。上記以外の法律及び最新情報は、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」、「食品」、「家庭用品」などとしては使用できません。  
 記載希望納入価格は本体価格であり消費税などが含まれておりません。

和光純薬時報 Vol. 87 No. 3  
 2019年7月15日発行  
 発行責任者 糸 博之  
 編集責任者 鎌田裕子  
 発行所 富士フ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