



CONTENTS

●Review

動物実験の 3R における国内外の動向
国立医薬品食品衛生研究所 小島 肇夫

「蛍光生物学」の最前線 1
生体機能イメージングを実現する蛍光プローブの精密設計
東京大学大学院医学系研究科 神谷 真子・浦野 泰照

●Topics on Chemistry

低分子蛍光化合物による筋肉細胞の分化制御
株式会社同仁化学研究所 上藺 貴広

細胞周期の進行を時間・空間的に
リアルタイムで可視化する技術
株式会社同仁化学研究所 日吉 友香

2011 No.138

ISSN 0385-1516

 **DOJIN NEWS**

ドージンニュース

目次

Review

動物実験の3Rにおける国内外の動向
 国立医薬品食品衛生研究所 小島 肇夫…………… 1

「蛍光生物学」の最前線 1

生体機能イメージングを実現する蛍光プローブの精密設計
 東京大学大学院医学系研究科 神谷 真子・浦野 泰照… 10

Topics on Chemistry

低分子蛍光化合物による筋肉細胞の分化制御
 株式会社同仁化学研究所 上菌 貴広…………… 16
 細胞周期の進行を時間・空間的にリアルタイムで可視化する技術
 株式会社同仁化学研究所 日吉 友香…………… 18

Commercial

新製品

近赤外蛍光色素標識キット
 ICG Labeling Kit-NH₂…………… 20
 自己組織化単分子膜作製用試薬
 ビオチン-SAM 試薬…………… 21
 アルカンチオール類…………… 22

試作品

アセチルコリンエステラーゼ活性測定用キット…………… 17

開発中

新規アタージェント
 トレハロースエーテル型…………… 21

新製品案内

近赤外蛍光色素標識キット

品名	容量	希望納入価格(¥)	メーカーコード
ICG Labeling Kit - NH ₂	1 sample	20,000	LK31
	3 samples	45,000	LK31

自己組織化単分子膜作製用試薬 ビオチン-SAM 試薬

品名	容量	希望納入価格(¥)	メーカーコード
Biotin-SAM Formation Reagent	1 μmol × 3	16,000	B564

アルカンチオール類

品名	容量	希望納入価格(¥)	メーカーコード
Sulfobetaine3-undecanethiol	10 mg	20,000	S350
5-Amido-1-pentanethiol	10 mg	14,000	A508
	100 mg	48,000	
7-Amido-1-heptanethiol	10 mg	14,000	A509
	100 mg	48,000	
10-Amido-1-decanethiol	10 mg	14,000	A510
	100 mg	48,000	



九州新幹線 さくら
 2011年3月 九州新幹線が全線開業しました。
 撮影場所：熊本県熊本市

動物実験の3Rにおける国内外の動向

National and International trends of 3Rs in animal experiments



小島 肇夫

国立医薬品食品衛生研究所
安全性生物試験研究センター
薬理部 新規試験法評価室 室長

要約

There is slow, steadily progressing the movement of 3Rs (to Replace them with non-sentient alternatives, to Reduce to a minimum the number of animals used, and to Refine experiments which used animals so that they caused the minimum pain and distress) of animal experiments in Japan.

The Japan Health Sciences Foundation established the Center for Accreditation of Laboratory Animal Care and Use in 2007. With the purpose of assessing and verifying compliance with the "Basic Guidelines for Proper Conduct of Animal Testing and Related Activities in the Research Institutions under the Jurisdiction of the Ministry of Health, Labour and Welfare (MHLW)", the objective of the center is to promote the optimum

enforcement of scientific animal testing. Other Jurisdiction systems have been established by successive in Japan.

On the other hand, MHLW created the Japanese Center for the Validation of Alternative Methods (JaCVAM) at the National Institute of Health Sciences (NIHS) in 2005. JaCVAM has promoted the 3Rs in animal experiments for the evaluation of chemical substance safety and established guidelines for new alternative experimental methods through international collaboration for 5 years. Many Japanese colleagues have supported JaCVAM activities by performing validation studies and peer reviews and by providing regulatory acceptance for new alternative experimental methods. Furthermore, we must push forward with international harmonization efforts in accordance with the International Cooperation on Alternative Test Methods (ICATM) framework, which was organized in April, 2009. We think that developments and continued activities of these centers are key contributions in 3Rs.

We expect these Japanese activities may contribute to the International harmonization in 3Rs.

キーワード：

動物実験代替法、代替法、バリデーション、第三者評価、3R

1. 国内の動向 -1-

1.1 「動物愛護及び管理に関する法律の改訂」および関連指針

昭和48年(1973)に制定された「動物の愛護及び管理に関する法律(以後、動愛法と記す)」が2006年(平成18年)6月、環境省より施行され、第41条 動物を科学上の利用に供する場合の方法、事後措置等が改訂された¹⁾。これまでの、「できる限り動物に苦痛を与えない方法によって実験を行わなければならないこと」に加え、「できる限り動物を供する方法に代わり得るものを利用すること、できる限りその利用に供される動物の数を少なくすること等により動物を適切に利用することに配慮するものとする」が付記された。さらに、「実験動物の飼養及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準」が環境省より告示された²⁾。その基本的な考え方には、動物を科学上に利用することは必要不可欠であるので、3R(Reduction: 実験動物の削減、Refinement: 実験動物の苦痛の軽減、Replacement: 実験動物の置き換え)を徹底するために、適正な飼養および保管並びに科学上の利用に努めることが記載されている。加えて、環境省は平成18年10月「動物の愛護及び管理に関する施策を総合的に推進するための基本的な指針」を定めた³⁾。この中では、実験動物の適正な取扱いの推進について述べられている。

これらを受け、同時期に文部科学省⁴⁾、厚生労働省⁵⁾、農林水産省⁶⁾が関連「研究機関等における実験動物の実施に関する基本指針」を告示した。動物実験責任者の責務、動物実験委員会の設置、機関内規定の策定、動物実験計画の承認、データの信頼性を確保する観点から、適切な動物実験方法の選択、動物実験等の施設および設備を踏まえて動物実験計画を立案し、適正に実施することが記載されている。実験方法の選択には動物実験代替法(以下、代替法と記す)の利用、実験動物の選択、苦痛の軽減への配慮が明記されている。

さらに、同時期に日本学術会議は「動物実験の適正な実施に向けたガイドライン」を示している⁷⁾。動愛法の基本指針を踏まえて、各研究機関が動物実験等に関する規定を整備するに際してモデルとなる共通ガイドラインを作成した。この他にも、日本実験動物学会、日本薬理学会、日本トキシコロジー学会、日本生理学会、日本神経科学会、日本実験動物協会などがそれぞれに指針を示している⁸⁾。

さて、動愛法には附則第9条において、「政府は、この法律の施行5年後を目途として、新法の施行の状況について検討を加え、必要があると認めるときは、その結果に基づいて所要の措置を講ずるものとする」とされている。これに基づけば、平成23年度を目途として施行状況を検討し、必要であれば法改正を行うことになる。実際、中央環境審議会動物愛護部会において、動物愛護

管理法見直しに向けた議論が平成22年6月より進んでいる⁹⁾。この中で、実験動物の福祉が議題にあがっており、どのような追加記載がなされるのかが注目していきたい。ただし、混同がないように、用語を正確に区別しておきたい。環境省が扱っているものは、「実験動物」であり、一方、その他省庁が扱っているのは、「動物実験」である。改訂が検討されているものは、「実験動物」であり、「動物実験」の規制が今後どう改正されるのか定かでない。

ところで、5年前の動愛法の改訂にあたり、3Rの原則が導入された理由について考えてみたい。これについては、鍵山が興味深い記述を残している¹⁰⁾。すなわち、3Rは国際原則であり、先進国で3Rを法令で謳っていない国は日本以外に見当たらなかったこと、研究論文のレフェリーの指摘事項の背景に3Rの原則の非明文化があったこと、我が国の製薬会社は欧米からアウトロー呼ばわりされ、国際展開に苦戦していたことがその理由であると記載している。日本の3Rの必要性は、動物福祉のためだけでなく、国際社会の中での生き残り、科学水準や国際経済力の維持のためのものである。今回の動愛法の改正によっても、この考え方が中心であろう。

1.2 動物実験施設の第三者認証機関

日本学術会議の「動物実験の適正な実施に向けたガイドライン」には、実験動物等の適正化に必要な教育訓練、自己点検・評価および検証ならびに情報公開に関する記述がある⁷⁾。この自己点検・評価には、「当該機関以外の者による検証を行うことを考慮する」と示されている。この検証機関として、米国ではAAALAC (Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care)が国際認証をできる組織としてよく知られているが¹¹⁾、日本ではこれまで当該機関以外の者が評価する公的な仕組みがなかった。この当該機関以外の者による審査を担当する組織として、2007年、財団法人ヒューマンサイエンス振興財団が第三者認証機関を設立し¹²⁾、公私立大学実験動物施設協議会、国立大学法人動物実験施設協議会¹³⁾、日本動物実験協同組合¹⁴⁾など複数の認証制度においても審査が進んでいる。日本においても本格的な当該機関以外の者による検証が始まったことを意味している。

2. 国際動向

これまで説明してきた動愛法や動物福祉問題はすべて欧米にその起源が遡る。そこで、我が国の現状を客観的にみるため、欧米諸国の仕組みについて確認しておきたい。

2.1 EUの動向

欧米諸国には、前述した「実験動物」と「動物実験」の線引きはない。例えば、英国はAnimal Actで3つの免許制度を導入している¹⁵⁾。実験実施施設の指定、実験者の免許、実験計画の審査および免許の交付である。ところが、この法律はEUの法律と比べ表現が弱いとされており、2013年には改訂を予定している。このEUの法律とは、欧州議会が、EUの研究室で使用されている年間1200万以上の実験動物を規定するEU指令609-86に代わる新しいものであり、2010年9月に改正案の採用が決議され、ヨーロッパの多くの加盟国に、動物実験の水準向上を促した¹⁶⁾。以下が特記すべき事項である。

- チンパンジーなどの類人猿の使用禁止（一部の例外を除く）。
- 事前の倫理的・科学的な評価の権威化。

- 実験動物のすべてのブリーダー、サプライヤー、ユーザが、機器や動物のケージの選択およびトレーニング等に関する法令の順守。

- EUと加盟国レベルにおける医学研究や教育などを含むすべての分野での、非動物の方法の開発および推進。

このようなEUの思想、法律的な問題が経済にまで波及した事例が、化粧品開発における動物実験の規制問題¹⁷⁾およびリーチ法 (REACH: Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals) 問題である¹⁸⁾。

化粧品の規制に関しては、2003年に化粧品指令7次改正が公布され、2009年3月に代替法が確立されている試験がある場合には、①EU域内での動物試験の完全禁止、②動物試験した製品、動物試験をした原料を含む製品の販売禁止が決められている¹⁷⁾。さらに、EU委員会は、期限内の開発が困難と判断された試験法の場合には、2013年まで延長する法案を提出している。これに対応すべく、EUでは欧州化粧品工業会 (COLIPA: European Trade Association for the Cosmetic, Toiletry and Perfumery Industry)¹⁹⁾と欧州代替法評価センター (ECVAM: European Centre for the Validation of Alternative Methods)²⁰⁾が共同で試験法の開発、バリデーションおよび専門家による第三者評価（以後、第三者評価と記す）を進めている。

一方、REACHとはすでにEU市場に流通している約3万の化学物質に関し、その製造・輸入を行う事業者は、その安全性データなどを揃え、登録することが義務づけられる規制を指す。登録、評価、認可、制限の総称である¹⁸⁾。この背景にはEUで化学品会社が27,000社（売上額590 billion €）あり、170万人の従業員、国際市場の33%を占めている事情がある一方、職業性皮膚炎の治療費に3 million € / 日、約600 million € / 年が必要であるとともに、既存化学物質86%の毒性データが不足していることに端を発している²¹⁾。この安全性評価はハザードベースでなく、リスクベース（ハザードと曝露評価）が中心である、2009年までに事前登録された約18万の化学物質について、70%の試験を2017年までに実施しなければならない。実験を行う場合にはITS (Integrated Testing Strategies) という戦略に従い、Read-acrossという関連物質情報の調査、構造活性相関 (QSAR: Quantitative Structure-Activity (または Affinity) Relationship) などの *in silico* の利用、代替法を優先せざるを得ないと記されている。1t以上の製造/輸入物質には代替法により有害性を同定する。さらに製造量が増えるにつれて、曝露評価まで求められており、動物実験を有効に使っていかねばならない²²⁾。

ただし、新規代替法が開発されても、例えば、経済協力開発機構 (OECD: Organisation for Economic Co-operation and Development) テストガイドラインなどに²³⁾、受け入れられるためには10年が掛かると言われており、これまで通りの方法では2017年までには多くの新規試験法を用意できない。新規試験法に求められるものは、化学物質等の安全・安心の確保であり、代替が第一優先ではない。新規試験法の採用においては、各分野の専門家により、適用範囲や再現性、正確性などの視点で慎重に議論されねばならないからである。そこで、類似した試験法については、既存試験法の性能標準 (performance standard) に基づいたバリデーションにより、REACHのために“適切な”方法を短期間で選択するme-tooバリデーションという方策が検討されている²³⁾。

2.2 米国における動向

アメリカにおいては、実験動物はAnimal Welfare Act²⁴⁾、動物

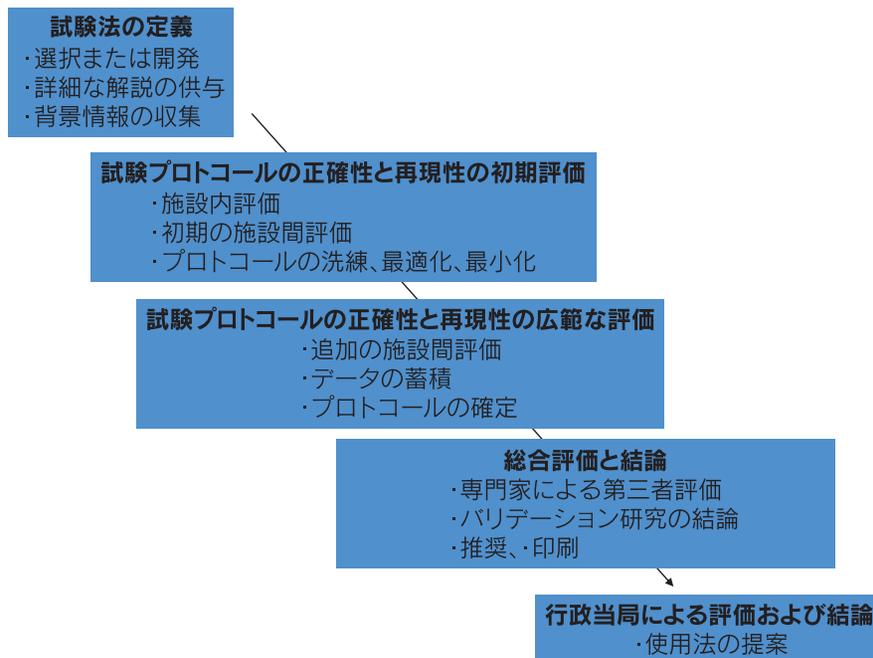


図 1. 試験法の公定化の過程

実験は Health Research Extension Act で規制されている²⁵⁾。これらを国立科学アカデミー (NAC: National Academy of Sciences) 傘下の実験動物研究協会 (ILAR: Institute for Laboratory Animal Research) が関係省庁の支援を受けて、実験動物の管理および使用に関する指針を編集し、実験動物および動物実験の倫理・科学的な自主管理を促している²⁶⁾。以上のような状況は、日本に近い。ただし、その詳細は大きく異なっている。一番大きな相違点は、獣医師の役割である。日本学術会議のガイドラインでは、獣医師の役割は少ないが、ILAR の指針では、実験動物を専門とする獣医師が科学と動物福祉の推進役として定められている。また、前述した AAALAC の国際認証なども厳しいものであると聞いている。

2.3 国際協調機関

このような動物実験の 3R は欧米主導ということもあり、OECD、世界動物保健機関 (OIE: World Organisation for Animal Health)、日米 EU 医薬品規制調和国際会議 (ICH: International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use)、動物用医薬品の承認審査資料の調和に関する国際協力会議 (VICH: International Cooperation on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Veterinary Products)、化粧品国際規制会議 (ICCR: International Cooperation on Cosmetics Regulations)、国際標準化機構 (ISO: International Organisation for Standardization) などの規制に関わる国際協調機関においても 3R に関する声明を出している。これらの中で、OECD では、今後提案されるテストガイドライン案には 3R の精神が盛り込まれることを望んでおり²⁸⁾、代替法や動物実験でも複数の試験を組み合わせたガイドラインが増えている。OIE の実験動物福祉綱領では、

加盟国に実験動物福祉に関する法的整備を勧告している²⁷⁾。ICH では、動物実験数削減の可能性もテーマの一つとしてあげられており、*in vitro* 試験の議論も少しずつではあるが、増えている²⁸⁾。比較的知名度が低い ICCR とは、厚生労働省、米国医薬食品庁 (FDA: Food and Drug Administration)、カナダ厚生省 (Health Canada) および欧州委員会企業産業総局により 2007 年 9 月に設立された化粧品規制のための国際的な協力会議である。その具体的な議題の一つとして、EU の動物実験事情に国際的に対応するため、「化粧品成分の安全性評価と代替法」が挙げられている²⁹⁾。

2.4 代替法のための国際機関

代替法の開発の中で、化学物質等の安全性試験の公定化には厳密な国際ルールが作られている。これが 2005 年に発行された OECD ガイダンス文書 (Guidance Document: GD) No. 34 である³⁰⁾。この文書の中には、今後、新規試験法が公定化される場合のバリデーションや第三者評価に関する手順、手法が記載されている。すなわち、図 2 に示すように³¹⁾、新規試験法が公定化されるにはバリデーションや第三者評価、行政的な受入れのための評価を経なければいけない。ところが、図 1 に示すように、バリデーションや第三者評価を実施すると言っても、正確性や再現性の確認に種々の過程を要する。ましてやバリデーションの実施や実行委員会の構築にはノウハウが多い。第三者評価においても種々の専門家への要請、公的な認証までの手順をも考慮する必要がある。そこで、このガイダンスに先立ち、世界各地にバリデーションセンターが設立された。1990 年代に米国では NICEATM (The National Toxicology Program Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods) / ICCVAM (Interagency Coordinating Committee on the Validation of



図 2. 公的な試験法ができるまで

Alternative Methods)³²⁾、欧州には ECVAM が設立された²⁰⁾。これらのセンターの役割はそれぞれ法律で規定されており、代替法への関与を肅々と進めている。さらに、遅れて 2009 年には韓国³³⁾とブラジル³⁴⁾にもバリデーションセンターが設立された。いよいよ国際的なバリデーションセンター時代の幕開けである。これらセンターの混乱を避ける理由もあり、2009 年 4 月には代替試験法協力国際会議 (ICATM : International Cooperation on Alternative Test Methods) が設立され³⁵⁾、代替法の開発に国際協調の重要性が謳われている。この ICATM が設立された理由は、限られた人的・物量的な資源の中、それぞれのセンターが重複した検討を避け、代替法研究を加速することにある。

ただ、欧米のセンターは米国の Alternative Research & Development Foundation³⁶⁾、CAAT (Johns Hopkins Center for Alternatives to Animal Testing)³⁷⁾ や EU 内の各国の専門機関 FRAME (Fund for

the Replacement of Animals in Medical Experiments)³⁸⁾、NCA (Netherlands Center for Alternatives to animal use)³⁹⁾、NC3R (UK National Center for the Replacement, Refinement and Reduction of Animals in Research)⁴⁰⁾ や ZEBET (German Center for the Documentation and Evaluation of Alternatives to Animal Experiments)⁴¹⁾、EPAA (European Partnership for Alternative Approaches to Animal Testing)⁴²⁾ というような歴史ある助成機関や代替法専門研究機関を下地にしており、我が国と研究者の層が違うことを認識しておかねばならない。

2.5 代替法に関する欧米の取り組み

2004 年以降、多くの代替法が OECD でテストガイドラインとして認められるようになった。表 1 に示すように、2001 年以降に認められた動物実験の 3R に関する試験法を示す。光毒性試験⁴³⁾、腐食性試験⁴⁴⁻⁴⁶⁾ などである。

化粧品の規制を考慮に入れ、2008 年には、三つの局所刺激性試験のガイドライン案が OECD に提出された²³⁾。一つは培養表皮モデル EPISKIN を用いた *in vitro* 皮膚刺激性試験である。ECVAM 科学諮問委員会 (ESAC : ECVAM Scientific Advisory Committee) の認証を経て⁴⁷⁾、EU から OECD に提出された。さらに、ESAC は他の培養表皮モデル EpiDerm や SkinEthics をも認証し⁴⁸⁾、これらを合わせ、2010 年にテストガイドライン No. 439 として承認されている⁴⁹⁾。

後の二つは眼刺激性試験代替法 BCOP (Bovine Corneal Opacity/Permeability Assay : 牛摘出角膜混濁試験) および ICE (Isolated Chicken Eye Assay : 鶏摘出眼球試験) である。いずれも腐食性・強い眼刺激性を検出できる方法として ICCVAM から提案され⁵⁰⁾、ECVAM も認証した⁵¹⁾。これら代替法は異例の早さで 2009 年 9 月に OECD テストガイドラインとなった^{52,53)}。昨今では、これらの素材に病理学的な評価を組合せ、弱い刺激性を評価しようというガイダンスが検討中である²³⁾。さらに、ECVAM では眼刺激性試験の代替法として、過去に実施された細胞毒性試験 (ニュートラルレット放出試験、赤血球試験、蛍光物質放出およびマイクロフィジオロメーターの各試験) の回顧的なバリデーションを行い、ESAC は 2009 年 7 月、蛍光物質放出試験およびマイクロフィジオロメーター試験を限定的な使用で認証した⁵⁴⁾。これらの試験法は、OECD テストガイドラインとして検討されること

表 1 2001 年以降成立した動物実験 3R に関する OECD テストガイドライン (TG)

Method	International Acceptance
CORROSITEX Skin Corrosivity Test	OECD TG 435 (2006)
EpiSkin Skin Corrosivity Test	OECD TG 431 (2004)
EpiDerm Skin Corrosivity Test	OECD TG 431 (2004)
SkinEthic RHE Skin Corrosivity Test	OECD TG 431 (2004)
EST-1000 Skin Corrosivity Test	OECD TG 431 (2004)
Rat TER Skin Corrosivity Test	OECD TG 431 (2004)
<i>In vitro</i> reconstructed human epidermis test methods EpiDerm, EPISKIN, SkinEthic RHE	OECD TG 439 (2010)
3T3 NRU Phototoxicity Test	OECD TG 432 (2004)
Bovine Corneal Opacity and Permeability (BCOP) Test Method	OECD TG 437 (2009)
Isolated Chicken Eye (ICE) Test Method	OECD TG 438 (2009)

Method	International Acceptance
Updated Murine local lymph node assay (LLNA) for skin sensitization (20% reduction)	OECD TG 429 (2010)
Reduced LLNA (rLLNA)	OECD TG 429 (2010)
Nonradioactive LLNA protocol, LLNA : BrdU-ELISA	OECD TG 442B (2010)
Nonradioactive LLNA protocol, LLNA : DA	OECD TG 442A (2010)
Up and Down Procedure (UDP)	OECD TG 425 (2001)
<i>In vitro</i> micronucleus test	OECD TG 487 (2010)
Fixed Dose Procedure (FDP)	OECD TG 420 (2001)
Acute Toxic Class Method (ATC)	OECD TG 423 (2001)
Inhalation toxicity - acute toxic class method	OECD TG 436 (2009)
Stably transfected human estrogen receptor- α transcriptional activation assay for detection of estrogenic agonist-activity of chemicals	OECD TG 4 55 (2009)

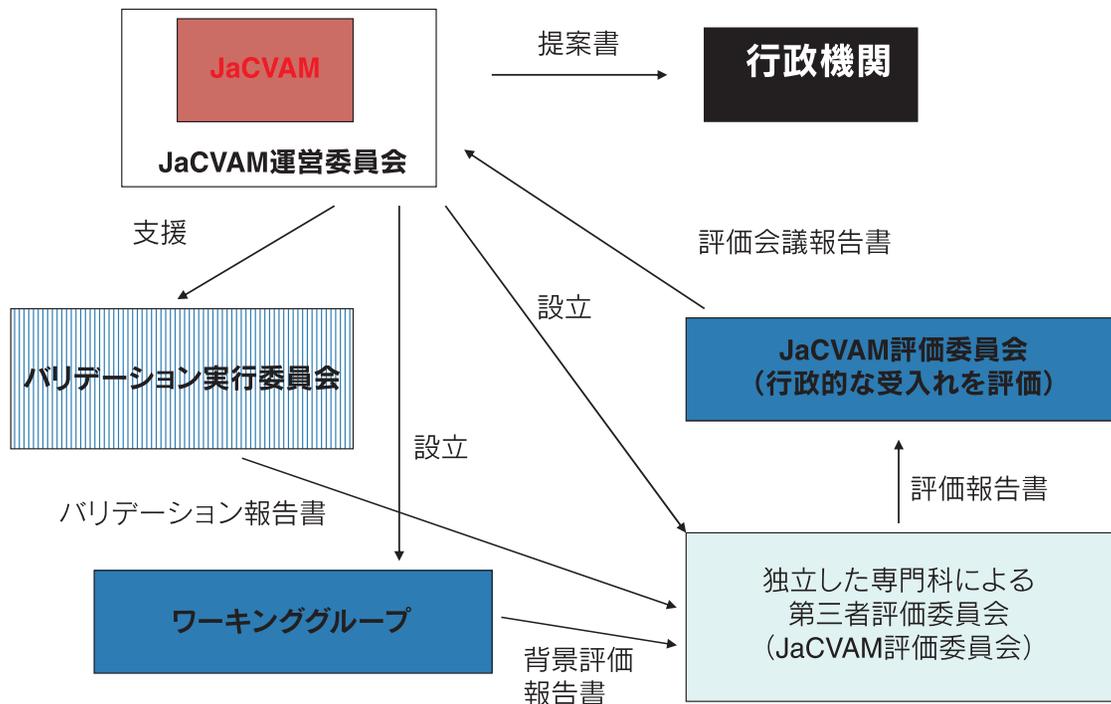


図 3. JaCVAM の試験法評価システム

が 2010 年 3 月に決まっている²³⁾。なお、次のステップとして、EpiOcular、SkinEthics などの培養角膜モデルのバリデーションが進捗中である。

もう一つの開発を急がねばならない代替法である急性毒性試験については、ICCVAM から細胞毒性試験で急性毒性試験の最高適用濃度を定めるといふ第三者評価報告書⁵⁵⁾が 2009 年、OECD に提案され、2010 年にガイダンスとして承認されている⁵⁶⁾。

また、*in vitro* 皮膚感作性試験代替法のプレバリデーションが ECVAM で始まった²⁰⁾。本試験の代替法として、ペプチド結合試験⁵⁷⁾および細胞株を用いた試験が挙がっており⁵⁸⁻⁶⁰⁾、株式会社資生堂および花王株式会社が日本化粧品工業連合会の有志や COLIPA の協力を得て開発を進めてきたヒト細胞株活性化試験 (Human Cell Line Activation Test : h-CLAT) をも含めた検討が、2010 年 3 月に開始された²³⁾。

一方、10 年以上前に問題となった環境ホルモンの検出 (スクリーニング) を指標としたガイドラインが Stably Transfected Human Estrogen Receptor-alpha Transcriptional Activation Assay for Detection of Estrogenic Agonist (STTA) NO.455 が 2009 年に成立し⁶¹⁾、H295R Steroidogenesis Assay の成立が 2011 年に予定されている²³⁾。

繰り返しになるが、これら試験法の開発を支えているものは、EU や米国における研究資金である。EPAA という政府と産業界が資金を出し合う団体にて、適切な資金・資源の提供を通して、代替法の開発やバリデーションを加速し、安全性評価のための代替法の行政による承認の迅速化を目指している⁴²⁾。また、動物愛護国際協会 (Humane Society International) の支援も貢献度が高い⁶²⁾。現在でも、これら団体等により EU での第 7 次の研究支援がな

されており、さらに AXLR8 (accerate) という第三者評価により、研究が推進されている⁶³⁾。

一方、米国においても、NAS は 21 世紀の毒性試験の中で、“包括的な *in vitro* 試験の利用は、ヒトの生物学に基づいた細胞や分子システムと関連する生物学的挙動を明確にし、最終的には、作用機構を基にしたアプローチにより、動物実験の必要性を排除できるかもしれない”と述べている⁶⁴⁾。

また、米国毒性プログラム (NTP : National Toxicology Program) により開発およびバリデートされた試験方法は動物実験の 3R を可能にする。NTP のロードマップの活動と試験法は、規制当局への価値を最大化するため、ICCVAM との協力および協議を促すと述べている⁶⁵⁾。さらに、米国環境省 (EPA : Environmental Protection Agency)、米国環境健康科学研究所 (NIEHS : National Institutes of Environmental Health Sciences)、米国衛生研究所 (NIH : National Institutes of Health) / 米国ヒトゲノム研究所 (NCGC : NIH Chemical Genomics Center) および FDA が進めている ToxCast というプロジェクトでは⁶⁶⁾、化学物質のリスク評価のためのツールとして、ハイスループットシステムを検討している。特に、EPA の戦略では、1) 将来の化学物質のスクリーニングや優先順位付けのための毒性経路情報の利用、2) リスク評価における毒性経路情報の利用、3) 技術移転を主眼としている。

3. 国内の動向 -2-

さて、欧米の状況から世界の潮流を理解して頂いたところで、もう一度、国内の動向、特に代替法に特化して説明していきたい。

3.1 日本動物実験代替法学会の動向

日本動物実験代替法学会は⁶⁷⁾、設立されて20年を越える世界で初めて設立されたの代替法に関する学会である。これまで、日本でも眼刺激性、皮膚刺激性、感作性、光毒性試験などの代替法についてバリデーションや第三者評価を行ってきた⁶⁸⁾。これらの内容はレベルの高いものであり、欧米での評価は高い。

2007年8月に第6回国際動物実験代替法会議(6th World Congress on Alternatives & Animal Use in the Life Sciences: WC6)⁶⁹⁾、2008年2月にWC6フォローアップをいずれも東京で開催し⁷⁰⁾、日本国内での盛り上がり以上に日本の活動に対する国際的な評価が高い。大会の内容も世界のトップレベルに近いものであったと感じている。ただし、残念ながら、日本は世界の代替法研究の中心にはいない。よって、その情報は欧米から遠く、高い代替法開発の技術を持ちながら、その技術を利用して、世界のニーズに対応させるという戦略が欠けているようである。

3.2 代替法のための機関

欧米の組織と同様、日本においても置き換えや動物数の削減につながる新規または改良代替法の開発・評価のために、2005年11月に国立医薬品食品衛生研究所 安全性生物試験研究センター内に新規試験法評価室が設立された⁷¹⁻⁷⁴⁾。この部署の業務の一つが新規または改良試験法の評価という活動である。この活動を我々はJaCVAM (Japanese Center for the Validation of Alternative Methods)と呼んでいる⁷⁵⁾。JaCVAMの活動目的は、1)日本における動物実験の3Rの普及、2)国際協調を重視した新規動物実験代替法の公定化である。その試験法検証のための組織を図3に示す。試験法毎にバリデーション、ワーキンググループ、第三者評価の組織を構築し、それらの報告書を受け、行政的な受入れ評価を行い、公定化に支障のない試験法を行政機関に提案している。残念ながら、JaCVAMは欧米のセンターのような法的な裏付けを持たず、永続的な活動ではない。しかし、ICATMの主要メンバーとして国際的な期待および、その評価は高い。これは、日本人の本分野における活躍への期待が大きいからと認識している。具体的に言えば、試験法の開発・改良、バリデーションへの参画は日本人に向けており、現時点では研究者層は薄くとも、代替法研究の加速を期待させるからと感じている。

3.3 JaCVAMの活動

3Rの国際動向に応えるため、JaCVAMでは、眼刺激性、皮膚刺激性、感作性、光毒性試験などの代替法について、日本独自のバリデーションや第三者評価を実施してきた。これまでJaCVAMが承認し、行政に提案した試験法を表2にまとめた。また、現在関与しているバリデーションを表3に記載した。これらの情報はJaCVAMホームページで逐次更新しており、最新情報を入手してほしい⁷⁶⁾。以下には昨今、大きな進捗がある安全性試験法を紹介する。

1) 腐食性、皮膚刺激性試験

腐食性試験の代替法として、日本製の培養皮膚モデル Vitrolife-Skinの正当性をJaCVAM評価会議が認証した⁷⁶⁾。

また、皮膚刺激性試験の代替法としてESACにより認証された培養表皮モデルEPISKINについて⁴⁷⁾、JaCVAM皮膚刺激性評価委員会がESACの認証内容を確認し、JaCVAM評価会議が認証した⁷⁷⁾。一方、日本製の培養表皮モデルLabCyte EPI-MODEL(株式会社J-TEC)については⁷⁸⁾、2008-2009年に日本動物実験代替法学

表2 JaCVAM 評価会議によって認証された動物実験代替法

No.	Test Method
1	<i>In vitro</i> skin corrosion testing : Vitrolife-Skin, EpiDerm
2	The Bovine Corneal Opacity and Permeability (BCOP) Test Method for Identifying Ocular Corrosives and Severe Irritants
3	The Isolated Chicken Eye (ICE) for Identifying Ocular Corrosives and Severe Irritants
4	Skin sensitization assay, LLNA : DA
5	Skin sensitization assay, LLNA : BrdU-ELISA
6	<i>In vitro</i> skin irritation testing : EPISKIN

表3 JaCVAM が実験に参加している国際バリデーション研究

試験法	終了予定時期	参加施設	目標
遺伝毒性試験 <i>in vivo</i> コメットアッセイ	2011年秋	14施設(内、日本からは4施設)	OECDテストガイドライン
遺伝毒性試験 <i>in vitro</i> コメットアッセイ	不明	7施設(内、日本からは1施設)	OECDテストガイドライン
発癌性試験スクリーニング Bhas 形質転換試験	2010年10月終了	3施設(すべて国内)	OECDテストガイドライン
内分泌かく乱試験スクリーニング STTA-antagonist アッセイ	2011年3月	3施設(内、日本から2施設)	OECDテストガイドライン
内分泌かく乱試験スクリーニング CCi アッセイ	2011年1月	3施設(内、日本から1施設)	OECDテストガイドライン
皮膚刺激性試験 LabCyte EPI-MOEDL	2010年12月終了	3施設(すべて国内)	OECDテストガイドライン
眼刺激性試験 STE法	2010年12月終了	3施設(すべて国内)	未定
光毒性試験 ROS アッセイ	2011年	未定(すべて国内)	ICHガイドライン
皮膚感作性試験 h-CLAT	2011年	4施設(内、日本から2施設)	EU認証

会で実施されたバリデーションおよび2010年のJaCVAM主導の追加バリデーションにおいて、EPISKINと同程度の予測性を持つことが検証された。LabCyte EPI-MODELについてはOECDガイドラインへの掲載を目指している。

2) 眼刺激性試験

BCOPやICEについても、JaCVAM眼刺激性評価委員会がICCVAMの認証内容を確認し、JaCVAM評価会議が認証した⁵⁰⁾。さらに、1998年に厚生労働科学研究補助金を得て作成された「細胞毒性試験による眼刺激性試験代替法のガイダンス」について^{79,80)}、上記評価委員会にて第三者評価が進行している。また、株式会社花王で開発された細胞毒性試験STE(Short Time Exposure)⁸¹⁾のバリデーションが日本動物実験代替法学会およびJaCVAM主催で実施された。

3) 感作性試験

日本が提案したリンパ節中のATP量の変化を指標としたLLNA-DA法⁸²⁾やBrdUの取り込みを指標としたLLNA-BrdU ELISA法⁸³⁾が、JaCVAM評価会議で認証されるとともに^{84,85)}、2010年にOECDテストガイドラインとなった^{86,87)}。一方、前述したよう

に、h-CLAT^{58,59)}のバリデーション研究を ECVAM とともに実施している。

4) 光毒性試験

活性酸素種 (Reactive oxygen species: ROS) を指標とした光毒性試験が光毒性の予測に有用であるとの報告を受け⁸⁸⁾、日本製薬工業会の支援を受け、バリデーションを実施している。なお、資生堂株式会社にて酵母・赤血球を用いた光毒性試験の組合せ法は⁸⁹⁻⁹¹⁾、JaCVAM 評価会議でバリデーション結果が不十分と判断されている⁹²⁾。

5) 遺伝毒性試験

コメットアッセイについては⁹³⁾、日本環境変異原学会／哺乳類変異原性 (MMS) 研究会、欧米の研究機関と協力して国際的なバリデーションを進めている。*in vivo* 試験に関しては、最終的なバリデーションの段階にある。*in vitro* 試験に関しては、プロトコルを定めるプレバリデーションの段階にある。

また、イニシエーションに加え、プロモーターも検出できる形質転換試験法 Bhas アッセイについては⁹⁴⁾、独立行政法人新エネルギー・産業技術総合開発機構 (NEDO) プロジェクトでバリデートされ、OECD にテストガイドラインとしての申請を行っている²³⁾。

6) 内分泌かく乱物質スクリーニング

前述したテストガイドライン STTA 法は⁶¹⁾、化学物質評価研究機構 (CERI) によって開発された。現在では、このテストガイドラインにアンタゴニストの評価系も加えるべく、バリデーションを実施している。

また、同様に CERI および大塚製薬株式会社によって開発されたアンドロゲンの検出試験においても、テストガイドライン案を OECD に提出している²³⁾。

7) 急性毒性試験

日本薬局方には、プラスチック容器の品質管理のため、急性毒性試験に代わり、細胞毒性試験を推奨している⁹⁵⁾。さらに、ゴム製品の品質管理のために細胞毒性試験の利用を検討している⁹⁶⁾。

8) 発熱性物質試験

欧州薬局方 (European Pharmacopoeia: EP) に掲載された主にヒト血液を用いる *in vitro* 試験に関しては⁹⁷⁾、バリデーション結果が不十分と、ICCVAM⁹⁸⁾ および JaCVAM 評価会議で判断されている⁹⁹⁾。

4. 終わりに

動物福祉問題イコール、3R である。ただ、実験動物に携わる方々とお話しして感じるの、3R を持ち出せば、とりあえず既得権を確保できる、免罪符という発想である。確かに、獣医師も Refinement の面では福祉的な配慮をされているが、削減や置換えの知識やその方策を全くお持ちでないことに愕然とする。上記してきたように、公定な代替法の開発には多額の経費と長い時間が掛かることさえも知らない方が多い。欧米の追従でなく、「動物実験 3R は日本にとって得意芸に近い分野であり、国際的な信用を高め、ビジネスチャンスをつかむ好機である」というように発想を変えて頂きたいものである。欧米の期待を横目で見ながら、手を拱いている時間はない。既存の殻を破るため、皆さんの技術を世界に広めるために、今後も JaCVAM 活動に努めてきたいと考えている。

謝辞

バリデーションを進めるにあたり、日本動物実験代替法学会、厚生労働科学研究からの支援に感謝致します。また、試験法の評価に協力頂きましたすべての JaCVAM 関係者に感謝致します。

[参考文献]

- 1) 動物の愛護及び管理に関する法律 (2010) Available at: http://www.env.go.jp/nature/dobutsu/aigo/amend_law2/law.pdf
- 2) 実験動物の飼養及び保管並びに苦痛軽減に関する基準 (2006) Available at: http://www.env.go.jp/nature/dobutsu/aigo/law_series/nt_h180428_88.html
- 3) 動物の愛護及び管理に関する施策を総合的に推進するための基本的な指針 (2006) Available at: http://www.env.go.jp/nature/dobutsu/aigo/2_data/laws/guideline_h181031.pdf
- 4) 文部科学省 研究機関等における動物実験等の実施に関する基本指針 (2010) Available at: http://www.mext.go.jp/b_menu/hakusho/nc/06060904.htm
- 5) 厚生労働省 厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針 (2010) Available at: <http://www.mhlw.go.jp/general/seido/kousei/i-kenkyu/dobutsu/0606sisin.html>
- 6) 農林水産省 農林水産省の所管する研究機関等における動物実験等の実施に関する基本指針 (2010) Available at: http://www.maff.go.jp/www/press/2006/20060601press_2b.pdf
- 7) 日本学術会議 動物実験の適正な実施に向けたガイドライン (2010) Available at: <http://www.scj.go.jp/ja/info/kohyo/pdf/kohyo-20-k16-2.pdf>
- 8) 重茂浩美, “動物実験に関する近年の動向、科学技術動向”, **2006**, 10-20.
- 9) 中央環境審議会動物愛護部会 (2010) Available at: <http://www.env.go.jp/council/14animal/yoshi14.html>
- 10) 鍵山直子, “動物愛護管理法における 3R 原則の明文化と実験動物の適正な飼養保管”, 日獣会誌, **2010**, 395-398.
- 11) AAALAC International Association (2010) Available at: <http://www.aaalac.org/>
- 12) 佐々木弥生 (2008) Available at: http://wwwsoc.nii.ac.jp/jsaae/WC6_followup/WC6_Follow_Sasaki.pdf
- 13) 大学法人動物実験施設協議会 (2010) Available at: <http://www.kokudoukyou.org/annai/>
- 14) 日本動物実験協同組合 (2010) Available at: <http://www.labanimal.org/freme.html>
- 15) United Kingdom Protection of Animals Act (2000) Available at: <http://www.veggieglobal.com/protection-of-animals-act-uk.htm#2000>
- 16) Update on the revision of EU lab animal laws (2010) Available at: <http://www.rspca.org.uk/ImageLocator/LocateAsset?asset=document&assetId=1232720902775&mode=prd>
- 17) Commission Staff Working Documents; Time Tables for the phasing-out of animal testing in the framework of the 7th Amendment to the Cosmetics Directive (Council Directive 76/768/EEC); EN, SEC82004)1210 (2004).
- 18) ECH (2008) Available at: http://ec.europa.eu/echa/home_en.html
- 19) COLIPA (2010) Available at: <http://www.colipa.eu/about-colipa-the-european-cosmetic-cosmetics-association.html>
- 20) ECVAM (2010) Available at: <http://ecvam.jrc.ec.europa.eu/>
- 21) T. Hartung, (2006) Available at: <http://wwwsoc.nii.ac.jp/jsaae/20kai.html>
- 22) JRC (2010) Available at: http://www.vet.uu.nl/nca/userfiles/other/REACH_and_the_need_for_intelligent_testing_strategies.pdf#search=Integrated%20Testing%20Strategies%20REACH
- 23) OECD (2010) Available at: http://www.oecd.org/document/55/0,3343,en_2649_34377_2349687_1_1_1_1,00.html

- 24) Animal Welfare Act, Available at: http://awic.nal.usda.gov/nal_display/index.php?info_center=3&tax_level=3&tax_subject=182&topic_id=1118&level3_id=6735&level4_id=0&level5_id=0&placement_default=0
- 25) Health Research Extension Act, Available at: <http://grants.nih.gov/grants/olaw/references/hrea1985.htm>
- 26) ILRA (2010) Available at: <http://dels.nas.edu/ilar/>
- 27) OIE (2010) Available at: http://www.oie.int/eng/bien_etre/en_introduction.htm
- 28) Y. Ohno, *ILAR Journal*, **2002**, *43*, s95-98.
- 29) 厚生労働省 (2010) Available at: <http://www.mhlw.go.jp/houdou/2008/08/h0814-1.html>
- 30) OECD (2005) OECD Series on testing and assessment Number 34, Guidance document on the validation and international acceptance of new or updated test methods for hazard assessment, *ENJ/JM/MONO* (2005) 14
- 31) ICCVAM (1997) Validation and regulatory acceptance of toxicological test methods: a report of the ad hoc Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods. *NIH Publication* No: 97-3981, 1997, National Institute of Environmental Health Sciences (NIEHS)
- 32) ICCVAM (2010) Available at: http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/ocutox_docs/EPreport/ocu_report.htm
- 33) KoCVAM (2010) Available at: <http://www.nifds.go.kr/nitr/contents/m91100/view.do>
- 34) O. A. Presgrave, *Altern Lab Anim.*, **2008**, *36*(6), 705-8.
- 35) ICATM (2010) Available at: <http://iccvam.niehs.nih.gov/about/icatm.htm>
- 36) Alternative Research & Development Foundation (2010) Available at: <http://www.ardf-online.org/>
- 37) CAAT (2010) Available at: <http://caat.jhsph.edu/>
- 38) FRAME (2010) Available at: <http://www.frame.org.uk/>
- 39) NCA (2010) Available at: <http://www.nca-nl.org/>
- 40) NC3R (2010) Available at: <http://www.nc3rs.org.uk/>
- 41) ZEBET (2010) Available at: <http://www.bfr.bund.de/cd/1591>
- 42) EPAA (2010) Available at: http://ec.europa.eu/enterprise/epaa/index_en.htm
- 43) OECD (2004) Test Guideline NO. 432: *in vitro* 3T3 NRU phototoxicity testing. OECD Guideleine for the Testing of Chemicals. Paris, France.
- 44) OECD (2004) Test Guideline No. 430: *In Vitro* Skin Corrosion: Transcutaneous Electrical Resistance Test (TER), OECD Guideleine for the Testing of Chemicals. Paris, France.
- 45) OECD (2004) Test Guideline No. 431: *In Vitro* Skin Corrosion: Human Skin Model Test, OECD Guideleine for the Testing of Chemicals. Paris, France.
- 46) OECD (2006) Test Guideline No. 435: *In Vitro* Membrane Barrier Test Method for Skin Corrosion, OECD Guideleine for the Testing of Chemicals. Paris, France.
- 47) ECVAM (2007) Statement on the validity of *in-vitro* tests for skin irritation, issued by the ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC26), 27 April 2007. Available at: <http://ecvam.jrc.ec.europa.eu/>
- 48) ECVAM (2008) Statement on the scientific validity of *in-vitro* tests for skin irritation testing, issued by the ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC29), 5 November 2008. Available at: <http://ecvam.jrc.ec.europa.eu/>
- 49) OECD (2010) Test Guideline No. 439: *In Vitro* Skin Irritation *Reconstructed Human Epidermis Test Method*, OECD Guideleine for the Testing of Chemicals. Paris, France.
- 50) ICCVAM (2010) Available at: <http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ocutox.htm>
- 51) ESAC (2009) Statement on the Conclusions of the ICCVAM Retrospective Study on Organotypic *In Vitro* Assays as Screening Tests to Identify Potential Ocular Corrosives and Severe Irritants.
- 52) OECD (2010) Test Guideline No. 437: Bovine Corneal Opacity and Permeability Test Method for Identifying Ocular Corrosives and Severe Irritants, OECD Guideleine for the Testing of Chemicals. Paris, France.
- 53) OECD (2010) Test Guideline No. 438: Isolated Chicken Eye Test Method for Identifying Ocular Corrosives and Severe Irritants, OECD Guideleine for the Testing of Chemicals. Paris, France.
- 54) ESAC (2009) ESAC statement on the scientific validity of two *in vitro* eye irritation test methods.
- 55) ICCVAM (2010) Available at: <http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/acute/acute.htm>
- 56) OECD (2010) No 129: Guidance Document on using Cytotoxicity Tests to Estimate Starting Doses for Acute Oral Systemic Toxicity Tests, OECD Guideleine for the Testing of Chemicals. Paris, France.
- 57) G. F. Gerberic, J. D. Vassallo, R. E. Bailey, J. G. Chaney, S. W. Morral and J. P. Lepoittevin, *Toxicol. Science*, **2004**, *81*, 332-343.
- 58) T. Ashikaga, Y. Yoshida, M. Hirota, K. Yoneyama, H. Itagaki, H. Sakaguchi, M. Miyazawa, Y. Ito, H. Suzuki and Toyoda, *Toxicol in Vitro*, **2006**, *767-773*.
- 59) H. Sakaguchi, T. Ashikaga, M. Miyazawa, Y. Yoshida, Y. Ito, K. Yoneyama, M. Hirota, H. Itagaki, H. Toyoda and H. Suzuki, *Toxicol in Vitro*, **2006**, *774-784*.
- 60) P. Aeby, T. Ashikaga, S. Bessou-Touya, A. Schepky, F. Gerberick, P. Kern, M. Marrec-Fairley, G. Maxwell, J. M. Ovigne, H. Sakaguchi, K. Reisinger, M. Tailhardat, S. Martinuzzi-Teissier and P. Winkler, *Toxicol in Vitro*, **2010**, *24*(6), 1465-73.
- 61) OECD (2009) Test Guideline Test No. 455: The Stably Transfected Human Estrogen Receptor-alpha Transcriptional Activation Assay for Detection of Estrogenic Agonist-Activity of Chemicals, OECD Guideleine for the Testing of Chemicals. Paris, France.
- 62) Humane Society International (2010) Available at: <http://www.hsi.org.au/>
- 63) AXLR8 (2010) Available at: <http://www.axlr8.eu/workshops/>
- 64) National Research Council (2007) Toxicity Testing in the 21st century, A vision and a strategy, The National Academies Press, Washington, D.C., USA
- 65) A National Toxicology Program for the 21st century (2010) Available at: <http://ntp.niehs.nih.gov/files/NTPrdmp.pdf>
- 66) ToxCast (2010) Available at: <http://www.epa.gov/nct/toxcast/summit.html>
- 67) 日本動物実験代替法学会 (2010) Available at: <http://www.asas.or.jp/jsaa/>
- 68) 小島肇夫, *LABIO21*, **2009**, *38*, 17-20.
- 69) Proceedings of 6th World Congress on Alternatives & Animal Use in the Life Sciences, *Altern. Animal Test. Experiment*, **2008**, *14*, Special Issue.
- 70) WC6 フォローアップシンポジウム「3Rsに基づく動物実験の規制と第三者認証」抄録集 (2008).
- 71) 大野泰雄, 国立衛研報, **2004**, *122*, 1-10.
- 72) 小島肇夫, 化粧品技術者会誌, **2006**, *40*(4), 263-268.
- 73) 小島肇夫, 薬学雑誌, **2008**, *128*(5), 747-752.
- 74) 小島肇夫, コスメティックステージ, **2010**, *4*(5), 56-61.
- 75) JaCVAM (2010) Available at: <http://jacvam.jp/>
- 76) JaCVAM 提案書 (2008) 腐食性試験代替法: 「3 次元培養ヒト皮膚モデル (Vitrolife-skinTM) を用いた腐食性試験」.
- 77) JaCVAM 提案書 (2009) 皮膚刺激性試験代替法: 「ヒト皮膚モデル (三次元皮膚 EPISKIN) を用いた皮膚刺激性試験代替法」.
- 78) M. Katoh, F. Hamajima, T. Ogasawara and K. I. Hata, *Journal of Toxicological Science*, **2009**, *34*(3), 327-334.
- 79) Y. Ohno, et al., *Toxicology in Vitro*, **1999**, *13*, 73-98.
- 80) 大野泰雄 他, *Altern. Animal Test. Experiment*, **2005**, *10*(2), 54-157.
- 81) Y. Takahashi, M. Koike, H. Honda, Y. Ito, H. Sakaguchi, H. Suzuki and N. Nishiyama, (2008) *Toxicology in Vitro*, **2008**, *22*, 760-770.
- 82) K. Yamashita, K. Idehara, N. Fukuda, M. Yamagishi and N. Kawada,

- Altern. Animal Test. Experiment*, **2005**, 11(2), 136-144.
- 83) M. Takeyoshi, K. Yamasaki, Y. Yakabe and I. Kimber, *Toxicol. Lett.*, **2001**, 119, 203-208.
- 84) JaCVAM 提案書(2008)皮膚感作性試験代替法：「皮膚感作性試験代替法(LLNA-DA法)」
- 85) JaCVAM 提案書(2009)皮膚感作性試験代替法：「皮膚感作性試験代替法(LLNA-BrdU)」
- 86) OECD (2010) Test Guideline Test No. 442A: Skin Sensitization *Local Lymph Node Assay: DA*, OECD Guideleins for the Testing of Chemicals. Paris, France.
- 87) OECD (2010) Test Guideline Test No. Test No. 442B: Skin Sensitization *Local Lymph Node Assay: BrdU-ELISA*, OECD Guideleins for the Testing of Chemicals. Paris, France.
- 88) S. Onoue, N. Igarashi, Y. Yamauchi, S. Yamada and Y. Tsuda, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **2008**, 46(1), 187-93.
- 89) M. Sugiyama, H. Itagaki, T. Hariya, N. Murakami and S. Kato, *Altern. Animal Test. Experiment*, **1994**, 2, 183-191.
- 90) M. Sugiyama, H. Itagaki and S. Kato, (1994) *Altern. Animal Test. Experiment*, **1994**, 2, 193-202.
- 91) M. Mori, M. Hoya, M. Sugiyama and H. Itagaki, *Altern. Animal Test. Experiment*, **2003**, 10(1), 1-17.
- 92) JaCVAM 評価報告書 (2010) 光毒性試験代替法：「酵母光生育阻害試験と赤血球光溶血性試験の組み合わせによる光毒性試験代替法」
- 93) R. R. Tice, E. Agurell, D. Anderson, B. Burlinson, A. Hartmann, H. Kobayashi, Y. Miyamae, E. Rojas, J. C. Ryu, Y. F. Sasaki, *Environ Mol Mutagen.*, **2000**, 35(3), 206-21.
- 94) A. Sakai, C. Suzuki, Y. Masui, A. Kuramashi, K. Takatori and N. Tanaka, *Mutat Res.*, **2007**, 630(1-2), 103-11.
- 95) 柘植英哉, 森 充生, 大庭澄明, 大内 正, 寺田三郎, 五島隆志, 田邊豊重, 山影康次, 田中憲穂, 渡辺美香, 畔上二郎, 大向英夫, 小島 肇, 医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス, 2011.
- 96) 厚生省薬務局医療機器開発課監修, “医療用具および医用材料の基礎的な生物学的試験のガイドライン解説”, 薬事日報社, 東京, 1996.
- 97) Bacterial Endotoxin, European Pharmacopoeia 5.0, **2005**, 161-168.
- 98) ICCVAM (2010) Available at: <http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/pyrogen/pyrogen.htm>
- 99) JaCVAM 評価報告書 (2010) *in vitro* 発熱性物質試験.

略歴

名前：小島 肇(ペンネーム：小島 肇夫) Hajime Kojima, Ph.D.
 学位：薬学博士
 所属・役職：国立医薬品食品衛生研究所 安全性生物試験研究センター 薬理部 新規試験法評価室 室長
 藤田保健衛生大学 医学部 客員講師
 連絡先：〒158-8501 東京都世田谷区上用賀 1-18-1
 TEL: 03-3700-9874 FAX: 03-3700-1145
 e-mail: h-kojima@nihs.go.jp

生年月日：昭和35年4月9日生(50歳)

略歴：昭和58年 岐阜大学・農学部農芸科学科卒業
 同年 日本メナード化粧品株式会社入社
 昭和59～61年 国立遺伝学研究所・形質遺伝部留学
 平成8年 長崎大学薬学部にて博士号取得
 平成17年 国立医薬品食品衛生研究所 入所

専門：毒性学、変異原性、組織培養

学会活動：

- ・日本動物実験代替法学会 評議員、理事、副会長
- ・日本皮膚アレルギー・接触皮膚炎学会 評議員
- ・日本環境変異原学会 評議員
- ・日本トキシコロジー学会
- ・安全性評価研究会
- ・日本動物細胞工学会
- ・Society of Toxicology

国際協力

- ・ESAC (ECVAM: European Center for the Validation of Alternative Methods Scientific Advisory Committee), observer
- ・SACATM (Scientific Advisory Committee on Alternative Toxicological Methods, USA), observer
- ・ICH Center for the Validation Alternative Methods, observer
- ・ICCR Center for the Validation Alternative Methods, observer
- ・OECD Endocrine Disrupter Working Group, non-animal, observer
- ・OECD Test Guideline, National Coordinator

賞罰

- ・日本動物実験代替法学会 1998年論文賞受賞
- ・日本動物実験代替法学会 2000年論文賞受賞
- ・日本動物実験代替法学会 2003年論文賞受賞

「蛍光生物学」の最前線

1

生体機能イメージングを実現する 蛍光プローブの精密設計

神谷 真子・浦野 泰照
東京大学大学院医学系研究科

1. はじめに

小学校の理科で誰もが一度は触れたことがあるであろう、pH による BTB 溶液の色の变化、さらし粉によるアニリンの呈色、ヨウ素によるでんぷんの呈色反応。pH、アニリン、でんぷんといった直接目で観察することの出来ない分子が、BTB 溶液・さらし粉・ヨウ素といった試薬を加えるとなぜか特定の“色”に変化し視覚的に確認できるようになる……そんな現象に感動を覚えた方も少なくないだろう。これらは特定の条件下になると色が変化する原理を用いた検出法だが、色の变化の代わりに、特定の条件下でのみ“蛍光”を発するような試薬も知られている。“蛍光プローブ”

と呼ばれるこれらの試薬は、より高感度な検出が可能であるため、試験管の中だけでなく「生きている状態の生物試料」における種々の生理活性物質の動態をリアルタイムに観測する研究ツールとして、現在の生物学的研究には欠かせないものとなっている。「蛍光生物学」の最前線の第一回目である今回は、このような蛍光プローブの特徴や開発の経緯、また筆者らが確立してきた蛍光プローブのオリジナル設計法および本設計法に基づき開発した種々の蛍光プローブを紹介していきたいと思う。

2. 蛍光プローブとは

では、蛍光プローブとはどのような機能や特徴を持った分子なのだろうか？ 図 1(a) に、蛍光プローブを用いて「生きている」細胞を「生きたまま」観測する手法の原理を簡潔にまとめた。観測対象とする生理活性分子 (▽) の検出を考えると、ほとんどの生理活性物質は無色であるため、光学顕微鏡でただ観察してもその動きを知ることは出来ない。そこで、元々は無蛍光性であり、▽と反応・結合することで初めて蛍光を発する分子 (蛍光プローブ) を細胞内に存在させることで、▽の動きを蛍光の変化として、高感度かつリアルタイムに追うことが可能となる。このように、簡便かつ高感度に観測対象分子を可視化する蛍光プローブは、現在の生命科学研究や医学・薬学研究において欠かせないツールとなっている。

その端緒となったのが、1980 年に Tsien らにより開発された、Ca²⁺ イオン蛍光プローブの開発であった¹⁻³⁾。現在では、Ca²⁺ イオンが細胞内の情報伝達を司る代表的なセカンドメッセンジャーとして働いていることは、既に疑いの無い事実であるが、これは Ca²⁺ イオンを高感度かつ迅速に蛍光検出可能な蛍光プローブの

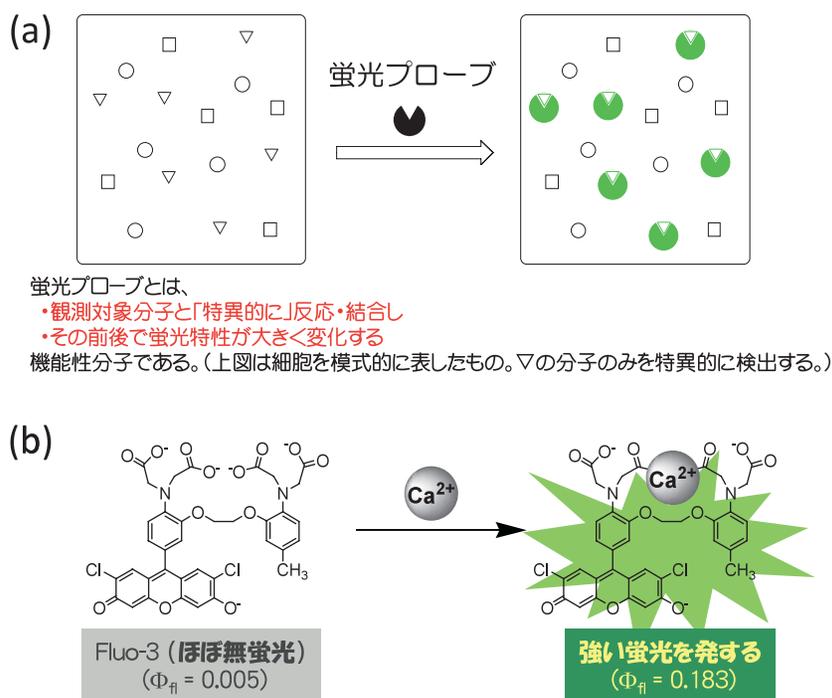


図1 (a) 蛍光プローブの機能 (b) 代表的な Ca²⁺ イオン検出蛍光プローブ Fluo-3 の、Ca²⁺ イオン結合前後における蛍光特性変化

開発によるところが極めて大きい。代表的な Ca^{2+} イオン検出蛍光プローブである Fluo-3 の構造と Ca^{2+} イオン検出の原理を図 1(b) に示した。Fluo-3 はフルオレセイン骨格と Ca^{2+} イオンキレーターである BAPTA 部位とが融合した構造であるが、 Ca^{2+} フリーの状態ではほぼ無蛍光であり、これが Ca^{2+} イオンと結合することでその蛍光強度が 36-40 倍に上昇する性質を持つことから、生細胞における Ca^{2+} イオンの挙動を初めて詳細に検討することが可能になったのである。

3. 分子内光誘起電子移動に基づく蛍光プローブの論理的精密設計法の確立

上述のように生細胞観測に極めて重要な役割を果たす蛍光プローブであるが、これまでに開発されてきた有機小分子蛍光プローブのほとんどは trial and error で開発されてきており、望みの機能を実現する蛍光プローブを狙って開発することは極めて困難であった。

そこで筆者らはこのような状況を打破し、目的の機能を有する蛍光プローブを論理的に精密に設計することを目標とした研究を行ってきた結果、光誘起電子移動 (Photoinduced Electron Transfer; PeT) を設計原理とする蛍光プローブの論理的なデザイン法を確立することに成功した。すなわち、例えば代表的な蛍光分子であるフルオレセインは、分子をベンゼン環部位と蛍光団であるキサントン環部位の 2 つに分けて考えることが可能であり、分子内 PeT によりその蛍光特性を精密に制御可能であることを

見出した (図 2(a))。具体的には、ベンゼン環部位の HOMO エネルギーレベルがある値よりも高いフルオレセイン誘導体は全てほぼ無蛍光であり、これが低い誘導体は全てフルオレセインと同等の強い蛍光を発することが明らかとなった (図 2(b))^{4,5)}。

以上の知見を発展させることで筆者らは、図 2(c) に示した蛍光プローブの論理的設計法の確立に成功した。すなわち、ある観測対象分子に対する蛍光プローブの開発を考える際、その観測対象分子と特異的に結合・反応し、かつその反応前後で基質の HOMO エネルギーレベルが大きく低下する化学反応 (分光学的な変化は一切必要ない) さえ知っていれば、これを活用して反応前は PeT によりほぼ無蛍光であり、反応後に PeT が起こらなくなることで強い蛍光を発するプローブを論理的に開発することが可能となった。

そこでまず筆者らは、上述の蛍光プローブデザイン法を活用して、各種活性酸素種 (ROS) の選択的検出を可能とする蛍光プローブの開発を試みた。活性酸素種 (ROS) は、炎症、ガンなど多くの疾患に関わるとされ、また近年では細胞内情報伝達物質としての役割も持つとの指摘もあり、ますます注目を集めている。一口に ROS と言っても、スーパーオキシド、過酸化水素、ヒドロキシラジカル、一重項酸素など多くの種が存在し、これらはそれぞれ特徴的な化学反応性を持つことから、生体内においても異なる役割を持つ可能性も高い。ROS 検出用蛍光プローブは、筆者らの研究以前にもいくつか開発され、中でもジクロロフルオレセインの 2 電子還元体である DCFH (Dichlorodihydrofluorescein) が広く用いられてきた。しかしながら DCFH には ROS 間の特異性は全くなく、また励起光を当てるだけで ROS の有無にかかわ

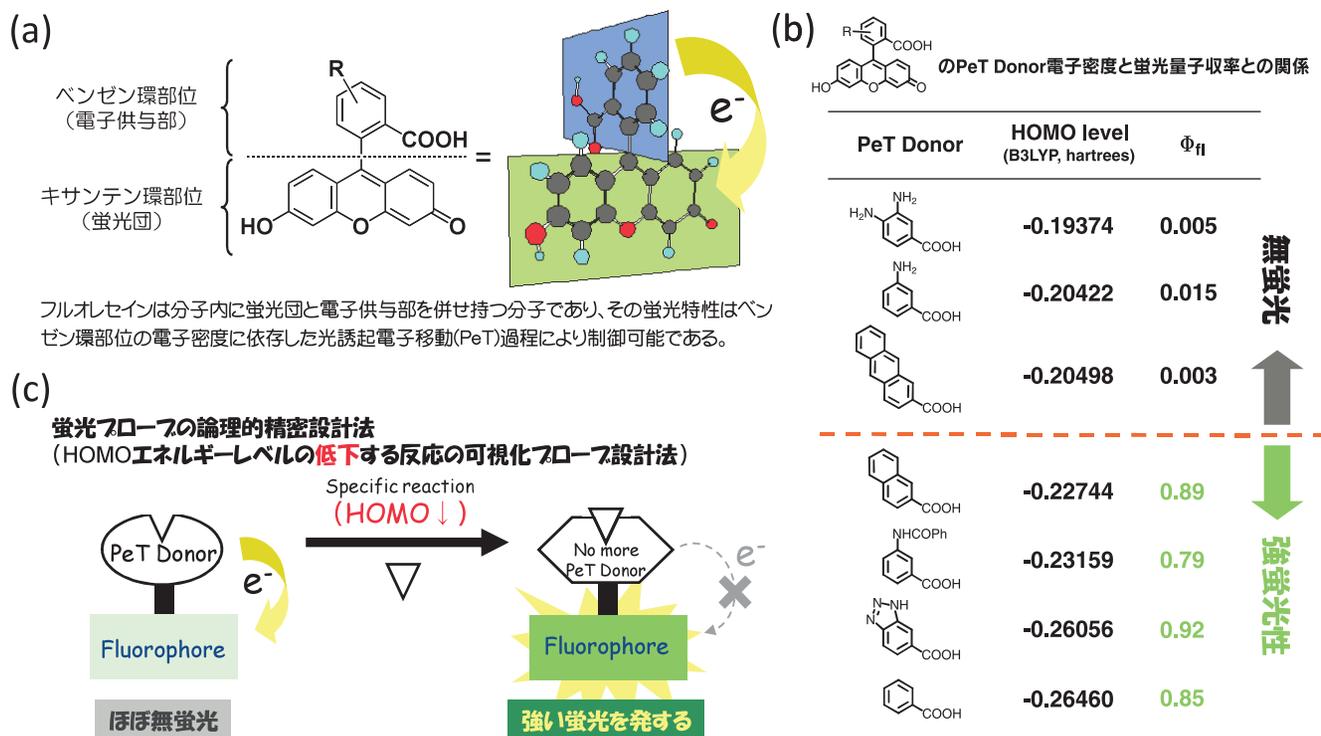


図 2 (a) 代表的な長波長励起蛍光分子であるフルオレセインは 2 つの部位に分割して考えることができる (b) フルオレセイン誘導体の蛍光量子収率は、ベンゼン環部位の HOMO エネルギーレベルに依存した光誘起電子移動の概念によって、精密に予測することが可能である (c) これまでに確立した、光誘起電子移動に基づく蛍光プローブの論理的精密設計法の一例

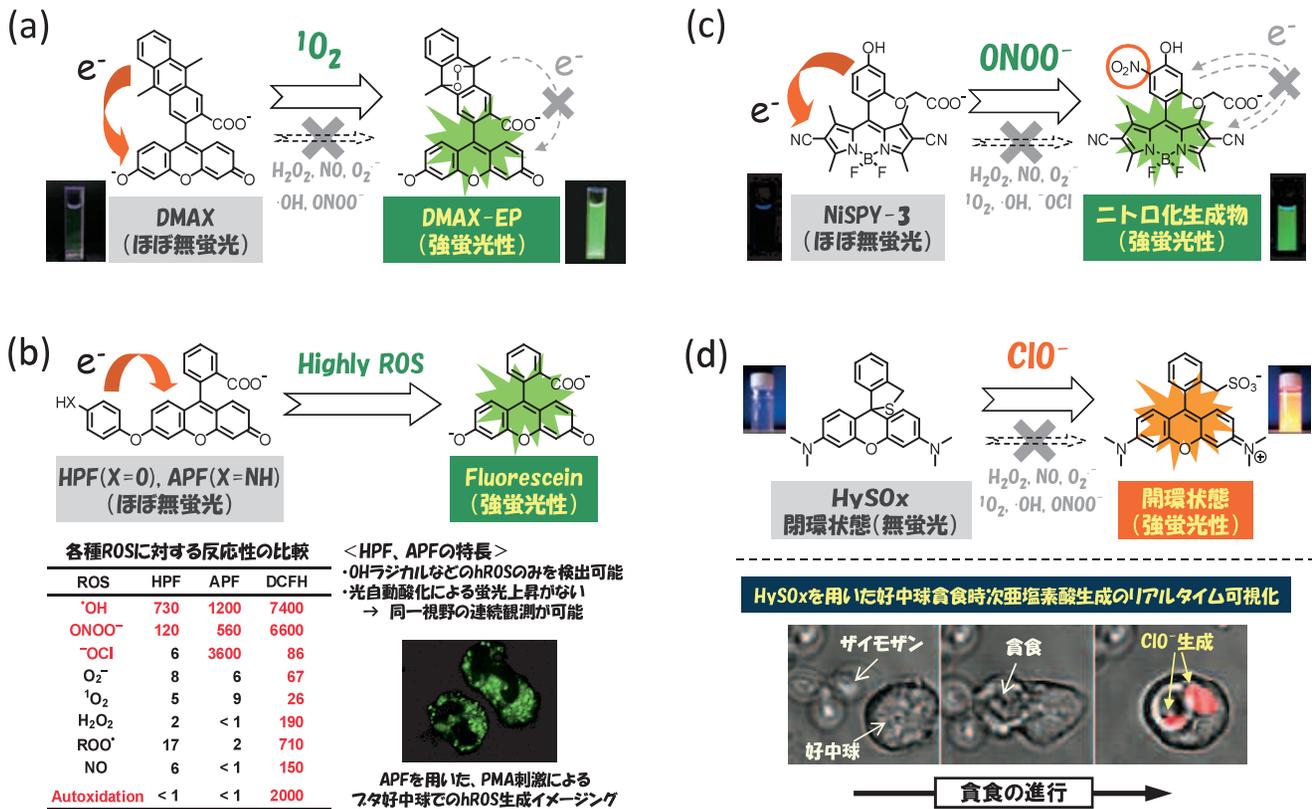


図3 確立した設計法に基づき開発に成功した、各種活性酸素種を種特異的に検出可能な蛍光プローブ群 (a)一重項酸素検出蛍光プローブ DPAX, DMAX 類 (b)強い酸化活性種 (hROS)のみを検出するプローブ HPF, APF (c)ニトロ化ストレス検出蛍光プローブ NISPY 類 (d) 次亜塩素酸特異的、抗光褪色性蛍光プローブ HySOx

らず大きく蛍光が増大してしまう欠点を持っており、生物学的に意味あるデータを得ることは困難であった。そこで筆者らは、ある特定の活性酸素種のみを検出可能な蛍光プローブの精密設計を試みた結果、多数の新規蛍光プローブの開発に成功した⁶⁻⁹⁾。図3にいくつかの代表例を示したが、例えば一重項酸素とパーオキシナイトライドとをそれぞれ高選択的かつ高感度に検出可能な蛍光プローブは、前者はアントラセンからエンドパーオキシドを生成する化学反応⁵⁾を、後者はフェノールのニトロ化反応⁸⁾をそれぞれ鍵化学反応として活用することで、論理的にそれぞれの蛍光プローブを開発することに成功した。

4. TokyoGreen 骨格の創製に基づく、各種加水分解酵素活性可視化蛍光プローブの開発

さらに最近、フルオレセインの骨格構造を大胆に見直すことで、新たな蛍光プローブデザイン法に繋がる誘導体群の創製に成功した。すなわち上記の PeT の考え方によれば、カルボキシ基は他の官能基に変換することが可能なはずであると考え、メチル基、メトキシ基など他の官能基に置換した誘導体の開発に成功した (図4(a))。驚いたことにこれらの単純なフルオレセイン誘導体は新規化合物であり、また以下に詳述するようにこれらは極めて有用な蛍光プローブ母核となるものであったため、これらの新規蛍光骨格を TokyoGreen (以下 TG と略す) と命名した¹⁰⁾。次にこれら

TGs の蛍光特性を精査した結果、ベンゼン環 HOMO エネルギーレベルの上昇により蛍光量子収率が減少するという PeT の原理に一致した結果が得られたばかりでなく、蛍光 On/Off の境界はキサンテン環部位の水酸基がアニオン型である場合と、分子型である場合で大きく異なることも明らかとなった (図4(b))。本知見はプローブ設計の観点から非常に有用である。すなわち、図4(b)のオレンジの枠で囲った *m*-メトキシトルエンをベンゼン環部位として持つ TG は、キサンテン部位がアニオン型の時は強蛍光性である一方、分子型になるとほぼ無蛍光であるという特異な性質を有するキサンテン系色素と考えられ、極めて有用な蛍光プローブ母核となり得ることを示している。以下、本特性を活用して開発に成功した各種加水分解酵素活性を可視化する蛍光プローブを紹介する。

まず、レポーター酵素として汎用されているβ-ガラクトシダーゼ活性検出蛍光プローブ TG-β Gal (図4(c)) を紹介する。TG-β Gal は、*m*-メトキシトルエンをそのベンゼン環部位とする TG 類であり、このプローブ自身のキサンテン環部位の水酸基は、ガラクトースと結合しているエーテル構造となっており、よって pH 7.4 の水溶液中でも分子型をとる結果、ほぼ無蛍光性である。これがβ-ガラクトシダーゼにより特異的に加水分解されることで、キサンテン環部位の水酸基はフリーとなるが、その pKa が約 6.2 であるため脱プロトン化してアニオン型となるため、生成物である 2-Me-4-OMe TG は強い蛍光を発する。すなわち本プローブはβ-ガラクトシダーゼ活性検出蛍光プローブとして機能する。

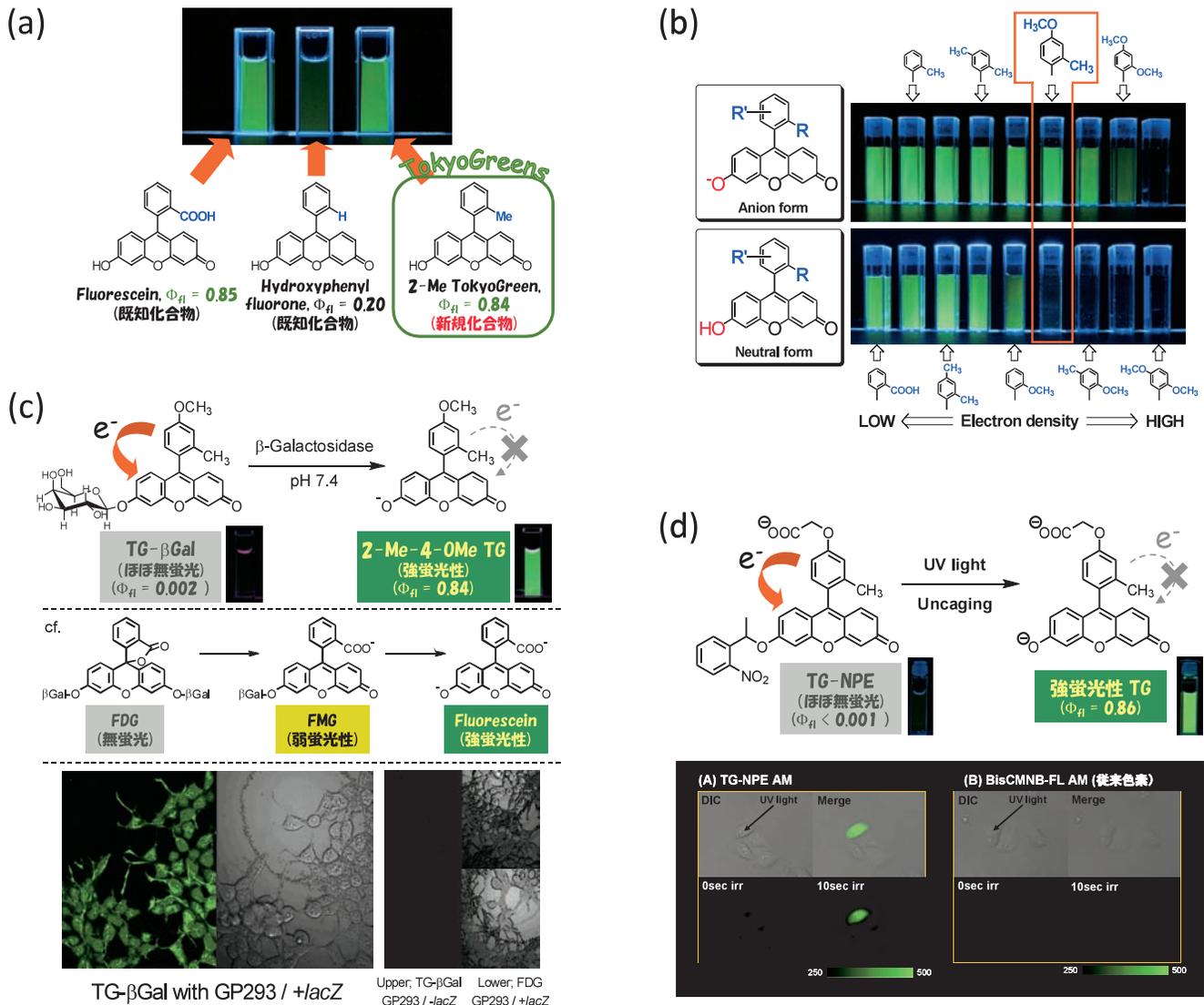


図4 (a)新規フルオレセイン誘導体 TokyoGreens の創製 (b)TokyoGreens の特徴的な蛍光特性 (c)TokyoGreen 骨格を活用した、高感度かつ生細胞系での使用が可能な世界初のβ-ガラクトシダーゼ検出蛍光プローブ TG-βGal の開発 (d)新規 Caged 蛍光色素 (Caged TG 類) の開発

実際、本反応前後での蛍光増大率は約 800 倍にも達し、極めて鋭敏にβ-ガラクトシダーゼ活性検出が可能である。また、本プローブは生細胞系への適用が可能であり、実際図 4(c) に示したように、生細胞系におけるβ-ガラクトシダーゼを高感度に検出することが可能である^{10,11)}。

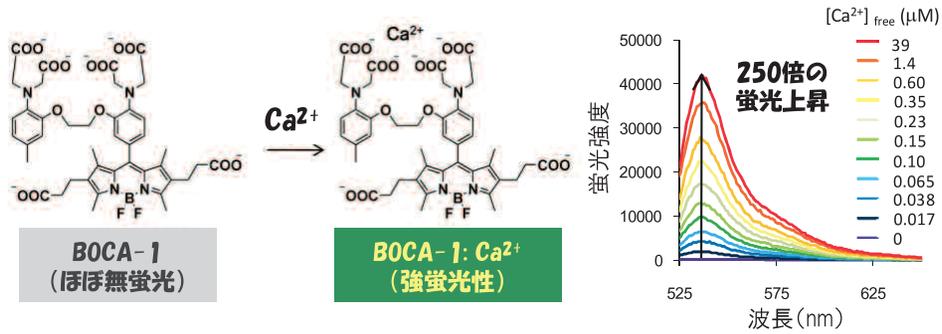
上述の設計法で用いるアルキル基部位は、もちろんガラクトースに限られるものではない。これを光解除性保護基であるニトロベンジル基とすれば、いわゆる Caged 蛍光色素が誕生する。実際本設計法に基づいて開発された TG-NPE は、それ自身は分子内 PeT の結果ほぼ無蛍光であり、ここに 350 nm の解除光を照射することで大きな蛍光増大を示す Caged 蛍光色素として機能する。TG-NPE は上述の TG-βGal と同様、1 段階の光解除性保護基の脱離により最大の蛍光強度変化を生じるため、従来色素に比べ極めて短時間の解除光照射で単一細胞の蛍光染色が可能であることも示された (図 4(d))¹²⁾。

5. 空間局在の制御が可能な蛍光プローブ

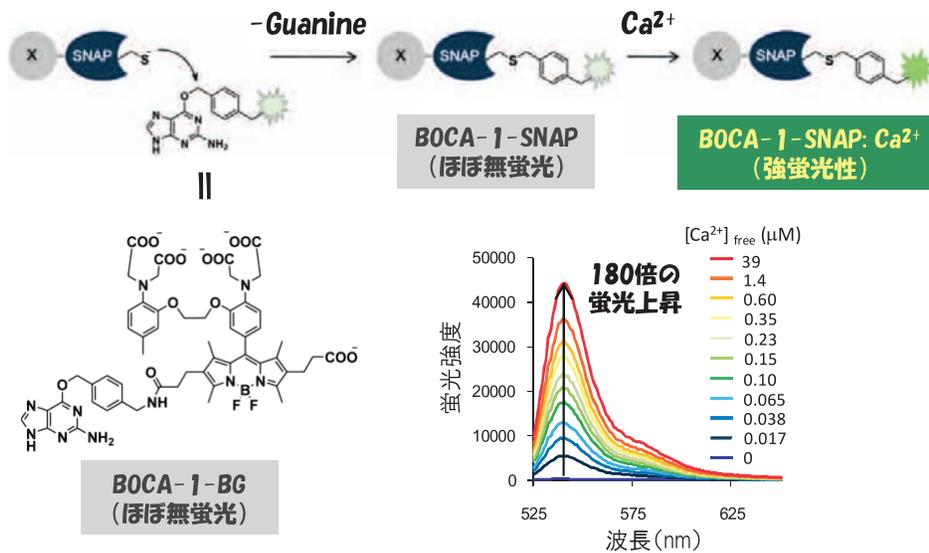
上述のように、筆者らの確立した蛍光プローブ設計法により、望みの機能を持つ蛍光プローブを狙って開発することが出来るようになってきた。一方で近年では、蛍光プローブと、FlAsH-tag、Halo-tag、SNAP-tag といった蛋白ラベル化技術とを組み合わせることで、蛍光プローブの細胞内局在を制御しようという試みが報告されている¹³⁻¹⁵⁾。筆者らも、独自の蛍光プローブ設計法により新たな高感度 Ca²⁺ 蛍光プローブを開発し、SNAP-tag と組み合わせることで、部位特異的な Ca²⁺ 挙動の観察に成功したので下記に紹介する。

まず初めに、筆者らの方法論に則りプローブ骨格の最適化を図ることで、既存の Ca²⁺ 蛍光プローブよりも大きな蛍光上昇を示すプローブを設計した。具体的には、tetramethyl BODIPY を基本蛍光骨格として、Ca²⁺ キレーターである BAPTA を適切に配置させることで、従来までの蛍光プローブでは成し得なかった 250 倍と

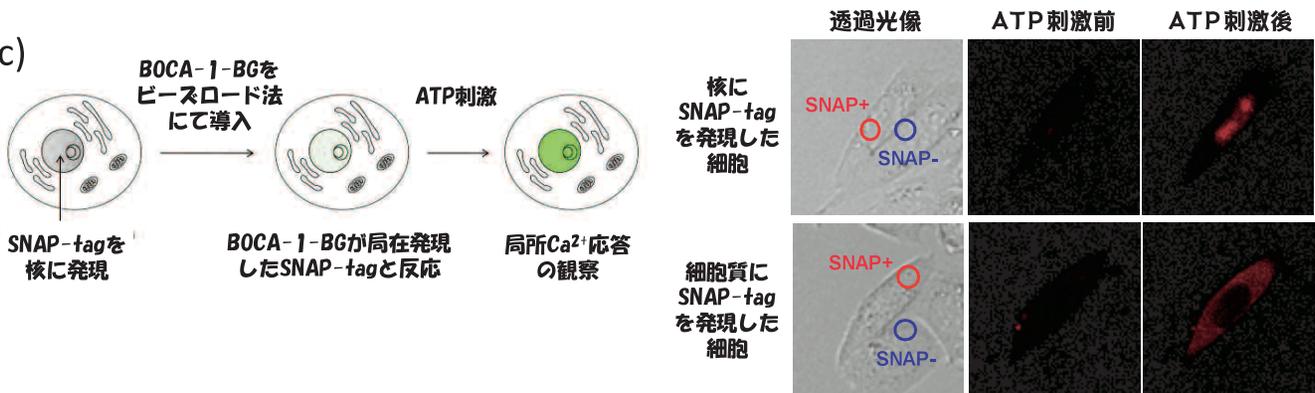
(a)



(b)



(c)



核や細胞質のみといった部位のみにCa²⁺蛍光プローブを局在させることが出来、また刺激によりCa²⁺濃度変化を局所的に観察することに成功した。

図5 (a)BODIPY を母核とした新たな高感度 Ca²⁺ 蛍光プローブ (BOCA-1) と、その Ca²⁺ との結合前後における蛍光特性変化。(b)空間局在が可能な Ca²⁺ 蛍光プローブ (BOCA-1-BG) の SNAP-tag へのラベル化反応と、その Ca²⁺ との結合前後における蛍光特性変化。(c)BOCA-1-BG を用いた局所 Ca²⁺ 蛍光イメージング

いう蛍光強度上昇を示す新たな Ca^{2+} 蛍光プローブ (BODIPY-based calcium indicator, BOCA-1) の開発に成功した (図 5(a))。

次に、開発した BOCA-1 に、SNAP-tag との反応部位である benzyloguanine を組み込んだ化合物 (BOCA-1-BG) を合成した。BOCA-1-BG の SNAP-tag とのラベル化後における蛍光特性を精査した結果、 Ca^{2+} 添加により 180 倍もの蛍光強度上昇を示し、蛋白とのラベル化後にもその機能が保持されることが示された (図 5(b))。

さらに、SNAP-tag を細胞内の特定の部位 (核・細胞質) に局所発現させた細胞を用い、BOCA-1-BG の生細胞における局在性・応答性を検討した。ピーズロード法¹⁶⁾により化合物を細胞内に導入したところ、SNAP-tag が発現している部位のみに Ca^{2+} 蛍光プローブを局在させることが出来、また ATP 刺激により Ca^{2+} 濃度変化を局所的に観察することに成功した (図 5(c))¹⁷⁾。このような局所 Ca^{2+} 濃度変化を可視化する手法の開発により、細胞内シグナル伝達における Ca^{2+} の担う役割について、より深い洞察および新たな知見がもたらされるものと考えている。

6. おわりに

筆者らが確立することに成功した有機小分子蛍光プローブの論理的な設計法により、開発可能な蛍光プローブの種類は飛躍的に増大し、実際、本稿で紹介してきたように、生きている生物試料の中で起こる各種イベントを可視化する、実用性のある新規蛍光プローブ群の開発に成功してきた。今後、これらのプローブをより現場の要望に応じたプローブへと育てていくとともに、新たな機能を持つプローブを開発していく予定である。

また今回は紹介できなかったが、筆者らは、従来培養細胞系が主な対象であった蛍光プローブを *in vivo* にも適用することで、極めて高精度な *in vivo* がんイメージングへと適用拡大することにも成功している。興味のある方は筆者らの総説などを参照して頂ければと思う^{18,19)}。

[参考文献]

- 1) R. Y. Tsien, *Biochemistry*, **1980**, *19*, 2396-2404.
- 2) G. Grynkiewicz, et al., *J. Biol. Chem.*, **1985**, *260*, 3440-3450.
- 3) A. Minta, et al., *J. Biol. Chem.*, **1989**, *264*, 8171-8178.
- 4) T. Miura, et al., *J. Am. Chem. Soc.*, **2003**, *125*, 8666-8671.
- 5) K. Tanaka, et al., *J. Am. Chem. Soc.*, **2001**, *123*, 2530-2536.
- 6) N. Umezawa, et al., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **1999**, *38*, 2899-2901.
- 7) K. Setsukinai, et al., *J. Biol. Chem.*, **2003**, *278*, 3170-3175.
- 8) T. Ueno, et al., *J. Am. Chem. Soc.*, **2006**, *128*, 10640-10641.
- 9) S. Kenmoku, et al., *J. Am. Chem. Soc.*, **2007**, *129*, 7313-7318.
- 10) Y. Urano, et al., *J. Am. Chem. Soc.*, **2005**, *127*, 4888-4894.
- 11) M. Kamiya, et al., *J. Am. Chem. Soc.*, **2007**, *129*, 3918-3929.
- 12) T. Kobayashi, et al., *J. Am. Chem. Soc.*, **2007**, *129*, 6696-6697.
- 13) T. Oded, et al., *Nat. Chem. Biol.*, **2007**, *3*, 423-431.
- 14) E. Tomat, et al., *J. Am. Chem. Soc.*, **2008**, *130*, 15776-15777.
- 15) M. Bannwarth, et al., *ACS Chem. Biol.*, **2009**, *4*, 179-190.
- 16) P. L. McNeil, et al., *J. Cell. Sci.*, **1987**, *88*, 669-678.
- 17) M. Kamiya, et al., *Anal. Chem.*, **2010**, *82*, 6472-6479.
- 18) 浦野泰照, *ファルマシア*, **2009**, *45*, 769-774.
- 19) Y. Urano, et al., *Nat. Med.*, **2009**, *15*, 104-109.

< 筆者紹介 >



氏名：神谷 真子 (Mako KAMIYA)

連絡先：東京大学大学院医学系研究科・生体情報学分野・助教
〒113-0033 東京都文京区本郷 7-3-1
Tel: 03-5841-3568 Fax: 03-5841-3563
E-mail: mkamiya@m.u-tokyo.ac.jp

略歴：

2008 東京大学大学院薬学系研究科博士課程終了(薬学博士)
2008-2010 スイス連邦工科大学ローザンヌ校 博士研究員
2010 現職



氏名：浦野 泰照 (Yasuteru URANO)

連絡先：東京大学大学院医学系研究科・生体情報学分野・教授
〒113-0033 東京都文京区本郷 7-3-1
Tel: 03-5841-3601 Fax: 03-5841-3563
E-mail: uranokun@m.u-tokyo.ac.jp

略歴：

1995 東京大学大学院薬学系研究科博士課程終了・博士(薬学)
1995-1997 日本学術振興会特別研究員(PD)
1997-2005 東京大学大学院薬学系研究科 助手
2004-2008 科学技術振興機構さきがけ「構造機能と計測分析」
領域研究員(兼任)
2005-2009 東京大学大学院薬学系研究科 助教授・准教授
2010 現職

現在のテーマ

光機能性小分子群の創製・癌の *in vivo* 蛍光イメージング

Topics on Chemistry

低分子蛍光化合物による筋肉細胞の分化制御

株式会社同仁化学研究所 上園 貴広

同一個体の細胞が持つ遺伝子は同じであるが、個体の部位や個体への発生・分化において、すべての遺伝子が発現されるわけではない。すなわち、組織・器官によって特異的な遺伝子が、それぞれの発生期において時期特異的に発現し、固有のタンパク質が合成されたり、発現を抑制したりして、細胞の個々の組織・器官への発生・分化が達成される。細胞の分化制御機構を解明しようとする際には、分化誘導物質や分化阻害物質の性質とそれらの機能、作用機序の研究が、極めて重要な意味を持つ。以前から知られている低分子蛍光化合物が、最近、筋肉細胞の分化を制御する機能を持つことが新たに発見されたので紹介する¹⁾。

初期の筋肉細胞分化の過程では、未分化な細胞が筋繊維由来の細胞である「筋芽細胞」になる。筋芽細胞はさらに分化を開始し、筋肉細胞特異的なタンパク質が発現される。特に、筋肉細胞の分化で特徴的な現象は細胞融合である。単核細胞である筋芽細胞が融合して、多核細胞である「筋管細胞」へと分化する(図1)。さらに成熟した筋管細胞から、収縮能を持つ筋繊維を形成する段階を経て、筋肉が完成する。シャーレ中で培養した筋芽細胞から筋管細胞への分化は容易であり、筋管細胞から筋繊維への分化は、小胞体ストレスを誘起する薬剤の投与によって誘導される報告がある²⁾。

以前、Kimらは筋芽細胞には染色せず、筋管細胞にのみ特異的に染色し、筋肉細胞の分化状態を識別することができるローサミン化合物を報告している³⁾。カチオン性の芳香環をもつローサミン化合物は、低分子蛍光化合物であり膜電位が負に帯電しているミトコンドリアに引き寄せられ内側へ入る。さらに最近、Kimらは筋芽細胞から筋管細胞への分化を阻害するローサミン化合物(B25化合物)を見つけ出した¹⁾。マウス筋芽細胞C2C12にローサミン化合物(A25-B25化合物類)を添加し、蛍光顕微鏡で観察したところ、B25化合物を添加した筋芽細胞は未分化状態を保持していた。対照的に、B25化合物と類似の構造をもつA25化合物は、長い円筒状の筋管細胞が形成され、ローサミン化合物類を添加していない条件と同じように筋芽細胞の分化が確認された。

また、分化した筋管細胞へB25化合物を添加したところ、筋管細胞が分裂し、単核細胞へ変化していた。A25化合物を添加した筋管細胞は長くまっすぐな構造を保持していた。そこで、筋管細胞の細胞分裂を確認するために、筋肉分化マーカーであるミオシンの染色を行った。B25化合物を添加し、筋管細胞から分裂した単核細胞の約40%が抗ミオシン抗体により染色され、筋管細胞

が筋芽細胞へ分裂したことが示唆された。また、B25化合物が分裂を誘起する濃度は数 $\mu\text{mol/L}$ 以下であった。

B25化合物による筋芽細胞への分裂メカニズムを検証するために、myoseverin(図2)との比較を行った。プリン誘導体であるmyoseverinは、微小管を不安定化し、筋管細胞から単核細胞への分裂を誘導する試薬として知られている⁴⁾。筋芽細胞C2C12にそれぞれの化合物を添加し、抗微小管抗体で染色した。myoseverinを添加したC2C12細胞の微小管は不規則な配向に変化していたが、B25化合物を添加したC2C12細胞の微小管はA25化合物を添加した細胞と同じように平行で束状に配列した正常な形状を保っていた。微小管が開裂すると細胞周期は停止するため、myoseverinは細胞周期の停止を誘発する試薬としてもよく知られている。そこで、myoseverinまたは、B25化合物処理をしたC2C12細胞の細胞周期を観察したところ、myoseverinを添加したC2C12細胞はG2/M期で停止していた。更に、神経細胞分化のモデル細胞としてよく知られているラット副腎髄質の褐色細胞腫細胞PC12の分化の際に、myoseverinを添加したところ、神経分化が阻害されていた。つまり、myoseverin処理をした筋管細胞は細胞種や細胞状態に関係なく、微小管開裂を引き起こし分裂していた。それとは対照的に、B25化合物はPC12細胞の増殖や神経細胞への分化に影響を与えなかった。これらの結果から、B25化合物処理による細胞分裂のメカニズムは、myoseverinが微小管を開裂させて誘起する細胞分裂のメカニズムとは異なることが示唆された。

また、B25化合物によって誘起された筋管細胞の分裂に、NF- κB (nuclear factor κB 核内因子 κB)の活性化が関与するかどうかを検証した。NF- κB は筋肉の分化に深く関与する因子として知られている。TNF(tumor necrosis factor 腫瘍壊死因子)によって活性化されたNF- κB はヒト筋芽細胞やマウス筋芽細胞C2C12の分化を抑制することが報告されている⁵⁾。筋芽細胞C2C12にレンチウイルスを用いて、NF- κB 遺伝子を導入し、筋管細胞へ分化させた。この筋管細胞へB25化合物を添加し、活性を測定したところ、NF- κB は活性化されていた。

また、NF- κB の強力な阻害剤であるクルクミンとB25化合物を同時に添加して筋管細胞を処理したところ、分裂は抑制された。この結果から、NF- κB の活性化はB25化合物による筋管細胞分裂に必要であることが示唆された。しかし、TNFはNF- κB を活性化するにもかかわらず、筋管細胞の分裂を誘起しなかったこと

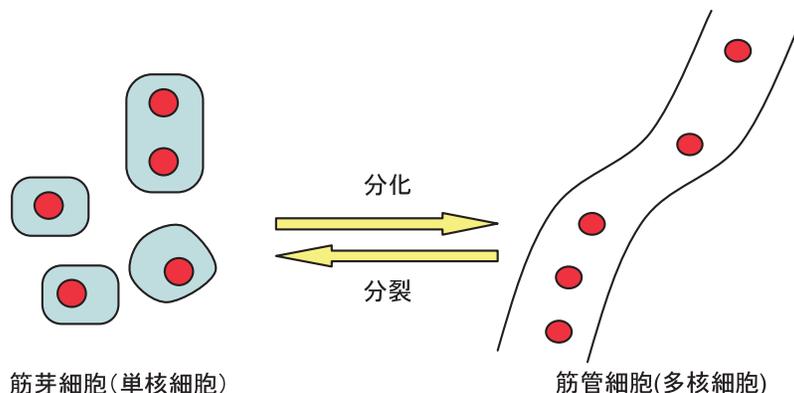


図1 筋肉細胞の分化と分裂

試作品

アセチルコリンエステラーゼ活性測定用キット

AChE-Specific Assay Kit

<特長>

- ・新規の基質である MATP+ を使用
- ・高選択的にアセチルコリンエステラーゼ活性を測定できる
- ・DTNB を用いた簡便な比色法
- ・アセチルコリンエステラーゼ阻害活性も測定できる

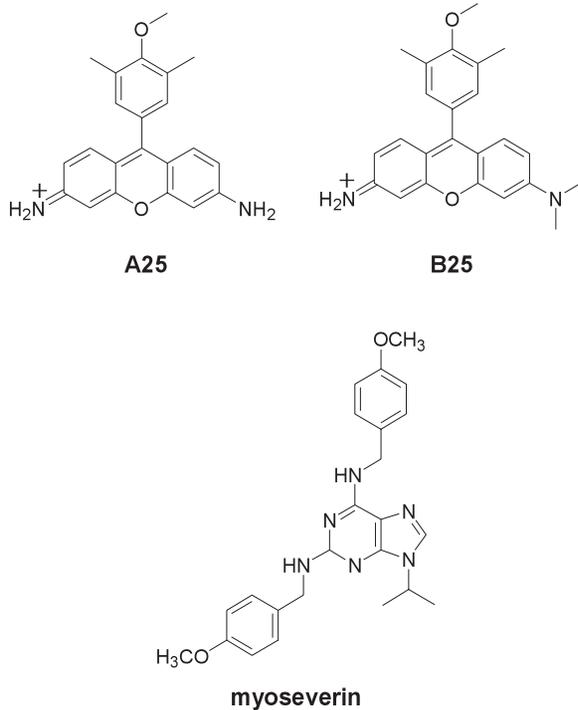


図 2 ローサミン類及び myoseverin の構造式

から、NF- κ B 経路は細胞分化の制御には関与するが、NF- κ B 活性化だけでは筋管細胞の分裂を引き起こすには不十分であることがわかった。

このように、既知の低分子蛍光化合物が蛍光性のみならず、細胞の分化制御に関わるような新たな機能を合わせもつ可能性が出てきた。

今回紹介した論文では、組織観察、マーカー・特異的タンパク質の検出や転写因子の活性により、低分子蛍光化合物による細胞の分化制御機構の解明を試みている。低分子化合物による分化制御機構の研究は、再生医療の基礎研究部分になる幹細胞増殖因子や分化誘導因子などによる発生分化のメカニズムに関わると考えられている。

[参考文献]

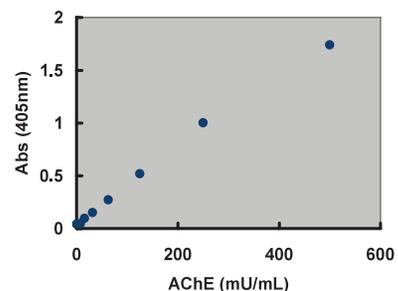
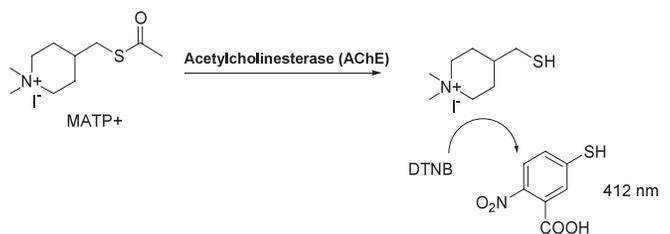
- 1) Yun kyung Kim, Hyung-Ho Ha, Jun-Seok Lee, Xuezhi Bi, Young-Hoon Ahn, Siti Hajar, Jae-Jung Lee and Young-Tea Chang, *J. Am. Chem. Soc.*, **2010**, 132, 576-579.
- 2) Keiko Nakanishi, Naoshi Dohmae and Nobuhiro Morishima, *FASEB J.*, **2007**, 21, 2994-3003.
- 3) Bridget K. Wagner, Hyman A. Carrinski, Young-Hoon Ahn, Yun Kyung Kim, et al., *J. Am. Chem. Soc.*, **2008**, 130, 4208-4209.
- 4) Gustavo R. Rosania, Young-Tae Chang, Omar Perez, Daniel Sutherland, Helin Dong, David J. Lockhart and Peter G. Schultz, *Nature Biotechnology*, **2000**, 18, 304-308.
- 5) Peter Magee, Stephen Pearson and Jeremy Allen, *Lipids in Health and Disease*, **2008**, 7, 24.

アセチルコリンエステラーゼ (AChE) は、神経伝達物質であるアセチルコリンを分解して神経伝達系をコントロールする重要な酵素の一つであり、脳や血中等に存在することが知られています。この酵素は有機リン系およびカルバメート系の農薬や殺虫剤などによって活性が低下することから、これらの薬物の曝露指標として用いられています。また、アルツハイマー病では神経障害によってアセチルコリン量が減少するため、AChE 阻害剤がアルツハイマー病治療薬として注目されています¹⁾。

本キットは、AChE 活性を測定するためのキットです。キットには、新規基質である MATP+ が含まれており、一般的な基質であるアセチルチオコリンに比べ、高選択的に AChE 活性を測定することができます²⁾。検出には DTNB を用いた比色法を利用し、キット付属のスタンダードを用いることで、簡便に AChE 活性を求めることができます。また、AChE 阻害活性を測定することも可能であり、農薬の検出や AChE 阻害物質のスクリーニングにも有用です。

* MATP+ は、独立行政法人 放射線医学総合研究所によって開発された新規のアセチルコリンエステラーゼ (AChE) 基質です。

<測定原理>



Standard AChE で作成した検量線の例

[参考文献]

- 1) 杉本八郎 *日薬理誌*, **2004**, 124, 163-170.
- 2) T. Kikuchi, T. Okamura, K. Fukushi, and T. Irie, *Biol. Pharm. Bull.*, **2010**, 33, 702-706.

Topics on Chemistry

細胞周期の進行を時間・空間的にリアルタイムで可視化する技術

株式会社同仁化学研究所 日吉 友香

細胞は増殖する際、DNA複製によりDNAを2倍にし、細胞分裂の過程で均等に染色体を分配して2つの娘細胞を形成する。この現象は周期的に起こることから細胞周期と呼ばれる。

細胞周期についてはこれまで様々な手法によって活発に研究されており、詳細な分子メカニズムが次々と明らかにされてきた。細胞周期はG1期(DNA合成準備期)、S期(DNA合成期)、G2期(分裂準備期)、M期(分裂期)、G0期(静止期)に分かれている。2001年にノーベル医学・生理学賞を受賞したHartwellらによって細胞周期の主な制御因子群が発見され、細胞周期の分子メカニズム解析は躍進的に進歩し多くの成果をあげている。細胞周期で最も重要な制御因子はcyclinとcyclin dependent kinase (CDK)の複合体であり、cyclinとCDKには、それぞれ約10種類のサブタイプが存在している。G0/G1期移行はcyclin D-CDK4複合体、G1/S期移行はcyclin E-CDK2複合体、S期移行はcyclin A-CDK2複合体、G2期移行はcyclin A-CDK1複合体、G2/M期移行はcyclin B-CDK1複合体が制御していることなどが解明されている。

これまでの研究では、1つの細胞に着目して細胞周期のメカニズムが解析されてきた。一方、多くの細胞から成る個体では、細胞は存在する場所によって異なる調節を受けて細胞周期が進行し、組織や器官を形成・維持していると考えられている。しかし、多細胞生物の胚発生における形態形成、ガン細胞の増殖や浸潤、転移などと細胞周期がどのように関わっているのかはよくわかっていない。組織や器官、個体において、各々の細胞が「いつ、どこで、どのように」細胞周期が制御されているかを理解することは、基礎生物学分野の理解を深めるだけでなく、再生医療やガン研究などの医療分野においても重要である。

従来、生きた細胞や組織における細胞周期進行は、光学顕微鏡を用いた観察により解析されてきた。細胞周期のM期からG1期への移行は、染色体や紡錘体の出現、細胞分裂などの形態変化が起こるため光学顕微鏡で識別することができる。しかし、細胞周期の開始ポイントであるG1期からS期への移行は、形態変化を伴わないため、光学顕微鏡で識別することができない。そこで、G1/S期移行を解析するために、nuclear bromodeoxyuridine (BrdU)を使った細胞染色が用いられてきた。この方法は、DNA合成の際にBrdUを取り込ませた後、細胞を固定して抗BrdU抗体で染色する必要があり、生きた状態をリアルタイムで観察することができない。そのため、生きた組織において細胞周期進行を時間空間的にリアルタイムで可視化する技術の開発が求められてきた。

2008年ノーベル化学賞を受賞した下村脩によってオワンクラゲから単離された緑色蛍光タンパク質(green fluorescent protein: GFP)は、目的タンパク質と融合させて細胞に発現させることで、タンパク質の細胞内局在や特定細胞の体内分布を観察するためのレポータータンパク質として利用されている。このGFPタンパク質と細胞周期に特異的なタンパク質の融合タンパク質は、生きた細胞でS期とG2期を観察するためのマーカーとして開発されてきた。例えば、S期に特異的に発現しDNA複製に関与するproliferating cell nuclear antigen (PCNA)、S期後期からG2期初期に発現し複製されたDNAの結合に関与するDNA ligase I、そしてS期後期に発現しDNAの二重らせんをほどいていくDNA helicase BなどのGFP融合タンパク質がこれまでに作製されてきた^{1,2)}。しかしながら、これらのGFP融合タンパク質は、細胞内で蛍光の発現が微弱で短時間であることが多く、蛍光シグナル明暗差の検出がしばしば困難であるため、細胞周期移行

を観察するマーカーとして、現時点では実用性に欠ける。

本稿で紹介する「Fucci (fluorescent, ubiquitination-based cell cycle indicator) 技術」は、G1期とS/G2/M期を見分けることができる蛍光マーカーであり、細胞周期を時間空間的にリアルタイムで可視化することを可能にした³⁾。この技術が開発されたことにより、様々な生物現象と細胞周期の相互関係を生きた状態でリアルタイムで観察できるようになった。

この技術では、細胞周期の特定の時期だけに発現する2つの制御タンパク質であるCdt1とgemininを利用している。これらの制御タンパク質は、ユビキチン化を介して細胞周期依存的に分解を受ける。Cdt1はDNA複製の開始因子であり、G1期に発現量が最大になりS/G2/M期には分解される。一方、gemininはCdt1機能の抑制因子であり、DNA複製を抑制している。gemininの発現はS/G2/M期に最大となりG1期には分解され存在しない(図1)。この異なる発現パターンを示す2つのタンパク質に、それぞれ異なる色の蛍光タンパク質を融合させて細胞周期マーカーを作製し、蛍光顕微鏡下の細胞の蛍光色の違いで簡単に細胞周期を見分けることを可能にした。

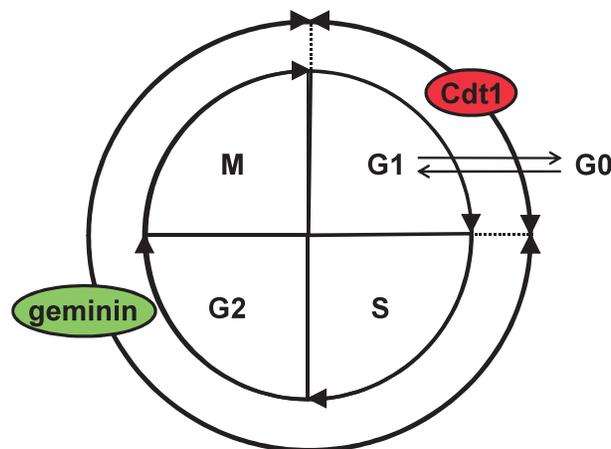


図1 細胞周期サイクルと制御タンパク質の発現

具体的には、Cdt1とgemininの全長遺伝子を用いると細胞分裂が進行しないので、細胞分裂が進行するための最適配列を探索し、その最適配列に蛍光タンパク質を融合させている。ヒトCdt1遺伝子の部分配列にヒラタクサビライシから単離された赤色蛍光タンパク質(monomeric Kusabira-Orange 2: mKO2)の遺伝子を、ヒトgeminin遺伝子の部分配列にはアザミサンゴから単離された緑色蛍光タンパク質(monomeric Azami-Green: mAG)の遺伝子を融合させ、mKO-hCdt1とmAG-hGemを作製した。これら2つの遺伝子をレンチウイルスを使ってHeLa細胞内へ同時に導入して発現させたと、G1期の細胞の核は赤色の蛍光を示し、S/G2/M期の細胞の核は緑色の蛍光を発することが観察された。すなわち、細胞周期に沿って赤色と緑色の蛍光が交互に出現した。この蛍光色の変化はBrdUやPCNAの免疫染色による細胞周期の分析結果と一致していた。また、Fucci (mKO-hCdt1とmAG-hGem)を発現させても細胞周期に影響はないことが、細胞形態の経時変化から確認された。このように、細胞周期に同期して蛍光

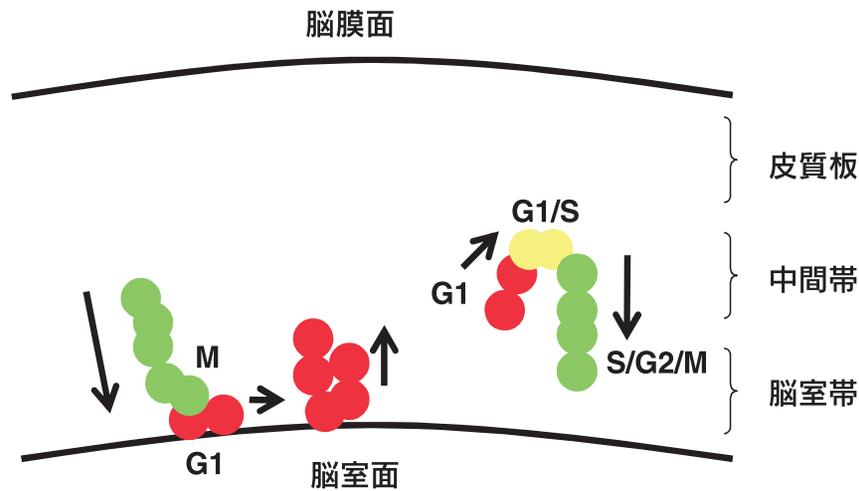


図2 脳原基における神経前駆細胞の動態

色が交互に変化する様子が確認され、細胞周期の可視化が実現された。

Sakaue-Sawanoらは、体内においてガン細胞がどのようにふるまうかを解析するために Fucci 技術を利用した。Fucci を発現する良性の腫瘍細胞塊 (NMuMG 細胞) をヌードマウスの乳腺上皮周囲の脂肪帯に移植して 16 日後の状態を観察したところ、移植細胞塊の大きさに変化はなく、赤色を呈していた。このことは、移植細胞は G1 期あるいは G0 期の状態となり増殖は止まっていることを示している。一方、Fucci を発現する悪性の腫瘍細胞塊 (HeLa 細胞) を移植した場合は、細胞塊が大きく成長し、赤色 (G1 期) と緑色 (S/G2/M 期) が混在していた。このことから、悪性の腫瘍細胞は体内で増殖が盛んであることが確認された。さらに、悪性腫瘍細胞の転移の過程における細胞周期の進行を検証するために、Fucci を発現する HeLa 細胞のゲル懸濁液をヌードマウスの皮膚静脈に注入したところ、血管壁に付着した移植ガン細胞は、ほとんどすべてが赤色蛍光を発生し、G1 期にあることが判明した。そして、血管壁から組織内に浸潤・転移を開始したガン細胞では、赤色 (G1 期) と緑色 (S/G2/M 期) が混在した黄色の核が観察された。さらに、注入して 4 日後には組織内に侵入して増殖していた。これらの結果は、ガン細胞が浸潤・転移を開始するときに細胞周期の進行も開始され、組織に入った後、ガン細胞は盛んに分裂することを示している。このように、Fucci 技術によって、腫瘍の悪性度の判定や腫瘍の浸潤・転移における細胞周期進行をリアルタイムに観察することも可能となった。

さらに Sakaue-Sawano らは、脳の神経組織の発生における細胞周期の進行も生きた動物を対象に解析している。赤色蛍光 Fucci 発現トランスジェニックマウスと緑色蛍光 Fucci 発現トランスジェニックマウスを交配させて、新たな Fucci トランスジェニックマウスを作製した。このマウスの細胞は、すべて、赤色または緑色の蛍光を発する。このようなトランスジェニック動物は、細胞周期と神経細胞発生の相互関係を、生きた状態で検証するためには、今までにない理想的なモデルである。

脳の神経前駆細胞のほとんどは脳室面で誕生し、その後最終配置部位へ移動し分化すると言われている。この神経前駆細胞の移

動・分化が、細胞周期進行とどのようにリンクしているかを調べるために、前述のトランスジェニックマウスを利用している。神経細胞の分裂が盛んな脳原基を生きたままスライス培養して、蛍光顕微鏡で観察した。その結果、数個の細胞の動態がリアルタイムに確認された。ある動態パターンでは、脳室帯の緑色を呈する細胞 (S/G2/M 期) は、移動して脳室面に到達すると分裂することがわかった。その後、生じた 2 つの娘細胞は赤色 (G1 期) に変化して脳室面から中間帯へ移動することが明らかになった。また、別の動態パターンでは、中間帯にある赤色を呈する細胞 (G1 期) は、脳室面へ移動を開始すると同時に黄色 (G1/S 期移行) を経て、緑色 (S/G2/M 期) に変化することが確認された (図 2)。このように、これまで解析が困難であった脳発生において、それぞれの細胞の細胞周期と細胞の移動・分化がどのように制御されているか、時間空間的にリアルタイムで解析することが可能となった。

Fucci 技術は、生体内における細胞周期を可視化し、容易に時間空間的にリアルタイムで観察することを可能にした。今後、生体内において細胞の増殖・分化と細胞周期がどのように関係しているのか更に明らかになると考えられる。この技術によって、細胞周期の制御が深く関わっているガン細胞の浸潤・転移や、再生医療に重要な iPS 細胞の分化などと細胞周期進行を関連させて評価することが可能である。さらに、創薬分野で細胞増殖に関わる薬の評価に利用できると期待される。

今回紹介した Fucci 技術では、細胞周期の G1 期とそれ以外の S/G2/M 期を識別する 2 種の蛍光マーカーを用いている。今後、各々の期に特異的な蛍光マーカーが開発され、細胞周期の進行がより詳細に明らかにされることを期待したい。

[参考文献]

- 1) H. Leonhardt, H. P. Rahn, P. Weinzierl, A. Sporberr, T. Cremer, D. Zink and M. C. Cardoso, *J. Cell Biol.*, **2000**, 149, 271.
- 2) H. P. Easwaran, H. Leonhardt and M. C. Cardoso, *Cell Cycle*, **2005**, 4, 453.
- 3) A. Sakaue-Sawano, H. Kurokawa, T. Morimura, A. Hanyu, H. Hama, H. Osawa, S. Kashiwagi, K. Fukami, T. Miyata, H. Miyoshi, T. Imamura, M. Ogawa, H. Masai and A. Miyawaki, *Cell*, **2008**, 132, 487.

新製品

開発元 DOJINDO MOLECULAR TECHNOLOGIES, INC.

近赤外蛍光色素標識キット

ICG Labeling Kit-NH₂

<特長>

- ・ 50~200 µgの抗体やタンパク質に ICG (Indocyanine Green) を簡単に標識可能
- ・ 細胞損傷や自家蛍光の影響が少ない近赤外蛍光イメージングに有用 (励起波長 / 蛍光波長 = 774 nm/805 nm)
- ・ Filtration tube を用いた分離操作により高い回収率で標識体が得られる

ICG (Indocyanine Green) は肝機能検査のための色素負荷試験にも用いられているシアニン色素で、近赤外領域に蛍光を持ちます。励起波長は 774 nm 付近、蛍光波長は 805 nm 付近であり、生体内で用いた場合でも、ヘモグロビンなどによる妨害を受けにくいという蛍光特性があります。抗体に標識して近赤外蛍光を利用した蛍光内視鏡への応用が報告され、近年 *in vivo* 蛍光イメージングへの応用が期待されています。ICG Labeling Kit-NH₂ はアミノ基を有するタンパク質、特に抗体に ICG を標識するためのキットです。既に発売している Fluorescein Labeling Kit-NH₂ や HiLyte Fluor™ 555 Labeling Kit-NH₂、HiLyte Fluor™ 647 Labeling

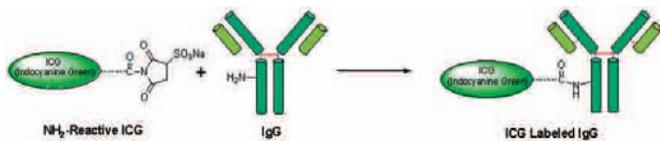


Fig. 1 抗体への標識反応

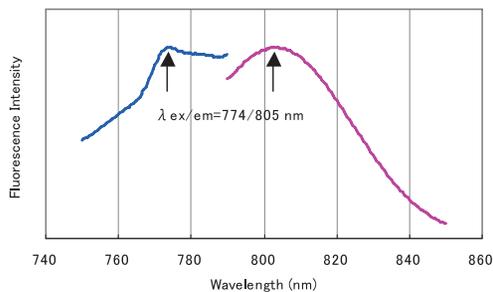


Fig. 2 ICG 標識抗体の蛍光スペクトル

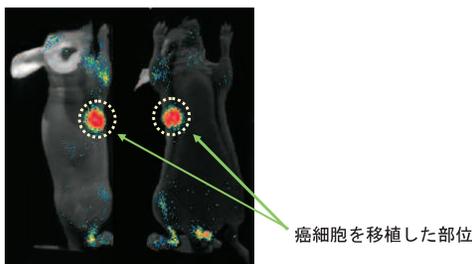


Fig. 3 ICG 標識抗インテグリン抗体による癌細胞の *in vivo* 蛍光イメージング
* *in vivo* 光イメージング装置 (Clairvivo OPT; 島津製作所) を用いて蛍光観察

Kit-NH₂ と同様に、キット付属の NH₂-Reactive ICG は分子内に活性エステルを有しているため、アミノ基を有する標的分子と混合するだけで安定な共有結合を形成します (Fig. 1)。タンパク質に ICG を標識する場合、標識反応を阻害するような低分子化合物 (トリスなど) や未反応の NH₂-Reactive ICG は付属の Filtration Tube を用いて容易に除去することができます。ICG 標識 IgG の場合、励起波長/蛍光波長は 774 nm/805 nm です (Fig. 2)。本キットには標識に必要なすべての試薬と作製した ICG 標識体を保存するための溶液が含まれています。

Fig. 3 に、ICG 標識抗インテグリン抗体を用いて、マウス内の癌細胞を蛍光観察した例を示します。本キットを用いて ICG 標識した抗インテグリン抗体を、癌細胞を移植したマウスに尾静注した後、*in vivo* 光イメージング装置 (Clairvivo OPT; 島津製作所) により近赤外蛍光 (励起波長/蛍光波長 = 785 nm/845 nm) を観察いたしました。その結果、ICG 標識抗体を導入して 48 時間後には癌細胞を移植した部位に明瞭な近赤外蛍光が観察され、ICG 標識抗体が癌細胞に集積していることが確認できました。このように本キットは、近赤外蛍光を利用した *in vivo* イメージングに有用です。

[参考文献]

- 1) Dual-Modality Molecular Imaging Using Antibodies Labeled with Activatable Fluorescence and a Radionuclide for Specific and Quantitative Targeted Cancer Detection, M. Ogawa, C. A. S. Regino, J. Seidel, M. V. Green, W. Xi, M. Williams, N. Kosaka, P. L. Choyke and H. Kobayashi, *Bioconjugate Chem.*, **2009**, 20(11), 2177.
- 2) *In vivo* Molecular Imaging of Cancer with a Quenching Near-Infrared Fluorescent Probe Using Conjugates of Monoclonal Antibodies and Indocyanine Green, M. Ogawa, N. Kosaka, P. L. Choyke and H. Kobayashi, *Cancer Res.*, **2009**, 69(4), 1268.
- 3) Clinical implications of near-infrared fluorescence imaging in cancer, N. Kosaka, M. Ogawa, P. L. Choyke, H. Kobayashi, *Future Oncology*, **2009**, 5(9), 1501.

<キット内容>

[1 sample]

- ・ NH₂-Reactive ICG 1 tube
- ・ WS Buffer 1.5 ml × 1
- ・ Reaction Buffer 250 µl × 1
- ・ Filtration Tube 1 tube

[3 samples]

- ・ NH₂-Reactive ICG 3 tubes
- ・ WS Buffer 4 ml × 1
- ・ Reaction Buffer 500 µl × 1
- ・ Filtration Tube 3 tubes

品名	容量	希望納入価格(¥)	メーカーコード
ICG Labeling Kit - NH ₂	1 sample	20,000	LK31
	3 samples	45,000	LK31

新製品

ビオチン-SAM 試薬

Biotin-SAM Formation Reagent

<特長>

- ・簡単にビオチン-SAM を金基板上に形成できる
- ・アビジン類を効率的に固定化できる
- ・タンパク質の非特異的吸着を抑えることができる

QCM や SPR 等のバイオセンサーに Self-Assembled Monolayer (SAM) を介してタンパク質を固定化する方法のひとつにビオチン-アビジン法があります。このたび、小社では NeutrAvidin や Streptavidin などのアビジン類を効率的に固定化し、非特異的吸着の少ないセンサーを作製するためのビオチン-SAM 試薬を開発いたしました。

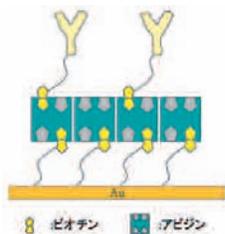


Fig. 1 ビオチン-アビジン法による金表面への抗体固定化の模式図

本製品には、ビオチン化したアルカンチオール試薬が含まれており、エタノールに溶解して金基板上にアプライするだけで効率的なビオチン-SAM を金基板上に形成することができます (Fig.1)。

Fig. 2 に本製品および他社ビオチン-SAM 試薬を用いてビオチン-SAM を形成させた QCM 基板の性能を比較した結果を示します。形成したビオチン-SAM の表面に Streptavidin を結合させた後、FBS を添加することによってタンパク質の非特異吸着量を、またビオチン化 BSA を添加することによってビオチン結合能を評価しました。その結果、本製品を用いて作製したビオチン SAM-Streptavidin 基板は、FBS の非特異吸着がほとんど観察されず、またビオチン結合能は他社試薬を用いて作製した基板よりも 5 倍以上高いことが確認されました。

本製品は、QCM や SPR、電極などのセンサー表面に効率的なビオチン-SAM を形成させる方法として有用です。

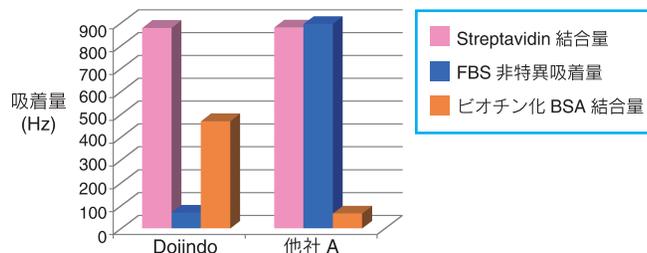


Fig. 2 Biotin-SAM Formation Reagent および他社 Biotin-SAM 試薬を用いて作製した SAM への Streptavidin 結合量と Streptavidin 結合後の表面への FBS 非特異吸着量およびビオチン化 BSA 結合量の比較 (QCM にて評価)

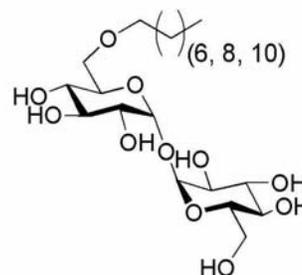
品名	容量	希望納入価格(¥)	メーカーコード
Biotin-SAM Formation Reagent	1 μ mol \times 3	16,000	B564

開発中

新型デタージェント

トレハロースエーテル型

トレハロースは、グルコースが 1,1- グリコシド結合している二糖類の一種であり、タンパク質の変性防止や食品の乾燥・凍結に対する保護など他の糖には見られない特異な性質を持っていることが知られております。現在開発中の 3 種のトレハロースデタージェントは、エーテル結合で親油基と結合しているため広い pH 領域で水溶液安定性が高く、トレハロースを基本骨格としていることから特異な性質を有することが期待されます。



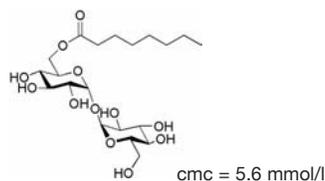
関連商品

Trehalose C8、Trehalose C10、Trehalose C12 は、親水基がトレハロース、親油基が直鎖脂肪酸エステルで構成される、新しいタイプの非イオン性界面活性剤です。

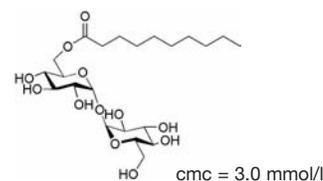
トレハロースは、グルコース 2 分子が、 α 、 α -1,1 で結合した非還元性の糖であり、天然に存在します。トレハロースを添加することにより、タンパク質や脂質の変性を抑制することから、食品・菓子原料に幅広く利用されています。それはトレハロースが細胞中で水に代わる働きを有し、細胞から水が失われた場合でもそのダメージを抑制するためです。

このように、他の糖にはない性質をもつトレハロースを基本骨格としたトレハロース型デタージェントは、特異な性質を有することが期待されます。

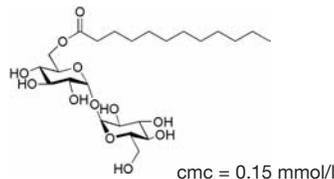
● Trehalose C8



● Trehalose C10



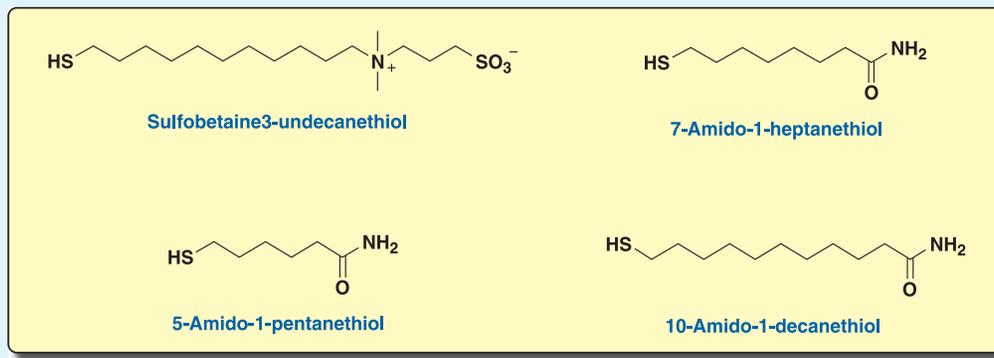
● Trehalose C12



品名	容量	希望納入価格(¥)	メーカーコード
Trehalose C8	500 mg	20,000	T459
Trehalose C10	500 mg	20,000	T460
Trehalose C12	500 mg	20,000	T461

新製品

アルカンチオール類



アルカンチオールやジスルフィド類が金属基板上で形成する自己組織化単分子膜 (Self-Assembled Monolayers: SAMs) は光スィッチング・光電池などの薄膜光学材料、超微細フォトリソグラフィなどのパターン化材料、つや出し・濡れ性などの表面改質といった機能性材料分野から、マイクロアレイ、化学修飾電極、QCM や SPR 等を用いたバイオセンサーなどの分野で広く応用されています。小社では様々な特性を有するチオールやジスルフィド類を販売しており、このたび、上記のようなスルホベタイン、アミドタイプのアルカンチオールを製品ラインナップに追加いたしました。

末端にスルホベタイン基を導入した SAM は、イオン強度 200 mmol/l 以上の条件下、または、弱アルカリ領域で非特異吸着抑制の効果が特に高いことが報告されています¹⁾。この性質を利用して他のチオールやジスルフィドとの混合 SAM を形成させた高感度バイオセンサーの作製ができると期待されます。また、Ostuni らは、金基板へのバクテリア、哺乳類細胞のパターニングの研究に Sulfobetaine3-undecanethiol を用いており²⁾、生体物質パターニングへのさらなる応用も期待できます。

アミド基を導入した SAM は、他の官能基を導入した SAM と比較して、その水素結合性の効果により熱安定性が高いことが報告されています³⁾。また、Mosley らは、水素結合性を利用した脱離可能なポリマーシート作製の研究を行い、テンプレートとしてアミド基を導入した SAM を用いています⁴⁾。さらに、濡れ性とタンパク吸着の関係性の研究にアミド基を導入した SAM が用いられており、アミド基を有する SAM はタンパク吸着抑制効果が見られることが確認されています^{5,6)}。

[参考文献]

- 1) R. E. Holmlin, X. Chen, R. G. Chapman, S. Takayama, G. M. Whitesides, *Langmuir*, **2001**, *17*, 2841.
- 2) E. Ostuni, R. G. Chapman, M. N. Liang, G. Meluleni, G. Pier, D. E. Ingber, G. M. Whitesides, *Langmuir*, **2001**, *17*, 6336.
- 3) R. Valiokas, M. Östblom, S. Svedhem, S. C. T. Svensson, B. Liedberg, *J. Phys. Chem. B*, **2002**, *106*, 11550.
- 4) D. W. Mosley, M. A. Sellmyer, E. J. Daida, J. M. Jacobson, *J. Am. Chem. Soc.*, **2003**, *125*, 10532.
- 5) G. B. Sigal, M. Mrksich, G. M. Whitesides, *J. Am. Chem. Soc.*, **1998**, *120*, 3464.
- 6) A. Sethuraman, M. Han, R. S. Kane, G. Belfort, *Langmuir*, **2004**, *20*, 7779.

品名	容量	希望納入価格 (¥)	メーカーコード
Sulfobetaine3-undecanethiol	10 mg	20,000	S350
5-Amido-1-pentanethiol	10 mg	14,000	A508
7-Amido-1-heptanethiol	100 mg	48,000	
	10 mg	14,000	A509
	100 mg	48,000	
10-Amido-1-decanethiol	10 mg	14,000	A510
	100 mg	48,000	

ホームページアドレス
URL : <http://www.dojindo.co.jp/>
E-mail : info@dojindo.co.jp

フリーファックス 0120-021557
フリーダイヤル 0120-489548