

2012

No.143

ISSN 0385-1516



ドージンニュース

CONTENTS

●Review

光変換前駆体法による有機半導体
材料の開発

奈良先端科学技術大学院大学 山田 容子

「蛍光生物学」の最前線6-1

哺乳類動物の固定組織の大規模・高精細

3次元蛍光観察

理化学研究所脳科学総合研究センター

宮脇 敦史・濱 裕

「蛍光生物学」の最前線6-2

生物発光・蛍光イメージングを用いた
がん細胞とがん微小環境の解析

愛媛大学大学院

今村 健志・疋田 温彦・本藏 直樹・大嶋 佑介

●Topics on Chemistry

DT Diaphorase 特異的なグルコース

定量蛍光色素の開発

株式会社同仁化学研究所 後藤 奈月

●Column

留学体験記－経験を挑戦へ－

株式会社同仁化学研究所 岩下 秀文



CONTENTS

Review

光変換前駆体法による有機半導体材料の開発 • [1]

奈良先端科学技術大学院大学

山田 容子

「蛍光生物学」の最前線 6-1

哺乳類動物の固定組織の大規模・高精細 3 次元蛍光観察 • [6]

理化学研究所脳科学総合研究センター

宮脇 敦史・濱 裕

「蛍光生物学」の最前線 6-2

生物発光・蛍光イメージングを用いた

がん細胞とがん微小環境の解析 • [10]

愛媛大学大学院

今村 健志・疋田 温彦・本蔵 直樹・大嶋 佑介

Topics on Chemistry

DT Diaphorase 特異的なグルコース定量蛍光色素の開発 • [13]

株式会社同仁化学研究所 後藤 奈月

Column

留学体験記－経験を挑戦へ－ • [16]

株式会社同仁化学研究所 岩下 秀文

Commercial

新製品

アセチルコリンエステラーゼ特異的基質 • [5]

MATP+

自己組織化単分子膜作製用試薬 • [14]

アルキルホスホン酸誘導体

細胞内カルシウムイオン測定用試薬キット • [17]

Calcium Kit II - iCellux

二価性試薬・ビオチンラベル化剤 • [18]

新製品案内

* 容量・価格等の詳細は各ページをご覧ください。

アセチルコリンエステラーゼ特異的基質

MATP+

自己組織化単分子膜作製用試薬

- アルキルホスホン酸誘導体

10-CDPA

FHPA

FOPA

FDPA

11-HUPA

11-NUPA

M-EG₃-UPA

ODPA

11-PIUPA

細胞内カルシウムイオン測定キット

Calcium Kit II - iCellux

二価性試薬・ビオチンラベル化剤

Biotin-SS-Sulfo-OSu

Biotin-HPDP

BS3

DSP

DTSSP

Sulfo-SMCC

Sulfo-AC₅-SPDP

光変換前駆体法による有機半導体材料の開発

The development of low-molecular organic semiconducting materials using photoconvertible precursors



山田 容子

奈良先端科学技術大学院大学
教授

Summary:

The finding of clean and renewable energy is one of the major scientific and technological challenges in the 21st century. Solar cells are an attractive alternative considering the availability of solar energy. Organic thin-film solar cells prepared by solution process are one of the good candidates for the promising next generation of solar cells. Recently we have developed a photoconvertible diketone precursors of acenes. The precursors can be converted to the corresponding acenes quantitatively in solution and in film by photoirradiation. Here our recent achievements will be presented.

1. はじめに

再生可能エネルギーの需要が高まり、その開発はサイエンス・テクノロジーの両分野において最重要課題の一つである。なかでも太陽エネルギーは半永久的に享受できる大きなエネルギー源であり、太陽電池の開発が世界的な規模で進められている。太陽電池を普及させるためには、低価格・大面積・フレキシブルなデバイスの開発が急務である。現在はシリコン太陽電池が主流であるが、次世代太陽電池として、無機材料を用いた化合物太陽電池、量子ドット太陽電池、低分子・高分子材料を用いた有機太陽電池(OSC)などの開発が盛んに研究されている。

有機半導体材料は、OSCだけでなく、有機発光ダイオード(OLED)、有機薄膜トランジスタ(OTFT)、液晶など、様々な分野で利用されている。電荷輸送は分子間を電荷がいかに効率よく移動できるかにかかっており、HOMOとLUMOのエネルギーギャップや、薄膜中の分子の配列が鍵を握る。そのような観点から考えると低分子有機材料の利点は、単一の構造を有しているため高純度に精製可能であること、合成化学的に構造をチューニングすることで光学特性・HOMO/LUMOエネルギーレベル・結晶構造・電荷移動度などを自在にコントロールできることにある¹⁻⁵⁾。本稿では、有機化学的視点から低分子有機薄膜太陽電池を概観し、最後に我々の最近の取り組みを紹介する。

2. 有機薄膜太陽電池の原理

有機太陽電池は、色素増感太陽電池と有機薄膜太陽電池に大別される。ここでは有機薄膜太陽電池に限定してその構造と評価方法、開発の歴史を簡単に解説する。

有機薄膜太陽電池の構造を単純化して説明すると、透明半導体電極と金属電極でp型半導体材料(電子ドナー)とn型半導体材料(電子アクセプター)からなる活性層を挟み込んだ形をとる。この活性層を光照射すると、

- ①ドナーまたはアクセプターが励起されて励起子となり、
- ②励起子が薄膜中を移動してドナーとアクセプターが出会い、
- ③ドナーからアクセプターへと光励起電子移動が起こり、
- ④その結果生じたホール(プラスの電荷)はp層を、電子(マイナスの電荷)はn層を通ってそれぞれ電極へと送り込まれる仕組みになっている(図1)。

みになっている(図1)。

この4つの過程はいずれも極めて重要であり、太陽電池の効率をあげるためにには次の4つの因子の改良がキーとなる。すなわち

- ①光を吸収して励起子が生成する効率
 - ②生じた励起子が、p層とn層の界面まで移動する効率
 - ③励起子からホールと電子への電荷分離が起こる効率
 - ④生じたホールと電子が、それぞれp層・n層を通って両極へ電荷を輸送し、電極へ電荷を注入する効率
- である。これらの因子を改良するためには、OSCのデバイス構造はもちろんのこと、ドナー分子・アクセプター分子のHOMO・LUMOレベル、p層とn層から成る活性層の薄膜構造、材料の純度など実に様々な要素が鍵をなす。

太陽電池の性能は電流-電圧曲線により評価される(図2a)。光源にはAM(エアマス)1.5と呼ばれる太陽光スペクトルを照射した標準条件を用いる(図2b)。AM1.5とは垂直方向から41.8°傾いた方向から地表に照射される太陽光スペクトルを表す言葉である。

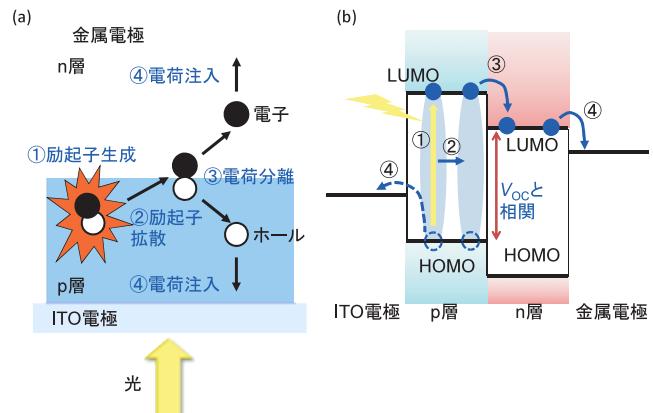


図1 有機薄膜太陽電池の(a)光電変換メカニズムと(b)エネルギーダイアグラム。(b)図の①から④の過程は(a)図の①から④の過程に相当する。

太陽が真上にあるとき(AM1.0)にくらべ大気中を通過する距離が1.5倍になり、日本付近の太陽光に相当する。光照射時に電圧を印可しながら電流を測定することで、開放電圧(V_{oc})、短絡電流密度(J_{sc})、曲線因子(FF)、エネルギー変換効率(PCE)を求めることができる。 V_{oc} は電流が流れないときの電圧に相当し、ドナー分子のHOMOレベルとアクセプター分子のLUMOレベルのエネルギー差と相関がある。 J_{sc} はバイアス電圧をかけないときの電流である。活性層の厚みや吸収スペクトルの形状、電荷輸送能、すなわち、薄膜構造に影響される。 FF はその素子の最大出力(P_{out})の、理想的な最大出力($V_{oc}J_{sc}$)に対する割合であり、次の式で表される。

$$FF = \frac{V_{mp}J_{mp}}{V_{oc}J_{sc}}$$

光照射により生じた励起子が電極に到達する割合に相当し、1に近いほど良い特性である。 PCE は得られる電気エネルギー(P_{out})の入射光エネルギー(P_{in})に対する割合であり、次の式が成り立つ。

$$PCE = \frac{P_{out}}{P_{in}} = \frac{V_{mp}J_{mp}}{P_{in}} = \frac{V_{oc}J_{sc}FF}{P_{in}}$$

この式からわかるように、 V_{oc} 、 J_{sc} 、 FF のすべての値が大きくなるほど、 PCE の値も大きくなる。しかし、それらを同時に満たすことは容易ではない。 V_{oc} の値はドナーのHOMOとアクセプターのLUMOのエネルギー差と相関があるため、ドナー分子とアクセプター分子の分子設計と組み合わせが重要である(図1b)。一方 J_{sc} と FF の値は薄膜構造や電極界面の状態が大きく作用する。OSCの実用化には10~15%の PCE が必要と言われているが、2011年には10%を超える効率が報告された。そこで次に有機薄膜太陽電池の構造を紹介する。

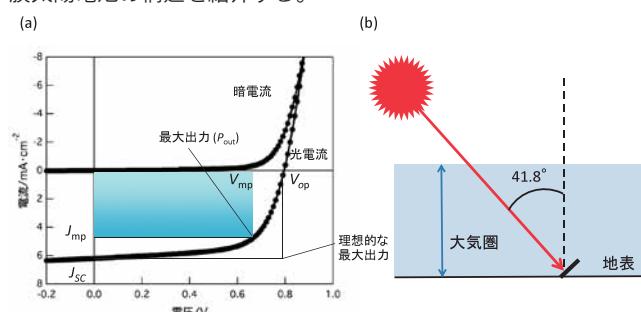


図2 (a)太陽電池の性能評価に用いるJ-Vカーブ。 P_{out} :最大出力; V_{op} :開放電圧; V_{mp} :最大出力における電圧; J_{sc} :短絡電流; J_{mp} :最大出力における電流値;(b)AM 1.5に対応する太陽光の模式図。

3. 有機太陽電池の構造

1950年代に最初に報告された有機薄膜太陽電池は、ショットキー型太陽電池と言われる単層の構造をしており、光合成色素であるクロロフィルaやその類縁体としてのCuフタロシアニンなど、1種類の色素材料を異なる金属電極の間に挟み込んだ構造であった(図3)。しかしこれはホールと電子が同一の層を流れるために逆電子移動が起こりやすく PCE はそれぞれ0.001%、0.01%と低いものであった^{6,7)}。

そこでp型材料(銅フタロシアニン)とn型材料(PTCBI)を層状に重ねたpn構造がTangらにより報告された⁸⁾。この構造では、p層とn層の界面でホールと電子のペアであるエキシントンが形成さ

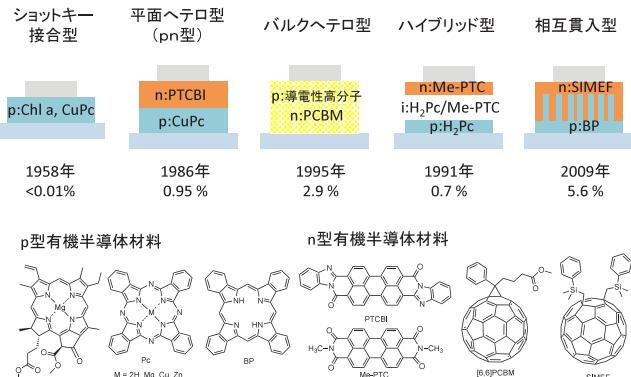


図3 有機薄膜太陽電池の構造とこれまでに使用された代表的な低分子半導体材料

れ、ドナーのLUMOからアクセプターのLUMOへの光励起電子移動が起こり、電荷が生じる。ホールはp層を、電子はn層を通してそれぞれ電極へと運ばれる。Tangらが報告した最初のpn構造では PCE は0.95%、 FF は0.65まで向上した。しかし有機半導体の励起子拡散長はシリコン半導体に比べて短く20 nm以下である。従って薄膜が厚いと励起された分子が拡散してpn接合界面で電荷分離する前に基底状態に戻ってしまい、 PCE の効率が上がらない。一方、薄膜を薄くすると光の吸収効率が下がる。その解決法の一つとしてはpn層とpn層の間に薄い電極を挟みこむタンデム構造がある⁹⁾。タンデム構造にすることで、膜厚が薄い2つ以上のデバイスを直列に連結することができ、全体的には膜厚を厚くすることが可能になり吸光度を稼ぐことができる。また2つの層の吸収波長領域をずらし、幅広い太陽光を利用することも可能になる。

もう一つの解決法は、バルクヘテロ構造である。バルクヘテロ構造とは、p層とn層が混じりあった構造であり、高分子薄膜太陽電池で主流となっている方法である^{10,11)}。溶媒に可溶なp型材料とn型材料を適当な割合でブレンドし、溶液プロセスにより薄膜化する。これにより、任意の割合でp型材料とn型材料を混合できるだけでなく、p層とn層の界面面積が大きく増加するため、励起子拡散距離が短くても、電荷分離の効率を高めることができる。このバルクヘテロ構造は、有機薄膜太陽電池において大きなブレークスルーであり、 PCE が大きく増加する要因となつた。さらに、p層とn層の間に混合層(i層)を挟み込んだpin構造も報告されている。

低分子有機半導体でこのバルクヘテロ構造(ここではpin構造のi層も含む)を構築するには2つの手法が報告されている。共蒸着と溶液塗布である。共蒸着法とは、p型材料とn型材料を同時に蒸着し、結晶性の混合薄膜を作成する方法である¹²⁾。高い半導体特性を持ちながら難溶性の、フタロシアニン、ペンタセンなどのp型材料とフラーーエンやペリレンビスイミドなどのn型材料の利用に適した方法である。平本らは共蒸着に用いるフラーーエンを高純度化することで膜厚を1 μmにすることに成功し、H₂PC/C₆₀系で PCE =5.3%を達成した¹³⁾。一方溶液塗布法は、p型及びn型の可溶性の低分子材料を混合し、スピンドルコート法などで薄膜化する方法である。近年はローバンドギャップポリマーからヒントを得た化合物や、アセンやフタロシアニンに置換基を導入して可溶化した化合物、液晶性の化合物など様々な可溶性低分子系の材料が報告されている^{1,2)}。

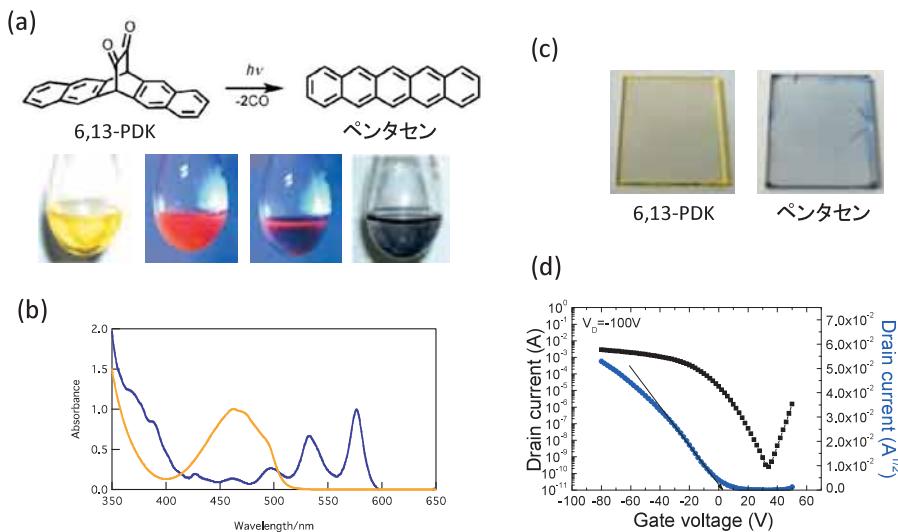


図4 (a) 6,13-PDK からペンタセンへのトルエン中アルゴン下の光変換反応；(b) 6,13-PDK (黄)とペンタセン(紫)のトルエン中の吸収スペクトル；(c) ガラス基板上に作成された6,13-PDK フィルムと及び光変換後のペンタセンフィルム；(d) 本光変換法により作成されたペンタセンFETデバイスのI-V曲線 (山形大中山健一准教授との共同研究)

低分子を可溶化させるもう一つの手法として前駆体法があげられる。フタロシアニンに良く似た構造のベンゾポルフィリン(BP)は、難溶で合成と精製が難しい化合物であった。しかし可溶性のビシクロ[2.2.2]オクタジエン縮環前駆体(CP)を精製した後、固体やフィルムのまま加熱し逆Diels-Alder反応により結晶性有機半導体のBPへと変換できることが報告された¹⁴⁾。2009年にはBPとフラーレン誘導体($C_{60}(CH_2SiMe_2Ph)_2$; SIMEF)を組み合わせた熱変換型前駆体法による有機薄膜太陽電池が報告され、低分子塗布型材料を用いた素子としてはきわめて高い値5.6%のエネルギー変換効率が達成された¹⁵⁾。この手法では溶液塗布でありながら、BPとSIMEFの結晶性が高く、直径25 nm程度の柱が櫛状に組合わさった相互貫入型の構造となっていることがポイントであった。

4. 光変換型前駆体法によるアセンの合成

我々は、このようなバルクヘテロ構造あるいは相互貫入型構造を光を利用して作ることを念頭に材料の開発を行っている。熱変換型前駆体法に対し光変換型前駆体法は、光のエネルギーを利用した脱離反応であり、光を利用するため局所的な変換が可能になり、光によるプロセス制御が期待される。変換後に結晶成長を促進するためのアニーリングは必要であるものの、光反応自体は室温またはそれ以下で進行するため、デバイス作製過程で熱変換前駆体法ほど高い温度を必要としない。従って、ポリマー中に混ぜたりフレキシブル基板などの上にデバイス作製することも期待できる、新しい手法である。本章では、最近我々が開発した材料を中心に紹介する。

4.1 6,13-ペンタセンジケトン前駆体の光変換と塗布型ペンタセンFETの作成

我々は光変換型前駆体法を優れた有機半導体材料であるペンタセンに応用し、2005年にペンタセンジケトン前駆体(6,13-PDK)

を報告した(図4a)。熱変換型の前駆体はそれまでにいくつか報告されていたが、光変換型は初めてであった。本章ではその光化学的挙動について述べる。6,13-PDKは、熱的には極めて安定であり、300°C以上に温度を上げても分解が見られず、昇華精製が可能である。図4bに吸収スペクトルを示す。460 nm前後にn-π*吸収が観測されるが、その吸光係数は1400と、カルボニル基のn-π*励起としてはかなり大きい。通常は禁制遷移であるカルボニル基の吸収の禁制がかなり緩和されて許容遷移になっているためである。

トルエン溶液中で6,13-PDKのn-π*吸収を励起すると、2分子の一酸化炭素が脱離し、ペンタセンへと定量的に変換する。ペンタセンのトルエンへの溶解度が低いために、反応中にペンタセンの結晶が析出する(図4a)。この光反応の量子収率は化学光量計により0.014と求められた。また、本光反応は一般に紫外部のπ-π*励起でも進行する。

本光反応はフィルム中も進行する(図4c)。この6,13-PDKを用いた塗布型有機薄膜トランジスタの作製を山形大中山健一准教授との共同研究により試みた。ペンタセンはこのn-π*吸収はちょうど青色LED発光波長に相当する。スピンドルコート法による前駆体の塗布と電界効果移動度は最大0.86 cm²/Vsを記録した(図4d)¹⁶⁾。これは、一般的なペンタセン蒸着膜によるFET特性に匹敵する値であり、この値が溶液塗布プロセスから成膜した薄膜で観測されることは注目に値する。

また我々は6,13-PDKの構造異性体である5,14-PDKの合成に成功した(図5)¹⁷⁾。興味深いことに6,13-PDKとは吸収スペクトルの形が大きく異なる。通常のn-π*吸収に加えアントラセンのπ-π*吸収に由来する吸収が観測されるが、さらに400 nm付近にブロードな吸収が見られる。400 nmはちょうど生成物のペンタセンの吸収の谷間に相当し、また赤色LEDの発光波長に相当する。5,14-PDKのトルエン中の光反応量子収率は、400 nm, 460 nmのいずれも6,13-PDKを超える0.024であり、より広範囲の光の利用が可能となつた。

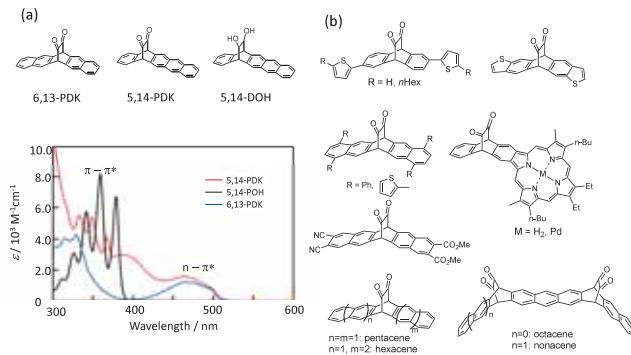


図 5 (a) 6,13-PDK, 5,14-PDK 及びその前駆体(5,14-DOH)の構造と吸収スペクトル ; (b) 様々なジケトン前駆体

4.2 様々なジケトン前駆体

本反応はアントラセン系有機半導体材料やペンタセン誘導体、高次アセンやポルフィリン系にも展開可能である(図5b)。アントラセン系化合物では、n->n*吸収と光変換後のアントラセンのpi->pi*吸収が重ならないために、大気安定性が高く、またフィルター効果も小さいために光反応が早く進行するという利点がある¹⁸⁾。太陽電池の材料として用いるには、吸収波長領域の点で劣るが、OFETなどの用途には優れている。また、ペンタセンは難溶性であると同時に大気下で不安定なために、置換基を導入する位置が比較的限られているが、ジケトン部位を保護基として利用することで、6,13位の最も反応性の高い部分を保護し、同時に溶解度も上げて置換基導入を行うことができる。最終的に光変換を行うことで、6,13位は無置換のまま別の部位に置換基が導入された置換ペンタセンの合成が可能となった^{19, 20, 21)}。一方前駆体のベンゼン環が6以上連結したアセン類は、溶解度と酸素安定性が極めて低いために合成が困難とされていたが、本光反応を利用することで可能となった。最終段階で高次アセンへと変換でき、しかも低温、フィルム中、気相反応での変換が可能なために、通常の方法では合成が困難な化合物の合成が可能である。これまでに本光反応を利用したヘキサセン、ヘプタセン、オクタセン、ノナセンの合成が報告された²²⁻²⁵⁾。一方我々はモノアンスラポルフィリンのジケトン前駆体のSoret帯をトルエン中で励起することでモノアンスラポルフィリンへと変換することにも成功した²⁶⁾。

4.3 新しいペンタセン誘導体の開発

最後に6,13-DKの合成中間体を利用して合成が可能になったペンタセン誘導体を紹介する。6,13-DKはジヒドロキシ誘導体(6,13-DOH)をSwern酸化することにより得られるが、6,13-DOHを2-ヨードキシ安息香酸(IBX)により処理すると、酸化的に開裂し、6,13-ジホルミルペンタセンが得られることを見いたした。この化合物はペンタセン誘導体合成の新しいキーハウジングとして利用できる。例えば、このジホルミルペンタセンを出発物質に、ジシアノペンタセン(DC-PEN)やペンタセンビスイミド(PBI)の合成に成功した。これらはいずれも新規化合物であり、同様の合成法でジシアノナフタセン(DC-NAP)、ナフタセンビスイミド(NBI)も合成した。ジシアノアセンは強い蛍光を示し、またアンビポーラー特性を示すことがわかった²⁷⁾。一方テトラセンビスイミドはn型FET特性を示した²⁸⁾。

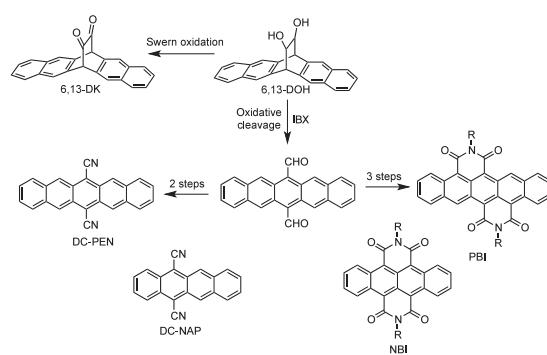


図 6 6,13-DK, DC-PEN, DC-NAP, PBI, 及び NBI の構造式

5. 終わりに

6,13-PDKを用いた光変換有機半導体材料は、光を用いることで、光の強度、照射時間、波長など、多くのパラメータで制御することが期待される。またレーザー技術を用いることで、2次元のみならず3次元のパターンニングも可能である。6,13-PDKは熱には極めて安定であるため、光の自由度を最大限に利用した薄膜構造制御が期待できる。光変換前駆体法で作成した薄膜で蒸着膜に匹敵するFET特性が実現されており、光制御により結晶性薄膜を作成することに成功した。この手法を展開し、光による分子レベルのプロセス制御を通じて、新しいバルクヘテロ構造制御へと展開したい、と考えている。

6. 謝辞

本研究の一部は、JST CREST「革新的塗布型材料による有機薄膜太陽電池の構築」における、山形大学大学院理工学研究科 中山健一准教授、千葉大学大学院理工学研究科 矢貝史樹准教授、新潟大学大学院理工学研究科 生駒忠昭准教授、関西学院大学理工学部 増尾貞弘准教授との共同研究によるものです。また、本研究を推進するにあたり愛媛大学大学院理工学研究科、小野昇名誉教授、宇野英満教授、奥島鉄雄准教授、愛媛大学総合科学支援センター森重樹特任講師はじめ多くの共同研究者、愛媛大学大学院理工学研究科有機化学研究室及び奈良先端科学技術大学院大学物質創成科学研究所有機光分子科学研究室の学生諸氏のご協力を得た事を感謝致します。本研究の一部は文部科学省科学研究費(B)及び特別経費「グリーンフォトニクス研究教育推進拠点整備事業」の支援により行われました。

[参考文献]

- A. W. Hains, Z. Liang, M. A. Woodhouse and B. A. Gregg, *Chem. Rev.*, **2010**, *110*, 6689-6735.
- A. Mishra and P. Bauerle, *Angew. Chem. Inter. Ed.*, **2012**, *51*, in press. DOI: 10.1002/anie.201102326
- 松尾 豊, 有機薄膜太陽電池の科学, 化学同人, **2011**.
- 上原 赫, 吉川 遼編, 有機薄膜太陽電池の最新技術, 株式会社シーエムシー出版, **2005**.
- 小野 昇編, 有機薄膜太陽電池の高効率化と耐久性向上, サイエンス&テクノロジー, **2009**.
- D. Kearns and M. Calvin, *J. Chem. Phys.*, **1958**, *29*, 950-951.
- C. W. Tang and A. C. Albrecht, *J. Chem. Phys.*, **1975**, *62*, 2139-2149.
- C. W. Tang, *Appl. Phys. Lett.*, **1986**, *183*-185.
- S. Uchida, J. Xue, B. P. Rand and S. R. Forrest, *Appl. Phys. Lett.*, **2004**,

新製品

- 85, 4218-4220.
- 10) N. S. Sariciftci, L. Smilowitz, A. J. Heeger and F. Wudl, *Science*, **1992**, 258, 1474-1476.
 - 11) G. Yu, J. Gao, J. C. Hummelen, F. Wudl and A. J. Heeger, *Science*, **1995**, 270, 1789-1791.
 - 12) M. Hiramoto, H. Fujiwara and M. Yokoyama, *Appl. Phys. Lett.*, **1991**, 58, 1062-1064.
 - 13) 平本 昌宏, 応用物理, **2008**, 77, 539.
 - 14) S. Ito, T. Murashima, H. Uno and N. Ono, *Chem. Commun.*, **1998**, 1661-1662.
 - 15) Y. Matsuo, Y. Sato, T. Niinomi, I. Soga, H. Tanaka and E. Nakamura, *J. Am. Chem. Soc.*, **2009**, 131, 16048-16050.
 - 16) 大橋知佳, 山田容子, 中山健一, 第 59 回応用物理学関連連合講演会, 東京, **2012**, 15p-GP11-13.
 - 17) T. Aotake, S. Ikeda, D. Kuzuhara, S. Mori, T. Okujima, H. Uno and H. Yamada, *Eur. J. Org. Chem.*, **2012**, 1723-1729.
 - 18) H. Yamada, E. Kawamura, S. Sakamoto, Y. Yamashita, T. Okujima, H. Uno and N. Ono, *Tetrahedron Lett.*, **2006**, 47, 7501-7504.
 - 19) S. Katsuta, H. Yamada, T. Okujima and H. Uno, *Tetrahedron Lett.*, **2010**, 51, 1397-1400.
 - 20) R. Mondal, A. N. Okhrimenko, B. K. Shah and D. C. Neckers, *The journal of physical chemistry. B*, **2008**, 112, 11-15.
 - 21) C. Tönshoff and H. F. Bettinger, *Chem. Eur. J.*, **2012**, 18, 1789-1799.
 - 22) R. Mondal, R. M. Adhikari, B. K. Shah and D. C. Neckers, *Organic Letters*, **2007**, 9, 2505-2508.
 - 23) R. Mondal, B. K. Shah and D. C. Neckers, *J. Am. Chem. Soc.*, **2006**, 128, 9612-9613.
 - 24) C. Tönshoff and H. F. Bettinger, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2010**, 49, 4125-4128.
 - 25) R. Mondal, C. Tönshoff, D. H. Khon, D. C. Neckers and H. F. Bettinger, *J. Am. Chem. Soc.*, **2009**, 131, 14281-134289.
 - 26) H. Yamada, D. Kuzuhara, K. Ohkubo, T. Takahashi, T. Okujima, H. Uno, N. Ono and S. Fukuzumi, *J. Mater. Chem.*, **2010**, 20, 3011.
 - 27) S. Katsuta, D. Miyagi, H. Yamada, T. Okujima, S. Mori, K. Nakayama and H. Uno, *Org. Lett.*, **2011**, 13, 1454-1457.
 - 28) S. Katsuta, K. Tanaka, Y. Maruya, S. Mori, S. Masuo, T. Okujima, H. Uno, K. Nakayama and H. Yamada, *Chem. Commun.*, **2011**, 47, 10112-10114.

[著者プロフィール]

氏名：山田 容子 (Hiroko Yamada)

所属：奈良先端科学技術大学院大学 物質創成科学研究科 教授
連絡先：〒630-0192 奈良県生駒市高山町 8916-5

TEL : 0743-72-6041 FAX : 0743-72-6042

E-mail : hyamada@ms.naist.jp

略歴：

- 1992 京都大学大学院理学研究科化学専攻
博士後期課程修了・博士（理学）
- 1992 - 1994 日本学術振興会特別研究員（PD）
- 1994 - 1998 (株)日本チバガイギー国際科学研究所及び
(株)チバ・スペシャルティー・ケミカルズ
- 1998 - 2000 大阪大学産業科学研究所機関研究員
- 2000 - 2003 JST CREST 博士研究員
- 2003 - 2010 愛媛大学理学部助教授(2007より准教授に名称変更)
- 2011 - 2012 奈良先端科学技術大学院大学
物質創成科学研究科准教授
- 2012 - 現職
- 2006 - 2010 JST さきがけ「物質と光作用」領域研究員（兼担）
- 2010 - JST CREST 「太陽光エネルギー」領域研究代表
(兼担)

専門：有機化学、有機光化学

アセチルコリンエステラーゼ特異的基質

MATP+

<特長>

- ・アセチルコリンエステラーゼに対し、高い選択性を示す
- ・ブチリルコリンエステラーゼ阻害剤添加は不要

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(赤血球)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、これらの薬物の暴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この酵素が活性化しているため、アルツハイマー病治療薬のターゲットとしても注目されています。

現在、AChE 活性測定には、基質であるアセチルチオコリンと検出試薬である DTNB を用いた Ellman 法が一般的に用いられています。しかしながら、アセチルチオコリンは、AChE 選択性が低く、生体内に存在する非特異的コリンエステラーゼ(ブチリルコリンエステラーゼ；BChE)に対しても反応します。そのため、AChE 活性を測定するためには BChE 阻害剤を添加する必要があり、操作が煩雑でした。

MATP+ は、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 (Fig. 1)。

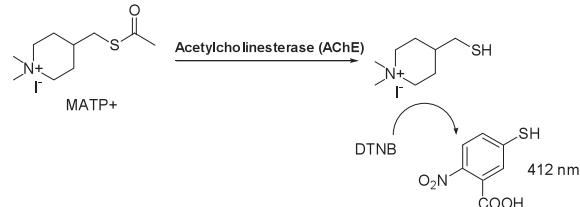


Fig. 1 MATP+ を用いたアセチルコリンエステラーゼ活性測定法の原理

一般的に用いられているアセチルチオコリンに比べ、非常に高いAChE選択性を有しています (Fig. 2)。そのため、BChE阻害剤を添加することなくAChE活性を選択的かつ簡便に測定することができます。

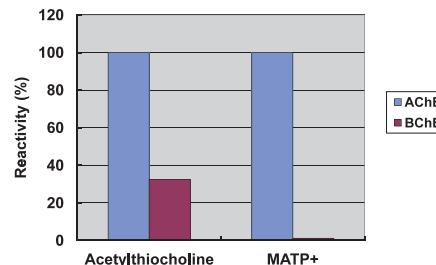


Fig. 2 AChE 選択性の比較

注) AChEに対する反応性を 100%とした場合の値を示す。

本試薬は全血中の AChE 活性測定や Karnovsky/Roots 法を用いた神経組織の AChE 染色に有用であり、AChE 活性が変動する疾患や農薬暴露の確認手段として簡便で正確な測定方法として利用されています。

(本製品は特許出願がなされており、小社は試薬用途として、その実施許諾を得て製造・販売しております)

品名	容量	希望納入価格(¥)	メーカーコード
MATP+	10 mg	20,000	M450

「蛍光生物学」の最前線

6-1 哺乳類動物の固定組織の大規模・高精細3次元蛍光観察

宮脇 敦史、濱 裕
理化学研究所脳科学総合研究センター

1. はじめに

現代の形質転換技術や遺伝子導入技術を活用すれば、マウスなど実験哺乳類動物の様々な構造を選択的に蛍光タンパク質の蛍光で標識することができる。標識した組織サンプルをホルマリンで固定し、蛍光を指標に構造を可視化し3次元的に再構築する技術に対する興味が増大している。特に神経科学の分野で、マウス脳内の神経回路を機能的にマップする試みは世界的な規模で行われており、神経細胞同士の連絡（コネクション）を網羅的に調べることから「コネクトミクス（プロジェクト）」と呼ばれている¹⁻³⁾。シナプスを含め神経回路の機能的構造を高精細に観察するには、脳組織の切片の蛍光画像を何枚も連続的に取得し、それらを積み上げていくことが必要である。切片の作り方には2通りある。機械的に切るか光学的に切るかである。機械的方法を採用すると、脳表面からの深さにかかわらず高精細な蛍光観察が可能であるが、切片作製に大変な労力を伴う、画像からの3次元再構築が大変に難しいという問題がつきまとった。一方、光学的方法を採用すると、光が脳組織内部で散乱するため、観察部位が脳表面から深くなるにつれ画像が暗くぼやけるという問題がつきまとった。一般的に、光学的切片を目指す蛍光イメージング観察においては、生体試料の表面から深部に向かってどこまで蛍光を高精細に観察できるかが課題で、観察深度限界を指標に議論される。脳組織を材料にすると、通常の一光子励起顕微鏡で0.15 mm、二光子励起顕微鏡でも0.7 mm程度が一般的な限界と言われている。マウスの脳の場合、表層の皮質の厚さが約1 mmある。皮質とそれよりも脳の深部にある海馬や視床との神経連絡などを観察するには、数mmまで観察深度限界を広げる必要がある。

我々が肉眼で感じる可視領域の光は、なかなか生体試料を直進することができない。光の直進を妨げる主な要因は散乱である。試料の中で光の散乱が起こり、光の進行方向が何度も変わってしまうのだ。これまで光の散乱を取り除く技術（透明化試薬）がいくつか開発されてきたが、そのほとんどが有機溶媒をベースにしていた。BABB（ベンジルアルコール/安息香酸ベンジル）試薬による透明化が一般的であるが⁴⁾、ホルマリン固定した組織を脱水する過程や透明化試薬そのものの影響で、観察したい標識構造の蛍光シグナルが消失してしまうという問題があった。そのため、生体試料の脱水を必要としないような、蛍光タンパク質にやさしい水溶性の透明化試薬の開発が求められていた。

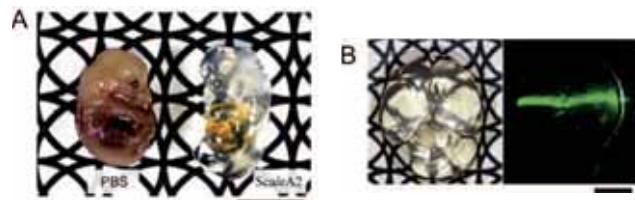


図1 ScaleA2 試薬によってゼリー様に透明化したマウス胎仔およびマウスの脳。
(A) ScaleA2 試薬で透明化したマウスの胎仔（胎生 13.5 日）（右）と PBS に浸漬した同時期のマウス胎仔（左）。(B) ScaleA2 試薬で透明化した生後 15 日目のマウス脳（左）と、この脳に波長 532 nm のレーザーポインターの光を照射した画像（右）。いずれも組織固定液で固定した後に ScaleA2 試薬で 2 週間処理を行なった。スケールバーは 5 mm。(文献 5 より改変して転載)

2. 組織透明化技術 Scale の開発

我々は尿素をベースに組織透明化試薬の開発に着手した。尿素で処理をすると Western Blotting に用いる PVDF 膜などいろいろな材料が水になじみやすくなること、さらに、高濃度の尿素の存在下でも蛍光タンパク質の蛍光の明るさがまったく減弱しないことに注目した。最終的に、尿素を含む水溶性にグリセロールと界面活性剤を添加した ScaleA2 試薬を完成させた⁵⁾。組成は、4M 尿素、10% グリセロール、0.1% Triton X と、極めてシンプルである。これら 3 つの溶質を水で溶解することが重要である。PBS のような緩衝液を溶媒として使ってはならない。特に塩が混入すると、組織透明化プロセスがブロックされることがわかっている。

ホルマリン固定したマウス胎仔やマウスの脳を ScaleA2 試薬で 2 日から 2 週間処理したところ、ゼリーのように透明になることを確認した（図 1）。また、神経細胞集団に黄色蛍光タンパク質（YFP）を発現する形質転換マウス（YFP-H ライン）⁶⁾の脳に適用して、ScaleA2 試薬による透明化プロセスが蛍光タンパク質の蛍光シグナルを完全に保存することを確認した（図 2）。

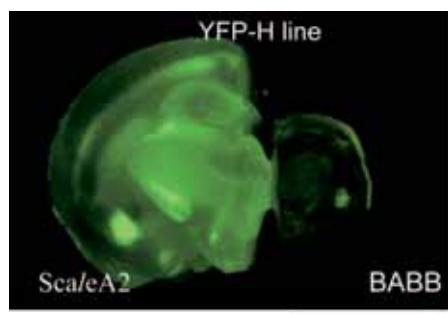


図2 ScaleA2 試薬による処理が蛍光タンパク質の蛍光シグナルに及ぼす影響。
ScaleA2 試薬で処理を行なった黄色蛍光タンパク質（YFP）を発現するマウス（YFP-H ライン）の大脳スライス（左）と有機溶媒を用いた BABB 法による透明化（文献 4）を行なった大脳スライス（右）。ScaleA2 試薬による処理が YFP の蛍光シグナルを保存するのに対して BABB 法による処理が YFP の蛍光シグナルを損なうことがわかる。スケールバーは 5 mm。(文献 5 より改変して転載)

3. 脳を切らずに、神経の回路や投射を可視化する

YFP-H ラインの脳を使って、神経回路の大規模・高精細な蛍光観察を試みた。マウス全身をホルマリン固定し、取り出した全脳を ScaleA2 溶液に 1 週間浸漬した。二光子励起蛍光顕微鏡を使って、作動距離が 2 mm の対物レンズを脳表面に置いて観察したところ、脳皮質の全層（I 層から VI 層まで）、さらに白質を超えて海馬の一部まで一挙に観察することができた。また、各蛍光画像における空間分解能は高く、樹状突起の棘突起（スパイク）構造の詳細が確認できた（図 3）。二光子励起蛍光顕微鏡を使った理由は、一般的にこの観察方法における観察深度限界が一光子励起蛍光顕微鏡の限界に比べて大きいことがある。しかし、同様の深部（～2 mm）蛍光観察が、通常の一光子励起蛍光顕微鏡を使ってもできることがわかった（図 4）。

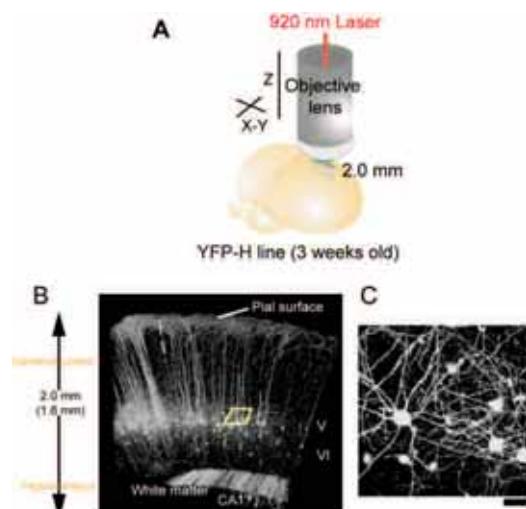


図 3 二光子励起蛍光顕微鏡による ScaleA2 試薬で処理を行なった YFP-H ライン・マウス大脳の神経回路の大規模・高精細な蛍光観察。

(A) 作動距離 2 mm の対物レンズを用いた観察部位。(B) 脳皮質の全層（I 層から VI 層まで）から海馬の一部までの広領域にわたる 3-D 透視観察像。(C) 画像 B 中の四角の領域の拡大画像、樹状突起（スパイク）構造の詳細が確認できた。スケールバーは 50 μm。（文献 5 より改変して転載）

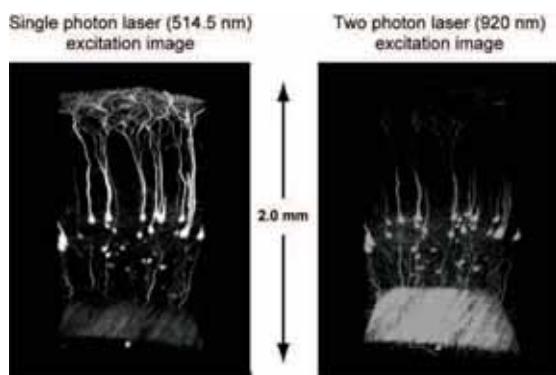


図 4 ScaleA2 試薬で処理を行なった YFP-H ライン・マウス大脳の一光子励起蛍光顕微鏡観察による 3-D 透視画像。同一部位を一光子励起蛍光顕微鏡（左）と二光子励起蛍光顕微鏡（右）で観察した。

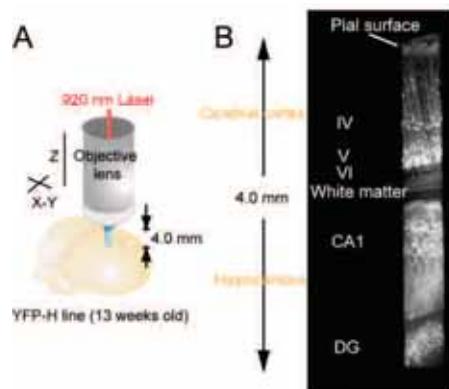


図 5 ScaleA2 試薬で処理を行なった YFP-H ライン・マウス大脳のより深い領域の二光子励起蛍光顕微鏡観察。

(A) 作動距離が 4 mm（開口数が約 1）の対物レンズによる大脳の観察。(B) 二光子励起蛍光顕微鏡観察による大脳観察部位の 3-D 透視画像。脳表面から皮質、白質を経て海馬の歯状回（DG）にいたる観察が可能となった。（文献 5 より改変して転載）

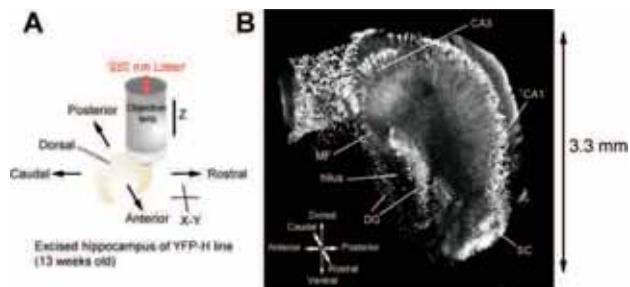


図 6 ScaleA2 試薬で処理を行なった YFP-H ライン・マウス海馬のより深く広い領域の二光子励起蛍光顕微鏡観察。

(A) 作動距離が 4 mm（開口数が約 1）の対物レンズによる大脳から切り離した海馬の観察部位。(B) 二光子励起蛍光顕微鏡観察による海馬の広領域にわたる 3-D 透視画像。DG、歯状回：GCL、顆粒細胞層；MF、苔状線維；SC、海馬台。（文献 5 より改変して転載）

ScaleA2 試薬で透明になった生体試料の観察深度限界は、もはや対物レンズの作動距離に依存する。こうした事実を踏まえて、開口数を高く維持しながら対物レンズの作動距離を長くする開発を光学顕微鏡メーカーに依頼した。観察深度限界を飛躍的に拡大することを目指したのである。たとえば作動距離が 4 mm（開口数が約 1）の対物レンズが出来てきて、これを使った観察を二光子励起蛍光顕微鏡で行った。YFP-H ラインの全脳に適用し、脳表面から、皮質、白質を経て、さらに海馬の歯状回にいたる神経回路を可視化し 3 次元構築することができた（図 5）。また、こうした観察を水平方向に広げ、タイリングソフトウェアを使ってつなぎ合わせることで、YFP-H ラインの海馬のほぼ全体に渡って神経回路を 3 次元構築することができた（図 6）。

一方で、わざと開口数の低い対物レンズを用いて焦点深度をかせぐことを狙った一光子励起蛍光顕微鏡観察を行った。まず、電気穿孔技術を使って、子宮内のマウス胎仔の脳右半球大脳皮質の第 II / III 層の錐体細胞に YFP 遺伝子を導入し、発生とともにこれらの神経の軸索が左半球に投射する経路を蛍光で標識した。生後 10 日目の脳をホルマリン固定し、ScaleA2 試薬で透明化し、マク

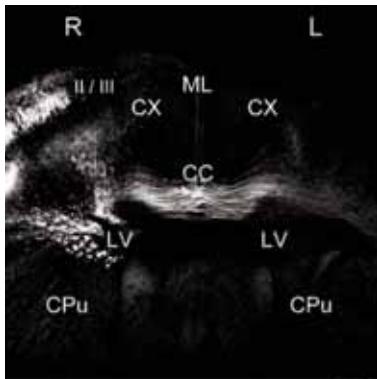


図7 マクロズーム共焦点レーザー走査顕微鏡による広範囲にわたる神経投射の可視化。電気穿孔法によりYFP遺伝子を大脳皮質に導入したマウスの発生に伴って投射する交連線維をScaleA2試薬で処理した後に観察。
図は3-D透視画像。CC、脳梁:CX、大脳皮質:CPu、線条体:LV、側脳室:ML、正中線。(文献5より改変して転載)

ロズーム共焦点レーザー走査顕微鏡で観察を行った。左右の半球を連結する投射線維の束の走行を3次元的に追跡することができた。(図7)。こうした技術が普及すれば、数多くの変異マウスのなかから、投射線維の走行パターンに異常があるものを迅速に見つけることができると思われる。

4. 3次元空間で、神経幹細胞と血管との相互作用を解析

神経幹細胞の可視化のために、従来はBrdU注入によるS期特異的パルスラベルが一般的に行われてきた。一方我々は、細胞周期の進行を指標にして神経新生の可視化を行っている。特にマウス脳の海馬における神経新生に注目している。すなわち、細胞周期蛍光プローブFucci 7のS/G2/M期マーカー(緑色)を発現する形質転換マウスを用いると、細胞分裂に向かう神経幹細胞の核を海馬組織内に見出すことができる。さらに、還流固定に際してTexas Red conjugated lectinを使用することで、マウスの全身の血管を赤色の蛍光で標識することができる。上記形質転換マウスに全身血管標識を施し、ホルマリン固定した脳をScaleA2試薬で透明化した後、緑と赤の2色蛍光観察を行った。すると海馬の歯状回において神経幹細胞の核が血管に寄り添う様子を観察することができた(図8)。さらに我々が独自に開発したソフトウェア「RINZO」⁵⁾を使って、3次元空間における最短距離の自動測定計算を行ったところ、増殖する神経幹細胞の核が他の神経核に比べて有意に血管に近いことを証明することができた。おそらく、神経新生に必要な栄養が血管から供給されることに関連する現象と考えられる。

5. 木も森も見る技術

蛍光タンパク質でいろいろな生物構造を蛍光標識する技術と連携して、Scale試薬による生体試料の透明化技術は、大規模かつ高精細な3次元構造の再構築プロジェクトに著しく貢献することが期待される。従来の光学顕微鏡や電子顕微鏡による網羅的観察

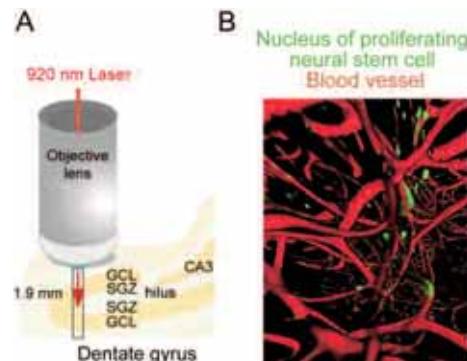


図8 海馬歯状回の血管と増殖に向かう神経幹細胞の核の二光子励起蛍光顕微鏡観察。ScaleA2試薬で処理を行なった海馬歯状回の3-D透視画像。

(A) 海馬歯状回の観察部位。(B) 増殖に向かう神経幹細胞の核(細胞周期蛍光プローブFucciのS/G2/M期マーカーを発現している、緑色)がTexas Red conjugated lectin(赤色)で標識された血管に寄り添っている。GCL:顆粒細胞層; SGZ:顆粒細胞下帯。(文献5より改変して転載)

は、1mm以内のスケールで詳細に行われる(木を見て森を見ず)。一方、MRIやPETなどによる観察は、個体丸ごとのスケールで粗く行われる(森を見て木を見ず)。Scale技術は、これら2つの可視化技術の間にあるギャップを埋める役割を果たすと期待される(木も森も見る)。たとえば、最近流行りのチャネル・ロドプシン。この遺伝子をウイルスベクターなどを使ってネズミの脳の特定領域に導入し、光ファイバーで照射して、遺伝子導入された神経を発火させる実験が広く行われている。光照射がもたらす行動を解析するわけであるが、実際にどういう神経がチャネル・ロドプシンを発現しているのかをマップしておく必要がある。幸いにもチャネル・ロドプシンにはYFPが付与されているので、動物実験が終了した段階で脳を固定かつ透明化して簡単な蛍光3次元再構築(必ずしも高精細である必要はない)を行うことを勧めたい。

6. Scale技術の幅広く柔軟な発展

Scale技術は脳以外の器官、組織にも適用可能である。マウス以外の哺乳類実験動物、例えばラット、ブタ、サルの試料にも適用可能である。ヒトの病理標本に適用すれば、いろいろな標識技術と組み合わせて、標本内を隈なく観察して病変を確実に見つけ出す技術に発展することが期待される。

ScaleA2試薬でマウス胎仔や生後マウスの全脳を透明化するのに2日から2週間の時間を費したと記したが、組織を覆う表皮や被膜があると透明化のスピードは落ちる。たとえば脳組織のプロックであれば、極めて短時間に透明化が完了する。

注目すべきは、Scale試薬の組成が著しく簡単であることだ。従つて、試料の性質に合わせて自由自在にScale試薬の組成を変えることができる。我々は、生体試料の多様性を考慮し、ScaleA2の組成を変更してScaleE2試薬およびScaleB4試薬を開発している。ScaleE2試薬は透明化に伴う試料の膨張を抑えることができ、ScaleB4試薬は透明化にかかる時間を短縮することができる。Scale試薬はいずれも非常に安価で、大量の試薬調製が可能である。大型の生体試料についてもScale技術の適用が期待できる。

[参考文献]

- 1) J. W. Lichtman and J. R. Sanes, "Ome sweet ome: what can the genome tell us about the connectome?", *Curr. Opin. Neurobiol.*, **2008**, 18, 346-353.
- 2) J. W. Lichtman and S. J. Smith, "Seeing circuits assemble", *Neuron*, **2008**, 60, 441-448.
- 3) H. S. Seung, "Reading the book of memory: sparse sampling versus dense mapping of connectomes", *Neuron*, **2009**, 62, 17-29.
- 4) H.-U. Dodt, U. Leischner and A. Schierloh, et al., "Ultramicroscopy: three-dimensional visualization of neuronal networks in the whole mouse brain", *Nat. Methods*, **2007**, 4, 331-336.
- 5) H. Hama, H. Kurokawa and H. Kawano, et al., "Scale: a chemical approach for fluorescence imaging and reconstruction of transparent mouse brain", *Nat. Neurosci.*, **2011**, 14, 1481-1488.
- 6) G. Feng, R. H. Mellor and M. Bernstein, et al., "Imaging neuronal subsets in transgenic mice expressing multiple spectral variants of GFP", *Neuron*, **2000**, 28, 41-51.
- 7) A. Sakaue-Sawano, H. Kurokawa and T. Morimura, et al., "Visualizing spatiotemporal dynamics of multicellular cell cycle progression", *Cell*, **2008**, 132, 487-498.

[著者プロフィール]

氏名：宮脇 敦史（Atsushi Miyawaki）

所属：独立行政法人理化学研究所 脳科学総合研究センター

　　脳科学総合研究センター 副センター長

　　同センター 細胞機能探索技術開発チームリーダー

住所：〒351-0198 埼玉県和光市広沢 2-1

1991年3月 大阪大学医学部大学院医学研究科博士課程修了

1991年4月 日本学術振興会 特別研究員（御子柴克彦教授）

1993年4月－1998年12月 東京大学医科学研究所 助手

1995年10月 HFSP long-term fellowship, University of California San Diego, Dept. of Pharmacology (Prof. Roger Tsien)

研究課題：カルシウムプローブの開発

1997年10月 Research Pharmacologist, University of California San Diego, Dept. of Pharmacology (Prof. Roger Tsien)

研究課題：カルシウムプローブの開発

1999年1月～ 独立行政法人理化学研究所 脳科学総合研究センター 先端技術開発グループ 細胞機能探索技術開発チーム チームリーダー

2004年1月－2009年3月 独立行政法人理化学研究所 脳科学総合研究センター 先端技術開発グループ グループディレクター

2005年7月－2010年3月 東京大学分子細胞生物学研究所細胞機能情報研究センター プロトオーム研究分野
客員教授

2006年4月－2011年3月 自然科学研究機構基礎生物学研究所 発生ダイナミクス研究部門 客員教授

2006年10月－2012年3月 独立行政法人科学技術振興機構 ERATO「生命時空間情報」プロジェクト 研究総括

2007年4月～ 早稲田大学理工学術院 分子神経科学研究 客員教授

2008年4月～ 独立行政法人理化学研究所 脳科学総合研究センター 副センター長

2009年4月～ 慶應義塾大学 医学部 客員教授

2010年4月～ 東邦大学 理学部 客員教授

2012年4月～ 横浜市立大学生命ナノシステム科学研究所 客員教授

氏名：濱 裕（Hiroshi Hama）

所属：独立行政法人理化学研究所 脳科学総合研究センター
細胞機能探索技術開発チーム

住所：〒351-0198 埼玉県和光市広沢 2-1

筑波大学医学研究科修了。医学博士。

同大学の基礎医学系薬理学研究室助手（研究テーマ：グリア細胞の細胞生物学）。

国立精神・神経センター神経研究所の機能研究部のポストドク（研究テーマ：筋ジストロフィーに関わるタンパク質の生化学）を経て、1999年から独立行政法人理化学研究所・脳科学総合研究センター・細胞機能探索技術開発チームの研究員。

現在の研究テーマは、「神経前駆細胞を用いた神経組織の修復」、および「ニューロン／グリアネットワークの可視化」。

第23回フォーラム・イン・ドージン 「ホスホリパーゼA2が織りなす多元的世界」

本年も11月にフォーラム・イン・ドージンを開催いたします。

詳細なプログラムは次号および小社ホームページにてご案内いたします。

皆様のご参加をお待ちしております。

期日：2012年11月16日(金)

場所：熊本ホテルキャッスル（熊本市中央区城東町4-2）

清水 孝雄（東京大学大学院医学系研究科 特任教授）

村上 誠（東京都医学総合研究所 生体分子先端研究分野 脂質代謝プロジェクト プロジェクトリーダー）

久木山 清貴（山梨大学大学院医学工学総合研究部 内科学講座第二 教授）

上田 直子（崇城大学 薬学部 薬学科 生命薬学講座 生化学研究室 教授）

隅 寿恵（大阪大学大学院医学系研究科 神経内科学助教）

西浦 弘志（熊本大学大学院生命科学研究部 生体機能病態学 分子病理学分野 助教）

「蛍光生物学」の最前線

6-2

生物発光・蛍光イメージングを用いた がん細胞とがん微小環境の解析

今村 健志^{1,2}、正田 温彦^{1,2}、
本藏 直樹^{1,2}、大嶋 佑介^{1,2,3}

¹ 愛媛大学大学院医学系研究科 分子病態医学分野

² 科学技術振興機構 戰略的創造研究推進事業

³ 愛媛大学 医学部付属病院 先端医療創生センター

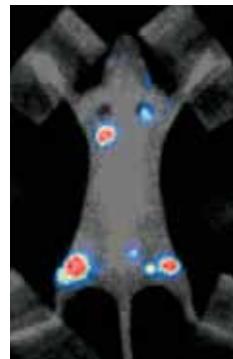


図1 生物発光技術を用いた乳がん骨転移のイメージング
(文献3を一部改変して転載)

ホタルルシフェラーゼを恒常に発現する高骨転移ヒト乳がん細胞株 MDA-231-D 細胞(MDA-231-D-Fluc 細胞)⁹⁾をヌードマウスの左心室に移植して0週目に、担がんマウスに基質であるD-ルシフェリンを投与した後、暗箱の中に入れ、超高感度 CCD カメラによって動物の体内に存在する細胞から発せられる微量な発光シグナルを検出し、画像化した。肩甲骨や四肢骨から強い発光シグナルが検出された。別の実験で、シグナルが検出された部位を追跡すると、レントゲン上、骨破壊が確認された。

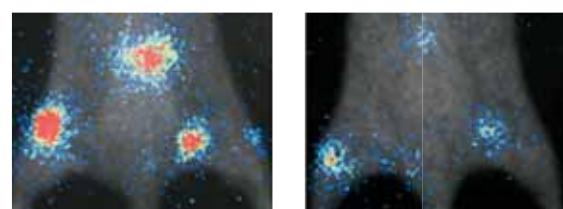
はじめに

これまで、がんは‘均一な細胞の集団’と考えられていた。ところが、近年、がんは‘不均一な細胞の集団’であり、特に、幹細胞様の性質を持ったごく少数のがん幹細胞が、発がんから転移・再発に関与していると考えられるようになってきた¹⁾。さらに、がんは周囲を血管や間質といった微小環境(がん微小環境)が支えている複雑な組織であるが、このがん微小環境が発がんや転移にも強く関わる可能性がわかってきた。特に、がん幹細胞は、ニッセと呼ばれる特殊な環境によって自己再生能や多分化能の維持、制御された増殖や分化等の特性を付与されると考えられている。以上のことから、これからのがん研究では、がん幹細胞とニッセを中心としたがん-がん微小環境から構成される複雑なネットワークを理解して、その分子メカニズムを解析する必要がある。

このような問題点を解決するために必要なテクノロジーの一つにバイオイメージング技術がある^{2,3)}。中でも生物発光技術や蛍光技術を用いた生体光イメージングは、他のイメージング技術と同様に、同一個体を低侵襲で経時的に解析することが可能であるのみならず、他のイメージング技術に比べ、簡便で安全性が高く、高空間分解能の解析が可能である。さらにプローブにさまざまな工夫を凝らすことで多元的解析や機能解析が可能であり、抗体等を付加することで選択性・特異性が高いイメージングが実現できる。本稿では、生物発光や蛍光など光を駆使したがんイメージングについて、特に、がん細胞とがん微小環境の解析に焦点を絞り、我々のデータを紹介しながら解説する。

1. 生物発光イメージングを利用したがん細胞追跡とシグナル伝達解析

ホタル、ウミシイタケや鉄道虫などは、体内で発光酵素ルシフェラーゼを利用して、基質であるD-ルシフェリンやセレンテラジンを酸化反応によって発光体に変換し、光を発生させる。このシステムは、細胞生物学実験において、ATP活性測定やレポーターによる転写活性測定に広く用いられてきたが、ルシフェリン等の基質が発する生体透過性に富むルミネッセンスを利用してイメージングに応用できる。具体的には、ホタルルシフェラーゼを恒常に発現する乳がん細胞をヌードマウスの左心室に注射して、



A. ウミシイタケルシフェラーゼ
(セレンテラジン投与)

B. ホタルルシフェラーゼ
(D-ルシフェリン投与)

図2 生物発光技術を用いたがん細胞のTGF- β シグナルのイメージング
(文献4を一部改変して転載)

MDA-D-T β Fluc/Rluc 細胞をヌードマウスの左心室に移植して5週目に、担がんマウスにセレンテラジン(A)とD-ルシフェリン(B)を投与した後、生物発光イメージングをおこなった。Renilla ルシフェラーゼ陽性のがん細胞内のTGF- β シグナルをイメージングすることができた。

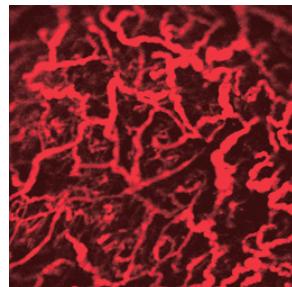


図3 蛍光技術を用いたがん血管新生のイメージング

(文献6を一部改変して転載)

ヒト線維肉腫細胞株 HT1080 細胞をヌードマウスの皮下に移植して1週目に、麻酔下の担がんマウスに血管標識用近赤外蛍光プローブ AngioSense(パーク・エルマー社)を投与して、がん内部の血管新生をイメージングした。

また、Bimolecular Fluorescence Complementation (BiFC) 法を用いること、タンパク間相互作用やユビキチン化などタンパク質の翻訳後修飾をイメージングすることができる。具体的には、N末端側とC末端側に2分割したルシフェラーゼにそれぞれタンパク質を繋いだ融合タンパク質を用いると、2つのタンパク質が結合する場合にルシフェラーゼが再構成され、その活性が観察できる⁵⁾。

2. 蛍光イメージングを利用したがん血管新生とプロテアーゼ活性のイメージング

近年、分子生物学や有機化学を駆使した蛍光タンパク質プローブや蛍光有機小分子の作製技術の進歩と共に焦点レーザー顕微鏡や2光子励起顕微鏡などの蛍光検出器機の性能の向上などにより、蛍光イメージングを利用して、動物が生きた状態で、さまざまな生命現象をイメージングできるようになった。蛍光イメージングは前述の生物発光イメージングに比べ、基質の投与を必要とせず、空間分解能、時間分解能、多元性に優れているが、自家蛍光や散乱などの光学特性の問題から、生体深部観察には不向きであると考えられてきた。しかし、近年、近赤外領域の長波長蛍光有機小分子の蛍光プローブの開発が進み、自家蛍光の低い環境で、より深部まで観察が可能になり、生体での蛍光イメージングの欠点が解決されつつある。

がんは自らの酸素や栄養補給のために血管新生促進因子を分泌して血管増生を促し、さらにその新生血管を介して遠隔臓器に転移する。そのため、血管新生阻害薬が、がん分子標的治療薬として注目されている。蛍光イメージングを用いると、従来の病理組織学的手法では不可能だった同一個体の経時的な血管イメージングをおこなうことが可能で、例えば、血管新生阻害剤投与前後での評価をおこなうことができる⁶⁾。我々は、血管イメージング用近赤外蛍光有機小分子を用いて、ヒトがん細胞を移植したマウスにおけるがんの血管新生を経時にイメージングした(図3)。

一方、蛍光ケンチング効果を利用したプロテアーゼ活性用近赤外蛍光プローブを用いることで、細胞や動物が生きてる状態で、プロテアーゼ活性をイメージングすることができる。さらに、緑色蛍光タンパク質(green fluorescent protein; GFP)を発現するがん細胞やAngioSenseなどと組み合わせることで、例えば、がん(図4A)、新生血管(図4B)とカテプシンB, L, Sやプラスミン等のプロテアーゼ活性(図4C)を同時(図4D; Merge画像)に解析することが可能である。がん転移やがん血管新生において

は、がん細胞や血管内皮細胞が周囲組織に浸潤する必要があり、その場合には組織を溶解するプロテアーゼが重要な働きを担っている。よって、がん悪性化のメカニズムの解明や分子標的薬剤の開発のために、血管やプロテアーゼ活性をイメージングする手法が大きな力を発揮する。

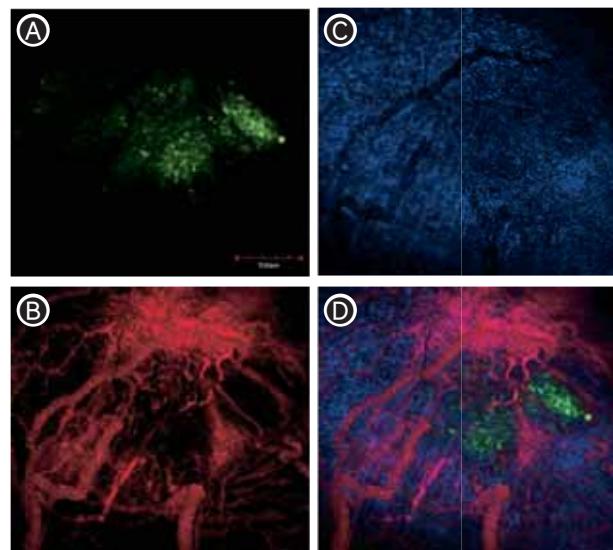


図4 蛍光技術を用いたがん細胞、血管とプロテアーゼ活性のイメージング
(文献10から転載)

GFPを発現するHT1080細胞をヌードマウスの皮下に移植して1週目に、麻酔下の担がんマウスに血管標識用近赤外蛍光プローブ AngioSenseとProSense(パーク・エルマー社)を投与して、がん細胞(A; 緑)、がんの新生血管(B; 赤)とカテプシンB/L/Sやプラスミンなどのプロテアーゼ活性(C; 青)をイメージングし、Mergeした(D)。

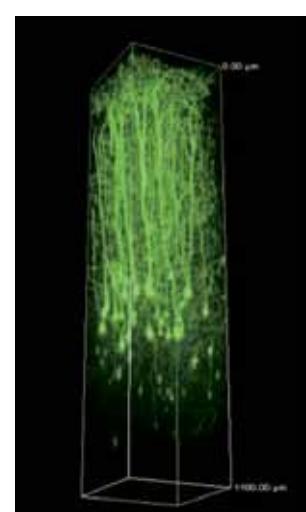


図5 2光子励起顕微鏡を用いた脳深部イメージング
Thy1プロモーター支配下にenhanced GFP(EGFP)を発現するH-lineマウスの頭蓋骨を開窓(open-skull法)し、生きているマウスの脳を2光子励起顕微鏡でイメージングし、大脳新皮質の錐体路細胞を観察した。第V層の細胞体から上下の基底樹状突起まで細胞全体のネットワークがイメージングされている。

おわりに

以上、我々のデータを中心に、光技術を駆使したがんイメージング研究のトピックスをまとめた。今後、さらに光プローブと光検出機器の技術革新が加われば、光イメージングはがん研究のみならず広くライフサイエンス分野での活躍が期待される。但し、深部観察に関しては課題も多く、それぞれの実験系に応じた工夫や新たな検出系の開発が必要である。特に2光子励起顕微鏡を用いると、サブミクロンレベルの解析が可能であり、近年、さまざまな研究分野において2光子励起顕微鏡が活用され、例えは、リンパ組織における免疫細胞の相互作用⁷⁾や骨における破骨細胞前駆細胞の動態⁸⁾などの報告がなされている。我々は、マウスが生きた状態で大脳新皮質の錐体路細胞をイメージングし、表面から約1mmの深さで錐体路細胞の第V層細胞体と基底樹状突起を観察することに成功している（図5）。

[参考文献]

- 1) M. Dean, T. Fojo and S. Bates, "Tumour stem cells and drug resistance", *Nat. Rev. Cancer.*, **2005**, 5, 275-284.
- 2) T. F. Massoud and S. S. Gambhir, "Molecular imaging in living subjects: seeing fundamental biological processes in a new light", *Genes Dev.*, **2003**, 17, 545-580.
- 3) 今村健志他, 病理と臨床 25 特集 形態学の進歩(時空間病理)文光堂, **2007**, 533-538.
- 4) Y. Katsuno, A. Hanyu, H. Kanda, Y. Ishikawa, F. Akiyama, T. Iwase, E. Ogata, S. Ehata, K. Miyazono and T. Imamura, "Bone morphogenetic protein signaling enhances invasion and bone metastasis of breast cancer cells through Smad pathway", *Oncogene*, **2008**, 27, 6322-6333.
- 5) T. Kojima, S. Karasawa, A. Miyawaki, T. Tsumuraya and I. Fujii, "Novel screening system for protein-protein interactions by bimolecular fluorescence complementation in *Saccharomyces cerevisiae*", *J. Biosci. Bioeng.*, **2011**, 111, 397-401.
- 6) A. Hanyu, K. Kojima, K. Hatake, K. Nomura, H. Murayama, Y. Ishikawa, S. Miyata, M. Ushijima, M. Matsuura, E. Ogata, K. Miyazawa and T. Imamura, "Functional *in vivo* optical imaging of tumor angiogenesis, growth, and metastasis prevented by administration of anti-human VEGF antibody in xenograft model of human fibrosarcoma HT1080 cells", *Cancer Sci.*, **2009**, 100, 2085-2092.
- 7) R. N. Germain, M. J. Miller, M. L. Dustin and M. C. Nussenzweig, "Dynamic imaging of the immune system: progress, pitfalls and promise", *Nat. Rev. Immunol.*, **2006**, 6, 497-507.
- 8) M. Ishii, J. G. Egen, F. Klauschen, M. Meier-Schellersheim, Y. Saeki, J. Vacher, R. L. Proia and R. N. Germain, "Sphingosine-1-phosphate mobilizes osteoclast precursors and regulates bone homeostasis", *Nature*, **2009**, 458, 524-528.
- 9) S. Ehata, A. Hanyu, M. Fujime, Y. Katsuno, E. Fukunaga, K. Goto, Y. Ishikawa, K. Nomura, H. Yokoo, T. Shimizu, E. Ogata, K. Miyazono, K. Shimizu and T. Imamura, "Ki26894, a novel transforming growth factor-beta type I receptor kinase inhibitor, inhibits *in vitro* invasion and *in vivo* bone metastasis of a human breast cancer cell line", *Cancer Sci.*, **2006**, 98, 127-133.
- 10) 今村健志, 羽生亜紀, イメージング . がんの分子標的治療, 鶴尾隆編, 南山堂, **2008**, 46.

[著者プロフィール]



氏名：今村 健志 (Takeshi Imamura)

所属：愛媛大学大学院医学系研究科 分子病態医学分野
住所：〒791-0295 愛媛県東温市志津川

E-mail : timamura-ind@umin.ac.jp

コメント：鹿児島大学医学部卒業後、整形外科の臨床研修を行いましたが、整形外科専門医取得後に心機一転、スウェーデン王国ルードヴィッヒ癌研究所に留学し、基礎研究の道に進みました。帰国後は、財団法人癌研究会癌研究所(現在の公益財団法人がん研究会がん研究所)で15年ほどシグナル伝達とがん・骨代謝の研究を行い、2010年から現職です。この10年ほどは、バイオイメージングを駆使したがん研究に焦点を絞って頑張っています。研究室 HP : <http://www.m.ehime-u.ac.jp/school/imaging/>

氏名：疋田 温彦 (Atsuhiko Hikita)

所属：愛媛大学大学院医学系研究科 分子病態医学分野
住所：〒791-0295 愛媛県東温市志津川

E-mail : ahikita@m.ehime-u.ac.jp

コメント：ニッチとは何か、少しずつでも明らかにできればと考えています。

氏名：本蔵 直樹 (Naoki Honkura)

所属：愛媛大学大学院医学系研究科 分子病態医学分野
住所：〒791-0295 愛媛県東温市志津川

E-mail : honkura@gmail.com

コメント：見ることの偉大さに衝撃を受け、非線形光学を駆使した画像化技術および操作することの素晴らしさから光操作の技術発展に貢献できればと思って研究しています。



氏名：大嶋 佑介 (Yusuke Oshima)

所属：愛媛大学大学院医学系研究科 分子病態医学分野、
愛媛大学 医学部付属病院先端医療創生センター

住所：〒791-0295 愛媛県東温市志津川

E-mail : y-oshima@m.ehime-u.ac.jp

コメント：青山学院大学大学院博士後期課程修了、在学中は日本学術振興会特別研究員、理化学研究所研修生として、ラマン分光法による生体分子計測の研究に従事。基礎生物学研究所研究員を経て、現職。非線形光学・ラマンによるプローブレスイメージングの技術開発と臨床応用をテーマとして日々研究に取り組んでいます。

Topics on Chemistry

DT Diaphorase 特異的なグルコース定量蛍光色素の開発

株式会社同仁化学研究所 後藤 奈月

蛍光色素は、生物化学の基礎研究、新薬開発、臨床診断といった分野で有力なツールとして注目されてきた。これまで用途に応じた種々の蛍光色素が数多く開発されているが、今回は DT- ジアホラーゼ（以下 DTD）特異的な蛍光色素に着目し、その特徴を紹介する。

DTD はフラビンタンパク質のホモ二量体であり、ほぼすべての種の動物細胞組織に広範囲に存在している。この酵素は NADPH または NADH を電子供与体として様々なキノン物質やキノンエボキシド、芳香族ニトロ化合物等の二電子還元を触媒している。この求電子的なキノンに対する酸化還元活性は結果として解毒作用を示すため、DTD は一般的に防御酵素として認知されている。なお、以前は NADH は DPNH (Diphosphopyridine nucleotide)、NADPH は TPNH (Triphosphopyridine nucleotide) と呼ばれており、それらを還元する酵素としてそれぞれの頭文字 D、T を取り DTD- ジアホラーゼと命名されている。

一方で、DTD はレドックス応答性の色素と脱水素酵素を組み合わせた酵素反応系に利用することで、疾病的診断や研究に幅広く用いられている。血糖測定においても、酵素反応系はグルコースを選択的に認識するという点で優れており、近年、酸化還元応答性の蛍光試薬と酵素を用いたグルコース測定法が活発に開発されている。使用される酵素としては、グルコースオキシダーゼやグルコースデヒドロゲナーゼ等がある。

グルコースオキシダーゼを利用した測定法は、グルコースを酸化する際に酸素を電子受容体として利用し、酸素を過酸化水素に還元することによって反応が開始される。產生された過酸化水素は、ペルオキシダーゼを触媒として蛍光色素の酸化反応を引き起こす。この酸化反応による色素の蛍光変化は、產生される過酸化水素量、すなわちグルコース量に依存するため、蛍光変化によってグルコースを定量することができる。しかし、この検出系は尿素やビリルビン等の夾雑物に影響されやすいといった欠点がある。

対照的に、レサズリン、遷移元素のオスミウムやルテニウムの金属錯体は、脱水素酵素であるグルコースデヒドロゲナーゼから直接電子を受け取るため酸素非依存的に反応が進行する。レサズリンは、グルコース存在下、DTD、NAD⁺、グルコースデヒドロゲナーゼによって蛍光性のレゾルフィンに変換される。しかしながら、還元反応が進行すると無蛍光物質となる、また無蛍光のレサズリンの吸収波長と蛍光性のレゾルフィンの蛍光波長が重なり、感度が低下するといった問題がある。一方、遷移元素を用いた測定系では、サンプル中の酸素量によって蛍光強度が低下するとい

う問題があり、いずれも十分な測定系とは言えない。

そこで本稿では、Sheng-Tung Huang らの開発したグルコースを高感度に定量するための新規の蛍光性色素を紹介したい¹⁾ (Fig. 1)。

化合物 1 は、ローダミン 110 の 3' と 6' 部位にキノンを結合させることにより、ローダミン 110 の蛍光を抑えているため無蛍光である。DTD、NADH 存在下では、DTD を触媒として NADH より電子を受け取り、キノン部位に選択的に還元反応が起こる。その際に生成する化合物 2 のフェノール部位は非常に反応性が高いため、速やかに分子内でラクトン化反応を起こし化合物 3 とローダミン 110 を産生する²⁾。解離したローダミン 110 は本来高い量子収率を有しており、解離と同時に蛍光が検出される仕組みである。

実際のグルコース定量においても、グルコース濃度に依存した蛍光強度の増加が確認されている (Fig. 2)。

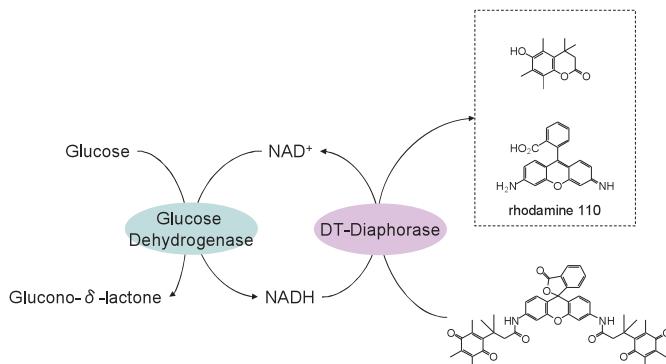


Fig. 2 化合物 1 によるグルコース定量法

グルコースデヒドロゲナーゼの働きにより、まずグルコースがグルコノラクトンに酸化され、それと一緒に系内に存在する NAD⁺ が還元されて NADH を生じる。NADH は電子供与体として働き、DTD を触媒として化合物 1 を還元することによって蛍光物質であるローダミン 110 を産生する。グルコース 1 分子の酸化により生じた電子が結果として 1 分子のローダミン 110 を産出するため、ローダミン 110 の蛍光強度からサンプル中のグルコースを定量することが可能となる。本化合物を用いたグルコース定量法は μM 濿度の測定も可能であり、感度はレサズリンとグルコースオキシダーゼを用いた系³⁾ に匹敵する。

前述のように、化合物 1 を利用した測定系は、反応にグルコースオキシダーゼを介さないことから測定系中の尿素やビリルビン等の夾雑物の影響を受けない、遷移元素を用いないためサンプルに含まれている酸素の影響を受けず蛍光収率が低下しない、ローダミン 110 を色素に用いていることからレサズリンのように励起波長と蛍光波長が重ならないため検出感度が高いといった利点がある。以上より、より正確なグルコースの定量が可能である。Sheng-Tung Huang らは化合物 1 に続いて DTD を触媒としクマリン誘導体を骨格とした蛍光検出試薬 (Fig. 3) についても報告している⁴⁾。この色素は、化合物 1 よりも長波長蛍光、大きなストークスシフトという特徴を有している他、反応部位の立体障害が小さいため、反応性が高い。そのため、この蛍光色素を用いることによってグルコース検出のさらなる高感度化を達成している。

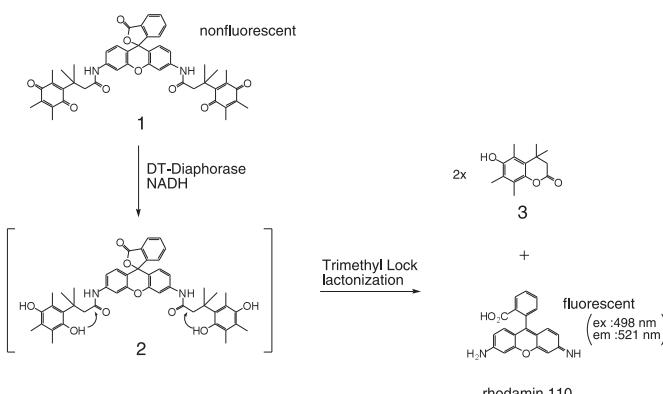


Fig. 1 化合物 1 の反応機構

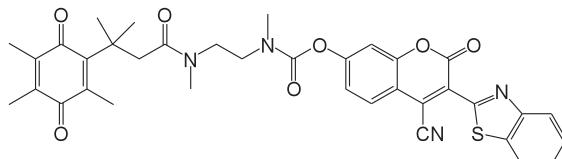


Fig. 3 クマリン誘導体を骨格とした蛍光色素

今回紹介したこれらの化合物は、Trimethyl Lock lactonizationという反応機構によってDTD依存的に反応し、蛍光を発するという新規の蛍光色素であり、この色素を用いることによって一般的なグルコース検出法の問題点を克服することが可能である。また、グルコースデヒドロゲナーゼではなく他の酵素を利用することによって、さまざまな検出系への応用が期待できる。

[参考文献]

- 1) S. T. Huang and Y. L. Lin, "New latent fluorophore for DT diaphorase", *Org. Lett.*, **2006**, 8 (2), 265.
- 2) S. S. Chandran, K. A. Dickson and R. T. Raines, "Latent fluorophore based on the trimethyl lock", *J. Am. Chem. Soc.*, **2005**, 127, 1652.
- 3) H. Maeda, S. Matsu-ura, Y. Yamauchi and H. Ohmori, "Resazurin as an electron acceptor in glucose oxidase-catalyzed oxidation of glucose", *Chem. Pharm. Bull.*, **2001**, 49(5), 622.
- 4) S. T. Huang, Y. X. Peng and K. L. Wang, "Synthesis of a new long-wavelength latent fluorimetric indicator for analytes determination in the DT-Diaphorase coupling dehydrogenase assay system", *Biosens Bioelectron.*, **2008**, 23(12), 1973.

第28版総合力タログ（2012/2013）発行



2012年2月1日に第28版総合力タログを発行いたしました。カタログ発行と併せて、ホームページの商品カタログ、プロトコルの内容も更新しております。これからも、引き続き皆様のご研究に役立つ情報をご提供して参ります。

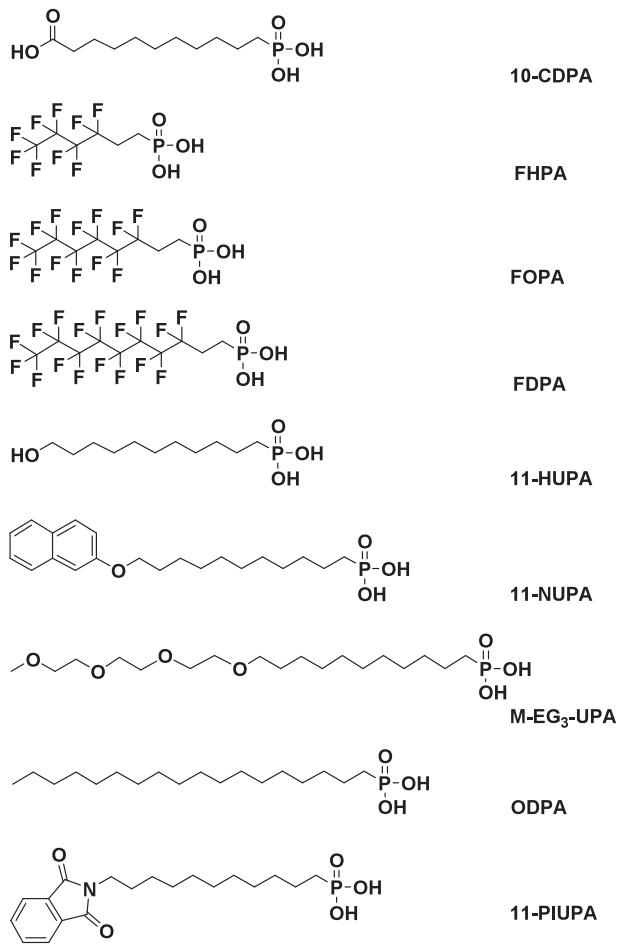
カタログのご請求は小社マーケティング部までご依頼ください。
その他パンフレット類のご請求も承っております。

Free dial : 0120-489548 Free fax : 0120-021557
<http://www.dojindo.co.jp/technical/catalog.html>

新製品

自己組織化单分子膜作製用試薬

アルキルホスホン酸誘導体



ホスホン酸誘導体は、Al₂O₃¹⁾、TiO₂²⁾、ZrO₂³⁾、SiO₂⁴⁾、マイカ⁵⁾、ステンレス (SS316L) 表面酸化膜⁶⁾、ニチノール⁷⁾、ヒドロキシアパタイト⁸⁾、AgO⁹⁾、ZnO¹⁰⁾、ITO^{11, 12)} 等の種々な金属酸化物の表面処理・改質剤として、近年、注目されています。

金属酸化物の表面処理には有機シラン化合物の自己組織化单分子膜(SAMs)が用いられていますが、試薬自体の安定性が低く、重合が起こるなど必ずしも使い易いものではありませんでした。一方、有機ホスホン酸誘導体はそれ自身は非常に安定な化合物であるにもかかわらず、有機シラン化合物同様に金属酸化物表面にSAMsを形成します。

ITO基板の仕事関数を増加する有機酸誘導体

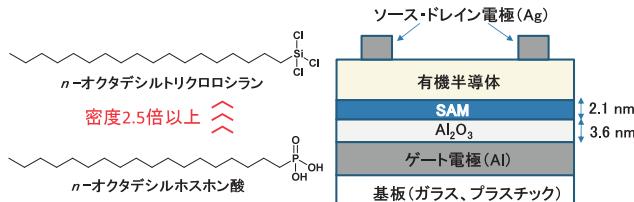


Fig. 1 SAM を絶縁膜に利用した有機トランジスタの模式図

Klauk らや Sekitani らは、 Al_2O_3 上のアルキルホスホン酸(ODPA)SAMを有機トランジスタの絶縁膜として使用し、トリクロロシリソ誘導体よりも有用であることを示しています (Fig. 1)¹³⁾。

Sharma らは ITO 基板をパーフルオロアルキル基を有するホスホン酸(FOPA)で修飾することにより、酸素プラズマ処理と同様に、ITO 基板の仕事関数が増大することを報告しています。

酸素プラズマ処理によって増加した仕事関数はすぐに低下しますが、FOPA 修飾により増加した仕事関数は安定性が高く、246 時間後も低下しないことが示されています (Fig. 2)¹¹⁾。また、FOPA 修飾 ITO を用いて作製した有機薄膜太陽電池は発光量、駆動電圧ともにより安定で、長寿命化されています。

このような有機デバイス以外にも最近様々な応用例が報告されています。例えば、Pulsipher らは ITO 基板に水酸基末端のアルキルホスホン酸(11-HUPA)の SAM を形成し、酸化条件をコントロールすることで、アルデヒドとカルボン酸二種類の表面ペターンを作製しています¹²⁾。Traina らはオリゴエチレングリコール部位を有するアルキルホスホン酸で Y_2O_3 微粒子を修飾し、水溶化することに成功しています¹⁴⁾。

Zhang らは、 ZnO 上にカルボン酸末端のアルキルホスホン酸(10-CDPA)SAMを形成し、縮合剤を用いて抗体を固定化し、バイオセンサーへの有用性を示しています¹⁰⁾。

小社では、このように種々の金属酸化物表面の機能化に有用なホスホン酸誘導体の開発を進めており、このたび 9 種類を製品化致しました。他のホスホン酸誘導体へのご要望も引き続き承っておりますので、ご興味がありましたらお問合せ下さい。

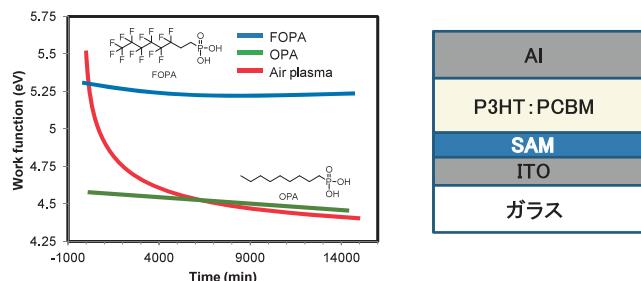


Fig. 2 FOPA により増加した ITO の仕事関数の安定性と有機薄膜太陽電池デバイス構造。(参考文献 11) より。

[参考文献]

- (a) T. A. Lewington, M. R. Alexander, G. E. Thompson and E. McAlpine, *Surf. Eng.*, **2002**, 18(3), 228. (b) T. Hauffman, O. Blajiev, J. Snauwaert, C. van Haesendonck, A. Hubin and H. Terryn, *Langmuir*, **2008**, 24(23), 13450.
- (a) B. M. Silverman, K. A. Wieghaus and J. Schwartz, *Langmuir*, **2005**, 21(1), 225. (b) G. Zorn, I. Gotman, E. Y. Gutmanas, R. Adadi, G. Salitra and C. N. Sukenik, *Chem. Mater.*, **2005**, 17(16), 4218. (c) E. S. Gawalt, G. Lu, S. L. Bernasek and J. Schwartz, *Langmuir*, **1999**, 15(26), 8929.
- W. Gao and L. Reven, *Langmuir*, **1995**, 11(6), 1860.
- (a) E. L. Hanson, J. Schwartz, B. Nickel, N. Koch and M. F. Danisman, *J. Am. Chem. Soc.*, **2003**, 125(51), 16074. (b) M. Dubey, I. Gouzman, S. L. Bernasek and J. Schwartz, *Langmuir*, **2006**, 22(10), 4649. (c) I. Gouzman, M. Dubey, M. D. Carolus, J. Schwartz and S. L. Bernasek, *Surf. Sci.*, **2006**, 600(4), 773.
- J. T. Woodward, A. Ulman and D. K. Schwartz, *Langmuir*, **1996**, 12(15), 3626.
- A. Raman, M. Dubey, I. Gouzman and E. S. Gawalt, *Langmuir*, **2006**, 22, 6469.
- R. Quinones and E. S. Gawalt, *Langmuir*, **2008**, 24, 10858.
- S. C. D'Andrea and A. Y. Fadeev, *Langmuir*, **2003**, 19, 7904.
- Y. T. Tao, C. Y. Huang, D. R. Chiou and L. J. Chens, *Langmuir*, **2002**, 18, 8400.
- B. Zhang, T. Kong, W. Xu, R. Su, Y. Gao and G. Cheng, *Langmuir*, **2010**, 26(6), 4514.
- A. Sharma, B. Kippelen, P. J. Hotchkiss and S. R. Marder, *Appl. Phys. Lett.*, **2008**, 93, 163308.
- A. Pulsipher, N. P. Westcott, W. Luo and M. N. Yousaf, *J. Am. Chem. Soc.*, **2009**, 131(22), 7626.
- a) H. Klauk, U. Zschieschang, J. Pfleum and M. Halik, *Nature*, **2007**, 445, 745. b) T. Sekitani, Y. Noguchi, U. Zschieschang, H. Klauk and T. Someya, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2008**, 105, 4976.
- C. A. Traina, A. Christopher and J. Schwartz, *Langmuir*, **2007**, 23(18), 9158.

品名	容量	希望納入価格(¥)	メーカーコード
10-CDPA	10 mg	11,000	C490
	100 mg	30,000	
FHPA	10 mg	9,800	F340
	100 mg	28,000	
FOPA	10 mg	9,800	F329
	100 mg	28,000	
FDPA	10 mg	13,000	F330
	100 mg	36,000	
11-HUPA	10 mg	11,000	H399
	100 mg	30,000	
11-NUPA	10 mg	11,000	N468
	100 mg	30,000	
M-EG ₃ -UPA	10 mg	13,800	M457
	100 mg	38,200	
ODPA	10 mg	11,000	O407
	100 mg	30,000	
11-PIUPA	10 mg	11,000	P463
	100 mg	30,000	

Column

留学体験記－経験を挑戦へ－

私は1年程会社を離れ熊本大学・発生医学研究所・桑昭苑教授の研究室にお世話になった。桑先生は世界的に有名な発生学の研究者で胚性幹細胞または多能性幹細胞（ES/iPS細胞）を脾臓や肝臓といった組織へ分化誘導する技術の第一人者であり、日本を代表する女性研究者でもある。発生医学研究所は熊本大学医学部附属病院の向かいに位置し、世界的に著名な先生方が日々研究をされている。桑先生の研究室はその2階にあり、研究員・大学院生・学部生の総勢26名が日々研究を行っている。私もその一員に加わり幅広い研究に携わらせて頂いた。この貴重な1年について簡単に触れたい。

桑先生の研究室は、糖尿病患者の治療に向けES/iPS細胞を用いた脾臓の作製を目指して研究している。ES/iPS細胞から脾臓への分化は正常発生に従えば三胚葉のうち内胚葉を経由し分化する（Fig. 1）。白木助教らはマウスES細胞を支持細胞（M15細胞）と共に培養することで効率よく内胚葉へ分化させ、続いて脾臓の前駆細胞へ分化することに成功した¹⁾。さらにM15細胞との共培養条件を変更することで、同じ内胚葉由来の肝臓も作製できた²⁾。興味深いことに、この支持細胞を用いる技術は、添加する液性因子を変更することで、三胚葉それぞれへの分化誘導にも応用できる³⁾。最新の報告では支持細胞を用いることなく、疑似基底膜上でヒトES細胞を培養することで脾臓および肝臓へ分化誘導する方法も確立している⁴⁾。分化対象細胞がマウスからヒト、支持細胞無しの培養条件に移行したことからも世界に先駆けた研究が展開されているといえるだろう。

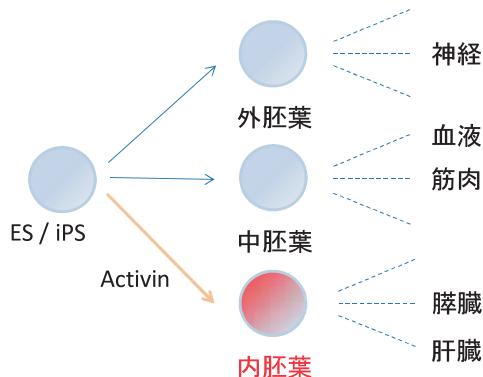


Fig. 1 分化誘導図

再生医療を実現化するためには克服すべき様々な問題点がある。例えば人への移植、治療を目指す上ではxeno-free（動物種由来の因子などを排除した環境）な培養系が望ましく、今後この分野の大きな課題でもある。また、脾臓や肝臓といった細胞を作製するには、培養に1ヶ月ほどかかり、かつ高額である。さらに、実際に治療に使用するためには大量の分化細胞が必要であり、効率的な分化誘導は必要不可欠となる。熊本大学では2012年4月より臓器再建研究センターを設立し、桑研究室や発生医学研究所の技術を移植へ応用する計画が進んでいる。ぜひ桑研究室から新たな技術が確立され、世界を先導した研究が報告されることを期待したい。また、先生方の研究成果の再生医療への応用が加速していくためにも、我々試薬会社ができることを模索し協力したい。

当社においても桑先生の研究室で習得した技術、知見をもとに再生医療分野に向けた試薬・キット開発を進めている。最終的な細胞を獲得するための効率的な分化誘導技術や分化細胞の確認方法は注目点だと感じる。多くの試薬会社より再生医療分野での試

株式会社同仁化学研究所 岩下 秀文

薬等が販売されている。競合が多い中、研究者が求めているものをいち早く感知し形にしていかなければならない。桑先生をはじめお世話になった研究室の方々へ恩返しができるように今後も日々情報を集めながら社会に貢献できる試薬開発を行っていきたい。

[参考文献]

- 1) N. Shiraki, T. Yoshida, K. Araki, A. Umezawa, Y. Higuchi, H. Goto, K. Kume and S. Kume, "Guided differentiation of embryonic stem cells into Pdx1-expressing regional-specific definitive endoderm", *Stem Cells*, **2008**, 26, 874.
- 2) N. Shiraki, K. Umeda, N. Sakashita, M. Takeya, K. Kume and S. Kume, "Differentiation of mouse and human embryonic stem cells into hepatic lineages", *Genes Cells*, **2008**, 13, 731.
- 3) N. Shiraki, Y. Higuchi, S. Harada, K. Umeda, T. Isagawa, H. Aburatani, K. Kume and S. Kume, "Differentiation and characterization of embryonic stem cells into three germ layers", *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **2009**, 381, 694.
- 4) N. Shiraki, T. Yamazoe, Z. Qin, K. Ohgomori, K. Mochitate, K. Kume and S. Kume, "Efficient differentiation of embryonic stem cells into hepatic cells *in vitro* using a feeder-free basement membrane substratum", *PLoS One.*, **2011**, 6(8) e24228.



熊本大学発生医学研究所外観

新製品 7月2日発売

細胞内カルシウムイオン測定用試薬キット

Calcium Kit II - iCellux

<特長>

- ・薬剤低濃度領域のシグナル応答が向上（小社 Calcium Kit II - Fluo 4 比較）。
- ・プローブを添加した後の細胞洗浄は不要。
- ・Fluo 3 や Fluo 4 と同様の蛍光特性を有するプローブを使用。
- ・96 穴、384 穴の両方のマイクロプレートに対応。

本製品は、細胞内カルシウムイオン測定蛍光試薬と測定に必要なバッファー等を組み込んだキットです。これまでのキットに比べ、低濃度域でのシグナル検出が可能となり、より高感度な Ca 濃度測定が可能となっております。

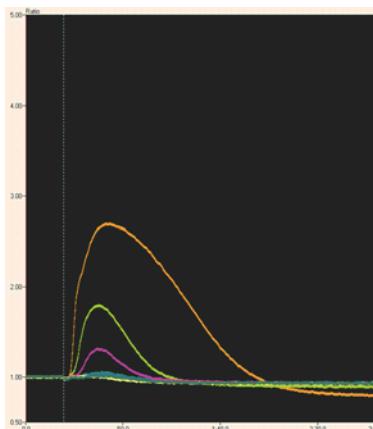
溶液中のバックグラウンド蛍光を消光するクエンチャラーを用いることで、カルシウムプローブを細胞へ負荷した後の洗浄操作を行うことなく、細胞内カルシウム濃度変化を測定できます。洗浄操作が不要となるため、HEK293 細胞などの剥離しやすい細胞を使用する場合や、特に HTS (High Throughput Screening) による薬剤スクリーニングを行う場合に適しています。また、細胞種や添加する薬剤などに応じて、製品に付属した Probenecid (陰イオントransporter 阻害剤) 溶液を添加することが可能です。

ただし、細胞種や添加する薬剤によっては、「レスポンスの高低」「リガンドとの相互作用」などが生じることがあります。測定系に影響の少ない方法での測定を行いたい場合は、Wash タイプで姉妹品の「Calcium Kit - Fluo 4」をご使用ください。本キットでは、96 穴プレート 10 枚分の測定が可能です。

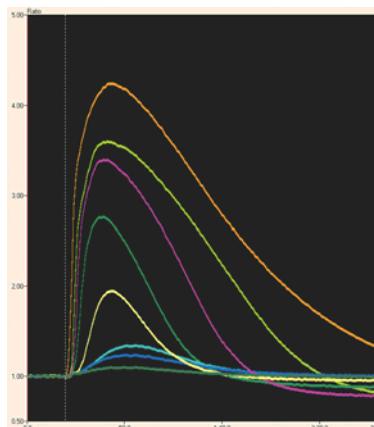
<測定例>

1. FDSS7000 EX を用いた、細胞内カルシウム測定結果

Calcium Kit II - Fluo 4



Calcium Kit II - iCellux



[ATP]
10 µM
1 µM
300 nM
100 nM
30 nM
10 nM
1 nM
0 nM

細胞 : CHO-K1 プレート : NUNC 384 wells plate (Non-coating)

刺激薬剤 : ATP final: 1 nM-10 µM

Probenecid : final 1.25 mM Calcium Probe インキュベート時間 : 1 hr

データ提供 : 浜松ホトニクス株式会社

<キット内容>

· Calcium Probe	× 10
· Dimethylsulfoxide	2 ml × 1
· Quenching Buffer	100 ml × 1
· 250 mmol/l Probenecid	1.3 ml × 1

操作方法

- 1) クリアボトルの蛍光測定用マイクロプレートに細胞を播種する。
- 2) 添付の Dimethylsulfoxide を用いて、Calcium Probe を溶解し、Quenching Buffer に加え、Loading Buffer を調整する。
- 3) 1) のプレートに培地と等量の Loading Buffer をそれぞれのウェルに加える。
- 4) 37°Cで 1 時間インキュベートする。
- 5) そのまま薬剤添加による蛍光強度変化を各種蛍光プレートリーダーで測定する。

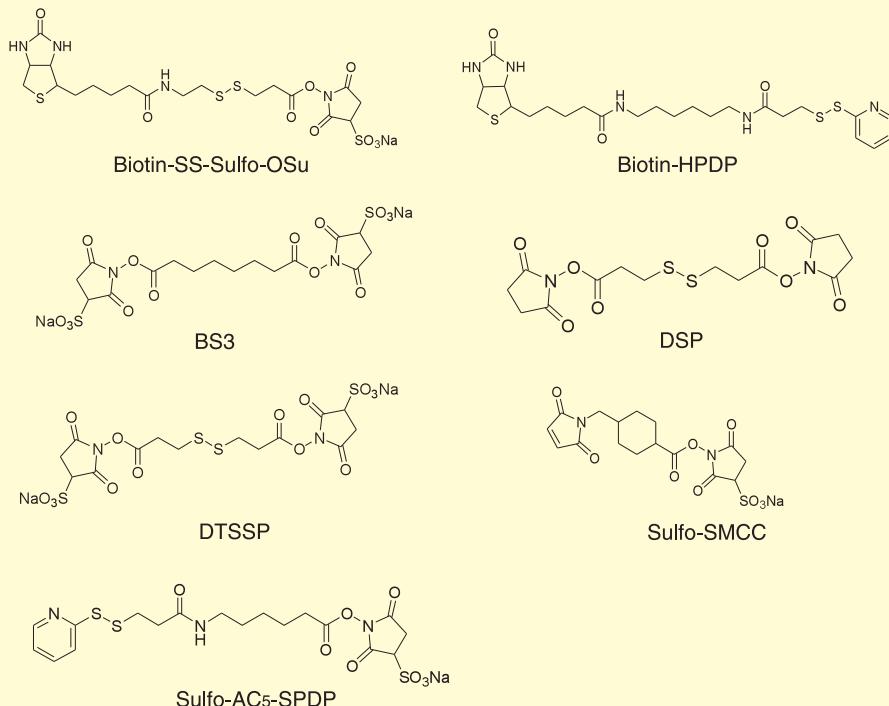
注意事項

*測定には、クリアボトルの蛍光測定用マイクロプレートと下方励起／下方蛍光測定が可能なマイクロプレートリーダーが必要になります。

品名	容量	希望納入価格(¥)	メーカーコード
Calcium Kit II - iCellux	10 plates	58,000	CS34

新製品 7月2日発売

二価性試薬・ビオチンラベル化剤



二価性試薬は、タンパク質、抗体、酵素などが持つアミノ基やSH基を利用し、二種類のタンパク質分子を架橋させるのに使用されます。ビオチンラベル化剤は、ビオチンをアミノ基、SH基を利用して、分子内に導入する試薬です。それぞれ分子の長さと水溶性の有無により分類されます。

小社ではこれまで、Hetero-bifunctional Reagents や Biotin ラベル化剤、His-Tag 技術に使用できる化合物を販売してまいり

ました。今回更にプロテオミクス研究に活用していただける様に、二価性試薬、ビオチンラベル化剤をご要望の多かった化合物を新規ラインナップとして追加致します。還元剤により切断可能なスペーサーを持つビオチンラベル化剤は、固定化アビシン担体を用いたアフィニティー精製において、非変性条件下での溶出が可能となります。また、細胞膜表面タンパク質の発現解析にも利用されます。

品名	容量	希望納入価格(¥)	メーカーコード
Biotin-SS-Sulfo-OSu	100 mg	38,000	B572
Biotin-HPDP	50 mg	40,400	B573
BS3	50 mg	17,000	B574
DSP	1 g	30,400	D629
DTSSP	50 mg	18,000	D630
Sulfo-SMCC	50 mg	27,600	S330
Sulfo-AC5-SPDP	50 mg	66,000	S359

既存製品のラインナップは、こちらのURLからご覧ください。
関連パンフレットもご用意しております。
<http://dominoweb.dojindo.co.jp/goodsr7.nsf/ByChuInfo/05>

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