

NEXT

No. **68**

2024 / March

Science, Products and Information

サーモフィッシャーサイエンティフィック
ライフサイエンス情報誌

NEXT Interview

染色体を自由自在にデザインする時代へ

染色体工学のさらなる進化が拓く未来

香月康宏 氏 (鳥取大学医学部生命科学科染色体医工学講座 / 染色体工学研究センター 教授)



P. 04 Ion AmpliSeq Transcriptome Human Gene Expression Kit

P. 05 MagMAX Pure Bind ビーズ

P. 06 CellInsight CX7 LED Pro HCS Platform

P. 07 Pierce Dilution-Free Rapid Gold BCA Assay

P. 08 TrueMark Infectious Disease Research Panel

P. 09 TaqMan アレイプレート

P. 10 QuantStudio Absolute Q デジタルPCRシステム AutoRun Suite

P. 13 TaqMan Cells-to-C_T Express kit

P. 15 Attune CytPix Flow Cytometer

染色体を自由自在にデザインする時代へ 染色体工学のさらなる進化が拓く未来

香月康宏 氏

鳥取大学医学部生命科学科染色体医工学講座 / 染色体工学研究センター 教授



香月康宏 (かづきやすひろ)
2000年鳥取大学医学部生命科学科卒業、04年鳥取大学大学院医学系研究科生命科学系専攻博士課程修了。03年日本学術振興会特別研究員(DC2)、04年日本学術振興会特別研究員(PD)、05年鳥取大学医学系研究科助手、07年同所属助教、10年より染色体工学研究センター助教を兼任、15年より鳥取大学医学系研究科及び染色体工学研究センター准教授(兼任)、23年より現職。

他の技術の追従を許さないほど巨大なDNA断片を搭載可能な人工染色体。染色体を自由にデザインして細胞に導入する染色体工学技術の進歩がこれからのライフサイエンスに大きな影響を与えようとしています。鳥取大学染色体工学研究センター教授の香月康宏氏は、使いやすく有用なヒトやマウスの人工染色体の技術開発に取り組むとともに、50数か所以上の大学等の研究機関や20社を超える企業との多彩な染色体工学技術を活用する共同研究を進めています。「大きなDNA断片を搭載できる人工染色体はいわば豪華客船のようなもの。小型船よりもはるかに多くのDNA断片を細胞へ運ぶベクターとして働きます。私たちは、人工染色体をヒトiPS細胞に導入し、両者の長所を生かすことで新たな医療の可能性を拓けようとしています。そしてヒト疾患治療法の開発、ヒト化モデル動物の作製による基礎研究と創薬研究を進めるとともに、デザイン人工染色体を基盤技術として新たな生物を生み出す合成生物学にアプローチし、ゲノムの動作原理や生物の根本原理の解明にも繋げたい」と香月氏は語ります。

巨大なヒト疾患原因遺伝子や 全長に及ぶヒト抗体遺伝子を搭載

ヒト人工染色体(HAC)は、ヒト21番染色体をベースに構築しました。この染色体は遺伝子領域を極限まで削り、主に中心体とテロメア部分からなります。HACに遺伝子を搭載してヒト細胞へ導入すると47本目の独立した染色体としてふるまい、導入先のゲノムを傷つけることなく、細胞分裂の際に複製・分配されて娘細胞に受け継がれていきます。HACをベクターとして活用する際の最大の特徴は、数Mbに及ぶ染色体レベルの遺伝子導入が可能なこと。2010年、私たちはHACに2.4Mbのデュシェンヌ型筋ジストロフィーの原因遺伝子であるジストロフィンの正常型を組み込み、患者さんから得られたiPS細胞や中胚葉性血管芽細胞に導入して筋芽細胞へ分化させることで、ジストロフィンタンパク質が正常に産生されることを報告しました。続けて遺伝的に筋ジストロフィーを発症するマウスにHAC導入細胞を介して正常型ジストロフィン遺伝子を導入するとマウスの病的症状が軽減することを報告しました。ただしこの時、種の異なるマウスにヒト由来のHACベクターを導入すると、HACが脱落しやすく不安定になることが課題でした。また染色体工学の開発者で共同研究者の押村光雄先生らは、2000年に染色体を介して数Mbに及ぶ無傷のヒト免疫グロブリン(Ig)遺伝子座を保持しヒト抗体を産生するマウスの作製に世界で初めて成功して報告しましたが、この時もヒト由来セントロメア配列を持つヒト染色体断片のマウスでの安定性は完全とは言えず、課題として残っていました。この問題を解決すべく、私たちはマウスの染色体をベースに新たにマウス人工染色体(MAC)を構築しました。そしてヒトIg遺伝子座(重鎖:1.8Mb、軽鎖κ:1.7Mb)の全長合計3.5MbをMACベクターにクローニングし、内在性のマウス抗体遺伝子座が破壊されたマウスに導入して安定化に成功し、2022年に報告しました。このマウスはヒトに類似した多様な抗体レパトアを再現し、免疫により抗原特異的なヒト抗体を効率よく取得できることから、安全性の高いヒト抗体医薬品の創出に役立つと期待されています。このような成果は、従来技術によるトランスジェニックマウスではなしえなかったことであり、人工染色体技術を活用して作製したマウスを「トランスクロモソミックマウス」と名付け、多くの共同研究を進めています。

ゲノムは「読む」時代から 「書く」時代へ

1980年代から急速な発展を遂げた分子生物学とゲノム解読技術により、2003年にはヒトゲノム解読終了が宣言されました。この間の技術発展に伴い、ゲノム解読費用は急速に低下し、研究者が利用しやすい技術になりました。同じ頃、私たちはヒトやマウスの人工染色体の開発に着手し、染色体工学の基礎を固めていきました。当時、染色体を扱う技術は難易度が非常に高く、限られた研究者の職人的な手練や膨大な時間を要する作業の連続でした。しかし今では使いやすいゲノム編集や核酸合成技術、シーケンス解析等の発展により、目的の人工染色体の作製や細胞導入は数年間から数か月単位に短縮できています。私たちもPCRやゲノム編集のように染色体工学技術が誰もが使える技術になるように技術開発や研究基盤の整備に取り組んでいます。例えばHACやMACの細胞への導入効率の改善や、ヒトとマウスだけでなくブタなどの他の動物種でも安定して使える人工染色体の作製を進めています。また京都大学・iPS細胞研究所と共同研究により、免疫拒絶を抑えたヒトiPS細胞に治療用遺伝子を搭載したHACを導入し、細胞ストックとして多くの方に利用してもらう基盤整備も進めています。さらに異なる種の細胞間を行き来できるシャトル型人工染色体の作製も構想中です。染色体レベルの遺伝子導入が幅広い分野で一般化することで、ライフサイエンス研究はゲノムを「読む」時代から、「書く」時代へ移行し、研究スタイルも大きく変化します。生物を観察する研究から、細胞や新しい機能を有する生物を作り出して研究する時代が到来するでしょう。現時点では、染色体に搭載する数MbレベルのDNA配列を合成するコストはかなり高額ですが、シーケンス解読のコストが劇的に低下したように今後の改善が望めそうです。そうなれば誰もが染色体を自由にデザインできるようになります。私たちは誰もがゲノムを「書く」時代を見据えて研究を進めています。

基礎研究の成果を遅延なく 応用へ繋げるために

人工染色体の医学への応用は、4つの方向性で推進します。それらは、1.ヒト抗体産生動物の作製、2.ヒト薬物動態モデル動物・細胞の作

製、3.疾患モデル動物の作製、4.細胞治療法の開発であり、それぞれが、抗体医薬品開発、医薬品の安全性評価、疾患メカニズム解明と治療薬開発、遺伝子・細胞治療推進を目的とします。また効率的な事業化・産業化を進めるために、鳥取大学のキャンパス内には産学官連携を推進する3施設が設置されています。1つ目は主に染色体工学技術に関わる基礎研究や技術開発を担い、私が教授を務める染色体工学研究センター、2つ目は事業化を推進するために鳥取県が出資した「とっとりバイオフロンティア」であり、大学発ベンチャーの基点として、企業単独でも、他の研究機関との共同研究でも自由に活用できます。3つ目は医薬品の上市などの最終的な産業化のための医薬品シーズ開発等を担当する「とっとり創薬実証センター」であり、私がそのセンター長を兼任し、管理・運営しています。これらとは別に、2023年10月からAMEDの革新的先端研究開発支援事業(LEAP)の代表に就任し、「デザイン染色体による免疫系ヒト化動物の創成と創薬応用」という研究課題で応用研究をさらに加速させていきたいと思っています。

若い方へのメッセージ

ワクワクする研究に取り組むことを勧めます。そのためには幹となる研究を見つけること。私は高校生の頃に、北海道大学で実施された遺伝子治療成功のニュースに触れて基礎医学研究を志しました。研究者として基礎医学研究で成果を上げれば、個々の患者さんを救う医師よりも、もっと多くの患者さんを救えると思ったからです。そのために医学的知識を基に研究者を育成することを理念に掲げた鳥取大学医学部の生命科学研究所に入学しました。そこで恩師の押村先生と出会い、人工染色体を研究の軸に据え、生命科学科出身では初めての生命科学科・教授となりました。また2022年3月に自然科学研究機構のExCELLSに客員PIとして採用されました。そこでは「生命を観察する」ことから学ぶ研究に加え、「生命をつくる」ことで学ぶ研究に取り組めます。テーマの1つに、植物の光合成に関わる複数の遺伝子を1本の人工染色体に載せて、動物の細胞に移す研究があります。人工染色体研究は、医学への応用にとどまらず、生物の根本原理の解明や環境問題を含む大きなテーマへの挑戦も可能にします。医学研究とともに、生命の本質を理解する研究を行うことはとてもワクワクすること。皆さんもワクワクする研究にぜひ挑戦してください。

池谷 真 氏(京都大学iPS細胞研究所臨床応用研究部門 准教授)

iPS細胞から難病の新規治療薬探索や間葉系幹細胞治療法の開発へ 客観的な細胞特性評価を網羅的な遺伝子発現解析がサポート



ヒト細胞から作製可能なiPS細胞の強みを活かして、疾患iPS細胞から分化させた細胞の状態や機能を調べ、疾患メカニズムの解明や新規治療薬探索の研究が進んでいます。またiPS細胞の高い増殖性を活用した再生医療への応用研究も盛んです。「私たちはiPS細胞を基盤に進行性骨化性線維異形成症(FOP)の治療薬探索や間葉系幹細胞の均一な大量生産を誘導する応用研究に取り組んでいます。各段階での細胞特性は次世代シーケンサ(NGS)による網羅的な遺伝子発現解析などで客観的に評価し、将来的な臨床応用に際しても安定した細胞供給が可能になると考えています」と京都大学iPS細胞研究所の池谷真氏は語ります。

希少疾患患者から

作製したiPS細胞から治療薬探索へ

「FOPは全身の骨格筋などの組織中に骨が出現し、体幹・四肢可動域の低下や変形が生じる指定難病です。2006年に原因となる遺伝子変異は同定されましたが、未だ有効な治療薬はありません」と池谷氏は語り始めます。「私たちは2010年から研究を開始し、患者細胞からiPS細胞を作製してin vitroで骨や軟骨を誘導して疾患を再現し、さらにマウス生体内で患者細胞由来のiPS細胞から異所性骨を誘導してin vivoで病態を再現することに成功しました。そこでこの実験系を基に6809種の化合物で薬剤スクリーニングを行い、臓器移植後の免疫抑制剤等として市販されているラパマイシンが異所性骨化を抑えることを突き止めました。当

初、ラパマイシンに対する細胞応答はマイクロアレイで調べていましたが、NGSの汎用化に伴いRNA-seqに切り替えました。NGS解析はコストが高く、得られるデータが膨大で解析が複雑という印象を持たれがちですが、ライブラリー調製にIon AmpliSeq™ Transcriptome Human Gene Expression Kitを使うことでコストを抑えつつ実験やデータ解析を簡便化できました。マイクロアレイよりもバックグラウンドが低く質の高いデータが得られています。さらに発現に変動が見られた遺伝子群が関わるパスウェイを調べることで異所性骨化のメカニズムの解明も進みました」と池谷氏は続けます。

iPS細胞由来間葉系幹細胞治療法の開発に向けて

「間葉系幹細胞は、造血幹細胞移植後の急性移植片対宿主病(GvHD)への適応など、近年広く注目を集めています。しかし生体由来の間葉系幹細胞は、大量生産が困難で、品質がドナーの状態に左右されるといった複数の課題を抱えています」と池谷氏は指摘します。「私たちはiPS細胞から間葉系幹細胞の均一な細胞集団、いわゆるマスターセルバンクを作製することでこの課題を解決できると考えています。そのためにiPS細胞から間葉系幹細胞を分化させる際に、生体内での発生段階を考慮して神経堤細胞を介した二段階で誘導します。この方法により安定した間葉系幹細胞が大量に得られ、抗炎症作用や骨再生能力を有することから生体由来の間葉系幹細胞とほぼ同等の性能を持つことを確



認しました。また、軟骨への高い分化能を生かした膝関節治療への応用研究を進めています。目的細胞への分化段階を評価するために、2日ごとに培養細胞の遺伝子発現解析を行い、発生過程に特徴的な遺伝子発現パターンを経時的に調べています。この時、発生段階に特異的なマーカーとともにIon AmpliSeq Transcriptome Human Gene Expression Kitでヒト全遺伝子の網羅的な発現解析を行っています。目的細胞への分化の根拠をより強く示すことで再現性に優れた実験が行え、論文としての質も向上します」と語ります。

iPS細胞の臨床応用、そして未来へ

「間葉系幹細胞の臨床応用では、この先10年でコストダウン、安全性の向上、対象疾患の拡大を図り、iPS細胞由来間葉系幹細胞や、そこからの分化細胞を使った治療の産業化を目指します。その先には病院で気軽に、まるで点滴のように治療が受けられる未来を想定しています。また、治療効果を増強した機能強化型の間葉系幹細胞の開発も構想中です」と池谷氏はiPS細胞を起点に広がる臨床応用の未来を語ります。

Ion AmpliSeq Transcriptome Human Gene Expression Kit

次世代シーケンサによるヒト全遺伝子の網羅的発現解析を簡便に

Ion AmpliSeq™ Transcriptome Human Gene Expression Kitは、1回のアッセイで20,000種を超えるヒトRefSeq遺伝子の発現レベルを測定可能です。ホルマリン固定パラフィン包埋(FFPE)組織やその他劣化したRNAを含むサンプルなど、解析困難なサンプルに由来する微量なトータルRNAを直接定量できます。またマウス全遺伝子の網羅的発現解析用キットも提供しています。

- FFPEサンプル、細胞、その他のソースからわずか10 ngのトータルRNAから解析可能
- 20,000以上のヒトRefSeq遺伝子を網羅
- 従来のマイクロアレイ解析よりも、ダイナミックレンジが広く、検出感度が向上



製品名	サイズ	製品番号	価格
Ion AmpliSeq Transcriptome Human Gene Expression Kit	24 アッセイ	A26325	¥349,600

POINT

Applied Biosystems™ MagMAX™ Pure Bind ビーズは、次世代シーケンシング (NGS) ワークフローやPCRアプリケーション用の使いやすく汎用性の高い磁気ビーズです。

- NGSサイズセレクションおよびPCRクリーンアップ: 既存のワークフローへ簡単に移行
- 高いコストパフォーマンス: 品質、性能を損なうことなくコスト削減へ
- 室温保存で、よりサステナブルに: 室温で18カ月間安定で、冷蔵庫のスペースや電気代を節約
- 自動化ワークフローに対応: Thermo Scientific™ KingFisher™ Purification System などの自動抽出・精製装置と組み合わせることでクリーンアッププロトコルを効率的に実施

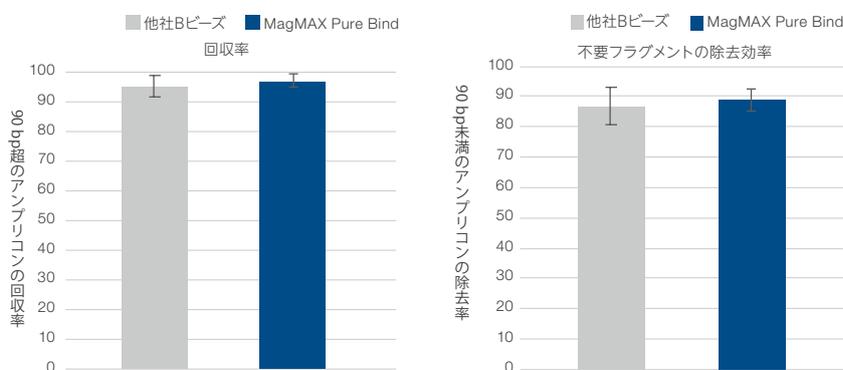


高い回収率、および不要なフラグメントの除去効率

MagMAX Pure Bind ビーズ回収率および不要フラグメントの除去効率は従来製品と同等に優れています。

図1 回収率と不要フラグメントの除去効率の比較

標準プロトコルに従い、MagMAX Pure Bind ビーズと広く使用されている他社BビーズでPCR産物を回収しました。フラグメントDNA 500 ng (サンプル対ビーズ比1.8) のインプットを使用して、クリーンアップ後の回収率と除去効率をクリーンアップ前のインプット量に対する割合として算出した結果、MagMAX Pure Bind ビーズは他社Bのビーズと機能的に同等で90 bp未満のフラグメントを効果的に除去でき、90 bp超のアンプリコンについては、約90%の高い回収率を示しました。



汎用されている磁気ビーズと同等のパフォーマンス

MagMAX Pure Bind ビーズは、従来製品と同等のクリーンアップパフォーマンスを発揮します。また、この製品はコストパフォーマンスに優れ、既存のワークフローにもスムーズに移行できるため、品質や性能を維持しつつコスト削減を図れます。

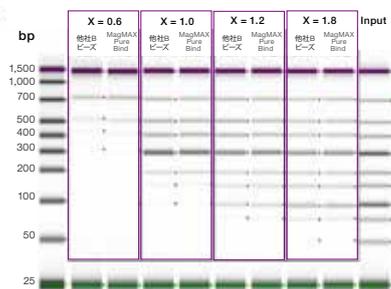


図2 PCR産物のクリーンアップ・パフォーマンスの比較

標準プロトコルに従い、MagMAX Pure Bind ビーズと他社Bビーズを使用してDNA 500 ngのインプットで不要フラグメントを除去しました。サンプル対ビーズ比 (X) を0.6から1.8まで変化させてクリーンアップを行い、クリーンアップ後のフラグメントを比較しました。MagMAX Pure Bind ビーズは、サンプル対ビーズ比の範囲全体で、他社Bのビーズと同等のクリーンアッププロファイルを示しました。

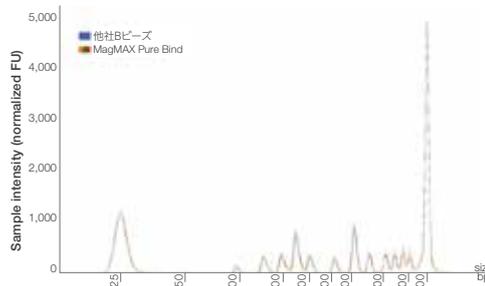


図3 クリーンアッププロファイルの検証

標準プロトコルに従い、MagMAX Pure Bind ビーズと他社Bのビーズを使用してDNA 500 ng のインプットで不要フラグメントを除去しました。サンプル対ビーズ比1.8でのクリーンアップを行い、クリーンアップ後のプロファイルを比較しました。MagMAX Pure Bind ビーズは、推奨されるサンプル対ビーズ比1.8 で、他社Bのビーズと同等のクリーンアッププロファイルを示しました。

製品名	サイズ	製品番号	価格
MagMAX Pure Bind ビーズ	5 mL	A58521	¥31,500
	50 mL	A58522	¥115,000
	250 mL	A58523	¥395,000

[セミナー報告]

日本動物実験代替法学会第36回大会 サーモフィッシャーサイエンティフィック共催ランチョンセミナーより (2023年11月29日開催)

生体模倣ヒト血液脳関門モデル： その開発と多様なモダリティの脳移行性評価に向けた取り組み



降幡知巳 氏(東京薬科大学薬学部個別化薬物治療学教室 教授)

脳疾患に対する治療薬の開発では血液脳関門(blood-brain barrier, BBB)の透過性が課題であり、98%以上の低分子薬物、ほぼ全ての高分子薬物は脳内に移行できず、薬理活性を維持しながらその透過性を改善することも非常に困難です。しかも開発段階では候補薬をヒトに投与できないため、私達は「ヒトに投与せずとも薬物のヒト脳移行性を知ることができる世界」を目指してヒトBBBモデルの開発を進めています。具体的には、薬物や薬物脳送達キャリアのヒトBBB透過性を的確に評価することを目的に、3種のヒト不死化細胞(脳毛細血管内皮細胞、ペリサイト、アストロサイト)と生体を模倣する培養法を組み合わせ、トランスウェル型とスフェロイド型のヒトBBBモデルを開発しています。

トランスウェル型ヒトBBBモデルでは、培地に生体模倣性を取り入れることにより機能を向上させ、薬物のヒト脳移行性評価とヒト脳内濃度予測に応用したいと考えています。これまでに行った薬物透過性試験では、トランスウェル型ヒトBBBモデルから得られた値とヒト臨床データから推測した脳移行性が良い相関を示し、薬物の生体での脳移行性を、このモデルで予測評価できる可能性があります。階層スフェロイド型ヒトBBBモデルは、内外反転しながらも生体BBB本来の細胞配置・3D構造を模倣し、基本的なBBB機能を有するのみならず、トランスウェルモデルよりも高いBBB関連タン

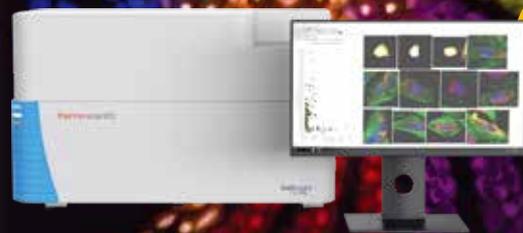
パク質の発現が認められます。現在、階層スフェロイド型BBBモデルを薬物の脳送達キャリア開発に応用したいと考え、受容体介在性トランスサイトosis (RMT)による高分子のBBB透過性を評価できるか検証を進めています。例えばトランスフェリン受容体(TfR)による抗TfR抗体のBBB透過です。さらにBBB透過性・非透過性の2種類の環状ペプチド(それぞれDNPペプチド、SLSペプチド、ともに熊本大学大槻先生、伊藤先生らにより開発)を用いたモデルの機能検証を行いました。今後、SLSペプチドのBBB透過機序をさらに詳細に調べるため、温度や時間、濃度などの条件を変化させて実験を行なう予定です。これに向け、Thermo Scientific™ CellInsight™ CX5 High Content Screening (HCS) Platformによる多検体の迅速アッセイ系を確立し、実験を効率化したいと思っています。本機器を用いることで、スフェロイドを作製した96ウェルプレートそのまま一度にイメージング解析ができるようになりますし、アプリケーションが豊富なことも実験をする上で有用です。

今後も、生体模倣ヒトBBBモデルの機能・汎用性・経済性の向上に努め、ヒトに投与せずとも薬物のヒト脳移行性を知ることができる世界を目指して研究を進めてまいります。本モデルにご興味があれば、お気軽にご連絡ください。

CellInsight CX7 LED Pro HCS Platform

画像取得から定量解析まで細胞イメージアナライザーで自動化

7色のLED励起を採用したThermo Scientific™ CellInsight™ CX7 LED Pro High Content Screening (HCS) Platformは、sCMOSカメラにアップグレードされ、95%を超える量子効率と低バックグラウンドを実現し、露光時間の短縮で、さらなるハイスループット化を推進します。CellInsight シリーズで定評のある多様なアプリケーションに対応する40種類以上のアッセイテンプレートを搭載し、豊富な蛍光イメージング試薬とレディメイドのプログラムで、定量的で客観的な画像解析が行えます。



NEW!

製品名	サイズ	製品番号	価格
CellInsight CX7 LED Pro High Content Screening Platform(1年保証)	1 式	HCSDCX7LEDPRO	¥40,000,000

Pierce Dilution-Free Rapid Gold BCA Assay

希釈系列の調製は不要! 簡単・迅速・正確なタンパク質定量

POINT

Thermo Scientific™ Pierce™ Dilution-Free™ Rapid Gold BCA Assayは、広いダイナミックレンジとすぐ使える調製済み検量線用スタンダードにより、タンパク質定量を迅速化します。本製品は、調製済み検量線用スタンダードを含む、新しいThermo Scientific™ Pierce™ Dilution-Free™ シリーズの一員です。

- 簡単: 8連チューブの調製済み検量線用スタンダードで、希釈系列の調製は不要
- 迅速: アッセイの反応時間は室温でたった5分
- 正確: 希釈作業回数の減少で、ピペティングエラーによる誤差を削減

NEW!



▶ 作業時間を大幅に短縮

Pierce Dilution-Free Rapid Gold BCA Assayは、スタンダードの希釈系列の調製やサンプル希釈が不要なので、従来製品やBradford Assayよりもタンパク質定量にかかる作業時間が大幅に短縮されます(図1)。

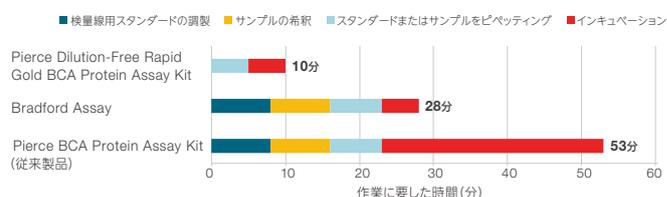


図1 従来キットよりも作業・反応時間を大幅に短縮

Pierce BCA Protein AssayとBradford Assay用の検量線は、2 mg/mLのウシ血清アルブミン(BSA)スタンダードを段階希釈して調製しました。Pierce Dilution-Free Rapid Gold BCA Assay用の検量線にはPierce Dilution-Free BSAを使用しました。細胞溶解液と精製タンパク質の計10サンプルを各製品のマニュアルに従って定量し、作業・反応時間を比較しました。Pierce BCA Protein AssayとBradford Assayは10サンプル中4サンプルで2 mg/mLを超える濃度と予想されるため希釈が必要でしたが、Pierce Dilution-Free Rapid Gold BCA Assayではすべて希釈せずに測定できました。

▶ 広いダイナミックレンジと高い精度

本製品は、20~10,000µg/mLで直線性を示す広いダイナミックレンジを有するため(図2)、高濃度サンプルでも希釈せずに直接試薬と反応(室温、5分)させるだけで定量できます。さらに高い精度も兼ね備えています(図3)。

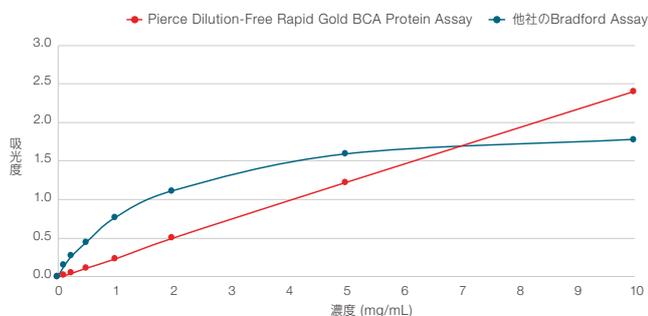


図2 Pierce Dilution-Free Rapid Gold BCA Protein Assayと他社のBradford Assayで得られた検量線の比較

調製済みBSA(0~10 mg/mL)を、Dilution-Free Rapid Gold BCA Protein Assayと他社のBradford Assayキットのそれぞれのマニュアルに従ってマイクロプレートで反応後、検量線を作成しました。吸光度はThermo Scientific™ Varioskan™ LUX Multimode Microplate Reader (VL0000D0)で測定しました。

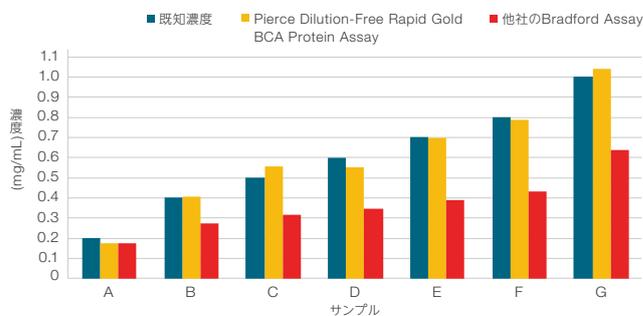


図3 既知濃度のサンプルをPierce Dilution-Free Rapid Gold BCA Protein Assayと他社のBradford Assayで測定して得られた濃度の比較

いずれのアッセイも、それぞれのキットのマニュアルに従って、マイクロプレートで実施しました。

▶ 用途に応じた製品ラインアップ

調製済み検量線用スタンダードを含むPierce Dilution-Free シリーズとして、他にも以下のラインナップを取り揃えています。検量線用スタンダードのみの単売もあります。目的に応じてご使用ください。

製品名	サイズ	製品番号	価格
Pierce Dilution-Free Rapid Gold BCA Protein Assay	500 mL	A55860	¥53,100
	250 mL	A55861	¥35,100
	20 mL	A55862	¥9,000
Pierce BCA Protein Assay Kit with Dilution-Free BSA Protein Standards, multichannel pipette compatible	1 L	A55864	¥54,900
	500 mL	A55865	¥38,700
Pierce Bradford Plus Protein Assay Kit with Dilution-Free BSA Protein Standards, multichannel pipette compatible	950 mL	A55866	¥52,200
Pierce Dilution-Free BSA Protein Standards, Multichannel Pipette Compatible, 0.125-2 mg/mL	7 x 1 mL x 2 セット	A55863	¥27,000
Pierce Dilution-Free BSA Protein Standards, Multichannel Pipette Compatible, 0.125-10 mg/mL	7 x 1 mL x 2 セット	A56979	¥27,000

根来麻奈美 氏(独立行政法人国立病院機構三重病院臨床研究部・特任研究員)

ウイルス・細菌・寄生虫による感染性胃腸炎の疫学研究を効率化

TrueMark Infectious Disease Research Panelのマルチプレックス解析を活用



感染性胃腸炎は世界における5歳未満小児の死亡原因の上位を占めており、これは特に途上国においてインパクトが大きく、対策の強化が望まれています。三重病院臨床研究部の根来麻奈美氏は、谷口清州医師らと共にガーナ保健省に属する公衆衛生基盤研究所とガーナにおける感染性胃腸炎に関する疫学研究を進め、その実態の把握と対策に協力しています。「感染性胃腸炎関連病原体はウイルス・細菌・寄生虫と多岐にわたるため、検索のためには多検体の病原菌を効率よく測定する実験系が必要でした。そこでマルチプレックス測定ができるリアルタイムPCR用のApplied Biosystems™ TrueMark™ Infectious Disease Research Panel(以降、TrueMarkパネル)を検証しました」と根来氏は話します。

ウイルス・細菌・寄生虫の感染を同時測定

「一般的な急性感染性胃腸炎の検査では、細菌は細菌培養、ウイルスは免疫測定、寄生虫は顕微鏡検査や酵素免疫法というよ



根来氏(右)とガーナからの大学院生のKuurdor Elijah Deku-Mwin氏(左)とAmexo Jennifer Xolali氏(中央)

うに、病原体に合わせた方法で行います。しかし多種項目を多検体でそれぞれの検査を実施するのは、煩雑で時間がかかり過ぎるため、遺伝子解析法の可能性を探りました。PCRの検査法は多くありましたが、多様な病原体を一度に解析できるキットは数えるほどしかなく、しかもその多くは専用機器が必要でした。そんな時に細菌・ウイルス・寄生虫の感染を同時に検出できるTrueMarkパネルの情報を得ました。一般的なリアルタイムPCRシステムを使って性質も形態も異なる病原体をマルチプレックスで同時検出可能と聞いて、求めているものだと思います」と根来氏は語ります。

約300検体中の27種類の病原体を約1か月で測定

「既成パネルには該当製品がなかったため、アッセイパネルを特注で依頼しました。一般的な感染性胃腸炎の病原体リストから、これまでの疫学データを参考にして27種類に絞り込み、384ウェルプレート1枚で15検体を解析、20枚で約300人分の検体を測定できる仕様です。このパネルでガーナの180検体だけでなく、同じ年度の三重(日本)の検体を測定し、感染性胃腸炎の流行状況を比較検討しました。核酸抽出には少し工夫を要しましたが、測定は私とガーナからの大学院生3名で行い、1カ月程度で終了しました。従来法との比較は検出数が多かったノロウイルスGIIとロタウイルスで行いました。その結果、ノロウイルスGIIのシングルプレックス・リアルタイム

PCRのデータや、ロタウイルスのコンベンショナルPCR法のデータをTrueMarkパネルによるマルチプレックス・リアルタイムPCRのデータと比較したところ、結果の違いは少なくおむね一致していました。コンベンショナルPCRでもマルチプレックス測定が行えますが、バンドの強弱や非特異的バンドの出現で判断が難しい場合があります。一方、TrueMarkパネルでは、結果の判定条件を決めておくことで判断に迷うことが少なく、一律の結果を出せる点が優れていました」と根来氏は評価します。

今後の発展へ

「今回の測定結果では、ガーナの方が日本(三重)よりも症例当たり多数の病原体に感染している傾向がありました。ただし、どちらの症例でも、検出した病原体の数と重症度には大きな差はありませんでした。一方、病原体が未検出の症例と検出された症例には重症度に違いがあり、病原体の種類や遺伝子型が重症度に影響する可能性が示唆されたことから、今後は遺伝子型などを詳しく調べていく意義がありそうです。またロタウイルス・ワクチンは開発されていますが、ノロウイルスにはまだなく、さらにワクチンが予防できるウイルスもウイルス変異により予防効果に影響を及ぼす可能性があるため、ウイルス変異のモニタリングの必要性があります。疫学調査をさらに充実させて、ワクチンの有効利用に対する提案を行い、主に小児の感染性胃腸炎の対策に役立つことを目指します」と根来氏は最後に語ります。

TrueMark Infectious Disease Research Panel

多検体中の感染症病原体をリアルタイムPCR法で迅速解析

Applied Biosystems™ TrueMark™ Infectious Disease Research Panelは、呼吸器疾患、尿路疾患、性感染疾患、腔疾患および消化器疾患における感染症病原体をリアルタイムPCRにより検出する遺伝子解析パネルです。多検体を迅速で再現性高く解析でき、薬剤耐性解析にも対応します。10種類のデザイン済みパネルだけでなく、カスタムパネルも提供します。



TaqMan アレイプレート

面倒な遺伝子発現解析実験を簡便化しませんか？

POINT

Applied Biosystems™ TaqMan™ アレイプレートは、数十～数百のターゲット遺伝子の発現解析を簡便に行うための製品です。アッセイプレートにターゲット遺伝子に対応するApplied Biosystems™ TaqMan™ Gene Expression Assayのプロローブとプライマーをスポットして乾燥状態で提供します。

- 手間なし：プライマー、プロローブは設計・検証・分注済み
- 簡単：製品が届けば、cDNAサンプルとマスターミックスを入れるだけで、プレートの準備が完了
- 高品質：TaqMan Assayの高特異性、高感度、高再現性のリアルタイムPCR実験が可能



こんな人にお勧め！

- SYBRのプライマー設計、条件最適化、実験操作にかかる時間や手間を減らしたい
- NGS実験の結果をバリデーションしたい
- 数十～数百遺伝子のスクリーニング実験を精度良く行いたい

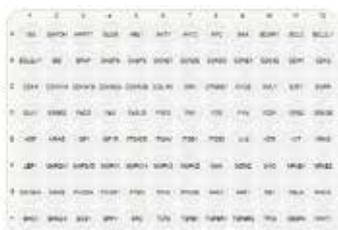
▶ 選べるTaqManアレイプレート

様々なニーズに対応できるように、数種類のプレートタイプを提供しています。

Applied Biosystems™ Inventoried TaqMan™ アレイプレート

特定のパスウェイや疾患に関連する遺伝子に対するTaqManアッセイがスポット済みです。96ターゲット(下図)、2×48ターゲットなどプレートによってレイアウトに種類があります。

- プレートタイプ：96ウェル
- ランモード：Standard & Fast
- 納期：約2～3週間(1枚からご注文可能)
- 注文方法：通常オーダー(カタログ品)



レイアウト例(製品番号:4414161)。1プレートで96遺伝子を発現解析

Applied Biosystems™ カスタム TaqMan™ アレイプレート

9種類のレイアウトフォーマットの中から自由にアッセイをスポット可能です。全ての生物種に対応しています。

- プレートタイプ：96ウェル
- ランモード：Standard & Fast
- 納期：約3～4週間(最少注文数は6枚です)
- 注文方法：Webオーダー

Format 8 Custom Format 8

	MC											
A	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
B	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
C	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
D	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
E	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
F	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
G	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7
H												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12

MC = Manufacturing Control (18S)

レイアウト例(製品番号:4413266)。アッセイ数7/コントロール数1/サンプル数12

特注TaqMan アレイプレート

さまざまな種類のApplied Biosystems™ TaqMan™ Assays(Gene Expression、MicroRNA、SNP Genotypingなど)を96ウェルプレートもしくは384ウェルプレートに希望するフォーマットで分注してお届けするサービスです。

- 納期：約3～5週間(最少注文数は20枚です)
- 注文方法：eメールオーダー

製品名	サイズ	製品番号	価格
Inventoried TaqMan アレイプレート	1枚	—	お問い合わせ
カスタムTaqMan アレイプレート	6枚～	—	お問い合わせ
特注TaqMan アレイプレート	20枚～	—	お問い合わせ

デジタルPCR実験を自動化して研究の生産性を向上

近日発売
予定



POINT

高精度で使いやすいApplied Biosystems™ QuantStudio™ Absolute Q™ デジタルPCRシステムに、自動化用の統合システムが登場しました。Applied Biosystems™ QuantStudio™ Absolute Q™ デジタルPCRシステム AutoRun Suiteは、QuantStudio Absolute Q デジタルPCRシステムを2台まで接続でき、マイクロプレート进行操作するロボット機構と高性能ソフトウェアを備え、最大72時間のハンズフリー操作をサポートします。

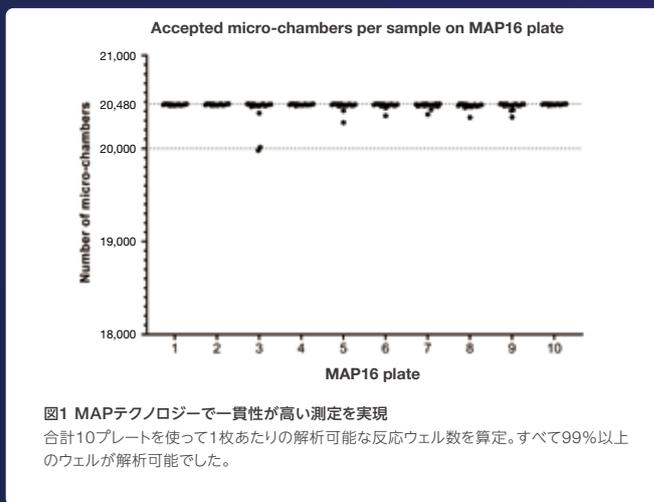
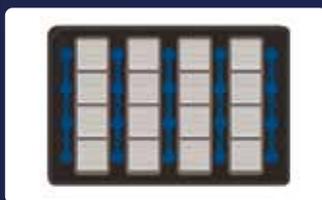
- 効率性: プレートセットとランの自動化により、数百サンプルを1回の操作で解析
- 柔軟性: 一度に60枚までのQuantStudio MAP16 Digital PCR Plate (MAP16プレート)をセットでき、最大960サンプルを連続測定
- 一貫性: 室温で72時間安定なマスターミックスにより、ランごとのばらつきを大幅に低減

高い均一性を支えるMAP16 プレートの特長

- サンプルロード時の不均一性やデッドボリューム (5%以下) を改善した独自プレート
- マイクロ流路 (microfluidic array plate: MAP) テクノロジーにより、1パーティション (区画) 当たり20,480個のマイクロチャンバー (反応ウェル) の平均99%以上を解析可能 (図1)
- 1プレートに4、8、12、16サンプルをセットでき、未使用パートは再利用可能
- マルチプレート解析対応



QuantStudio MAP16 Digital PCR Plate



ハイスループットに柔軟に対応する製品ラインアップ

QuantStudio Absolute Q デジタルPCRシステム AutoRun Suiteは、1台もしくは2台のQuantStudio Absolute Q デジタルPCRシステムを接続でき、24時間で最大512サンプル、バッチ測定で最大960サンプルを処理できます。QuantStudio Absolute Q デジタルPCRシステムのSAEソフトウェアが21 CFR Part 11対応をサポートします。

システム構成	AbsoluteQ (スタンドアローン)	Single Configuration (自動運転、1台接続)	Dual Configuration (自動運転、2台接続)
プレートの自動挿入	適合 (別途API設定が必要)	可	可
72時間までの自動オペレーション	不可	可	可
24時間当たりのサンプル処理数	96	256	512

[実験例]

ハイスループット自動化デジタルPCRシステムの一貫性をアデノ随伴ウイルスで検証

遺伝子治療で注目されるアデノ随伴ウイルス(AAV)由来ベクターの効率的な活用には、HEK293細胞等で産生するウイルスゲノムの正確な定量が複数のステップで必要となります。そこで検量線を必要とせず、シンプルな絶対定量を実現するQuantStudio Absolute Q デジタルPCRシステム AutoRun Suite (以下Absolute Q)を使って、リコンビナントAAVのゲノム力価をハイスループットで自動測定してデータの一貫性を検証しました。その結果、多様なサンプルにおいて変動係数(CV)3%という一貫性の高いデータが得られました。

材料・方法

市販のリコンビナントAAV2ウイルス粒子(Vigene社・RS-AAV2-FL)とAAVのITR配列のDNAコントロールをサンプルとして準備しました。AAV粒子は95°C・5分熱処理後、ITR配列をTaqManベースのApplied Biosystems™ QuantStudio™ Absolute Q™ dPCR Assay (製品番号:A52436)を使ってAbsoluteQで定量しました。AAV DNAコントロールは、AbsoluteQ、もしくはDropletベースのデジタルPCRシステム(以下Droplet)で定量しました。1ランの所要時間はAbsolute Qでは約90分でしたが、Dropletでは約6時間かかりました。

結果

- Absolute Qの測定におけるプレート間の平均%CV値は、AAV DNA コントロールサンプルで2.5%(図2)、AAV2粒子で2.2%(図3)と良好な一貫性を示しました。
- AAV DNA コントロールで2種類のデジタルPCRシステムの測定をすると、Dropletの平均%CV値は5.2%、Absolute Qは5.3%であり、ほぼ同等の結果が得られました(図4)。

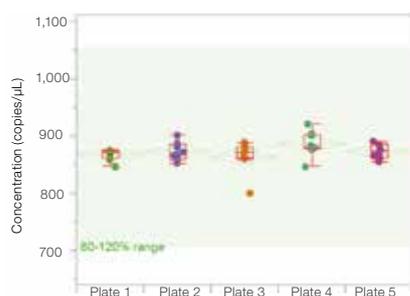


図2 AAV DNAコントロールのプレート間の測定結果

%CV値はプレート1~5でそれぞれ3.0%, 2.5%, 2.7%, 1.7%, および2.0%であり、全てのサンプルにおいて全体の20%誤差の範囲内に収まりました。それぞれのプレートはN=8 (プレート4はN=7)で実施しました。

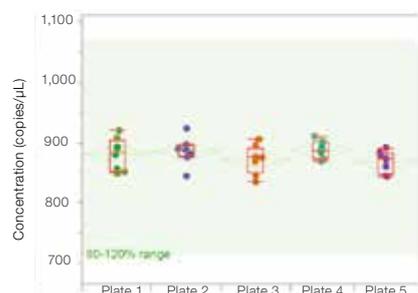


図3 AAV2粒子のプレート間の測定結果

%CV値はプレート1~5でそれぞれ1.1%, 1.8%, 3.2%, 2.5%および1.5%であり、全てのサンプルにおいて全体の20%誤差の範囲内に収まりました。それぞれのプレートはN=8で実施しました。

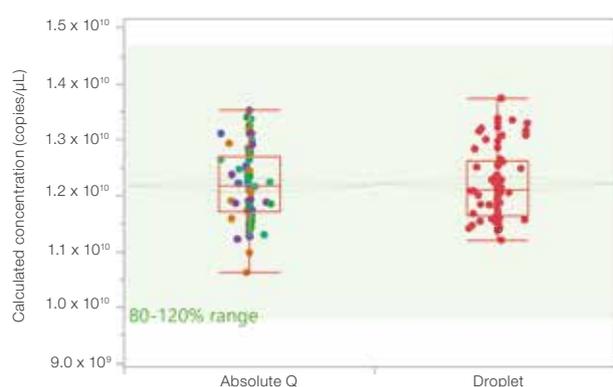


図4 Absolute QとDropletでの測定結果の比較

Absolute QとDroplet PCRの誤差は0.5%以内でした。また全てのサンプルにおいて全体の20%誤差の範囲内に収まりました。Absolute QはN=75、DropletはN=74で実施(Dropletは“No Call Result”が1つあり)。AAV DNAコントロールを200~3520copies/μLに希釈してAbsoluteQもしくはDropletで測定後、濃度を計算。

結論

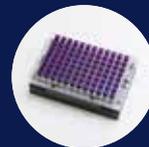
ハイスループット自動化システムのQuantStudio Absolute Q デジタルPCR システム AutoRun SuiteによるAAVのゲノム力価の定量データは高い一貫性を示し、高感度なデジタルPCRによる核酸の絶対定量をハイスループットで問題なく実施できることを確認しました。

製品名	サイズ	製品番号	価格
QuantStudio Absolute Q デジタルPCRシステム AutoRun Suite Single Configuration デスクトップPC付パッケージ(1年保証)	1式	QS-ABSQ-ARS-D-SA-S1	お問い合わせ
QuantStudio Absolute Q デジタルPCRシステム AutoRun Suite Dual Configuration デスクトップPC付パッケージ(1年保証)	1式	QS-ABSQ-ARD-D-SA-S1	お問い合わせ
Applied Biosystems Absolute Q Viral Titer dPCR Assays	700反応	A53736	¥181,800

予測ゲノムに対するジャポニカアレイ NEOの活用事例紹介

臨床や創薬への貢献を目指して、多因子疾患の発症リスクを予測する「予測ゲノム」研究が進められています。しかし個人個人のゲノムワイド関連解析は非常に煩雑で時間やコストがかかり、人種や民族に特有な事例も多く報告されています。サーモフィッシャーサイエンティフィックが提供するApplied Biosystems™ Axiom™ ジャポニカアレイ® NEOは、東北大学東北メディカル・メガバンク機構 (ToMMo) が構築した全ゲノムリファレンスパネル (3.5KJPNv2) をもとに設計され

ています。日本人3,552人の全ゲノムデータから選択された65万 tagSNPと日本民族集団特有の疾患関連SNPを搭載し、ToMMoが確立した全ゲノムインピュテーションと組み合わせ、数千万規模のSNP情報が取得可能で、予測ゲノムを含むこれからの精密個人化医療の実現を効率的にサポートします。ここでは学会やセミナーで最近発表されたジャポニカアレイの活用事例を紹介します。



活用事例紹介 1

「周産期疾患とDOHaD研究のいま」

菅原準一 氏

(スズキ記念病院 副院長)

(日本人類遺伝学会第68回大会共催セミナーより)

DOHaD (Developmental Origins of Health and Disease) は、1986年にBarkerが提唱した「将来の健康や特定の病気へのかかりやすさは、胎児期や生後早期の環境の影響を強く受けて決定される」という学説です。私は前職の東北大学産婦人科の頃から、DOHaDを基盤に多因子疾患の妊娠高血圧症候群 (Hypertensive Disorders of Pregnancy: HDP) の研究に取り組んでいます。これまでに東北メディカル・メガバンク機構の三世代コホートを基盤とした研究で、HDP発症に関連する複数のリスク因子を同定し、妊婦自身の低出生体重とHDP発症との関連性や、HDP既往の女性が高血圧と強く関連することを報告



しました。さらにジャポニカアレイを用いたゲノム解析とGCMSによるメタボローム解析を組み合わせた研究を進め、妊婦だけでなく、夫婦と子の相互作用を加味したトリオ・ゲノムワイド関連解析から、妊娠高血圧腎症 (PE) では子がマイナーアレルを一つ有することで母親のPEリスクが大きく減少すること、ゲノム多型・メタボローム相互作用解析から15番染色体の複数のSNPと一定のメタボロームデータの上昇による相互作用からPEの発症リスクが2倍上昇することを観察しています。今後詳細を調べていく予定です。またToMMoではSNPアレイデータ取得を進め、分譲データ等も充実しているので、基礎から臨床領域の多くの方に利活用をお勧めします。

活用事例紹介 2

「ゲノム解析を基盤とした老年病研究」

尾崎浩一 氏

(国立長寿医療研究センター (NCGG) 研究所・メディカルゲノムセンター長)

(2023年10月開催、「予測ゲノム」オンラインセミナーより)
糖尿病や心筋梗塞、アルツハイマー病などの多因子疾患においては、GWAS解析で同定したリスクバリエーション群を基にポリジェニックリスクスコア (PRS) を正確に構築することで、早期の疾患リスク予測や介入が行え、発症率の抑制に寄与します。2002年、私たち日本 (理研) の研究グループは世界で初めてGWAS解析から心筋梗塞感受性遺伝子の同定に成功しました。今回はジャポニカアレイによる孤発性アルツハイマー病 (LOAD) のGWAS解析を紹介します。欧米ではLOADに関連する75座位が報告されていますが、ゲノム構造は人種間で異なり、日本人に特化した解析が必要です。そこで私が所属するNCGGバイオバン



クを中心とした日本人検体 (LOAD: 3962検体、コントロール: 4074検体) を用いて約485万SNPを用いたGWAS解析を行いました。その結果、第4染色体上に日本人に特徴的なLOAD座位 (FAM47E) を同定しました。この座位は近傍遺伝子の脳における発現に影響を与えて疾患に関与することが示唆されました。また欧米人データとの大規模トランスエスニックメタ解析からは新規ローカスとしてOR2B2というオファン受容体をコードする遺伝子がADに関連することを同定しました。今後はゲノムデータの拡大化やオミクス統合解析、海外施設とのコラボレーションをさらに進め、PRSを利用した老年病の早期予防、病態解明による新規治療薬の開発を目指して、さらに研究を進めていきます。

※ジャポニカアレイ® は、国立大学法人東北大学の登録商標です。ジャポニカアレイ® NEOは、Life Technologies Corporation, part of Thermo Fisher Scientific Inc.が東北大学よりライセンスを受けて製造・販売しています。ジャポニカアレイ® NEOに搭載されている疾患関連SNPマーカーはすべて研究用途です。

TaqMan Cells-to-C_T Express kit

RNA精製不要で、さらに簡単・迅速な遺伝子発現解析!

POINT

NEW!

Invitrogen™ Cells-to-C_T™ Kitは、RNA精製を行わずに、培養細胞ライセートから直接逆転写反応 (RT) と定量PCR (qPCR) を実施するための製品シリーズです。新しく加わったInvitrogen™ TaqMan™ Cells-to-C_T™ Express Kit は、逆転写酵素にInvitrogen™ SuperScript™ IV VIL0 Master Mixを採用し、さらに簡便で迅速なRT-qPCRを実現します。



- さらに迅速に: RT-qPCR用の96サンプルを5分で調製可能
- さらに簡便に: 細胞溶解に必要なステップは1回のみ。停止液の添加は不要 (Invitrogen™ ezDNase™を使用) で、直接逆転写反応へ
- 優れた性能: 1~100,000個の細胞において、一貫した正確性、再現性、および感度を実現
- 効率的なワークフロー: 箱から取り出してすぐに使用できるよう最適化された試薬セット

▶ さらに簡便なシステムへ

TaqMan Cells-to-C_T Express Kitは、RNA精製を行うことなく培養細胞から直接、迅速な遺伝子発現解析を行うように設計されています。RT-qPCR 前に不活性化する必要のない細胞溶解バッファーを含むので、ワークフローがさらにシンプルになりました。本キットは、わずか5つのコンポーネントを使用するだけで優れた感度と迅速なワークフローの2ステップ RT-qPCRを実現します。

▶ 従来品 (Cells-to-C_T Fast Advanced) との比較

TaqMan Cells-to-C_T Express Kitは、細胞調製および逆転写反応で使用するコンポーネントを改良し、従来製品よりもシンプルでより短時間でRT-qPCRが行えます。

	Cells-to-C _T Express Kit	Cells-to-C _T Fast Advanced Kit
		
検出系	TaqMan	TaqMan/SYBR Green
結果までに要する時間(分) (細胞溶解からqPCRの結果出力まで)	70~85分	80~95分
細胞数(個)	10~100,000	10~100,000
細胞調製	〈所要時間 5分〉 <ul style="list-style-type: none"> ● Express Lysis Solution (室温保存) ● ezDNase (Stop Solution不要) 	〈所要時間 7分〉 <ul style="list-style-type: none"> ● Lysis Solution (4℃保存) ● DNase I ● Stop Solution
ステップ1 逆転写反応	〈所要時間 25分〉 <ul style="list-style-type: none"> ● Express RT Master Mix (SuperScript IV) ● Negative RT Control 	〈所要時間 35分〉 <ul style="list-style-type: none"> ● 20X Fast Advanced RT Enzyme (MMLV) ● 2X Fast Advanced RT buffer
ステップ2 qPCR反応	〈所要時間 40分〉 <ul style="list-style-type: none"> ● Express PCR Master Mix 	〈所要時間 40分〉 <ul style="list-style-type: none"> ● Fast Advanced PCR Master Mix

製品名	サイズ	製品番号	価格
TaqMan Cells-to-C _T Express Kit	40 反応	A57985	¥108,000
	100 反応	A57986	¥215,000
	400 反応	A57987	¥785,000

核酸抽出効率の比較

KingFisher Duo Primeシステムを用いた磁気ビーズ抽出法とスピнкаラム抽出法の比較

核酸抽出は、一般的にマニュアルによるスピнкаラムを用いた固相抽出法が使用されます。しかしマニュアル法では効率性が課題となり、さらに核酸の正確な定量には精製法が大きく影響します。ここでは自動化サンプル調製装置のThermo Scientific™ KingFisher™ Duo Prime システムと磁気ビーズ抽出キットを用いた核酸精製の半自動化ワークフローを紹介します。この方法は多様なサンプルに対応し、作業時間を大幅に節約するとともに高品質な精製が行えます。



材料・方法

細胞サンプルとして接着性の肺がん細胞株 (NCI-H23、NCI-H1781) を購入し、組織サンプルとしてウサギの肝臓と心臓を用意しました。また2名のドナーから採取した全血検体でRNAを抽出しました。磁気ビーズを用いたトータルRNA (スモールRNAを含む) の抽出は、Applied Biosystems™ MagMAX™ mirVana™ TotalRNA Isolation Kit とKingFisher Duo Primeシステムで行い、スピнкаラムによるRNAの抽出は、サンプルタイプに適した2種類の他社キットを使用しました。

遺伝子発現レベルは、Applied Biosystems™ QuantStudio™ 5 リアルタイムPCRシステム (384ウェルブロック、高速サイクル条件) を用いた1ステップRT-qPCR で解析しました。RNAサンプル中のゲノムDNA (gDNA) のコンタミネーション評価は、Invitrogen™ SuperScript™ IV VIL0™ Master Mixを使って逆転写酵素 (RT) の有無で行いました。実験内容の詳細とDNA抽出は、アプリケーションノートに記載しています。

結果

スピнкаラム法と同等以上のRNA収量

MagMAX mirVana キットを用いた磁気ビーズ法で抽出できたRNA収量は、細胞サンプル (図1左) ではスピнкаラム法と同程度、組織 (図1中央) および全血サンプル (図1右) ではスピнкаラム法よりも高い収量が得られました。

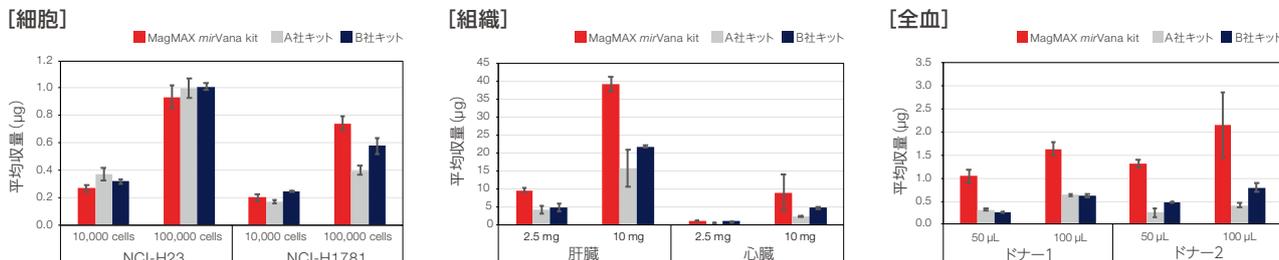


図1 MagMAX mirVana Total RNA Isolation KitとKingFisher Duo Prime システムを用いた抽出法によるRNA収量

スピнкаラム法よりもgDNAコンタミネーションが低減

スピнкаラム法 (特にB社) では細胞と全血サンプルの電気泳動図に複数の追加ピークが出現したので、gDNAのコンタミネーションを評価しました。全血サンプルから抽出したRNAについて、ダウンストリームの遺伝子発現解析を1ステップRT-qPCR法で行ったところ、ハウスキープ遺伝子であるACTBとADH5の増幅サイクル数 (C_T 値) に有意な差はありませんでした (図2A)。しかしRTなしで解析した場合、B社のスピнкаラムで抽出したRNAは C_T 値が低くgDNAによるコンタミネーションが示唆されました。MagMAX mirVana キットによる抽出RNAの C_T 値は最も高く、gDNAコンタミネーションの危険性は最小でした (図2B)。

まとめ

磁気ビーズとKingFisher Duo Prime システムを用いたワークフローは、より高品質な核酸を精製でき、スピнкаラム法よりも効率的で自動化が容易な抽出法であることが示されました。

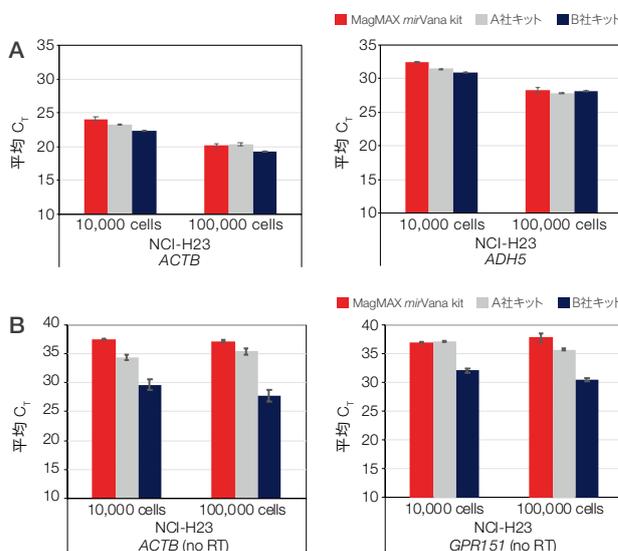
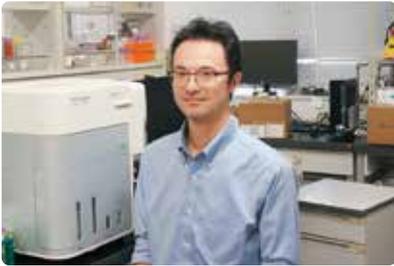


図2 細胞サンプルから精製したRNAの遺伝子発現とgDNAコンタミネーションの解析

胎盤の栄養膜細胞分化における多核化の形態変化を確認

本村健一郎 氏(国立成育医療研究センター免疫アレルギー・感染研究部 上級研究員)



研究の概要を教えてください。

母体と胎児の間に介在する胎盤は、妊娠中に胎児発育を担う臓器であり、その障害は妊娠合併症に深く関わっています。私たちは、胎盤形成やその障害メカニズムを明らかにし、妊娠合併症の解決を目指す基礎研究に取り組んでいます。胎児組織は胎盤内の絨毛で母体血と接しますが、その表面には合胞体栄養膜細胞が存在し、ガス交換、栄養輸送、ホルモン産生、免疫学的バリア機能といった、胎盤機能の基本となる作用の大半を担っています。合胞体栄養膜細胞は増殖能を失っていますが、その内側に位置する細胞性栄養膜細胞が融合することで維持されます。私たちは栄養膜細胞の分化メカニズムに着目し、研究を進めています。

応募のきっかけは何ですか？

2017年にヒト満期胎盤から初代細胞性栄養膜細胞を分離して安定的に培養し、細胞融合を介して多核の合胞体栄養膜細胞へ分化する系を確立しました。さらにこの

研究を進めるためには分化状態に応じた発現マーカーの特定が必要です。現在、分化に伴う細胞形態の変化は顕微鏡で観察し、候補となる発現マーカーはセルアナライザーで評価していますが、多核化した合胞体栄養膜細胞がセルアナライザーの目的の分画に含まれているかどうか、確認できずにいました。イメージングフローサイトメーターを使えば各分画に含まれる細胞形態を直接確認できるので、私たちがストックしている初代細胞性栄養膜細胞から分化誘導した合胞体栄養膜細胞をInvitrogen™ Attune™ CytPix™ Flow Cytometerで評価しようと思いました。

使用した感想を聞かせてください。

合胞体栄養膜細胞は、多核化に伴い細胞サイズが増大します。解析では、接着培養した合胞体栄養膜細胞を剥離してセルアナライザーに流しますが、初代培養した細胞には細胞片や死細胞の凝集塊も含まれているので機械の詰まりを防ぐためのフィルタリングを行っていました。今回の解析で、目的の分画に合胞体栄養膜細胞が壊れずに含まれていることを確認できました(図)。またサイズが大きな合胞体栄養膜細胞の一部は解析前のフィルタリングで除去されることも確認しましたが、Attune CytPix Flow Cytometerは事前のフィルタリングなしでも目詰まりなく流せ、しかも画像情報から解析対象となる細胞とDebrisを明確に区別できるのでこの実験

に適していると思いました。さらに一般的な死細胞染色試薬で染色された分画にも、合胞体化した栄養膜細胞が含まれていることを確認しました。これは融合で不安定になった細胞膜を試薬が通過し、蛍光分子が多く細胞内に取り込まれたと考えられ、この結果から、細胞に合わせた条件検討を行う必要があることが分かりました。操作性に関してはセットアップやシャットダウンがワンクリックで簡便な点が良かったです。

今後の研究へ向けて。

2023年4月、私たちは初代培養栄養膜細胞を使った実験により、胎盤がウイルス感染に特化した防御機構を持つことを論文発表しました。今後も胎盤の免疫機構や栄養膜細胞の分化メカニズムの解析を行い、疾患との関連性を継続して研究予定です。

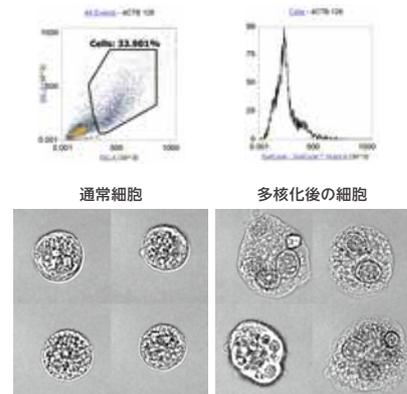


図 栄養膜細胞の解析結果 初代細胞性栄養膜細胞を培養して多核の合胞体栄養膜細胞に分化後、Attune CytPix Flow Cytometerで解析して各分画の画像を取得。

Attune CytPix Flow Cytometer

高速カメラ搭載の革新的なマルチカラーフローサイトメーター

Invitrogen™ Attune™ Flow Cytometerの最新モデル、Invitrogen™ Attune™ CytPix™ Flow Cytometerは、ハイスピードカメラを搭載し、蛍光シグナルと明視野画像を同時に取得できる優れたフローサイトメーターです。



- 最大1,000 µL/minの高いサンプル処理能力
- 最大6,000 images/secで明視野画像を取得可能
- ハイスループットでも一貫した画像品質

- ※1 他にblue/red、blue/violet、blue/violet 6 レーザーの組み合わせもあります。
- ※2 他にblue/red/violet、blue/red/violet 6 レーザーの組み合わせもあります。
- ※3 他にblue/red/violet 6/yellow レーザーの組み合わせもあります。

製品名	サイズ	製品番号	価格
Attune CytPix Flow Cytometer, blue/yellow(1年保証)*1	1 式	A48661-S1	¥14,000,000
Attune CytPix Flow Cytometer, blue/red/yellow(1年保証)*2	1 式	A48655-S1	¥19,700,000
Attune CytPix Flow Cytometer, blue/violet/yellow(1年保証)	1 式	A48656-S1	¥18,700,000
Attune CytPix Flow Cytometer, blue/red/violet/yellow(1年保証)*3	1 式	A48652-S1	¥23,700,000

LINE版「NEXTライフサイエンス情報」へお友だち登録しませんか？



サーモフィッシャーサイエンティフィックは、LINE公式アカウントで研究活動に役立つ情報を配信しています。

例えば、実験に関するちょっとした疑問を検証してみる「やってみた」シリーズをはじめ、人気ブログ記事や最新のNEXT誌を簡単に閲覧できます。

また開催間近のセミナー情報やキャンペーン情報もタイムリーにチェックできるので、ぜひお友だち登録してご活用ください！



【配信内容】

- 人気ブログ紹介
- 各種ハンドブックのダウンロード
- セミナー情報
- 新製品情報
- キャンペーン情報

ダウンロードコンテンツ例 ▶



LINE公式アカウントへのお友だち登録はこちらから

NEXT 3月号はいかがでしたか？

特集は、鳥取大学教授の香月康宏氏に染色体工学の技術開発とその応用の広がりを伺いました。染色体を自由自在にデザインする時代の到来が楽しみです。ユーザーボイスは、iPS細胞研究から難病治療を目指す京都大学iPS細胞研究所の池谷 真氏、感染性胃腸炎の疫学研究を効率的に進める三重病院の根来麻奈美氏、またセミナー報告や製品評価プログラム参加者へのインタビュー記事も掲載しています。新製品情報やテクニカルレビューもぜひご一読ください。

NEXT読者アンケートはこちらから → thermofisher.surveymonkey.com/r/NEXT_reader



NEXT バックナンバーは、こちらから → thermofisher.com/NEXT

研究用にも使用できます。診断用には使用いただけません。

© 2024 Thermo Fisher Scientific Inc. All rights reserved. All trademarks are the property of Thermo Fisher Scientific and its subsidiaries unless otherwise specified.

記載の価格は2024年3月現在のメーカー希望小売価格です。消費税は含まれておりません。●実際の販売価格は、弊社販売代理店までお問い合わせください。

●価格、製品の仕様、外観、記載内容は予告なしに変更する場合がありますのであらかじめご了承ください。●標準販売条件はこちらをご覧ください。 thermofisher.com/jp-tc LSG155-A2402HS

サーモフィッシャーサイエンティフィック
ライフテクノロジーズジャパン株式会社

テクニカルサポート ☎ 0120-477-392 ✉ jptech@thermofisher.com
オーダーサポート TEL: 03-6832-6980 FAX: 03-6832-9584
営業部 TEL: 03-6832-9300 FAX: 03-6832-9580

facebook.com/ThermoFisherJapan [@thermofisherjp](https://twitter.com/thermofisherjp)
thermofisher.com

販売店