

令和元年度名古屋大学技術職員研修（分析・物質コース）受講報告

○依藤絵里^{A)}、牧貴美香^{B)}、西村真弓^{B)}、伊藤広樹^{B)}、鳥居実恵^{C)}、
吉村文孝^{D)}、河野永治^{E)}、高濱謙太郎^{F)}、沢田義治^{G)}、加藤洋介^{H)}

A) 分析・物質技術支援室 生命情報解析技術グループ

B) 分析・物質技術支援室 表面分析・形態観察技術グループ

C) 分析・物質技術支援室 組成分析・構造解析技術グループ

D) 生物・生体技術支援室 動植物育成管理技術グループ

E) 生物・生体技術支援室 生物機能解析・実験実習技術グループ

F) 計測・制御技術支援室 シンクロトロン光技術グループ

G) 岐阜大学 科学研究基盤センター 機器分析分野

H) 岐阜大学 科学研究基盤センター

概要

令和元年度の名古屋大学技術職員研修（分析・物質コース）は、医学系研究科附属医学教育研究支援センター 分析機器部門にて「汎用分析機器を用いた分析技術の基礎と応用」というテーマで9月に開催された。

研修では講義および実習を通して、ライフサイエンス研究で用いられる基礎的な分析手法と応用例を学ぶことができた。実習では共用機器施設である分析機器部門の機器を使い、質量分析による食品の残留農薬分析と細胞間コミュニケーションに関わる細胞外膜小胞体（エクソソーム）中のRNA解析を体験した。本発表では、研修の内容と学んだことをまとめ報告する。

1 研修概要

テーマ	汎用分析機器を用いた分析技術の基礎と応用
研修目的	ライフサイエンス研究で用いられる機器分析技術に関して、理解を深め、基礎的な分析手法を習得し、その応用例について学ぶ。
担当	分析・物質技術支援室 生命情報解析技術グループ
開催日	令和元年9月3日～9月5日（図1にプログラムを記載）
開催場所	名古屋大学鶴舞キャンパス 医学系研究科附属医学教育研究支援センター 分析機器部門
受講者数	10名

開催場所となった分析機器部門は、医学系研究科・医学部において分析・計測機器を集中的に維持管理し、機器操作・試料作製の指導や結果の解釈・解析に関するアドバイス、講習会・セミナー開催等の研究支援サービスを行なう共通機器施設である。設置機器は主にライフサイエンス研究に用いられており、学内外からユーザーを受け入れている。

プログラムは一般講義、専門講義の他、実習は大きく前後半の2テーマに分けて行なわれた（図1）。前半は「食の安全をはかる」をテーマとした質量分析の実習、後半は細胞からの細胞外膜小胞体（エクソソーム）抽出と分析をテーマとしてセルソーター、電子顕微鏡、超遠心機と核酸に関する分析機器を用いた「セルソ

ーティング」「エクソソームの電顕観察」「エクソソーム total RNA の抽出と分析」の実習であった。

時刻 月日	13 ・ 00	13 ・ 20	13 ・ 30	13 ・ 45	14 ・ 45	15 ・ 00	16 ・ 00	16 ・ 15	16 ・ 45	17 ・ 15	18 ・ 00	20 ・ 00
9 月 3 日 (火)	受付		オリエンテーション	開講式	一般講義(1) 「がん研究最前線」 講師:日野原 邦彦 会場:実習室	休憩	一般講義(2) 「遺伝子の発現を定量・解析するには: 定量 PCR、RNA-Seq、ChIP-Seq を中 心に」 講師:紅 朋浩 会場:実習室	休憩	専門講義(1) 「質量分析が切り拓く ライフサイエンス」 講師:瀧 健太郎 会場:実習室	専門講義(2) 「エクソソーム RNA 分 析の基礎」 講師:伊藤 康友 会場:実習室	諸連絡 移動	意見交換会
9 月 4 日 (水)	受付				実習(1) 「食の安全をはかる -試料調製-」 講師:瀧 健太郎 会場:試料準備室	休憩			実習(2) 「食の安全をはかる -LC/MS/MS 測定-」 講師:瀧 健太郎 会場:分子構造解析室			
9 月 5 日 (木)	受付				実習(3) 「セルソーティング」 講師:田中 稔 会場:細胞機能解析室		実習(4) 「エクソソームの電顕観察」 講師:板倉 広治 会場:電顕室	休憩	実習(5) 「エクソソーム totalRNA の抽出と分析」 講師:伊藤 康友 会場:遺伝情報解析室			閉講式

図 1. 研修プログラム

2 研修内容

2.1 一般講義・専門講義 (1 日目)

初日は講義により、分析機器を用いたライフサイエンス研究の実例や実習に必要な基礎知識を学んだ。医学系研究科分子細胞免疫学講座の日野原特任准教授による一般講義「がん研究最前線」では、患者ごとに様々なサブタイプが存在し細胞によっても遺伝子発現が異なるため、現状では薬での根治が難しい種類のがんについて解明してきたことや、新たな治療法への可能性をお話いただいた。その中でアメリカのコアファシリタティによる研究支援についても触れられ、技術職員によるプロフェッショナルなサポートが研究の遂行に大変重要であったことやそのレベルの高さを知り、刺激を受けた。続く一般講義は医学系研究科システム生物学講座の紅助教より「遺伝子の発現を定量・解析するには：定量 PCR、RNA-seq、ChIP-Seq を中心に」という題で遺伝子とその発現解析技術の基礎について、解析方法の変遷も含めてお話いただいた。

専門講義では、実習の前提知識となる基礎を学んだ。「質量分析が切り拓くライフサイエンス」では、分析機器部門の瀧技師より質量分析、特に実習で使用する MS/MS についてとライフサイエンスにおける応用について説明された。分析機器部門では従来、タンパク質を対象とするプロテオミクス（例：臨床プロテオミクス、リン酸化プロテオミクス）の他にも、食品科学などに応用範囲を広げているとのことであった。伊藤技師による「エクソソーム RNA 分析の基礎」では、RNA とエクソソームの役割、エクソソーム RNA（エクソソームによって運ばれる RNA）を調べるための実験における基礎理論を学んだ。

2.2 実習「食の安全をはかる -試料調製-」「食の安全をはかる -LC/MS/MS 測定-」（2 日目）

質量分析の実習では、定量分析による農作物中の残留農薬試験を行なった。さらに、農作物を加工（ボイルまたは熱湯洗浄）することによる農薬・防カビ剤の残留量変化を調べた。

サンプルは市販のハウレンソウ（未処理/1 分間茹でたもの）およびレモン（未処理/1 分間熱湯に浸して洗浄したもの）を用いた。ハウレンソウでは茹でる前後での農薬残留量を、レモンでは熱湯洗浄前後での防

カビ剤残留量を果汁と果皮とに分けて比較した。レモン果汁以外のサンプルを凍結破砕した後、QuEChERS法（農薬分析によく用いられる、簡便な抽出・精製法）により全サンプルの農薬成分を抽出・精製した。なお、定量の精度を高めるために抽出時に内部標準物質を加えた。精製したサンプルはHPLC（Prominence, 島津製作所）で成分ごとに分離後、三連四重極型MS（QTRAP6500, AB Sciex）へ送液され測定された。なお、このときに予め準備されたブランク試料（オーガニックホウレンソウと防カビ剤を使用していないレモンから調製）に標準試薬を添加したのもも検量線作成用に測定した（→標準添加法と内部標準法を組み合わせた定量）。

結果を待つ間に解析方法についての講義を受け、質量分析において信頼性の高い結果を得るには目的に合わせて適切な標準法と標準物質を用いることが必要であり、実験デザインが大変重要であることを実感した。

解析の結果、ホウレンソウ残留農薬については未処理サンプルの Imidacloprid 濃度平均値は基準値（ポジティブリスト制度で定められた 0.01 ppm）以下だったものの、個別のサンプルでは基準値を超えたものがあつた。茹でたサンプルでは未処理サンプルよりも Imidacloprid 濃度が有意に低下し、平均値で未処理のおよそ 0.03 倍であった（図 3A）。レモンの防カビ剤については、果皮・果汁ともに熱湯洗浄により防カビ剤濃度が低下した（図 3B, 3C）。果汁中の防カビ剤濃度は熱湯洗浄の有無で変化しないと予想していたため、この結果は予想外であったが、サンプル数を増やし統計的に処理することで今回出た差が有意かどうかを判断することができると思われる。また、果汁は果皮をおろし金で採取した後のレモンを切り、絞った液をチューブにとるという方法で採取したが、未処理サンプルではこのとき実に残った果皮中の防カビ剤が果汁に混入した可能性が考えられる。これが原因だった場合は漏斗とスタンドを使用する、あるいはレモン絞り器を使用するなど、絞った果汁が果皮に触れないようにすることで改善できると予想される。

2.3 実習「セルソーティング」「エクソソームの電顕観察」「エクソソーム total RNA の抽出と分析」(3 日目)

3 日目はエクソソーム RNA 分析の方法として、<目的の細胞を分取→細胞を培養→培地からエクソソームを抽出→抽出したエクソソームを電子顕微鏡で確認→エクソソームから RNA を抽出、品質確認>という一連の工程のうち一部を学んだ。ただし実際にエクソソームや RNA の抽出を研修内で行なうのは難しかったため、事前に準備していただいたサンプルを用いた実習やデモンストレーションにより手法を学んだ。

「セルソーティング」

採取あるいは培養した細胞のうち、目的の細胞種あるいは特定の遺伝子を発現している細胞のみを分取する工程がセルソーティングである。セルソーティングに用いる機器セルソーターでは、細胞を細い流路に流し、流れる細胞 1 つ 1 つにレーザーを照射して蛍光や散乱光を測定すること、さらに特定範囲の蛍光・散乱光シグナル強度を持つ細胞を分けることができる。今回は講義の後、検査用コントロールサンプル（ヒト血球細胞）を使用し、蛍光色素で標識したヘルパーT細胞をセルソーター（BD FACSAria, Becton Dickinson）で分取する様子を見学した。

ヘルパーT細胞は細胞表面に CD3 と CD4 という抗原を発現するという特徴を持つ。従って、両分子をそれぞれ蛍光色素で標識し、リンパ球（散乱光シグナル強度により選別）のうち両方の蛍光輝度が高いものを選別するとヘルパーT細胞を選択的に回収することができる。今回のサンプルは CD3 を FITC（緑色蛍光を持つ蛍光色素）で、CD4 を PE（黄～橙色蛍光を持つ蛍光色素）で染色（標識）したものであった。



図2. 質量分析の試料調製

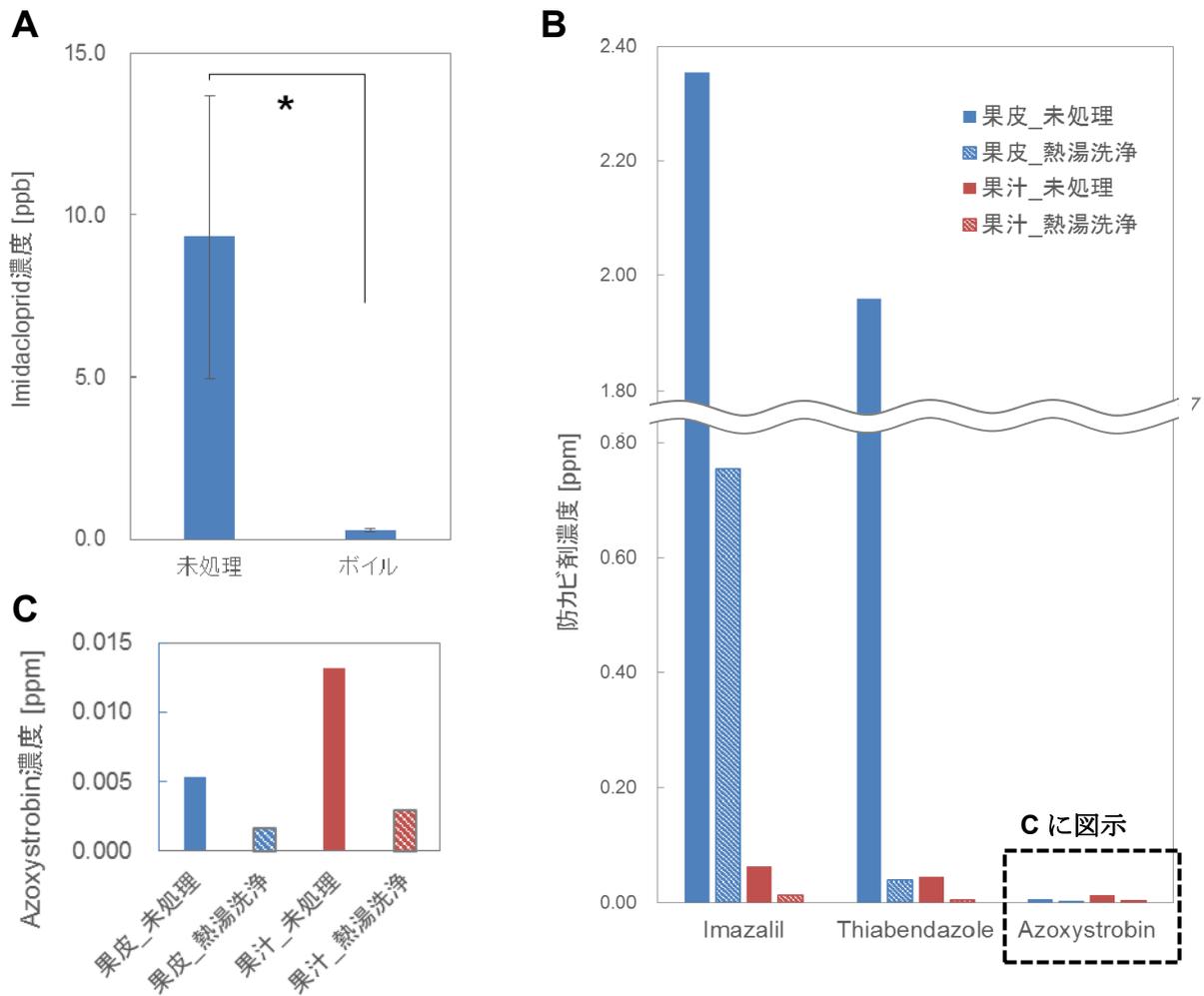


図3. 質量分析の結果。 A ホウレンソウの残留農薬 (Imidacloprid) 濃度。エラーバーは標準偏差を示す。

* $p < 0.05$ (t検定、 $n = 3$)。 B レモンの防カビ剤濃度。 $n = 1$ (各サンプルレモン2個体から調製)。

C レモンの防カビ剤 (Azoxystrobin) 濃度。 B のグラフの Azoxystrobin 部分を抜き出して表示。

ソーティングをする際にはコントロールサンプルが必要となる。まずは蛍光染色していないネガティブコントロールサンプルである。これを使って検出器の感度調整と、今回は血球細胞の中からリンパ球を選別するための閾値の設定を行なった。次に、蛍光標識を1色のみした単染色サンプルが標識の種数分必要になるが、これは「蛍光の漏れこみ」を補正するためである。図4のように、FITCの蛍光に含まれる黄～橙色の成分がPEの検出チャンネルに入ってしまう(=漏れこむ)ため、PEの蛍光輝度が本来よりも高く検出され偽陽性となる可能性がある。それを防ぐために単染色のサンプルで予め蛍光の漏れこみ度合を確認し、補正の設定をした。ここまでできたら測定するサンプルを一度流し、リンパ球で、FITCとPEの蛍光輝度がどちらも高いものを選別するように閾値設定をして再度サンプルを流すと、目的の細胞を含む液滴に電荷が付与され、電界によって進路が曲げられてチューブに入ってゆく。ソーティング後は、得られたサンプルの一部を再度測定して回収率と純度を調べた。

今回使った検査用サンプルでは通常純度97%、回収率50~80%程度が得られるとのことだったが、サンプルによっては純度、回収率がもっと低くなる。さらにソーティングの工程は細胞にかなりのストレスがかかるため、回収した細胞を培養したい場合、サンプルに含まれる陽性細胞の比率、ソーティング前後の測定に使われる細胞数、純度と回収率のロス、ソーティングのストレスによる細胞死や増殖停止を考慮して多めに細胞を準備する必要があると感じた。また、セルソーティングは測定者によって結果にばらつきが出やすいが、その要因は閾値設定の自由度が高いほか、回収用チューブの置き方によっても回収率が変わることなどにあり、安定した結果を得るには熟練が必要とのことであった。

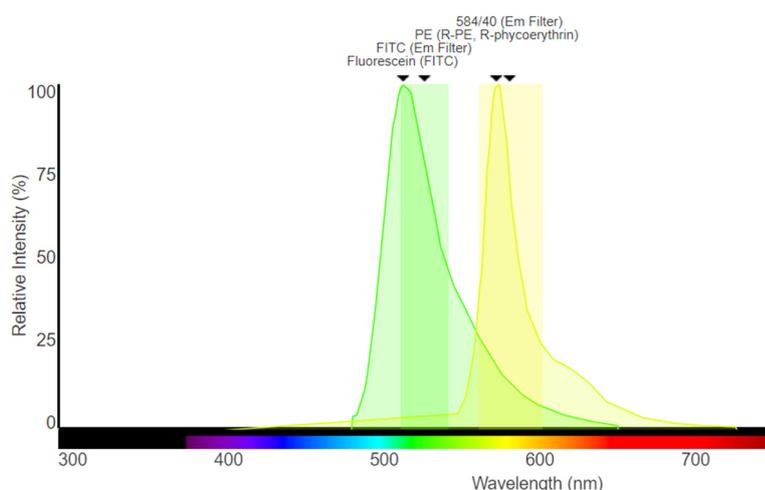


図4. FITCとPEの蛍光スペクトルおよび各検出チャンネルの検出波長域(蛍光スペクトルビューアーより)。緑色実線がFITC、黄色実線がPEの蛍光スペクトル。



図5. ソーティングのデモンストレーション

「エクソソームの電顕観察」

細胞培養液から抽出したエクソソームの確認には、粒径測定機や電子顕微鏡が使用される。今回はネガティブ染色法により可視化したエクソソームを透過電子顕微鏡で観察した。

透過電子顕微鏡では、試料の電子密度が高いところは電子線が透過しにくいため暗く、電子密度が低いところは電子線が透過しやすいため明るい像が得られる。ところが生体を構成する物質は電子密度の低いH, C, N, Oなどの元素が多く、そのままではコントラストがつかないために重金属での染色が必要となる。ネガティブ染色法では試料の周辺や間隔に染色剤(金属原子)が入り込み、電子線が透過しにくくなるため、試料に陰影がつき観察可能となる。

今回は事前に調製されたエクソソーム抽出液を用いた。カーボン支持膜を張ったグリッドに抽出液をのせて酢酸ウラニルで染色し、乾燥したグリッドを透過電子顕微鏡（JEM-1400PLUS または JEM-1400EX, 日本電子）で観察した。観察像は平面的で、事前の予備実験で撮影された画像ほど陰影がはっきりと見られなかったが、エクソソームと思われる直径 100 nm 程度の丸い小胞を多数観察できた。小さく薄いグリッドをピンセットで扱うことは初心者にとって難しく、数秒~数十秒ずつ行なう染色の各工程を進めるのに少しずつ余計に時間がかかることや、染色液を丁度よく吸い取るのが難しいことが予備実験の時のように染色されなかった要因になるのではないかと推察される。



図 6. ネガティブ染色の様子(グリッド上の余分な染色液を濾紙で吸う)

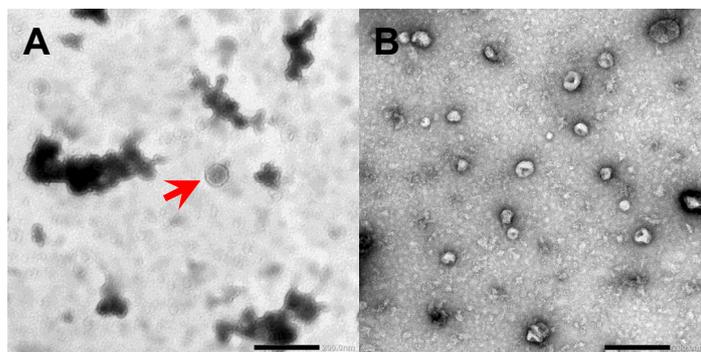


図 7. エクソソームの透過電子顕微鏡画像。 A 実習で撮影(矢印でエクソソームを示す) B 事前の予備実験で撮影。凹みのある小胞がエクソソーム。バー：200 nm

「エクソソーム total RNA の抽出と分析」

このセクションでは、細胞培養液からのエクソソーム抽出における主要工程に用いる超遠心機の使い方と、エクソソームから抽出した RNA の簡易濃度測定、品質確認の手法を学んだ。

超遠心機は超高速回転の遠心分離機であり、微小なものを分画することができる。その代わり、少しでも不適切な使用をすると重大な事故が起きるため、ユーザーへの安全講習を工夫しているとのことであった。気をつけるべき点として、サンプル液量、チューブのシール、サンプルの配置、バケットの本数とミスフックなど、通常の遠心機よりもはるかに細かい注意事項が多数あった。説明では何を怠るとどんな事故になるかが具体的に話され、講習資料には分析機器部門で実際に起きた事故の写真が複数使われていた。説明を受けた後、実際にサンプル（水）をセットし超遠心機にかけ、正しくセットできたかを確認した。

続いて RNA の分析では、まず吸光度計（NanoDrop 2000c, Thermo Fisher Scientific）で RNA 濃度を簡易測定した。サンプルはエクソソーム total RNA（1 サンプル）のほか、培養細胞から抽出した total RNA（2 サンプル）を用いた。RNA は波長 260 nm 付近の光をよく吸収するため、吸光度 A_{260} から濃度を算出することができる。一方タンパク質は 280 nm 付近に吸収のピークがあるため、 A_{260}/A_{280} が核酸の純度の指標となり、RNA では 2.0 付近を高純度とみなす。測定した RNA 濃度は表 1 のようになった。なお、細胞内 total RNA #4 と細胞内 total RNA #5 は同じ細胞種から抽出されており、#4 は細胞数 7.0×10^5 から、#5 は細胞数 3.5×10^5 （#4 と同じ細胞を 2 倍希釈）から抽出されたものである。細胞内 RNA #4 の測定値はばらつきが大きいのが、原因としては融解した RNA 溶液の攪拌が不十分で濃度が不均一であった可能性が考えられる。

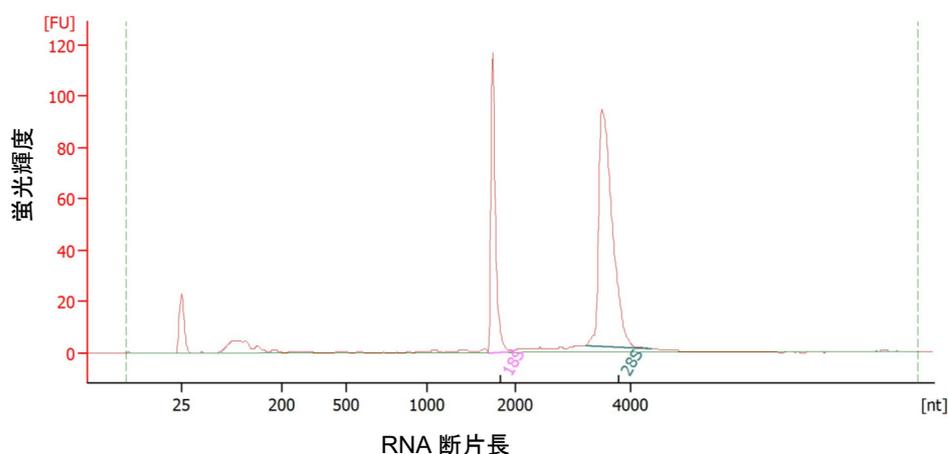
次に、バイオアナライザ（Agilent 2100, Agilent）と測定用キット（Agilent RNA6000 ナノキット, Agilent）で電気泳動を行ない、RNA 断片長の分布を測定した（図 8、細胞内 RNA は #4 のみ示す）。細胞内 RNA は #4、#5 とともに 1800 nt（ヌクレオチド）付近と 3600 nt 付近にシャープなピークが見られた。これは 18S リボソーム RNA と 28S リボソーム RNA と考えられ、一般的に両者の量比が 1:2 に近いほど RNA の分解が少なく、品質が良いとされる。バイオアナライザでは total RNA の品質は RIN というパラメータで表され、数値が 10

に近いほど品質が良く小さいほど悪いとされる。細胞内 RNA #4, #5 とともに RIN=10 であり分解が少ないことが示唆された。一方、エクソソーム RNA の断片長には明確なピークは見られず、数十~4000 nt 程度の幅広い長さの断片が存在していた。これはエクソソームにリボソーム RNA が含まれないことと一致する。エクソソームに含まれるのは mRNA と miRNA であるが、miRNA は 21~25 nt の短い核酸なので今回バイオアナライザで存在が確認できた断片は mRNA であると考えられる。なお、図 8 に見られる 25 nt のピークは補正用に全サンプルに加えるマーカーである。miRNA に相当する長さの RNA が含まれているかどうかは RNA6000 ナノキットでは判別が難しいため、短い断片用の測定キットを使用する必要がある。

表 1. 吸光度計で測定した RNA 濃度

Sample ID	核酸濃度 [ng/μL]	A ₂₆₀	A ₂₈₀	A ₂₆₀ /A ₂₈₀	Sample Type
細胞内 total RNA #4 (1 回目)	336.7	8.417	4.776	1.76	RNA
細胞内 total RNA #4 (2 回目)	262.0	6.549	3.790	1.73	RNA
細胞内 total RNA #5 (1 回目)	223.9	5.598	3.434	1.63	RNA
細胞内 total RNA #5 (2 回目)	239.5	5.988	3.607	1.66	RNA
エクソソーム total RNA	22.4	0.561	0.305	1.84	RNA

A 細胞内 total RNA #4



B エクソソーム total RNA

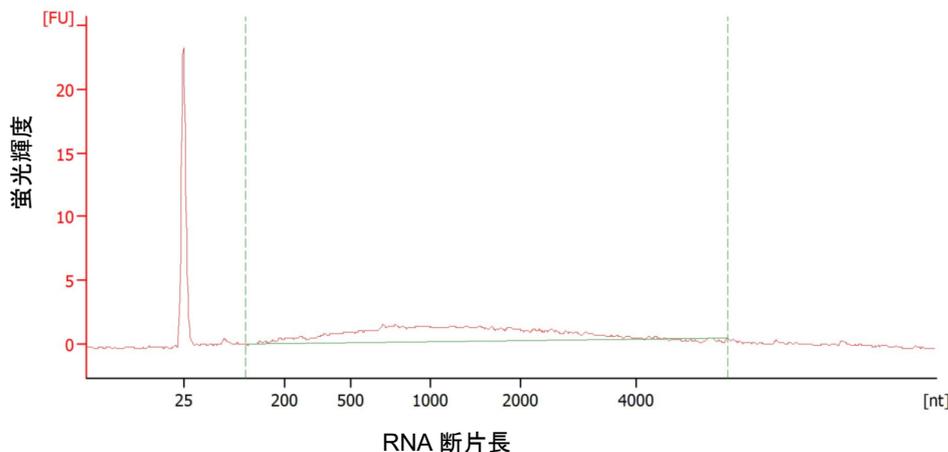


図 8. バイオアナライザ測定結果 (RNA 断片長の分布)。蛍光輝度が RNA 量を表す。

A 細胞内 total RNA #4。 **B** エクソソーム total RNA。

3 まとめ

本研修では、質量分析、セルソーティング、透過電子顕微鏡、遺伝子解析といった幅広い技術について、実際の応用例を体験しながらその原理、実験のキーポイント等を学ぶことで、ライフサイエンス研究のより広い分野に対する理解が深まった。試料作製から自分たちで行なえる機会はあまりないので、貴重な体験ができた。普段生物系の実験に関わっていない参加者にとっては生物試料を扱う実験は新鮮であり特性を実感したのではないかと思う。また、各講師の講義や実習での説明のしかたも大変参考になった。発表者は分析機器部門に所属し共通機器の管理・操作支援等をしているが、自分の担当分野以外の機器・研究に対してもより明確なイメージを持つことができたので、今後これをユーザーサポートの充実に繋げていきたいと感じた。

4 謝辞

本研修を企画し講師を務めてくださった生命情報解析技術グループの田中主任技師、伊藤技師、板倉技師、瀧技師に深く感謝いたします。医学系研究科の日野原特任准教授、紅助教には、基礎的な内容から最先端の研究・技術までわかりやすく講義いただきました。質量分析実習では、伊藤技術補佐員が瀧技師とともに準備と指導をしてくださいました。皆様に厚く御礼申し上げます。

参考文献

- [1] 令和元年度名古屋大学技術職員研修（分析・物質コース） 受講者資料
- [2] 蛍光スペクトルビューアー, Thermo Fisher Scientific, <https://www.thermofisher.com/jp/ja/home/life-science/cell-analysis/labeling-chemistry/fluorescence-spectraviewer.html>
- [3] エクソソーム研究の今と未来：トレンドとプロトコール tips, ベックマン・コールター株式会社パンフレット, 2019年2月