

〔総説〕

「ヒトiPS/ES細胞除去試薬の開発」

舘野 浩章…………… 2

「Claudinの創薬ターゲットとしてのインパクト」

橋本 洋佑、八木 清仁、近藤 昌夫…………… 5

「LC-MS/MSによる実用的な麦汚染主要カビ毒一斉分析法」

中川 博之…………… 8

〈テクニカルレポート〉

「高感度、高精度なキナーゼの新規蛍光HTSアッセイキットの紹介」

成瀬 健…………… 11

〔化学大家〕

「落合 英二」

廣部 雅昭…………… 24

〔製品紹介〕

細胞生物

抗Claudin-1,モノクローナル抗体(3A2/7A5)…………… 7, 14

フルオロスパーク™キナーゼ/ADPマルチアッセイキット …… 12

キタラーゼ…………… 13

コンドロイチン硫酸Aナトリウム,ニワトリ軟骨由来…………… 13

テムシロリムス…………… 13

LPS(リボポリサッカリド)…………… 14

抗マウス5-HT_{1A}受容体,ラットモノクローナル抗体(4A6)、

抗マウス5-HT_{2c}受容体,ラットモノクローナル抗体(6D2)

…………… 15

環境・分析

フザリウムトキシン混合標準液…………… 10

ポジティブリスト関連農薬標準品…………… 22

反応性代謝物検出試薬 XenoScreen™ GSH-EE …… 23

培養

StemSure® hPSC凍結保存溶液, AF…………… 16

ES/iPS細胞研究用低分子化合物溶液…………… 17

rBC2LCN-PE23…………… 4, 18

蛍光標識rBC2LCN…………… 18

rBC2LCNストリッピング溶液…………… 19

有機合成

縮合剤 HATU、HBTU…………… 20

新規フルオロメチル化剤 FMTS…………… 20

Bpin導入試薬ビス(ピナコラート)ジボロン…………… 21

鈴木-宮浦クロスカップリング反応体験キット2…………… 21

遺伝子

トランスフェクション試薬 ScreenFect™ A plus…………… 28

はじめに

ヒト iPS/ES 細胞がもつ腫瘍形成能がヒト iPS/ES 細胞を用いた再生医療の大きな課題となっている。我々はこれまで高密度レクチンアレイを用いて網羅的グライコム解析を行った結果、ヒト iPS/ES 細胞に選択的に反応するレクチン rBC2LCN (別名: AiLecS1) の発見に至っている。今回、この rBC2LCN に緑膿菌由来毒素の触媒ドメイン (PE23) を融合させたレクチン-薬剤複合体 (rBC2LCN-PE23) を開発した。rBC2LCN-PE23 を培養液に添加すると、ヒト iPS/ES 細胞に結合し、細胞内に移行して、ヒト iPS/ES 細胞をほぼ完全に死滅させることができた。しかし、調べた限りでは他の分化した細胞への影響はなかった。そのため、rBC2LCN-PE23 はヒト iPS/ES 細胞から作製した分化細胞に残存するヒト iPS/ES 細胞を除くための試薬として、今後広く活用されることが期待される。

ヒト iPS/ES 細胞を用いた再生医療の大きな課題

ヒト iPS 細胞やヒト ES 細胞は、無限に増殖できる能力 (自己複製能) や、心筋細胞や神経細胞など、あらゆる細胞に分化する能力 (多能性) を持つことから、再生医療のための細胞源として大きな期待が寄せられている。特にヒト iPS 細胞は 4 種の遺伝子を導入するだけで様々な体細胞から作製することができることから、再生医療のみならず、病態モデルや創薬開発などへの応用が期待されている。現在、ヒト iPS/ES 細胞を用いた再生医療を実現化するために多くの研究が進められている。昨年 9 月には、理研のグループにより加齢黄斑変性の治療を目的としたヒト iPS 細胞由来の網膜色素上皮細胞の移植が世界で初めて実施さ

れた。しかしヒト iPS/ES 細胞の臨床応用が現実的になりつつある一方で、安全性における大きな課題が存在しており、それがヒト iPS/ES 細胞の腫瘍化である。マウスにヒト iPS 細胞を移植した場合、僅か数百個でもテラトーマを形成できると報告されている。それ故、ヒト iPS/ES 細胞を用いた再生医療を実現化するためには、残存するヒト iPS/ES 細胞を除くための技術が必要不可欠である。また、それはヒト iPS 細胞由来の分化細胞を用いた病態モデルの構築のためにも重要である。これまでに残存ヒト iPS/ES 細胞を除くための技術として、大きく 2 つ報告されている。1 つが化学阻害剤で死滅させる方法で、もう 1 つが抗体やレクチンを用いてセルソーターで分離する方法である。基本的には、ヒト iPS/ES 細胞は他の分化細胞と同じ代謝活性を有することから、前者を用いた場合には、他の細胞への影響といった選択性の面で課題がある。一方、後者は前もって 1 つ 1 つの細胞に解離してからセルソーターという特殊な装置を用いてヒト iPS/ES 細胞を取り除くため、細胞シートなどへの適用ができない、処理速度が遅い、移植用細胞の生存に悪影響を与える可能性がある、などの課題がある。移植用細胞に残存するヒト iPS/ES 細胞を、安全、确实、かつ簡便に除去できる新たな技術が求められていた。

ヒト iPS/ES 細胞特異的レクチン rBC2LCN の開発の経緯

糖鎖は細胞の最表層を覆い、その構造は細胞の種類や性質に応じて劇的に変化することが知られている。実際に、癌マーカーや幹細胞マーカーの多くが糖鎖であることから、糖鎖が細胞を見分ける際の目印として有効であることが分かる。ヒト iPS/ES 細胞表面ももちろん糖鎖で覆われているものの、その構造はほとんど理解されてい

なかった。こうした中、我々はこれまで細胞表面を高密度に覆う糖鎖を迅速かつ高感度に解析する技術として高密度レクチンマイクロアレイを開発してきた。2007 年に京都大学の山中教授らによりヒト iPS 細胞が樹立された直後に、我々は本レクチンマイクロアレイを活用して、ヒト iPS/ES 細胞表面糖鎖を網羅的に解析した¹⁾。その結果、ヒト iPS/ES 細胞表面糖鎖がどのような構造をしているかということをも明らかにするとともに、レクチン (糖結合タンパク質の総称) の一種である rBC2LCN がヒト iPS/ES 細胞に特異的に結合することを見出した。その後、和光純薬工業との共同研究により、rBC2LCN を用いてヒト iPS/ES 細胞を生きたまま染色できる試薬を開発した (非標識 rBC2LCN レクチン: 2013 年 6 月、rBC2LCN-FITC: 2014 年 3 月、rBC2LCN-635: 2014 年 12 月)²⁾。また、ヒト iPS/ES 細胞への結合機構を解析したところ、rBC2LCN はポドカリキシンという糖タンパク質上の特定の O 型糖鎖である H タイプ 3 に結合することを明らかにした³⁾。さらに、ポドカリキシンがさまざまな種類のヒト iPS/ES 細胞から培養液中にも分泌されているという現象を見だし、これを利用して細胞培養液を用いて移植用細胞に残存するヒト iPS/ES 細胞を簡便に測定する技術を開発してきた⁴⁾。

薬剤融合型 rBC2LCN (rBC2LCN-PE23) を用いたヒト iPS/ES 細胞除去技術の開発

上記したように、rBC2LCN はヒト iPS/ES 細胞に特異的に結合する。面白いことに rBC2LCN は、ヒト iPS/ES 細胞に結合した後に、細胞内に取り込まれることが分かった⁵⁾。この現象を活用すれば、ヒト iPS/ES 細胞内に薬剤を送り込むことができるはずで

ある。そこで、細胞内に取り込まれるとタンパク質合成を阻害して、細胞死を引き起こす緑膿菌由来外毒素を rBC2LCN の C 末端部分に融合させた組換えタンパク質 (rBC2LCN-PE23) を考案した (図 1)。rBC2LCN-PE23 をヒト iPS 細胞 (201B7 株) に 0、6、24 時間反応させた後の顕微鏡写真像を図 2 に示す。生きた細胞を細胞質が緑色蛍光、死んだ細胞を核が赤色蛍光で染色処理して観察した。すると、rBC2LCN-PE23 を培養液に添加していない (0 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 場合は、多くのヒト iPS 細胞は培養皿に接着し、緑色蛍光で染色されたものの、赤色蛍光ではほとんど染色されなかった。つまりほとんどのヒト iPS 細胞が生きていることを示している。一方、10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の rBC2LCN-PE23 を培養液に添加して 6 時間後、明らかに細胞の形態が変化し、赤色蛍光で染色される死んだ細胞の数が増加した。24 時間後にはほとんどの細胞が培養皿への接着能力を失い、培養液中に浮遊した。つまり、ほとんどのヒト iPS 細胞が死んだことを示している。rBC2LCN-PE23 はヒト ES 細胞でも同様の効果を示した。また、ヒト iPS 細胞 (201B7 株) とヒト皮膚線維芽細胞を混合して培養した。10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の rBC2LCN-PE23 の添加前、及び添加 24 時間後の顕微鏡写真像を図 3 に示す。24 時間後はヒト iPS 細胞 (201B7 株) のみが選択的に死滅し、培養液中に浮遊した。一方、ヒト皮膚線維芽細胞の生存や増殖には影響を与えなかった。除去効率を算出したところ、10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の rBC2LCN-PE23 を添加して 24 時間後にはほぼ全てのヒト iPS/ES 細胞を死滅した。一方、ヒト皮膚線維芽細胞やヒト間葉系幹細胞の生存率には全く影響がなかった。

まとめ

今回開発した rBC2LCN-PE23 は以

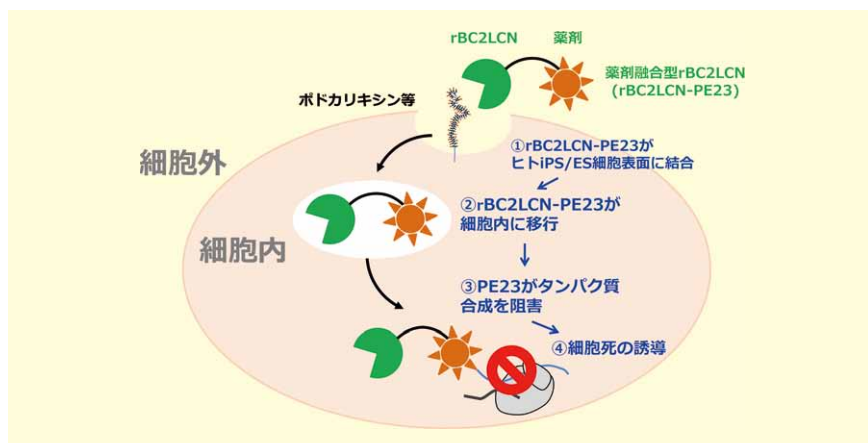


図 1. rBC2LCN-PE23 を用いたヒト iPS/ES 細胞除去機構

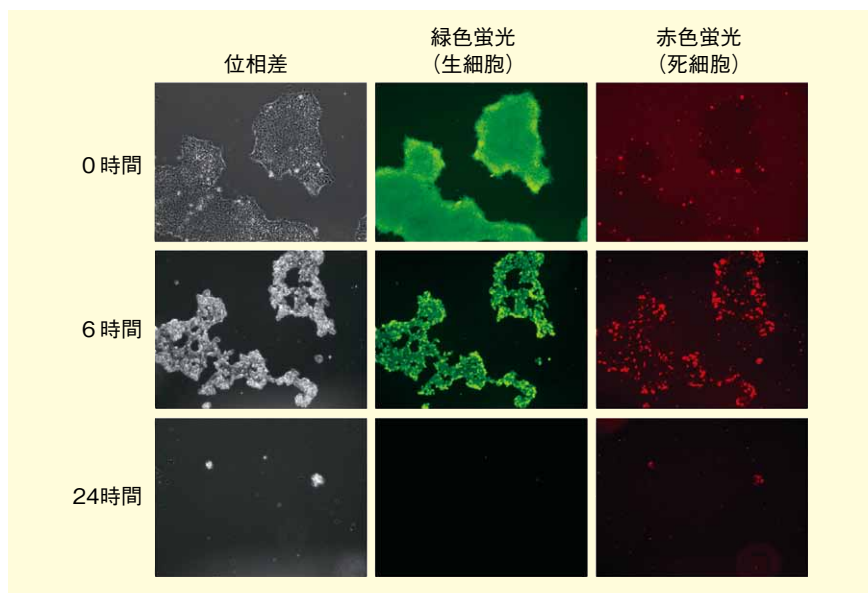


図 2. rBC2LCN-PE23 のヒト iPS 細胞 (201B7 株) 除去の経時的効果
位相差：実際の細胞の形態、緑色蛍光：生細胞が緑色に染色、赤色蛍光：死細胞が赤色に染色

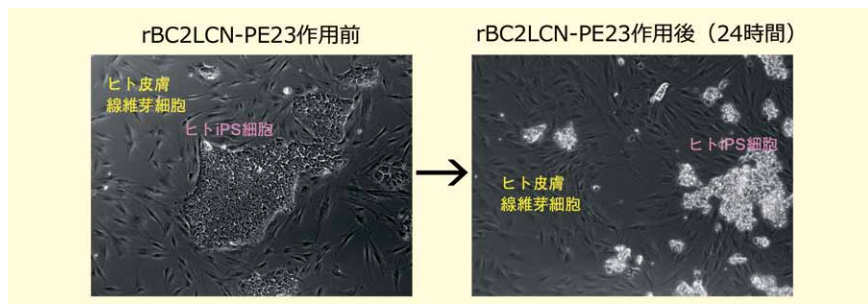


図 3. rBC2LCN-PE23 によるヒト iPS 細胞 (201B7 株) の選択的除去
〈左図〉ヒト皮膚線維芽細胞 (細長い細胞) とヒト iPS 細胞 (201B7 株) を混合培養した顕微鏡写真 (位相差像)。〈右図〉10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の rBC2LCN-PE23 を添加して 24 時間培養後の顕微鏡写真 (位相差像)。ヒト iPS 細胞のコロニーのみが選択的に死滅し、培養液中に浮遊しているのが分かる。

下3つの特徴をもつ。(i) 培養液に添加するだけでヒト iPS/ES 細胞を除去できる。特殊な装置は必要ない。(ii) 大量の細胞や細胞シートへの適用もできる。(iii) 洗浄操作で薬剤融合型レクチンを簡単に除くことができるため、体内に持ち込まれることはない。調べた限り、他の細胞への影響はない。しかし事前に目的の細胞への影響を調べてから使用する必要がある。rBC2LCN-PE23 はまず、未分化なヒト iPS/ES 細胞を除くための一般的な試薬として広く活用されることが期待される。今後は、実際の再生医療に用いる移植用細胞の製造に活用できるよう、その効果や安全性についての検証を進める予定である。

【参考文献】

- 1) Tateno, H., Toyota, M., Saito, S., Onuma, Y., Ito, Y., Hiemori, K., Fukumura, M., Matsushima, A., Nakanishi, M., Ohnuma, K., Akutsu, H., Umezawa, A., Horimoto, K., Hirabayashi, J. and Asashima, M. : *J. Biol. Chem.*, **286**, 20345 (2011).
- 2) Onuma, Y., Tateno, H., Hirabayashi, J., Ito, Y. and Asashima, M. : *Biochem. Biophys. Commun.*, **431**, 524 (2013).
- 3) Tateno, H., Matsushima, A., Hiemori, K., Onuma, Y., Ito, Y., Hasehira, K., Nishimura, K., Ohtaka, M., Takayasu, S., Nakanishi, M., Ikehara, Y., Ohnuma, K., Chan, T., Toyoda, M., Akutsu, H., Umezawa, A., Asashima, M. and Hirabayashi, J. : *Stem Cells Transl. Med.*, **2**, 265 (2013).
- 4) Tateno, H., Onuma, Y., Ito, Y., Hiemori, K., Aiki, Y., Shimizu, M., Higuchi, K., Fukuda, M., Warashina, M., Honda, S., Asashima, M. and Hirabayashi, J. : *Sci. Rep.*, **4**, 4069 (2014).
- 5) Tateno, H., Onuma, Y., Ito, Y., Minoshima, F., Saito, S., Shimizu, M., Aiki, Y., Asashima, M. and Hirabayashi, J. : *Stem Cell Reports*, in press.



レクチン

糖鎖に結合するタンパク質の総称で、ヒトからウイルスまで全ての生物に存在する。1888年にロシアのスティルマークにより、ヒマ種子の抽出液がいろいろな動物の血球を凝集することを発見したのが最初。特定の糖鎖に結合することから、古くから糖鎖解析のための試薬として応用されるほか、細胞間の相互作用を媒介することによりさまざまな生命現象に深く関与する機能を持つ。

レクチンマイクロアレイ

異なる糖結合特異性を持つ複数種のレクチンを同一基板（スライドガラスなど）上に固定化したもので、プロテインマイクロアレイの一種。複数種のレクチンの反応パターンから、サンプル中に存在する糖鎖を迅速、高感度でプロファイリングする技術。精製された糖鎖や糖タンパク質だけでなく、血清、細胞、組織などの生体試料の解析が可能。がん細胞や幹細胞を識別するための指標（マーカー）の探索に有効である。

緑膿菌由来外毒素

細胞内に取り込まれると真核生物のペプチド鎖伸張因子 eEF2 を ADP リボシル化することによりタンパク質合成を阻害して、細胞死を引き起こすタンパク質性の毒素。各種疾患の抗体医薬などにも応用が進んでいる。

Products



未分化ヒト多能性幹細胞除去試薬

rBC2LCN-PE23

本品は、緑膿菌由来外毒素の触媒ドメイン（PE23）を rBC2LCN の C 末端部分に融合させた組換えタンパク質です。rBC2LCN-PE23 は、細胞内に取り込まれ細胞死を引き起こすことで、ヒト ES 細胞・ヒト iPS 細胞を除去します。

特長

- 分化誘導時に残存するヒト ES 細胞・ヒト iPS 細胞を選択的に除去可能
- 培養液に添加するのみで使用可能

コード No.	品名	規格	容量	希望納入価格(円)	
NEW 180-03231	rBC2LCN-PE23	E°	細胞培養用	100 μℓ	30,000
NEW 186-03233				100 μℓ × 5	120,000

☞ 「分化細胞への影響」などのデータを P. 18 の製品紹介に掲載していますのでご参照下さい。

☞ 2 ~ 10℃保存 E° 20℃保存 80℃保存 表示がない場合は室温保存です。その他の略号は、巻末をご参照下さい。掲載内容は、2015年7月時点での情報です。最新情報は、siyaku.com (http://www.siyaku.com/) をご参照下さい。

Claudin の創薬ターゲットとしてのインパクト

大阪大学大学院 薬学研究科 生体機能分子化学分野 橋本 洋佑、八木 清仁、近藤 昌夫

1 はじめに

ドイツの哲学者ヘーゲルは、「事物の螺旋的発展の法則」を提唱している。これは、歴史の発展において、古く懐かしいものが新たな価値観を伴って再び現れてくるという法則である。

さて、上皮は、生体内外を隔てる障壁として機能していること、悪性腫瘍の90%が上皮由来であること、多くの病原性微生物の侵入門戸となっていること、治療満足度の低い炎症性疾患において上皮バリアの破綻が観察されることから、古くから創薬ターゲットとして注目されてきた。実際、創薬研究の歴史を紐解くと、半世紀以上前にEDTAによるヘパリンの粘膜吸収促進効果が見出され、上皮バリア制御による薬物吸収促進の concept が提唱されている¹⁾。

しかしながら、上皮バリアの生物学の発展遅延とも一部相俟って、有効性および安全性を兼ね備えた創薬戦略の構築は立ち遅れていた。

拙稿では、本邦における上皮バリアの生物学の進展に伴う、創薬研究の螺旋的発展の一端をご紹介します、当該研究領域の今後について俯瞰したい。

2 上皮バリアを標的とした創薬研究のはじまり

生物は、単細胞生物から多細胞生物に進化する過程において、生体内外・組織内外を隔てる障壁として上皮細胞を発達させてきた。当然のことながら、上皮は薬物の吸収障壁となることから、古くから上皮バリア制御による薬物吸収促進戦略が提唱されている¹⁾。上皮は障壁機能を発揮するために、隣接する細胞の隙間を密着結合（タイトジャンクション：TJ）によってシールすることで上皮細胞シートからの物質の漏れを防いでいるものの、当時はTJの存在は知られておらず上皮バリア

制御機構については未解明であった¹⁾。1963年にTJが同定されるとEDTA処理によってTJシールが開閉することが示され、TJシール制御による薬物吸収促進の concept が提唱され、多くの創薬研究者がTJシール制御による吸収促進法の開発に参入していった^{2,3)}。振り返ると、このEDTAによる薬物吸収促進研究が上皮バリアを標的とした創薬の螺旋的発展の始まりであった。

3 上皮バリアの分子基盤の解明

TJシール制御による concept が提唱されると、中鎖脂肪酸、ポリカチオンなどが吸収促進剤として開発され、既にカプリン酸ナトリウムなどがペプチド医薬などの経口吸収促進剤として臨床研究の段階に進んでいる⁴⁾。しかしながら、これらの吸収促進剤はTJシールを破壊（disruption）もしくは押し広げる（opening）ものであり、食物未消化物、大腸菌の代謝産物などの流入による安全性が懸念されており、現在に至ってもなお、これらの課題を克服する技術は開発されていない。

これらの背景のもと、1990年代に入ると糖やペプチドなどの吸収を担っているトランスポーターを利用した細胞内経路を介した薬物吸収促進研究が勃興し、マイクロドージング試験などに結実していった。

1982年にTJシールの本体が脂質ミセルである可能性が提起されたものの⁵⁾、1993年に京大月田承一郎先生のグループによりTJシールに4回膜タンパク質occludinが含まれていることが見出され、TJシールが膜タンパク質によって構成されていることがはじめて実証された⁶⁾。Occludinの細胞外領域の合成ペプチドを添加することでTJシールが弱くなり物質の透過が生じたことから、TJシール構

成タンパク質を標的とした薬物吸収促進の concept が提唱された⁷⁾。しかしながら、occludinを欠損させてもTJシールが構築されたことから、“真のTJシール構成分子”の同定が進められ、ついに1998年、京大古瀬幹夫先生、月田承一郎先生によって、上皮を標的とした創薬研究の螺旋的発展を巻き起こすことになる“claudin”が発見された⁸⁾（表1、図1）。

Claudinは分子量が23 kDa程度の小さな4回膜貫通タンパク質であり、27種類のメンバーからなるファミリーを構成しており、発現およびバリア機能は組織特異的である（図1）。例えば、claudin-1を欠損したマウスでは皮膚の重層上皮バリア、claudin-5欠損マウスでは血液脳関門バリアで分子量数百程度の小分子のみ通過できるゲートが開いていた^{9,10)}。後にこれらの知見は、claudinを標的とすることで、従来の「TJシール全体を壊し、押し広げる」から「TJシールを局所的に制御し、ゲートを開ける」へと、吸収促進戦略のパラダイムシフトの誘因となった。

これまでに、claudin-3と-4に結合する分子は可逆的に上皮バリアを弱め、カプリン酸ナトリウムに比して400倍もの吸収促進活性を有し、注射剤として臨床応用されている副甲状腺ホルモンの経口・経鼻・経肺投与化に

表1. 上皮細胞バリアの生物学の進展

年代	上皮細胞バリアに関する発見
1963	TJの発見
1973	TJストランドの発見
1982	TJの脂質ミセル説が提唱
1993	Occludinの発見（日本発）
1998	Claudinの発見（日本発）
1999-	ClaudinのTJバリア機能が証明（日本発）
2005	Tricellulinの発見（日本発）
2011	細胞間隙経路および細胞内経路の共役物質輸送にclaudinが関与（日本発）
2014	Claudinの立体構造解明（日本発）

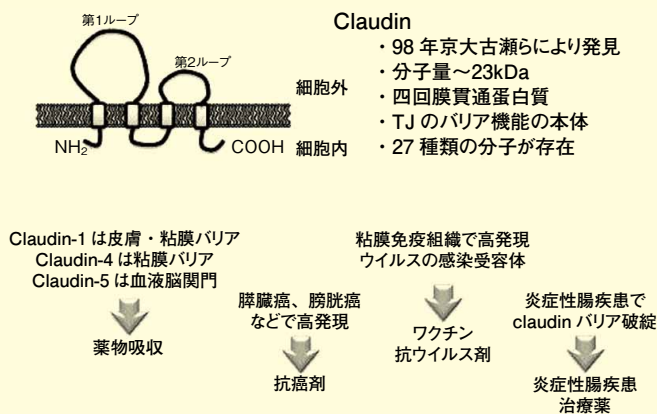


図1. Claudin を標的とした創薬の可能性

資することが証明されている¹¹⁻¹³⁾。さらに、本 claudin binder の claudin 結合域を変えることで吸収促進活性を制御できたことから、薬物の物性および投与部位に適した claudin 結合分子を開発することで、安全性と有効性を兼ね備えた、患者に優しい投与技術の開発に繋がるものと期待されている^{14,15)}。

4 Claudin 発見の創薬インパクト

Claudin 発見のインパクトは、粘膜吸収促進に留まらず、創薬研究全般に波及している。これまでに、ヒトでは膵癌、肝癌、乳癌など15種類以上の癌で claudin 発現異常が観察されること、粘膜免疫組織を覆う上皮細胞層で claudin-4 が高発現していること、claudin-1 がC型肝炎ウイルス (HCV) の感染受容体の1つとなっていること、アトピー性皮膚炎の患者において claudin-1 の発現低下が観察されること、神経周膜バリアでは claudin-1 が TJ シールを担っていることなどが見出され、上皮を標的とした創薬ターゲットとして claudin が衆目を集めつつある¹⁶⁻²⁰⁾ (図1)。

既に2001年には、claudin-3/4 指向性毒素を用いて claudin を標的とした癌治療戦略が提唱されていた²¹⁾ 当然のことながら、膜タンパク質を標的と

した癌治療戦略の基本戦略は抗体作製にあるものの、claudin は細胞外領域が約50アミノ酸、約15アミノ酸しかないうえにヒト・マウス・ラット間で相同性が高く、細胞外領域認識抗体の作製は立ち遅れていた。最近、当グループを含めて2つのグループで claudin-3/4 抗体が創出され、ヒト癌移植モデルにおいて副作用を伴うことなく抗腫瘍活性を発揮することが示された^{22,23)}。Claudin 結合分子は、腫瘍組織への抗癌剤浸透性を高める作用もあることから、癌化学療法との併用剤としての応用も期待されている²⁴⁾。

さて、現在世界では年間2000万余の人々が感染症により命を落としており、依然として感染症対策は世界的課題となっている。粘膜ワクチンは感染症対策の切り札として期待されているものの、単に抗原を粘膜面に投与しても免疫賦活化作用は惹起されず、粘膜上に存在している免疫組織に抗原を効率的に送達する技術の開発が粘膜ワクチン開発における重要課題の1つとなっている²⁵⁾。粘膜免疫組織を覆う上皮細胞には claudin-4 が高発現しており、claudin 指向性分子と抗原の融合タンパク質を経鼻免疫することで、血中・鼻粘膜・腸管粘膜において抗原特異的抗体価が上昇することから、claudin を標的とした粘膜ワクチン開発の concept も提唱されている²⁶⁾。

また、依然として世界には2億人もの HCV 感染者がおり、その数は毎年300万人ずつ増加している。エイズウイルスの感染者が3000万人であることを踏まえると、C型肝炎が非常に大きな public impact を有していることがみてとれる。HCV 感染は高率に慢性化し肝硬変を経て肝癌に至ること (我が国では肝癌患者の80%がC型肝炎由来)、肝癌患者に対する肝移植では移植肝に対する再感染が不可避であること、患者体内では高頻度で変異ウイルスが産生されていることが臨床問題となっている。C型肝炎治療薬は、ウイルス因子を標的とする薬剤と宿主因子を標的とする薬剤に大別されるが、既存薬はウイルス因子に直接作用する薬剤が大半を占めており、宿主因子とりわけ感染受容体を標的とした感染阻害剤は未だ皆無に等しい。

最近当グループは、感染受容体の1つが claudin-1 であることに着目²⁷⁾、claudin-1 の細胞外領域認識抗体を作製し、本抗体がヒト肝キメラマウスを用いた感染モデルに対して顕著な感染阻害活性を有すること、ヒト肝機能への副作用が生じないことを見出し、claudin-1 を標的とすることで有効かつ安全な感染阻害法を創出できることをはじめに見出した^{28,29)}。C型肝炎ウイルスの感染機構については未だ不明な点も多く、本抗体は基礎・臨床両面から肝炎治療に寄与すると期待される。

5 今後の展望

上述したように、claudin の発見に端を発した創薬研究の進展には目覚ましいものがあり、claudin を標的とした創薬応用は枚挙に暇がない。最後に、claudin を標的とした創薬研究の展望について触れ、拙稿をとじたい。

カプリン酸に代表される吸収促進剤は、TJ シールの破壊に伴う薬物以外の異物の流入が懸念されている⁴⁾。当然のことながら、claudin を標的とし

た吸収促進技術でも、これらの課題克服が実用化の成否を握ることになる。Claudin シール制御の安全性については、これまでに血液脳関門バリアを担う claudin-5 について知見が集積している。例えば、claudin-5 欠損マウスでは、脳内への小分子の透過が観察されるものの血液脳関門の TJ シールに形態異常が観察されないこと、siRNA により一過的に血液脳関門の claudin-5 を低下させ小分子の脳内移行が 48 時間以上観察される条件下でもマウスに異常が観察されなかったことから、少なくとも claudin-5 阻害によって血液脳関門が破壊されるようなことはなく、TJ シールに含まれている claudin-5 が形成するゲートを介して可逆的に物質が透過していると推察される^{10,30)}。Claudin は 27 種類存在するメンバーの組合せによって、ラテラル面において多種多様な claudin strand を構築していること、向かい合う claudin strand が対合することで TJ シールを形成していることから、claudin が形成する多種多様なゲートを自由自在に制御することができれば、目的とする場所に目的とする薬剤を吸収・送達することが可能になるかもしれない¹⁴⁾。

上記に加え、これまでに claudin を標的とした再生医療、炎症性腸疾患治療、末梢神経 DDS、外傷性脳損傷治療、抗肥満薬開発の可能性も提起されており、創薬イノベーションの起爆剤としての claudin の凄まじい破壊力が

顕在化しつつある。周知のように、創薬ではターゲット分子の構造情報が大きな意義を持つものの、1998 年の発見以降立体構造の解析は大きく立ち遅れてきた。2014 年 4 月に名大藤吉好則先生のグループ・阪大月田早智子先生のグループによって claudin の立体構造がはじめて解かれ³¹⁾、drug design による druggable claudin binder の創出研究が今まさに拓かれつつあり、本邦の上皮細胞生物学の土壌に育まれた本邦発の創薬イノベーションに向けて、上皮を標的とした創薬研究が螺旋階段を再び上りはじめたように見える。

6 謝 辞

本稿に記載された研究内容の一部は、厚生労働科学研究費補助金創薬基盤推進研究事業、文部科学省科学研究費補助金 (24390042)、文部科学省創薬等支援技術基盤プラットフォーム事業、公益財団法人武田科学振興財団、国立研究開発法人科学技術振興機構研究成果最適展開支援プログラムのご支援により実施されたものである。

【参考文献】

- 1) Windsor, E. and Cronheim, G. E. : *Nature*, **190**, 263 (1961).
- 2) Cassidy, M. M. and Tidball, C. S. : *J. Cell Biol.*, **32**, 685 (1967).
- 3) Aungst, B. J. : *J. Pharm. Sci.*, **89**, 429 (2000).
- 4) Choonara, B. F. *et al.* : *Biotechnol. Adv.*, **32**, 1269 (2014).
- 5) Kachar, B. and Reese, T. S. : *Nature*, **296**, 464 (1982).
- 6) Furuse, M. *et al.* : *J. Cell Biol.*, **123**, 1777 (1993).
- 7) Wong, V. and Gumbiner, B. M. : *J. Cell Biol.*, **136**, 399 (1997).
- 8) Furuse, M. *et al.* : *J. Cell Biol.*, **141**, 1539 (1998).
- 9) Furuse, M. *et al.* : *J. Cell Biol.*, **156**, 1099 (2002).
- 10) Nitta, T. *et al.* : *J. Cell Biol.*, **161**, 653 (2003).
- 11) Sonoda, N. *et al.* : *J. Cell Biol.*, **147**, 195 (1999).
- 12) Kondoh, M. *et al.* : *Mol. Pharmacol.*, **67**, 749 (2005).
- 13) Uchida, H. *et al.* : *Biochem. Pharmacol.*, **79**, 1437 (2010).
- 14) Furuse, M. and Tsukita, S. : *Trends Cell Biol.*, **16**, 181 (2006).
- 15) Takahashi, A. *et al.* : *Biomaterials*, **33**, 3464 (2012).
- 16) Schulzke, J. D. *et al.* : *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **1165**, 294 (2009).
- 17) Evans, M. J. *et al.* : *Nature*, **446**, 801 (2007).
- 18) Morin, P. J. : *Cancer Res.*, **65**, 9603 (2005).
- 19) Tamagawa, H. *et al.* : *Lab. Invest.*, **83**, 1045 (2003).
- 20) Hackel, D. *et al.* : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **109**, E2018 (2012).
- 21) Michl, P. *et al.* : *Gastroenterology*, **121**, 678 (2001).
- 22) Li, X. *et al.* : *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **351**, 206 (2014).
- 23) Suzuki, M. *et al.* : *Cancer Sci.*, **100**, 1623 (2009).
- 24) Kominsky, S. L. : *Expert Rev. Mol. Med.*, **8**, 1 (2006).
- 25) Neutra, M. R. and Kozlowski, P. A. : *Nat. Rev. Immunol.*, **6**, 148 (2006).
- 26) Kakutani, H. *et al.* : *Biomaterials*, **31**, 5463 (2010).
- 27) Evans, M. J. *et al.* : *Nature*, **446**, 801 (2007).
- 28) Fukasawa, M. *et al.* : *J. Virol.*, **89**, 4866 (2015).
- 29) Iida, M. *et al.* : *FASEB J.*, **28**, 1062.9 (2014).
- 30) Campbell, M. *et al.* : *J. Gene Med.*, **10**, 930 (2008).
- 31) Suzuki, H. *et al.* : *Science*, **344**, 304 (2014).

Products



C型肝炎ウイルス感染阻害抗体

抗 Claudin-1, モノクローナル抗体

コード No.	品 名	規 格	容 量	希望納入価格(円)
NEW 016-26081	Anti Claudin-1, Monoclonal Antibody (3A2)	免疫化学用	100 μ l	40,000
NEW 013-26091	Anti Claudin-1, Monoclonal Antibody (7A5)	免疫化学用	100 μ l	40,000

※本品の性能やデータはP. 14の製品紹介に掲載していますので、ご参照下さい。

2 ~ 10°C 保存 20°C 保存 80°C 保存 表示がない場合は室温保存です。その他の略号は、巻末をご参照下さい。
掲載内容は、2015年7月時点での情報です。最新情報は、siyaku.com (<http://www.siyaku.com/>) をご参照下さい。

1 はじめに

麦類赤かび病 (図1) は植物病原菌として知られる *Fusarium* 属菌によって引き起こされる麦類の重要病害である¹⁾。感染した穀粒は小麦の場合、白変から桃色を呈してしわ粒になる (図2)。温帯地域に位置するわが国では麦の生育期に降雨が多いため、赤かび病が発生しやすい。また、*Fusarium* 属菌の一部はカビ毒 (マイコトキシンともいう) を産生することが知られている。本稿では、著者らが確立した高速液体クロマトグラフィー-タンデム型質量分析法 (LC-MS/MS) による麦汚染主要カビ毒の一斉分析法を紹介する。



図1. 赤かび病菌に感染した小麦



図2. 小麦の健全粒 (左) と赤かび病被害粒 (右)

2 麦汚染主要カビ毒

麦を汚染するカビ毒としては、トリコテセン系カビ毒と呼ばれる一連の化合物 (構造によりタイプA、タイプBに分類される) やゼアラレノン (ZEN) がその代表例としてあげられる (図3)。中でもタイプBトリコテセンであるデオキシニバレノール (DON, 図3) は世界各地で汚染が発生することから、多くの国で基準値が設定されている²⁾。わが国を含むアジアでは、もう1つのタイプBトリコテセンであるニバレノール (NIV, 図3) による汚染がDONとともに報告される例が多いことから重視されている³⁾。国内では2002年に小麦中のDONについて1.1 mg/kgの暫定基準値が設定された³⁾。2008年には汚染低減のための指針が策定され⁴⁾、麦類におけるDON, NIV汚染低減への取り組みがなされている。ZENに関しては家畜飼料についてのみ1 mg/kgの暫定許容値が設定されている³⁾。一方、欧州連合 (EU) は、タイプBトリコテセンやZENの基準値に加えて、タイプAトリコテセンであるT-2ト

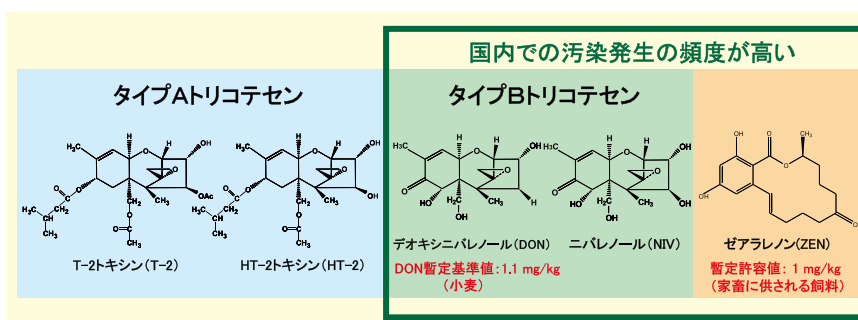


図3. 麦を汚染する主要カビ毒

キシニン (T-2) 及びHT-2 トキシニン (HT-2) の含量についても食品及び飼料の指標値を定めている⁵⁾。このような背景からLC-MS/MSによるDON, NIV, ZEN, T-2, HT-2の一斉分析法の確立を試みた。

3 本手法の特徴 (内部標準物質の使用)

LC-MS/MSによるカビ毒分析においては、農作物や食品から溶媒による抽出操作を行う際の抽出効率のばらつきや、イオンソース部における夾雑成分によるイオン化への影響 (マトリックス効果) がしばしば問題視される⁶⁾。本手法では内部標準物質を使用することで適切な補正を行い、これらの変動要因の影響を低減することを試みた⁷⁾。内部標準物質となる化合物は構造や物理化学的挙動が目的化合物と類似していることが望ましい。このため、トリコテセン系カビ毒 (DON, NIV, T-2, HT-2) にはベルカロール (VEL), ZENにはゼアララノン (ZAN) (図

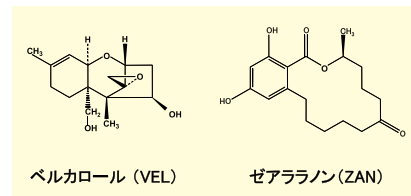


図4. 内部標準物質とその構造

4) を内部標準物質として使用した。

4 分析手順と結果

各種カビ毒を添加した麦粉末試料10 g (小麦、大麦) に内部標準物質を添加し、12時間以上冷凍又は冷蔵条件下で保存した。室温に戻した後、アセトニトリル/水混合液 (80/20, v/v) 40 mL、酢酸0.4 mLを逐次添加してホモジナイザーを用いて抽出を行った。抽出後、遠心分離 (3,000×g, 10 min) により得られた上清をPresep® C18逆相固相抽出カラム (和光純薬製コードNo. 296-34091, 299-35061)、カビ毒精製用多機能カラムに順番に供して精製を行った。多機能カラムからの最初の流出液3 mLを廃棄した後、続

表1. 検量線用カビ毒混合液の組成

Bottle No.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
NIV ($\mu\text{g/L}^{-1}$)	1	2.5	5	10	25	50	100	250	500	1000	1500
DON ($\mu\text{g/L}^{-1}$)	1	2.5	5	10	25	50	100	250	500	1000	1500
T-2 ($\mu\text{g/L}^{-1}$)	0.2	0.5	1	2	5	10	20	50	100	200	300
HT-2 ($\mu\text{g/L}^{-1}$)	0.2	0.5	1	2	5	10	20	50	100	200	300
ZEN ($\mu\text{g/L}^{-1}$)	1	2.5	5	10	25	50	100	250	500	1000	1500
VEL (internal standard) ($\mu\text{g/L}^{-1}$)	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
ZAN (internal standard) ($\mu\text{g/L}^{-1}$)	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50

All solutions were prepared in acetonitrile/water/acetic acid (5/94/1, v/v/v).

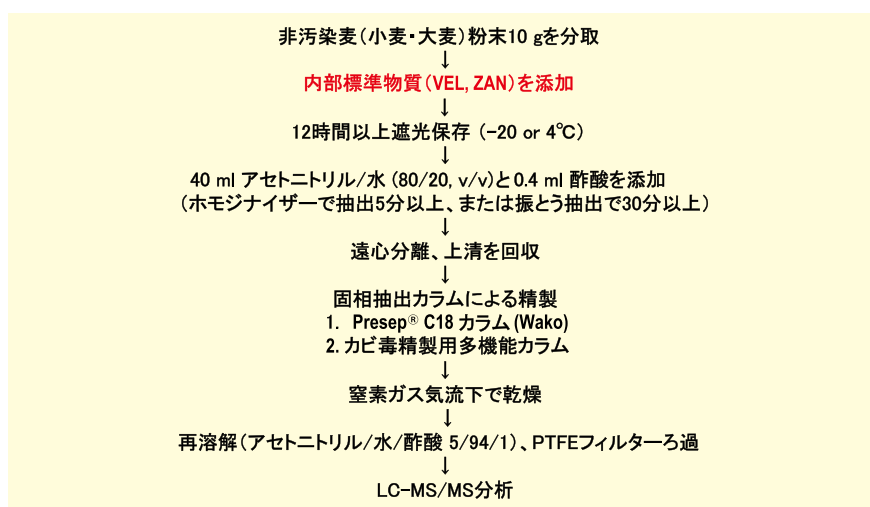


図5. 麦汚染主要カビ毒一斉分析法のプロトコール

いて流出する溶液約 2 mL より 1.6 mL を分取し、窒素ガス気流下で濃縮・溶媒除去を行った。この残留物をアセトニトリル/水/酢酸混合液 (5/94/1, v/v/v) 0.4 mL に溶解し、親水性 PTFE シリンジフィルター (ポアサイズ 0.20 μm) で濾過した試料について、LC-MS/MS による一斉分析を行った。図5に一連の手順の概略を示す。LC装置の移動相はA液 (0.1% (v/v) 酢酸含有 0.5 mM 酢酸アンモニウム水溶液) と B液 (0.1% (v/v) 酢酸含有アセトニトリル) を混合して用いた。カビ毒の分離には C18 逆相カラム (ϕ 3.0 mm \times 250 mm) を使い、カラム温度 40°C、流速 0.30 mL/min で A-B 液の直線濃度勾配を利用して目的化合物を保持・溶出させた。質量分析装置のイオンソースには大気圧エレクトロスプレーイオン化 (ESI) インターフェースを使用し、多成分反応

モニタリング (MRM) モードで一斉分析を行った。各種カビ毒の定量分析に用いた検量線用カビ毒混合液の組成を表1に示す。

分析結果の一例として、DON (40 $\mu\text{g/kg}$), NIV (40 $\mu\text{g/kg}$), T-2 (8 $\mu\text{g/kg}$), HT-2 (8 $\mu\text{g/kg}$), ZEN (8 $\mu\text{g/kg}$) を添加した小麦粉末を分析した際の LC-MS/MS クロマトグラムを示す (図6)。DON, NIV, ZEN は負イオン化条件、T-2, HT-2 は正イオン化条件でそれぞれ良好に検出された。いずれのカビ毒も試験溶液の注入後 20 分以内にピークが確認され、LCカラムの平衡化時間も含めると 1 分析当たり 30 分程度で連続分析が可能であった⁷⁾。

5 分析法の妥当性確認 (室間共同試験)

開発された分析法が実用的であるか

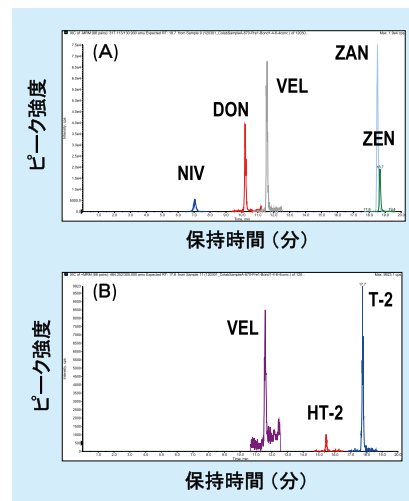


図6. カビ毒添加小麦の LC-MS/MS クロマトグラム (A: 負イオン化条件、B: 正イオン化条件)

否かを判断するためには、室間共同試験による妥当性確認を行うことが必要である。そこで、本手法について AOAC インターナショナルの「試験室間共同試験のガイドライン」⁸⁾ を参照して妥当性確認を実施した⁷⁾。12 試験室に本手法を提供し、カビ毒添加小麦粉末 (小麦・大麦) を用いた添加回収試験を行った (小麦および大麦の試験試料は (財) 食品薬品安全センター 秦野研究所にて調製した)。外れ値検定を行った後の有効なデータから、併行相対標準偏差 (RSD_r) と室間再現相対標準偏差 (RSD_R) を算出し、その値から HorRat (Horwitz ratio) 値を評価した。HorRat < 2 であれば、分析値の室間再現精度は許容範囲内とみなされる。例として、DON に関する室間共同試験の結果を示す (表2)。全ての条件 (3 濃度レベル、小麦・大麦) で HorRat < 2 が確認された。従って、小麦および大麦に含まれる 40 ~ 1,000 $\mu\text{g/kg}$ 濃度レベルの DON 分析において本手法の妥当性が確認された。同様な手順により、小麦および大麦に含まれる NIV (40 ~ 1,000 $\mu\text{g/kg}$ 濃度レベル), T-2 (8 ~ 200 $\mu\text{g/kg}$ 濃度レベル), HT-2 (8 ~ 200 $\mu\text{g/kg}$ 濃

度レベル), ZEN (8~1,000 μg/kg 濃度レベル) のそれぞれについて本手法の妥当性が確認された⁷⁾。また、自然汚染試料として配付した T-2 含有小麦試料 (メーカーによる付与値 111.2 μg/kg) についても HorRat < 2 が確認された⁷⁾。従って、本手法は添加回収試験だけではなく自然汚染試料の分析にも有効であることが確認された⁷⁾。

6 おわりに

LC-MS/MS によるカビ毒の一斉分析についてはこれまで多くの手法が報告されている⁶⁾。しかしながら麦汚染主要カビ毒 5 種 (DON, NIV, T-2, HT-2, ZEN) を一斉分析可能で、空間共同試験によるフルバリデーションレベル (有効試験室数 8 以上) で妥当性が確認された分析法は従来報告されておらず、本手法が国内外を通じて最初の例である。本手法は内部標準物質による補正を取り入れており、小麦と大麦の両者を分析対象にできることから、国産麦の主要カビ毒汚染を調査する上でも実用的な手法であるといえる。

【参考文献】

1) 赤かび病研究チーム HP : http://www.naro.affrc.go.jp/org/karc/second_term%20team/Fusarium/index.html (2015 年 4 月 10

表 2. 空間共同試験の結果 (DON)

DON の試験結果

Laboratory	Spiked wheat (μg/kg)						Spiked barley (μg/kg)					
	40		100		1000		40		100		1000	
A	37.7	38.1	99.3	107.5	1075.6	1027.2	40.1	42.8	104.8	99.7	1105.5	982.4
B	35.1	35.5	93.9	92.8	922	850.8	41.7	42.2	100.4	104.9	1026.6	1049.2
C	28.8	25.4	75.9	70	745.1	792.6	30.9	30.1	65.6	87.1	818.9	813.1
D	30.4	34.8	69	71.4	705	817	30.6	44.8	110	94.2	924	840
E	36	35.2	93.6	92	1115.2	1127.4	38.7	37.6	103	96.7	1118.3	1064
F	45.9	48	102.9	101.3	917.9	928.7	47.3	43.6	95.1	83.2	922.2	950.7
G	38.8	42.6	88.2	67.4	819.9	820.6	45.2	43.9	108.4	124.5	968.9	693.1
H	32.1	33.6	103.4	107.5	966.3	911.7	32.1	40.4	83.6	75.3	915.9	1073.3
I	58.1	45.4	119	113.4	998.2	1172.2	88.8	58.5	146.3	122.5	993.2	1095.6
J	39.9	51.9	109.1	123	1120.9	1160.4	143.7	106.4	184.5	181.7	1180.9	1230.5
K	31.5	35	84.5	85	911	923	34.5	39.5	79.5	84.5	988	803
L	30.4	28.2	70.9	76.3	1151.6	948.4	42.8	38	69.3	88.5	1180.6	1204.7
Mean (μg/kg)	37.4		92.4		955.4		39.3		96.7		997.6	
Mean recovery (%)	93.5		92.4		95.5		98.3		96.7		99.8	
Outlier (Cochran parameters)	0		0		0		1		0		0	
Outlier (single Grubbs parameters)	0		0		0		1		1		0	
Outlier (paired Grubbs parameters)	0		0		0		0		0		0	
Repeatability relative SD (RSD _r , %)	10.6		6.3		6.7		10.6		10.4		8.6	
Reproducibility relative SD (RSD _R , %)	21.4		18.4		14.7		13.4		20		14.3	
HorRat	1.0		0.8		0.9		0.6		0.9		<2	

(太文字は外れ値)

$$\text{HorRat} = \text{RSD}_R / \text{PRSD}_R$$

HorRat < 2 であれば、空間再現性有

日アクセス)

- Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO): "Worldwide Regulations for Mycotoxins in Food and Feed in 2003", Food and Agriculture org. (2004). Available online: <http://www.fao.org/docrep/007/y5499e/y5499e00.htm> (accessed on 10 April 2015).
- いろいろなカビ毒 (農林水産省 HP): http://www.maff.go.jp/j/syouan/seisaku/risk_analysis/priority/kabidoku/kabi_iroiro.html (2015 年 4 月 10 日アクセス)
- 麦類のアオキシニバレノール・ニバレノール汚染低減のための指針の策定・普及について (農林水産省 HP): http://www.maff.go.jp/j/syouan/seisaku/risk_analysis/priority/kabidoku/

pdf/sisin_tuti.pdf (2015 年 4 月 10 日アクセス)

- Commission Recommendation 2013/165/EU : <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2013:091:0012:0015:EN:PDF> (accessed on 18 June 2015)
- 中川博之ら:「食品工業におけるカビ汚染対策 (食品工業 NEO)」, p. 95 (光琳) (2010).
- Nakagawa, H. et al : *J. Anal. Bioanal. Tech.* S6, doi : 10.4172/2155-9872.S6-002 (2014).
- AOAC international Appendix D : "Guidelines for collaborative study procedures to validate characteristics of a method of analysis", Official methods of analysis of AOAC international. 18 ed (2005).

フザリウムトキシン混合標準液

フザリウムトキシン 5 種の混合標準液です。



コード No.	品名	規格	容量	希望納入価格 (円)
068-06401	Fusarium Toxins Mixture Standard Solution (Acetonitrile Solution) [E°][調][H][調][調][調]	マイコトキシン試験用	1mℓ×5A	40,000

成分: デオキシニバレノール、ニバレノール、ゼアラレノン各 25 μg/mℓ、T-2 トキシン、HT-2 トキシン各 5 μg/mℓ

内部標準物質

コード No.	品名	規格	容量	希望納入価格 (円)
225-02231	Verrucarol Standard [E°][調][調]	マイコトキシン試験用	5mg	60,000
264-02141	Zearalanone Standard [E°]	マイコトキシン試験用	5mg	34,000

[調][調]: 生物・毒素兵器の製造、使用防止のため「毒素等」を試験研究用に使用することを認める証が必要です。

詳細は下記よりご参照下さい。

当社 HP → カテゴリから選ぶ → 分析・環境 → 食品分析 → 05. マイコトキシン → フザリウムトキシン混合標準液

<http://www.wako-chem.co.jp/siyaku/product/analysis/Fusarium/index.htm>

[E°]…2~10℃保存 [E°]…20℃保存 [E°]…80℃保存 表示がない場合は室温保存です。その他の略号は、巻末をご参照下さい。掲載内容は、2015 年 7 月時点での情報です。最新情報は、siyaku.com (<http://www.siyaku.com/>) をご参照下さい。

高感度、高精度なキナーゼの新規蛍光 HTS アッセイキットの紹介

和光純薬工業株式会社 ライフサイエンス研究所 成瀬 健

はじめに

タンパク質のりん酸化修飾は、プロテインキナーゼと呼ばれる酵素群によって触媒される。プロテインキナーゼは ATP のりん酸基を基質タンパク質に転移する反応を触媒する酵素であり、ヒトでは 500 種類以上のプロテインキナーゼが存在する。プロテインキナーゼの発現や機能に異常が生じると細胞内タンパク質のりん酸化レベルの制御不全が引き起こされ、悪性腫瘍などの疾患の発生につながる。そのため、プロテインキナーゼを標的とした医薬品の開発が盛んに進められている。

低分子医薬品の研究開発工程には、膨大な化合物から成る化合物ライブラリーから、標的のキナーゼのみを特異的に阻害する化合物を選別するハイスループットスクリーニング (HTS) とよばれる工程がある。HTS に適用可能なキナーゼ活性測定キットは各社から販売されており、測定原理として、ATP の減少量を測定する方法、ADP の生成量を測定する方法、基質ペプチドのりん酸化量を測定する方法の 3 種類に大別される。その中でも、ADP の生成量を測定する方法は感度が優れており、あらゆる種類のキナーゼを測定することができるため、広く利用されている。

今回当社では、東京大学創薬機構と共同して、新規の酵素カップリング反応を利用したキナーゼ活性測定試薬、Fluorospark™ Kinase/ADP Multi-Assay Kit を開発した¹⁾。本キットは、キナーゼ反応で生じた ADP を蛍光測定により定量することで、高感度、高精度かつ低コストにキナーゼ活性を測定することができる。さらに、キナーゼ活性を経時的に測定するリアルタイムアッセイにも対応しており、基礎研究から HTS まで幅広く適用できるアッセイキットとなっている。本稿では、新規キナーゼアッセイキットの特長と使用例について紹介する。

Fluorospark™ Kinase/ADP Multi-Assay Kit の特長と使用例

本試薬は、キナーゼ反応の生成物である ADP を酵素カップリング反応により蛍光物質レゾルフィンに変換することを特長とする (図 1)。そのため、レゾルフィンの蛍光を測定することでキナーゼ反応液中の ADP を定量し、それによりキナーゼ活性を評価することができる。

本アッセイキットによる測定は、検出液をキナーゼ反応液に添加するだけの簡便なワンステップ操作で完了する。最初にキットに付属の 4 液 (基質

液、酵素液、レサズリン液、還元剤ブロッカー) を使用前に混合して検出液を用時調製し、次に検出液をキナーゼ反応液に添加して 30 分間インキュベーションする。その後、酵素カップリング反応により生成したレゾルフィンの蛍光を測定することで、 $0.05 \mu\text{mol}/\ell \sim 30 \mu\text{mol}/\ell$ までの ADP を直線性良く定量することができる (図 2)。このように、検出液を添加して蛍光を測定するというホモジニアスなアッセイ系であるため、効率的に多数の化合物サンプルを測定することができる。本アッセイキットは 96、384、1536 ウェルプレートのいずれのマイクロプレートにも対応しているため、アカデミアレベルの小規模なスクリーニングから膨大な化合物ライブラリーを用いた HTS まで幅広く本アッセイキットを利用できる。

また、本アッセイキットは基質変換率が低い場合、すなわちキナーゼ反応による ADP 生成量が低い場合においても高感度、高精度で、優れた Z'-factor を取得可能であるという特長をもつ。Z'-factor とは、感度と精度から算出されるアッセイ系の妥当性を示す指標であり、HTS のアッセイ系を評価するための指数として広く用いられている。一般的に、適切なスクリーニングを行うには 0.5 以上の Z'-factor が必要とされている。本アッセイキットを用いて 5% 基質変換率に相当する ADP の定量を行ったところ、従来の

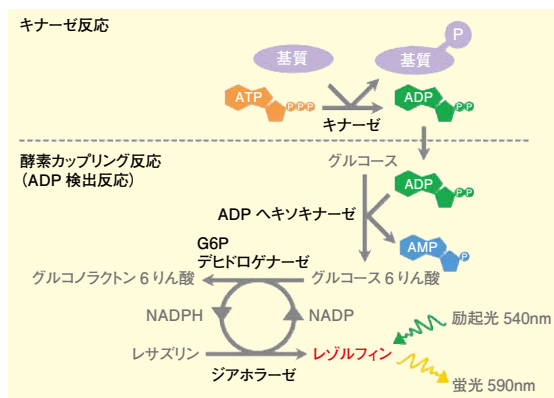


図 1. Fluorospark™ Kinase/ADP Multi-Assay Kit の測定原理

キナーゼ反応の結果生じた ADP は、3 種類の酵素による酵素カップリング反応を経て蛍光物質レゾルフィンに変換される。レゾルフィンの蛍光量は ADP の生成量と比例するため、レゾルフィンの蛍光を測定することでキナーゼの活性測定を行うことができる。

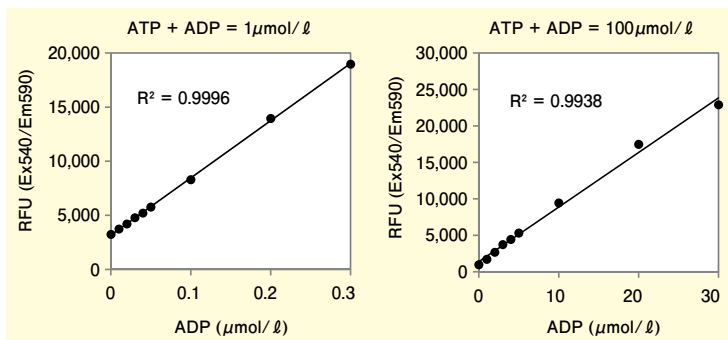


図 2. Fluorospark™ Kinase/ADP Multi-Assay Kit による ADP 検量線
小容量 384 ウェルプレート上で 5 μℓ の ADP、ATP 混合液 (ADP+ATP=1, 100 μmol/ℓ) に対して 5 μℓ の検出液を添加し、ADP の定量を行った。

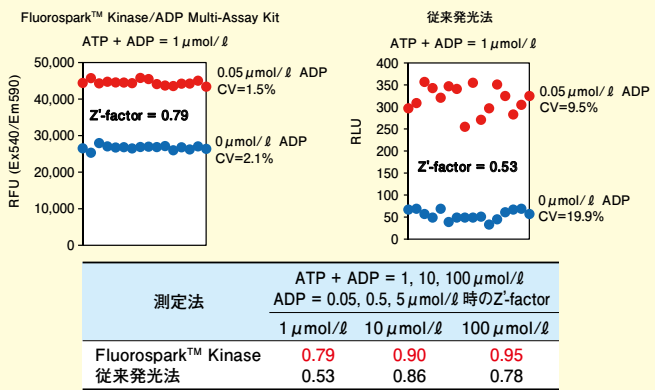


図3. 従来発光法との Z'-factor の比較

ATP+ADP=1, 10, 100 μmol/l の 0% 基質変換率もしくは 5% 基質変換率に相当する ADP を Fluorospark™ Kinase/ADP Multi-Assay Kit もしくは従来発光法により定量した (n=16)。Z'-factor は、ポジティブコントロールとネガティブコントロールの平均値をそれぞれ μ_p , μ_n 、標準偏差をそれぞれ σ_p , σ_n として、 $Z\text{-factor} = 1 - (3 \times (\sigma_p + \sigma_n) / (\mu_p - \mu_n))$ の式により算出した。

発光法を利用した ADP 定量キットよりもデータのバラつきが少なく、優れた Z'-factor が取得可能であることが示された (図3)。また、cAMP-dependent protein kinase (PKA) をモデル酵素として PKA に対する特異的阻害剤 H-89 による阻害曲線を作成したところ、文献値 ($IC_{50}=40\text{nmol/l}$) とほぼ同じ IC_{50} 値が得られ、実際のキナーゼ活性も問題なく測定可能であることが示された²⁾ (図4)。

さらに、本アッセイキットは、キナーゼ活性の経時的測定 (リアルタイムアッセイ) にも利用できる。例として、さまざまな ATP 濃度における PKA の反応初速度をリアルタイムアッセイにより算出し、ATP に対する PKA の K_m 値を求めた (図5)。このように、基礎研究レベルでキナーゼのカイネティクス解析が必要とされる場合も、本アッセイキットを使用することができる。

おわりに

これまで紹介したように、Fluorospark™ Kinase/ADP Multi-Assay Kit は低コストかつ高感度、高精度なキナーゼ活性測定が可能であり、リアルタイムアッセイを行うこともできるため、さまざまな研究シーンで活用可能である。また、キナーゼだけではなく、ATPase などの ADP を産生する酵素全般の活性測定にも適用できると

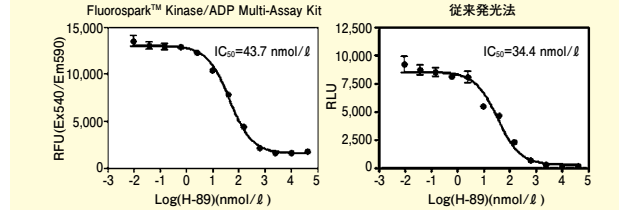


図4. H-89 による阻害曲線の作成

PKA の特異的阻害剤 H-89 による PKA の阻害効果を測定した。各濃度の H-89 に対して PKA 0.02U/μl、ATP 5 μmol/l、Kemptide 125ng/μl を添加して反応を行い、反応液中の ADP 量を Fluorospark™ Kinase/ADP Multi-Assay Kit もしくは従来発光法により定量した。

考えられる。

現在、東京大学創薬機構では誰でもアクセス可能な大規模化合物ライブラリーが整備されており、創薬研究における HTS は身近なものとなりつつある。本アッセイキットがアカデミア、企業問わず幅広い研究者に活用され、今後の創薬研究の発展に貢献できることを願う。

※Fluorospark™ Kinase/ADP Multi-Assay Kit は、東京大学創薬機構との共同開発品である。

【参考文献】

- 1) Kumagai, K. *et al.*: *Anal. Biochem.*, **447**, 146 (2014).
- 2) Hidaka, H. *et al.*: *Methods Enzymol.*, **201**, 328 (1991).

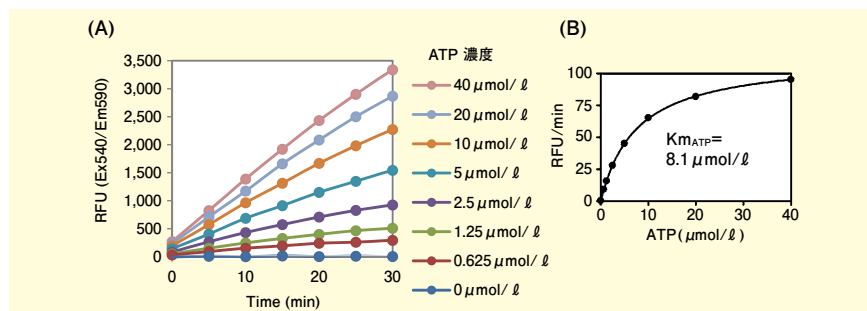


図5. リアルタイムアッセイを用いた K_m の算出

- (A) 0 ~ 40 μmol/l の ATP 溶液中における PKA の活性を、リアルタイムアッセイにより測定した。キナーゼ反応は、PKA 0.02U/μl、ATP 5 μmol/l、Kemptide 125ng/μl で行われた。
(B) (A) の結果から各 ATP 濃度における PKA 反応の初速度を算出し、 K_m 値を計算した。

フルオロスパーク™キナーゼ/ADPマルチアッセイキット



コード No.	品名	規格	容量	希望納入価格(円)
291-77401	Fluorospark™ Kinase/ADP Multi-Assay Kit	酵素活性測定用	1,000 回用	65,000
297-77403			10,000 回用	照会

* Fluorospark は和光純薬工業(株)の登録商標です。

2 ~ 10°C 保存 -20°C 保存 -80°C 保存 表示がない場合は室温保存です。その他の略号は、巻末をご参照下さい。
掲載内容は、2015年7月時点での情報です。最新情報は、siyaku.com (http://www.siyaku.com/) をご参照下さい。

溶菌酵素



キタラーゼ

本品は、 β -1,3-グルカナーゼ活性を主とする溶菌酵素です。キタラーゼは、 β -1,3-グルカナーゼ活性の他に、プロテアーゼ、ヘミセルラーゼ、バクチナーゼ、アミラーゼ活性を有すると報告されています。

- 外観：うすい褐色～褐色、粉末
- エンド- β -1,3-グルカナーゼ活性：2,800units/g
(初回生産ロット実測値)

(単位の定義) 反応液1ml中のカードランから1分間に1 μ molのグルコースに相当する可溶性糖を遊離する酵素量を1unitとする。

- 由来：Rhizoctonia solani

[ご注意]

溶解するバッファーによっては、溶解後ろ過滅菌して使用する際に、目詰まりを生じる場合がございますが、活性に影響はございません。数回に分けてろ過滅菌を行って下さい。

コードNo.	品名	規格	容量	希望納入価格(円)
119-01021	Kitalase	Ref ^o 生化学用	1g	30,000

精製グリコサミノグリカン

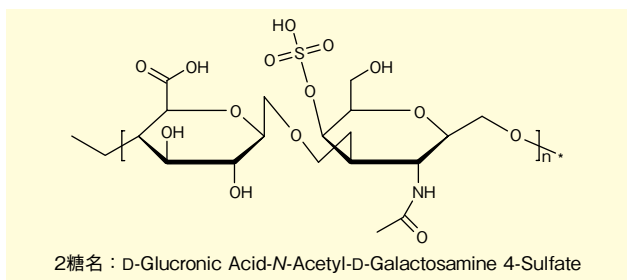


コンドロイチン硫酸Aナトリウム, ニワトリ軟骨由来

本品は、D-グルクロン酸(GlcA)と4位が硫酸化されたN-アセチル-D-ガラクトサミン(GalNAc)を基本2糖構造とするコンドロイチン硫酸Aナトリウムの精製品です。

コンドロイチン硫酸はプロテオグリカンの糖鎖部分を構成する酸性多糖で、軟骨をはじめとする結合組織の主要な構成因子です。基本2糖構造の硫酸基の結合位置によってコンドロイチン硫酸A, B, C, D及びEに分類され、コンドロイチン硫酸Aは幅広い動物の軟骨に豊富に存在しています。

基本2糖構造



コードNo.	品名	規格	容量	希望納入価格(円)
037-24391	Chondroitin Sulfate A Sodium Salt, from Chicken Cartilage	E ^o 細胞生物学用	5mg	20,000

関連商品

コードNo.	品名	規格	容量	希望納入価格(円)
032-14613	Chondroitin Sulfate C Sodium Salt	Ref ^o 生化学用	5g	5,200
034-14612	Chondroitin Sulfate C Sodium Salt	和光特級	25g	15,500
034-08801	Chondroitin Sulfate C Sodium Salt	和光特級	5g	4,900
032-08802	Chondroitin Sulfate C Sodium Salt	和光特級	25g	13,000
034-23061	Chondroitin Sulfate E Sodium Salt, from Squid Cartilage	E ^o 細胞生物学用	2mg	20,000
162-22131	Proteoglycan, from Salmon	E ^o 細胞生物学用	10mg	16,000
168-22133	Nasal Cartilage	E ^o 細胞生物学用	50mg	64,000

がん研究関連試薬

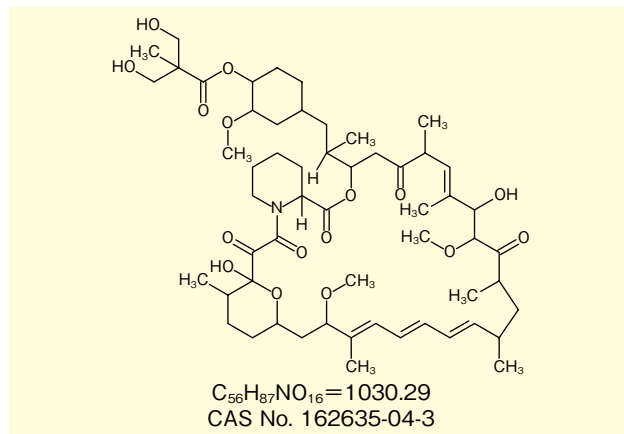


テムシロリムス

本品は、ラパマイシンの誘導体であり、mTOR阻害剤です。FK506結合タンパク質-12(FKBP-12)と結合してmTORの活性を阻害することにより、細胞周期の移行、血管新生を抑制します。

- 外観：白色～わずかにうすい褐色、結晶～粉末
- エタノール溶状：試験適合
- 含量(HPLC)(異性体混合)：96.8%以上

(初回生産ロット実測値)



コードNo.	品名	規格	容量	希望納入価格(円)
203-20131	Temsirolimus	E ^o 生化学用	5mg	13,000
209-20133	(mixture of isomers)	E ^o 生化学用	25mg	52,000

関連商品

mTOR阻害剤

コードNo.	品名	規格	容量	希望納入価格(円)
033-21951	Compound 401	E ^o 細胞生物学用	1mg	9,000
039-21953		細胞生物学用	5mg	30,000
051-08771	Everolimus	E ^o 薬理研究用	5mg	15,000
057-08773		細胞生物学用	25mg	52,000
115-00881	KU0063794	Ref ^o 細胞生物学用	5mg	25,000
165-24441	PP242	Ref ^o 細胞生物学用	5mg	25,000
184-02531	Rapamycin (mixture of isomers)	E ^o 細胞生物学用	1mg	20,000
180-02533		細胞生物学用	10mg	54,000
188-02534		細胞生物学用	50mg	180,000

自然免疫研究、生体防御機能研究に！ Wako LPS(リポポリサッカリド)

LPS (リポポリサッカリド、リポポリサッカライド、リポ多糖、内毒素) はグラム陰性菌の外膜に存在している成分です。さまざまな生物活性発現や細胞間コミュニケーションに大きな役割を果たしており、近年ではLPSを用いた自然免疫研究、生体防御機能の研究が盛んに行われています。

この度、大腸菌 O128 及びサルモネラチフィウム G30/C21 のLPSが追加になりました。

LPSの受託生産

下記に記載のないグラム陰性菌について、お客様からお預かりした乾燥菌体からのLPSの抽出・精製を行っております。グラム陰性菌の入手、菌体培養から対応可能な場合もございます。ご希望の方は、当社または当社代理店の営業員までお問合せ下さい。

コードNo.	品名	規格	容量	希望納入価格(円)
Escherichia coli 超遠心品				
121-05161	Lipopolysaccharide, from <i>E. coli</i> O26	Ref ^o 細胞生物学用	5mg	20,000
128-05171	Lipopolysaccharide, from <i>E. coli</i> O55	Ref ^o 細胞生物学用	5mg	21,000
126-05471	Lipopolysaccharide, from <i>E. coli</i> O103	Ref ^o 細胞生物学用	5mg	19,000
125-05181	Lipopolysaccharide, from <i>E. coli</i> O111	Ref ^o 細胞生物学用	5mg	19,000
124-06251	Lipopolysaccharide, from <i>E. coli</i> O113	Ref ^o 細胞生物学用	5mg	28,000
122-05191	Lipopolysaccharide, from <i>E. coli</i> O127	Ref ^o 細胞生物学用	5mg	19,000
120-06471	Lipopolysaccharide, from <i>E. coli</i> O128	Ref ^o 細胞生物学用	5mg	照会
121-06261	Lipopolysaccharide, from <i>E. coli</i> O150	Ref ^o 細胞生物学用	5mg	28,000
129-05461	Lipopolysaccharide, from <i>E. coli</i> O157	Ref ^o 細胞生物学用	5mg	21,000
222-01901	Lipopolysaccharide, from <i>E. coli</i> O86a	Ref ^o 細胞生物学用	5mg	22,000
Escherichia coli フェノール抽出品				
120-05131	Lipopolysaccharide, from <i>E. coli</i> O26	Ref ^o 細胞生物学用	25mg	16,000
127-05141	Lipopolysaccharide, from <i>E. coli</i> O55	Ref ^o 細胞生物学用	25mg	16,000
125-05201	Lipopolysaccharide, from <i>E. coli</i> O111	Ref ^o 細胞生物学用	25mg	16,000
124-05151	Lipopolysaccharide, from <i>E. coli</i> O127	Ref ^o 細胞生物学用	25mg	16,000
Bordetella pertussis Tohama 超遠心品				
126-06331	Lipopolysaccharide, from <i>B. pertussis</i> Tohama	Ref ^o 細胞生物学用	2mg	35,000
Salmonella 超遠心品				
126-05971	Lipopolysaccharide, from <i>S. typhimurium</i>	Ref ^o 細胞生物学用	5mg	23,000
127-06481	Lipopolysaccharide, from <i>S. typhimurium</i> G30/C21	Ref ^o 細胞生物学用	2mg	照会
124-05651	Lipopolysaccharide, from <i>S. Minnesota</i> 1114	Ref ^o 細胞生物学用	5mg	20,000
121-05661	Lipopolysaccharide, from <i>S. Minnesota</i> R595	Ref ^o 細胞生物学用	5mg	20,000
Pseudomonas aeruginosa 超遠心品				
129-05961	Lipopolysaccharide, from <i>P. aeruginosa</i> PAO1	Ref ^o 細胞生物学用	5mg	24,000
Campylobacter jejuni フェノール抽出品				
128-05671	Lipopolysaccharide, from <i>C. jejuni</i> Penner O:19	Ref ^o 細胞生物学用	5mg	20,000
Proteus フェノール抽出品				
124-05271	Lipopolysaccharide, from <i>P. vulgaris</i> OX2	Ref ^o 細胞生物学用	25mg	17,000
121-05281	Lipopolysaccharide, from <i>P. vulgaris</i> OX19	Ref ^o 細胞生物学用	25mg	17,000
128-05291	Lipopolysaccharide, from <i>P. mirabilis</i> OXK	Ref ^o 細胞生物学用	25mg	17,000
Helicobacter pylori 超遠心品				
229-01911	Lipopolysaccharide, from <i>H. pylori</i> GU2	Ref ^o 細胞生物学用	2mg	32,000
120-05871	Lipopolysaccharide, from <i>H. pylori</i> CA2	Ref ^o 細胞生物学用	2mg	33,000
Porphyromonas gingivalis 超遠心品				
120-06351	Lipopolysaccharide, from <i>P. gingivalis</i> ATCC 33277	Ref ^o -	2mg	35,000

C型肝炎ウイルス感染阻害抗体 Wako 抗Claudin-1, モノクローナル抗体(3A2/7A5)

本品は、native form のヒト Claudin-1 を認識する抗体で、C型肝炎ウイルス感染を阻害します。抗ウイルス活性が強い抗体(クローン No. 3A2)とウエスタンブロットでの反応性を示す抗体(クローン No. 7A5)の2種類があります。

製品概要

クローン No.	3A2	7A5
サブクラス	マウス IgG2b	マウス IgG1
交差性	ヒト	
抗原	ヒトClaudin-1発現ベクター*	
組成	PBS(pH7.4)	
抗体濃度	ラベルに記載 (初回ロット1mg/ml)	ラベルに記載 (初回ロット0.4mg/ml)

* DNA 免疫法により抗体を作製しています。

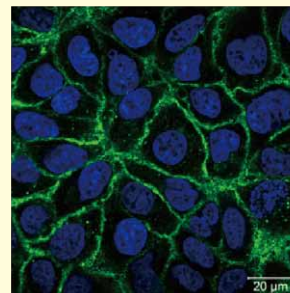
適用

クローン No.	3A2	7A5
免疫細胞染色	+	+
ウエスタンブロット	-	+
C型肝炎ウイルス感染阻害活性	++	+

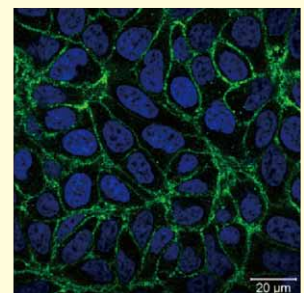
データ

免疫細胞染色

クローンNo. 3A2



クローンNo. 7A5



細胞: HepG2 (ヒト肝がん由来細胞株)
一次抗体濃度: 10 μg/ml、二次抗体: 抗マウスIgG-Alexa Fluor488
青: DAPI 緑: Claudin-1

HepG2 細胞で Claudin-1 の細胞膜局在が見られた。

(データご提供: 国立感染症研究所 深澤先生)
大阪大学薬学研究所 近藤先生)

コードNo.	品名	規格	容量	希望納入価格(円)
016-26081	Anti Claudin-1, Monoclonal Antibody (3A2)	Ref ^o 免疫化学用	100μl	40,000
013-26091	Anti Claudin-1, Monoclonal Antibody (7A5)	Ref ^o 免疫化学用	100μl	40,000

Ref^o: 2 ~ 10℃保存 E^o: -20℃保存 80^o: 80℃保存 表示がない場合は室温保存です。その他の略号は、巻末をご参照下さい。
掲載内容は、2015年7月時点での情報です。最新情報は、siyaku.com (http://www.siyaku.com/) をご参照下さい。

Native formのセロトニン受容体を認識

抗マウス5-HT_{1A}受容体, ラットモノクローナル抗体(4A6)

抗マウス5-HT_{2C}受容体, ラットモノクローナル抗体(6D2)

本品は、DNA免疫法により樹立したNative formの5-HT_{1A}受容体または5-HT_{2C}受容体を特異的に認識するラットモノクローナル抗体です。5-HT_{1A}受容体及び5-HT_{2C}受容体は、セロトニン(5-HT)によって活性化するGタンパク質共役型受容体で、主に中枢神経系に局在しており、記憶、摂食、睡眠、快感、不安などを制御する機能が報告されています。これらの受容体に作用する抗不安薬や抗精神病薬が開発されており、新規創薬ターゲットとして注目されています。

特長

- 免疫組織染色で使用可能
- Native formの5-HT_{1A}または5-HT_{2C}受容体を認識
- DNA免疫法により樹立

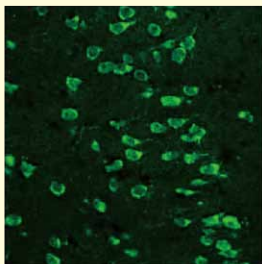
製品概要

	マウス5-HT _{1A} 受容体, ラットモノクローナル抗体(4A6)	抗マウス5-HT _{2C} 受容体, ラットモノクローナル抗体(6D2)
クローンNo.	4A6	6D2
サブクラス	ラットIgG2b, κ	ラットIgG2a, κ
交差性	マウス	
適応	免疫組織染色 (1:100-2,000)	免疫組織染色 (1:200-10,000)
	フローサイトメトリー (1:100-1,000)	

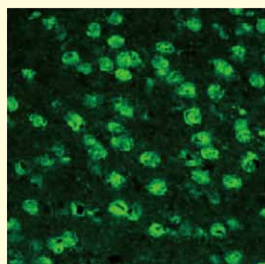
データ

■ 前頭前野での免疫組織染色

5-HT_{1A}受容体抗体(4A6)



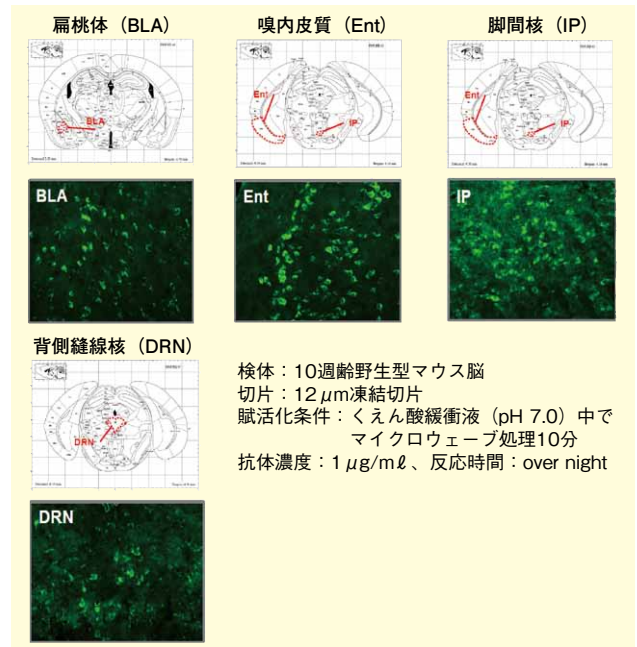
5-HT_{2C}受容体抗体(6D2)



検体：10週齢野生型マウス脳
切片：12 μm凍結切片
賦活化条件：くえん酸緩衝液(pH 7.0)中でマイクロウェーブ処理10分
抗体濃度：1 μg/ml、反応時間：over night

前頭前野ニューロンにおける5-HT_{1A}及び5-HT_{2C}受容体の細胞体局在が見られた。この結果はmRNAの高発現部位と一致している。

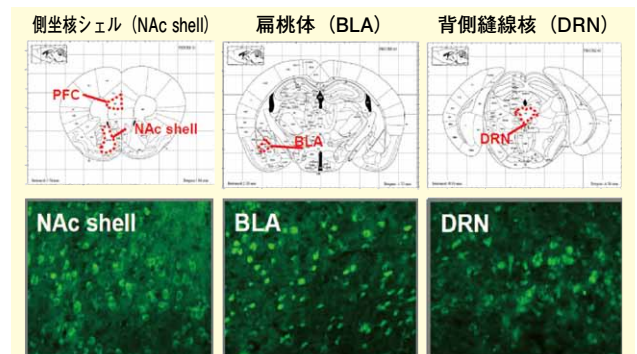
■ 5-HT_{1A}受容体抗体(4A6)による5-HT_{1A}受容体 mRNA発現部位毎の免疫組織染色



検体：10週齢野生型マウス脳
切片：12 μm凍結切片
賦活化条件：くえん酸緩衝液(pH 7.0)中でマイクロウェーブ処理10分
抗体濃度：1 μg/ml、反応時間：over night

扁桃体(BLA)、嗅内皮質(Ent)、脚間核(IP)、背側縫線核(DRN)における5-HT_{1A}受容体の陽性シグナルが見られた。この結果は、mRNAの高発現部位と一致している。



■ 5-HT_{2C}受容体抗体(6D2)による5-HT_{2C}受容体 mRNA発現部位毎の免疫組織染色






検体：10週齢野生型マウス脳
切片：12 μm凍結切片
賦活化条件：くえん酸緩衝液(pH 7.0)中でマイクロウェーブ処理10分
抗体濃度：1 μg/ml、over night

側坐核シェル(NAc shell)、扁桃体(BLA)、背側縫線核(DRN)における5-HT_{2C}受容体の陽性シグナルが見られた。この結果は、mRNAの高発現部位と一致している。

(本ページ掲載のすべてのデータご提供：大阪大学大学院薬学研究科 松田敏夫先生、田熊一徹先生、長谷部茂先生)

コードNo.	品名	規格	容量	希望納入価格(円)
016-25981	Anti Mouse 5-HT _{1A} Receptor, Rat Monoclonal Antibody (4A6) 	免疫化学用	50 μl	30,000
013-25991	Anti Mouse 5-HT _{2C} Receptor, Rat Monoclonal Antibody (6D2) 	免疫化学用	50 μl	30,000

 2 ~ 10°C保存  -20°C保存  -80°C保存 表示がない場合は室温保存です。その他の略号は、巻末をご参照下さい。
掲載内容は、2015年7月時点での情報です。最新情報は、siyaku.com (<http://www.siyaku.com/>)をご参照下さい。

ヒト iPS 細胞の凍結保存に Wako StemSure® hPSC 凍結保存溶液, AF

本品は、動物由来成分不含のヒト iPS 細胞用凍結保存溶液です。緩慢凍結法により高生存率で細胞を凍結保存できます。また、プログラムフリーザーを使用する必要はありません。なお、本品は DMSO を含んでいます。

特長

- ヒト iPS 細胞を高生存率で凍結保存可能
- 動物由来成分不含
- 緩慢凍結法により凍結保存可能
- プログラムフリーザー不要
- フィーダーフリー培養した細胞に使用可能
- 面倒な試薬の調製が不要

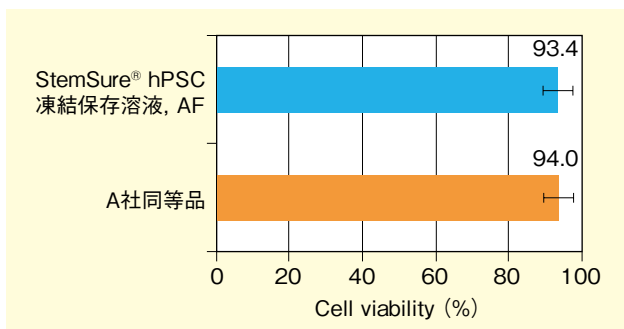
品質試験

- 外観
- 実用試験 (ヒト iPS 細胞 201B7 株)
- 無菌試験
- エンドトキシン試験
- マイコプラズマ試験

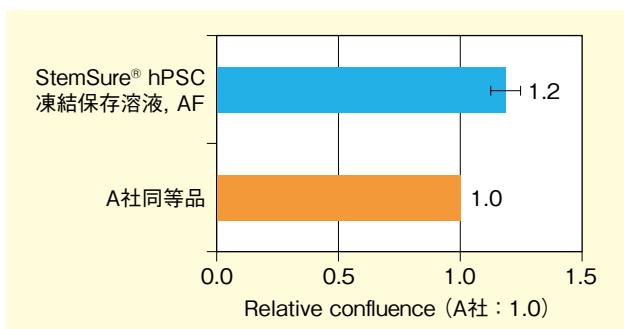
データ

細胞生存率・細胞増殖率の確認

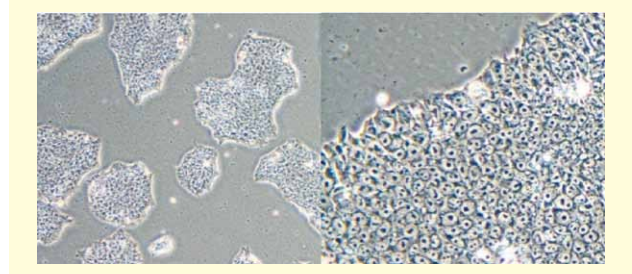
〈細胞生存率〉



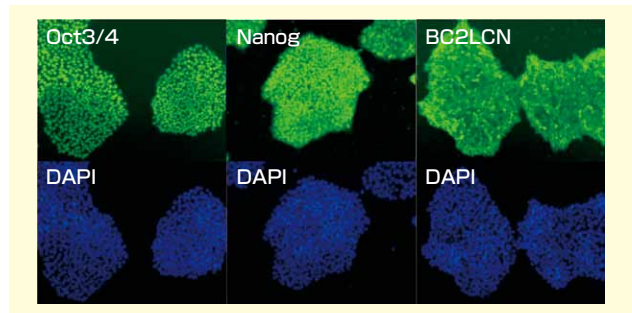
〈細胞増殖率〉



細胞・コロニー形態の確認

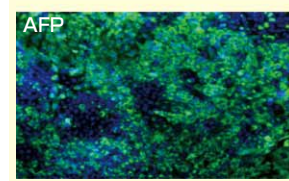
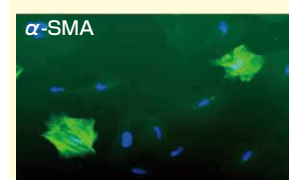
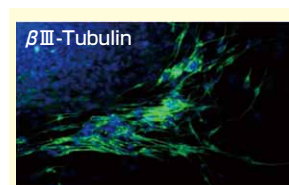


未分化マーカー発現の確認




培養中のヒト iPS 細胞 201B7 株をシングルセルに分散した後、本品に懸濁し、 -80°C で 2 ~ 4 日間凍結保存した。凍結融解後の細胞生存率と細胞増殖率を確認した。また、凍結融解を 5 回繰り返した後、細胞・コロニー形態と各種未分化マーカー (Oct3/4、Nanog、BC2LCN) を確認した。その結果、ヒト iPS 細胞は高い細胞生存率と細胞増殖率を示した。また各種未分化マーカーの発現を確認した。



ヒト iPS 細胞 201B7 株の三胚葉への分化



本品で 5 回凍結融解をしたヒト iPS 細胞 201B7 株を用い、胚葉体を形成し、三胚葉に分化することを β III -Tubulin、 α -SMA、AFP の発現で確認した。

培地組成: StemSure® D-MEM [コード No.197-16275]+20% SSR [コード No.197-16775]+2mmol/l L-Glutamine [コード No.073-05391]+0.1mmol/l StemSure® 2-Mercaptoethanol [コード No.198-15781]+1×Non-essential Amino Acids Solution [コード No.139-15651]

コード No.	品名	規格	容量	希望納入価格(円)
NEW 197-17831	StemSure® hPSC Freezing Medium, AF 	細胞培養用	100ml	16,000

 $2 \sim 10^{\circ}\text{C}$ 保存  -20°C 保存  -80°C 保存 表示がない場合は室温保存です。その他の略号は、巻末をご参照下さい。掲載内容は、2015 年 7 月時点での情報です。最新情報は、siyaku.com (<http://www.siyaku.com/>) をご参照下さい。

使いやすい溶液タイプ



ES/iPS 細胞研究用 低分子化合物溶液

本品は、ES 細胞、iPS 細胞の未分化能維持や分化誘導に関わると報告されている低分子化合物の溶液タイプです。新たに 6 品目を追加しました。フィルター滅菌済みのため、そのまま培地に添加してご使用頂けます。

CultureSure® 低分子化合物溶液

本品は、原料製造工程・製造現場で動物由来物を一切使用せず製造しています。

品質試験

外観、エンドトキシン試験、無菌試験、マイコプラズマ試験

3mmol/ℓ CKI-7 二塩酸塩溶液 (1)

本品は、CK1 選択的阻害剤です。SB431542、Y-27632 と共に使用することで、血清フリー、フィーダーフリー条件下でヒト ES 細胞とヒト iPS 細胞を網膜前駆細胞に分化誘導すると報告されています。

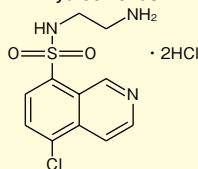
5mmol/ℓ SB431542 溶液 (2)

本品は、ALK4, 5, 7 の阻害剤です。ES 細胞由来内皮細胞の増殖、分化、シート形成を刺激すると報告されています。また、チアゾビビン、PD0325901 とともに使用するとトリプログラミング効率が 200 倍以上改善し、かつトリプログラミングがスピードアップすると報告されています。

10mmol/ℓ Y-27632 溶液 (3)

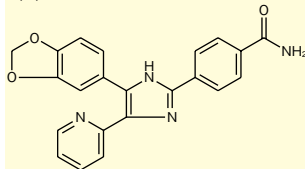
本品は、選択的かつ強力な ROCK 阻害剤です。ヒト ES 細胞やヒト iPS 細胞の細胞分散時に細胞死を抑制し、また凍結保存後の細胞生存率が向上すると報告されています。

(1) CKI-7 Dihydrochloride



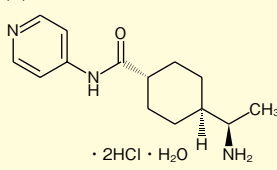
$C_{11}H_{12}ClN_3O_2S \cdot 2HCl = 358.67$
CAS No. 1177141-67-1

(2) SB431542



$C_{22}H_{16}N_4O_3 = 384.39$
CAS No. 301836-41-9

(3) Y-27632



$C_{14}H_{21}N_3O \cdot 2HCl \cdot H_2O = 338.27$
CAS No. 331752-47-7

低分子化合物溶液

品質試験

外観、無菌試験、マイコプラズマ試験

10mmol/ℓ PD0325901 溶液 (4)

本品は、MAPK 阻害剤です。本品と CHIR99021 を培地に添加するとマウス ES 細胞を効率よく培養できます。

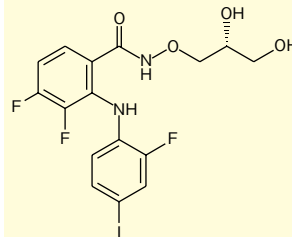
10mmol/ℓ PD184352 溶液 (5)

本品は、MEK1 阻害剤です。CHIR99021、SU5402、PD184352 を含む培地でマウス ES 細胞を培養すると、未分化能を維持したまま効率よく培養できると報告されています。

10mmol/ℓ Thiazovivin 溶液 (6)

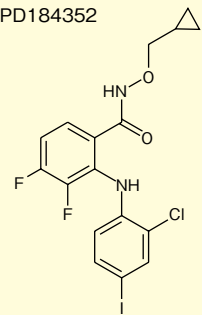
本品は、ROCK 阻害剤です。ヒト ES 細胞のトリプシン処理後の生存率を改善すると報告されています。

(4) PD0325901



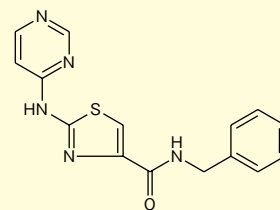
$C_{16}H_{14}F_3N_2O_4 = 482.19$
CAS No. 391210-10-9

(5) PD184352



$C_{17}H_{14}ClF_2N_2O_2 = 478.66$
CAS No. 212631-79-3

(6) Thiazovivin



$C_{15}H_{13}N_5OS = 311.36$
CAS No. 1226056-71-8

コード No.	品名	規格	容量	経銷人価(円)
CultureSure® 低分子化合物溶液				
039-24611	CultureSure® 3mmol/ℓ CKI-7 Dihydrochloride Solution, Animal-derived-free	細胞培養用	1ml	照会
033-24631	CultureSure® 5mmol/ℓ SB431542 DMSO Solution, Animal-derived-free	細胞培養用	1ml	照会
039-24591	CultureSure® 10mmol/ℓ Y-27632 Solution, Animal-derived-free	細胞培養用	300μℓ	30,000
低分子化合物溶液				
166-25951	10mmol/ℓ PD0325901 DMSO Solution	細胞培養用	300μℓ	照会
163-25961	10mmol/ℓ PD184352 DMSO Solution	細胞培養用	300μℓ	照会
204-19551	10mmol/ℓ Thiazovivin DMSO Solution	細胞培養用	300μℓ	照会

未分化ヒト多能性幹細胞検出・除去試薬

rBC2LCN-PE23

蛍光標識 rBC2LCN

rBC2LCN ストリッピング溶液

rBC2LCN (AiLecS1) は、*Burkholderia cenocepacia* 由来のレクチンである BC2L-C の N 末端ドメインを大腸菌で発現させた組換えレクチンです。rBC2LCN はヒト ES 細胞・ヒト iPS 細胞の細胞表面に存在する糖鎖に非常に高い特異性を持ちます。

rBC2LCN-PE23

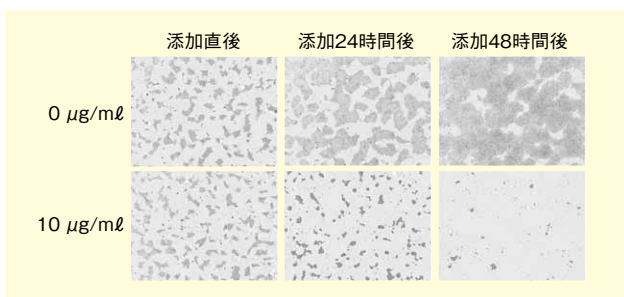
本品は、緑膿菌由来外毒素の触媒ドメイン (PE23) を rBC2LCN の C 末端部分に融合させた組換えタンパク質です。細胞内に取り込まれ細胞死を引き起こすことで、ヒト ES 細胞・ヒト iPS 細胞を除去します。

特長

- 分化誘導時に残存するヒト ES 細胞・ヒト iPS 細胞を選択的に除去可能
- 培養液に添加するのみで使用可能

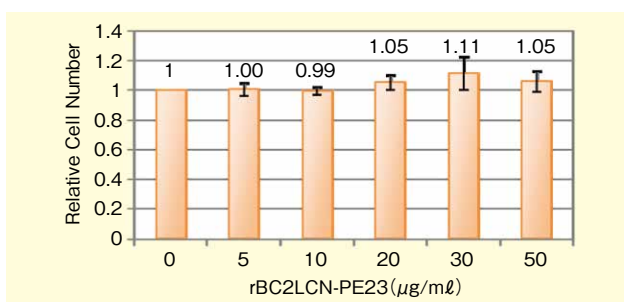
データ

ヒト iPS 細胞の除去



ヒト iPS 細胞 201B7 株の培養液に終濃度 10 µg/ml となるように rBC2LCN-PE23 を添加した。その後培地交換せずに 48 時間培養を続けると、rBC2LCN-PE23 を添加した培養液ではヒト iPS 細胞の細胞死が誘導され、コロニーが浮遊し除去された。

分化細胞への影響



正常ヒト皮膚線維芽細胞 (NHDF) の培養液に終濃度 5, 10, 20, 30, 50 µg/ml となるように rBC2LCN-PE23 を添加し、48 時間後の細胞数を確認した。rBC2LCN-PE23 を添加しても死細胞はほぼ認められなかった (0 µg/ml rBC2LCN-PE23 の生細胞数を 1 とした)。

【参考文献】

- 1) Tateno, H. et al. : *Stem Cell Reports*, 4, 811 (2015).

コード No.	品名	規格	容量	希望納入価格 (円)
NEW 180-03231	rBC2LCN-PE23	細胞培養用	100 µl	30,000
NEW 186-03233			100 µl × 5	120,000

rBC2LCN-FITC/-547/-635

本品は、蛍光色素でラベル化された rBC2LCN です。ヒト ES 細胞・ヒト iPS 細胞の培養液に添加することで、未分化細胞を生きたまま細胞染色やフローサイトメトリーを用いて解析することができます。

特長

- 使用方法が簡単
 - 細胞固定せずに、培地添加 30 分後に蛍光を観察可能
- 未分化ヒト ES 細胞・ヒト iPS 細胞を検出できる
- 細胞を生きたまま染色できる
- 培地交換後も染色が持続する
- 細胞染色、フローサイトメトリーに使用可能
- 細胞毒性が低い

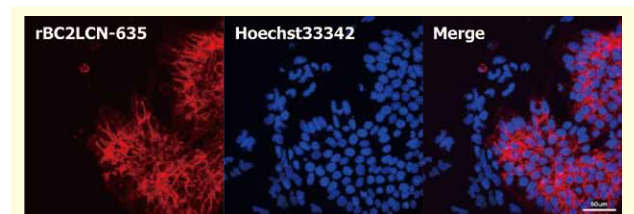
製品概要

- 無菌試験済み (0.1 µm フィルターでろ過済み)
- 組成: PBS 溶液
- 実用希釈倍率

Live Cell Imaging	1 : 100 ~ 1,000
Flow Cytometry	1 : 100 ~ 1,000

データ

ヒト ES 細胞の生細胞染色 (Live Cell Imaging)

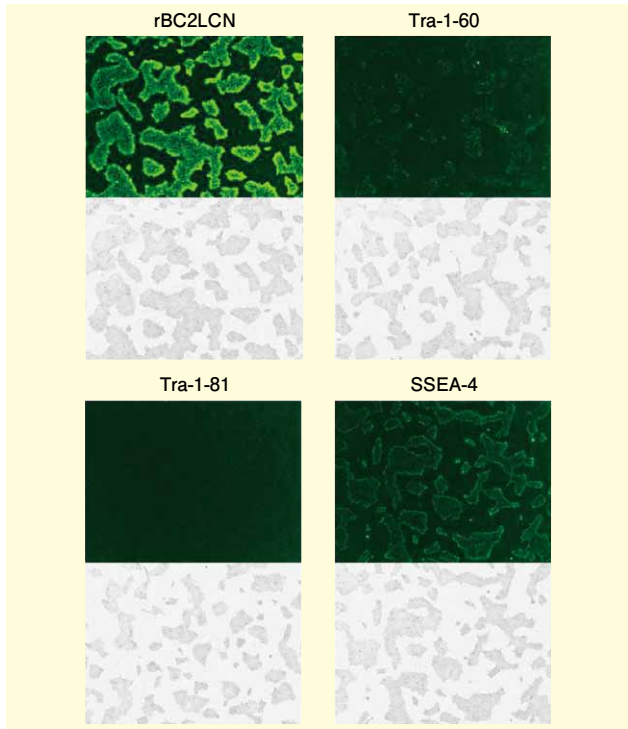


rBC2LCN-635 を用いてヒト ES 細胞 WA01 株を染色し、共焦点顕微鏡で細胞を観察した。未分化状態を逸脱したヒト ES 細胞を含む細胞を染色したところ、逸脱細胞と未分化状態を維持した細胞を染め分けることができた。

(データご提供: 国立研究開発法人 産業技術総合研究所 創薬基盤研究部門 幹細胞工学研究グループ 小沼泰子先生、伊藤弓弦先生)

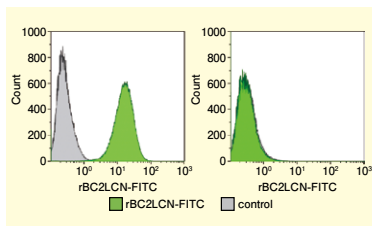
[次頁に続く]

ヒトiPS細胞の生細胞染色 (Live Cell Imaging)



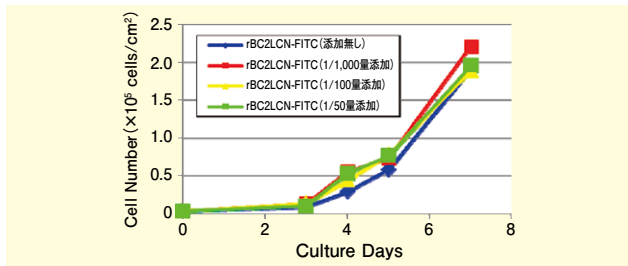
rBC2LCN-FITC と汎用されている未分化マーカーである Tra-1-60、Tra-1-81、SSEA-4 の抗体を用いヒト iPS 細胞 201B7 株を生細胞染色した (2 時間染色)。結果、rBC2LCN-FITC は抗体と比較して感度が高く、特異性も高いことがわかった。

Flow Cytometry を用いたヒトiPS細胞の分離



rBC2LCN-FITC を用いてヒト iPS 細胞 201B7 株とヒト正常二倍体線維芽細胞を染色し、フローサイトメトリーに供した。結果、未分化であるヒト iPS 細胞と分化したヒト二倍体線維芽細胞を分離できた。

ヒトiPS細胞に対する細胞毒性評価



ヒト iPS 細胞 201B7 株の培養液に培養液の 1/1,000、1/100、1/50 量の rBC2LCN-FITC を添加した状態で培養し続けた。結果、いずれの濃度でも rBC2LCN-FITC の存在に関わらず、未添加時と同程度の細胞増殖を示した。

【参考文献】

- 1) Onuma, Y. et al. : *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **431**, 524 (2013).
- 2) Tateno, H. et al. : *Stem Cells Transl. Med.*, **2**, 265 (2013).
- 3) Tateno, H. et al. : *Sci. Rep.*, **4**, 4069 (2014).

コード No.	品名	規格	容量	希望納入価格 (円)
180-02991	rBC2LCN-FITC 【AiLecS1-FITC】	細胞染色用	100 μ l	20,000
186-02993	Ex. 495nm, Em. 520nm		100 μ l \times 5	80,000
186-03211	rBC2LCN-547 【AiLecS1-547】	細胞染色用	100 μ l	30,000
182-03213	Ex. 551nm, Em. 565nm		100 μ l \times 5	120,000
NEW 185-03161	rBC2LCN-635 【AiLecS1-635】	細胞染色用	100 μ l	30,000
NEW 181-03163	Ex. 634nm, Em. 654nm		100 μ l \times 5	120,000
029-18061	BC2LCN 【AiLecS1】、Lectin,	糖鎖研究用	1mg	30,000
025-18063	recombinant, Solution*		1mg \times 5	照会

* 未標識体

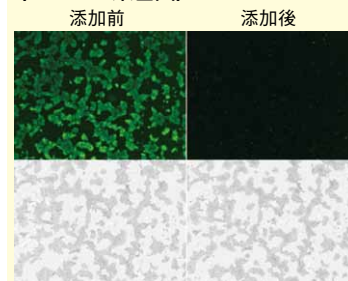
■ rBC2LCNストリッピング溶液

本品は、ヒト ES 細胞・ヒト iPS 細胞の細胞膜表面に存在する糖鎖と結合した rBC2LCN レクチンを強制的に細胞から剥離させることができます。rBC2LCN 剥離後、細胞を他の抗体で染色することや、生細胞の場合は培養を継続することが可能です。

データ

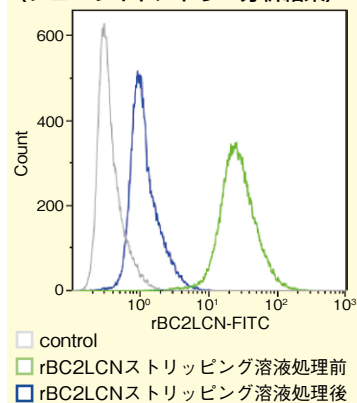
■ ヒト iPS 細胞からの rBC2LCN の剥離

〈コロニー染色図〉



rBC2LCN ストリッピング溶液を添加することで、細胞膜表面に結合していた rBC2LCN-FITC が剥離された。

〈フローサイトメトリー分析結果〉



rBC2LCN-FITC により染色されたヒト iPS 細胞 201B7 を本溶液で処理し、フローサイトメトリーに供すると、未処理の細胞に比べ処理された細胞のピークが左へシフトした。

ヒト iPS 細胞 201B7 株の培養液に 1/100 量の rBC2LCN-FITC を添加し、35 分間染色した。培養液除去後、rBC2LCN ストリッピング溶液を添加し、30 分間インキュベートした。また、rBC2LCN-FITC 添加後の細胞と rBC2LCN ストリッピング溶液添加後の細胞をフローサイトメトリーに供した。

コード No.	品名	規格	容量	希望納入価格 (円)
182-03171	rBC2LCN Stripping Solution	細胞培養用	10ml	15,000

Refr: 2 ~ 10°C 保存 E: 20°C 保存 80: 80°C 保存 表示がない場合は室温保存です。その他の略号は、巻末をご参照下さい。
掲載内容は、2015 年 7 月時点での情報です。最新情報は、siyaku.com (<http://www.siyaku.com/>) をご参照下さい。

縮合剤 大容量発売!

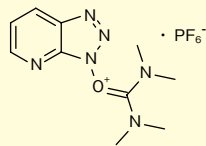


HATU

HBTU

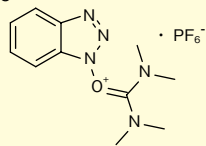
本品は、汎用されている DCC などに比べてラセミ化を抑制することができる縮合剤です。アミドやエステル結合を構築するための最も一般的な方法は、カルボン酸の活性化を伴う脱水縮合反応です。これまでにさまざまな縮合剤の報告がありますが、反応剤によっては副生成物の除去や、ラセミ化などの問題点が知られています。ラセミ化の問題を抑制する添加剤として HOAt、HOBt が知られており¹⁾、それらを分子内に含む HATU、HBTU は、DCC などに比べてラセミ化を抑制できます。

HATU



C₁₀H₁₅N₆O · PF₆⁻ = 380.23
CAS No. 148893-10-1

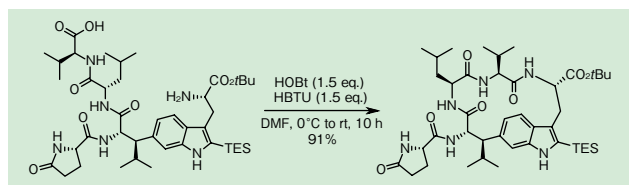
HBTU



C₁₁H₁₆N₅O · PF₆⁻ = 379.24
CAS No. 94790-37-1

反応例

Celogentin C 全合成研究²⁾



【参考文献】

- 1) Carpino, L. A. : *J. Am. Chem. Soc.*, **115**, 4397 (1993).
- 2) Ma, B., Litvinov, D. N. B., He, L., Banerjee, B. and Castle, S. L. : *Angew. Chem. Int. Ed.*, **48**, 6104 (2009).

コード No.	品名	規格	容量	希望納入価格 (円)
NEW 018-26122	O-(7-Azabenzotriazol-1-yl)-		25g	23,000
NEW 010-26121	N,N,N',N'-tetramethyluronium	有機合成用	100g	65,000
NEW 012-26125	Hexafluorophosphate【HATU】	照会	500g	
NEW 025-18781	O-(Benzotriazol-1-yl)-		100g	34,000
NEW 027-18785	N,N,N',N'-tetramethyluronium	有機合成用	500g	95,000
	Hexafluorophosphate【HBTU】			

関連商品

コード No.	品名	メーカー (メーカーコード)	容量	希望納入価格 (円)
349-03622	HOBt	同仁 (H009)	25g	5,800
341-03621			100g	17,600
325-29161	1-Hydroxy-7-azabenzotriazole【HOAt】	ワコーケミカル (-)	1g	5,200
321-29163			5g	16,200

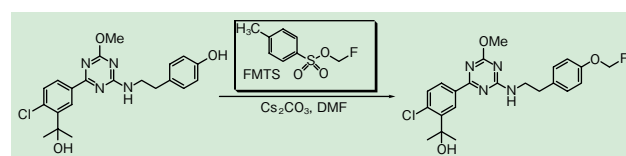
新規フルオロメチル化剤



p-トルエンスルホン酸フルオロメチル

本品は、K₂CO₃ 及び Cs₂CO₃ などの塩基を用い、ヘテロ・酸素・窒素・硫黄原子などを、それぞれ、温和な条件下でフルオロメチル化できます。フルオロメチル基を持つ医薬品・農薬・機能性材料の創出に有用です。

反応例



【参考文献】

- 1) 三宅寛：和光純薬時報，**83**(1), 6 (2015).
- 2) Arnaud, J., Artiaga, M., Barth, F., Hortala, L., Martinez, S. and Roux, P. : WO 2013/087643A1.
- 3) Carroll, L., Witney, T. H. and Aboaqye, E. O. : *Med. Chem. Commun.*, **4**, 653 (2013).

コード No.	品名	規格	容量	希望納入価格 (円)
067-06471	Fluoromethyl	有機合成用	1g	18,000
063-06473	p-Toluenesulfonate【FMTS】		5g	70,000

関連商品

コード No.	品名	規格 / メーカー	容量	希望納入価格 (円)
求電子的ふっ素化剤				
030-24401	1-Chloromethyl-4-fluoro-1,4-diazoniabicyclo[2.2.2]octane Bis (tetrafluoroborate) <small>Ref</small> <small>図II</small>	有機合成用	5g	5,000
038-24402			25g	15,000
036-24403			100g	37,000
069-06311	N-Fluorobenzenesulfonimide	有機合成用	5g	6,500
067-06312			25g	16,000
065-06313			100g	45,000
068-06521	N-Fluoropyridinium	有機合成用	5g	8,000
066-06522			25g	23,000
061-06491	N-Fluoro-2,4,6-trimethylpyridinium	有機合成用	5g	6,500
069-06492			25g	16,000
061-06511	N-Fluoro-2,4,6-trimethylpyridinium	有機合成用	5g	8,000
069-06512			25g	23,000
求核的ふっ素化剤				
023-15801	Bis(2-methoxyethyl) aminosulfur	有機合成用	5g	12,000
021-15802			25g	35,000
045-31101	Diethylaminosulfur Trifluoride <small>F</small> <small>図</small>	和光一級	5g	13,500
043-31102			25g	49,000
203-20011	Tetrabutylammonium Dihydrogen	有機合成用	5g	7,800
201-20012			25g	27,500
209-20013			100g	70,000
トリフルオロメチル化剤				
329-79491	Methyl 2,2-Difluoro-2-(fluorosulfonyl) acetate <small>Ref</small> <small>図</small>	ワコーケミカル	5g	5,900
327-79492			25g	20,700
165-18691	N-Phenylbis(trifluoromethanesulfonimide)	-	5g	11,000
201-19821			1g	7,500
207-19823			5g	18,000
209-19822			25g	70,000
353-29861	Trimethyl (trifluoromethyl) silane <small>図</small>	ワコーケミカル	5g	8,500
351-29862			25g	26,800

Ref^o…2 ~ 10°C保存 [E]^o…20°C保存 [80]^o…80°C保存 表示がない場合は室温保存です。その他の略号は、巻末をご参照下さい。
掲載内容は、2015年7月時点での情報です。最新情報は、siyaku.com (http://www.siyaku.com/) をご参照下さい。

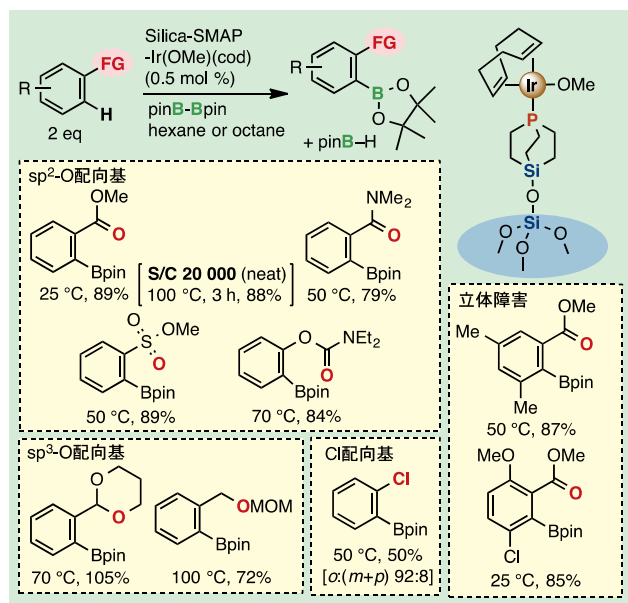
鈴木-宮浦カップリングなどに Wako 株式会社ワコーケミカル ビス(ピナコラート)ジボロン

この度、Bis(pinacolato)diboron の大入り包装 (100g, 500g) を追加しました。

本品は、鈴木-宮浦カップリングなどに使用されるボロン酸ピナコールエステル(Bpin)を導入する試薬です。これまでは、有機トリフラートやハロゲン化合物を基に、対応するボロン酸エステルを合成していましたが、近年では、Silica-SMAP などの特殊な配位子を用いることで、直接的な C-H ほう素化反応も可能です。

反応例

■ Silica-SMAP を用いた Bpin 化反応¹⁾



【参考文献】

1) 澤村 正也: 和光純薬時報, 82 (1), 2 (2014).

コード No.	品名	メーカー	容量	希望納入価格 (円)
327-56971	Bis (pinacolato) diboron	ワコーケミカル	1g	4,500
323-56973			5g	6,500
325-56972			25g	27,000
321-56974			100g	65,000
329-56975			500g	照会

関連商品

コード No.	品名	規格	容量	希望納入価格 (円)
197-17451	Silica-SMAP	有機合成用	1g	18,000
193-17453			5g	70,000
194-17461	Silica-TRIP	有機合成用	1g	15,000
190-17463			5g	60,000

2010年のノーベル化学賞反応を体験 Wako 鈴木-宮浦クロスカップリング反応体験キット 2

本品は、鈴木-宮浦クロスカップリング反応で2種類の蛍光分子を合成する化学実験キットです。

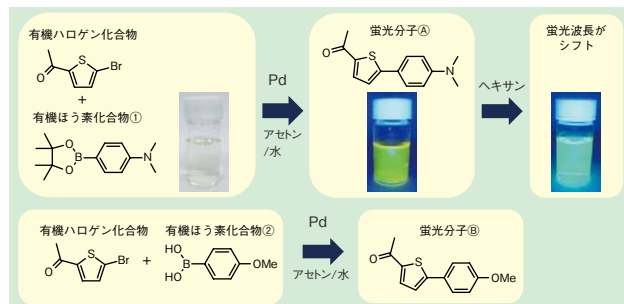
2010年にノーベル化学賞を受賞された北海道大学名誉教授 鈴木 章 先生の研究成果を手軽に体験することができます。(監修:北海道大学大学院 地球環境科学研究所 山田幸司 准教授)

特長

- 実験時間は約20分
- 特殊な実験器具不要
- ブラックライトで蛍光を観察
- 蛍光分子①は、反応液にヘキサンを加えると蛍光波長がシフトして蛍光色が変化*

*合成される蛍光分子は、周りの溶媒の極性によって蛍光波長が変化するソルバトクロミズム性を有します。

反応式



キット構成

(蛍光分子2種 × 20回分: 1反応10mlとして)

- 2-アセチル-5-プロモチオフェン 820mg
- 4-(N,N-ジメチルアミノ)フェニルボロン酸ピナコールエステル (上記①) 500mg
- p-メトキシフェニルボロン酸 (上記②) 300mg
- 炭酸ナトリウム 200mg
- 酢酸パラジウム 8mg

*溶媒の水、アセトン、ヘキサンなどは、別途必要。

*蛍光の観察には、λ = 365nmのブラックライトや紫外線LEDが必要

コード No.	品名	規格	容量	希望納入価格 (円)
289-90581	Suzuki-Miyaura Cross Coupling Reaction Experiment Kit 2	化学実験用	1kit	14,000

関連商品

コード No.	品名	規格/メーカー	容量	希望納入価格 (円)
291-75201	Luminol Reaction Experiment Kit	教育用	1セット	6,500
309-09441	UV Lamp (366nm)	エルメックス (BL-02)	1台	5,600

品目追加

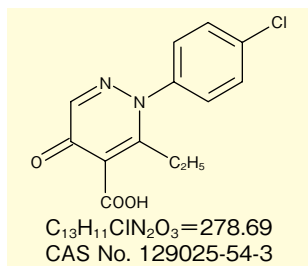


ポジティブリスト関連 農薬標準品

ポジティブリスト関連の残留農薬試験用標準品の追加品目をご紹介します。品目は順次追加しています。

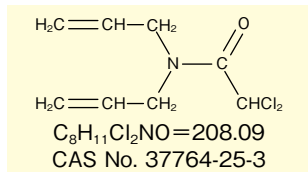
■ クロフェンセット標準品

化学名: 2-(4-Chlorophenyl)-3-ethyl-2,5-dihydro-5-oxopyridazine-4-carboxylic Acid
 含量 (qNMR): 97.0% 以上
 外観: わずかにうすい褐色、結晶性粉末～粉末又は塊
 備考: 植物成長調整剤



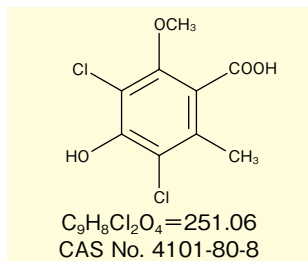
■ ジクロロミド標準品

化学名: *N,N*-Diallyl-2,2-dichloroacetamide
 含量 (qNMR): 97.0% 以上
 外観: 黄色～褐色、澄明の液体
 溶解性: 水 5、ケロセン 15 (g/l)
 備考: 葉害軽減剤



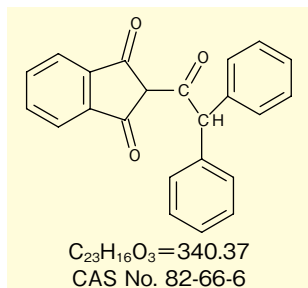
■ ジクロロイソエバニニック酸標準品

化学名: 3,5-Dichloro-4-hydroxy-2-methoxy-6-methylbenzoic Acid
 含量 (HPLC): 98.0% 以上
 外観: 白色、結晶性粉末～粉末



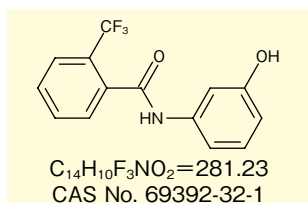
■ ダイファシノン標準品

化学名: 2-(Diphenylacetyl)indan-1,3-dione
 別名: Diphacin
 含量 (qNMR): 98.0% 以上
 外観: 黄色、結晶性粉末～粉末
 溶解性: 水 0.3mg/kg、クロロホルム 204、トルエン 73、キシレン 50、アセトン 29、エタノール 2.1、ヘプタン 1.8 (g/kg)
 備考: 殺鼠剤



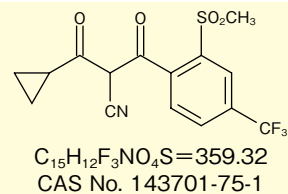
■ フルトラルニル代謝産物 M4 標準品

化学名: α,α,α -Trifluoro-3'-hydroxy-*o*-toluanilide
 含量 (qNMR): 98.0% 以上
 外観: 白色～わずかにうすい黄褐色、結晶性粉末～粉末又は塊



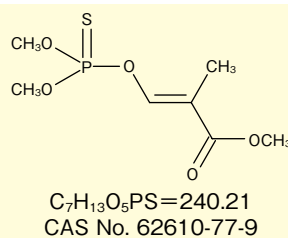
■ イソキサフルトール代謝産物 B 標準品

化学名: 2-Cyano-3-cyclopropyl-4-(2-methylsulphonyl-4-trifluoromethylphenyl)propane-1,3-dione
 含量 (qNMR): 98.0% 以上
 外観: 白色～ごくうすい赤色、粉末



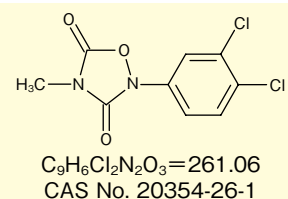
■ メタクリホス標準品

化学名: Methyl (*E*)-3-(dimethoxyphosphinothioxy)-2-methylacrylate
 別名: Damfin
 含量 (qNMR): 95.0% 以上
 外観: 無色～わずかにうすい黄色、澄明の液体
 備考: 殺虫剤



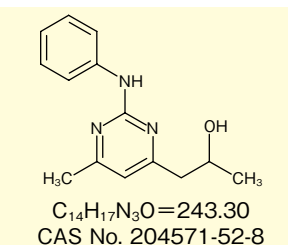
■ メタゾール標準品

化学名: 2-(3,4-Dichlorophenyl)-4-methyl-1,2,4-oxadiazolidine-3,5-dione
 別名: Tunic
 含量 (qNMR): 98.0% 以上
 外観: 白色、結晶性粉末～粉末
 備考: 除草剤



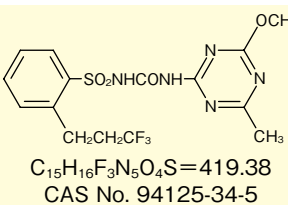
■ メバニピリムプロパノール体標準品

化学名: 1-(2-Anilino-6-methylpyrimidine-4-yl)-2-propanol
 含量 (qNMR): 98.0% 以上
 外観: 白色、結晶性粉末～粉末



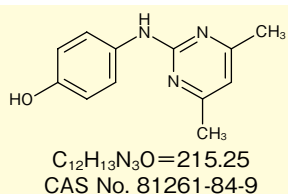
■ プロスルフロン標準品

化学名: *N*-[(4-Methoxy-6-methyl-1,3,5-triazin-2-yl)amino]carbonyl-2-(3,3,3-trifluoropropyl)benzene Sulfonamide
 別名: Peak
 含量 (qNMR): 98.0% 以上
 外観: 白色、結晶性粉末～粉末
 溶解性: 蒸留水 29mg/l (pH 4.5, 25°C)、緩衝用水 87 (pH 5.0)、43,000 (pH 7.7) (mg/l, 25°C)、エタノール 8.4、アセトン 160、トルエン 6.1、*n*-ヘキサン 0.0064、*n*-オクタノール 1.4、酢酸エチル 56、ジクロロメタン 180 (g/l, 25°C)
 備考: 除草剤



■ ピリメタニル代謝産物 B 標準品

化学名: 2-(4-Hydroxyanilino)-4,6-dimethylpyrimidine
 含量 (qNMR): 98.0% 以上
 外観: 白色～うすい灰白色、結晶性粉末～粉末



[次頁に続く]

コード No.	品名	規格	容量	希望納入価格 (円)
NEW 035-24451	Clofencet Standard <small>Ref</small>	残留農薬試験用	100mg	20,000
NEW 042-33791	Dichlormid Standard <small>Ref</small> <small>国</small>	残留農薬試験用	100mg	15,000
NEW 048-33771	Dichlorisoevermnic Acid Standard <small>Ref</small>	残留農薬試験用	50mg	30,000
NEW 045-33781	Diphacinone Standard <small>Ref</small> <small>国-I</small>	残留農薬試験用	100mg	16,000
NEW 064-06481	Flutolanil Metabolite M4 Standard <small>Ref</small>	残留農薬試験用	50mg	30,000
NEW 097-07111	Isoxaflutole Metabolite B Standard <small>Ref</small> <small>国-III</small>	残留農薬試験用	100mg	30,000
NEW 131-18391	Methacrifos Standard <small>E</small> <small>国</small>	残留農薬試験用	100mg	15,000
NEW 131-18411	Methazole Standard <small>Ref</small>	残留農薬試験用	100mg	45,000
NEW 138-18421	Mepaniprym Propanol Standard <small>Ref</small>	残留農薬試験用	100mg	30,000
NEW 160-27291	Prosulfuron Standard <small>Ref</small>	残留農薬試験用	100mg	23,000
NEW 166-27391	Pyrimethanil Metabolite B Standard <small>Ref</small>	残留農薬試験用	100mg	30,000

その他のポジティブリスト関連品目は下記よりご参照下さい。
和光純薬試薬 HP → カテゴリーから選ぶ → 分析・環境 → 食品分析 → 01. 残留農薬・動物用医薬品 (ポジティブリスト制度)

反応性代謝物検出試薬



XenoScreen™ GSH-EE

本品は、特異体質性薬物毒性 (IDT) を引き起こす原因となる可能性のある反応性代謝物を検出する試薬です。

IDTは5,000人から10,000人に一人の割合で発生する、予見することが困難な毒性であり、発現には反応性代謝物が関係していると考えられています。

本品は、医薬品候補化合物の反応性代謝物生成有無の確認試験に有用です。

特長

● 高い検出性能

グルタチオンエチルエステルをトラッピング試薬として使用しているため、従来のグルタチオン法と比較し高感度に検出できます。さらにそのD体と併用することでより判定が容易になります。

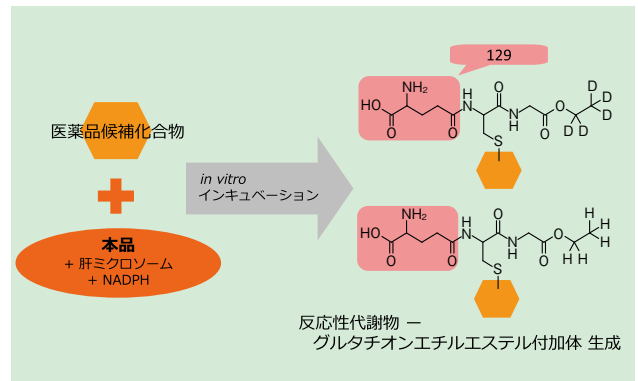
● 簡単、Ready-to-use タイプ

1回の反応に必要なトラッピング試薬、Buffer類が

チューブに小分け済みです。面倒な試薬類の秤量、Stock solutionの調製が不要です。

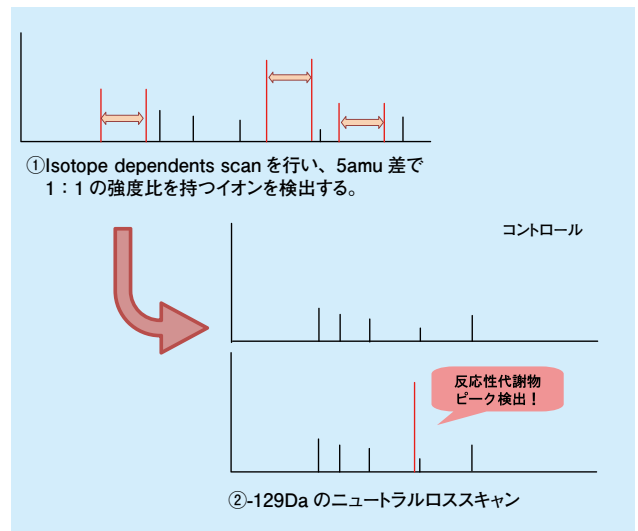
使用法概略

〈付加体生成〉



〈前処理〉

〈LC-MS分析〉



コード No.	品名	規格	容量	希望納入価格 (円)
NEW 244-00961	XenoScreen™ GSH-EE (Tube type) <small>E</small>	薬物動態研究用	12本	照会

関連商品

反応工程後、分析前の前処理に最適なカラムです。

コード No.	品名	規格	容量	希望納入価格 (円)
NEW 292-35311	Presep® XenoScreen™ 96well Plate	薬物動態研究用	1個	照会

Ref…2 ~ 10℃保存 E…20℃保存 国…80℃保存 表示がない場合は室温保存です。その他の略号は、巻末をご参照下さい。
掲載内容は、2015年7月時点での情報です。最新情報は、siyaku.com (http://www.siyaku.com/) をご参照下さい。

落合 英二 (1898. 6. 26 ~ 1974. 11. 4)

東京大学名誉教授 廣部 雅昭

はじめに

わが国近代薬学の祖と言われた長井長義博士 (1845 ~ 1929: 化学大家 359) は、日本薬学会初代会頭 (1887 ~ 1929) として君臨する一方、東京帝国大学医科大学薬学科初代教授 (1893 ~ 1921) として薬化学講座を創設した。同講座はその後近藤平三郎教授 (1921 ~ 1938: 化学大家 424) を経て、落合英二教授に引き継がれた。「長井長義—近藤平三郎—落合英二」というわが国の正統派的天然物化学—有機化学の一つの大きな流れを形成したと言っても過言ではない。本稿ではとくに落合英二先生のご生涯を顧みつつ、果たされた輝かしいご業績について述べる。

生い立ち

先生は明治 31 年 (1898) 6 月 26 日、父落合初太郎、母ノブの三男として浦和にて出生、元来落合家は栃木県小山市の出身であるが、父初太郎氏は東京高師出身の名望高き教育者として近県の師範学校、中等学校の教頭、校長などを歴任されていた関係で転勤が多かったようである。学齢に達し、先生は父が教頭を勤めていた千葉県立第一師範学校付属小学校に入学、物理・化学を専攻された父君の影響と教育熱心な父君の“代役”として親交のあった千葉薬専・医専出身の菊地氏から受けた植物採集の実地指導などにより後年先生の該博な植物学や天然物化学研究への素地が形成されたものと考えられる。先生が県立千葉中学に進学した当時、わが国は第一次世界大戦の影響下にあり、ドイツからの医薬品の輸入が途絶え、国策として医薬品の国産化が唱えられ、東大薬学科も挙げて合成医薬品の製造技術工程を指導要領に加えるような時代であった。産学官共同の機運はこの頃に始まったとも言え、その趣旨の一環として、この時期後述する乙卯研究所が近藤平三郎教授によ



1969年11月3日 文化勲章授章

て設立されたと言われている。

一方若き落合先生は、ひたすら憧れてやまない植物研究への道を目指し、植物学の権威である安田篤教授の薫陶を得るべく仙台の旧制第二高等学校へと進学した。地衣研究の碩学として著名な安田教授に傾倒した先生は未知の地衣発見に没頭したが、たまたま地衣研究のよしみで朝比奈泰彦東大薬学科教授が採集の途次、安田教授を訪問、先生が案内役を任された。朝比奈教授は「植物研究では食えんから、応用範囲の広い薬学が良い。薬学には植物成分研究の大化学者長井長義教授がおられる・・・」と、かつて尊敬する恩師から勧められたというご自身の体験を話されたとのことである。そのことで先生が熟慮の末、ご自身の生涯の進路を薬学と定めたとすれば、この朝比奈教授との出会いの意義は大きい。しかも東大薬学科長井教授の講座を将来継承することになったのだから不思議な運命を感じざるを得ない。

研究生活のはじまり

大正 8 年 (1919) 先生は迷うことなく東京帝国大学医学部薬学科に入学、卒業研究では念願の長井教授の薬化学

教室で厳しい実験第一主義の指導を受けられた。明治 39 年 (1906) 竣工の当時としては最新式の 2 階建て木骨赤煉瓦造りの薬学教室は大正 12 年 9 月 1 日の関東大震災の際、夏休み返上で実験をしていた近藤教授以下落合副手らの消火活動で被害を最小限に食い止められ、東大が灰燼に帰する危機を防いだ。その功績に対し時の古在総長より薬学科に金一封が贈られた。その赤煉瓦の研究室は 1960 年代まで大学最古の建物として伝統の名残をとどめていた。その前年、大正 11 年停年制の導入により長井教授が退官、近藤教授が薬化学講座第 2 代教授に就任、卒業したばかりの落合先生は副手となり研究生生活が始まった。

長井教授以来、薬化学教室伝統のアルカロイド研究は佳境に入っており、苦参塩基マトリンからオオツツラフジのシノメニン研究に拡大していた。落合先生は近藤教授の片腕としてこれら防已科アルカロイドの系統的研究を、全国各地から台湾にいたるまで原料採集を行うなど精力的に展開された。先生の外国文献の速読能力、精力的な行動力、豪快なビールの飲みっぷりなど、つとに知られていたが晩年までその風格が変わることはなかった。大正 14 年先生は助手に任じられ、昭和 3 年「シノメニンの構造研究」で薬学博士の学位を得、同時に光代夫人と結婚された。近藤教授の信任厚く昭和 5 年には助教教授に昇任されるとともに 2 年間のドイツ留学を命じられた。

留学とその成果

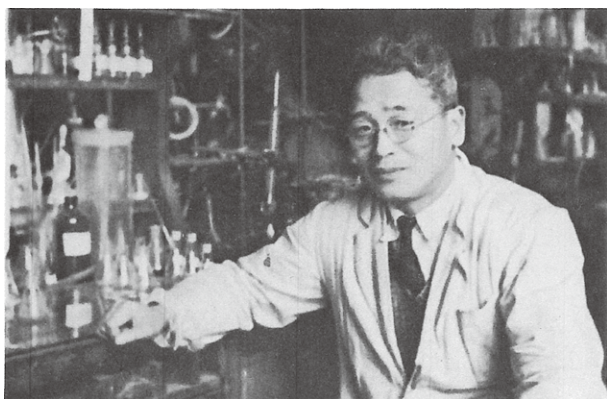
当時ヨーロッパへの渡航は陸路か海路しかなかったが、先生はシベリア鉄道で単身ベルリンへと旅立った。フライブルク大学の Staudinger 教授 (高分子化学 1953 年ノーベル化学賞) の研究室で近代有機化学の精髓を学ぶとともに、後半は他大学、研究所などで錯塩化学、生化学、微量分析についての知識を吸収するなど世界的視野を



1944年 学士院賞 受賞の日



1957年4月 Staudinger夫妻落合家訪問



1950年12月 実験室にて

広めることに努められた。ドイツでは長井、近藤両教授の影響もあり破格の厚遇が得られ、これら貴重な体験が先生の天然物化学から後の画期的な精密有機化学への展開につながったことは想像に難くない。先生はブレーグルが開発したマイクロ分析装置一式とクルマンのマイクロ天秤、高度真空蒸留用水銀ポンプなど革新的実験装置を留学土産に昭和7年海路意気揚々と帰国された。本務に復帰した先生はマトリンの研究を継続する一方で、留学土産に持参した微量分析装置を開発普及すべく本郷の理化器械商石井徳太郎氏に依頼、苦勞の末わが国初の有機微量分析装置の開発に成功、共同研究者の津田

恭介助手、坂本秀策研究員とともに昭和12年薬学雑誌に歴史的な第一報「有機微量分析に関する知見—クロル、ブロム元素の簡易定量法」を発表、同時に出版された「有機定量分析法微量篇」は化学界に大きな反響を呼び、近年に至るまで微量分析法普及の原点になったことはよく知られている。

教授就任と新研究の展開

昭和13年落合先生は近藤教授停年退官をうけて薬化学講座第3代教授に就任、津田恭介助教授、上尾庄次郎、宮木高明各助手の強力な体制をしいた。時あたかも日中事変に端を発した戦局は急を告げ、第二次世界大戦に突

入、国民生活は困窮の度合いを増していた。この時期先生の世界的業績「芳香族第三級アミンN-オキシド化学」が芽生えることになる。先生は長井、近藤両教授が手がけた伝統的なアルカロイド研究を継承する一方、基本骨格である複素環化合物（当初は異項環と称された）の反応性研究から、芳香環におけるヘテロ原子による電子の分極現象を有機電子論的考察から予測し、ピリジンやキノリンの窒素原子を酸素化することでヘテロ環への求電子反応を可能にすることを実験的に証明した。本反応は極めて汎用性の高い画期的な反応で、複素環化学の発展に著しく寄与するとともに医薬品などの創製、また発がん機構研究への貢献など高く評価され帝国学士院賞から後の文化勲章受章の榮譽へと発展した。

太平洋戦争の拡大にともない大学も積極的な協力を要請された。南方に派遣された軍人がマラリアに冒され、その特效薬の供給が喫緊の課題であった。落合教授はキニーネに勝る抗マラリア薬を複素環化学を駆使し多数合成し供することが出来た。この研究を契機に規那塩基誘導体の化学が展開した。

薬化学講座懸案のマトリン研究は、津田助教授へと継承され、後に東大応用微生物研究所に転進された津田恭介教授の昭和41年度日本学士院賞受賞によって完結された。落合教授の天然物研究への執着は止むことを知らず、戦後新テーマとしてトリカブトのアコニットアルカロイドに着目、教授以下教員総出で、全国各地の原植物採集に出かけ、成分の地域特性など退官まで精力的に研究を続けられた。この研究は講座継承者の岡本敏彦教授（当時助教授）から講座出身の夏目充隆博士（乙卯研究所所長）へと引き継がれた。かつて長井教授が日本が世界に伍して研究するには日本特産の植物を材料にする天然物化学や日本独自の発想になる研究が必要と言われたそうである

が、落合教授も戦時下電気もガスも欠乏している中、七輪で反応や蒸留を行わざるを得なかったN-オキシド化学の研究が日本の独壇場になり得たのは、戦争で海外との情報流通がなく、また敵性英語排斥で和文論文が多く、情報が流出しなかったおかげであると述懐されていたが宜なるかなという実感がある。

戦後初めて世界に公表された「N-オキシドの化学」は世界の化学者達の矚目するところとなり、1955年チューリッヒで開催されたIUPAC総会において日本学術会議代表として行った特別講演は高い評価を受け、IUPAC有機化学部委員に選任された。さらに1960年にはドイツ薬学会名誉会員、1966年には米国薬学アカデミー名誉



1953年 トリカブト採集



1957年4月 東大医学部薬学科

会員に推挙された。

東京大学退官とその後の活動

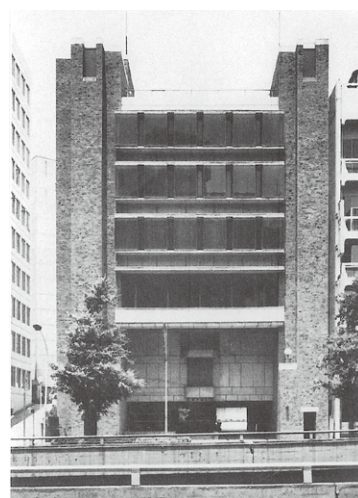
戦中・戦後の激動と困窮の時代を経て、先生は昭和34年(1959)停年により21年間にわたる東京大学教授の職を辞することになったが、その前年(1958)東京大学医学部薬学科は学部として独立し、全国の薬学部設立の先鞭をつけることとなった。先生の最終講義は当時教室で佳境にあった「規那塩基誘導体の合成」に関するもので、開拓された複素環化学の天然物合成研究への応用に相当する先生の思いのこもった感動的な講義であった。

先生は退官と同時に近藤名誉教授が理事長を務めておられた乙卯研究所の第2代所長に就任された。先生の研究に対する情熱は衰えを知らず、理化学研究所招聘研究員も兼務、さらに文部省総合研究班を組織、全国で活躍する研究者を糾合しN-オキシド化学の集大成を図った。1967年Elsevier社から出版された重厚な英文著書、E. Ochiai「Aromatic Amine Oxides」は世界に大きな反響を呼び、その後の同分野研究のバイブル的存在となった。

日本薬学会への貢献

昭和31年(1956)先生は日本薬学会会頭に、さらに昭和35年には同名

誉会員に推挙され、わが国薬学研究の向上・発展の先頭に立つとともに学会機能の充実に努められた。特筆すべきは昭和45年学会創立90周年記念事業として、渋谷の長井家の土地に薬学会館を建設する計画を発表、先生は建設委員長として率先指揮にあたられた。2年後に赤煉瓦をあしらったモダンな会館が竣工、それまで東大薬学部の片隅に寄生するような状態にあった学会事務局を移転した。赤煉瓦は大震災と戦災をくぐり抜けた東大薬学科の赤煉瓦の一部が象徴的に使われたとのことであるが先生の深い思い入れが感じられる。その後約20年を経て平成3年(1991)、薬学会館は津田恭介教授を建設委員長として全面的に現在の大規模



旧日本薬学会会長井記念館(1972~1989)



近藤平三郎 乙卯研 初代所長(右)と落合英二 第二代所長(左)

なインテリジェントビルに建て替えられ、学会として磐石な基盤が完成し今日に至っているが、いずれも長井家の絶大なる篤志によるもので日本薬学会長井記念館と命名されている所以である。

栄 誉

先生の成し遂げられた数々のご業績に対し様々な栄誉が与えられた。昭和19年(1944)先生の「芳香族複素環塩基の研究」に対して帝国学士院賞が授与された。芳香族複素環化合物の反応性の理論的考察とN-オキシド化学の展開が対象となった。しかし戦局は益々悪化の一途をたどり学徒動員など研究もままならぬ時期で受賞の喜びも半分であったに違いない。昭和20年8月終戦を迎え、復員した研究者も含め大学は困窮した環境の中にあっても自由な研究を謳歌する喜びを味わったことであろう。教室は再び活気を取り戻し、前述した画期的な研究成果と多くの優れた俊秀を輩出した。退官後昭和38年1月先生は宮中における講書始の進講者に選ばれ、皇居において両陛下はじめ皇族の方々の前で「アルカロイドについて」ご進講申し上げた。植物学者である昭和天皇への配慮ともとれるが、もともと先生は植物学への造詣が深く、天然物化学の研究実績も豊富で、内容は極めて奥深くかつ具体的で薬学的な話題も多く含んでおり、陛下も感銘深くお聴きになられたことと察せられる。先生の長年の功績を称え、昭和40年(1965)日本学士院会員、昭和44年(1969)には文化功労者に選ばれ同時に文化勲章が授与された。昭和49年7月、先生の喜寿を祝う門弟達による盛大な「薬化の会」に満面の笑みをたたえ出席されたが、9月病に冒されて入院、加療の甲斐なく同年11月4日満76歳の天寿を全うされた。生前の勲績に対し従三位勲一等瑞宝章が授けられた。



1974年7月 喜寿祝賀会

おわりに

落合先生がご自身のことを振り返って書かれたものは少なく、本稿は逝去後根本曾代子氏が書かれた伝記や門下の方々が寄稿された追悼の記をまとめた回想録、また光代夫人がまとめられた先生の日記や随想などの遺稿集をもとに執筆をさせていただいたが、先生は、まさに我が国にとって未曾有の激動の時代を、強烈な個性とブルドーザーのごときエネルギーな行動力で日本の薬学を牽引し、世界に冠たる業績をあげ、未開の荒野を走り抜かれたご生涯であったという印象が強い。漢薬麻黄からエフェドリンを発見し世界に名をなした長井長義初代教授が創設された薬学では最も“老舗的”な講座の伝統を守り育て、継承して行くためには、常に新生面を開拓付加しつつ、さらに独自の新領域も開拓・発展させなければならない。その宿命を見事果たされた典型と言えるが、制度が出来て以来、同講座から3名の文化勲章受章者が輩出されたことは特筆に値する。先生は研究でのオリジナリティを非常に大切に、常に余念なき思索と細心な実験を研究者

に求めた。先生の研究教育に対する姿勢は大変厳しい反面、細やかな心遣いも忘れなかった。先生にとっては孫弟子に相当する筆者ですら欧米留学当時、研究の心構えなど記したメールを頂戴したが、先生独特の短い言葉の中に温かさがこもっていた。留学の最後に訪問したミュンヘン大学のR.Huisgen教授が述べられた「落合の化学は世界の宝だ」との賛辞を伝えるのを楽しみに帰国したが、すでに病状重篤で面会は叶わなかった。

【参考文献】

- 1) 岡本敏彦編：「落合英二先生回想録」(落合英二先生顕彰会)(廣川書店)(1992)。
- 2) 落合光代編：「おつづらふじ」落合英二遺稿(廣川書店)(1980)。
- 3) 乙卯研究所編：「きろくときおく」(乙卯研究所)(2009)。

写真はすべて上記文献から出版元のご了承を得て転載させていただいた。また年代等正確を期するため「社団法人 日本薬学会経歴」を参照させていただいた。記して謝意を表する。

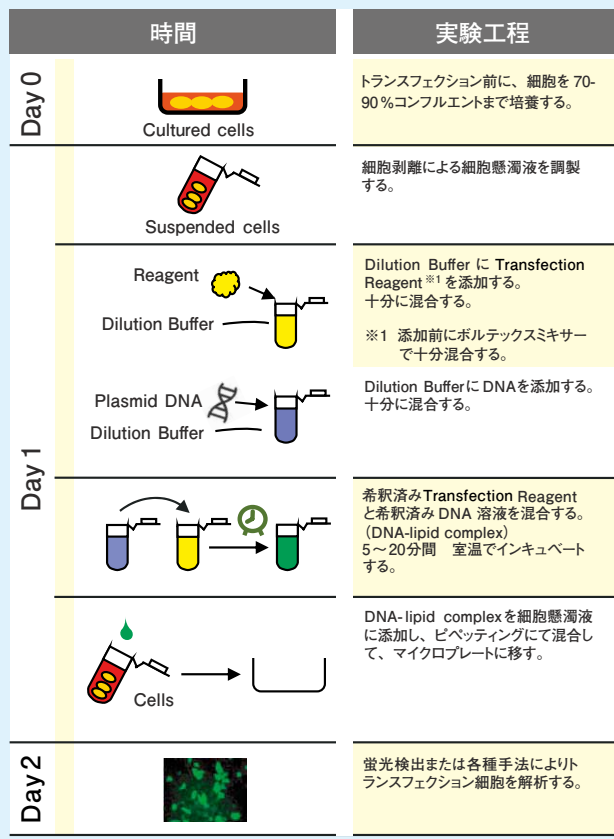


本品は、クリックケミストリーによってスクリーニング¹⁾された新規カチオン性リポソームから構成されるトランスフェクション試薬です。DNA とトランスフェクション試薬の混合比率レンジを大幅に拡大しました。これにより、トランスフェクションの最適化がより簡単になりました。汎用実験細胞株 (HeLa, MCF-7, MDCK など)、幹細胞 (iPS 細胞, 間葉系幹細胞など)、血球系細胞 (K562, マクロファージ, THP-1, RAW264.7 など)、ミクログリア、プライマリー (初代培養) 細胞に DNA 及び siRNA を導入できます。細胞毒性が低いので、トランスフェクション後の培地交換が不要です。また、構成試薬中に毒劇物を含んでいません。

特長

- One-step 法
トランスフェクションから本解析までを従来法から24時間短縮
- 浮遊系 導入困難細胞へのトランスフェクション効率を改善

One-step 法概要



【参考文献】

1) Li, L. et al.: *Biomaterials.*, **33**, 8160 (2012).

コード No.	品名	構成		規格	容量	希望納入価格(円)
		Transfection Reagent	Dilution Buffer			
293-77101	ScreenFect™ A plus	0.2ml	10ml	遺伝子研究用	0.2ml	12,000
299-77103		1ml	50ml		1ml	45,000
297-77104		1ml × 5	5 × 50ml		1ml × 5	180,000

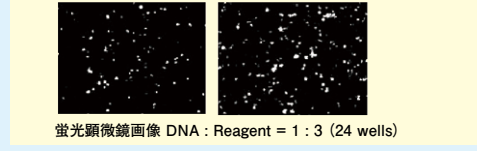
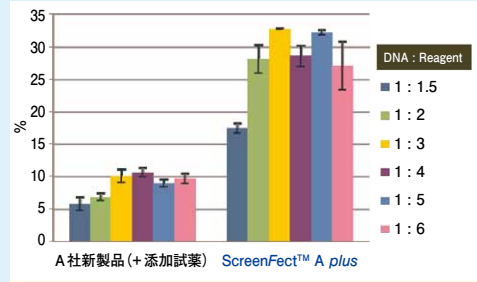
2~10℃保存 -20℃保存 80℃保存 表示がない場合は室温保存です。
 特定毒物 第一種特定化学物質 第二種特定化学物質 劇物 毒物 毒薬 劇薬 危険物 向精神薬 特定麻薬向精神薬原料 化学兵器禁止法 第一種指定物質 化学兵器禁止法 第二種指定物質 カルタヘナ法
 覚せい剤取締法 国民保護法 ダイオキシン類
 掲載内容は、2015年7月時点での情報です。上記以外の法律及び最新情報は、siyaku.com (http://www.siyaku.com/) をご参照下さい。

記載されている試薬は、試験・研究の目的にのみ使用されるものであり、「医薬品」、「食品」、「家庭用品」などとしては使用できません。
 記載希望納入価格は本体価格であり消費税などが含まれておりません。

データ

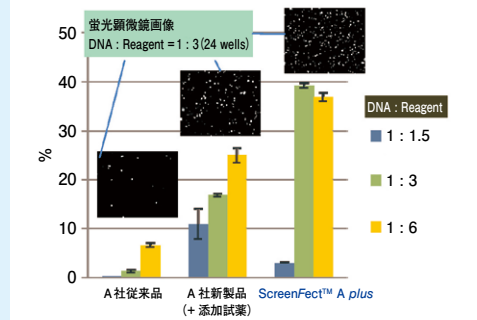
■ トランスフェクション性能 (フローサイトメトリー)

〈トランスフェクション効率 (GFP) (MCF-7)〉



MCF-7: ヒト乳がん細胞由来(上皮細胞様形態) (接着系)
 導入方法: A社 新製品 → 2-Step
 ScreenFect™ A plus → 1-Step

〈トランスフェクション効率 (GFP) (K562)〉



K562: ヒト慢性骨髄性白血病細胞由来 (浮遊系)
 導入方法: A社品 → 2-Step
 ScreenFect™ A plus → 1-Step

和光純薬時報 Vol. 83 No. 3
 2015年7月15日発行
 発行責任者 上田 衡
 編集責任者 鎌田裕子
 発行所 和光純薬工業株式会社
 〒540-8605 大阪市中央区道修町三丁目1番2号
 TEL.06-6203-3741 (代表)
 URL http://www.wako-chem.co.jp
 印刷所 共進社印刷株式会社

● 和光純薬時報に対するご意見・ご感想はこちらまでお寄せ下さい。
 E-mail jiho@wako-chem.co.jp

● 製品に対するお問合せはこちらまでお寄せ下さい。
 Please contact us to get detailed information on products in this journal.

■ 和光純薬工業株式会社 (Japan) <http://www.wako-chem.co.jp>
 フリーダイヤル (日本のみ) 0120-052-099 / Tel 81-6-6203-3741
 フリーファックス (日本のみ) 0120-052-806 / Fax 81-6-6201-5964
 E-mail labchem-tec@wako-chem.co.jp

■ Wako Overseas Offices :
 ・Wako Chemicals USA, Inc. <http://www.wakousa.com>
 Toll-Free (U.S. only) 1-877-714-1920
 Head Office (Richmond, VA) : Tel 1-804-714-1920 / Fax 1-804-271-7791
 Boston Sales Office (Cambridge, MA) : Tel 1-617-354-6772 / Fax 1-617-354-6774
 ・Wako Chemicals GmbH <http://www.wako-chemicals.de>
 European Office (Neuss, Germany) : Tel 49-2131-311-0 / Fax 49-2131-311100