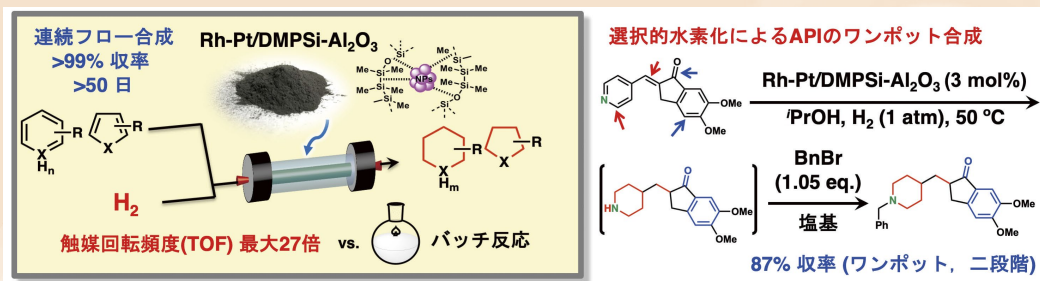


和光純薬時報

October 2020
Vol.88 No.4



【総説】

- 「温和な条件下での核水添を実現する不均一系ロジウム-白金ナノ粒子触媒」 宮村 浩之、小林 修…………… 2
- 「マリントキシン研究の楽しみ」 安元 健…………… 6

〈テクニカルレポート〉

- 「PS アフィニティー法が実現した高活性な MSC 由来エクソソームの精製
—エクソソーム再生医療における全く新たな戦略の提案—」 山根 昌之、石止 貴将…………… 10
- 「蛍光顕微鏡を必要としない高感度な未分化細胞染色キット Human ES/iPS Cell Staining Kit-BF の使用例について」 吉居 華子…………… 12

【連載】

〈遺伝子解析 新技術とその応用〉

- 「第2回 Cas9 タンパク質と gRNA のトランスフェクション試薬 GenomONE[®]-GE」 近藤 由隆…………… 14
- 〈ミクログリア研究の最前線 —基礎から臨床へ—〉
- 「第2回 ミクログリアの発生活起源と脳疾患」 高田 和幸…………… 16

【化学大家】

- 「スタニズラオ・カニツァーロ」 羽場 宏光…………… 28

【製品紹介】

有機合成

- ホスホニウム系縮合剤「PyFOP」…………… 18
- Pd/C, 球状、Pt/C, 球状…………… 19

培養

- PRIME-XV MSC XSFM MDF1…………… 22
- IS Sf Insect…………… 22
- BalanCD HEK293 シリーズ…………… 24
- Cepallet[®] シリーズ…………… 24

環境・分析

- 生薬試験用試薬…………… 20
- ポジティブリスト関連農薬・動物用医薬品標準品…………… 20
- 水道法対応 JCSS…………… 21

免疫

- レビス[®] Human IFN- γ ELISA Kit…………… 21
- 抗 CD9, ラットモノクローナル抗体 (77B)…………… 26
- 抗インテグリン $\alpha 8 \cdot \alpha 9$, モノクローナル抗体…………… 27
- 抗 Claudin-5, モノクローナル抗体 (R9/M48)…………… 32

【お知らせ】

- 生薬試験用試薬カタログのご案内…………… 20

1 はじめに

不均一系触媒は、簡便な操作のみで回収、再使用が可能なることから、環境調和型の有機合成において中心的な役割を果たすことが期待される。また、不均一系触媒は連続フロー合成やコンビナトリアル合成などの次世代型の有機合成にも応用される。そのような中、金属ナノ粒子が精密有機合成において、高活性で頑強性の高い不均一系触媒として注目を集めている。金属ナノ粒子は単独では不安定で速やかに凝集を起こしてしまうことから、触媒として用いる場合は安定化が必須であり、我々は、金属ナノ粒子触媒を精密有機合成化学に用いることを目的に、担体として有機高分子に注目した¹⁾。高分子を金属ナノ粒子の安定化剤として用いる場合、高分子残基と金属ナノ粒子との相互作用が強すぎると、反応基質のナノ粒子表面への相互作用が阻害され、高い触媒回転が期待できない。そこで、比較的弱い多点での相互作用で金属ナノ粒子を安定化することのできるポリシランを用いることで、基質が容易にクラスター表面にアクセス可能となると考えた。ポリシランを担体として用いた場合、ポリフェニルメチルシラン (MPPSi) に加え²⁾、芳香環を有しないポリジメチルシラン (DMPSi) を担体として用いた場合でも金属ナノ粒子が安定に担持されることから、ポリシラン中のケイ素-ケイ素結合もナノ粒子の安定化に寄与していると考えられる³⁾。実際、透過型電子顕微鏡分析における走査像観測装置及び、エネルギー分散型 X 線分析装置によって金属ナノ粒子は主にポリシラン部位に担持、安定化されていることが明らかとなっている³⁾。

芳香環の水素化 (核水添) 反応は、石油化学、水素貯蔵-輸送技術をはじめ、医薬品合成や天然物合成等の有機合成化学においても重要である⁴⁾。中

でも複数の官能基が存在する複雑な有機化合物において、芳香環やヘテロ芳香環を選択的に水素化する反応は、医薬品原薬 (API) 等の生物活性化合物の合成においても新たな戦略を与える。しかし、このような生物活性物質に多く含まれるピリジン、アミド、エステル、カルボン酸、アミン、アルコールといった極性官能基は、金属との相互作用が強く触媒毒となり得る。ベンゼンやトルエンといった比較的単純な芳香族化合物の水素化反応は均一系、不均一系遷移金属触媒によって進行することが見出されているが⁵⁾、様々な官能基を有する芳香族化合物の水素化を可能とする不均一系触媒の例は非常に限られている。さらに、2つ以上の芳香環を有する化合物における選択的な水素化反応についての一般的な知見は少なく、その予測も難しい。したがって、そのような選択的な水素化が可能となれば、多段階合成における終盤での選択的な芳香環の還元も可能となり、合成戦略が広がると考えられる。

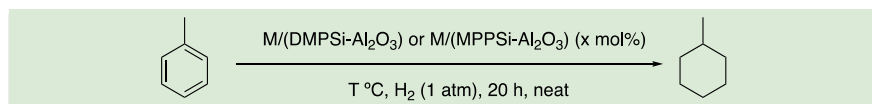
一方で、不均一系触媒をカラムに充填して基質を流通させることで目的物を連続的に得る連続フロー合成は、通常のバッチ法に比べて数々の利点があり、不均一系触媒を用いる反応として

も理想的である^{2,3,6)}。ここで用いる触媒には、触媒カラム内で反応を完結させることができる高い触媒回転頻度 (TOF)、および、長時間の反応において活性の低下なく反応を連続的に進行させることができる高い耐久性と触媒回転数 (TON) が求められる。

2 ポリシラン固定化金属ナノ粒子による芳香環の水素化反応

ロジウム、白金、パラジウム、およびロジウム-白金合金ナノ粒子をポリシラン-アルミナ複合担体に担持した触媒を、トルエンの水素化反応で活性を評価した (Table 1)。その結果、白金、パラジウムの単金属ナノ粒子触媒はほとんど活性を示さなかったが (Entries 2 and 3)、0.025 mol% のロジウムナノ粒子触媒を用いることで、目的のメチルシクロヘキサンが常温、常圧水素といった穏和な条件下、中程度の収率で得られた (Entry 1)。一方、DMPSi および MPPSi に担持したロジウム-白金合金ナノ粒子触媒は、同反応条件下、どちらも良好な収率で目的物を与えた (Entries 4 and 5)。反応温度を 50°C に上昇させて、これら二種類の触媒の活性を比較したところ、DMPSi に担持した触媒は定量

Table 1. ポリシラン触媒の活性評価



Entry	Catalyst (M; ポリシラン)	Rh (M) (x, mol%)	Temp (°C)	Yield (%) ^[a]	TON ^[c]
1	Rh; DMPSi	0.025	30	40	1,600
2	Pt; DMPSi	0.025	30	2	64 (/Pt)
3	Pd; DMPSi	0.025	30	0	0
4	Rh-Pt; DMPSi	0.025 (0.008 Pt)	30	76	3,020
5	Rh-Pt; MPPSi	0.025 (0.008 Pt)	30	72	2,880
6	Rh-Pt; DMPSi	0.025 (0.008 Pt)	50	99	3,960
7	Rh-Pt; MPPSi	0.025 (0.008 Pt)	50	77	3,080
8 ^[b]	Rh-Pt; DMPSi	0.00625 (0.0021 Pt)	50	>99	16,000 (198,193) ^[d]

[a] Determined by GC analysis. [b] Reaction time 60 h. [c] Defined as moles of reacted toluene per mole of Rh. [d] Defined as moles of reacted H₂ per mole of active site of catalyst.

的に目的物を与えたのに対し、MPPSiに担持した触媒は中程度の収率にとどまった (Entries 6 and 7)。Rh-Pt/(DMPSi-Al₂O₃) 触媒 (0.00625 mol%) を用いて反応を行ったところ、60 時間で定量的に目的物が得られ、その時の触媒回転数 (TON) は 16,000 (トルエンを基準として) であった (Entry 8)。また、水素吸着によって Rh-Pt/(DMPSi-Al₂O₃) 触媒の活性点を測定したところ、0.0155 mmol/g であり、活性点あたりの反応した水素のモル数は 198,193 であった。

3 連続フロー系における触媒の高耐久性と基質一般性

次に、触媒をカラムに充填して、基質であるトルエンと水素ガスを直接流通させることで反応を行う連続フロー系で反応を行った (Figure 1)。触媒を充填したカラムは 70 °C に維持し反応を行ったところ、50 日以上にわたって定量的に目的のメチルシクロヘキサンを与えた。その時の触媒回転数 (TON) は 347,149 (トルエンを基準として)、活性点あたりの反応した水素のモル数は 9,981,553 で、約一千万に達することがわかった。

次にバッチ、およびフロー系にて基質一般性の検討を行った (Table 2)。ベンゼンおよび一置換ベンゼンは、バッチ、フロー系どちらも高い収率で水素化反応が進行した (2a-2e)。高高い置換基を有する 2d、2e においては、バッチ系では原料が残存したのに対し、フロー系では定量的に目的物が得られた。para-, meta- キシレンはどちらの系でも定量的に目的物が得られたが、ortho- キシレンやメシチレンについては、フロー系では定量的に目的物が得られたのに対し、バッチ系では低収率にとどまった (2f-2i)。いずれも、立体的な障害が大きい基質においては、フロー系が良い結果を与えた。電子供与基、吸引基を有する基質で

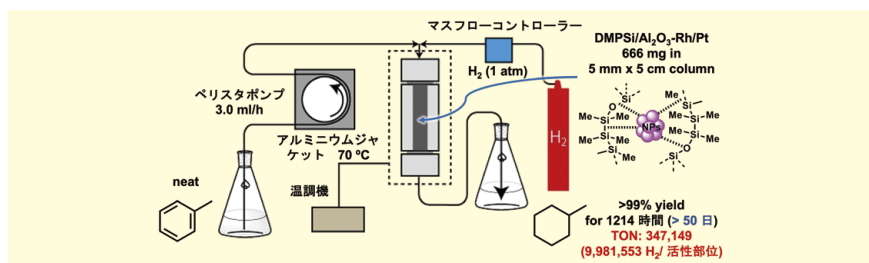


Figure 1. 連続フロー系での芳香環水素化反応

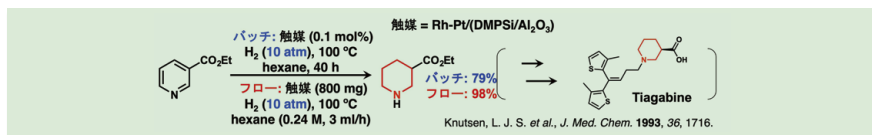
Table 2. 基質一般性

aromatic compounds		Rh-Pt/(DMPSi-Al ₂ O ₃) (x mol% as Rh)		saturated compounds	
		T °C, H ₂ (P atm), t h, neat or solvent			
バッチ: 触媒 (Rh: 0.1-1 mol%), H ₂ (1 atm), neat, 24 h, 50 °C フロー: 触媒 (600-800 mg), neat, H ₂ (1 atm), 3.0 ml/h, 70 °C 触媒 = Rh-Pt/(DMPSi/Al ₂ O ₃) c:t シス: トランス					
2a	2b	2c	2d	2e	
>99%	>99%	99% (64 h)	86%	86%	
>99%	>99%	>99%	>99%	>99%	
2f	2g	2h	2i	2j	
>99% ^a	>99% ^a	22%	45%	99%	
(c:t = 68:32)	(c:t = 78:22)	(c:t = 92:8)	(c:t = 88:12)		
>99%	>99%	>99%	>99%	>99%	
(c:t = 64:36)	(c:t = 77:23)	(c:t = 89:11)	(c:t = 75:25)		
2k	2l	2m	2n	2o	2p
94%	99%	>99%	83%	95%	90%
>99%	98%	>99%	(10 atm, 80 °C)	95%	(36 h)
>99%			10 atm to 1 atm	95%	>99%
バッチ: 触媒 (Rh: 0.1-1 mol%), H ₂ 触媒 = Rh-Pt/(DMPSi/Al ₂ O ₃) CPME: cyclopentylmethylether					
2q	2r	2s	2t	2u	
91% (neat, 10 atm, 80 °C)	83% (neat, 20 atm, 120 °C)	93% (AcOEt, 10 atm, 80 °C)	95% (AcOEt, 10 atm, 80 °C)	94% (CPME, 1 atm, 50 °C)	
2v	2w	2z	2aa	2ab	2ac
95% (CPME, 1 atm, 50 °C)	59%	41%	99% (neat, 1 atm, 50 °C)	99% (CPME, 1 atm, 50 °C)	99% (CPME, 1 atm, 50 °C)
2ad	2ae	2af	2ag	2ah	2ai
99% (neat, 10 atm, 80 °C)	99% (neat, 1 atm, 50 °C)	99% (neat, 1 atm, 50 °C)	86% (neat, 4 atm, 80 °C)	96% (neat, 10 atm, 80 °C)	76% (neat, 20 atm, 120 °C)

は、いずれもバッチ、フロー系共に良好な結果が得られた (2j-2l)。ヘテロ芳香環を有する基質は、フロー系のほうが良い結果を与えた (2m-2p)。特に、ピロールについてはバッチ系では高圧条件を必要とするのに対し、フロー系では 1 気圧水素で定量的に反応が進行した。アミノ基やカルボキシル基を有する基質では、いずれの場合も良好な収率で水素化反応が進行した (2q-2v、2aa-2ac)。アニリンを用いた

場合は、シクロヘキシルアミンと、ジシクロヘキシルアミンの混合物として得られた (2w、2z)。フェノールやフェニルエーテルでは、いずれも良好な収率で目的物を与えた (2ad-2ag)。キノリンやイソキノリンは二分子の水素と反応し、いずれもヘテロ芳香環のみが還元された (2ah、2ai)。

一方、3-エチルニコチネートの水素化反応は、得られる生成物が様々な生理活性物質に誘導できることから、重



Scheme 1. 生理活性物質合成中間体合成

要な反応である。これまで、本反応のいくつかの触媒が開発されてきたが、いずれも 100 気圧を超える水素を必要としていた^{4e, 7)}。それに対し、Rh-Pt/(DMPSi-Al₂O₃) 触媒においては、10 気圧の水素で反応が進行し、バッチ系では良好な収率で、フロー系ではほぼ定量的に目的物が得られた (Scheme 1)。

4 フロー系における特異な反応加速

基質一般性の検討においても、バッチ系に比べフロー系が高い収率を与えることが多かったが、より定量的にバッチ系とフロー系での触媒回転頻度 (TOF) の違いを 4 つの異なる種類の基質に対して計測し、比較することとした (Table 3)。

標準的な一置換ベンゼンであるトルエンにおいては、バッチ系に対し、フロー系では 5.4 倍の TOF が得られた。より高い基質である *ortho*-キシレンにおいては、バッチ系での反応速度はトルエンに対しおよそ 7 分の 1 であったが、フロー系ではバッチ系に対し 7.1 倍の反応加速が観測された。さらに、ヘテロ原子を有するピロールや *N*-メチルアニリンは、バッチ系ではより反応性が低かったが、フロー系ではバッチ系に対し 27 倍の大幅な反応加速が観測された。これらの結果から、高い基質や、触媒と強く相互作用し、触媒毒となり得るヘテロ原子を有する基質ほど、フロー系での反応加速効果が大きくなることがわかった。

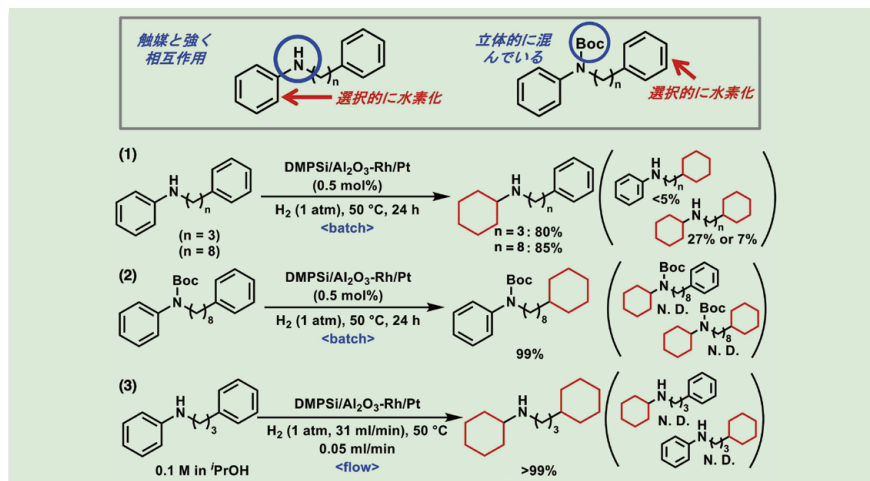
5 基質の吸着特性による選択的芳香環水素化

Table 3 において、基質の性質によって反応性が大きく異なることがわ

かった。そこで、同一分子中に二種類の異なる環境に存在する芳香環のどちらか一方を選択的に還元できないかと考えた (Scheme 2)。アニリン構造とアルキルベンゼン構造を同一分子内に有する基質を用いたところ、アニリン部位のみが選択的に水素化された生成物が優先して得られた (式(1))。これはアニリン部位がより強く触媒表面に吸着したためと考えられる。一方、アニリン部位を Boc 基で保護したところ選択性が逆転した (式(2))。これは、Boc 基の立体障害により、アニリン部位の触媒への吸着が阻害され、ア

Table 3. バッチ系とフロー系での TOF 比較

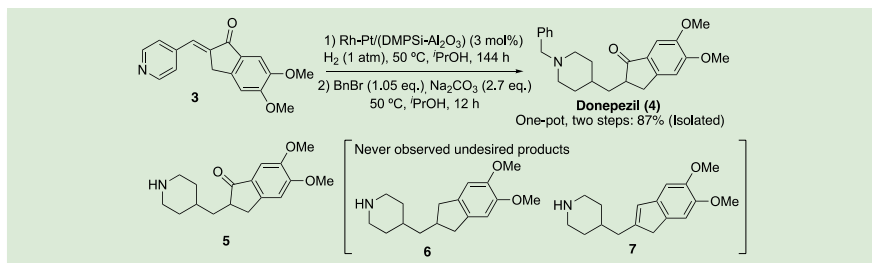
反応条件 (バッチ, フロー系共に): 50 °C, neat, H ₂ (1 atm)				
Substrate	Product	TOF (Batch)	TOF (Flow)	TOF (Flow)/TOF (Batch)
		221 h ⁻¹	1189 h ⁻¹	5.4
		30 h ⁻¹	213 h ⁻¹	7.1
		22 h ⁻¹	593 h ⁻¹	27
		14 h ⁻¹	378 h ⁻¹	27



Scheme 2. 同一分子内に存在する 2 つの芳香環の選択的水素化

ルキルベンゼン部位のみが還元されたためと考えられる。一方、反応をフロー系で行ったところ、バッチ系より反応性が高まったため、どちらの芳香環も水素化された (式(3))。以上のように、保護基の有無や反応系を変えることで、三種類の選択性を自在に制御することができた。

さらに、このような選択的な芳香環水素化反応を実際の医薬品原体 (API) 合成に応用した (Scheme 3)。安価な原料からアルドール縮合によって合成可能な基質 **3** は、4 つの水素化される官能基を有する (ピリジン環、オレフィン、ケトン、1,2-ジメトキシベンゼン環)。Rh-Pt/(DMPSi-Al₂O₃) 触媒を用い、水素化反応を行ったところ、ピリジン部位とオレフィンのみが選択的に還元された化合物 **5** が優先的に得



Scheme 3. Donepezil のワンポット合成

られた。これまで報告されている文献によると、化合物 **6** や **7** が副生成物として得られ、その選択性の制御が困難であったが⁸⁾、Rh-Pt/(DMPSi-Al₂O₃) 触媒を用いた場合はこれらの副生成物は生成しなかった。化合物 **5** は触媒を除去することなく、引き続きワンポットでのベンジル化反応を行うことで、API である Donepezil (**4**) を 87% (2 段階) で得ることができた。

6 おわりに

以上のように、我々は芳香族化合物の水素化に有効な、白金/ロジウム二元金属ナノ粒子をポリシラン/アルミナ複合担体に固定化した触媒 (Rh-Pt/(DMPSi-Al₂O₃)) を開発した⁹⁾。本触媒は、トルエンを始めとする芳香族炭化水素やピリジン等のヘテロ芳香環の水素化反応において、穏和な条件下 (無溶媒、1 気圧水素、50-80°C) で高い活性を示した。カラムに本触媒を充填し、基質と水素を流通させることで反応を行う連続フロー反応を行ったところ、バッチ反応に比べ大幅な触媒回転速度の向上が確認され、50 日を超

える連続反応においても触媒活性の低下は見られなかった。さらに、同一分子内に二種類の異なる環境に存在する芳香環を持つ基質において、本触媒を用いることで選択的に片方、もしくは両方を水素化できることを見出した。

【参考文献】

- (a) Kobayashi, S. *et al.* : *Aldrichimica Acta*, **46**, 3 (2013). (b) Kobayashi, S. *et al.* : *Chem. Rec.*, **10**, 271 (2010).
- (a) Oyamada, H. *et al.* : *Chem. Commun.*, 4297 (2006). (b) Oyamada, H. *et al.* : *Org. Biomol. Chem.*, **6**, 61 (2008). (c) Ueno, M. *et al.* : *Chem. Commun.*, 1647, (2008).
- Kobayashi, S. *et al.* : *ChemCatChem*, **7**, 4025 (2015).
- (a) Alhumaidan, F. *et al.* : *Energy Fuels*, **25**, 4217 (2011). (b) Qi, S.-C. *et al.* : *RSC Advances*, **3**, 14219 (2013). (c) Schröder, F. *et al.* : *Tetrahedron*, **54**, 5259 (1998). (d) O'Hagan, D. : *Nat. Prod. Rep.*, **17**, 435 (2000). (e) Ouchi, T. *et al.* : *Org. Process Res. Dev.*, **18**, 1560 (2014).
- (a) Baker, R. H. *et al.* : *J. Am. Chem. Soc.*, **69**, 1250 (1947). (b) Kitching, W. *et al.* : *J. Org. Chem.*, **47**, 5153 (1982). (c) Widegren, J. A. *et al.* : *J. Mol. Catal. A Chem.*, **191**, 187 (2003). (d) Eliaou, N. *et al.* : *J. Sol-Gel Sci. Technol.*, **35**, 159 (2005). (e) Motoyama, Y. *et al.* : *Chem. Lett.*, **35**, 876 (2006). (f) Park, I. S. *et al.* : *Adv. Synth. Catal.*, **349**, 2039 (2007). (g) Park, K. *et al.* : *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.*, **46**, 1152 (2007). (h) Takasaki, M. *et al.* : *Chem. Asian J.*, **2**, 1524 (2007). (i) Rossi, L.

- M. *et al.* : *J. Mol. Catal. A Chem.*, **298**, 69 (2009). (j) Savoia, D. *et al.* : *Synthesis*, **2009**, 2440 (2009). (k) Yoon, B. *et al.* : *J. Phys. Chem. C*, **113**, 1520 (2009). (l) Hubert, C. *et al.* : *Green Chem.*, **12**, 1167 (2010). (m) Zahmakiran, M. *et al.* : *Chem. Commun. (Camb.)*, **46**, 4788 (2010). (n) Champness, N. R. : *Dalton Trans.*, **40**, 10311 (2011). (o) Hubert, C. *et al.* : *Green Chem.*, **13**, 1766 (2011). (p) Yan, N. *et al.* : *Chem. Commun. (Camb.)*, **47**, 2529 (2011). (q) Zieliński, M. *et al.* : *ChemCatChem*, **3**, 1653 (2011). (r) Snelders, D. J. M. *et al.* : *ACS Catalysis*, **2**, 201 (2012). (s) Zahmakiran, M. *et al.* : *Langmuir*, **28**, 60 (2012). (t) Niembro, S. *et al.* : *New J. Chem.*, **37**, 278 (2013). (u) Das, P. *et al.* : *New J. Chem.*, **40**, 2850 (2016). (v) Hattori, T. *et al.* : *Eur. J. Org. Chem.*, **2015**, 2492 (2015). (w) Maegawa, T. *et al.* : *Chem. Eur. J.*, **15**, 6953 (2009).
- Oyamada, H. *et al.* : *Beilstein J. Org. Chem.*, **7**, 735 (2011).
 - Irfan, M. *et al.* : *Eur. J. Org. Chem.*, **2009**, 1327 (2009).
 - Elati, C. R. *et al.* : *Synth. Commun.*, **36**, 169 (2006).
 - Miyamura, H. *et al.* : *J. Am. Chem. Soc.*, **140**, 11325 (2018).

TOF (触媒回転頻度)

一つの触媒サイトにおいて単位時間あたりに生成物に変換できる分子数の最大値である。触媒の最高効率を表す。

TON (触媒回転数)

触媒が不活性化する前に、触媒 1 モルあたり (または触媒サイト 1 モルあたり) 変換できる物質のモル数 (または分子数) である。触媒の安定性 (寿命) を表す。

触媒毒

触媒と作用してその性能を低下させる物質。

核還元 (水添) 触媒

コード No.	品名	規格	容量	希望納入価格 (円)
186-03451	Rh-Pt/(DMPSi-Al ₂ O ₃)	有機合成用	1g	15,000
182-03453			5g	50,000

関連製品

フロー反応用触媒

コード No.	品名	規格	容量	希望納入価格 (円)	コード No.	品名	規格	容量	希望納入価格 (円)
169-28861	Pd/C, Beads (Pd 5%)	有機合成用	5g	22,000	162-28851	Pt/C, Beads (Pd 5%)	有機合成用	5g	照会
167-28862			25g	83,000	160-28852			25g	照会

RF: 2~10°C 保存 EF: 20°C 保存 SF: 80°C 保存 HF: 150°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、2020 年 10 月時点での情報です。最新情報は、当社 HP をご参照下さい。

今回、富士フィルム和光純薬の好意によって筆者のライフワークである「海洋生物毒研究」を紹介する機会を得ました。海洋生物毒には多彩な顔があります。化学構造や薬理作用の解明、食品衛生・公衆衛生面への対策、生態・生物学的意義の解明等があります。筆者の最大の関心事は「毒の化学構造」ですが、毒化の真犯人「=毒の生産者」を見つけ出す過程も楽しい作業でした。微小生物が毒を生産し、食物連鎖によって拡散するように、研究対象の毒も次々と繋がっていききました。本誌は専門的成果を述べる学術研究誌ではないので、筆者の個人史を含めた天然物化学の一面を伝える読み物として提供したいと考えました。

1 「シガテラ、Ciguatera」

高校3年の最後の夏休みに漁師と交わした「酔う魚」についての会話が、筆者の「マリントキシン研究」のすべての始まりでした。

夏休みを満喫しようと友人と諮って沖縄北端の小さな離島、伊平屋島を訪ね、連日のように海で泳いだり魚を釣ったりして遊びましたが、潮の流れなどの海の状況を知るためにたびたび漁師を訪ねました。その際に聞く、魚の種類や習性に纏わる豊富な話題は楽しみでした。中でも「酔う魚」の話には大いに興味をそそられました。まず、中毒に際して使う通常の表現は「魚に当たった」です。それを「酔う」と表現するのは体がだるく、節々が痛み、二日酔いに似る状態なので「酔う」と表現すると説明されました。特に奇妙なことは水に触れると感電したような痛みが走ることでした。中毒は特定の魚種に限定されず多くの種類で酔い、鮮度は問題ないが極地性がある、毒化地域は時々移動するとのことでした。

後日、この症状はカリブ海、インド洋、太平洋のサンゴ礁海域で多発する

特異な中毒「シガテラ」中毒と判明しました。新大陸に渡航する多くの船がカリブ海で停泊すると、新鮮な魚を喜んで食べた船員に中毒が多発しました。原因は解明されないままにコロンプス以来のミステリアスな中毒として知られ、第二次世界大戦の際に太平洋に展開した日米兵士の多数が中毒して一気に関心が高まりました。

1-a. 「毒化原因」

毒化魚はフグのような種特異性がなく、個体差や地域差も大きいので餌由来の毒と考えられました。しかし、毒を生産する生物や、毒の化学的性質などは全く不明でした。1950年代後半から仏領ポリネシアでは観光基地あるいは軍事基地として島の開発が進みましたが、それに伴って中毒は爆発的に増加しました。そこで、沖縄で「酔う魚」の調査を行った経験のある筆者がWHOの顧問に招かれて仏領ポリネシアに派遣されました。餌由来の毒を想定していたので、まず最初に魚の消化管内容物の顕微鏡観察と毒性試験を実施し、胃中に出現する円盤状単細胞生物が魚の毒性と高い相関を示すことを見出しました。毒性が特に高かったガンビエル諸島では、滑走路や航路開設のために土木工事が行われ、土砂のために大部分のサンゴが死滅し、石灰藻で覆われていました。その石灰藻の表面を例の円盤状生物が覆うように生育していました(図1)。

この生物は渦鞭毛藻と呼ばれる単細胞生物で新属新種でしたので採集地、円盤状の形状、毒性に因んで *Gambierdiscus toxicus* と命名しました。海底から採集した *G. toxicus* と有毒魚から抽出・精製した成分がNMRの比較でこれらが同一基本骨格と判定できたので、毒の起源(Ciguatoxin, CTX)と同定できました。採集した株は培養でCTXを生産しなかったため、有毒株を求めて再度仏領ポリネシアに赴き、有毒株を得ましたが、その間に8年が経過しました。*G. toxicus*

は広く分布していますが、現在、CTX生産株は世界でも数株しか知られておらず、培養による毒の供給にとって隘路となっています。

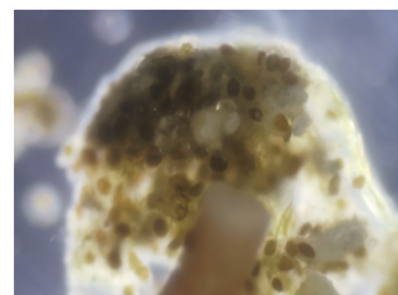
1-b. 「化学構造」

多くの魚種が毒化しますが、食物連鎖の頂点に位置するのはウツボです。その内臓に高濃度のCTXが蓄積するので抽出原料に最適でした。個体差と地域差が大きいので、有毒個体4tを収集するのに10年を費やしました。内臓124kgからは0.4mgのCTXが得られました。NMRを駆使して解明した構造を図2に示します。CTXは基本骨格の環構成が異なるCTX1B型とCTX3C型があり、いずれも食物連鎖を移行する間に代謝的修飾を受けます。LC-MS定量用の標準品として、5成分をqNMRで値付けしましたが、市販するだけの量は確保できず、必要に応じて関係諸機関に提供しています。また、LC-MSによる定量に取り組み、魚肉中0.01ppbという極めて厳しい基準値をクリアできています。

平間正博東北大学名誉教授のグループはCTX1B及びCTX3Cの全合成の偉業を達成しています。また、大阪府立大学の円谷健教授のグループは、分子両端の部分構造合成品を使用して、サンドウィッチELISAを完成しています。

1-c. 「作用」

CTXは電位依存性Na⁺チャネルに結合して脱分極から分極状態への復帰を阻害します。CTX1Bの化学構造を



石灰藻ヒメモサズキを覆い尽くす *G. toxicus*

図1. 石灰藻ヒメモサズキ上に密生する *G. toxicus*

図2に示します。マウス腹腔内投与による最小致死量 (0.4 μg/kg) はフグ毒テトロドトキシンを25倍上回っています。経口摂取による推定最小発症量はヒト成人で7ngでした。この強い毒性ため魚肉中の許容濃度は0.01ppbという非常に低い値が設定されていますので、測定は容易ではありません。

1-d. 「マイトトキシシ」

サンゴ礁で普通に見かける小型魚のサザナミハギは捕獲しやすいこと、皮下脂肪が焼いたときに香ばしいためにタヒチでは愛好されています。タヒチにおけるシガテラの原因の60%以上を占めていたこともあります。肉食魚のハタやウツボに比べて中毒症状が軽微なことも好んで食された理由です。サザナミハギで代表される藻食魚と食物連鎖上位の魚との間に見られる中毒症状の違いが、原因毒組成の違いに由来するのではないかとかねてから指摘されていました。筆者はサザナミハギの消化管内容物にはCTX群以外に極性の高い別種の成分があることを明らかにして、サザナミハギのタヒチ名「maito、マイト」に因んで「Maitotoxin、MTX」と命名しました。その後 *G. toxicus* の培養に成功し、藻体から単離して化学構造を解明できました (図3)。

ペプチドや多糖類のような単位構造の繰り返しを持たない天然物としては最大かつ最も複雑な化合物です。その活性 (マウス腹腔内投与毒性、溶血活性) も少数の細菌毒素を除くと類を見ない強烈な値です。経口毒性は弱いと考えられていますが、中毒への実際の寄与は不明です。

薬理活性に関する初期の研究は大泉康東北大学名誉教授によって活発に行われました。ラット副腎皮質細胞 (PC12細胞)、その他の細胞を用いて、MTXが細胞外Ca²⁺の流入を招き、Ca²⁺非存在下では活性を示さないことを見出しました。MTXにイオノフォア活性はなく、ベラパミルなどの

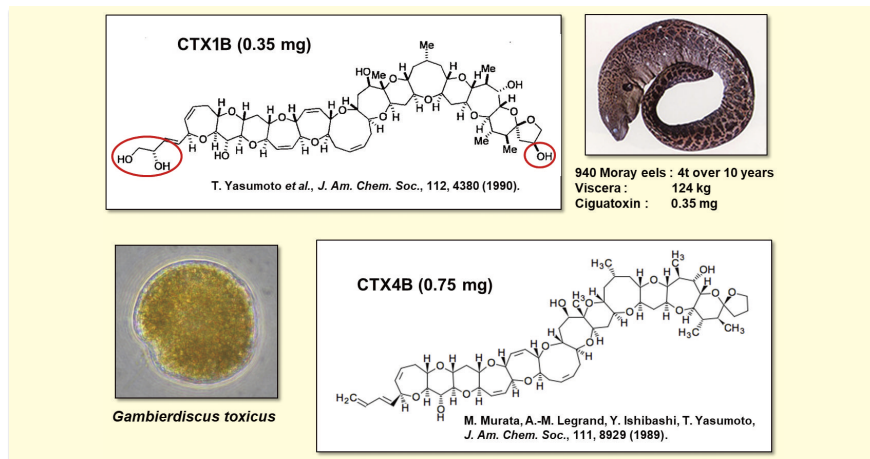


図2. ウツボから得た主成分 CTX1B と *G. toxicus* が生産する CTX4B

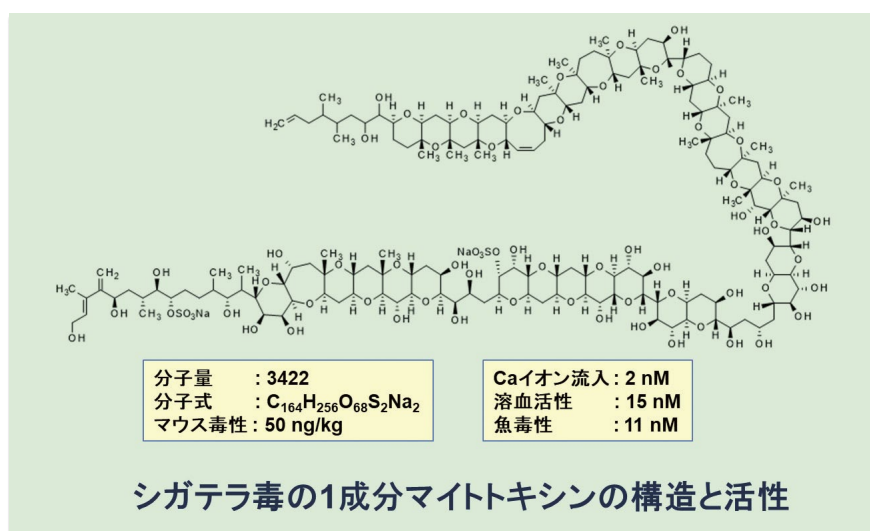


図3. マイトトキシシの化学構造

Ca²⁺遮断剤では完全には遮断されませんでした。Na⁺を介する活性もないので、未知のCa²⁺チャネルを活性化している可能性が指摘されました。NIHの故John Daly博士らはさらに多様な細胞系を用いて実験し、Ca²⁺チャネルを有しない細胞も含めてあらゆる細胞系でCa²⁺の流入をもたらすことを明らかにして、Ca²⁺が誘起する細胞現象の解明に有用であると指摘しました。しかし、MTXのその後の供給が途絶え、Daly氏も逝去されたのでその後の解明は進んでいません。また、筆者らが培養したMTX生産株は筆者の退官後に死滅しました。硫酸

エステルが脱離したMTXが最近報告されましたが、MTX生産株は誰も得ることができずにいます。特異なチャネル発見に有力な化合物だけに供給が継続されることを願っています。

2 シガテラから派生したマイトトキシシ研究

2-a. フグ毒 (Tetrodotoxin) の細菌起源

フグ毒 (Tetrodotoxin, TTX) は我が国のみならず世界で最も良く知られたマイトトキシシです。長年、フグが生産していると考えられていましたが、筆者はシガテラの研究の際に外部

起源であることに気づきました。多くのサンゴ礁魚について CTX や MTX の分布を調べた際に、フグ科ではない熱帯魚のサザナミヤッコやナンヨウブダイ内臓に水溶性の急性毒が出現し、フグ毒によく似た症状でマウスを殺すことに気づきました。後日、TTX 蛍光分析装置を自作して分析し、TTX に一致することを確認しました。東北大学の地元、宮城県産のフグでも TTX 含量は顕著な地域差を示しました。更に、フグには TTX と異なるマヒ性貝毒のサキシトキシン (Saxitoxin, STX) が共存することが多く、両毒の比率は地域によって大きく異なりました (図 4)。このことから TTX はシガテラの CTX と同様に食物連鎖を介して蓄積したと推定して、起源を探る研究を開始しました。

シガテラの発生する南西諸島やフィリピンではオオギガニ類が TTX を蓄積します。胃中に出現する石灰藻のヒメモサズキを分析して TTX の存在を確認しました。しかし、含量には地域差と季節差が大きいので、石灰藻への付着生物、細菌の可能性を疑い、細菌を分離・培養して 2 種の TTX 生産細菌を確認しました。細菌が起源であれば、多くの生物に移行・蓄積することが説明できます。近年では EU 諸国で養殖 2 枚貝の消化管に TTX が検出され、TTX 生産菌も分離されています。

低濃度とはいえ TTX の存在は食品衛生上の問題とされます。検出・定量には LC-MS が使用されますので、定量用標準品の作出が要望されています。TTX は吸湿性が強く正確な秤量は困難です。qNMR を適用するには TTX がヘミラクタール型と 10,7-ラクトン型との平衡混合物であり、2 組のシグナルを与えること、その比率は pH や温度で変化することに留意する必要があります。TTX と同時に出現する同族体群の同定・定量用標準品の作成も必要ですが、達成は容易でなく大きな課題です。

2-b. パリトキシン類縁体の発見と起源の考察

パリトキシン (Palytoxin, PLTx, $C_{129}H_{223}N_3O_{54}$) は、ハワイ大学の D. Moore 教授と名古屋大学の故平田義正・上村大輔教授グループの日米研究者の競演によって構造が解明され、当時知られた最も複雑かつ猛毒の化合物として脚光を浴びました。さらに、構造決定後の時を経ずして発表された岸義人教授による全合成は驚きと賞賛で迎えられました。PLTx はハワイで猛毒な海藻 (実際は海藻ではなかった) についての伝承に基づいてスナギンチャクから発見されました。海岸の 30m 程度のごく狭いリーフの割れ目に生育するスナギンチャクだけが猛毒を有するとされていて、局地的な毒性

変化の大きさは PLTx の外部起源を示すと考えられました。真の生産者が何であるかが問題とされてきました。その後、筆者を含む多くの研究者によって PLTx と同族体が多様な生物から検出されています。

PLTx とシガテラ研究の接点は *G. toxicus* の発見にありました。*G. toxicus* は浮遊性のプランクトン生活をする大多数の渦鞭毛藻とは異なって、海藻表面に付着生育する珍しい生態を示します。*G. toxicus* の分布調査を行った際に多種の海藻付着性渦鞭毛藻を多数観察しました。その一種、*Ostreopsis siamensis* は *G. toxicus* に大きさや形状が酷似していました。培養して毒の本体を *Ostreocin* と名付けて化学構造を調べたところ、思いがけなくパリトキシンの類縁体と判明しました。さては PLTx の起源は渦鞭毛藻であろうかと期待しましたが化学構造の一部、メチル基と水酸基が異なっていました。その後、地中海で近縁種の *Ostreopsis ovata* が繁殖して海水浴客に健康被害が発生しました。二枚貝への蓄積も明らかになり、公衆衛生・食品衛生上の重大問題とされています (毒本体は *Ovatoxin* と命名された)。化学構造から見る限り *Ostreocin* 類と *Ovatoxin* 類はメチル基や水酸基が異なっているので PLTx の直接の前駆体ではありません。スナギンチャクには細菌、藍藻、渦鞭毛藻など多様な微小生物が共生しています。恐らく、共生藍藻が PLTx を生産すると思われますが、海産藍藻の培養は非常に困難なので起源の問題を完全に解決するのは当面困難です。なお、生化学・薬理学試験では PLTx が多用されてきましたが、有毒スナギンチャクの大量採取や PLTx の精製は極めて困難なので、将来の補給が心配です。

2-c. 下痢性貝毒とオカダ酸

1976 年に東北沿岸で二枚貝を原因とする下痢症が多発し、我々は下痢性貝毒 (Diarrhetic shellfish poisoning、

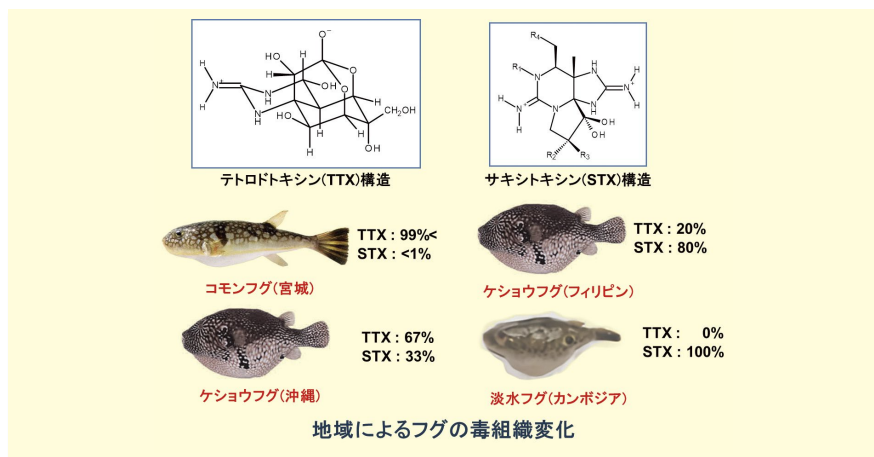


図 4. フグに出現する TTX と STX の地域変化

DSP) と名付けました。ほぼ同時期に EU でも同様な下痢症が多発し、スペインやフランスで数千人規模の観光客がバカンス先の海岸で被害に遭いました。現在では DSP はマヒ性貝毒に次ぐ重要な貝毒とされています。貝毒を精製して NMR スペクトルを初めて見たときに驚きました。タヒチで採集した底性渦鞭毛藻、*Prorocentrum lima* の有毒成分である海綿動物から得られた薬理活性成分として有名なオカダ酸 (Okadaic acid, OA) に酷似していたのです (図 5)。OA は Ca^{2+} 非存在下で平滑筋の収縮を招くことで注目されていました。我々が実際に貝から単離した化合物は 35-メチルオカダ酸でした。同時に Prorocentrolide と名付けた環状イミンも同定しました。面白いことに、研究室恒例の夏休みで三陸沿岸の民宿に滞在した際に茹でたムラサキイガイをビールのつまみにして食べたところ下痢をした事件がありました。腸炎ビブリオ菌の汚染を疑って茹でる時間を十分にとっても下痢をしました。そこで化学物質原因を疑い、この中毒を「下痢性貝毒」(DSP)、原因毒を Dinophysistoxin と名付けて追求しました。その結果、図 5 に示す 35-メチルオカダ酸 (DTX1) が同定されました (図 5)。毒の起源は渦鞭毛藻の *Dinophysis fortii* (図 6) と決定できたことが毒を Dinophysistoxin-1 (DTX1) と命名した理由です。*D. fortii* は実際に毒を生産せず、さらに微小な藻類を

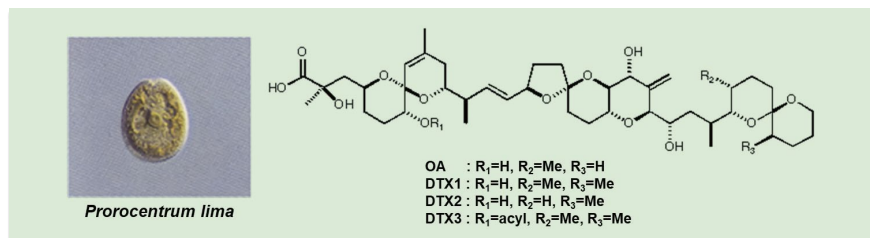


図 5. 底性渦鞭毛藻の *P. lima* はオカダ酸類を生産する

摂食して OA、DTX1 を蓄積します。培養が可能な *P. lima* は OA と DTX1 の両成分を生産しますので、LC-MS 定量用の標準品は *P. lima* の培養で生産されます。遙か南のシガテラ研究が足元の三陸沿岸の食中毒と繋がったのは意外でした。



図 6. 下痢性貝毒の主要原因プランクトン *D. fortii*

6 おわりに

マリントキシンは強力かつ特異的な活性を有するので生化学・薬理学試薬あるいは食品・公衆衛生監視試薬として重要です。抽出原料となる有毒魚介の入手は極端に困難ですが、近年の各種分析手段の進歩によって、本稿に述べたマイトトキシンのような超微量な試料でも活用の機会が得られるのは喜ばしいことです。

【参考文献】

- 1) Yasumoto, T.: *Chemical Record*, **1**, 228 (2001).
- 2) Yasumoto, T.: *Proc. Japan Acad. Ser. B.*, **81**, 43 (2005).
- 3) Yasumoto, T., Nagai, H., Yasumura, T., Michishita, T., Endo, A. and Yotsu, M.: *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **479**, 44 (1986).
- 4) Takahashi, M., Ohizumi, Y. and Yasumoto, T.: *J. Biol. Chem.*, **257**, 7287 (1982).
- 5) Gusovsky, F. and Daly, J.: *Biochem. Pharmacol.*, **39**, 1633 (1990).
- 6) Yokoyama, A., Murata, M., Oshima, Y., Iwashita, T. and Yasumoto, T.: *J. Biochem.*, **104**, 184 (1988).
- 7) 上村大輔、平田義正: *現代化学*, **145**, 14 (1983).
- 8) Moore, R. E.: "Progress in the chemistry of Organic Natural Products.", Springer-Verlag, Wien/New York, Vol. 48, p. 81 (1985).
- 9) Usami, M., Ishibashi, S., Inoue, A., Kan, Y. and Yasumoto, T.: *J. Am. Chem. Soc.*, **117**, 5389 (1995).
- 10) Yasumoto, T., Murata, M., Oshima, Y., Matsumoto, G. and Clardy, J.: "Seafood toxins, ACS Symposium series.", American Chemical Society, Washington, Vol. 262, p. 207 (1984).

マリントキシン関連製品



コード No.	品名	規格 / メーカー	容量	希望納入価格 (円)
038-25801	CiguatoxinCTX 1B	生化学用	100ng	30,000
030-21581	CiguatoxinCTX 3C	生化学用	100ng	34,000
382-14341	CTX-ELISA 1B	株式会社セルサイエンス	1キット	120,000
042-33671	Dinophysistoxin-1	生化学用	100μg	54,000
131-19011	Maitotoxin	生化学用	10μg	30,000

☑: 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確認する証が必要です。

コード No.	品名	規格 / メーカー	容量	希望納入価格 (円)
156-03551	OA・DTX1 Mixture Standard Solution (each 1mg/L Methanol Solution)	食品分析用	2mL	24,000
152-03271	Okadaic Acid	生化学用	25μg	16,600
158-03273	Okadaic Acid	生化学用	100μg	48,000
165-26141	Palytoxin	生化学用	100μg	57,300
206-11071	Tetrodotoxin	生化学用	1mg	38,600

☑: 2~10℃保存 ☑: 20℃保存 ☑: 80℃保存 ☑: 150℃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、2020年10月時点での情報です。最新情報は、当社HPをご参照下さい。

PSアフィニティー法が実現した高活性なMSC由来エクソソームの精製 —エクソソーム再生医療における全く新たな戦略の提案—

富士フィルム和光純薬株式会社 導入品推進部 学術課 山根 昌之
ライフサイエンス研究所 石止 貴将

細胞外小胞のひとつであるエクソソームは、細胞が放出する脂質二重膜の小胞体である。近年、間葉系幹細胞 (Mesenchymal stem cell : MSC) など一部の細胞に由来するエクソソームに治療効果が存在することが示されたことから、エクソソームを利用した再生医療が注目されている。本稿では当社が開発したエクソソーム精製技術であるPSアフィニティー法の利点と最近明らかになった再生医療における有用性について紹介する。

◆エクソソーム

エクソソームは細胞から放出されるCD9、CD63、及びCD81などをマーカータンパク質とした直径30～100nmの脂質二重膜の小胞体である¹⁾。エクソソームはタンパク質やDNA、RNA、さらには脂質といった細胞由来成分を含んでおり、これらの受け渡しによる細胞間情報伝達に関与すると考えられている²⁾。

◆MSC由来エクソソーム

MSCは、脂肪、骨、及び軟骨への分化が可能な中胚葉由来の幹細胞である。MSCは骨髄や脂肪、臍帯から樹立できることから再生医療のソースとして期待されている。このMSCは免疫抑制や抗炎症、抗線維化といった効果を有することが知られているが、近年これらがエクソソームによるものであることが示されている³⁾。このことから、MSC由来エクソソームを利用する再生医療が注目されはじめています。

◆新規エクソソーム精製手法 (PSアフィニティー法)

エクソソームの精製には、古くから用いられてきた超遠心分離法をはじめ、密度勾配分離法や表面抗原を利用した抗体アフィニティー法などが知られているが⁴⁾、いずれも回収率、精製純度、インタクトな粒子の取得、再現性においてそれぞれ課題を有している。これに対し当社は、エクソソームの表面に存在するホスファチジルセリン (Phosphatidylserine : PS) を利用

した新たな精製手法であるPSアフィニティー法を金沢大学の華山教授らと共同開発した⁵⁾。PSアフィニティー法ではカルシウム依存的にPSに結合するTim4タンパク質が使用される。このTim4タンパク質はPSに対して強力に結合する一方、EDTAのようなカルシウムキレート剤の作用によりその結合が乖離する。このような性質を利用して、回収率、精製純度、インタクトな粒子の取得、再現性において従来法より有効なエクソソーム精製が可能になった (図1)。

◆PSアフィニティー法が実現した高活性なMSC由来エクソソームの精製

今回当社が新たに明らかにしたMSC由来エクソソームの精製にお

けるPSアフィニティー法の有用性について以下に紹介する。はじめに、骨髄由来MSCの培養上清からPSアフィニティー法及び超遠心分離法で精製を行い、PSアフィニティー法を応用したエクソソーム定量技術であるPS ELISA法 (図2A) によりエクソソーム回収率の比較を行った。CD9、CD63及びCD81の検出からエクソソームの定量解析を行ったところ、超遠心分離法では40%程度の回収率であるのに対し、PSアフィニティー法では80%以上と極めて高い回収率を示すことが確認された (図2B)。

さらに、両手法で精製したMSC由来エクソソームの活性を比較するため、ヒト末梢血由来単核球 (PBMC)

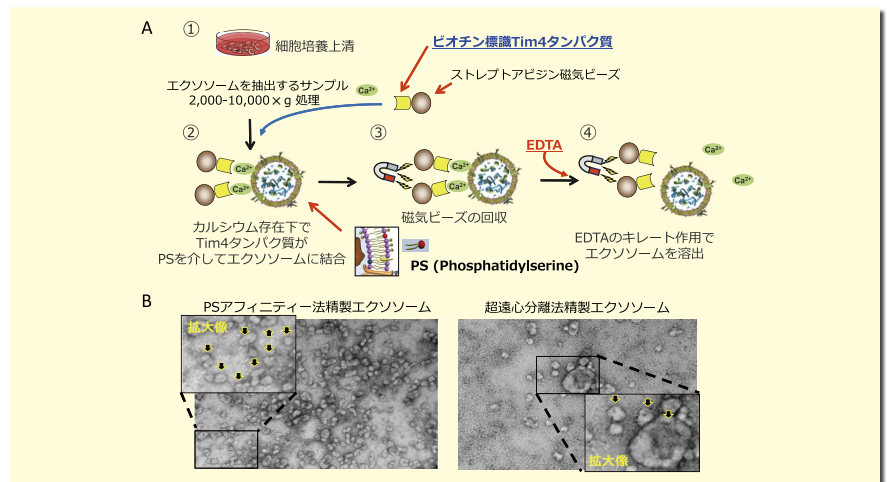


図1. A) PSアフィニティー法によるエクソソーム精製のフロー。B) PSアフィニティー法、及び超遠心分離法により精製したCOLO201細胞株由来エクソソームを透過型電子顕微鏡により撮影した像。矢印はエクソソームを示す。

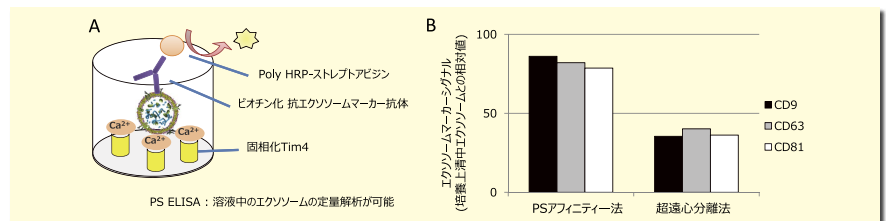


図2. A) PS ELISA法の原理。固相化したTim4タンパク質で捕捉したエクソソームを表面抗原を認識する抗体で検出することで定量解析を行う当社独自の技術。B) PS ELISA法によりPSアフィニティー法、超遠心分離法それぞれの手法で精製したMSC由来エクソソームを定量した結果。検出には抗CD9抗体、抗CD63抗体、抗CD81抗体を使用。グラフは培地中のエクソソームとの相対値。PS ELISA法: PS Capture™ Exosome ELISA Kit (Streptavidin HRP) (コードNo. 298-80601; 抗CD63抗体付属); 抗CD9抗体 (コードNo. 019-27953)、抗CD81抗体 (コードNo. 011-28111)

由来単球を用いた抗炎症効果及びヒト胎児肺由来正常線維芽細胞 (TIG3 細胞) を用いた抗線維化効果の検討を実施した。その結果、PS アフィニティー法で精製した MSC 由来エクソソームが超遠心分離精製エクソソームに比べ、極めて高い活性を有していることが明らかとなった (図 3, 図 4)。

以上の結果は、PS アフィニティー法が MSC 由来エクソソームを高回収率かつ高活性を保持した状態で精製することが可能であることを意味する。逆に言えば、従来法の課題である低い回収率に加え、超遠心の物理的ダメージによる MSC 由来エクソソームの活性低下が今回改めて浮き彫りになったものと考えられる。よって、当社が開発した PS アフィニティー法は、今後のエクソソーム治療分野において、革新的な技術に成り得るポテンシャルを十分に秘めていると言える。

◆最後に

繰り返しになるが、エクソソームを用いた再生医療が注目される一方で、現状では超遠心分離法といった古典的な精製手法が依然として広く利用されている⁶⁾。これに対して当社が開発した PS アフィニティー法は、エクソソームの回収率、精製純度、インタクトな粒子の取得、再現性に優れた精製手法であり、従来法の問題点である低い回収率と活性低下を解決した理想的

な手法である。今後再生医療に最適化したエクソソーム精製技術が必要になることが予想されるが、PS アフィニティー法が極めて強力な技術ツールになることを期待している。

【参考文献】

1) Colombo, M. et al. : *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, **30**, 255 (2014).

- 2) Mathieu, M. et al. : *Nat. Cell Biol.*, **21** (1), 9 (2019).
 3) Phinney, D. G. and Pittenger, M. F. : *Stem Cells*, **35** (4), 851 (2017).
 4) Thery, C. et al. : *Curr. Protoc. Cell Biol.*, **30** (1), 3.22.1 (2006).
 5) Nakai, W. et al. : *Sci. Rep.*, **6**, 33935 (2016).
 6) Fujita, Y. et al. : *J. Clin. Med.*, **7** (10), 355 (2018).

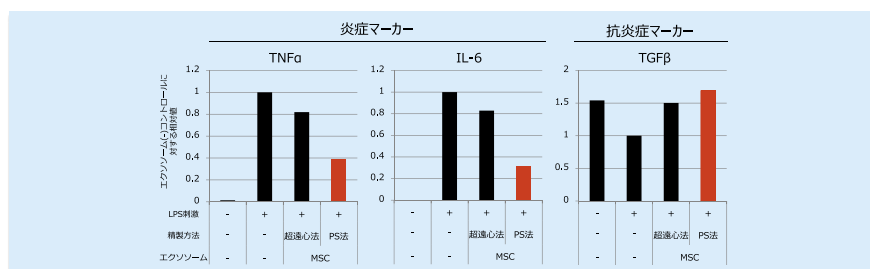


図3. PBMC 由来単球を LPS で刺激して誘導した炎症に対する MSC 由来エクソソームの効果を定量 PCR により検討した結果

各手法で精製した MSC 由来エクソソームを 4.5×10^8 particles/mL で添加している。TNF α 、IL-6 の上昇、及び TGF β の低下は MSC 由来エクソソームにより抑制されることを確認した。さらにこのような効果は超遠心分離法に比べ PS アフィニティー法で精製したエクソソームがより強力であることも確認した。超遠心法：超遠心分離法、PS 法：PS アフィニティー法

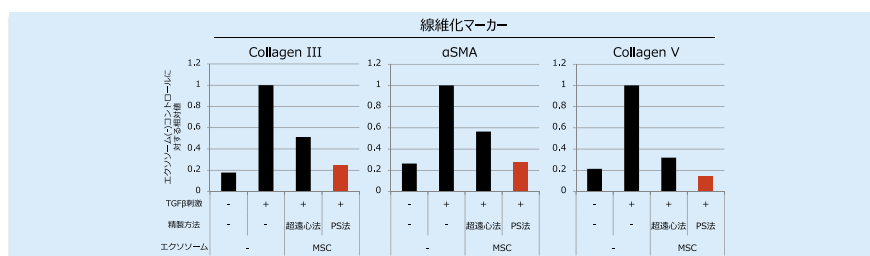


図4. TIG3 細胞を TGF β で刺激して誘導した線維化関連遺伝子の上昇に対する MSC 由来エクソソームの効果を定量 PCR により検討した結果

各手法で精製した MSC 由来エクソソームを 1×10^9 particles/mL で添加している。Collagen III、 α SMA、Collagen V の上昇は MSC 由来エクソソームにより抑制されることを確認した。さらにこのような効果は超遠心分離法に比べ PS アフィニティー法で精製したエクソソームがより強力であることも確認した。超遠心法：超遠心分離法、PS 法：PS アフィニティー法

エクソソーム関連製品



—高純度エクソソーム精製キット—超遠心不要—

コード No.	品名	規格	容量	希望納入価格 (円)
299-77603	MagCapture™ Exosome Isolation Kit PS	Ref	2回用	20,000
293-77601			10回用	80,000

—高感度検出—エクソソームELISAキット

コード No.	品名	規格	容量	希望納入価格 (円)
298-80601	PS Capture™ Exosome ELISA Kit (Streptavidine HRP)	Ref	96回用	58,000

—抗体製品

当社では、エクソソーム関連抗体を多数取扱っています。
 当社 HP をご覧下さい。

エクソソーム 抗体 和光

Ref: 2~10℃保存 F: 20℃保存 S: 80℃保存 H: 150℃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、2020年10月時点での情報です。最新情報は、当社HPをご参照下さい。

蛍光顕微鏡を必要としない高感度な未分化細胞染色キット Human ES/iPS Cell Staining Kit-BF の使用例について

富士フイルム和光純薬株式会社 ライフサイエンス研究所 吉居 華子

◆はじめに

近年、ヒト ES 細胞や iPS 細胞などを細胞源とした再生医療への期待が高まり、細胞加工製品（再生医療等製品）の研究開発・実用化が急速に進展している。実際にヒト ES/iPS 細胞を用いた治験が実施されるようになってきたが、その一方で、再生医療等製品の安全性と品質の評価方法は確立していないのが現状である。今回、当社で開発した Human ES/iPS Cell Staining Kit-BF は、簡易的にかつ高感度に未分化細胞を検出でき、再生医療の安全性向上への貢献が期待される。本稿では本キットの使用方法について紹介する。

◆未分化マーカー rBC2LCN

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体レクチンである（コード No. 029-18061、025-18063）。rBC2LCN は未分化なヒト ES/iPS 細胞の細胞膜に存在するポドカリキシン上のムチン様 O 型糖鎖である H タイプ 3 (Fuc α 1-2Gal β 1-3GalNAc) に高

い親和性を持つため、ヒト ES/iPS 細胞の未分化マーカーとして報告されている^{1,3)}。rBC2LCN は細胞毒性をほとんど示さないため、培養液中に蛍光標識 rBC2LCN を添加するだけで細胞を生きたまま簡便に染色することができる。当社では rBC2LCN を蛍光標識した rBC2LCN-FITC、rBC2LCN-547、rBC2LCN-635 を開発した（図 1）。

※現在の取扱品は、p13 をご参照下さい。

◆Human ES/iPS Cell Staining Kit-BF の開発

ヒト ES/iPS 細胞の未分化性の確認には、rBC2LCN や Nanog、Oct4、Sox2、SSEA-1、SSEA-3、SSEA-4、TRA-1-60、TRA-1-81 などの未分化マーカーと細胞を反応させ、蛍光で検出する手法が多用されている。しかし、上記の未分化マーカーでの検出には蛍光顕微鏡など的高額な装置が必要であり、また観察に熟練の技術を要することから、その使用に制限がある。そのため、蛍光顕微鏡を使用せず、可視光下で検出可能な未分化性の確認方法として、ALP（アルカリフォスファターゼ）

染色が用いられている。ALP はヒト ES/iPS 細胞で高発現していること、ALP 活性の検出には特殊な装置を必要としないことなどから ALP は未分化マーカーとして広く使用されている。しかし、骨、軟骨、肝臓などの複数種の細胞が ALP 活性を持ち、特異性が低いことから、ALP 活性を持つ細胞への分化実験における未分化細胞の検出などには ALP 染色は使用できない（表 1）。

そこで当社では、未分化なヒト ES/iPS 細胞への特異性が高い rBC2LCN の POD（ペルオキシダーゼ）標識体を使用し、可視光下で高感度に未分化細胞を検出できる Human ES/iPS Cell Staining Kit-BF を開発した。本キットは、rBC2LCN-POD、発色基質、washing buffer で構成されており、rBC2LCN-POD が未分化なヒト ES/iPS 細胞に結合し、発色基質と反応することで、可視光下で未分化細胞を観察することができる（図 2A）。キット構成品だけで、未分化なヒト ES/iPS 細胞を検出ことができ、操作も非常に簡便である。また、本キットには高感度の基質を採用しており、rBC2LCN-POD は ALP と同等の染色強度を示す（図 2B）。

◆Human ES/iPS Cell Staining Kit-BF の使用例

rBC2LCN は未分化性を失ったヒト ES/iPS 細胞には結合しないため、培養中に出現する未分化状態を逸脱した細胞（例：図 3A の赤枠の細胞）は本キットでは染色されない。よって、本キットは培養したヒト ES/iPS 細胞の品質管理に使用可能である。また、rBC2LCN-POD の特異性は他の未分化マーカー抗体よりも高く⁴⁾、ヒト ES/iPS 細胞を ALP 活性を有する細胞へと分化させた際の残存未分化細胞の検出にも利用できる。実際に、ALP 活性を有する MSC（間葉系幹細胞）中にスパイクしたヒト iPS 細胞の

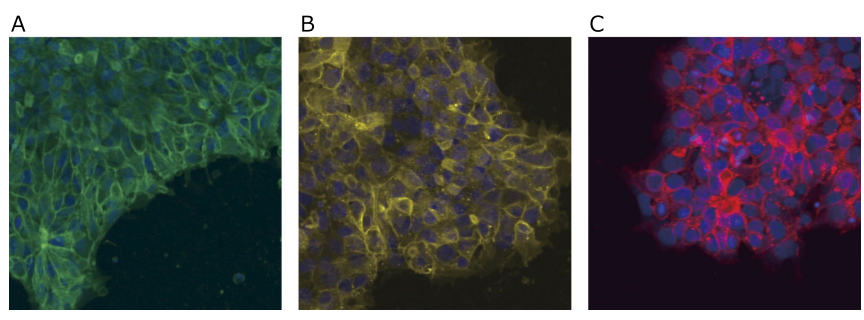


図 1. 各種蛍光標識 rBC2LCN によるヒト iPS 細胞の染色
feeder-free 条件下で培養したヒト iPS 細胞 (201B7 株) を固定後、A) rBC2LCN-FITC、B) rBC2LCN-547、C) rBC2LCN-635 で染色。核は Hoechst33342 (青) で対比染色した。

表 1. 未分化細胞検出法（可視）の比較

	従来法	本キット
	アルカリフォスファターゼ染色	rBC2LCN-POD 染色
ターゲット	細胞膜上酵素	細胞膜上糖鎖
特異性	× 一部使用できない細胞あり	◎
操作性	○	○
検出感度	○	○

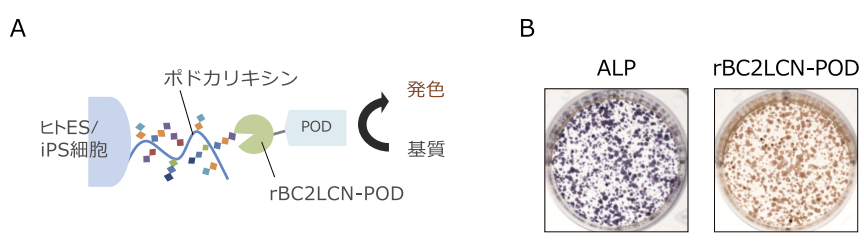


図2. Human ES/iPS Cell Staining Kit-BF を用いた未分化細胞の検出

- A) 本キットの原理：ヒト ES/iPS 細胞の細胞膜に存在するポドカリキシン上の O 型糖鎖を認識する rBC2LCN に POD を結合させ、基質を用いて未分化細胞を特異的に検出。
 B) feeder-free 条件下で培養したヒト iPS 細胞 (201B7 株) を固定後、ALP (NBT/BCIP)、本キットで染色。

発した Human ES/iPS Cell Staining Kit-BF は、特異性が高く、高感度に未分化細胞の検出を可能にした。また、特殊な装置や技術を必要とせず、操作も非常に簡便であることから、さまざまな場面での使用が可能となり、再生医療の安全性向上への貢献が期待される。

※rBC2LCN は国立研究開発法人産業技術総合研究所との共同開発品である。

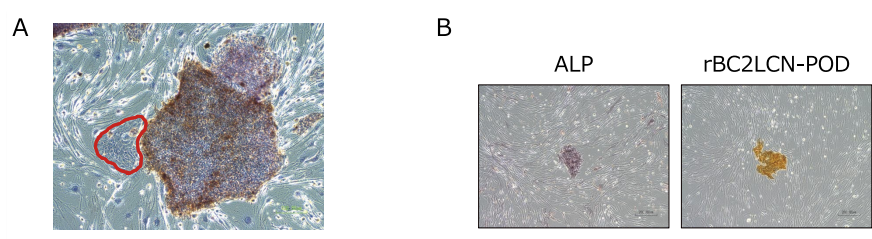


図3. Human ES/iPS Cell Staining Kit-BF を用いた未分化細胞の検出

- A) on-feeder 条件下で培養したヒト iPS 細胞 (201B7 株) を固定後、ALP (NBT/BCIP) (青紫)、続いて本キット (褐色) で共染色。
 B) MSC とヒト iPS 細胞を共培養し ALP、本キットで染色。

検出も可能であった (図 3B)。使用方法も非常に簡便であることから、ヒト ES/iPS 細胞を使用した研究へ幅広く利用いただきたい。

◆最後に

ヒト ES/iPS 細胞を用いた細胞加工製品の開発、実用化が急速に進む中、安全性や品質評価方法に大きな課題が残されている。これに対し当社が開

【参考文献】

- 1) Onuma, Y., Tateno, H., Hirabayashi, J., Ito, Y. and Asashima, M. : *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **431**, 524 (2013).
- 2) Tateno, H., Matsushima, A., Hiemori, K., Onuma, Y., Ito, Y., Hasehira, K., Nishimura, K., Ohtaka, M., Takayasu, S., Nakanishi, M., Ikehara, Y., Nakanishi, M., Ohnuma, K., Chan, T., Toyoda, M., Akutsu, H., Umezawa, A., Asashima, M. and Hirabayashi, J. : *Stem Cells Transl. Med.*, **2**, 265 (2013).
- 3) 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).
- 4) Watanabe, T., Yasuda, S., Kusakawa, S., Kuroda, T., Futamura, M., Ogawa, M., Mochizuki, H., Kikkawa, E., Furukawa, H., Nagaoka, M. and Sato, Y. : *Cytotherapy* (2020). DOI:https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2020.07.009

未分化ヒトES/iPS細胞の細胞染色キット

Wako

Human ES/iPS Cell Staining Kit-BF

本品は、ヒト ES/iPS 細胞に対し高い親和性を持つレクチン、rBC2LCN (AiLecS1) を用いたヒト ES/iPS 細胞染色用キットです。rBC2LCN に結合させたペルオキシダーゼと高感度 DAB 発色基質により、蛍光顕微鏡を用いず、可視光下でヒト ES/iPS 細胞を識別できます。

コード No.	品名	規格	容量	希望納入価格 (円)
294-83501	Human ES/iPS Cell Staining Kit-BF	細胞染色用	10回用	80,000

蛍光色素標識済みrBC2LCN

フィルター過滅菌済みのため、そのままヒト ES/iPS 細胞を培養する培地に添加し、ヒト ES/iPS 細胞を蛍光顕微鏡で観察できます。フローサイトメトリーにも使用可能です。

コード No.	品名	規格	容量	希望納入価格 (円)
180-02991	rBC2LCN-FITC	細胞染色用	100 μL	20,900
186-02993	[Ex. 495nm, Em. 520nm]		100 μL × 5	87,000
185-03161	rBC2LCN-635	細胞染色用	100 μL	32,000
	[Ex. 634nm, Em. 654nm]			

☐₂₀…2~10℃保存 ☐_F…-20℃保存 ☐₈₀…-80℃保存 ☐₁₅₀…-150℃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、2020年10月時点での情報です。最新情報は、当社HPをご参照下さい。

第2回 Cas9 タンパク質と gRNA のトランスフェクション試薬 GenomONE®-GE

石原産業株式会社 近藤 由隆

はじめに

ゲノム編集では、Cas9 と gRNA をコードするプラスミドをトランスフェクションするケースが多いが、それらの発現量やオフターゲットが課題となる。それを回避するために Cas9 タンパク質と gRNA を細胞内に導入するケースが増えている。しかし、カチオン性のトランスフェクション試薬では、十分なゲノム編集効率が得られない細胞種も少なくない。

GenomONE®-GE はエンドサイトーシス経路ではなく、膜融合を介して Cas9 タンパク質と gRNA を細胞内に直接導入することができるトランスフェクション試薬である。エンドサイトーシス経路を回避することで、細胞内への導入過程における Cas9 タンパク質と gRNA の分解を最小限に抑えることができるため、高いゲノム編集効率を達成できる。本稿では、GenomONE®-GE が T 細胞のようなトランスフェクション困難な細胞に対しても適用できること、ノックインにも適用できることを紹介する。

GenomONE®-GE に付属する HVJ-E の特徴

1. カチオン性のトランスフェクション試薬及びウイルスベクターの特徴

これまでに、様々なカチオン性のトランスフェクション試薬が市販されている。これらは安全性が高く、また、特定の細胞種に対しては高効率で物質を細胞内へ導入することが可能だが、必ずしもすべての細胞種に対して有効ではなく、特に浮遊系の免疫細胞では低効率であることが知られており、汎用性に問題がある。ウイルスベクターは、ウイルスの感染能力を利用するため、カチオン性のトランスフェクション試薬と比較して圧倒的に優れた遺伝子導入・発現効率を有しているものの、安全性に問題がある。従って、これまでに開発されたトランスフェクション試薬、ウイルスベクターにはいづれも一長一短があり、安全かつ高効率で物質を細胞内へ導入できる新たな技術開発が望まれている。

る。このような背景のもと、全く新しい発想に基づいて大阪大学の金田安史先生によって開発された、高い安全性と高効率で物質を細胞内へ導入できる能力を兼ね備えた高性能ベクターが HVJ-E (Hemagglutinating virus of Japan envelope ; HVJ-E) である¹⁾。

2. HVJ-E は安全性の高いトランスフェクション試薬である

HVJ-E はセンダイウイルスのゲノムを破壊した不活化センダイウイルスである。本来センダイウイルスが有する感染性・増殖性を完全に喪失しているため、特殊な設備を必要とせず、バイオセーフティーレベル 1 (BSL1) の実験室で使用することができる (図1 (a))。HVJ-E が付属する研究用試薬 GenomONE® シリーズは 2002 年から販売されているが、これまでに外部施設でウイルスの感染被害が生じた報告は全くない。これは、HVJ-E の製造過程・製造後に、鶏卵・培養細胞を用いたウイルスの感染性・増殖性が完全に喪失していることの確認を含め、徹底的な品質管理を行っている結果である。

3. HVJ-E のエンベロープ内に様々な物質を封入することができる

HVJ-E のエンベロープ内に siRNA、miRNA、プラスミド DNA、タンパク質など様々な物質を封入できることが確認されている。本稿で紹介する GenomONE®-GE

には Cas9 タンパク質と gRNA を HVJ-E エンベロープ内に効率よく封入するために必要な専用の試薬が付属されており、簡便な操作で容易に封入することができる。

4. HVJ-E は膜融合を介して物質を細胞内へ導入する

一般的に、カチオン性のトランスフェクション試薬はエンドサイトーシス経路で細胞内に取り込まれ、リソソームで分解を受けるため、エンドソームから細胞質に脱出する過程が障壁となる。一方、HVJ-E の外膜には、センダイウイルス同様に膜融合に関わる F タンパク質と HN タンパク質が存在しており、センダイウイルス同様の非常に高い膜融合能が保持されている。HVJ-E は膜融合を介してエンベロープ内に封入した物質を細胞内へ直接導入することで、エンドサイトーシス経路を回避することができる。そのため、細胞内への導入過程において Cas9 タンパク質や gRNA などの細胞内へ導入したい物質の分解を最小限に抑えることができるので、高い導入効果が期待できる (図1 (b))。

5. HVJ-E は様々な細胞種に適用可能な汎用性の高いトランスフェクション試薬である

HVJ-E はシアル酸を認識して細胞に結合するため、細胞特異性が低く、哺乳類から鳥類まで幅広い細胞種で利用する

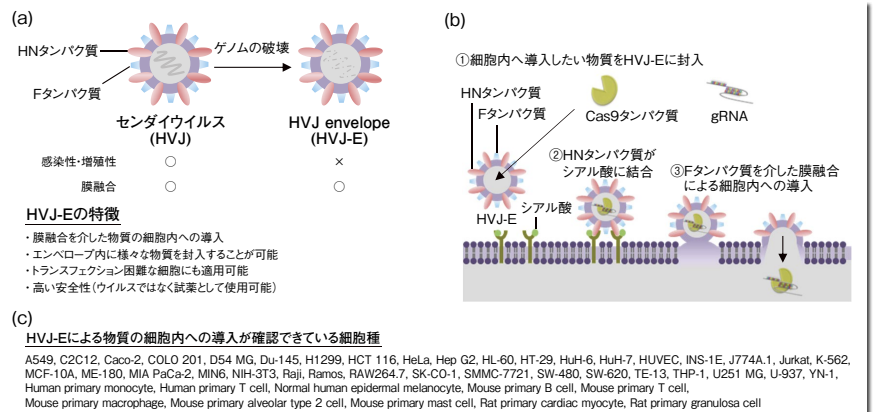


図 1. HVJ-E の概要

- (a) センダイウイルスと HVJ-E の特徴
- (b) 膜融合を介した物質の細胞内への導入
- (c) HVJ-E による物質の細胞内への導入が確認できている細胞種

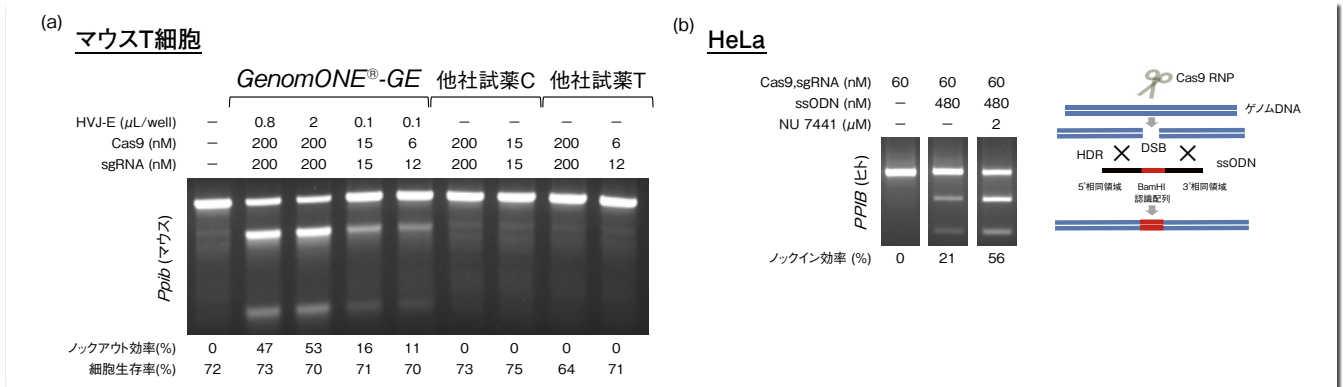


図2. GenomONE[®]-GE を用いたゲノム編集の実験結果
 (a) マウス T 細胞における Cas9 タンパク質と gRNA の導入によるノックアウト
 (b) ssODN (ドナー DNA) を用いたノックイン

ことができる。驚くべきことに、カチオン性のトランスフェクション試薬では物質を細胞内に導入することが難しい B 細胞、T 細胞のような免疫細胞においても適用可能で^{2,3)}、多数の研究者から多様な細胞種においてトランスフェクションの成功例が報告されている (図1 (c))。

GenomONE[®]-GE を用いたゲノム編集の実験結果

1. トランスフェクション困難なマウス T 細胞に Cas 9 タンパク質と gRNA を導入できる

PMA/ionomycin 刺激したマウス脾臓由来の T 細胞に、Cas9 タンパク質とマウス *Ppib* 遺伝子を標的とした sgRNA (2'OMe+PS 修飾) を GenomONE[®]-GE、他社試薬 C、他社試薬 T を用いてトランスフェクションした (96-well プレート)。2 日後、標的部位の PCR 増幅を行い、T7 endonuclease I 処理後の電気泳動のバンドパターンからノックアウト効率を算出した。GenomONE[®]-GE では高いノックアウト効率を得られた一方、他社試薬 C、他社試薬 T では全くゲノム編集が確認できなかった (図2 (a))。

2. ssODN (ドナー DNA) を用いたノックインにも適用可能

HeLa 細胞に Cas9 タンパク質、ヒト *PPIB* 遺伝子を標的とした sgRNA (2'OMe+PS 修飾)、制限酵素 BamHI 認識配列をインサート配列として含む ssODN (PS 修飾) を GenomONE[®]-GE を用いてトランスフェクションした (48-well プレート)。2 日後、標的部位の PCR 増幅を行い、制限酵素 BamHI 処理後の電気泳動のバンドパターンからノックイン効率を算出した。GenomONE[®]-GE は高いノックイン効率を達成し、さらに非相同末端結合 (NHEJ) 経路において重要な役割を担っている DNA-PK の阻害剤で、相同組換え修復 (HDR) 効率を向上することが知られている NU 7441 を使用することでノックイン効率は一層高まった (図2 (b))。

おわりに

GenomONE[®]-GE は、本稿で紹介したマウス T 細胞、HeLa 細胞以外にも Jurkat、THP-1、U-937、RAW264.7、HEK-293 細胞などトランスフェクションが難しい細胞を含む多様な細胞種において高いゲノム編集効率を達成しており、これ

らの結果は、GenomONE[®]-GE が汎用性の高い Cas9 タンパク質と gRNA のトランスフェクション試薬であることを証明している。

一般的に、カチオン性のトランスフェクション試薬を用いてプラスミド DNA を細胞内へ導入する際の障壁として、エンドソームから細胞質への脱出、転写・翻訳効率などが挙げられ、トランスフェクション困難な細胞においては、これらの要因が関わっていることが考えられる。一方、本稿で紹介した GenomONE[®]-GE を用いて Cas9 タンパク質と gRNA を細胞内に導入する際は、上記の障壁は問題にならない。即ち、膜融合を介して物質を細胞内へ導入するためエンドサイトーシス経路を回避できること、転写・翻訳の必要が無いことから、トランスフェクション困難な細胞においても高いゲノム編集効率を達成できる。本稿を読んだ研究者の方には、ユニークな特徴をもつ高性能の HVJ-E ベクターが付属した GenomONE[®]-GE を是非試していただきたい。

【参考文献】

1) Kaneda, Y. et al. : *Mol. Ther.*, **6**, 219 (2002).
 2) Hatano, R. et al. : *J. Immunol.*, **194**, 960 (2015).
 3) Akamatsu, M. et al. : *Sci. Immunol.*, **4**, eaaw2707 (2019).

GenomONE[®] シリーズは、当社 HP をご覧下さい。

GenomONE 和光

検索

第2回 ミクログリアの発生起源と脳疾患

京都薬科大学統合薬科学系 高田 和幸

はじめに

ミクログリアは中枢（脳・脊髄）の組織マクロファージであり、中枢での免疫を第一線で担う。発生様式や生態の特殊性が明らかになるにつれ、ミクログリアは様々な学問領域の研究者たちからの脚光を浴び、ミクログリアの生物学的学術研究がますます盛んに繰り広げられている。本稿では、ミクログリアの発生起源やその生態に着目し、脳疾患との関わりや治療標としての位置づけについて紹介したい。

ミクログリアの発生

1919年、スペインの神経科学者である Pio del Río Hortega は、神経細胞、アストロサイトに次ぐ第三の脳構成細胞群の形態学的特徴を鮮明に描写し、この細胞集団をミクログリアと命名した。Hortega はミクログリアの発生起源にも触れており、前駆細胞は脳の発達初期に脳の外から移入してくると述べている。長らくその前駆細胞は末梢血中の単球と考えられてきたが、今から10年前、胚体外組織の卵黄嚢での造血により作られる「原始マクロファージ」であることがマウスを用いた実験で明らかとなった¹⁾。この原始マクロファージは、erythro-myeloid progenitors (EMPs) と呼ばれる細胞から転写因子 Myb 非依存的²⁾に単球を経ず発生し、脳を含む全身の各臓器に生着して一時的に組織マクロファージとなる(図)。その後、EMPs が胎仔肝へ移動して造血の場が引き継がれると、ここでは EMPs から Myb 依存的に単球(fetal liver monocytes) が作られる。この単球も全身をめぐる、先に生着していた原始マクロファージを置換または共存しながら、新たな組織マクロファージとしてのポピュレーションを形成していく³⁾。この時、脳では発達段階の血液脳関門が形成されており、この侵入はほとんど起こらない。すなわち、全身の臓器に常在性の組織マクロファージが存在する中で、ミクログリアだけが卵黄嚢で作られた原始マクロファージを主な発生起源にすることになる。

細胞起源によるミクログリアの特徴付け

EMPs による造血に遅れ、胎生期の大動脈-性腺-中腎(aorta-gonad-mesonephros : AGM) 領域では造血幹細胞(hematopoietic stem cells : HSCs) が発生する(図)。HSCs もマウス胎仔肝で胎生期の二次造血を開始するが、出生直前には骨髄へと移行して出生後の二次造血を全般的に担っていく。HSCs 由来単球も組織マクロファージのソースの一つと考えられるが、生理的条件下でのミクログリアのポピュレーションへの貢献はほとんどない^{1,4)}。一方で、HSCs 由来単球は血流によって全身を巡回し、感染や障害性シグナルにตอบสนองして組織に移行してマクロファージへと分化する。この HSCs 由来単球マクロファージは短命で組織に一時的に滞在して炎症反応を惹起するが、対する EMPs 由来の組織常在性マクロファージは主に栄養や組織再構築に働くとされる。また、HSCs 由来マクロファージはケモカイン受容体 CCR2 の発現が高く、EMPs 由来マクロファージは F4/80、colony-stimulating factor-1 receptor (CSF-1R) やフラクタルカイン受容体 CX3CR1 の発現が高いなど、それぞれの遺伝子発現パターンに細胞起源が色濃く残り⁴⁾、機能的役割分担に繋がることが予想される。CSF-1R を介するシグナルが microRNA-21 を誘導して炎症性因子の発現を抑制し、栄養因子の発現を促進することは⁵⁾、ミクログリアを代表とする EMPs 由来組織マクロファージの細胞起源に伴う機能的特徴を説明する上でも興味深い。最近では、脳実質との境界となる血管周囲腔、硬膜や脈絡叢に存在するマクロファージ(border-associated macrophages : BAMs) と実質のミクログリアは、卵黄嚢 EMPs を同じ細胞起源としながらも、それぞれの運命付けは卵黄嚢に存在する時点で決まることが示唆されており⁶⁾、さらに BAMs とミクログリアを区別する遺伝子発現パターンも明らかとなっている⁷⁾。このように、

ミクログリアという組織マクロファージの特徴は、生着先である脳や脊髄といった環境から受けるシグナルのみならず、そのユニークな発生起源からの影響を大きく反映しており、ミクログリアの生態や機能をより深く、正確に理解するには、この発生起源を十分考慮することも重要であることがわかる。

ミクログリアのポピュレーションの維持

上述のように、ミクログリアの前駆細胞は胎生期にのみ作られ、生後の骨髄 HSCs 由来単球はミクログリアの補填にはほぼ関与しない。このミクログリアの生後のポピュレーションの維持について、近年、マウス脳では約96日に一回脳全体のミクログリアが入れかわるサイクルで細胞死(アポトーシス)と分裂を繰り返しており、脳内での細胞数を一定に保つことが報告された⁸⁾。この自己分裂によるポピュレーションの維持様式は、エピジェネティック修飾という形で分裂後の細胞にも発生起源を伝え、また、時々刻々と変化する生着後の中枢内での微小環境の情報を引き継ぎ、時空間依存的なミクログリアのサブポピュレーションや脳疾患に特異的なサブポピュレーションの出現にも大きく関わると考えられる^{9,10)}。

ミクログリアと脳疾患

21 番染色体トリソミーが原因で発症する Down syndrome (DS) では、胎生期に神経発生が減少するがその原因は不明である。京都薬科大学の石原慶一博士らとの共同研究により DS モデルマウスを解析したところ、胎生期脳内ではミクログリアを含む脳組織マクロファージの割合の減少と好中球や単球などの炎症性細胞の割合の増加がみられ、大脳皮質では神経新生が低下することを見出した¹¹⁾(図)。このことは、ミクログリアを含む胎生期の脳内免疫環境の破綻が DS 発症に深く関与し、その正常化が DS の胎内治療法を見据えた新たな治療標となることを示唆している。

本シリーズの企画・構成に際し、九州大学大学院薬学研究院 ライフイノベーション分野 津田 誠先生にご協力頂きました。

一方、Alzheimer's disease (AD) の最大のリスクは加齢であり、発症までに数十年に渡って脳に蓄積する amyloid- β ($A\beta$) が病態形成の引き金として捉えられている。また、 $A\beta$ 蓄積部位 (老人斑) にはミクログリアが集積することも古くからよく知られる。ミクログリアの自己分裂によるポピュレーションの維持機構を考慮すると、加齢や長期間の $A\beta$ 暴露で積み重なったミクログリアの性質変化¹²⁾こそが、 $A\beta$ から AD 発症までを結ぶ主要な経路なのかもしれない。我々は、マウスの骨髄や末梢血から採取した HSCs から CSF-1 刺激下にマクロファージを作製し、脳内 $A\beta$ 蓄積を呈する AD モデルマウスの海馬内に移植したところ、マウスの認知機能障害が改善することを見出した^{13, 14)} (図)。当初、移植したマクロファージの $A\beta$ 貪食のみが治療効果をもたらす作用機序と考えていたが、この移植細胞から分泌される transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1) がミクログリアの機能変化をもたらすことも治療に関わることが判明した¹⁵⁾。TGF- β シグナルは発生初期の段階での原始マクロファージからミクログリアへの運命付けに必須であることが報告され⁶⁾、一方では、ミクログリアを含む老化したグリア細胞の除去が認知機能の改善に繋がることも報告されている¹⁶⁾。長期間にわたる $A\beta$ への暴露や加齢により積み重なるミクログリアの性質変化は認知機能の低下に働き、ミクログリアの初期発生に必須となる TGF- β シグナルはこの変化を一部解除し、認知機能の改善に繋がるのかもしれない。

おわりに

ミクログリアの自己分裂を繰り返すポピュレーションの維持機構において、発生起源や生着後の微小環境情報はエピジェネティック修飾という形で引き継がれ、時空間依存的にミクログリアを特徴付けていくと考えられる。我々は、Agency for Science, Technology and Research (A*STAR) の Florent Ginhoux 博士との共同研究において induced pluripotent

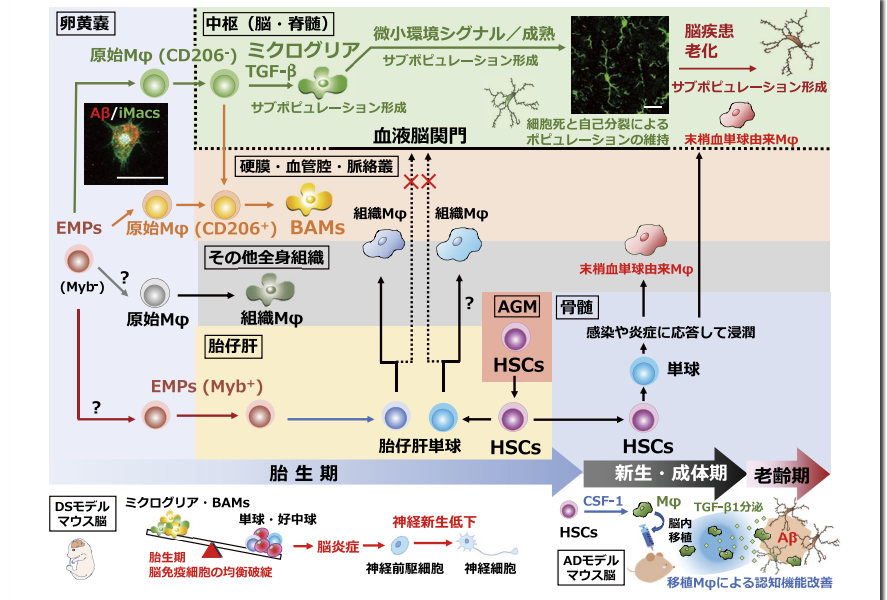


図. ミクログリアを含む組織マクロファージの発生と脳疾患との関わり
 マウス卵黄嚢で EMPs から転写因子 Myb 非依存的に単球を経ずに原始 M ϕ が作られ、ミクログリアを含む組織 M ϕ として各組織に生着する。ミクログリアと BAMs へはこの時点で方向付けられ、ミクログリアへの分化には TGF- β シグナルが必要である。その他の原始 M ϕ の方向付けは不明である。その後、胎仔肝へ移動した EMPs が胎仔肝単球を作り、原始 ϕ を置換または共存しながら新たな組織 M ϕ となるが、中枢では血液脳関門のため置換されない。その後の AGM 領域で発生した HSCs 由来の単球も生理的条件下ではミクログリアとはならないが、感染/障害性シグナルにตอบสนองし、血中から組織に移行して M ϕ となる。ミクログリアの発生起源は卵黄嚢原始 M ϕ であり、その後は細胞死と自己分裂でポピュレーションを維持する。DS モデルマウス胎生期脳では、ミクログリアや BAMs の割合が減少し、炎症性細胞の割合が増加して神経発生が低下している¹¹⁾。AD モデルマウスに CSF-1 刺激により HSCs から作製した M ϕ を移植すると、移植細胞は $A\beta$ を貪食するのみならず TGF- β 1 を分泌して内在性のミクログリアの $A\beta$ 貪食を促進して、認知機能障害を改善する¹³⁻¹⁵⁾。写真左: iPS 細胞由来 M ϕ (iMacs) は原始 M ϕ の発生過程を再現し、ミクログリアにも分化誘導でき $A\beta$ 貪食機能を示す。写真右: 成体期マウス海馬のミクログリア (Goat 抗 Iba1 抗体による染色)。Scale bars: 20 μ m。A β : amyloid- β , AD: Alzheimer's disease, AGM: aorta-gonad-mesonephros, BAMs: border-associated macrophages, CSF-1: colony-stimulating factor-1, DS: Down syndrome, EMPs: erythro-myeloid progenitors, HSCs: hematopoietic stem cells, M ϕ : macrophages, TGF- β : transforming growth factor- β 。

stem (iPS) 細胞から胎生期初期の造血を反映した原始マクロファージ (iMacs) の作製に成功しており¹⁷⁾ (図)、このような発生起源を再現できるプリミティブな細胞を用いた解析が、ミクログリアの生態のより正確な理解に導いてくれることが期待される。脳の発生から老化まで様々なステージで引き起こされる脳疾患の発症機序を解明し、その治療法開発の手がかりを得るには、ミクログリアの発生から成熟さらには老化のプログラムを正確に理解することは非常に有益と考えられる。AD モデルマウスへのマクロファージ移植の研究は、札幌医科大学 下濱 俊教授、京都薬科大学 芦原 英司教授、立命館大学 北村 佳久教授との共同研究である。

【参考文献】

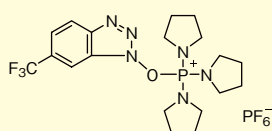
- 1) Ginhoux, F. et al.: *Science*, **330**, 841 (2010).
- 2) Schulz, C. et al.: *Science*, **336**, 86 (2012).
- 3) Hoeffel, G. et al.: *Immunity*, **42**, 665 (2015).
- 4) Hagemeyer, N. et al.: *EMBO J.*, **35**, 1730 (2016).
- 5) Caescu, C. I. et al.: *Blood*, **125**, e1 (2015).
- 6) Utz, S. G. et al.: *Cell*, **181**, 557 (2020).
- 7) Mrdjen, D. et al.: *Immunity*, **48**, 380 (2018).
- 8) Askew, K. et al.: *Cell Rep.*, **18**, 391 (2017).
- 9) Masuda, T. et al.: *Nature*, **566**, 388 (2019).
- 10) Keren-Shaul, H. et al.: *Cell*, **169**, 1276 (2017).
- 11) Ishihara, K. et al.: *Brain Pathol.*, **30**, 75 (2020).
- 12) Baik, S. H. et al.: *Cell Metab.*, **30**, 493 (2019).
- 13) Kawanishi, S. et al.: *J. Alzheimers Dis.*, **64**, 563 (2018).
- 14) Kuroda, E. et al.: *J. Alzheimers Dis.*, **73**, 413 (2020).
- 15) Kuroda, E. et al.: *Neuroscience*, **438**, 217 (2020).
- 16) Tyler, B. et al.: *Nature*, **502**, 578 (2018).
- 17) Takata, K. et al.: *Immunity*, **47**, 183 (2017).

穏和な条件下でアミドやエステル結合を形成

ホスホニウム系縮合剤 PyFOP

Wako

本品は、穏和な条件下でアミドやエステル結合を形成することが可能な縮合剤で、高い基質に対して良好な性能を示します。ペプチドや核酸などの中分子合成にご使用いただけます。



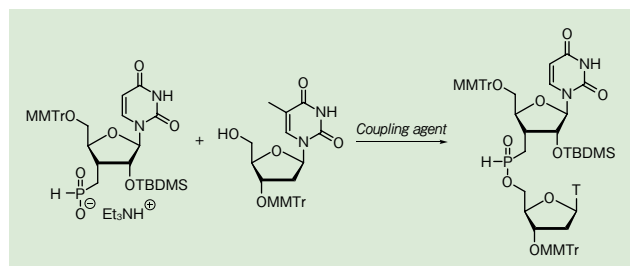
$C_{19}H_{27}F_3N_6OP \cdot PF_6^- = 588.39$
CAS RN® 154921-02-5

特長

- ベンゾトリアゾール骨格に電子吸引基 CF_3 が導入された構造
- 穏和な条件下でアミドやエステル結合を形成
- ペプチドや核酸などの立体的に高い基質に対しても性能良好

反応例

■ チミジンと高いウリジンの縮合^[a]



TBDMS : *tert*-butyldimethylsilyl

MMTr : monomethoxytrityl

Entry	Coupling agent	Conc. [mmol/L]	Time for the formation of	
			75% product	90% product
1	HBTU	60	3.3h	4.6h
2	HATU	60	10min	18min
3	BOP	60	1.1h	3.0h
4	PyFOP	60	n.e. ^[c]	< 4min
5	PyFOP	120	n.e. ^[c]	< 4min
6	PyCloP	60	50% in 1.5h	—
7	PyCloP/ <i>N</i> -methylimidazole ^[b]	60	—	0.5h

[a] Reaction carried out in acetonitrile/pyridine (3:1, v/v). [b] The concentration of *N*-methylimidazole was 0.5mol/L. [c] n.e. = not estimated, since no data could be collected by NMR spectroscopy before a reaction time of 4min.

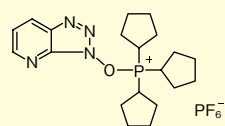
【参考文献】

1) Winqvist, A. and Strömberg, R. : *Eur. J. Org. Chem.*, **2002**, 1705 (2008).

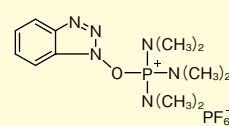
コード No.	品名	規格	容量	希望納入価格 (円)
202-21061	6-Trifluoromethyl-1 <i>H</i> -benzotriazol-1-yloxytripyrrolidinophosphonium Hexafluorophosphate [PyFOP] ^{Ref}	有機合成用	5g	35,000

関連製品

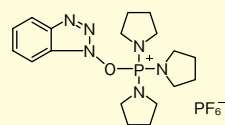
その他のホスホニウム系縮合剤



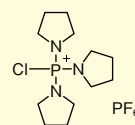
$C_{17}H_{27}N_7OP \cdot PF_6^- = 521.38$
CAS RN® 156311-83-0
1



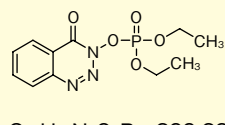
$C_{12}H_{22}N_6OP \cdot PF_6^- = 442.28$
CAS RN® 56602-33-6
2



$C_{18}H_{28}N_6OP \cdot PF_6^- = 520.39$
CAS RN® 128625-52-5
3



$C_{12}H_{24}ClN_3P \cdot PF_6^- = 421.73$
CAS RN® 133894-48-1
4



$C_{11}H_{14}N_3O_5P = 299.22$
CAS RN® 165534-43-0
5

No.	コード No.	品名	規格	容量	希望納入価格 (円)
1	019-25591	(7-Azabenzotriazol-1-yloxy) tripyrrolidinophosphonium Hexafluorophosphate [PyAOP]	有機合成用	1g	5,100
	015-25593	Hexafluorophosphate [PyAOP]		5g	13,600
	017-25592	^[F]		25g	52,000
2	021-17742	1 <i>H</i> -Benzotriazol-1-yloxytris (dimethylamino) phosphonium Hexafluorophosphate [BOP]	有機合成用	25g	8,300
	023-17741	^[Ref]		100g	26,000
3	026-17731	1 <i>H</i> -Benzotriazol-1-yloxytripyrrolidinophosphonium Hexafluorophosphate	有機合成用	5g	7,000
	024-17732	^[Ref]		25g	23,500
4	038-22621	Chlorotripyrrolidinophosphonium Hexafluorophosphate [PyCloP]	有機合成用	1g	4,600
	036-22622	^[Ref]		25g	31,900
5	042-32912	3-(Diethoxyphosphoryloxy)-1,2,3-benzotriazin-4(3 <i>H</i>)-one [DEPBT]	有機合成用	25g	29,000

その他の縮合剤は当社ホームページをご覧ください。

試薬事業トップ→合成・材料→有機合成反応→縮合反応

https://labchem-wako.fujifilm.com/jp/category/synthesis/organic_synthesis/condensation/index.html

汎用的なフロー反応用触媒

Wako

Pd/C, 球状

Pt/C, 球状

固定化触媒フロー（固体触媒フロー）は、フロー反応の利点である、「自動化できる」「装置がコンパクト」「加熱冷却に必要なエネルギーが小さく安全性が高い」「効率的な反応であるので精製操作が簡便（不要）」などの他に、①触媒種を変えることにより、多くの触媒反応に応用できる、②触媒カラムサイズを変えることで生産量のコントロールが可能である、③生成物への触媒の混入が少なく、グリーンケミストリーの観点から見ても理想的な反応系である、といった利点があります。

当社では、フロー反応に適した触媒をラインアップしています。この度、球状活性炭素に担持したPd触媒、Pt触媒を発売しました。

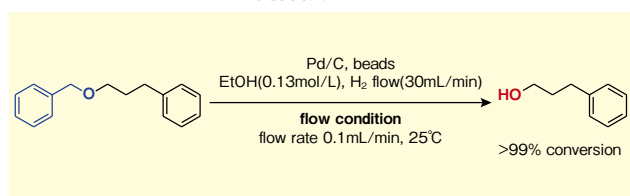
特長

- 一般的なPd/C、Pt/Cをフロー反応用にアレンジ
- 粒子径 約 200 μm
- さまざまな反応（還元、脱保護）に使用可能
- 圧力損失が少ない

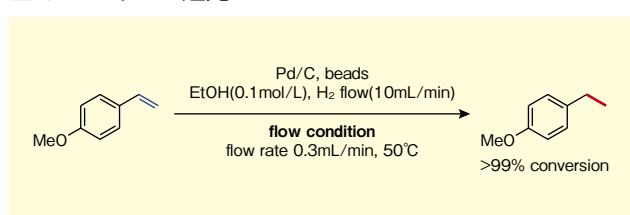


反応例

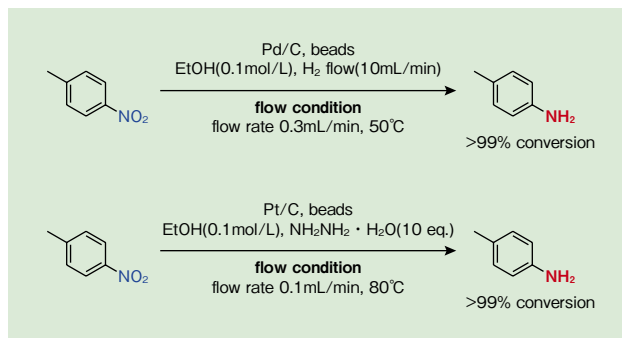
ベンジルエーテルの脱保護



オレフィンの還元



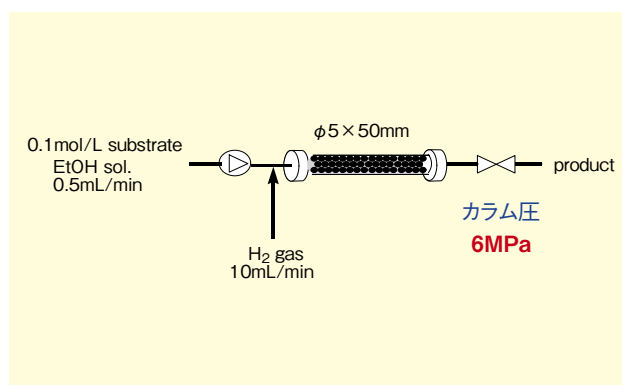
ニトロ基の還元



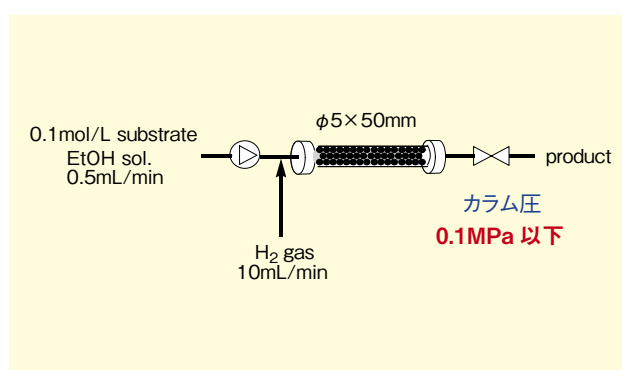
データ

圧力損失の比較

〈一般的なPd/C〉



〈Pd/C, 球状、Pt/C, 球状〉



コード No.	品名	規格	容量	希望納入価格(円)
NEW 169-28861	Pd/C, Beads (Pd 5%)	有機合成用	5g	22,000
NEW 167-28862	Pd/C, Beads (Pd 5%)	有機合成用	25g	83,000
近日発売 162-28851	Pt/C, Beads (Pd 5%)	有機合成用	5g	照会
近日発売 160-28852	Pt/C, Beads (Pd 5%)	有機合成用	25g	照会

Refr° …2~10°C保存 F° …-20°C保存 R° …-80°C保存 H° …-150°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、2020年10月時点での情報です。最新情報は、当社HPをご参照下さい。

品目追加

生薬試験用試薬

Wako

当社では、局方規格並びに自主規格の生薬試験用標準品を多数取揃えています。

■ エフェドリン塩酸塩標準液

本品は、生薬マオウに含まれている成分（エフェドリン塩酸塩）を薄めたメタノール（1→2）に溶かし、20mg/L及び50mg/Lに調製した標準液です。

50mg/Lはマオウの定量法に、20mg/Lは葛根湯エキス、麻黄湯エキス、葛根湯加川芎辛夷エキス、小青竜湯エキス、防風通聖散エキスなどの定量法にご使用頂けます。

■ エフェドリン塩酸塩・プソイドエフェドリン塩酸塩混合標準液

本品は、エフェドリン塩酸塩・プソイドエフェドリン塩酸塩（各100mg/L）を薄めたメタノール（1→2）に溶かした標準液です。

マオウなどの定量法（システム適合性試験）に用いられます。

コード No.	品名	規格	容量	希望納入価格(円)
NEW 054-09361	Ephedrine Hydrochloride Standard Solution [20mg/L Methanol(1 in 2) Solution]	生薬試験用	1mL×5A	25,000
NEW 057-09351	Ephedrine Hydrochloride Standard Solution [50mg/L Methanol(1 in 2) Solution]	生薬試験用	1mL×5A	25,000
NEW 058-09381	Ephedrine Hydrochloride・Pseudoephedrine Hydrochloride Mixture Standard Solution [each 100mg/L Methanol(1 in 2) Solution]	生薬試験用	1mL×5A	26,000

最新版！『生薬試験用試薬』

カタログ頒布中

2020年版にリニューアルした生薬試験用試薬カタログを配布中です。

日本薬局方第17局第二追補に対応しており、TLC写真データやHPLCの分析例も紹介しています。「局方生薬試験用」の試薬・試液を約110品目、「生薬試験用」の生薬成分、生薬標準品を約55品目掲載しています。日本語版のほか、英語・中国語版もご用意しています。



●カタログダウンロードはこちら

<https://labchem-wako-pages.fujifilm.com/crude-drug-catalog-download.html>



追加品目のお知らせ

ポジティブリスト関連農薬・動物用医薬品標準品

Wako

当社では、ポジティブリスト制度の対象となる農薬・動物用医薬品の標準品を取扱っています。

下記品目を新たに発売しました。

- シクラニプロール標準品
- イソフェタミド標準品
- ジメチルジチオカルバミン酸メチル標準品
- チオアセトヒドロキサム酸メチル標準品
- メトフルトリン標準品（異性体混合物）
- ベンチオピラド標準品
- ベンチオピラド代謝産物 PAM 標準品
- ピリオフェノン標準品
- ピロキサスルホン標準品
- スルファモノメトキシ-N-水和物標準品
- テブフェンピラド標準品
- トリフルメゾピリム標準品

コード No.	品名	規格	容量	希望納入価格(円)
NEW 034-25761	Cyclaniliprole Standard	残留農薬試験用	100mg	25,000
NEW 091-07371	Isofetamid Standard	残留農薬試験用	100mg	25,000
NEW 137-14373	Methyl Dimethyldithiocarbamate Standard	残留農薬試験用	100mg	30,000
NEW 138-06853	Methyl Thioacetohydroxamate Standard	残留農薬試験用	100mg	13,000
NEW 130-18981	Metofluthrin Standard (mixture of isomers)	残留農薬試験用	50mg	28,000
NEW 164-28811	Penthiopyrad Standard	残留農薬試験用	100mg	26,000
NEW 161-28821	Penthiopyrad Metabolite PAM Standard	残留農薬試験用	50mg	29,000
NEW 168-28831	Pyriofenone Standard	残留農薬試験用	100mg	25,000
NEW 167-28801	Pyroxasulfone Standard	残留農薬試験用	50mg	24,000
NEW 198-18961	Sulfamonomethoxine Monohydrate Standard	高速液体クロマトグラフ用	100mg	8,500
NEW 206-13293	Tebufenpyrad Standard	残留農薬試験用	100mg	20,000
NEW 203-21111	Triflumezopyrim Standard	残留農薬試験用	50mg	30,000

随時、当社 HP のリストに発売品目を追加・更新しています。詳細は当社 HP をご覧下さい。

試薬事業トップ→製品情報→分析→残留農薬・動物用医薬品分析→標準品“製品一覧”

<https://labchem-wako.fujifilm.com/jp/category/01942.html>

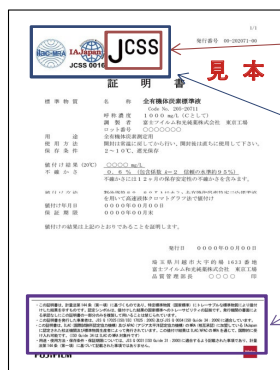
2～10℃保存 20℃保存 80℃保存 150℃保存 表示がない場合は室温保存です。その他の略号は、巻末をご参照下さい。掲載内容は、2020年10月時点での情報です。最新情報は、当社 HP をご参照下さい。

新製品ラインアップ追加

水道法対応 JCSS

Wako

水質基準に関する省令の一部改正により、試薬における標準原液の規定として、計量法に基づく証明書が添付され、かつ各号の別表に定める標準原液と同一濃度のものを用いることができるようになってきました。今回、水道法に対応した「ハロ酢酸4種混合標準液」をJCSSとして追加しました。水質試験の信頼性向上にお役立て下さい。



JCSS標準章
校正結果が国家計量標準へと繋がっていることを公に証明しています。

JCSS認定シンボル
国際MRA（相互承認）対応の認定事業者が発行できる証明書です。

ILAC（国際試験所認定協力機構）及びAPAC（アジア太平洋認定協力機構）とMRA（相互承認）しているIAJapanに認定を受けていることから、国際的に受け入れられます（ISO 17034:2016はILACのMRA対象外です）。

製品概要

組成	水質基準に係る検査方法
クロロ酢酸 ジクロロ酢酸 トリクロロ酢酸 ブロモ酢酸 各 1,000mg/L	水質基準（別表）17、17(2)

コードNo.	品名	規格	容量	希望納入価格(円)
084-10491	ハロ酢酸4種混合標準液 (t-ブチルメチルエーテル溶液)	JCSS	2mL×5A	14,000

上記以外にも多数のJCSS対応品を取扱っています。詳細は当社ホームページをご覧ください。

試薬事業トップ→分析→標準物質（SIトレーサブル）→JCSS標準液

<https://labchem-wako.fujifilm.com/jp/category/analysis/reference-material/jcss/index.html>

JCSS 和光

☐: 2~10℃保存 ☐: -20℃保存 ☐: -80℃保存 ☐: -150℃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、2020年10月時点での情報です。最新情報は、当社HPをご参照下さい。

富士フイルムワコーシバヤギ株式会社

ヒト血清（血漿）中 IFN- γ を短時間・微量検体・高感度で測定可能

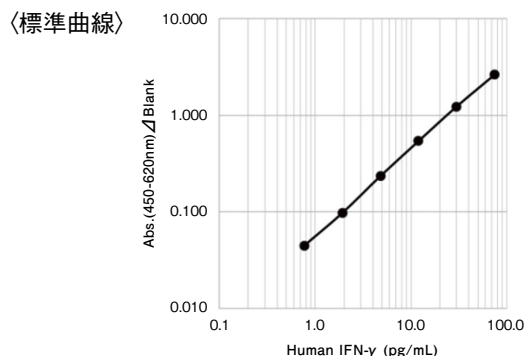
レビス® Human IFN- γ ELISA Kit

IFN- γ はIFN- α/β などのI型インターフェロンとは構造が異なるII型インターフェロンで、143アミノ酸（ヒト）からなるサイトカインです。IFN- γ は主に、抗ウイルス効果をはじめ、細胞増殖抑制効果、抗腫瘍効果、マクロファージ活性化、NK細胞の活性増強、免疫応答調節作用、分化誘導の調節作用などの生物活性を有することが知られており、さまざまな研究分野で注目されています。

本キットは、ヒト血清（血漿）中のIFN- γ を特異的かつ高感度に測定することができます。

製品概要

- 検量線範囲：0.768pg/mL ~ 75.0pg/mL
- 測定時間：2時間20分
- 検体量：100 μ L/ウェル（希釈検体）
- 測定波長：主波長450nm / 副波長620nm
- 検体：ヒト血清/血漿（EDTA（推奨）/ヘパリン）培養上清



測定例

ヒト正常血清中IFN- γ を本キット及び他社製品で測定した。

検体	LBIS	他社A
血清-1	0.821	N.D.
血清-2	1.21	N.D.
血清-3	0.656 (参考値)	N.D.
血清-4	0.244 (参考値)	N.D.
血清-5	2.02	N.D.
血清-6	0.525 (参考値)	N.D.
血清-7	2.02	N.D.
血清-8	1.43	N.D.
血清-9	0.974	N.D.
血清-10	1.71	N.D.

コードNo.	メーカーコード	品名	容量	希望納入価格(円)
631-47891	AKH-IFNG	LBIS Human IFN- γ ELISA Kit	96回用	70,000

生物由来原料基準に適合した 間葉系幹細胞用無血清培地

PRIME-XV MSC XSFM MDF1

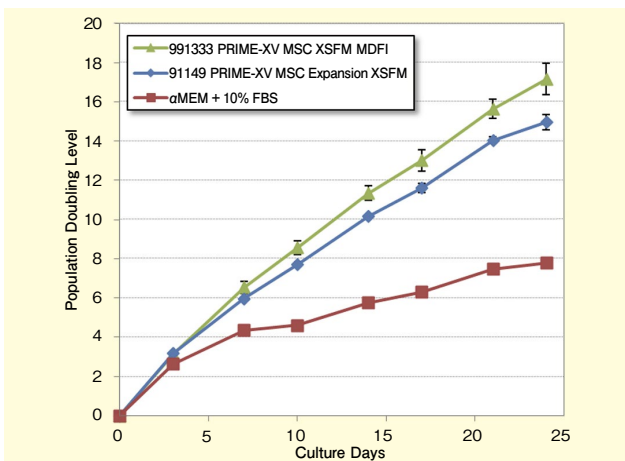
本品は、FUJIFILM Irvine Scientific 社の PRIME-XV MSC Expansion XSFM (メーカーコード: 91149) を基に、平成 15 年厚生労働省告示第 210 号生物由来原料基準の要求事項を満たすように改良し、再生医療等製品材料適格性確認書を取得しています。臨床応用のご検討にお役立て下さい。

特長

- 再生医療等製品材料適格性確認書取得
- Serum-free, Xeno-free
- Ready-to-use
- 高い増殖性
- 培養後も分化能を保持
- cGMP 準拠工場にて製造

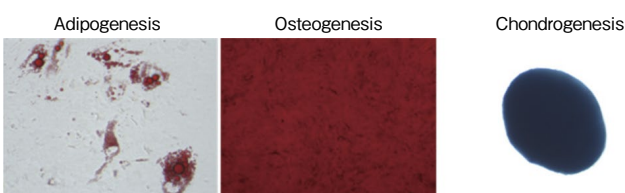
データ

細胞増殖比較



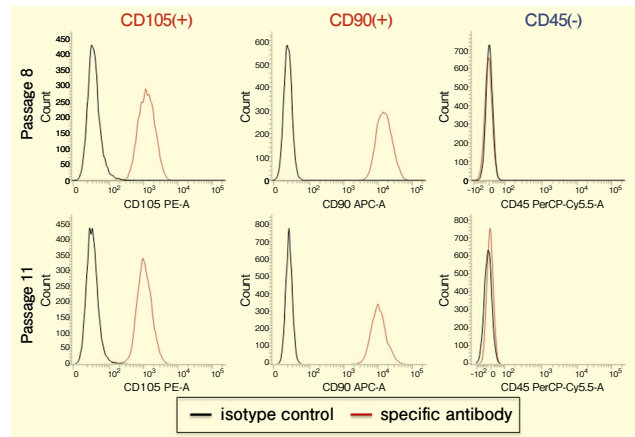
PRIME-XV MSC XSFM MDF1 は、血清含有培地よりも優れた増殖性能を示した。

分化能



PRIME-XV MSC XSFM MDF1 は、ヒト MSCs の分化能を維持した。

細胞表面マーカー発現レベル



多継代にわたって、間葉系幹細胞のマーカー発現を維持する。

コード No.	メーカーコード	品名	容量	希望納入価(円)
552-37463	991333-1L	PRIME-XV MSC XSFM MDF1 F	1L	110,000
550-34201	91149-250ml	PRIME-XV MSC Expansion XSFM	250mL	30,000
556-34203	91149-1L	PRIME-XV MSC XSFM MDF1 E	1L	110,000

※ PRIME-XV MSC XSFM MDF1 の 250mL 品は今後追加予定です。

昆虫細胞用、無血清培地

IS Sf Insect

この度、FUJIFILM Irvine Scientific 社では、Sf9 及び Sf21 細胞用の無血清、動物由来成分不含培地として IS Sf Insect を開発しました。

IS Sf Insect は浮遊培養による Sf9 及び Sf21 細胞の増殖、バキュロウイルス発現系 (BEVS) による組換えタンパク質やウイルス様粒子などのタンパク質発現、ウイルスベクターの産生をサポートします。

また、cGMP 準拠品による、優れた品質、一貫性、スケラビリティを実現しました。原料とサプライチェーンの厳正な管理に加え、機能性、無菌性、エンドトキシンなどさまざまな QA 試験を実施しています。またご依頼に応じてサイズやパッケージをカスタマイズすることが可能です。



IS Sf Insect の外観

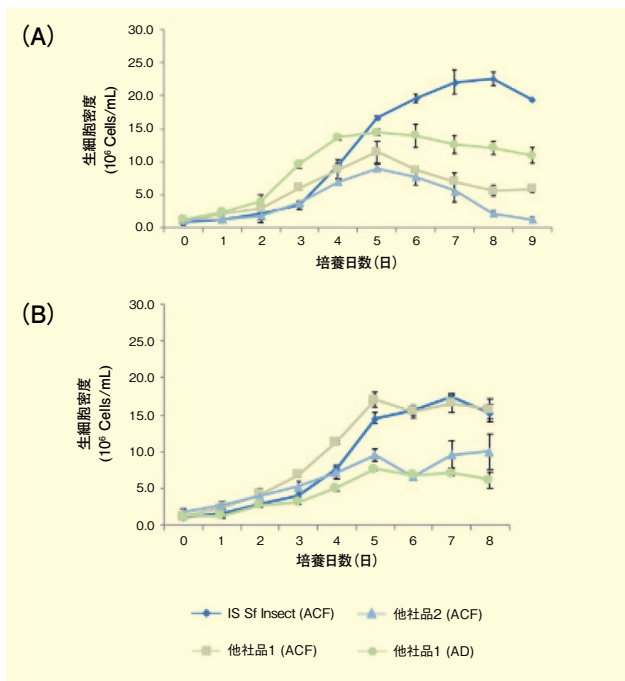
[次頁に続く]

特長

- 無血清、動物由来成分不含 (ACF)
- Sf9 と Sf21 細胞の培養において、高増殖性、高収量をサポート
- ロット間差を低減
- BEVS など、多種類の組換えタンパク質発現系に対応
- Ready-to-use の長期培養用培地
- cGMP 準拠の工場での生産により、研究から商業生産へシームレスに移行可能、かつ高い信頼性と品質を保持

データ

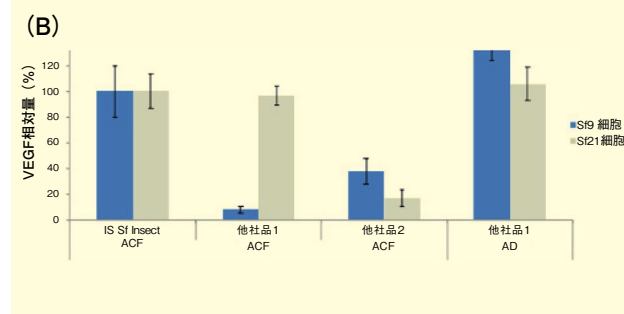
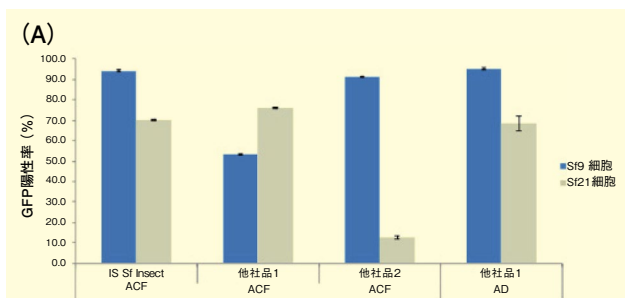
高い増殖性



IS Sf Insect、他社品 1 (ACF、AD)、他社品 2 (ACF) を用いて、Sf9 細胞 (A) 及び Sf21 細胞 (B) を培養し、それぞれの生細胞密度を測定した (n=4)。Sf21 においては他社品と同等、Sf9 においては最も高い生細胞密度を達成した。

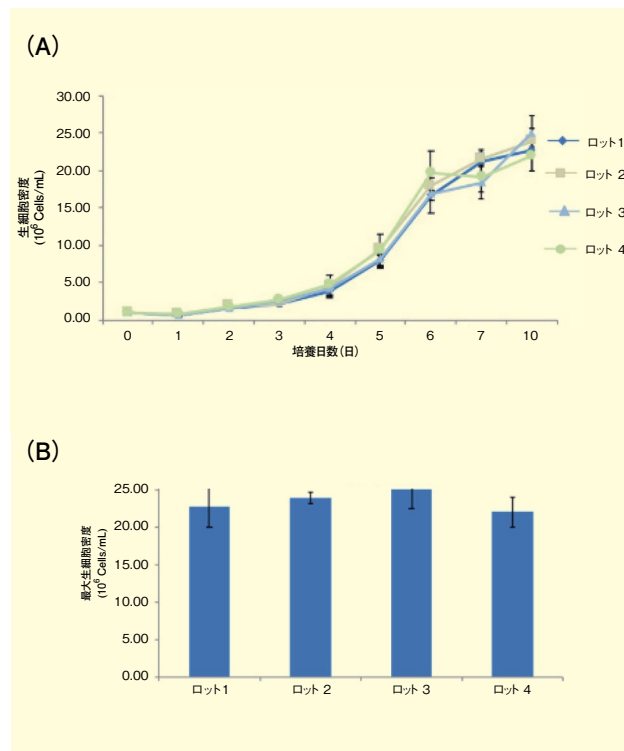
※ AD：動物由来成分含有

高感染率、高タンパク質収量をサポート



0 日目に、血管内皮増殖因子 (VEGF) と Green Fluorescent Protein (GFP) を共発現する BEVS を、Sf9 及び Sf21 細胞に感染させた。感染 3 日後に、フローサイトメトリーを用いて GFP 発現細胞の割合 (%) により、感染率を算出し (A)、また同日に ELISA を用いて VEGF 量を測定した (B)。感染率は他社と同等かそれ以上であり、VEGF 量は ACF の中では最も高い数値を達成した (n=4)。

ロット間の一貫性



ロットの異なる加水分解物を含んだ IS Sf Insect 培地を 4 ロット作製した (ロット 1-4)。ロット 1-4 で Sf9 細胞を培養し、各ロットの生細胞密度 (A) 及び最大生細胞密度 (B) を測定したところ、パフォーマンスは一貫していることが示された (n=4)。

コード No.	メーカーコード	品名	容量	希望納入価格 (円)
556-37081	91174-1L	IS Sf Insect	2-8℃保存	1L 11,000

タンパク質・ウイルス生産用 293 細胞用完全合成培地



BalanCD HEK293 シリーズ

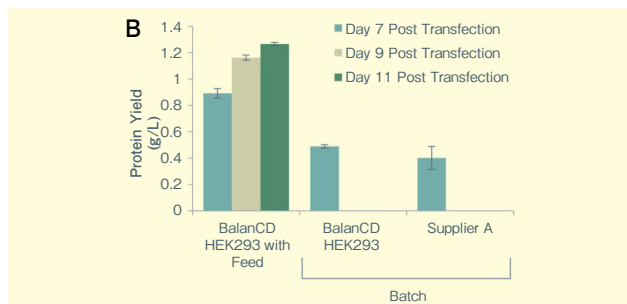
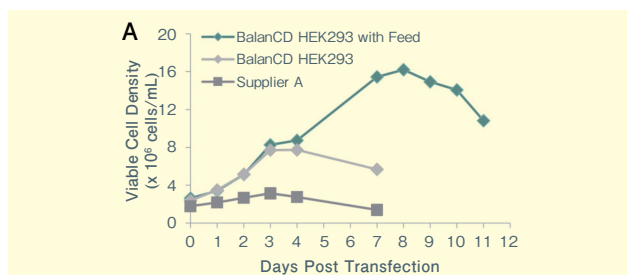
本品は、293 細胞用完全合成培地です。タンパク質生産、ウイルス生産にご利用いただけます。

特長

- 完全合成培地、動物由来成分不含
- FDA の Drug Master File 登録済
- 高い増殖性・生産性
- cGMP 準拠工場にて製造

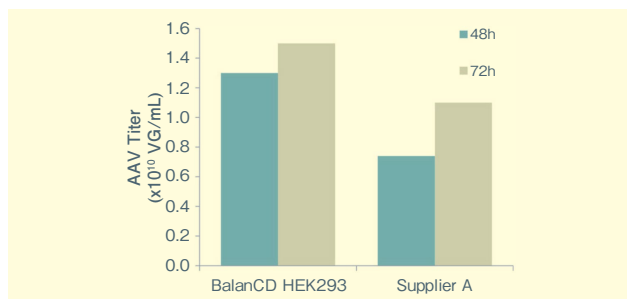
データ

■ タンパク質生産例



HEK293-6E 細胞に発現ベクター 40%Hc, 40%Lc, 15%AKT, 5%GFP をトランスフェクションし、タンパク質の一過性発現を行った。生細胞数 (A)、抗体濃度 (B) を測定した。

■ アデノ随伴ベクター (AAV) 生産例



HEK293 細胞に AAV パッケージングベクターをトランスフェクションし、48, 72 時間後に定量 PCR にてベクターゲノムのコピー数を定量した。

コード No.	メーカーコード	品名	容量	希望納入価格 (円)
551-34231	91165-1L	BalanCD HEK293 2-8℃保存	1L (液体)	18,000
551-34317	94137-10L	BalanCD HEK293 2-8℃保存	10L (粉末)	100,000
550-34245	91166-500mL	BalanCD HEK293 Feed 2-8℃保存	500mL (液体)	24,000
557-34211	91150-50mL	Anti-Clumping Supplement* 2-8℃保存	50mL (液体)	39,000

*細胞が凝集する場合に、1-2mL/L を培地に添加して下さい。

温度応答性細胞培養容器



Cepallet® シリーズ

DIC 株式会社の「Cepallet® (セパレット)」は、低温の培地を添加するだけで細胞を回収することができる温度応答性培養容器です。酵素やスクレーパーを使用しないため、細胞にダメージを与えません。特殊ポリマーで容器の表面を処理しており、細胞を培養する温度では容器表面は細胞が接着しやすい表面 (疎水性) ですが、温度を下げると接着しにくい表面 (親水性) となり細胞が剥がれます。

種々の細胞に適用できるように S-type (幹細胞向け) と W-type (汎用) の 2 種類をラインアップしています。



Cepallet® の外観

特長

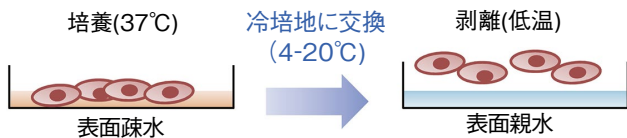
- 簡便操作
 - 低温 (4-20℃) の培地を添加するだけ
 - PBS リンスや酵素添加は不要
 - 培養工程の自動化に適している
- 細胞へのダメージがなく高収率
 - 酵素、スクレーパーを使わない
 - 細胞の表面抗原が消失しない
 - 再接着しにくい

[次頁に続く]

☑…2~10℃保存 ☒…20℃保存 ☒…80℃保存 ☒…150℃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、2020年10月時点での情報です。最新情報は、当社HPをご参照下さい。

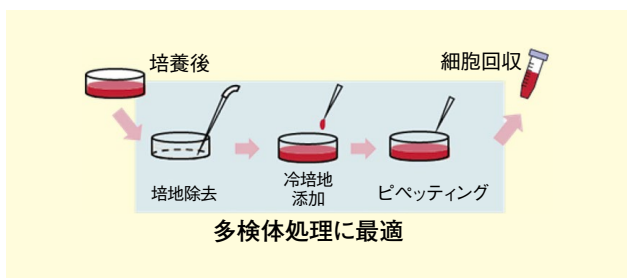
製品概要

温度応答性剥離



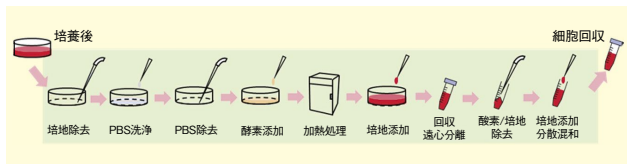
Cepallet®と通常容器/酵素処理の比較

〈Cepallet®〉



- わずか3ステップ
- 遠心分離不要
- 再接着しにくい

〈従来法 (通常器材/酵素)〉



適用細胞の例

iPS細胞由来分化細胞、神経細胞、間葉系細胞、マクロファージ、線維芽細胞、初代培養細胞

使用法

- ①細胞毎に必要な前処理後、従来の培養器材と同様の方法で細胞を播種する。
(例. iPS細胞の場合: 足場材が必要)
※接着性の低い細胞の場合は、細胞外マトリックスで基材をコーティングして下さい。
※基材の特性上、通常の培養基材のコーティングより長めのインキュベーションをおすすめしています。
- ②細胞培養後、4℃の培地に交換、室温で5分間静置する。
※20℃の培地に交換、室温で30分間静置する剥離も可能です。
- ③細胞を回収する。
※剥がれにくい細胞は培地を緩やかにピペッティングして下さい。

データ

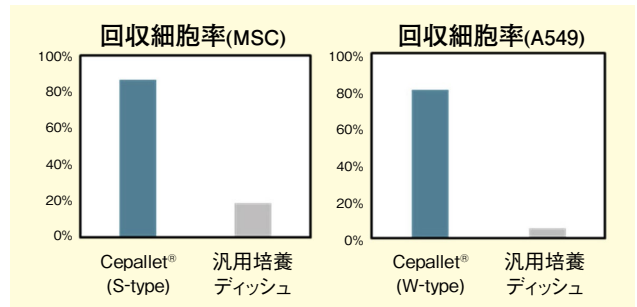
各種細胞の実験例

ヒト骨髄由来MSC
Cepallet® (S-type)

ヒトiPS細胞
(A社無血清培地 & iMatrix-511)
Cepallet® (S-type)

ヒト肺上皮由来
A549細胞
Cepallet® (W-type)

ヒト子宮頸がん由来
HeLa細胞
Cepallet® (W-type)



【サンプル受付中】

★のついた製品はサンプルをご用意しています。当社HPまたは当社販売代理店へお申し付け下さい。35mmディッシュは2枚、その他の製品は1枚のご提供です。

コードNo.	メーカーコード	品名	容量	希望納入価格(円)
638-47661	W-D35-10	Cepallet® W-type Dish (35mm)★	10枚	18,000
635-47671	W-D60-10	Cepallet® W-type Dish (60mm)★	10枚	22,000
631-47651	W-D100-5	Cepallet® W-type Dish (100mm)★	5枚	21,000
636-47601	S-D35-10	Cepallet® S-type Dish (35mm)	10枚	18,000
633-47611	S-D60-10	Cepallet® S-type Dish (60mm)	10枚	22,000
633-47591	S-D100-5	Cepallet® S-type Dish (100mm)	5枚	21,000
639-47691	W-P6-5	Cepallet® W-type Microplate (6well)★	5枚	13,000
632-47681	W-P24-5	Cepallet® W-type Microplate (24well)★	5枚	13,000
632-47701	W-P96-5	Cepallet® W-type Microplate (96well)★	5枚	13,000
637-47631	S-P6-5	Cepallet® S-type Microplate (6well)	5枚	13,000
630-47621	S-P24-5	Cepallet® S-type Microplate (24well)	5枚	13,000
634-47641	S-P96-5	Cepallet® S-type Microplate (96well)	5枚	13,000
634-47761	F-T75-5	Cepallet® Flask T75	5個	20,000
630-47741	F-T150-5	Cepallet® Flask T150	5個	22,500
637-47751	F-T225-5	Cepallet® Flask T225	5個	25,000

☐…2~10℃保存 F…20℃保存 ☐…80℃保存 ☐…150℃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、2020年10月時点での情報です。最新情報は、当社HPをご参照下さい。

エクソソーム研究に!

抗 CD9, ラットモノクローナル抗体 (77B)

Wako

本品は、テトラスパニンファミリー (TM4SF) のメンバーである CD9 に対するラットモノクローナル抗体です。CD9 はインテグリンや他の表面タンパク質と複合体を形成する細胞表面糖タンパク質です。細胞接着及び移動の調節、血小板の活性化や凝集を引き起こすことが報告されています。

また、CD9 はエクソソーム表面に見出されるエクソソームマーカーとして知られています。エクソソーム研究にご使用下さい。

特長

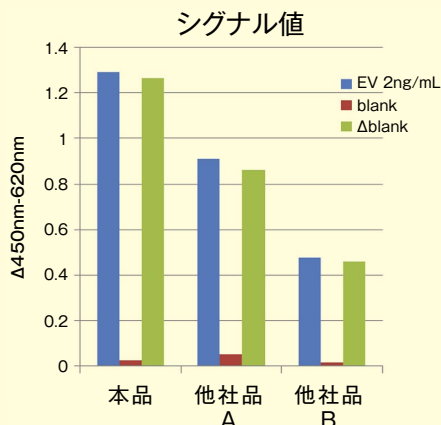
- ウシ CD9 に反応しない
- ELISA の固相化抗体に使用可能

製品概要

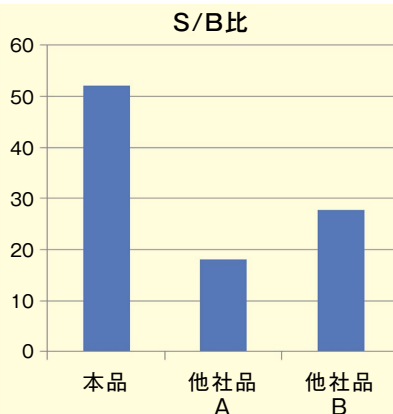
コード No.	013-28171, 019-28173
組成	1×TBS 50w/v% glycerol, 0.05w/v% sodium azide
クローン No.	77B
免疫動物	ラット
抗体サブクラス	IgG2b
種交差性	ヒト CD9 (ラット CD9 にわずかに反応)
アプリケーション	ウエスタンブロット* 1 : 1,000-1 : 8,000 *非還元サンプルをご使用下さい。 ELISA (検出) 1 : 2,000-1 : 16,000 (固相化) 1 : 100-1 : 1,000 フローサイトメトリー 1 : 200-1 : 2,000

データ

ELISA の Capture 性能比較



固相化抗体: 本品(コード No. 019-28173)、他社抗 CD9 抗体
エクソソームサンプル(EV): エクソソーム, COLO201 細胞由来
精製品 (コード No. 052-09301)
検出抗体: 抗 CD9, ラットモノクローナル抗体(77B), ビオチン結合
(コード No. 017-28211)



固相化抗体: 本品(コード No. 019-28173)、他社抗 CD9 抗体
エクソソームサンプル(EV): エクソソーム, COLO201 細胞由来
精製品 (コード No. 052-09301)
検出抗体: 抗 CD9, ラットモノクローナル抗体(77B), ビオチン結合
(コード No. 017-28211)

本品及び他社抗 CD9 抗体を固相化し、ELISA の Capture 性能比較を行った。結果、本品は他社 CD9 抗体よりもシグナル値及び S/B 比が高いことが示された。

コード No.	品名	規格	容量	希望納入価格(円)
013-28171	Anti CD9, Rat Monoclonal Antibody (77B)	免疫化学用	20µL	9,000
019-28173	Anti CD9, Rat Monoclonal Antibody (77B)	免疫化学用	100µL	30,000

抗CD9抗体選択ガイド

当社では、3種の抗 CD9 抗体をラインアップしています。下表を参考に適切な抗体をお選び下さい。

コード No. *1	014-27763	019-28173	019-27953
クローン No.	1K	77B	30B
免疫動物	マウス	ラット	ラット
抗体サブクラス	IgG1	IgG2b	IgG2b
種交差性 *2	ヒト	++	++
	ウシ	++	-
	マウス	-	-
	ラット	+	±
標識	未標識	未標識	ビオチン
アプリケーション	PS ELISA *3, WB, FCM	ELISA (固相化用), WB, FCM	PS ELISA *3, WB, IP, FCM

*1 100 µL 包装品のコード No.

*2 ++: 反応する, +: 弱く反応する,

±: ごくわずかに反応する, -: 全く反応しない

*3 エクソソーム表面に発現するホスファチジルセリン (PS) 結合分子である Tim4 を固相化した当社独自の ELISA

和光 エクソソーム

検索

抗体医薬品研究や線維化研究などに 抗インテグリン $\alpha 8$ ・ $\alpha 9$, モノクローナル抗体

Wako

インテグリンはさまざまな細胞に発現する、 α と β のサブユニットから成る2量体の接着分子です。 $\alpha 8$ 、 $\alpha 9$ サブユニットはともに $\beta 1$ と2量体を形成します。インテグリン $\alpha 8\beta 1$ は間葉細胞に、インテグリン $\alpha 9\beta 1$ は類洞・皮質洞リンパ管内皮細胞に発現し、それぞれ組織の線維化に関与していることが知られています。現在、抗体医薬品や抗体診断薬の分野においてインテグリンモノクローナル抗体の研究が進んでいます。

この度、当社では広島大学 TR センター・インテグリン-マトリックス治療開発医科学講座 横崎恭之先生のご協力のもと、インテグリン $\alpha 8$ 及び $\alpha 9$ のモノクローナル抗体を発売しました。本抗体はフローサイトメトリーや免疫細胞染色だけでなく中和抗体として細胞接着阻害アッセイなどにご使用いただけます。

特長

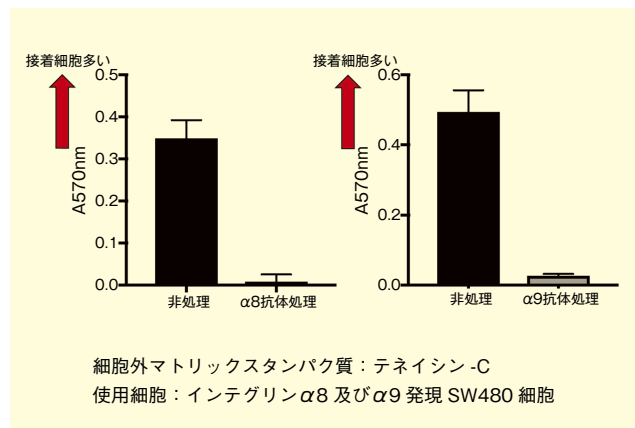
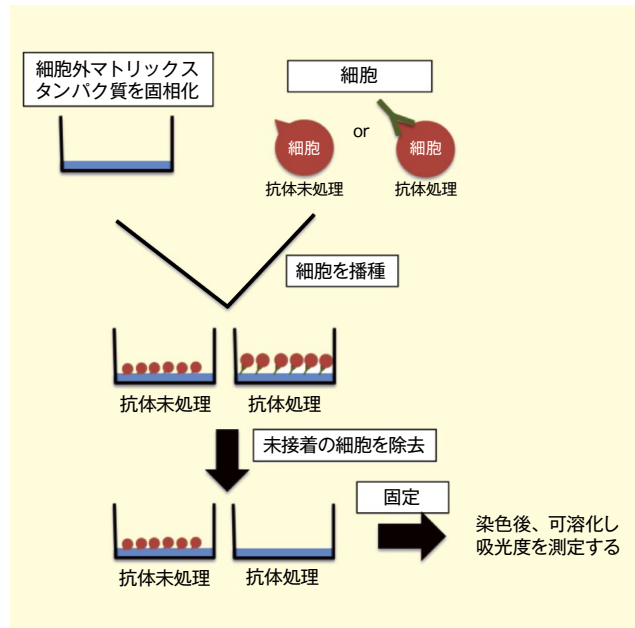
- 中和抗体として使用可能
- ヒト・マウス・ラットに交差反応性あり

製品概要

抗体名	抗インテグリン $\alpha 8$ モノクローナル抗体	抗インテグリン $\alpha 9$ モノクローナル抗体
コード No.	019-28053	016-28063
組成	PBS (-)	
抗体濃度	ラベルに記載 (初回製造ロット 1.1mg/mL)	ラベルに記載 (初回製造ロット 1.2mg/mL)
クローン No.	YZ26	YA4
免疫動物	ニワトリ	
サブクラス	IgG1・ κ キメラ* (可変領域：ニワトリ 定常領域：マウス) *二次抗体には抗マウス抗体のご使用をおすすめします。	
種交差性	ヒト、マウス、ラット	
アプリケーション	中和活性(細胞接着阻害)【推奨使用濃度：5-10 μ g/mL】 免疫細胞染色【推奨使用濃度：1 μ g/mL】 フローサイトメトリー【推奨使用濃度：2.5-5 μ g/mL】	

データ

細胞接着阻害アッセイ プロトコル概略



細胞外マトリックスタンパク質を固相化したプレート上で、本抗体で処理したインテグリン $\alpha 8$ または $\alpha 9$ 発現細胞を培養し、細胞の接着率を評価した。結果、本抗体で処理した細胞は、細胞外マトリックスタンパク質への接着が阻害された。
(データご提供：広島大学 TR センター・インテグリン-マトリックス治療開発医科学講座 横崎 恭之 先生)

コード No.	品名	規格	容量	希望納入価格(円)
019-28053	Anti Integrin $\alpha 8$, Monoclonal Antibody (YZ26) Chicken/Mouse IgG1 $\cdot\kappa$ Chimera	免疫化学用	50 μ L	35,000
016-28063	Anti Integrin $\alpha 9$, Monoclonal Antibody (YA4) Chicken/Mouse IgG1 $\cdot\kappa$ Chimera	免疫化学用	50 μ L	35,000

2~10℃保存 20℃保存 80℃保存 150℃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、2020年10月時点での情報です。最新情報は、当社HPをご参照下さい。

スタニスラオ・カニッツァーロ (1826.7.13 ~ 1910.5.10)

理化学研究所仁科加速器科学研究センターR | 応用研究開発室 羽場 宏光

昨年、2019年は、ロシアの化学者 Dmitrij Mendelejev が元素周期表を発表してから150周年の記念すべき年であった。1869年、Mendelejevは、当時知られていた63種の元素について原子量と化学的性質を手がかりに元素周期表を完成させた。Mendelejevが参照した原子量は、イタリアの化学者 Stanislao Cannizzaro (スタニスラオ・カニッツァーロ) が同国の物理化学者 Amedeo Avogadro の法則を再評価し、化学界に受け入れさせたものであった。カニッツァーロは、有機化学者として活躍するとともに、政治及び軍事活動に参加した。本稿では、彼の生涯と業績を紹介したい。

化学者、政治家として生きたカニッツァーロ

カニッツァーロは、1826年7月13日、Mariano Cannizzaro と Anna di Benedetto の10人の子供たちの末っ子として、イタリア・シチリア島の北西部に位置する都市、パレルモで生まれた。父 Mariano はメッシーナ生まれで、シチリア警察の局長、母 Anna はシチリア貴族の出であった。1836年、父をなくしたカニッツァーロは、王室寄宿学校に入学、特に数学で優秀な成績を取めた。1837年のコレラ流行によって、カニッツァーロは2人の兄弟を失った。カニッツァーロ自身もコレラに感染し、長く休学した。復学後は、文法、修辞学、哲学、人文科学、地理学、フランス語、ラテン語を学んだが、科学の科目はなかった。1841年、15歳の時、カニッツァーロはパレルモ大学医学部に入学した。大学では、生理学者 Michele Foderà とともに遠心神経と求心神経を区別する研究を行った。

1845年、カニッツァーロはナポリに移り、パレルモ大学での生理学研究の成果を発表するため第7回イタリア科学者会議に参加した。ここで、物理



図1. Demetrio Salazarro によるスタニスラオ・カニッツァーロ (32歳) のスケッチ

Credit : Edgar Fahs Smith Collection, Kislak Center for Special Collections, Rare Books and Manuscripts, University of Pennsylvania (Science History Institute)

学者 Macedonie Melloni に出会った。Melloni は、カニッツァーロを当時サリシンに関する研究で知られていたピサ大学の Raffaele Piria に紹介した。Piria は、カニッツァーロを研究室の助手として採用し、化学を教えるだけでなく、天然物質についての研究をさせた。Piria の指導は、カニッツァーロに自分の将来が化学にあることを確信させるものであった。

1847年の夏、カニッツァーロはパレルモに戻り、ピサ大学での研究を再開するつもりであった。しかし、1848年、ブルボン朝に対してシチリアの独立を要求する革命運動が勃発し、カニッツァーロは家族の反対を押し切ってこれに参加した。1849年4月、革命は失敗し、カニッツァーロは亡命を強いられた。彼は、パリに逃れ、Michel Chevreul の研究室で研究を再開した。ここでは、François Clôez とともに、シアナミドとその誘導体につ

いて研究した。パリにいる間、カニッツァーロは元素の比熱に関する研究を行っていた Victor Regnault の講義を聴講した。ここで得た知識は、後述の *Sunto* で論述される物質の構造理論において重要なものとなった。

1851年末、カニッツァーロはイタリアに戻ることができ、ピエモンテ州のアレッサンドリア大学で物理学、化学及び力学の教授の職に就いた。彼は、小さな実験室とアシスタントを得て、自身の最高の研究のいくつかを行った。その一つが後述するカニッツァーロ反応の発見である。

1855年、カニッツァーロはジェノヴァ大学の化学教授の任に就いた。ここでカニッツァーロは、後に彼を国際的に有名にする *Sunto* を執筆した。1857年9月24日、カニッツァーロは、イギリス・バークシャー州マールストーン村の Edward Withers 牧師の娘、Harriet Withers とフィレンツェで結婚した。Harriet がプロテスタントだったので、結婚式はイギリス領事館で行われた。二人は息子 Mariano (1858年生まれ、建築家) と娘 Ana (1860年生まれ) を授かった。1860年5月、カニッツァーロは、イタリア統一を目指す軍事家 Giuseppe Garibaldi の革命に加わった。同年9月、革命運動の合間を縫い、後述するドイツ・カールスルーエでの国際化学会議に出席し、*Sunto* を化学界に発信した。

1861年10月、カニッツァーロはパレルモに戻り、パレルモ大学の無機及び有機化学の教授、最終的に学長の任に就いた。カニッツァーロは10年間パレルモに滞在し、この間、ベンジアルアルコールと他の芳香族化合物の誘導体について研究した。パレルモはイタリアの化学教育の中心となり、カニッツァーロの研究室で学ぶことを切望するイタリア人や外国人が次々訪ねた。ベンゼン環の置換基の位置を特定する方法を考案した Wilhelm Körner、後にウィーンで著名な有機化学者となる

Adolf Lieben は、カニッツァーロの学生であった。カニッツァーロは、多くの政治及び教育活動にも携わった。市議会議員として、念願であった学校の設立や女性の高等教育の実現に貢献した。

1871年、イタリア統一に伴い、カニッツァーロは王国の元老院議員とローマ大学の化学主任教授としてローマに移った。彼はパニスベルナにある古い San Lorenzo 修道院をイタリア初の化学研究所に改修し、モノベンジル尿素やサントニンの研究を行った。カニッツァーロのインスピレーションを感じて、イタリアの偉大な科学者が多教育った。カニッツァーロは、ロンドン化学会の外国人会員に選出され、1872年、二人目の Faraday Lectureship Prize 受賞者となった。一方、カニッツァーロは、穏健な自由主義者として憲法制定に携わり、統一イタリアの改革に貢献した。彼はまた高等教育評議会員でもあり、一時は理事長を務めた。さらに、農業における公的指導の提供、イタリアの科学の進歩と自由業の促進に努めた。

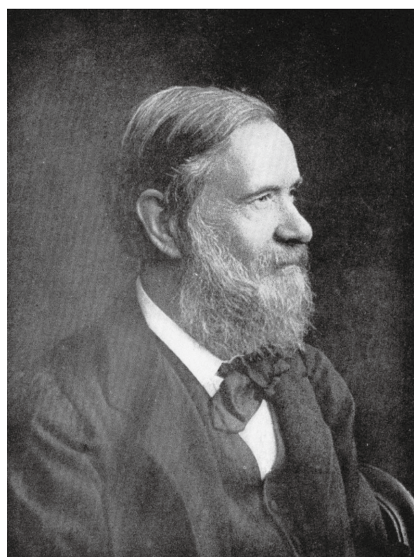


写真1. スタニズラオ・カニッツァーロ

Credit : Edgar Fahs Smith Collection, Kislak Center for Special Collections, Rare Books and Manuscripts, University of Pennsylvania (Science History Institute)

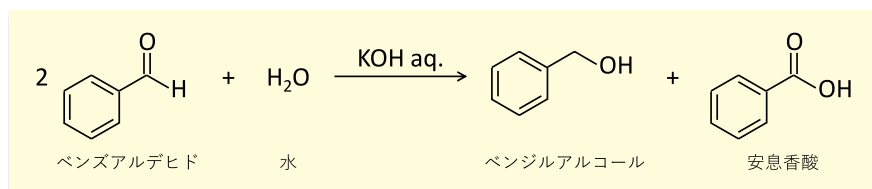


図2. カニッツァーロが発見したアルデヒドの不均化反応

ベンズアルデヒドが水酸化カリウムと反応し、酸化還元によりベンジルアルコールと安息香酸が生成される。

1910年5月10日、カニッツァーロは、84歳でこの世を去った。1926年、カニッツァーロの生誕100周年、第2回全国イタリア応用化学会議の際、彼の遺体はパレルモのバンテオンに移された。

有機化学における貢献

カニッツァーロは、約80の論文(有機化学:56報、理論:12報、物理:4報、伝記:5報、教育:2報、その他:4報)を発表した。実験的研究はすべて有機化学の分野で、特に芳香族アルコールの合成と性質に関する研究を行った。1853年、カニッツァーロは、ベンズアルデヒドの性質を調べているとき、ベンズアルデヒドが水酸化カリウムと反応し、酸化還元により安息香酸とベンジルアルコールが生成されることを発見した(図2)。ベンズアルデヒドにアルカリを作用させると安息香酸が生じることは、1832年、ドイツの Justus von Liebig と Friedrich Wöhler により報告されていた。しかし、カニッツァーロは安息香酸とともにベンジルアルコールが得られることを示したので、この不均化反応は彼の名でよばれるようになった。 α 位置の炭素に水素置換基を持たないアルデヒドを塩基性水溶液に入れて加熱すると、酸化体であるカルボン酸と還元体であるアルコールが1:1の量比で得られる。2種類の異なるアルデヒドの間にもこの反応は起こり、交差カニッツァーロ反応とよばれる。

カニッツァーロは、研究人生の後半

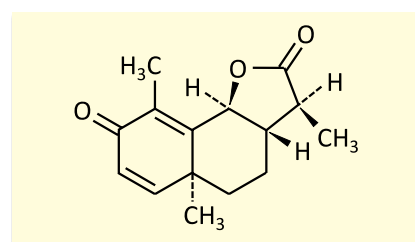


図3. サントニン(C₁₅H₁₈O₃)の化学構造式
サントニンは、回虫を駆除する特效薬として世界中で使用された。

を主にサントニン(図3)の構造研究にあてた。サントニンは、キク科のヨモギ属(アルテミシア属)植物の花から抽出される天然化合物である。カニッツァーロは、サントニンがナフタレンに由来する数少ない天然化合物の一つであることを示した。また、サントニンがケトンに似た性質を持ち、第2アルコールとオキシムに還元される可能性を示した。さらに、サントニンを使用して、ジメチルナフタリン、ジメチルナフトール及びプロピレンを合成することに成功した。

原子量の決定

1825 ~ 1860年、Liebig、Wöhler、Jean-Baptiste Dumas、Auguste Laurent、Charles Gerhardt、Charles Wurtz、Alexander Williamson、August Kekulé、Hermann Kolbe、Edward Franklandらの著名な化学者によって、有機化合物を対象とした研究が急速に進められた。しかし、彼らは独自の原子・分子の概念や原子量・分子量を用いて研究を進めたため、化学を体系化し、化合物を形式化するこ

とが非常に困難になった。この混乱を払拭すべく、1858年、カニッツァーロは、ジェノヴァ大学の理論化学の学生に対して画期的な原子・分子の理論の講義を行った。カニッツァーロは、この講義内容を「*Sunto di un Corso di Filosofia Chimica fatto nella Reale Università di Genoa* (ジェノヴァ大学における化学理論講義概要、以下“*Sunto*”と略記)」としてまとめ、*Il Nuovo Cimento* 誌に発表した。

カニッツァーロは、*Sunto*の中で、原子量と化合物の基本構造について化学者間で生じている混乱を解決する鍵として、イタリアの物理化学者 Amedeo Avogadro の忘れ去られていた仮説を再評価した。1811年、Avogadro は、同温、同圧で同じ体積の気体は同じ数の分子を含んでいると仮定した。すなわち、任意の2種類の気体の相対分子量は、同じ温度と圧力の条件下で、その2種類の気体の密度比と同じである。さらに、Avogadro は、単純な気体は、単一の原子ではなく2つ以上の原子の複合分子から成り立っているとした。カニッツァーロは、この Avogadro の仮説を明確に説明し、原子量を決定する二通りの方法を考案した。一つは Avogadro の原理をもとに分子量を参照して原子量を導き出す方法、もう一つは Dulong-Petit による原子量と固体元素の比熱の関係* (Dulong-Petit の法則) を用いる方法であった。カニッツァーロは、両手法の同等性を示した。さらに、同じ化学の原理が有機化学と無機化学の両方に適用できることを示した。しかし、*Sunto* の学術的価値は、すぐに化学界に受け入れられなかった。

第1回国際化学会議と元素周期表の誕生

18世紀、フランスの化学者 Antoine Lavoisier によって錬金術の束縛から解放された近代化学は、その後系統

的で緻密な実験が進められるようになった。19世紀半ばになると、これらの膨大な実験データを秩序立てて取り扱うため、原子と分子、当量、原子量などの基本概念と化学用語の意味や表記法の統一が不可欠となった。この問題を解決するため、ベルギー・ヘント大学の Kekulé は、カールスルーエ工科大学の Carl Weltzien、フランス・ソルボンヌ大学の Würtz と国際化学会議を開催することに合意し、各国の著名な化学者に招待状を送った。1860年9月3日～5日、ヨーロッパ中から140人を超える化学者がドイツ・カールスルーエに集まった。この会議で、カニッツァーロは、*Sunto* の内容、すなわち Avogadro の業績を強調し、Avogadro の法則と Dulong-Petit の法則を組み合わせると原子量と分子量を正確に計算できることを示した。カニッツァーロの理論は多くの参加者から支持を得たが、多数決による論争の解決がなされないまま会議は終了し、カニッツァーロは自分の発表は無駄に終わったと感じた。しかし、カニッツァーロの友人、イタリア・パヴィア大学の Angelo Pavesi は、会議終了時に *Sunto* の小冊子を参加者に配った。この小冊子は、Lothar Meyer に非常に強い印象を与えた。Meyer は *Sunto* のコピーを読んだ時の感想を次のように述べている。

私はそれを何度も読み、その論文が私たちの議論の主題に当てた明るい光に驚かされました。目からウロコが落ち、これまでの疑問が消え、確信が湧いてきました…。カニッツァーロの論文のおかげです…。Avogadro と Dulong-Petit の法則の不一致がカニッツァーロによって説明された後、両法則を十分に活用することができ、元素の化学量に基礎をなす理論はしっかりとした土台に置かれました。それなしでは、原子結合の理論は進歩し得なかったでしょう。

さらに、Meyer は、自身の著書「*Die Modernen Theorien der Chemie*」において、カニッツァーロの理論を全面的に活用し、化学界に大きな影響を与えた。

カールスルーエ会議には、当時ハイデルベルクに留学していたロシアの若き化学者 Dmitrij Mendelejev (写真2) も参加していた。Mendelejev もカニッツァーロの講義に大きな感銘を受けた一人であった。Mendelejev は、ロシア帰国後、元素の理論的研究に取り組み、1869年、元素周期表を完成させた(図4)。Mendelejev は、周期律の発見について次のように述べている。

私が1860年のカールスルーエでの化学者会議に参加し、イタリアの化学者カニッツァーロの考えを聞いたことは、私の周期律についての理論を発展させる上で決定的な瞬間であった。カニッツァーロは私の先達であった。なぜなら、彼が明確にした原子量こそが私の研究に必要な参考資料であったか

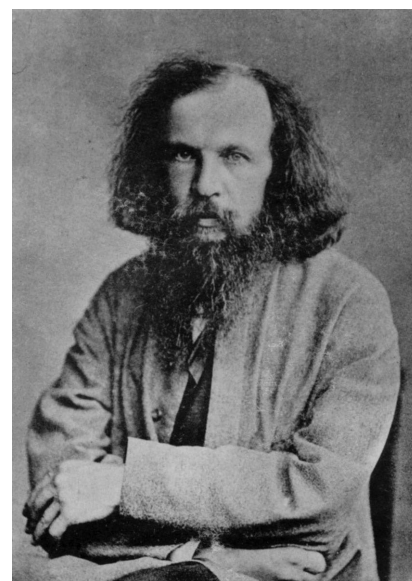


写真2. Dmitrij Mendelejev

Credit : Edgar Fahs Smith Collection, Kislak Center for Special Collections, Rare Books and Manuscripts, University of Pennsylvania (Science History Institute)

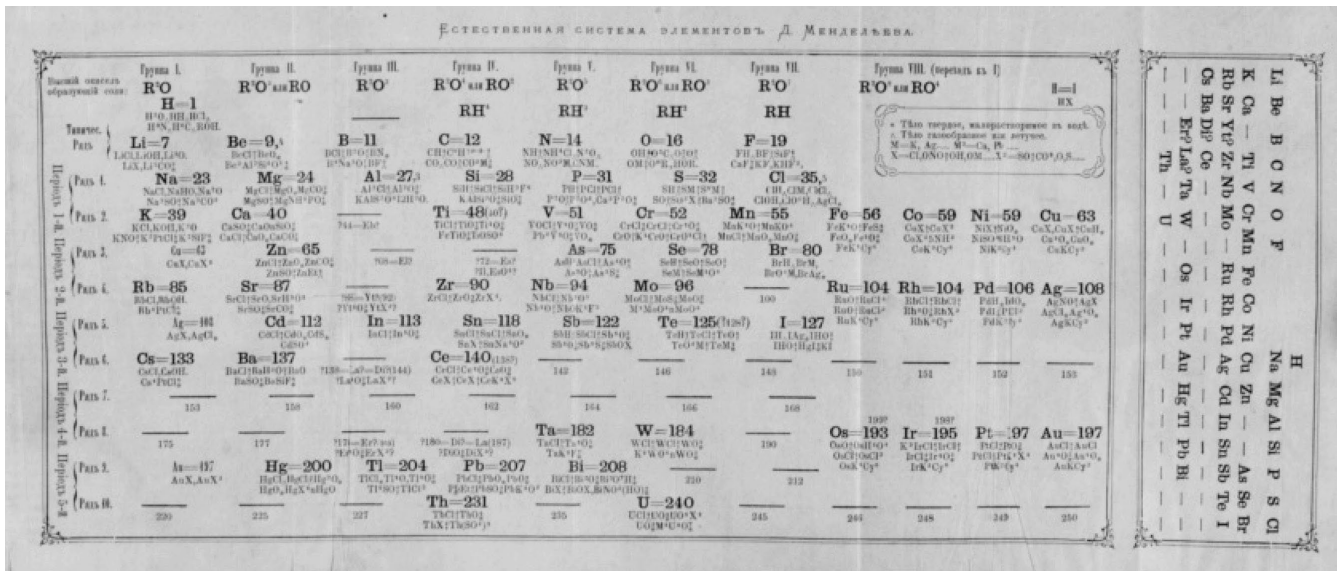


図4. Dmitrij Mendelejev の周期表 (The 1st Edition of *Osnovy khimii*, 1869–1871)

Credit : Science History Institute.

らだ。私は、直ちに、カニッツァーロが提案した原子量が *Duma* の分類に新しい見方を与え、その結果、原子量の増加と元素の性質の周期性に関わる本質的な考えにたどり着いた。

カニッツァーロは、彼の名を冠したカニッツァーロ反応でよく知られているが、William Tildenによると、彼の主要な業績は、原子量を決定する方法を確立したことと、同じ化学の原理によって有機化学と無機化学を統一したことである。この業績は、その後の科学の進歩に重大な影響を与えたとともに、科学の最も基本表といえる元素周期表の誕生をもたらした。この業績に対して、イギリス王立協会が、1891年、カニッツァーロにコプリ・メダルを授与した。コプリ・メダルは、物理学と化学分野の科学業績に対して贈られる最も歴史の古く権威ある賞である。

謝辞

スタニスラオ・カニッツァーロの生涯と功績について学び、本稿を執筆す

る機会をつくって下さった、桜井弘先生 (京都薬科大学名誉教授) に感謝申し上げます。本稿執筆にあたり、以下の文献を参考にさせていただいた。

【参考文献】

- 1) Tilden, W. A. : "Cannizzaro Memorial Lecture" *J. Chem. Soc., Trans.*, **101**, 1677 (1912).
- 2) Hartley, H. B. : "Stanislaw Cannizzaro, F. R. S. (1826-1910) and the first International Chemical Conference at Karlsruhe in 1860" *Notes Rec. R. Soc. Lond.*, **21**, 56 (1966).
- 3) Wisniak, J. : "Stanislaw Cannizzaro" *Educación Química*, **16** (3), 456 (2005).
- 4) <https://www.sciencehistory.org/Science-History-Institute-ウェブサイト> (2020年9月14日閲覧)
- 5) de Milt, C. : "The Congress at Karlsruhe" *J. Chem. Ed.*, **28**, 421 (1951).
- 6) Ihde, A. J. : "The Karlsruhe Congress : A centennial retrospective" *J. Chem. Ed.* **38**, 83 (1961).

* 1819年、フランスの Pierre Louis Dulong と Alexis Thérèse Petit が独立に見出した、固体元素の単位重量当たりの熱容量が一定値をとるという熱力学的法則。現代の解釈では、固体元素の定積モル比熱 C が、常温付近で気体定数 R の3倍となる ($C=3R$)。

† 1826年、フランスの化学者 Jean-Baptiste Dumas は、蒸気密度を測定する手法を確立し、炭素と酸素の原子量を用いて、30元素の原子量を決定した。また、Jöns Berzelius の電気化学的二元論に対抗し、型の説とよばれる有機化合物の分類と構造に関する理論を提唱した。



血液脳関門研究に

抗 Claudin-5, モノクローナル抗体 (R9/M48)

Claudin-5 は主に血液脳関門に発現する約 23kDa の 4 回膜貫通タンパク質で、血液脳関門の制御に関与していると報告されています。本品は、DNA 免疫法により樹立した Native form の Claudin-5 に対するモノクローナル抗体で、Claudin-5 の中和活性（血液脳関門モデルでのバリア機能を下げる作用）を示します¹⁾。他の Claudin ファミリーの Claudin-1, 2, 3, 4, 6, 7 には交差反応性を示しません¹⁾。

※本品は大阪大学・愛媛大学・当社の共同出願特許ライセンスに基づき販売しています。

PCT/JP2018/016975「抗 CLDN-5 抗体、及びその抗体を含有する医薬」

特長

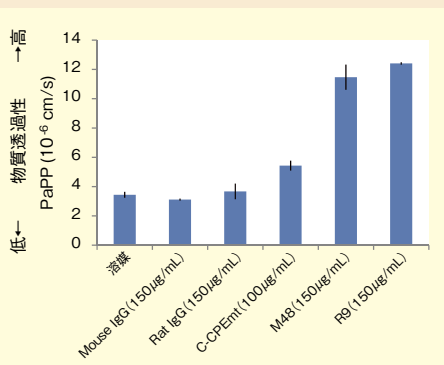
- 血液脳関門 *in vitro* 細胞モデルでのバリア活性低下作用あり

製品概要

品名	抗 Claudin-5, ラットモノクローナル抗体 (R9)	抗 Claudin-5, モノクローナル抗体 (M48)
コード No.	014-28101	011-28091
組成	PBS	
抗体濃度	ラベル記載 初回製造ロット: 1.1mg/mL	ラベル記載 初回製造ロット: 1.2mg/mL
クローン No.	R9	M48
抗原	ヒト Claudin-5 全長遺伝子 accession#AAH19290	
抗体サブクラス	ラット IgG2b・κ	マウス IgG3・κ
種交差性	ヒト、サル	
特異性	Claudin-5 ※ Claudin-1, 2, 3, 4, 6, 7 とは交差反応しません ¹⁾ 。	
アプリケーション	フローサイトメトリー 中和実験 (<i>in vitro</i>)	0.5-5 μg/mL 90-150 μg/mL

データ

血液脳関門 *in vitro* 細胞モデルでの中和実験



本抗体 (R9 及び M48) を血液脳関門カニクイザル細胞モデル (BBB キット、ファーマコセル社) に添加し、同モデルにおけるバリア活性の指標となる物質透過性への影響を検証した。

本抗体 (R9 及び M48) の添加により蛍光色素標識デキストラン (4kDa) の透過性が向上した。同様の作用を示す C-CPEmt より高い透過性を示した。

※C-CPEmt: Claudin-5 結合因子 (ウェルシュ菌由来毒素変異体)

【参考文献】

- 1) Hashimoto, Y. *et al.*: *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **363**, 275 (2017).

コード No.	品名	規格	容量	希望納入価格 (円)
NEW 014-28101	Anti Claudin-5, Rat Monoclonal Antibody (R9)	免疫化学用	500μL	70,000
NEW 011-28091	Anti Claudin-5, Monoclonal Antibody (M48)	免疫化学用	500μL	70,000

R…2~10℃保存 F…-20℃保存 C…80℃保存 I…150℃保存 表示がない場合は室温保存です。
 特定 毒…特定毒物 毒…毒物 劇…劇物 毒…毒薬 劇…劇薬 危…危険物 向…向精神薬 特…特定麻薬向精神薬原料
第1…化審法 第一種特定化学物質 第2…化審法 第二種特定化学物質 化兵…化学兵器禁止法 第一種指定物質 化兵2…化学兵器禁止法 第二種指定物質 カルタヘナ…カルタヘナ法
覚…覚せい剤取締法 国保…国民保護法
 掲載内容は、2020年10月時点での情報です。上記以外の法律及び最新情報は、当社HPをご参照下さい。

取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。

和光純薬時報 Vol. 88 No. 4

2020年10月15日発行

発行責任者 吉井陽市

編集責任者 中山紗希

発行所 富士フィルム和光純薬株式会社
〒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://ffwk.fujifilm.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 ffwk-jjho@fujifilm.com

●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.

■富士フィルム和光純薬株式会社 (Japan)
 試薬 URL <https://labchem-wako.fujifilm.com>
 フリーダイヤル (日本のみ) 0120-052-099
 フリーファックス (日本のみ) 0120-052-806
 E-mail ffwk-labchem-tec@fujifilm.com

■Wako Overseas Offices:

• FUJIFILM Wako Chemicals U.S.A. Corporation <http://www.wakousa.com>
 Toll-Free (U.S. only) +1 877 714 1920

Tel +1 804 714 1920 / Fax +1 804 271 7791

• FUJIFILM Wako Chemicals Europe GmbH <http://www.wako-chemicals.de>
 European Office (Neuss, Germany) : Tel +49 2131 311 0 / Fax +49 2131 311 100