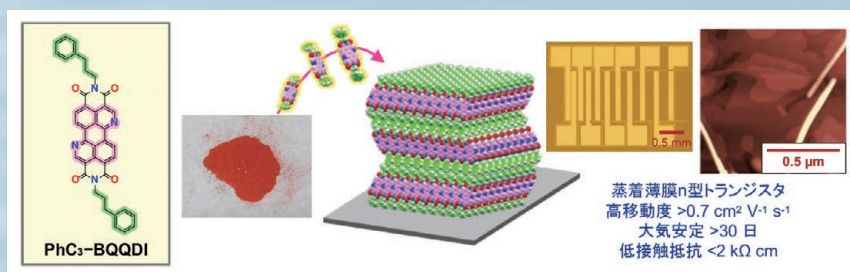


和光純薬時報

July 2021
Vol.89 No.3



【総説】

- 「真空蒸着法に適した高性能 n 型有機半導体材料とデバイス特性」 岡本 敏宏、熊谷 翔平…………… 2
- 「新規核酸誘導体コアクロル (COA-Cl) の生理活性—神経細胞保護効果を持つ *xeno free* 栄養因子—」 塚本 郁子…………… 6
- 「家族性パーキンソン病患者 iPS 細胞由来神経系細胞におけるエンドソーム機能障害」 坊野 恵子、岡野 ジェイムス 洋尚…………… 9
- 「PTS 溶液の開発と EV への応用」 増田 豪…………… 12

【連載】

- 〈よくわかる BDNF—基礎から臨床まで—〉 **新連載**
- 「第 1 回 BDNF 概論」 武井 延之…………… 15
- 〈微量元素分析—さまざまな分野での活用事例とその重要性—〉 **新連載**
- 「第 1 回 医薬品の元素不純物ガイドラインにおけるリスクアセスメント及び管理について」 西岡 利奈、花河 奏一郎…………… 18
- 〈ミクログリア研究の最前線—基礎から臨床へ—〉
- 「第 5 回 ヒト血液を用いた脳内ミクログリア活動性予測による心のリバース・トランスレーショナル研究」 加藤 隆弘…………… 21

【化学大家】

- 「屋井 先蔵」 中村 幹夫…………… 29

【製品紹介】

有機合成	細胞生物
ビルディングブロック …………… 23	ルシフェリン溶液 …………… 26
環境・分析	遺伝子
石英ネジロバイアル …………… 23	MagCapture™ エクソソームアイソレーションキットPS Ver.2 …………… 27
高純度NMR溶媒 …………… 24	α1-アンチトリプシン遺伝子変異検出キット …………… 27
LC/MS用溶媒シリーズ …………… 24	SARS-CoV-2 N501Y/E484K/L452R/E484Q Mutation Detection Kit …………… 32
生薬試験用試薬 …………… 25	培養
ポジティブリスト関連農薬標準品 …………… 25	ペプトン・タンパク質加水分解物 …………… 28
その他	
除菌用エタノール …………… 26	

【お知らせ】

- 生薬試験用試薬カタログのご案内 …………… 25

はじめに

あらゆるモノにセンシングデバイスを装着しインターネットを通じて制御管理するInternet of Things (IoT) 社会の創成が期待される中、トリリオン・センサ・ユニバースを実現するための多様なセンシングデバイスや、データを通信するRFIDタグなどの開発が盛んに行われている。これらを、ペットボトルや人体のような湾曲面に貼り付けられるフレキシブルデバイスや医療用センサなどとして社会実装するためには、例えば軽量性、柔軟性、生体・環境適合性などの性質が求められる。従来のデバイスにはシリコンに代表される無機半導体を用いられているが、上記の性質に優れた半導体材料として有機半導体が注目されており、現在、有機デバイスの研究が精力的に行われている。有機半導体は有機溶媒に対する可溶性を活かしたプリントドエレクトロニクスへの応用が特に注目されているが、有機溶媒を用いないクリーンなデバイス作製プロセスである真空蒸着法で得られる有機発光ダイオード (Organic Light-Emitting Diode ; OLED) や有機薄膜トランジスタ (Organic Thin-Film Transistor ; OTFT) も未だ重要な有機デバイスである。例えば、近年は真空蒸着型 OTFT の高周波応答性¹⁾ や差動増幅回路応用²⁾ が報告されており、集積論理回路およびIoTデバイスの開発が囑望される。しかしながら、論理回路の省電力化や信号利得の向上には正孔輸送型 (p型) OTFT と電子輸送型 (n型) OTFT を一対とした相補型回路が有利であるが、実際にはp型OTFTに関する研究や回路応用が主であり、n型OTFTの進展は極端に遅れている。これは、デバイス応用研究に適したn型有機半導体の欠如が理由と考えられ、その開発が喫緊の課題である。

OTFTに用いる有機半導体の性能指

標は、電荷移動度 (以下、移動度と略す) や大気安定性、輸送電荷の極性などである。真空蒸着法で得られるのは多結晶薄膜であるため、これらの性能は結晶性や粒径などにも大きく依存する。加えて、多結晶中の集合体構造は再結晶などで得られる単結晶構造とは異なることが多々あり、構造・物性相関の理解が単純でない。輸送電荷の極性については、電荷輸送を担う分子軌道準位と電極材料の仕事関数とのエネルギー的な差に依存するため、分子設計による制御が可能である。一般に、有機半導体はベンゼン環やチオフェン環などから成りπ電子豊富なため、正孔輸送に関与する最高被占軌道 (Highest Occupied Molecular Orbital ; HOMO) 準位が、大気安定な電極材料としてよくOTFTに用いられる金 (Gold) や炭素 (Carbon) 電極の仕事関数と近いため、p型有機半導体の設計は比較的容易である。一方、電子輸送は最低空軌道 (Lowest Unoccupied Molecular Orbital ; LUMO) が関与するが、LUMO準位は上記電極材料の仕事関数との差が大きい。一般には電子求引基の導入によりLUMO準位を深めることで、n型有機半導体を得ることができる。深いLUMO準位はn型OTFTの大気安定性にも繋がるため重要な指針であるが、電荷伝導に直接関与しない電子求引基の導入により伝導に有利な構造を形成しづらくなるなど分子設計上の制約がn型有機半導体の開発を困難にしている。

我々は最近、n型OTFTに有用な高

性能n型有機半導体材料を報告した³⁾。このベンゾ[de]イソキノリノ[1,8-gh]キノリン-3,4,9,10-テトラカルボン酸ジイミド (benzo[de]isoquinolino[1,8-gh]quinoline-3,4,9,10-tetracarboxylic diimide ; BQQDI) 骨格 (図1) は、電子求引性のイミド基に加え、電気陰性な窒素原子をπ共役骨格中に持つため、深いLUMO準位を有する (-4.17 eV (密度汎関数法による計算値)、-4.11 eV (サイクリックボルタンメトリーによる実測値))。指標の一つであるLUMO準位が<-4.0 eV (真空単位基準)⁴⁾ であるため、BQQDI化合物は大気安定なn型OTFTとして有望である。また、BQQ骨格中の窒素原子やイミド基の酸素原子が帯びる負電荷により、水素結合による分子間相互作用が顕著となり、高い電子輸送能を示す。とりわけ、イミド基上にフェニル基 (-C₂H₅Ph) を有するPhC₂-BQQDIは塗布型単結晶OTFTとしてバンド伝導による高移動度や優れた環境ストレス安定性を示すことを明らかにした^{3,5)}。本稿では、BQQDI化合物としての大気安定性とPhC₂-BQQDIの特徴である“フェニルアルキル基”を拡張した新規BQQDI化合物PhC₃-BQQDI⁶⁾ について、真空蒸着型OTFT特性に焦点を当てて解説したい。

合成および熱・化学安定性評価

PhC₃-BQQDIはPhC₂-BQQDIと同様の手法で合成し、昇華精製により

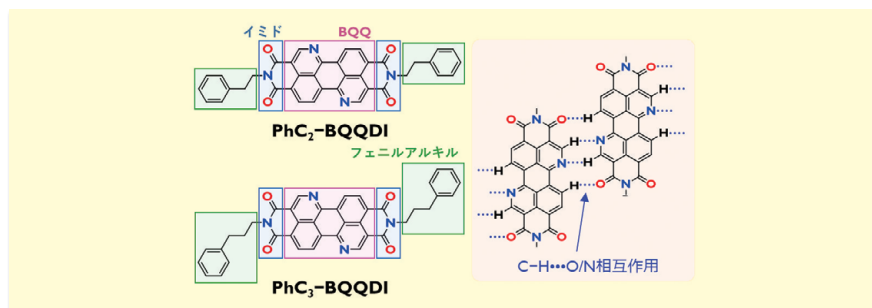


図1. BQQDI化合物の分子構造と設計された分子間相互作用

デバイス評価に適した高純度 (>99%LC) 材料として得ることができた。PhC₂-BQQDIと同様、PhC₃-BQQDIは高い熱安定性を有し、窒素気流下での熱重量 (thermogravimetry; TG) 測定から、5%重量減少を示す温度 (T_{95%}) は404℃と推定された。また、同時に行われた示差熱分析 (differential thermal analysis; DTA) でT_{95%}まで熱異常が観測されなかったことから、結晶相の高い安定性が推察される。また、真空蒸着法により合成石英基板上に厚み100 nmのPhC₃-BQQDI多結晶薄膜を作製し、紫外可視 (ultraviolet-visible; UV-Vis) 吸収スペクトルの経時変化を4週間追跡したところ、スペクトルに変化は見られなかったことから、大気下・室内光下で化学的に安定な材料であると言える。

単結晶構造と電子輸送能計算

置換基 (フェネチル基およびフェニルプロピル基) の影響を調べるため、PhC₃-BQQDIの単結晶構造解析を行いPhC₂-BQQDIと比較した。PhC₃-BQQDIはPhC₂-BQQDIをはじめとする他のBQQDI化合物と同様に伝導層を担うブリックワーク構造を形成し、フェニルプロピル基により層状の集合体構造を有している (図2上)。その基本的な集合体構造様式はPhC₂-BQQDIに似ているものの、置換基の高さの違いにより、ブリックワークの相対的な配置に違いが見られた。よってLUMO軌道の重なりにも違いが生じ、密度汎関数法によりLUMO軌道間のトランスファー積分は図2下に示すように推定された。図1右に示したような分子間C-H...OおよびC-H...N相互作用により横方向の分子間配置はほとんど同じであるため、t₂は約19 meVと両化合物に違いは無いが、πスタックを介するt₁およびt₃はPhC₃-BQQDIで顕著に小さく推定された。

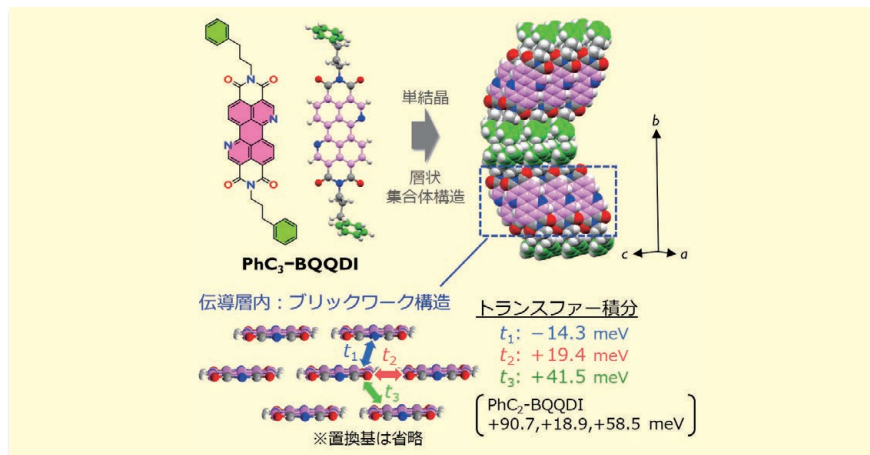


図2. PhC₃-BQQDIの単結晶構造とLUMO間のトランスファー積分

このことから、単結晶構造とトランスファー積分だけを考慮すると、PhC₃-BQQDIの電子輸送能はPhC₂-BQQDIに比べて低いことが推察される。

真空蒸着型薄膜トランジスタ特性

はじめに述べたように、電子輸送能は真空蒸着型OTFTを作製することで実験的に検証した。基板には熱酸化膜

(SiO₂) 200 nm付のnドープシリコンウエハーを用い、SiO₂表面はデシルトリメトキシシラン (DTS) で化学修飾することで電子輸送を阻害する官能基 (例えばSi-OH) の影響を低減させた。真空蒸着法により活性層としてPhC₃-BQQDIまたはPhC₂-BQQDIの約20 nm厚の多結晶膜を成膜した。蒸着中は基板温度を室温、100℃または180℃に保つことで多結晶粒径を制御した。最後にメタルマスクを用い

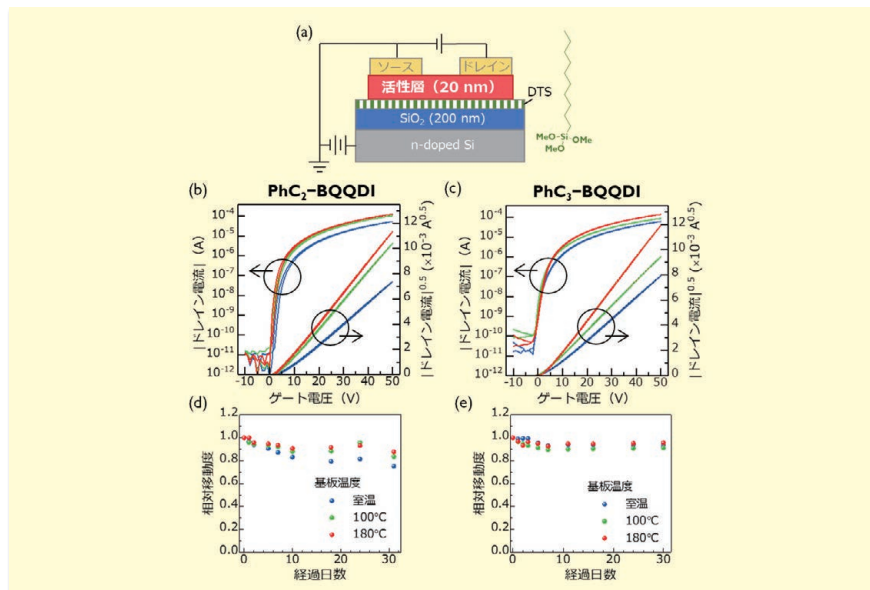


図3. 大気下で評価した真空蒸着型 OTFT 特性

(a) OTFT 構造の模式図 基板温度別の (b) PhC₂-BQQDI および (c) PhC₃-BQQDI の飽和領域での伝達特性 (ドレイン電圧: 50 V)。青線: 室温、緑線: 100℃、赤線: 180℃。(d) PhC₂-BQQDI および (e) PhC₃-BQQDI の移動度の 大気下における経時変化。

表 1. 大気下で評価した真空蒸着型 OTFT 特性 (チャンネル長/幅 = 100 μm / 1000 μm)

化合物	基板温度	平均(最大)移動度 (cm ² V ⁻¹ s ⁻¹) [†]	平均閾値電圧 (V) [†]	接触抵抗 (kΩ cm) [‡]
PhC ₂ -BQQDI	室温	0.29 (0.30)	4.6	4.8±0.6
	100°C	0.54 (0.54)	3.3	5.8±0.5
	180°C	0.64 (0.65)	3.5	4.7±0.4
PhC ₃ -BQQDI	室温	0.32 (0.33)	3.2	1.7±0.3
	100°C	0.51 (0.53)	1.4	4.3±0.6
	180°C	0.65 (0.70)	2.5	3.2±0.5

[†]飽和領域 (ドレイン電圧 = 50 V) で評価. [‡]ゲート電圧 = 50 V での推算値

て金電極60 nmを蒸着し、ソースおよびドレイン電極を形成した (図 3 a)。PhC₂-BQQDI、PhC₃-BQQDIともに大気下でも典型的なn型OTFT挙動を示し (図 3 b-c)、移動度や閾値電圧は表 1 に示す通りであった。移動度はPhC₃-BQQDIの方がやや高い程度で同等なもの、閾値電圧および伝達曲線に見られるヒステリシスはPhC₃-BQQDIの方が小さく、優れたOTFT特性を示した。この結果はトランスファー積分からの予想とは一致しないが、後述する薄膜構造の重要性や、(本稿では割愛するが) バンド構造を考慮する必要性を示唆するものである。さらに、トランスファーライン法 (transfer line method ; TLM) により接触抵抗を評価した。通常、接触抵抗はチャンネル抵抗に比べて小さいと考えているが、チャンネル長が短くなるにつれ接触抵抗がOTFT全体の特性に大きく影響するため、OTFTの再現性や信頼性を評価する上で重要な因子である。特に、高周波応答性にはOTFTの短チャンネル長化が必要なため、小さな接触抵抗が重要となる。今回の比較では、他の特性同様PhC₃-BQQDIが低接触抵抗を示した (表 1)。これらはソース・ドレイン電極に金だけを用いたn型OTFTでは最小クラスの値であることから、実用的なn型OTFTの開発研究として興味深い対象となりうる。また、PhC₂-BQQDIおよびPhC₃-BQQDIはいずれも優れた大気安定性を示すが、特にPhC₃-BQQDIでは一か月後でも90%以上の移動度を維持

した (図 3 d-e)。以上より、フェニルアルキル置換BQQDI化合物は真空蒸着型n型OTFTとしても優れた材料であり、とりわけPhC₃-BQQDIは様々な応用研究への展開が期待できる。

真空蒸着型多結晶薄膜構造

最後に蒸着型OTFT特性の違いについて調べるため、X線回折装置を用いて面外方向X線回折測定 (X線源: Cu Kα、波長: 1.5406 Å) を行った。成膜時の基板温度に依らず、PhC₃-BQQDIでは単結晶構造のb軸 (積層方向) に一致する回折パターンのみが観測された。一方、PhC₂-BQQDIでは二つの結晶相が混在していることがわ

かった (図 4 a)。このうち、一方は単結晶構造に一致する単結晶相であるが、他方は未知の薄膜相である。薄膜相の集合体構造は未だわかっていないが、一つの仮説として、薄膜相は単結晶相に比べて電子輸送能に乏しく、この混在がPhC₃-BQQDIに比べて低いOTFT特性に繋がったと推察される。また、単結晶構造を基にした分子動力学 (molecular dynamics ; MD) シミュレーションにより、薄膜相の形成について考察した。ここでは、単結晶構造から取り出した二分子膜を真空空間に置きMDシミュレーションを行うことで、真空蒸着時初期過程における単結晶相の安定性について考えた。図 4 b に示すように、二分子膜内部に比べて真空界面のフェニルアルキル基のB因子 (熱揺らぎの指標) が大きくなったが、特にPhC₂-BQQDIで顕著なB因子の増大を示した。この影響を受ける形でBQQ骨格のB因子も増大したため、基板上に分子が蒸着される際、PhC₂-BQQDIでは単結晶相の形成が比較的不安定であることが示唆される。PhC₃-BQQDIではフェニルプロピル基が揺らいでいるものの、BQQ

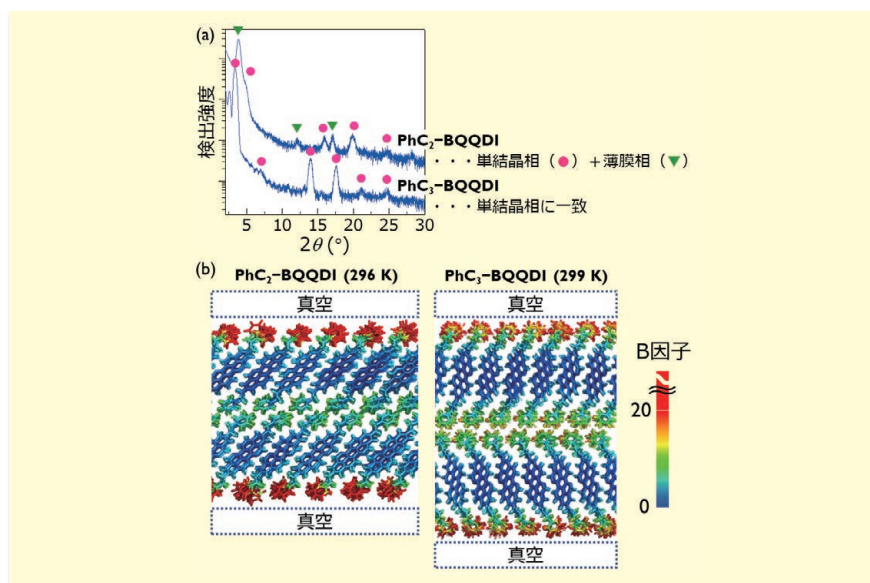


図 4. 薄膜構造の推定

(a) 面外方向X線回折 (波長 = 1.5406 Å)。 (b) 二分子膜のMDシミュレーションによるB因子マップ。

骨格のB因子は抑制されている。以上より、真空蒸着型OTFTではフェネチル基に比べて柔軟なフェニルプロピル基が、PhC₃-BQQDIの純粋な単結晶相形成に繋がり、高性能n型OTFT特性の発現に寄与したと考えられる。

おわりに

本稿では、真空蒸着型OTFTとしての性能に焦点を当て、フェニルプロピル基を持つPhC₃-BQQDIの開発および化学的性質や集合体構造、実デバイスを指向したOTFT特性評価について最近の研究成果を述べた。単結晶構造解析からはフェネチル基を持つ類縁体PhC₂-BQQDIでより優れた電子輸送能が予想され、実際に塗布型単結晶OTFTではPhC₂-BQQDIが最も良好な性能を有する。しかしながら真空蒸着型OTFTを評価したところ、移動度、閾値電圧、ヒステリシス、接触抵抗においてPhC₃-BQQDIの方が優れた性能を示すことが明らかとなった。これは置換基のエチル鎖とプロピル鎖との柔軟性の違いに起因すると考えられる。以上のように、継続的なn型有機半導体の比較研究によって、単結晶構造だけでは理解し難い有機半導体分子設計、および今後のOTFT開発について重要な知見を与えることが期待される。

謝辞

本稿の研究成果は、竹谷純一教授（東大）、渡辺豪講師（北里大）、石井宏幸助教（筑波大）をはじめとする多くの共同研究者の協力のもと得られた。また本稿の一部は、科学研究費補助金基盤研究 B (No. 17H03104)、科学技術振興機構さきがけ「微小エネルギーを利用した革新的な環境発電技術の創出」領域（谷口研二研究総括、秋永広幸研究副総括）(No. JPMJPR17R2)、富士フイルム株式会社の支援により進められたものである。ここに深く感謝申し上げる。

【参考文献】

- 1) Borchert, J. W., Zschieschang, U., Letzkus, F., Giorgio, M., Weitz, R. T., Caironi, M., Burghartz, J. N., Ludwigs, S. and Klauk, H.: *Sci. Adv.*, **6**, eaaz5156 (2020).
- 2) Sugiyama, M., Uemura, T., Kondo, M., Akiyama, M., Namba, N., Yoshimoto, S., Noda, Y., Araki, T. and Sekitani, T.: *Nat. Electron.*, **2**, 351 (2019).
- 3) Okamoto, T., Kumagai, S., Fukuzaki, E., Ishii, H., Watanabe, G., Niitsu, N., Annaka, T., Yamagishi, M., Tani, Y., Sugiura, H., Watanabe, T., Watanabe, S. and Takeya, J.: *Sci. Adv.*, **6**, eaaz0632 (2020).
- 4) Usta, H., Facchetti, A. and Marks, T. J.: *Acc. Chem. Res.*, **44**, 501 (2011).
- 5) Kumagai, S., Watanabe, S., Ishii, H., Isahaya, N., Yamamura, A., Wakimoto, T., Sato, H., Yamano, A., Okamoto, T. and Takeya, J.: *Adv. Mater.*, **32**, 2003245 (2020).
- 6) Kumagai, S., Ishii, H., Watanabe, G., Annaka, T., Fukuzaki, E., Tani, Y., Sugiura, H., Watanabe, T., Kurosawa, T., Takeya, J. and Okamoto, T.: *Chem. Mater.*, **32**, 9115 (2020).



ヒステリシス

トランジスタの伝達曲線（出力曲線）でゲート電圧（ドレイン電圧）を掃引した際、ドレイン電流が往復路で異なること。またはその度合い。

トランスファーライン法

異なるチャンネル長を持つ複数のトランジスタを作製し、接触抵抗を求める手法。配線抵抗が無視できる場合、全体抵抗をチャンネル長に対してプロットし、近似曲線の外挿から見積もられるチャンネル長ゼロの点の全体抵抗が接触抵抗として見積もられる。

接触抵抗とチャンネル抵抗

トランジスタ全体の電気抵抗は、半導体/ゲート絶縁体界面に形成されるチャンネル内の抵抗（チャンネル抵抗）、ソース・ドレイン電極からチャンネルに電荷注入するための抵抗（接触抵抗）、および両電極内の抵抗（配線抵抗）から成る。ただし、一般に用いられる金属電極の場合、配線抵抗は無視できるほど小さいため、チャンネル抵抗と接触抵抗が OTFT の支配的な抵抗成分である。接触抵抗はチャンネル長に依存しない値であるため、チャンネル長が短くなりチャンネル抵抗が低下するにつれ、OTFT 特性において接触抵抗の影響が大きくなる。

高性能n型半導体材料

コード No.	品名	規格	容量	希望納入価格(円)
165-28601	PhC2-BQQDI	機能性有機材料用	100mg	80,000
166-28871	PhC3-BQQDI	機能性有機材料用	100mg	83,000
024-19591	BQQDI Precursor	機能性有機材料用	250mg	照会

その他のn型有機半導体材料は当社HPをご覧ください。

試薬事業トップ→合成・材料→有機エレクトロニクス→有機半導体→n型有機半導体材料

n型有機半導体 和光

検索

新規核酸誘導体コアクロール (COA-CI) の生理活性 —神経細胞保護効果を持つxeno free栄養因子—

香川大学医学部 薬物生体情報学講座 塚本 郁子

はじめに

コアクロール (COA-CI) は筆者の研究グループが新規合成し、2010年より「2Cl-C. OXT-A」の名称で販売されている化合物である。当時は血管新生を促進する画期的な低分子として上市されたが、その後の研究で神経細胞に対する保護栄養効果の他、様々な生理活性が明らかになった。このたび、試薬名をコアクロールと改名してリニューアル販売をしていただくにあたり、新しい知見を紹介したい。

コアクロールの構造

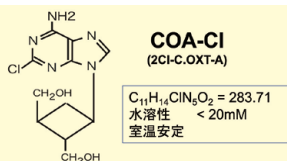


図1. コアクロール (COA-CI) の構造

コアクロールは徳島文理大学香川薬学部で合成された新規化合物である。これは微生物から単離された抗ウイルス活性を持つ核酸誘導体 Oxetanocin A をベースに、そのオキシタン環 (C-C-C-Oの環状エーテル) をシクロブタン環 (Carbo Oxethane) に置き換え、アデニン塩基にClを付加した構造を持つ (図1)。旧称の2Cl-C. OXT-Aは2位の塩素、炭素化オキシタン環 (Carbo Oxetane)、結合塩基の種類 (Adenine) を表していた。コアクロールとはこの旧称を短縮した名称である。コアクロールについて最初に発見した生理活性は血管新生促進作用であった。構造活性相関を調べるために数10種類に及ぶコアクロール誘導体について血管新生作用を調べたが、これまでのところ最も活性が高いのがこのコアクロールである。

血管新生作用

血管新生促進作用は血管内皮細胞



図2. COA-CI による HUVEC の管腔形成の促進

HUVECと線維芽細胞NHDFを用いた共培養系における管腔形成実験、ニワトリ漿尿膜やウサギ角膜を用いる*in vivo*実験で確認してきた¹⁾。HUVECは単培養しても管腔を形成しないが、共培養するとNHDFから分泌される血管内皮細胞増殖因子 (VEGF) のシグナルをうけて管腔形成を開始する (図2)。ところがコアクロールはHUVECにおいてVEGF受容体の活性には直接の影響を示さない²⁾。そこで筆者らはVEGFとは別の血管新生促進因子であるスフィンゴシン1リン酸 (S1P) に注目し、siRNAや各種の阻害剤を用い検討した。コアクロールはS1P₁受容体を介してMAPキナーゼを活性化し、HUVECの管腔形成を促進していることが明らかとなった²⁾。

HUVECに対する作用の一方で、NHDFにコアクロールを添加するとVEGF分泌が促進された (図3 a)。VEGF遺伝子発現を促進させる細胞内情報伝達経路としては、低酸素によって誘導される転写因子HIF-1 α を介したものと、代謝に関連した転写補助因子であるPGC-1 α (PPAR γ coactivator 1 α) を介したものが知られている

(*Nature*, **451**, 1008 (2008))。NHDFにおいてコアクロールはHIF-1 α に有意な変化をもたらさなかったが、PGC-1 α を遺伝子・タンパク質レベルで誘導した (図3 b)。さらにcAMPの濃度上昇、CREBのリン酸化の亢進も誘発したことからNHDFにおけるコアクロールのVEGF亢進作用は低酸素で増強されるもののHIF-1 α ではなく、PGC-1 α を介するpathwayの活性化によってもたらされていると考えられた³⁾。従って、コアクロールの血管新生促進作用には血管内皮細胞のS1P₁受容体を介する作用と、NHDF等周辺細胞からのVEGF分泌を亢進する作用の双方が貢献すると考えられる。

神経細胞に対する保護 栄養効果

コアクロールにはMAPキナーゼの活性化作用が確認されていたので、神経細胞に対しては突起伸長作用が期待できた。神経モデル細胞PC12を用いて検証したところ、ERK1/2の活性化と突起伸長効果が確認できた (図4 a)。また、細胞を低酸素や低栄養 (glucose

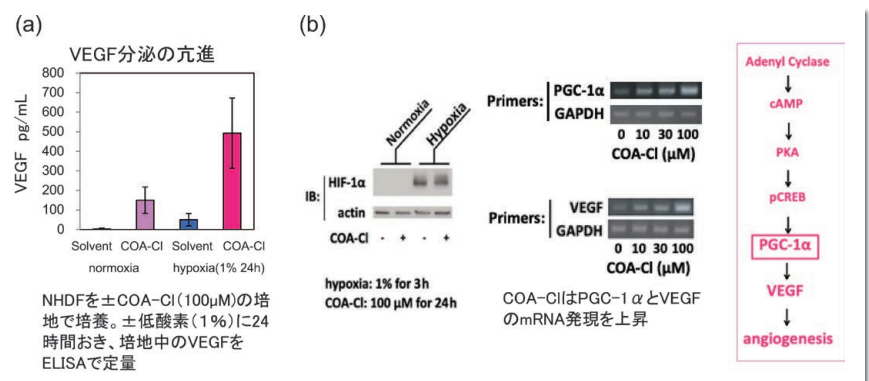


図3. COA-CI による VEGF の亢進

free) といったストレスに曝して細胞障害性のマーカーであるLDH活性を測定したところ、ストレス前の投与だけでなくストレス後の投与でも変わらない保護効果が確認できた (図4b)。この、ストレス後の投与でも有効であったという結果は、例えば脳梗塞などの虚血性障害の発生後に投薬しても効果が期待できるということであり、創薬シーズとしても有望と思われる。さらに、無血清ストレスに対する保護作用が認められた (図5) 他、過酸化物によるストレスに対しても保護作用 (細胞生存率の温存、アポトーシスの軽減) が確認できた。現在目覚ましい発展途上にある再生医療の現場では、その細胞培養過程において *xeno free* 素材が求められている。コアクロルは常温安定な低分子でありながら、代替血清や *xeno free* 栄養因子としての活躍が期待できる画期的な物質である。

コアクロルはPC12においてERK1/2だけでなく、チロシンヒドロキシラーゼ (TH) の活性化も誘導した。THはカテコールアミン生合成の律速酵素であり、実際に培地中のドパミン濃度が上昇することも確かめた。またマウスの脳内 (線条体) にマイクロダイアリスプローブを留置し、コアクロルを含むリンゲル液を還流して脳脊髄液を含む回収液中のドパミンを定量したところ、図6に示すように濃度依存的なドパミンの上昇が明らかになった⁴⁾。ドパミンはパーキンソン病を始めとする種々の神経変性疾患と深い関わりを持つ。神経変性疾患には有効な治療薬が少ないのが現状であるが、コアクロルはここでも活躍が期待できる。

病態モデル動物実験

血管新生作用、神経保護栄養効果は侵襲を受けた生体にとって大切な作用である。そこで病態モデル動物についてコアクロルの効果を検討した。脳虚

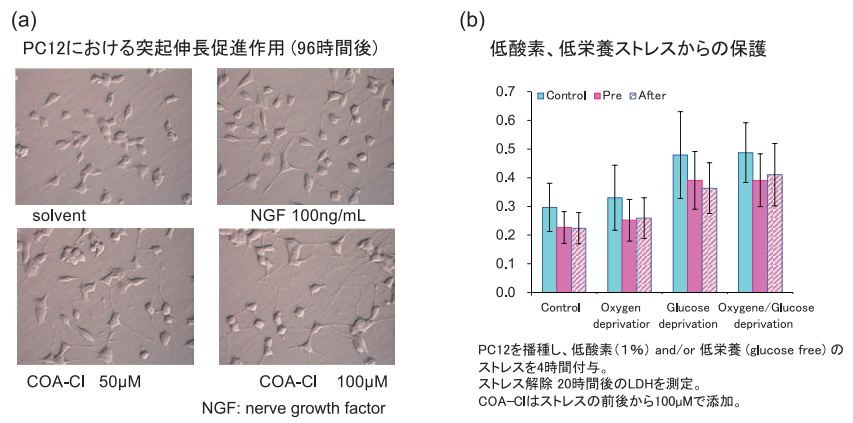


図4. COA-CIによる神経細胞保護栄養効果

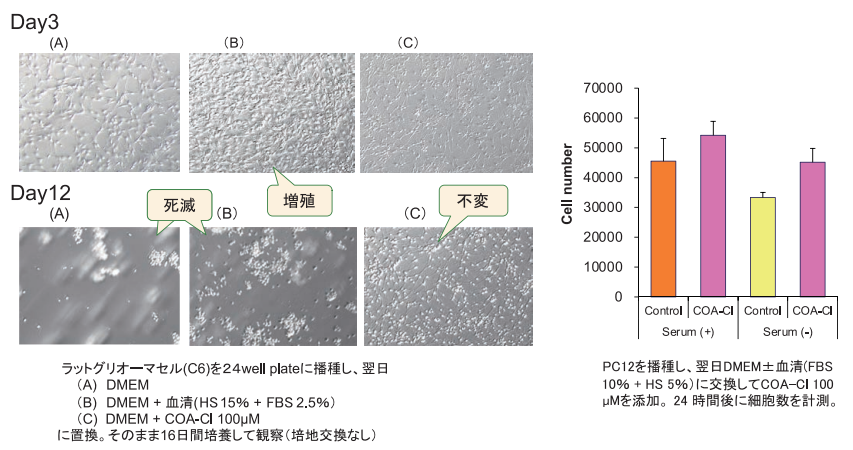


図5. 無血清ストレスからの保護作用

血、脳出血モデルラットや心虚血モデルマウスにおいて、障害発生後のコアクロル投与が損傷体積を縮小し予後を改善することを確かめた^{9,7)}。さらにアルツハイマーモデルマウスの記憶学習にも改善効果があることを報告している⁸⁾。

コアクロルの可能性

以上のようにコアクロルは様々な生理活性を有しており、創薬シーズや再生医療における *xeno free* 栄養因子としての応用が期待される。また、今回は紹介しきれなかったが、組織の線維化に関与する結合組織成長因子 (CTGF) の抑制作用も見つかっており、TGF β 1が誘発する組織の線維化

や上皮間葉転換 (EMT) を抑制することも報告している^{9,10)}。現在、COVID-19や鳥インフルエンザ、エボラ出血熱などのウイルス疾患が大きな社会問題を引き起こしているが、そもそもコアクロルは抗ウイルス薬の誘導体である。これらのウイルスに対して抗ウイルス活性を有するかどうかにつ

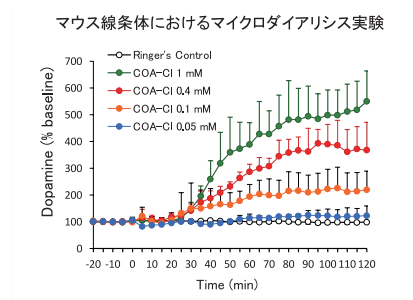


図6. COA-CIによるドパミン分泌亢進作用

いては大変興味を持たれるところである。室温安定な水溶性低分子という性質は創薬上の大きなアドバンテージでもある。今回のリニューアル販売を機にさらなる研究が進み、人類の健康に資することができるようにと願ってやまない。

謝 辞

コアクロルの研究は徳島文理大学香川薬学部の丸山徳見先生と榊原紀和先生による新規合成から始まった。それに続く広範な研究は引用文献記載の共同研究者の方々の協力なしには成すこ

とができなかった。この場を借りて、心から御礼申し上げます。

【参考文献】

- 1) Tsukamoto, I. et al. : *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **399**, 699 (2010).
- 2) Igarashi, J. et al. : *Pharma. Res. Per.*, **2**, e00068 (2014).
- 3) Igarashi, J. et al. : *Physiol. Rep.*, **4**, e12742 (2016).
- 4) Jamal, M. et al. : *Brain Res.*, **1706**, 68 (2019).
- 5) Okabe, N. et al. : *Brain Res.*, **1506**, 115 (2013).
- 6) Lu, F. et al. : *J. Stroke Cerebrovasc. Dis.*, **25**, 2637 (2016).
- 7) Nishikido, T. et al. : *Sci. Rep.*, **9**, 2533 (2019).
- 8) Kishimoto, Y. et al. : *Data Brief*, **20**, 1877 (2018).
- 9) Kawami, M. et al. : *Drug Methab. Pharmacokinet.*, **32**, 224 (2017).
- 10) Nakai, K. et al. : *J. Dermatol. Sci.*, **94**, 205 (2019).
- 11) 榊原紀和 他 : *BIO Clinica*, **33**, 39 (2018).



xeno free (ゼノフリー)

非ヒト由来成分を含まないこと。細胞の培養環境を説明するときなどに使われることが多い。再生医療に用いられるヒト細胞加工製品を製造する際にはゼノフリー培養環境のほうが望ましいとされており、FBSなどの動物由来栄養因子を使わない培養試薬の開発が求められている。

容量・価格リニューアル VEGF/NGF likeな活性を示す低分子化合物 COA-Cl [2-Cl-C.OXT-A]

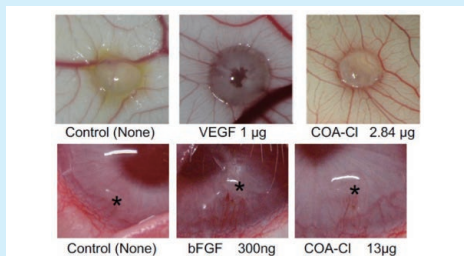
COA-Cl (コアクロル) は、血管新生促進作用を示す低分子化合物です。神経保護・栄養作用も示します。水溶性の低分子化合物であり、VEGFやNGFに代わり再生医療における血管や神経の構築に用いることができる可能性があります。また、xeno-free培地の添加剤として有用である可能性があります。

製品概要

- 外観：白色～わずかにうすい褐色、結晶性粉末～粉末又は塊
- 水溶状：試験適合

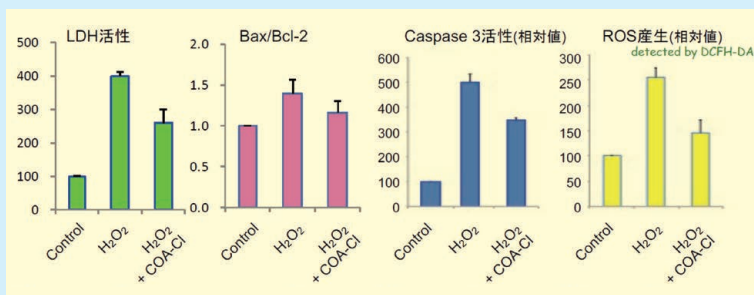
データ

■ ニワトリ漿尿膜 (CAM) とウサギ角膜を用いた血管新生促進作用確認例



(データご提供：香川大学医学部 塚本郁子先生)

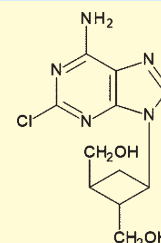
■ 神経モデル細胞 (PC12) の培養例：酸化ストレスからの保護作用



神経モデル細胞 (PC12) を播種し、翌日培地交換してCOA-Cl (100 µmol/L)、過酸化水素 (200 µmol/L) を添加、24時間後にストレスに応じて放出されるLDH、アポトーシス関連タンパク質、活性酸素を測定した。COA-Clを添加した場合は、LDH、アポトーシス関連タンパク質、活性酸素の放出量が減少した。

(データご提供：香川大学医学部 塚本郁子先生)

Wako



C₁₁H₁₄ClN₅O₂ = 283.71
CAS RN® 1253579-96-2

コード No.	品名	規格	容量	希望納入価格(円)
038-21543	COA-Cl	細胞生物学用	5mg	15,000
036-21544	[2-Cl-C.OXT-A]		25mg	60,000

☐₂…2～10℃保存 ☐₂₀…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、2021年7月時点での情報です。最新情報は、当社HPをご参照下さい。

家族性パーキンソン病患者iPS細胞由来神経系細胞におけるエンドソーム機能障害

東京慈恵会医科大学 再生医学研究部^{a)} 脳神経内科^{b)} 坊野 恵子^{a),b)} 岡野 ジェイムス 洋尚^{a)}

はじめに

近年、不治の病とされた様々な神経疾患の原因遺伝子・感受性遺伝子が同定され、その根幹病態にせまる発見が相次ぎ、病態解明に向け新たな知見が蓄積してきている。疾患関連遺伝子から推測される病態経路を疾患モデル細胞やモデル動物を用いて検証することにより、新規治療法の研究・開発が飛躍的に進んできた。2006年に誕生したiPS細胞は、再生医療に重要な役割を果たすと期待されており、臨床応用に向けた研究が進んでいる。また、難治性疾患患者の体細胞からiPS細胞を作製し患部の細胞に分化させ病態を解明する研究も世界中で盛んに行われている。多分化能を維持しつつ無限に増殖するiPS細胞は、病態研究や新規薬剤探索など基礎・臨床橋渡し研究のリソースとしても極めて有用である。

iPS細胞を用いたパーキンソン病の研究

パーキンソン病は、振戦、筋固縮、無動、姿勢反射障害の四大運動症状を特徴とする難病である¹⁾。神経変性疾患ではアルツハイマー型認知症に次ぎ多く、高齢化に伴い患者数は増加している。パーキンソン病はニューロンにおけるレヴィ小体 (α -シヌクレインが異常蓄積した凝集体) の出現を病理学的特徴とする²⁾。

大部分のパーキンソン病は孤発性であり、遺伝的要因と環境因子の複雑な組み合わせにより発症すると考えられているが、約10%は単一遺伝子異常により発症する家族性であることがわかってきている。これまでに家族性パーキンソン病の原因遺伝子は22種類が報告されているが、これらの遺伝子の強制発現あるいはノックダウン培養株化細胞、モデル動物の解析から、ミトコンドリア障害、酸化ストレスによる障

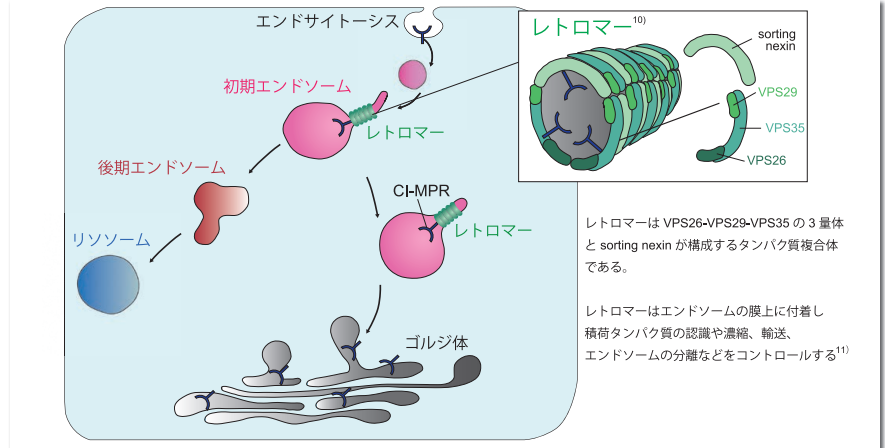


図 1.

害、ユビキチン・プロテアソーム系やオートファジー系などタンパク質分解系の異常が病態に深く関与することが示されている³⁾。家族性および孤発性パーキンソン病に共通する病態メカニズムが存在すると推測されているため、家族性パーキンソン病の病態解析により、孤発性パーキンソン病の新規治療法開発に資する重要な情報が得られる可能性がある。

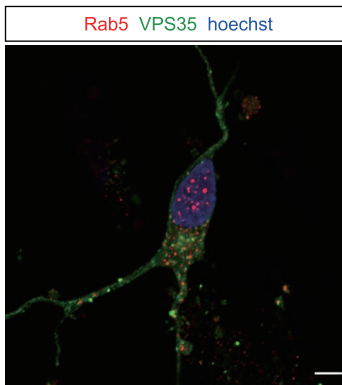
しかし、株化培養細胞モデルや動物モデルは種差や細胞特異性の違いが問題となることがあり、必ずしも病態を正確に反映する訳ではない。また、過剰発現系による疾患モデルでの研究結果を臨床試験の根拠として使用する場合、ヒトの生理的遺伝子発現量を反映していないため、試験の成功率を下げる潜在リスクとなることも指摘されてきた。そのため、これまでにパーキンソン病の病態進行の制御を目指した様々な治療戦略が検討されたにもかかわらず、根本的治療法は上市されてこなかった⁴⁾。

現在、iPS細胞技術の進歩により実際の患者の脳内で起きていると考えられる現象を*in vitro*で再現することが可能となった⁵⁾。特に非侵襲的に罹患組織から細胞を採取することが困難な神経変性疾患などの研究において、これまで不可能だったヒトニューロンの生細胞解析を行うことができる。さら

に疾患特異的iPS細胞には、患者の遺伝的背景を保持しつつ目的の細胞に誘導できること、生理的遺伝子発現量における解析が可能であること、ヒト細胞特異的な薬効評価が出来ることなどのアドバンテージがあり、病態解析や創薬研究のプラットフォームとして利用価値が高い。

VPS35 とパーキンソン病

PARK17は17番目に発見された家族性パーキンソン病であり、2011年にスイスとオーストリアからPARK17の家系が最初に報告された^{6,7)}。PARK17症例は日本でも報告されており、臨床症状は孤発性パーキンソン病と類似している⁸⁾。常染色体優性遺伝形式で遺伝するPARK17の原因遺伝子はVPS35であり、レトロマーのサブユニットタンパク質をコードしている⁹⁾。レトロマーは、VPS26-VPS29-VPS35からなる三量体と、sorting nexin二量体が構成するタンパク質複合体である¹⁰⁾ (図1参照)。レトロマーはエンドソームの膜上に付着し、積荷タンパク質の認識、輸送、エンドソームの切断制御など、エンドソーム輸送機構の重要な役割を担っていることが近年明らかになった¹¹⁾。パーキンソン病をはじめ病因タンパク質の細胞内蓄積が亢進する疾患では、異常タンパク質の細胞内



パーキンソン病 iNeuron, bar = 5μm

図2.

輸送障害が病態に関わっていることが予測されていた¹²⁾。しかしながら、VPS35の変異がパーキンソン病の病態にどのようなメカニズムで関与しているのかは不明である。我々はVPS35 (D620N) 変異のPARK17患者さんのご協力のもと、末梢血単核球からiPS細胞を樹立し、神経細胞に分化させ解析を行った。

パーキンソン病は運動障害としてパーキンソニズムを呈し、その責任病巣である中脳黒質のドパミンニューロンの脱落が原因で発症する。そこで、疾患特異的iPS細胞からドパミンニューロンを分化誘導したところ、コントロールと比較して疾患群ではアポトーシスが誘導されやすく、特異的にドパミンニューロンの細胞数が減少することがわかった。

エンドソームは細胞内へと取り込まれた物質の選別、分解、再利用などを制御するオルガネラであり、細胞内の様々なタンパク質などを輸送する¹³⁾。受容体などの積荷タンパク質はエンドサイトーシスにより細胞表面から取り込まれ、膜で区切られた様々な大きさの球形の小胞（エンドソーム）によって輸送される。積荷タンパク質はまず初期エンドソームに入り、一部は再利用のためゴルジ体に逆行輸送され、一部は後期エンドソームを経てリソソームへと輸送され分解される（図1）。そこで、iPS細胞から分化誘導した

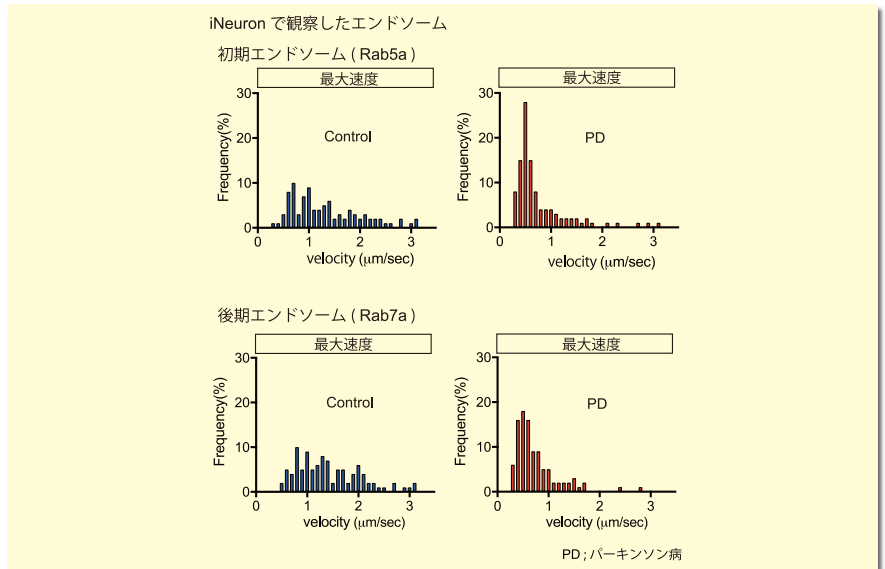


図3.

ニューロン (iNeuron) を固定し、レトロマーを構成するVPS35とエンドソームを免疫染色し観察したところ、Rab5 (初期エンドソームのマーカー) およびRab7 (後期エンドソームのマーカー) の多くはVPS35と隣りあい、もしくは重なりあって局在しており、コントロール群とパーキンソン病群の間でその分布に差は認められなかった(図2)。

次に、エンドソーム輸送機構におけるVPS35 (D620N) 変異の影響を生細胞で調べるため、蛍光タンパク質と融合させたRab5aもしくはRab7aをiNeuronで発現させライブイメージングで観察した。Rab5aもしくはRab7a陽性小胞の細胞内動態を追跡した結果、疾患群では初期および後期エンドソームの移動速度がともに低下していた(図3)。さらに小胞の分離および融合の頻度も低下していることがわかった(図4)。この結果から、VPS35 (D620N) 変異が初期および後期エンドソームの輸送、分離、融合を阻害していることが明らかになった。

レトロマーの代表的な積荷タンパク質として知られるCI-MPR (cation-independent mannose 6-phosphate receptor) は、パーキンソン病の病因

タンパク質である α -シヌクレインの代謝酵素であるカテプシンDをリソソームに輸送する受容体である。そこで、iPS細胞から分化誘導したグリア細胞におけるCI-MPRの細胞内局在を調べたところ、疾患群ではゴルジ体近

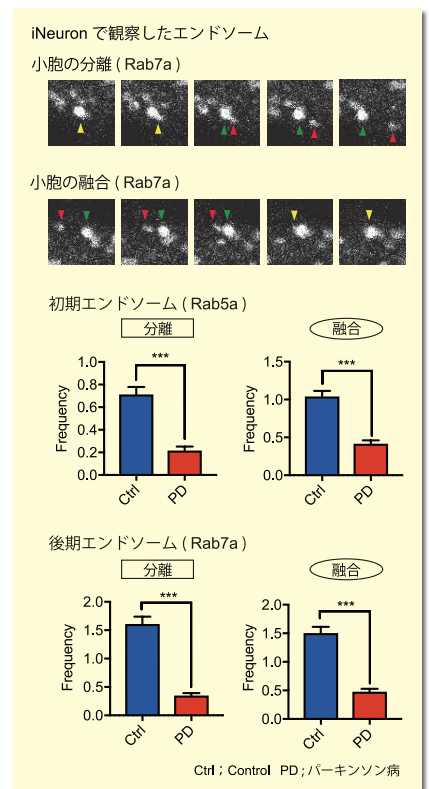


図4.

傍に貯留している傾向があり、患者細胞ではCI-MPRの輸送障害が生じている可能性が示唆された。

パーキンソン病の病理学的特徴は神経細胞内の α -シヌクレインの異常蓄積である。そこで、iPS細胞由来ドパミンニューロンを免疫染色し、細胞質における α -シヌクレイン輝度値を測定したところ、疾患群において優位に高かった。この結果から、VPS35 (D620N) 変異陽性患者のドパミンニューロンでは α -シヌクレインの細胞内蓄積が亢進している可能性が示された。

終わりに

iPS細胞技術は、従来の研究では困難だったヒト神経系細胞を用いた*in vitro*疾患モデルの解析を可能にし、病態解明に向け新たな研究手法の開発に道を開いている。今後、疾患特異的

iPS細胞を利用することにより、病態発症メカニズムに即した治療薬開発が加速すると期待されている。しかし、データの再現性を担保するためには分化した細胞を長期間に渡って培養し安定した状態で維持する必要があり、培養期間は時として2ヶ月間に及ぶこともある。特にライブイメージングを行うにあたっては分化・成熟したiNeuronを長期間維持できる培養条件を確立することが必須であるが、近年開発された神経細胞用培地*により容易にニューロンを培養できるようになったことは研究者にとって朗報である。

*本研究ではiNeuronの維持培養に神経細胞用培地(富士フィルム和光純薬コードNo. 148-09671)を使用した。研究の詳細については以下の論文を参照。

Bono, K. *et al.* : *Mol. Brain*, **13**, 137 (2020).


【参考文献】

- 1) Jankovic, J. : *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*, **79**, 368 (2008).
- 2) Spillantini, M. G. *et al.* : *Nature*, **388**, 839 (1997).
- 3) Deng, H. *et al.* : *Ageing Res. Rev.*, **42**, 72 (2018).
- 4) Athauda, D. and Foltynie, T. : *Nat. Rev. Neurol.*, **11** (1), 25 (2015).
- 5) Okano, H. and Yamanaka, S. : *Mol. Brain*, **7**, 22 (2014).
- 6) Vilarinho-Güell, C. *et al.* : *Am. J. Hum. Genet.*, **89**, 162 (2011).
- 7) Zimprich, A. *et al.* : *Am. J. Hum. Genet.*, **89**, 168 (2011).
- 8) Ando, M. *et al.* : *Mov. Disord.*, **27**, 1413 (2012).
- 9) Seaman, M. N. *et al.* : *J. Cell Biol.*, **142** (3), 665 (1998).
- 10) Hierro, A. *et al.* : *Nature*, **449**, 1063 (2007).
- 11) Burd, C. and Cullen, P. J. : *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, **6**, a016774 (2014).
- 12) Abeliovich, A. and Gitler, A. D. : *Nature.*, **539**, 207 (2016).
- 13) Galvez, T. *et al.* : *Cell*, **151**, 234 (2012).



神経細胞用試薬

Wako






神経細胞用培地

コード No.	品名	規格	容量	希望納入価格 (円)
148-09671	Neuron Culture Medium 	細胞培養用	100mL	50,000


神経細胞用分散液

コード No.	品名	規格	容量	希望納入価格 (円)
291-78001	Neuron Dissociation Solutions 	細胞培養用	4セット	31,100
297-78101	Neuron Dissociation Solutions S 	細胞培養用	10セット	50,000





凍結神経細胞シリーズ

コード No.	品名	規格	容量	希望納入価格 (円)
030-24881	Cerebral Cortex, from Mouse (embryonic day 15) 	細胞培養用	1本	43,800
082-10291	Hippocampus, from Mouse (embryonic day 16) 	細胞培養用	1本	56,300
033-24871	Cerebral Cortex, from Rat (embryonic day 17) 	細胞培養用	1本	50,000
036-24861	Cerebral Striatum, from Rat (embryonic day 17) 	細胞培養用	1本	50,000
085-10301	Hippocampus, from Rat (embryonic day 19) 	細胞培養用	1本	62,500



脳組織凍結保存溶液

コード No.	品名	規格	容量	希望納入価格 (円)
029-19161	Brain Tissue Freezing Medium 	細胞培養用	1mL×10	24,000

NS基礎培地/NSサプリメント

コード No.	品名	規格	容量	希望納入価格 (円)
148-09615	NS Basal Medium 	細胞培養用	500mL	8,300
146-09351	NS Supplement (×50) 	細胞培養用	10mL	23,200
141-09041	N2 Supplement with Transferrin (Apo) (×100) 	細胞培養用	5mL	20,900
141-08941	N2 Supplement with Transferrin (Holo) (×100) 	細胞培養用	5mL	18,700

神経関連抗体

コード No.	品名	規格	容量	希望納入価格 (円)
015-25191	Anti Phosphorylated α -Synuclein, Monoclonal Antibody (pSyn#64) 	免疫化学用	50 μ L	35,000
010-26481	Anti Phosphorylated α -Synuclein, Monoclonal Antibody (pSyn#64), Biotin-conjugated 	免疫化学用	100 μ L	50,000

詳細は当社 HP をご覧下さい。

神経細胞用試薬 和光

検索

PTS法の開発

タンパク質はその発現量や翻訳後修飾、相互作用の相手や局在を変えることで多様な生命現象を生み出している。生命現象において中心的役割を担う重要なタンパク質について、その発現プロファイルを得るプロテオミクスは近年の生命科学研究では欠かすことができない技術および研究分野である。プロテオミクスでタンパク質の発現プロファイルを得るには、試料からタンパク質を抽出後に、それらを消化酵素で断片化する必要がある。その後、液体クロマトグラフィータンデム質量分析計 (liquid chromatography-tandem mass spectrometry, LC-MS/MS) で分析することでペプチドの構造情報を取得し定性および定量を行う。近年はLCにおける分析カラムの微小化や充填剤の改良、MSの高感度化、高解像度化およびスキンスピードの高速化などLC-MS/MSにおける技術的進展が著しい。また、安定同位体標識試薬を用いた複数試料の同時分析や data independent acquisition など、これまでLC-MS/MSが不得意としてきた複雑性が高い試料中の低発現タンパク質の定性・定量ができるようになってきた。一方で、タンパク質はDNAやRNAのように増幅させることができないため、試料から得られたタンパク質やペプチドが前処理工程で損失してしまうと、例え最新の分析機器を用いても検出することはできない。また同様に試料から抽出できなければ、そして消化酵素で断片化できなければ、それらは試料中に存在していたとしてもLC-MS/MSで検出されないため発現していないものとして取り扱われてしまう。つまり、プロテオミクスにとって、試料からのタンパク質抽出工程および消化工程は分析機器と同じくらい重要であることを示している。

Swiss-Protデータベースには20,395

種類のヒトタンパク質が登録されている (2021年4月現在)。それらヒトタンパク質はそれぞれ、アミノ酸配列や翻訳後修飾に特徴を持つ。真のプロテオミクスを行うには、様々な生化学的な特徴を持つタンパク質を全て一様に可溶化する必要がある。特に膜貫通ドメインをもつタンパク質は疎水性が高く可溶化が難しいタンパク質である。これら膜タンパク質を含めすべてのタンパク質を抽出するには、可溶性の高い界面活性剤などを用いる必要がある。一方で強力な可溶化剤の多くは、その後の前処理で用いる消化酵素の活性を阻害してしまう。さらに、可溶化剤によってはLCにおけるペプチドの分離やMSにおけるイオンの検出に悪影響を与えてしまう。つまり、プロテオミクスの前処理では、タンパク質を偏りなく可溶化しつつも、消化酵素の活性を阻害せず、なおかつ除去が容易な可溶化剤を用いる必要がある。これまで膜タンパク質のような難溶性のタンパク質に対して可溶化と消化を改善するプロトコルは数多く報告されている。可溶化剤として、有機溶媒、界面活性剤、カオトロピック試薬を用いた方法や、消化法として酵素を用いず化学反応で切断する方法、非選択的プロテアーゼを用いる方法などが報告されてきた。ドデシル硫酸ナトリウム (Sodium dodecyl sulfate, SDS) などのイオン性界面活性剤は、疎水性タンパク質を可溶化する強力なツールであるが消化酵素を不活性化させるため、限外ろ過膜やメタノール・クロロフォルム沈殿を用いてバッファー交換する方法が報告されている。様々な方法が報告されているが一長一短であった。

我々は可溶性が高く、消化酵素の活性を阻害しない可溶化剤を探索するために、まずはスクリーニングを行った。可溶性は大腸菌の膜画分を用い、可溶化されたタンパク質の量から評価した。各溶液中の消化酵素活性は、基質として消化分解後に呈色する

化合物を用いて評価した。可溶化剤として、計27種類の有機溶媒、イオン性界面活性剤、非イオン性界面活性剤およびカオトロピック試薬を評価に用いた。スクリーニングの結果、胆汁酸の一つであるデオキシコール酸ナトリウム (Sodium deoxycholate, SDC) がスクリーニングで選抜された。SDCはSDSに次いで可溶性が高かった。また、1% (w/v) SDC存在下でも消化酵素の活性は阻害されず、逆に活性を促進した。SDCはプロテオミクスにおけるタンパク質の抽出と消化工程にとって非常に理想的な可溶化剤だったものの、SDCは陰イオン性の界面活性剤であり、高濃度で用いるとLC-MS/MSに悪影響を与えてしまうため、消化後に試料溶液から除去する必要がある。そこで我々は酸性条件下でデオキシコール酸が水に不溶になることを利用して、液液分配で除去する方法を考案した。SDCを含む消化後の試料に酢酸エチルを添加し、トリフルオロ酢酸で酸性にする。その後、激しく攪拌することで、水に不溶化したデオキシコール酸が酢酸エチルに分配する (図1)。ペプチドは水に溶けるため、デオキシコール酸と分離できる。このような可溶化剤を相間移動溶解剤 (Phase transfer surfactant, PTS) とし、この前処理方法をPTS法と名付けた¹⁾。PTSになる可溶化剤はSDC以外にもあり、SDCとラウロイルサルコシ酸ナトリウム (Sodium lauroylsarcosinate, SLS) を混合することで、さらにタンパク質の同定数が増加することを我々は見出している²⁾。PTS法を用いると、疎水性の高い膜タンパク質でも可溶性タンパク質と同等に定量的に抽出および消化できることが示された。PTS法はこれまで、膜タンパク質であるトランスポーターの絶対定量などにも用いられるなど疎水性タンパク質の前処理において多くの実績が報告されている。また、PTSは細胞分画にも用いられている³⁾。得られた画分をバッファー交

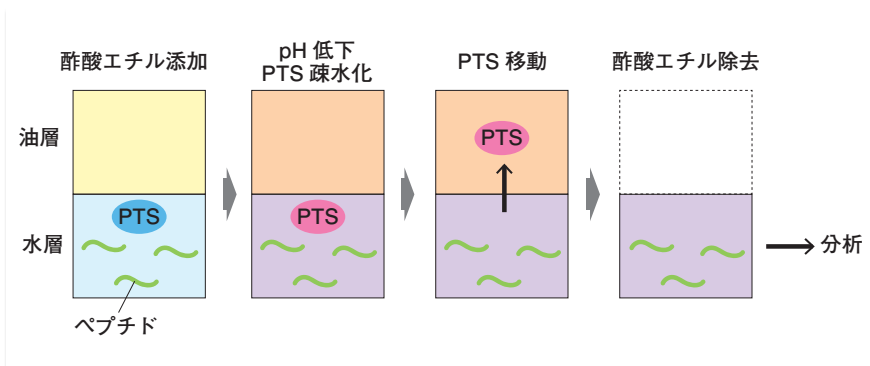


図 1.

換操作する必要がないため回収率が高く、微量細胞から得られた画分を用いて細胞内局在解析が可能となった。

PTS法のEVへの展開

がん細胞、内皮細胞やその他の様々な細胞間のコミュニケーションはかつて、サイトカインやケモカインなどの可溶性因子や細胞間の直接的な接触が仲介していたと考えられてきた。一方で近年、それら細胞間コミュニケーションには細胞外小胞 (Extracellular vesicles, EV) によっても媒介されていることが明らかになってきた⁴⁾。EVは、そのサイズや形成過程によって複数種類に分類されるが、いずれも細胞内から放出される膜構造体であり、細胞が持つDNA、RNA、タンパク質や脂質などの様々な生体分子が含まれている。

分取されたEVを用いて、EVが仲介する生命現象が検証されてきた。各種免疫細胞やがん細胞が放出するEVにより、免疫調節やエピジェネティック調節など周辺細胞の表現型を変化させることが報告されている。また、EV中に含まれる特定のRNA量を調べることで疾患を診断できることも報告されている。EVが関与する生命現象は幅広く、それらを解析するためにEVに内包される生体成分を明らかにすることは非常に重要である。特にEV中のタンパク質を観察する意義は高い。

細胞中のタンパク質の発現量はmRNAの発現量からある程度推測できるものの、EV中には遺伝子翻訳機構が備わっていないためタンパク質自体を観察する必要がある。

EVの機能を明らかにするために、EVを分取および濃縮する方法がいくつか報告されてきた⁴⁾。伝統的な方法として超遠心分離を用いる方法がある。細胞や死細胞などを除いた培養上清を100,000×gで処理し、沈殿物がEV画分として利用されている⁵⁾。また、スクロス密度勾配を組合わせた超遠心で分取する方法も知られている。EVのサイズを利用して、ゲルろ過クロマトグラフィーを用いて分取することも可能である。また、EVはCD9、CD63、CD81やTSG101などを表面に提示していることが知られており、これらを標的とした抗体でプルダウンすることで分取する方法も知られている。抗体を用いることで、選択性および純度高くEVを精製することが可能となった。一方で、抗体と抗原の親和性が高いため、比較的強力な可溶化剤を用いる必要があり、溶出時にEVを壊してしまう可能性がある。また、同じ細胞から分泌されるEVでも構成される異なる膜タンパク質を提示していることが知られており、単一の抗原を認識する抗体で濃縮してしまうと分取できないEVも出てくる。一方で、EVの二重膜を構成するリン脂質としてホスファチジルセリンが外側に

露出しており、これを利用してホスファチジルセリンと高い親和性を示すTim4タンパク質でEVをプルダウンする方法が報告されている⁶⁾。この方法は、EVを簡便かつ高純度に濃縮できる点や、EVの不均一性に左右されにくい点、ホスファチジルセリンとTim4との結合をキレート剤で解離することから、他のEV濃縮方法に比べて利点が多い。

我々は、EVに内包されるタンパク質を網羅的に解析するために、PTS法を適用した。EVはHeLa細胞の培養上清を用い、EVの濃縮にはMagCapture™エクソソームアイソレーションキットPS (富士フイルム和光純薬株式会社)を用いた。まずはキット添付のElution bufferもしくはPTS溶液を用いてEVの回収もしくはEVタンパク質を可溶化した。Elution bufferで回収したEVはPTS溶液で可溶化した。タンパク質の量をBCA assayで定量したところ、Elution bufferで回収されたタンパク質量に比べてPTS溶液で直接可溶化することでタンパク質の回収量は2.85倍に増加した。回収したEVタンパク質とビーズに残存したCD63の量から、Elution bufferおよびPTS溶液ではそれぞれ37.7および9.0%のEVが回収できずにビーズに残存していたことが示唆された。PTS溶液を用いることで、プルダウンしたEVをキット添付のElution bufferよりも多く回収できることが示された。また、PTS溶液はTim4とストレプトアビジンの相互作用を解離しなかったことから、Tim4が試料溶液に混入してLC-MS/MSにおけるEVタンパク質の検出を阻害することはない。次に得られたタンパク質を処理しLC-MS/MSで分析を行ったところ、317種類の膜貫通タンパク質を含む計1,766種類のタンパク質が定量された。PTS溶液で回収することで、Elution bufferで回収するよりも平均で3.24倍にタンパク質の定量値は

増加した。Tim4非添加群と比較して、有意に2倍以上濃縮されたタンパク質をGO解析 (Cellular component) したところ、Extracellular exosome がもっとも有意に濃縮されていた。さらに、ビオチン化Tim4を捕捉するAvidinビーズとして、製品キット添付のStreptavidinビーズではなくMagCapture™ Exosome Isolation Kit PS Ver.2 (富士フイルム和光純薬株式会社)のBiotin Capture Magnet Beadsを用いた。両ビーズでEVを回収したところ、EVタンパク質はStreptavidinとVer.2ビーズでそれぞれ1,280および1,449種類同定された。両群で1,236種類のタンパク質が共通に定量され、44種類のタンパク質がStreptavidinでのみ定量されたのに対して、213種類のタンパク質がVer.2ビーズでのみ定量された。タンパク質の定量値をボルケーノプロットで比較したところ全体的にVer.2ビーズ群で高かった (図2 A)。このことから、期待していた通りVer.2ビーズではStreptavidinビーズに比べて捕捉量は増加していた。また、同様にコントロールであるTim4非添加群でも比較したところ、Ver.2ビーズ群でタンパク質の定量値が低下した (図2 B)。CD9のTim4非添加群に対する濃縮率を見てみると、Streptavidinでは89.6倍だったのに対してVer.2ビーズでは149.1倍に濃縮されており、濃縮率が1.66倍に増加していた (図2 C)。このことから、Ver.2ビーズでは非特異的な吸着が少ないものと考えられた。

おわりに

以上の結果から、MagCapture™エクソソームアイソレーションキットを用いてEVのプロテオミクスを行う場合、添付のElution bufferを用いるのではなく、プルダウン後のビーズからPTS溶液で直接タンパク質を可溶化することで回収量を増やすことができ

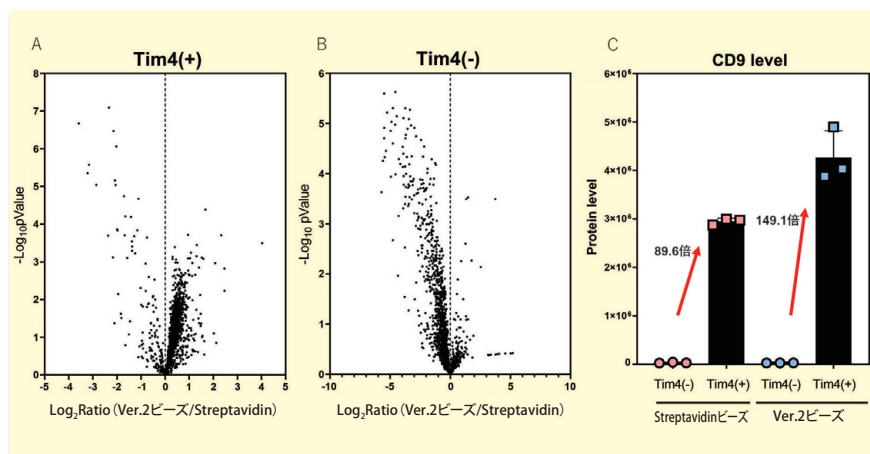


図2.

液体クロマトグラフィータンデム質量分析計

プロテオミクスにおいてタンパク質およびペプチドの定性・定量に用いられる分析機器。ペプチドは自身が持つ特性に依存して液体クロマトグラフィーで分離される。分離されたペプチドは順次イオン化され、質量分析計に導入される。質量分析計内でペプチドの構造情報が取得される。

Swiss-Prot

様々な生物種のタンパク質情報を集積したデータベース。アミノ酸配列だけでなく翻訳後修飾や機能、他のデータベースにおける登録ID情報などが掲載されている。

相間移動溶解剤 (Phase transfer surfactant, PTS)

pH や塩類の添加で、水への溶解性が変化する化合物。デオキシコール酸およびラウロイルサルコシン酸は、酸性条件下でカルボン酸が分子型となり水への溶解性が劇的に低下する。プロテオミクスの前処理において、不要になったPTSは液液分配で除去できる。

た。また、添付のStreptavidinビーズではなくVer.2ビーズを用いることで、さらに高回収率かつ高選択的にEVプロテオーム情報を取得できることが示された。

【参考文献】

- 1) Masuda, T. et al. : *J. Proteome Res.*, **7** (2), 731 (2008).
- 2) Masuda, T. et al. : *Mol. Cell. Proteomics*, **8** (12), 2770 (2009).
- 3) Masuda, T. et al. : *J. Proteome Res.*, **19** (1), 75 (2020).
- 4) Gandham, S. et al. : *Trends. Biotechnol.*, **38** (10), 1066 (2020).
- 5) Linares, R. et al. : *J. Extracell. Vesicles.*, **4**, 29509 (2015).
- 6) Nakai, W. et al. : *Sci. Rep.*, **6**, 33935 (2016).

第1回 BDNF 概論

新潟大学 脳研究所腫瘍病態学 武井 延之

「よくわかる BDNF —基礎から臨床まで—」シリーズ開始にあたって

金沢工業大学 バイオ・化学部 応用バイオ学科 小島 正己

神経栄養因子研究は、Rita Levi-Montalcini博士、Stanley Cohen博士たちにより1950年代に拓かれた。両氏によるNGF (nerve growth factor) の発見につき、Yves-Alain BardeはBDNF (brain-derived neurotrophic factor) を発見した。BDNFとNGFの間には高い相同性があり生物活性も同様であった。BDNFは中枢で発現が高いことから、記憶・学習との関係、脳疾患との関係の研究に発展している。BDNFの寄与を知るためにはBDNF測定技術は重要でありBDNFシグナルの解析技術も大切である。

本シリーズでは、最初にBDNFと神経栄養因子の研究を概要し、脳と発達、精神疾患との関係について、本邦の気鋭の研究者に、その現状と展望を存分に開陳いただくことになりました。どうぞご期待ください。

はじめに

BDNF研究は神経細胞の生存維持、分化誘導といった「古典的」作用に始まり、神経伝達、シナプス可塑性の制御という新たな作用へと展開されてきた。それに伴い、疾患との関係でも細胞死を伴う神経変性疾患への関与と治療への応用の試みから、神経機能異常(あるいは回路形成異常)と考えられる精神疾患や発達障害への関与や治療へと関心が変化してきている。図1に時系列に沿ったBDNF研究の流れを示し、本項ではBDNFの概略を解説する。

BDNFと受容体分子

BDNF(Brain-Derived Neurotrophic Factor: 脳由来神経栄養因子)は脳における最も主要な神経栄養因子である。神経栄養因子(neurotrophic factor)とは神経細胞の生存維持や分化誘導(突起伸展や神経伝達物質合成酵素発現誘導など)、成熟促進、機能調節などの働きを持つ蛋白分子の総称であり、Levi-MontalciniによるNGF(Nerve Growth Factor: 神経成長因子)の発見同定を端緒として研究が始まった。NGFは特定の神経細胞にしか効果を示さなかったため、他にも同様の働きをする分子が存在すると考えられた。BDNFはBardeとThoenenによって1982年にブタ脳から精製された¹⁾。その後1983年にNGFの、89年にBDNFのクローニング²⁾がなされ2つの分子は

50%以上のホモロジーを示すことがわかった。この相同領域を利用して第3の因子NT-3がクローニングされ、その後第4の因子としてNT-4が同定された。NTはneurotrophinの略で、neurotrophin familyと呼ばれる。BDNFはpreproBDNFからプロセッシングされ、matureBDNF(いわゆるBDNF)となる。BDNFは112アミノ酸残基からなり、分子量は13.5kDa、等電点は9.99でNGFと同様に分子内に3箇所のS-S結合がある。NGFの結晶構造解析から3つの平板なβシートを持ち、ここを介してホモ二量体を形成して生理作用を持つと考えられている。ファミリー間で保存されていないドメインが受容体との特異的結合を規定している

と考えられる³⁾。

受容体はNGF結合実験の結果から低親和性と高親和性の2種類の受容体が示唆され、低親和性受容体はp75(あるいはp75NTR)として同定された。この分子は全てのneurotrophinと低親和性(Kd=10⁻⁹)で結合する。TNF受容体ファミリーに属し、アポトーシスに関与する。neurotrophinのpro体が作用する受容体として再び注目されている。1991年になって高親和性(Kd=10⁻¹¹)の受容体が同定された。それがTrk(トラックと読む: Tropomyosin Receptor Kinase)で、もともとは癌で見出されたプロトオンコジーンの遺伝子産物として同定されていたが、リガンドはわかっていなかった。Trk

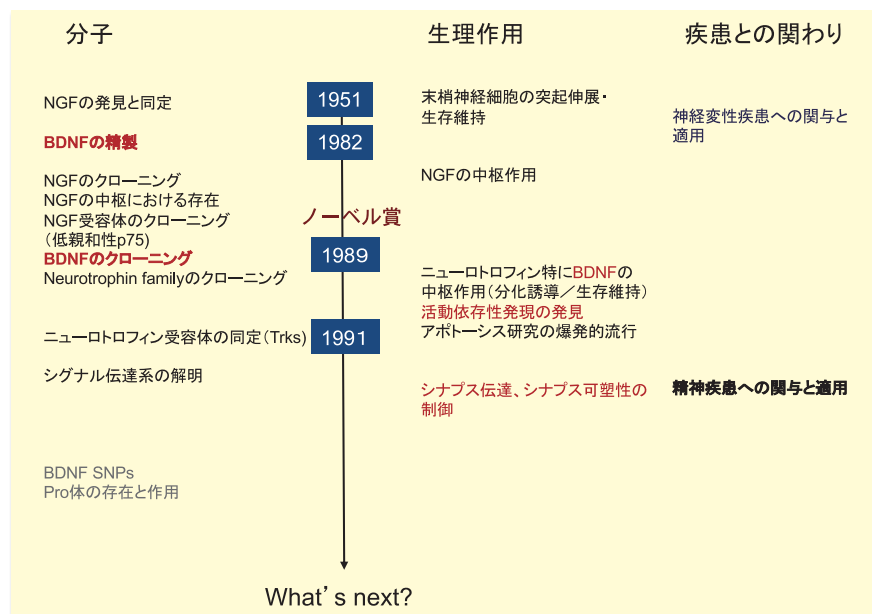


図1. BDNF (ニューロトロフィン) 研究の歴史とトレンド

本シリーズの企画・構成に際し、金沢工業大学 バイオ・化学部 応用バイオ学科 小島 正己先生にご協力頂きました。

はA、B、Cの三種あり、TrkA（遺伝子名 *NTRK1*）はNGFの、TrkB (*NTRK2*) はBDNFとNT-4の、TrkC (*NTRK3*) はNT-3の特異的受容体である。

TrkはA、B、Cともアミノ酸約800個からなり、糖鎖付加を受けて分子量140-145kDaの機能分子となる。受容体型チロシンキナーゼであり、細胞内にキナーゼドメインを持つ。二量体リガンドが結合するとTrk自体も二量体化し、細胞のチロシン残基を互いにリン酸化する。このリン酸化チロシンに種々の分子が結合し、細胞内にシグナルを伝達することによってBDNFをはじめとしたneurotrophinの生理活性が発揮される⁴⁾。細胞内の主要なシグナル系は受容体型チロシンキナーゼに共通で、1) アポトーシスや翻訳を制御するPI3K-Akt系、2) 主に転写調節を通じ分化誘導などを担うRas-MAPK系、3) 細胞内のカルシウムシグナルを駆動するPLC γ -Ca²⁺系がある⁵⁾。

BDNFの生理作用

BDNF研究も当初は末梢神経系における作用の研究が中心で、NGFは交感神経後根神経節の一部、BDNFは節状神経節の感覚神経と後根神経節の一部と互いに重複しない神経細胞に対して作用を示すことがわかった。末梢神経系に対するneurotrophinの作用は絶対的で、生存維持、突起進展に必須である。このため各ノックアウトマウスでは末梢神経不全のため致死となる。このような点から神経細胞の生存維持や突起伸展といった作用は神経栄養因子の「古典的作用」とも呼ばれる。

その後研究の中心は中枢神経系へと移り、NGFは脳基底野のアセチルコリン作働性神経細胞に作用し、BDNFは黒質ドーパミン作働性神経細胞や脊髄運動神経細胞に作用することが明らかとなった。これらはやはり古典的作用で、各神経伝達物質の合成酵素の発現誘導や伝達物質量の増加、生存維持作用などが報告された。NGFと

TrkAの発現は脳内では一部の細胞に限られていたが、BDNFと特にTrkBの発現は脳内の幅広い（ほぼ全ての）神経細胞で見られた。このこともあってBDNFの中枢神経細胞への作用がさらに広範に研究され、生存維持、分化誘導といった古典的作用の他に神経活動に依存した神経可塑性に関与することが明らかとなった。

神経可塑性とは、伝達物質放出や受容体機能の制御を通じた伝達効率の変化や、シナプスの再構成などにより特定の神経回路が強化されたり消去されたりする可逆的な変化のことである。形態的变化を必須とせず、転写、翻訳、分解の調節によってシナプスで働く分子の量的変化（特定の分子の数や分子の種類）、翻訳後修飾（リン酸化など）の変化、位置の変化（トランスロケーション）などによってもたらされる。BDNFは中枢神経細胞に対し、神経伝達物質の放出の誘起／増強や、受容体の機能増強を行うことが明らかとなり、長期的には神経回路の形成／安定化に作用していると考えられるようになってきた。その結果として学習記憶などに関与していると考えられる^{6,7)}。

BDNFの発現と放出

BDNFの発現は神経活動と密接に関係している。初代培養神経細胞をグルタミン酸で刺激するとBDNF mRNAの発現が大きく誘導され、GABA刺激によっては発現が低下した⁸⁾。BDNFは生理的条件下では神経細胞で発現していて、興奮性神経伝達によって上昇し、抑制性神経伝達によって低下する。BDNFの発現は記憶の細胞基盤と考えられている長期増強（LTP）でも誘導される。個体レベルでも感覚（視覚）入力に依存したBDNF mRNA発現レベルの変動が視覚野で観察されている。また学習訓練、習得によってラットやサルの脳でBDNFの発現が上昇することなどから、神経回路の活性化に

よる活動依存的な発現誘導が明らかになった⁷⁾。

発現調節だけでなく、BDNFの放出もまた神経活動依存的である。従来の古典的作用では、BDNFに限らず神経栄養因子は構成的に分泌されると考えられていた。常に一定量供給されることが生存維持などでは合理的であるからである。しかし神経伝達に関与するような速い反応を引き起こすには調節的放出が必要である。実際BDNFは脱分極刺激に応答して放出される。末梢神経系におけるNGFの作用形態から、神経栄養因子は軸索の投射先である標的細胞によって産生・分泌され、神経細胞はそこに向かって軸索を伸ばすという作用形態が考えられていた。しかしBDNFはシナプス前部の小胞に含まれ、伝達物質と同じように刺激にตอบสนองして放出されている。このような発現・放出の機構も神経可塑性への関与を支持しており、神経活動とBDNFが相互に作用していることを示している⁹⁾。

BDNFと疾患

神経栄養因子の生存維持作用から、神経変性疾患への治療が試みられてきた。培養細胞や動物実験では非常に有効ではあるが、治験まで行った例でも成功していない¹⁰⁾。まず分子量の問題で、蛋白であるため血液脳関門を通過できないことが大きい。低分子アゴニストなども開発されているが、作用が確定しているとは言い難い。一方、BDNFが神経機能に直接関与することから、本特集でも取り上げられるように、機能性の脳疾患と言われる精神疾患や発達障害での役割に注目が集まっている。直接治療に用いることは上記の理由で難しいかもしれないが、バイオマーカーとしての役割や、BDNFの作用をミミックする薬剤の開発なども期待されている。

BDNFは中枢性の摂食抑制作用もあり¹¹⁾、また何故か血小板に多く含まれ、調節的放出がなされている。このため

肥満や生活習慣病とも言える糖尿病や心臓血管系疾患などとの関連も報告され、非中枢性作用も明らかにされ研究はさらに広がっている¹²⁾。

【参考文献】

- 1) Barde, Y. A. et al.: *EMBO J.*, **1**, 549 (1982).
- 2) Leibrock, J. et al.: *Nature*, **14**, 341149 (1989).
- 3) Lewin, G. R. and Barde, Y. A.: *Annu. Rev. Neurosci.*, **19**, 289 (1996).
- 4) 武井延之: 脳科学辞典 (2020).
<https://bsd.neuroinf.jp/wiki/高親和性ニューロトロフィン受容体>, DOI: 10.14931/bsd.9306 (2021年6月21日閲覧)
- 5) Huang, E. J. and Reichardt, L. F.: *Annu. Rev. Biochem.*, **72**, 609 (2003).
- 6) Thoenen, H.: *Prog. Brain. Res.*, **128**, 183 (2000).
- 7) 武井延之、那波宏之: 生化学, **76**, 111 (2004).
- 8) Lindholm, D. et al.: *J. Neurobiol.*, **25**, 1362 (1994).
- 9) Nawa, H. and Takei, N.: *Trends Neurosci.*, **24** (12), 683 (2001).
- 10) Thoenen, H. and Sendtner, M.: *Nat. Neurosci.*, 1046 (2002).
- 11) Takei, N. et al.: *Front Psychol.*, **5**, 1093 (2014).
- 12) Marosi, K. and Mattson, M. P.: *Trends. Endocrinol. Metab.*, **25**, 89 (2014).

神経疾患研究に

Wako

Mature BDNF ELISA キットワコー、高感度品

BDNF (Brain-derived Neurotrophic Factor) は神経栄養因子の一つで、神経発生・神経保護作用・シナプス形成などに関与し、脳内で重要な役割を担うことが知られています。BDNF には前駆体である proBDNF が存在し、BDNF とは異なる作用を有することが報告されています。proBDNF はプロセッシングを受けることで mBDNF (mature BDNF) となります。

本品は、検体中の mBDNF 濃度を特異的に測定可能な ELISA キットです。発光検出系を用いることで既存品 (コード No. 296-83201 Mature BDNF ELISA キットワコー) の約 20 倍の感度を実現し、従来検出が難しかったマウス血中の微量な BDNF を測定可能です。

特長

- マウス血漿、血清中の微量な BDNF を測定可能
- mature BDNF を特異的に検出

性能

品名	Mature BDNF ELISA キットワコー、高感度品	Mature BDNF ELISA キットワコー
コード No.	298-83901	296-83201
測定対象	mature BDNF	mature BDNF
検体	マウス血清・血漿 ラット血清・血漿	ヒト血清・血漿
検量線範囲	0.205 ~ 50pg/mL	4.1 ~ 1,000pg/mL
ヒト proBDNF との反応性	< 0.5%	約 10%
必要検体量	13μL (4 倍希釈時)	ヒト血清:10μL (10 倍希釈時) ヒト血漿:5μL (20 倍希釈時)
測定時間	約 4 時間	約 4 時間
検出法	発光系	発色系

データ

■ 測定例 ー 自閉症モデルマウス血清、血漿での測定 ー

サンプル種	検体	検体No.	測定値 (pg/mL)
血清	BTBRマウス* (自閉症モデルマウス)	BTBR-1	12.4
		BTBR-2	18.1
		BTBR-3	16.1
	C57BL/6J (野生型マウス)	B6J-1	6.96
		B6J-2	9.80
		B6J-3	9.01
血漿 (ヘパリン)	BTBRマウス* (自閉症モデルマウス)	BTBR-4	11.1
		BTBR-5	9.73
	C57BL/6J (野生型マウス)	B6J-4	6.93
		B6J-5	11.6

* BTBR T+Itpr3tf/J マウス

本キットで自閉症モデルマウス及び野生型マウスの血漿、血清中の mBDNF を測定した。いずれの検体でも mBDNF を検出できた。

コード No.	品名	規格	容量	希望納入価格 (円)
298-83901	Mature BDNF ELISA Kit Wako, High Sensitive	免疫化学用	96回用	83,000

関連製品

■ ELISA キット

コード No.	品名	規格	容量	希望納入価格 (円)
296-83201	Mature BDNF ELISA Kit Wako	免疫化学用	96回用	69,000

☐₂…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、2021年7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1回 医薬品の元素不純物ガイドラインにおけるリスクアセスメント及び管理について

株式会社 住化分析センター TS 本部 大阪ラボラトリー 物性特性 G 西岡 利奈、花河 奏一郎

1. はじめに

医薬品中の元素不純物規制は、医薬品規制調和国際会議（ICH）にて元素不純物のガイドラインが作成され、日本においては平成27年9月30日付けで「医薬品の元素不純物ガイドラインについて」（薬食審査発0930第4号）として公表された。近年では第十七改正日本薬局方第二追補（令和元年6月28日 厚生労働省告示第49号）に、元素不純物ガイドラインの内容を踏まえた参考情報「製剤中の元素不純物の管理」が記載されている。さらに令和3年6月に告示された第十八改正にて、元素不純物管理の通則への追加、一般試験法の改正があった。次項にて改正点の概要を紹介する。

続いて本稿では、元素不純物の管理において重要な製品のリスクアセスメントとその手順について概略を解説する。また、リスクアセスメントのアプローチの一例を紹介する。

2. 第十八改正日本薬局方の改正点

第十八改正では通則34に元素不純物管理の項目が新規記載され、日本薬局方の製剤は、原則として一般試験法の元素不純物に係る規定に従って適切に管理を行うという内容が追加された。製剤、原薬及び添加材などにおいて、告示施行後36箇月の間（令和6年6月まで）にガイドラインを踏まえた管理へ対応することが求められる。

試験法については、一般試験法「2.66 元素不純物試験法」と参考情報「製剤中の元素不純物の管理」を統合し改正された。内容については、ICH Q3D「医薬品の元素不純物ガイドラインの改正について」（令和2年6月26日付け薬生薬審査発0626第1号）におけるカドミウムの許容一日暴露量の見直しに伴う数値等の修正が反映されている。

ガイドラインの公表後36箇月を経過したことを鑑み、既存製剤も適用範囲に含まれることが決定しており、今後ますます元素不純物の評価・管理が重要視されて

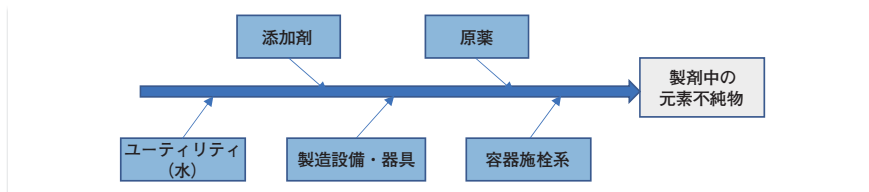


図1. 元素不純物の潜在的な混入源

いる。

なお、ICHの元素不純物ガイドラインは新医薬品の製造販売承認申請に際して検討される新製剤に適用されるが、局方取載以外の医療用医薬品製剤については令和2年12月28日付けで「医療用医薬品に係る元素不純物の取扱いについて」（薬生薬審査発1228第7号）により本ガイドライン通知が適用拡大され、同様の管理が求められている。

3. リスクアセスメント

元素不純物のリスクアセスメントのプロセスは次のステップで実施する。

【特定】 製剤の製造過程での元素不純物の混入源の特定

【評価】 製剤中の元素不純物につき実測値又は予測値と許容一日暴露量（PDE：permitted daily exposure）との比較により評価

【まとめ】 リスクアセスメントの結果を要約して文書化し、管理方法が十分であるか確認

さらに元素不純物を低減する追加の管理方法の必要性を検討
これらのステップを繰り返し行うことで、適切な管理方法の設定を行う。

3.1. 元素不純物の混入源の特定

製剤の製造過程において考えるべき元素不純物の潜在的な混入源には以下の

ものがある。

- ・原薬、添加剤など製剤構成成分の製造時において意図的に添加された元素（触媒など）による残留不純物
- ・原薬、水又は添加剤に意図的には添加されないが、それらの中に存在する可能性がある元素不純物
- ・製造設備・器具から原薬及び／又は製剤中に移行する可能性がある元素不純物
- ・容器施栓系から原薬及び製剤中に溶出する可能性がある元素不純物

図1は、製剤の製造過程の構成要素を示したものである。リスクアセスメントでは、それぞれの要素における潜在的な混入源からの元素不純物量が製剤の元素不純物の総量に影響することを考慮しなければならない。

リスクアセスメントに着手する一般的なアプローチ手法として、各構成成分の元素不純物に着目する「構成成分アプローチ」と最終製品の元素不純物に着目する「製剤アプローチ」がある。各アプローチで考慮する混入源などを図2にまとめた。これらの混入源についてそれぞれ公表文献や供給者からの情報又は試験結果など、根拠となるデータを入手し影響の大きいものを特定する。

余談ではあるが、元素不純物ガイドラインには、より理解を深めるために10のモジュール（0～9）で構成されるトレーニ

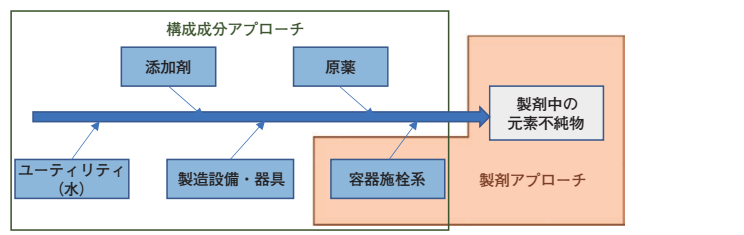


図2. リスクアセスメントのアプローチ

ングメソッドが用意されている。アプローチ方法についてはトレーニングメソッド モジュール5で詳細に紹介されているので、参考にしていただきたい。

3.2. 元素不純物の評価(PDE値と許容濃度との間の換算)

混入源の特定と対象元素が決定できれば、製剤中の個々の元素不純物に関して、実測値又は予測値と設定PDE値を比較し評価を実施する。PDE値を実測値又は予測値と比較するために許容濃度へ換算する手法として、ガイドラインではオプション1、2a、2b及び3の4つの手法が記載されている。構成成分アプローチではオプション1、2a及び2bから適した方法を選択し、製剤アプローチでは最終製品の評価になるため、オプション3を用いて換算する。(評価に関する詳細はガイドライン7項を参照)

3.3. 元素不純物の管理

ガイドラインでは管理閾値はPDE値の30%と定義されている。元素不純物量が管理閾値を下回る場合、追加の管理は必要とされていない。管理閾値を超える可能性があるがPDE値より低い場合には、元素不純物量の低減対策を実施する必要がある。対策の一例としては、上流管理、構成成分や容器施栓系の再選択、規格の設定などがある。

PDE値を超える場合にはさらなる対策を実施する必要がある。ただし、対策が技術的に実現不可能な場合に、トレーニングメソッド モジュール6で示すような、特定の状況下では妥当性を説明することで容認される可能性がある。

4. スクリーニングによる一次評価

リスクアセスメントの方法は多々あるが、製剤アプローチで実施する場合、まずは製剤中の元素不純物量に関するデータを収集し、アセスメントが必要な元素を決定する。元素不純物量に関する十分なデータがない場合などは、製剤中の元素不純物量を実際に測定する必要がある。ICH

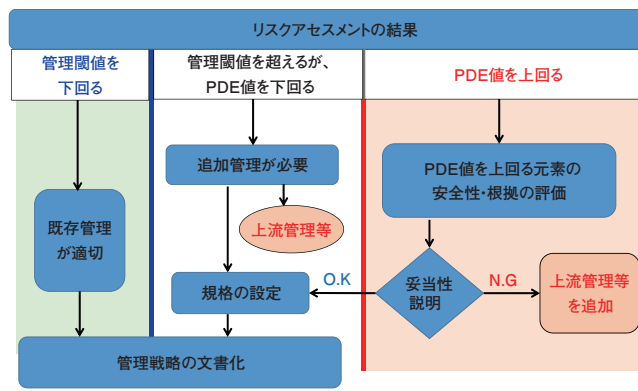


図3. 元素不純物の管理

Q3Dの対象24元素について設定した許容濃度の管理閾値との比較分析（スクリーニング分析）を実施することは対象元素を絞り込む有効な手段の一つである。

ここでは注射剤を例に、仮想のスクリーニング分析例を紹介する。

投与経路：注射

最大一日投与量：2mL

対象元素：クラス1、2A、2B及び3（24元素）

オプション：3

定量限界：PDE値から求めた許容濃度の10%又はそれ以下

使用装置：ICP質量分析計

表1にスクリーニング分析で実施した対象元素の一部について許容濃度、管理閾値、定量限界及び結果を示す。

許容濃度はオプション3にて注射剤の

PDE値を最大一日投与量（2mL）で除し換算した。この例では定量限界を、許容濃度の10%又はそれ以下としている。Crの様な許容濃度が他より特に高い元素は、測定時の定量限界を他の元素に合わせて、より低い濃度で評価することで、元素不純物の混入を確認することができる。また、例に示す通り対象元素ごとに許容濃度が異なるため、標準溶液の調液にはICH Q3D用に濃度設定された市販の混合標準溶液を使用することで希釈作業が削減され精度よく調液することが容易になるだろう。

この例ではスクリーニングの結果、Pb及びSbで管理閾値以上に検出されているため、混入起源の特定、上流管理、場合によっては本剤での規格の設定など追加の管理が必要になるだろう。注射剤では製剤中の元素不純物のみならず、製剤の有効期間中に包材成分の溶出の

表1. スクリーニング分析の許容濃度、管理閾値、定量限界及び結果

クラス	元素	注射剤のPDE値 (µg/day)	許容濃度 (µg/mL)	管理閾値 (µg/mL)	定量限界 (µg/mL)	スクリーニング結果 (µg/mL)
1	Cd	2	1	0.3	0.1	< 0.1
	Pb	5	2.5	0.75	0.25	1
	As	15	7.5	2.25	0.75	< 0.75
	Hg	3	1.5	0.45	0.15	< 0.15
2A	Co	5	2.5	0.75	0.25	< 0.25
	V	10	5	1.5	0.5	< 0.5
	Ni	20	10	3	1	< 1
3	Li	250	125	37.5	12.5	< 12.5
	Sb	90	45	13.5	4.5	20
	Cu	300	150	45	15	< 15
	Cr	1100	550	165	0.5※	2

※他の元素に合わせてより低い濃度で評価

注：スクリーニング結果が1または20の場合、PDE値を超えるが、PDE値を下回る領域に属する。注：スクリーニング結果が20の場合、PDE値を上回る領域に属する。

リスクが懸念される。容器施栓系からの混入リスクは安定性試験や苛酷条件での試験データ、又は部材メーカーからの情報収集などによって別途評価する必要がある。

5. まとめ

リスクアセスメントの内容、アプローチの一例として注射剤を例にスクリーニングによる一次評価方法を紹介した。元素不純物のリスクアセスメントは、投与経路や構成成分などで様々なケースがあり、それぞれの状況に合わせた対応が必要とな

る。ガイドラインのみならず詳細について提示しているトレーニングモジュール、海外の添加剤の文献データなど様々な情報を参考にすることを推奨する。2項で述べたように第十八改正日本薬局方の告示施行後36箇月までに、日局品製剤及び局外品製剤についてもガイドライン通知及び当該新薬局方の規定に基づく元素不純物の管理が求められるので留意されたい。

「微量元素分析 —さまざまな分野での活用事例とその重要性—」シリーズ開始にあたって

電子材料（半導体）や水質分析の他、食品や医薬品でも微量元素の管理が必要とされています。第十八改正日本薬局方（JP 18）では、製剤中の元素不純物の管理・試験法が記載されており、今後ますます微量元素分析の重要性が増してくると考えられます。

本シリーズでは、全4回の連載で半導体・環境・医薬品・食品の視点から、各分野における微量元素分析の例をご紹介します。

本連載が読者の皆様のご研究の一助になりましたら幸いです。

ICH Q3D対応

多元素混合標準液

水質試験で測定対象となる元素類の混合標準液をご用意しています。

製品概要

■多元素混合標準液 ICH Q3D 経口剤用

クラス1に分類される元素のうちHgを除く3元素とクラス2Aに分類される3元素の計6元素から成ります。（クラス1：Cd, Pb, As、クラス2A：Co, V, Ni）

組成：Cd：5, Pb：5, As：15, Co：50, V：100, Ni：200 (μg/mL)

マトリックス：5w/w% Nitric acid, Oxalic acid dihydrate, Water

■多元素混合標準液 ICH Q3D 注射剤用

クラス1に分類される元素のうちHgを除く3元素、クラス2Aに分類される3元素、クラス3に分類される7元素のうち3元素の計9元素から成ります。

組成：Cd：5, Pb：5, As：15, Co：5, V：10, Ni：20, Li：250, Sb：90, Cu：300 (μg/mL)

マトリックス：5w/w% Nitric acid, Oxalic acid dihydrate, L-(+)-Tartaric Acid, Water

■水銀標準液 ICH Q3D用 (Hg 30)

組成：Hg：30 (μg/mL) マトリックス：5w/w% Nitric acid, Water

※水銀については経口剤、注射剤の試験時に用時調製して下さい。

特長

- 「元素不純物に係る許容一日暴露量（PDE値）」を参考にした濃度設定
- ICP-MSによる主成分以外の不純物元素を保証
- JCSS実用標準液またはNIST SRMを用いて濃度確認を実施

コード No.	品名	規格	容量	希望納入価格(円)
138-18801	Multielement Standard Solution for ICH Q3D Oral Preparation Ⅲ-I	ICP分析用	100mL	18,000
135-18811	Multielement Standard Solution for ICH Q3D Injection Ⅲ-I	ICP分析用	100mL	24,000
133-18851	Mercury Standard Solution for ICH Q3D (Hg 30) Ⅲ-II	ICP分析用	100mL	7,200

その他の元素標準液（金属標準液）については、当社HPをご覧下さい。

試薬事業トップ→分析→元素標準液（金属標準液）

https://labchem-wako.fujifilm.com/jp/category/analysis/element_standard/index.html

元素標準液（金属標準液）和光

検索

Ⅲ-I…2～10℃保存 Ⅲ-II…20℃保存 Ⅲ-III…80℃保存 Ⅲ-IV…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、2021年7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5回 ヒト血液を用いた脳内ミクログリア活動性予測による心のリバース・トランスレーショナル研究

九州大学大学院 医学研究院 精神病態医学 加藤 隆弘

はじめに

近年、神経変性疾患に限らず様々な精神神経疾患において脳内炎症に重要な働きを担う免疫細胞ミクログリアの関与が示唆されているが、ヒトでの知見は限られている。従来、ミクログリアをターゲットとした臨床研究は、死後脳研究とPET研究が中心であった。こうした研究により、統合失調症患者、うつ病患者、自閉スペクトラム症患者、そして、自殺者の脳内でミクログリアの過剰活性化が報告されている。PET技術により生きている患者の脳内ミクログリア活性化を部分的に計測できるが、ミクログリア活性化は実際には多種多様であり、現在のPET技術で測定できる活性化の種類はTSPOなどごく一部の活性化計測に限られている。解像度の課題も大きく、PETだけでダイナミックで多彩なミクログリア活性化を特にモレキュラーレベルで評価することは困難である。特に創薬においては分子基盤の解明が鍵になるため、その限界は無視できない。

患者の脳のミクログリア細胞を採取して解析することが理想的であるが、倫理的にも技術的にもハードルが高い。従って、齧歯類などモデル動物の脳から採取したフレッシュなミクログリア細胞の解析はミクログリア病態解明のためには不可欠であり、筆者の研究室でもミクログリアにフォーカスを当てたモデルマウス実験を推進している¹⁾。しかしながら、精神疾患の表現型をすべて満たしうるモデル動物の作製は不可能である。こうした限界を打開するために、我々は、ヒトを対象として特にアクセスしやすい血液を用いた精神疾患リバース・トランスレーショナル研究を推進しているので紹介する。

ヒト血液由来 iMG 細胞の開発と応用

2016年以降、ヒトiPS細胞由来ミクログリア様細胞の開発が次々に報じられており、様々な脳疾患におけるミクログリアの病態理解への期待が高まっている^{2, 3)}。

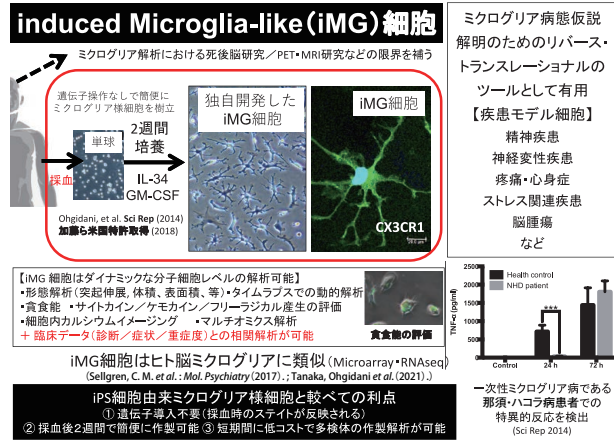


図1. ヒト血液由来直接誘導ミクログリア様 (iMG) 細胞の特徴 (文献4および5より改変)

特に遺伝的影響の大きい疾患においてはiPS細胞由来ミクログリア様細胞の解析は有用であるが、精神疾患においては遺伝的因子よりは環境因子が大きい疾患も多く存在しており、ステイトを反映しうる疾患モデル細胞の解析が重要である。しかるに、筆者の研究室では、ステイト情報がリセットされるiPS細胞を用いずに体細胞から直接的にミクログリア様細胞を誘導する技術開発を進めてきた。2014年、ヒト末梢血単球にGM-CSFとIL-34という2種類のサイトカインを投与することにより、わずか2週間で作製可能な直接誘導ミクログリア (iMG) 細胞の作製に成功した(図1)⁴⁾。iPS細胞と異なり、iMG細胞は遺伝子組み換え操作を一切必要とせずケミカル誘導により極めて短時間で作製可能であり、多くの検体数を比較的安価に作製可能である。さらに、iMG細胞は貪食能やサイトカイン産生能といったダイナミックな機能を計測可能であり、生きた細胞の多彩な分子レベルの解析が可能で、死後脳研究やPET研究のデメリットを補うことが期待される^{4, 5)}。2014年の開発時点で、iMG細胞がヒトの脳ミクログリア細胞の性質の多くを有しており、単球やマクロファージとは異なる表現型を示すことを確認している⁴⁾。米国マサチューセッツ総合病院 (MGH) の研究グループは、筆者らの助言を得て作製したiMG細胞がヒ

ト脳ミクログリアに最も類似していることをマイクロレイ解析によって明らかにしている⁶⁾。筆者らも九大脳外科との連携により、末梢血由来iMG細胞が同一患者の同時期の脳ミクログリアと類似していることをRNAseqによる網羅的な遺伝子発現解析で見出している (Tanaka, S. et al. : *Front. Immunol.*, in press)。

ヒトiMG細胞はすでに精神神経疾患や疼痛性疾患の病態解明研究やバイオマーカー開発研究に応用されている。筆者らが真っ先に注目したのは代表的な一次性ミクログリア病として知られる那須・ハコラ病である。精神病症状を30代で呈し40代で認知症症状が進行し寝たきり状態になった女性患者から作製したiMG細胞では、貪食刺激に対してTNF- α ・IL-6など炎症性サイトカインの産生レスポンスが遅延する傾向があり、同時に、IL-10など保護的サイトカイン産生に関しては早期から産生が抑制される傾向を見出した⁴⁾。こうした患者由来iMG細胞の反応から、那須・ハコラ病における多彩な精神症状出現や若年性認知症発症にミクログリアによる慢性的な脳内炎症の関与が示唆される⁴⁾。つぎに、筆者が臨床で関わっていた双極性障害I型・急速交代型(ラピッドサイクラー)の患者のiMG細胞を解析したところ、1名の男性患者では躁状態の時にM1型優位のmRNAプロファイリング

を示し、佐賀大学精神科の協力で3名での解析を試みたところ、M2型の代表的マーカーであるマンノースレセプターCD206のmRNA発現が「うつ状態」の時に共通して亢進していた⁷⁾。こうした結果から、双極性障害における「躁」と「うつ」のシフトにマイクログリアの免疫応答の変化が重要な役割を果たしている可能性がある⁷⁾。さらに、九大心療内科との連携により精神疾患に限らず身体疾患を有する患者からもiMG細胞を用いたリバーシ・トランスレーショナル研究を進めており⁹⁾、女性の線維筋痛症患者のiMG細胞においてTNF- α mRNAの高発現を見出しており、疼痛性障害の客観的バイオマーカーになる可能性を提案している⁸⁾。九大脳外科との連携により、iMG細胞のCD206の発現パターンが脳腫瘍(グリオーマ)の進行度を予測するマーカーになる可能性も萌芽的に見出している(Tanaka, S. et al. : *Front. Immunol.*, in press)。

iMG細胞はすでに国外の研究機関でも活用されている。前述のMGHのグループは、統合失調症患者の血液由来iMG細胞と同一患者のiPS細胞由来ニューロンとの共培養実験により、統合失調症患者において活性化マイクログリアが補体を介した神経シナプス傷害に重要であり、マイクログリア活性化阻害作用を有する抗菌剤ミノサイクリンによって神経シナプス傷害がレスキューされることを報じている⁹⁾。米国・オランダなどの国際共同研究チームも統合失調症患者由来のiMG細胞を用いた研究に着手しており、患者由来iMG細胞の方がLPSへの反応性が高く、TNF- α の産生も多かったと報じている¹⁰⁾。

ヒト血液メタボローム解析

筆者の研究室では血球成分ばかりでなく、血漿や血清からも脳内マイクログリア動態を把握するための糸口を探っている。例えば、血漿を用いた神経由来エクソソーム関連の解析を進めており、マイクログリア活動性に不可欠なサイトカインであるIL-34がうつ病の病態に関与する可能性

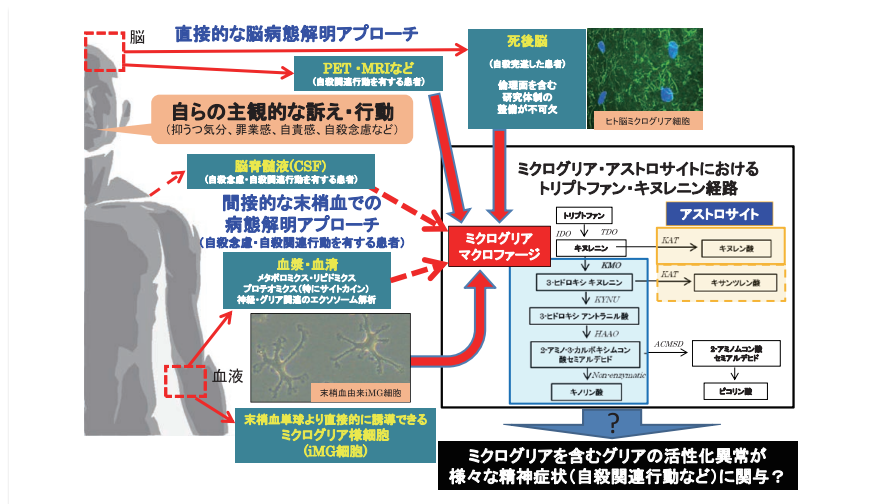


図2. 精神疾患の病態解明とバイオマーカー開発のための多軸的アプローチ (例：自殺関連行動へのアプローチ) 文献 14 より引用・改変

を見出している¹¹⁾。他方、九大検査部との連携により、抑うつを呈する患者から末梢血を採血しメタボローム解析を実施したところ、抑うつ重症度に関連する血中代謝物を幾つか同定し、さらに、自殺念慮の強さがマイクログリア活性化と関連深いトリプトファン-キヌレニン代謝経路における複数の代謝物と相関することを見出している^{12, 13)}。こうした結果は死後脳研究において自殺者の脳内マイクログリアが活性化していたという報告をサポートする知見である。しかるに、マイクログリア活性化の制御とその把握は、喫緊の社会的課題である自殺対策にも有用であると想定し、現在、様々な手法を組み合わせた双方向性研究を推進している¹⁴⁾ (図2)。

おわりに

抑うつ・不安・妄想そして自殺念慮など様々な精神症状や精神病態にマイクログリアの過剰活性化や活性化制御不全が関与している可能性がある。今後、様々な精神疾患を対象として、臨床データ取得、ヒト血液解析 (iMG細胞解析やメタボローム解析)、およびヒト脳解析を組み合わせたリバーシ・トランスレーショナル研究が発展し、分子細胞レベルでのマイクログリアを介した精神病態機序が解明されることで、マイクログリアをターゲットとした新しい治療薬の開発が期待される。採血により作製可

能なiMG細胞の解析やメタボローム解析は、精神疾患に限らず、様々な疾患における脳内マイクログリア動態を反映する客観的バイオマーカーとしての活用も期待される。

【参考文献】

- Ohgidani, M. et al. : *Brain Behav. Immun.*, **55**, 17-24 (2016).
- Muffat, J. et al. : *Nat. Med.*, **22**, 1358-1367 (2016).
- Pocock, J. M. and Piers, T. M. : *Nat. Rev. Neurosci.*, **19**, 445-452 (2018).
- Ohgidani, M. et al. : *Sci. Rep.*, **4**, 4957 (2014).
- Ohgidani, M. et al. : *Front. Cell. Neurosci.*, **9**, 184 (2015).
- Sellgren, C. M. et al. : *Mol. Psychiatry.*, **22**, 170-177 (2017).
- Ohgidani, M. et al. : *Front. Immunol.*, **7**, 676 (2017).
- Ohgidani, M. et al. : *Sci. Rep.*, **7**, 11882 (2017).
- Sellgren, C. M. et al. : *Nat. Neurosci.*, **22**, 374-385 (2019).
- Ormel, P. R. et al. : *Brain Behav. Immun.*, **90**, 196-207 (2020).
- Kuwano, N. et al. : *J. Affect. Disord.*, **240**, 88-98 (2018).
- Kuwano, N. et al. : *J. Affect. Disord.*, **231**, 74-82 (2018).
- Setoyama, D. et al. : *PLoS One*, **11**, e0165267 (2016).
- Suzuki, H. et al. : *Front. Cell. Neurosci.*, **13**, 31 (2019).

有機エレクトロニクス関連

ビルディングブロック

Wako

ポリイミドは、液晶層をはさむようにあって細長い液晶分子を方向揃えて並べるための材料である「配向膜」及び有機ELディスプレイの「フィルム基板」に使用される代表的な化合物です。今回、2種のポリイミドをラインアップしました。また、液晶や有機ELでよく使われるカルバゾールの高純度体を発売しました。HPLCにてUV及び蛍光の両検出器で含量99%以上を保証しています。他に、機能性材料の側鎖に導入できるトリフェニルアミン系ビルディングブロックも品揃えしています。



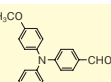
C₁₀H₆O₆=224.17
CAS RN® 1198787-91-5
1



C₁₀H₆O₆=224.17
CAS RN® 6053-46-9
2



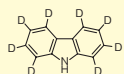
C₁₂H₉N=167.21
CAS RN® 86-74-8
3



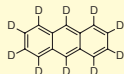
C₂₁H₁₉NO₃=333.38
CAS RN® 89115-20-8
4

No.	コード No.	品名	規格/メーカー	容量	希望納入価格(円)
NEW 1	358-45811	Cyclohexane-1 <i>R</i> ,2 <i>S</i> ,4 <i>S</i> ,5 <i>R</i> -tetracarboxylic Dianhydride	富士フィルム フコケミカル (株)	100g	70,000
NEW 2	355-45821	3-(Carboxymethyl)-1,2,4-cyclopentanetricarboxylic Acid 1,4:2,3-Dianhydride		100g	75,000
NEW 3	351-45801	Carbazole, 99%		100g	40,000
NEW 4	027-19581 025-19582	4-[Bis(4-methoxyphenyl)amino]benzaldehyde	有機合成用	5g 25g	15,000 39,000

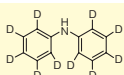
有機ELの発光材料によく見られるカルバゾール、アントラセン、ジフェニルアミンの重水素体をラインアップしました。これらの化合物は量産化可能です。また、メチル求核剤の重水素体を発売しました。



C₁₂HD₉N=175.26
CAS RN® 38537-24-5
5



C₁₄D₁₀=188.29
CAS RN® 1719-06-8
6



C₁₂HD₁₀N=179.28
CAS RN® 37055-51-9
7



CD₃I/Mg=169.26
CAS RN® 41251-37-0
8

No.	コード No.	品名	規格	容量	希望納入価格(円)
5	033-20971	Carbazole-1,2,3,4,5,6,7,8-d ₈	有機合成用	1g	30,000
	039-20973		10g	99,500	
6	018-28121	Anthracene-d ₁₀	有機合成用	1g	25,000
	014-28123		10g	99,500	

No.	コード No.	品名	規格	容量	希望納入価格(円)
NEW 7	045-34641	Diphenyl-d ₁₀ -amine	有機合成用	1g	28,000
	041-34643			10g	99,500
NEW 8	130-19101	Methyl-d ₃ -magnesium iodide, Diethyl Ether Solution (abt. 1mol/L)	有機合成用	100mL	61,000

長期のサンプル保管・高感度な分析に 石英ネジロバイアル

Wako

本品は、使いやすいネジロタイプの石英製バイアルです。石英ガラスはほぼSiO₂からできており、他のガラスと比べて金属不純物（ほう素やナトリウムなど）をほとんど含みません。また優れた耐薬品性を持つことから、長期の薬品保存に適しています。さらに、約1,000℃の高温まで使用でき、急速な温度変化にも耐えられるため、オートクレーブや乾熱での滅菌が可能です。

特長

- SiO₂ 99.99%電気溶融石英製

ガラス分類	組成(重量%)					アルカリ溶出
	SiO ₂	B ₂ O ₃	Al ₂ O ₃	Na ₂ O+K ₂ O	CaO+BaO	
石英ガラス	99.99	—	—	—	—	無
ほうけい酸ガラス	Type 1	81.0	13.0	2.0	4.0	—
	Type 2	79.0(Al ₂ O ₃ 含む)	11.0	SiO ₂ と合算	8.0	2.0
ソーダ石灰ガラス	70~73	—	1~1.8	13~15	7~12	多

金属不純物によるアルカリ溶出が起らず、長期保管に最適です。

- 高耐熱性、急加熱急冷却に対応
耐熱耐冷温度：本体→-196℃～1,000℃
キャップ→-120℃～190℃※
急速な温度変化にも耐えられるため、オートクレーブや乾熱での滅菌が可能です。
※1.5mLタイプは-60℃～120℃
- 使いやすい広口のネジロタイプ（※5mL、10mLタイプ）
外径：φ20.5mm、口内径：φ16.5mm
口外径：φ20.5mm
*使用例（qNMRのサンプル調製）
本品は不純物が溶出しない広口のバイアル（5mL、10mL）で、細かい秤量を必要とするqNMR測定のサンプル調製に最適です。



コード No.	品名	容量	希望納入価格(円)
NEW 299-36281	Quartz Screw Vials 1.5mL*	10本	25,000
NEW 296-36291	Quartz Screw Vials 5mL	10本	31,000
NEW 299-36301	Quartz Screw Vials 10mL	10本	35,000

※石英ネジロバイアル 1.5mL はオートサンプルラに使用いただけるバイアルです。詳細は当社 HP をご覧下さい。

分析→ラボウェア→実験器具→石英ネジロバイアル

<https://labchem-wako.fujifilm.com/jp/category/02093.html>

Ref... 2～10℃保存 E... 20℃保存 S... 80℃保存 IS... 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、2021年7月時点での情報です。最新情報は、当社HPをご参照下さい。

不純物確認試験や定量試験に最適な重溶媒

Wako

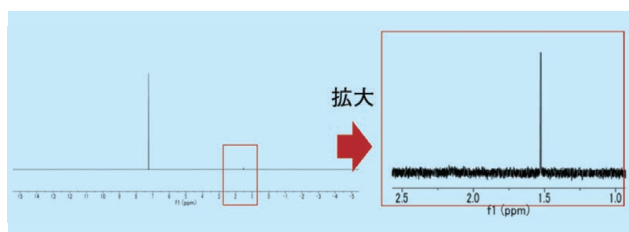
高純度 NMR 溶媒

装置感度の向上や、qNMRの普及による定量的条件下での測定によって、重水素化溶媒由来の不純物を懸念する機会が増えてきています。高純度NMR溶媒は、化学純度に加えて、日本薬局方記載の高感度な測定条件を用いて¹H NMRスペクトルを取得することで、不純物シグナルの限度試験を実施し、その品質保証をしています。不純物シグナルの限度試験は、¹H NMRに加えて、¹³C NMR、¹⁹F NMR、³¹P NMRといった多核についても実施し、より広範囲な核種に対して保証をしています。

製品規格 クロロホルム-d, 99.8% (高純度)

試験項目	規格値
外観	無色澄明の液体
水分	0.003%以下
重水素化率	99.8%以上
含量 (GC)	99.9%以上
不純物 (NMR) (¹ H)	試験適合
不純物 (NMR) (¹³ C)	試験適合
不純物 (NMR) (³¹ P)	試験適合
不純物 (NMR) (¹⁹ F)	試験適合

¹H NMR チャート例 クロロホルム-d, 99.8%(高純度)



コード No.	品名	規格	容量	希望納入価格 (円)
015-28131	Acetone-d ₆ , 99.9% (High purity)	NMR用	1mL×5A	32,000
021-19501	Benzene-d ₆ , 99.5% (High purity)	NMR用	1mL×5A	32,000
031-25531	Chloroform-d, 99.8% (High purity)	NMR用	1mL×5A	20,000
044-34471	Deuterium Oxide, 99.8% (High purity)	NMR用	1mL×5A	20,000
040-34571	Dichloromethane-d ₂ , 99.8% (High purity)	NMR用	1mL×5A	35,000
042-34651	Dimethyl Sulfoxide-d ₆ , 99.9% (High purity)	NMR用	1mL×5A	35,000
133-18971	Methanol-d ₄ , 99.8% (High purity)	NMR用	1mL×5A	28,000

詳細は当社HPをご覧ください。

試薬事業トップ→分析→核磁気共鳴スペクトル測定 (NMR) →NMR→NMR溶媒

<https://labchem-wako.fujifilm.com/jp/category/00626.html>

バックグラウンドノイズをさらに低減!!

Wako

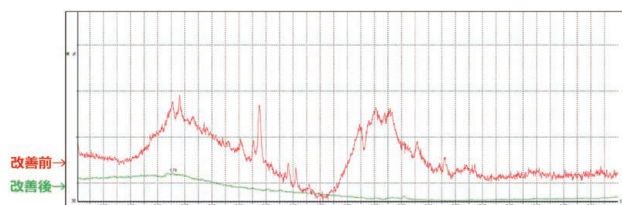
LC/MS用溶媒シリーズ

LC/MS用溶媒シリーズは製法の見直しにより、従来製品と比較しバックグラウンドノイズをさらに低減しました。

本シリーズの製品は微量分析に安心してご使用できるよう、LC/MS適合性試験、パーティクル保証 (0.5 μm以上) をしています。この機会にぜひお試しください。

データ

■ アセトニトリルのベースライン比較



特長

- 低バックグラウンドノイズ
- ナトリウムなどの溶出を抑えた特殊ガラスびんを使用 (特許第4586729号)
- パーティクル保証
- LC/MS適合性試験を実施

コード No.	品名	規格	容量	希望納入価格 (円)
012-19851	Acetonitrile	LC/MS用	1L	7,400
018-19853			3L	17,000
050-09221	Ethanol(99.5)	LC/MS用	1L	6,300
056-09223			3L	17,000
062-04721	0.1 vol% Formic Acid-Acetonitrile	LC/MS用	1L	7,200
068-04723			3L	16,800
138-14521	Methanol	LC/MS用	1L	1,950
134-14523			3L	4,000
168-25531	2-Propanol	LC/MS用	1L	4,300
164-25533			3L	9,800
214-01301	Ultrapure Water	LC/MS用	1L	2,300
210-01303			3L	4,500

最新の各種アプリケーションをHPにて公開しています。詳細は当社HPをご覧ください。

試薬事業トップ→分析→溶媒・溶離液→液体クロマトグラフィー用溶媒→LC/MS用溶媒
<https://labchem-wako.fujifilm.com/jp/category/00961.html>



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。

第十八改正日本薬局方 (JP18) 対応のマンギフェリンなどを新たにラインアップに追加しました。

■ コール酸、デオキシコール酸

日本薬局方一般試験法 試薬・試液のコール酸及びデオキシコール酸、薄層クロマトグラフィー用に適合しています。生薬「ゴオウ」の確認試験にご使用いただけます。

■ ジフェニルスルホン標準品

日本薬局方一般試験法 試薬・試液のジフェニルスルホン定量用に適合しています。

「ソヨウ」の定量法にご使用いただけます。

■ エフェドリン塩酸塩標準液類 (3品目)

覚せい剤原料 (エフェドリン塩酸塩、プソイドエフェドリン塩酸塩) が10%以下の標準液のため、購入時の譲渡証・譲受証の取り交わしが不要です。生薬マオウの定量などにご使用いただけます。

■ マンギフェリン

日本薬局方一般試験法 試薬・試液のマンギフェリン、定量用に適合しています。

「白虎加人参湯エキス」定量法にご使用いただけます。

■ サイコサポニンa, d混合標準試薬

使用時、本品に、メタノール1mLを正確に加えると、定量用サイコサポニンa及び定量用サイコサポニンd (どちらもqNMRで定量) をそれぞれ0.050mg/mLを含む混合標準液となるように調製済みです。「サイコ」の定量法にご使用いただけます。

■ サイコサポニンb₂標準試薬 (濃度調製済み)

使用時、本品に、水/メタノール混液 (1:1) 2mLを正確に加えると、0.010mg/mLのサイコサポニンb₂標準試液

となるように調製済みです。「サイコ」の定量法にご使用いただけます。

コードNo.	品名	規格	容量	希望納入価格 (円)
NEW 036-25841	Cholic Acid	局方生薬試験用 (薄層クロマトグラフィー用)	10mg	9,000
NEW 049-34661	Deoxycholic Acid	局方生薬試験用 (薄層クロマトグラフィー用)	10mg	9,000
NEW 048-34631	Diphenyl Sulfone Standard	生薬試験用	100mg	24,000
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
054-09361	Ephedrine Hydrochloride Standard Solution [20mg/L Methanol(1 in 2) Solution]	生薬試験用	1mL×5A	25,000
057-09351	Ephedrine Hydrochloride Standard Solution [50mg/L Methanol(1 in 2) Solution]	生薬試験用	1mL×5A	25,000
NEW 134-19121	Mangiferin	局方生薬試験用 (定量用)	20mg	85,000
NEW 194-19041	Saikosaponin a,d Mixture Standard Reagent	局方生薬試験用 (定量用)	100μg	45,000
NEW 194-18941	Saikosaponin b ₂ Standard Reagent	局方生薬試験用 (定量用)	20μg	18,000

『生薬試験用試薬』 カタログ頒布中



●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。

■ フロメトキン標準品

■ メチオゾリン標準品

■ スルホキサフロル標準品 (異性体混合物)

コードNo.	品名	規格	容量	希望納入価格 (円)
NEW 060-06961	Flometoquin Standard	残留農薬試験用	50mg	29,000
NEW 137-19091	Methiozolin Standard	残留農薬試験用	50mg	30,000
近日発売 190-19021	Sulfoxaflor Standard (mixture of isomers)	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→分析→残留農薬・動物用医薬品分析→標準品→残留農薬・動物用医薬品分析用標準品 “製品一覧”
<https://labchem-wako.fujifilm.com/jp/category/01942.html>

使いやすいポリエチレン容器の新製品を発売しました!

Wako

除菌用エタノール

新型コロナウイルスが流行する中、厚生労働省では手や指などのウイルス対策として、手洗いとアルコール消毒を定めています。令和2年4月10日付厚生労働省医政局経済課等による事務連絡において、「新型コロナウイルス感染症の発生に伴う高濃度エタノール製品の使用について」の通達がありました。当社の除菌用エタノールは、本通達に適合した製品で、**医薬品や医薬部外品ではありませんが、消毒用エタノールの代替品として、手指消毒に使用することができます。**

特長

- 除菌効果が高いといわれる濃度 (77 ~ 82 vol%) に調製
- メタノールなどの不純物を含まない低毒性なエタノール溶液
- 豊富なラインアップ

					
製品コード	051-09376	053-09375	057-09373	059-09377	051-09131
品名	80vol% エタノール				エタノールスプレー
容量	500mL	5L	18L	170mL	
容器	ポリエチレン系樹脂容器	硬質ガラス瓶	ポリエチレン系樹脂容器	一斗缶	スプレー缶
備考	専用キャップ (スプレー or ポンプ) に付け替え可能	丈夫な硬質ガラス瓶	詰め替えに便利な専用注ぎ口付き	400ccボトル約45回分の大容量	高圧ガスが充てんされワンタッチで持続的噴霧が可能

※当社製品を小分けしたものを販売しないで下さい。なお、購入者が他の容器へ詰め替えて使用することは差し支えありません。

- 専用キャップに付替えてそのまま使用可能



ポリエチレン製容器の除菌用エタノール (コードNo. 051-09376, 500mL) は、専用キャップ (別売) に付け替えてそのまま使うことができます。専用キャップは持ち運びに便利なスプレータイプと消毒液スタンドに取り付け可能なポンプタイプを2種類をご用意しています。

使用例



✓職場環境や研究室の除菌に ✓持ち運び用の除菌剤として ✓職場のウイルス対策に

コードNo.	品名	規格	容量	希望納入価格(円)
NEW 051-09376			500mL (ポリ容器)	1,480
053-09375	80vol% Ethanol	☐ 除菌用	500mL	1,900
057-09373			5L	9,060
059-09377			18L	38,000
051-09131	Ethanol Spray	☐ 除菌用	170mL	3,300
290-36331	Pump Dispenser for 80vol% Ethanol	無規格	5個	2,500
291-36361	Spray Dispenser for 80vol% Ethanol	無規格	5個	2,000

詳細は当社 HP をご覧下さい。

試薬事業トップ→常用試薬・ラボウェア→消耗品→除菌剤→除菌用エタノール

<https://labchem-wako.fujifilm.com/jp/category/01862.html>

便利な溶液タイプ

Wako

ルシフェリン溶液

D-ルシフェリンはホタル由来の発光基質です。ATP、マグネシウム存在下でルシフェラーゼによりルシフェリン-AMPとなり、さらにルシフェラーゼにより酸化されオキシルシフェリンとなり、発光します。このルシフェリン-ルシフェラーゼ発光機構を利用し、ホタルルシフェラーゼ遺伝子をマーカーとして遺伝子発現をモニターすることができます。

本品は、便利な溶液タイプです。

製品概要

- 外観：黄色の液体
- 濃度：30mg/mL
- 溶媒：PBS (-)

特長

- 便利な溶液タイプ
- エンドトキシン試験済み
- フィルターろ過滅菌済み

コードNo.	品名	規格	容量	希望納入価格(円)
NEW 128-06911	30mg/mL D-Luciferin Potassium Salt Solution	☐ 生化学用	1mL	20,000

☐…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、2021年7月時点での情報です。最新情報は、当社HPをご参照下さい。

回収率と精製純度を向上

Wako

MagCapture™ エクソソーム アイソレーションキット PS Ver.2

本品は、従来品 (MagCapture™ エクソソームアイソレーションキットPS) よりもエクソソームの回収率と精製純度が向上し、実験操作時間の短縮も実現したエクソソーム単離・精製キットです。本品で精製したエクソソームは、細胞添加実験にも使用できます。

性能

従来品との比較

	本品 (MagCapture™ エクソソームアイソレーション キット PS Ver.2)	従来品 (MagCapture™ エクソソームアイソレーション キット PS)
EV 回収性能	培養上清: ■■■■■■ 血液サンプル: ■■■■■■	培養上清: ■■■■■■ 血液サンプル: ■■■■■■
サンプル 反応時間*1	1 時間以上	3 時間以上
ビーズ使用 可能回数	5回*2	5回*2
溶出バッファ の細胞毒性	低い*3 (従来品に対して)	細胞種による

*1 サンプルのボリュームにより反応時間は変動します。

*2 通常使用1回、再使用4回を合計した5回を使用可能回数として設定しています。

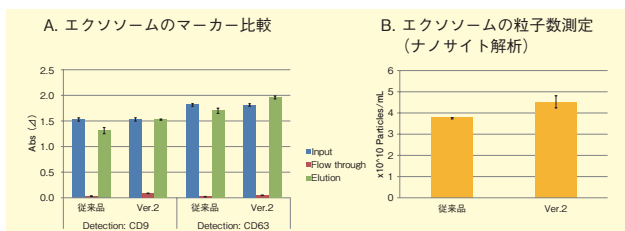
抽出するサンプルの由来が異なる場合やコンタミのリスクが予想される場合、新規に調製した磁気ビーズの使用を推奨します。

*3 溶出サンプルのバッファ交換をすることなく、*in vitro*や*in vivo*での投与実験が可能です。

溶出バッファはEDTAを含みます。EDTAが問題になる場合、バッファ交換が必要です。

データ

エクソソーム回収率の比較



間葉系幹細胞 (MSC) 由来培養上清から、本品及び従来品を用いてエクソソームを含む細胞外小胞の単離・精製を行った。回収したサンプルについて、ELISAによるマーカー比較及びナノサイトによる粒子数測定を行った。その結果、本品は従来品よりも回収効率が向上することが示された。

コード No.	品名	規格	容量	希望納入価格 (円)
294-84101	Magcapture™ Exosome		2回用	20,000
290-84103	Isolation Kit PS Ver.2	遺伝子研究用	10回用	80,000

新型コロナウイルスの重症化因子を検出

Wako

α1-アンチトリプシン遺伝子変異検出キット

α1-アンチトリプシン (AAT) は、セルピンスーパーファミリーに属するプロテアーゼインヒビターです。遺伝子変異によりAATが欠乏するα1-アンチトリプシン欠乏症は、呼吸器系疾患を引き起こすだけでなく、新型コロナウイルス感染症 (COVID-19) の重症化及び死亡に関連することが示唆されています¹⁾。

本品は、疫学調査において新型コロナウイルス感染症の重症化原因と予想されるα1-アンチトリプシン遺伝子の代表的なPiS及びPiZ遺伝子変異をリアルタイムPCR法により検出するキットです。

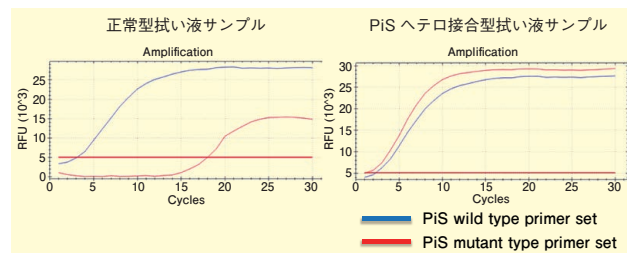
特長

- インターカレーターを用いたリアルタイムPCR法を採用
- 鼻咽頭拭い液及び唾液から精製なしで直接検出可能
- 独自開発したプライマーにより、点変異を高感度に検出

キット内容

- 1st PCR PiS primer set 100 μL × 1本
- 1st PCR PiZ primer set 100 μL × 1本
- qPCR PiS wild type primer set 100 μL × 1本
- qPCR PiS mutant type primer set 100 μL × 1本
- qPCR PiZ wild type primer set 100 μL × 1本
- qPCR PiZ mutant type primer set 100 μL × 1本
- 2 × PCR master mix 1,500 μL × 2本
- 20 × Intercalator* 200 μL × 1本

* Biotium, Inc.から商用ライセンスを得て、研究用試薬として販売しています (US 7803943 B2, US 7776567 B2)。



拭い液を95°C、6分熱処理して得た拭い液ゲノムDNAをPCR反応液に直接添加して測定した。正常型サンプルでは変異型primer setの増幅曲線が正常型primer setより15サイクル以上遅れて検出されるが、PiSヘテロ接合型変異サンプルでは両primer setがほぼ同時に検出され、容易に判定ができることが示された。塩基配列を解読した結果、報告されている点変異 (A→T) が確認された。

【参考文献】

1) Shapira, G., Shomron, N. and Gurwitz, D.: *FASEB J.*, 34(11), 14160 (2020).

コード No.	品名	規格	容量	希望納入価格 (円)
281-35101	α1-Antitrypsin Gene Mutation Detection Kit	遺伝子研究用	100 反応用	80,000

Refrigeration: 2~10°C, Freezing: -20°C, Dry Ice: -80°C, Liquid Nitrogen: -150°C. Indicated when room temperature storage is not applicable. Other abbreviations refer to the back cover. Content is as of July 2021. For the latest information, please refer to our website.

Kosher・Halal 認証取得済み ペプトン・タンパク質加水分解物

Solabia Biotechnology社はペプトン・タンパク質加水分解物を開発・製造するSolabiaグループのペプトン部門で、Kosher・Halal 認証取得済みの製品を豊富にラインアップしています。

同社の最大の特長は、動物由来製品と不使用製品を分けて製造していることです。トレーサビリティに関してお客様から高い信頼を受けており、また高品質な製品をバルク包装で提供しています。食品や発酵製品などの製造工程における微生物検査やバイオ医薬品生産（ワクチンなど）の細胞培養効率を向上させる必須栄養素としてご使用いただけます。

同社の生産工場はフランスとブラジルの複数拠点を稼働させているため、欠品となるリスクを大幅に抑え、COVID-19影響下でも継続的な供給が可能です。



Halal Certificate見本

製品概要

Kosher・Halal認証製品一覧

■ Broadbean peptone KPH

乳酸菌培養で優れた成長を示し、発酵、微生物検査、細胞培養において肉由来ペプトンの代替として使用できます。

主要原料：ソラマメ、消化酵素：植物・微生物由来

■ Enzymatic digest of casein KH

Tryptone USPと同性能に設計されたKosher認証済みの食品・発酵分野に適した高性能のカゼインペプトンです。

主要原料：牛乳カゼイン、消化酵素：微生物由来

■ Lupin peptone KPH

低分子量ペプチドで構成されており、発酵・バイオ医薬品・動物製品の代替としてさまざまな用途を持ちます。

主要原料：ルバン豆、消化酵素：植物・微生物由来

■ Papaic soy peptone KPH

IP (Identity-Preserved) ハンドリングされ、糖、窒素、

微量元素のバランスの取れた発酵用途向け脱脂大豆粉由来ペプトンです。

主要原料：脱脂大豆粉、消化酵素：植物・微生物由来

■ Pea peptone KPH

低分子量のペプチドで構成されたペプトンです。肉由来ペプトンやFBS、細胞培養サプリメントの代替としての用途を持ちます。

主要原料：エンドウ豆、消化酵素：植物・微生物由来

■ Potato peptone KPH

発酵増殖培地、細胞培養サプリメント、アニマルフリー培地などさまざまな用途を持ちます。

主要原料：ジャガイモ、消化酵素：植物・微生物由来

■ Soy Evolution KPH

独自の段階的な酵素消化システムにより大量の還元糖の遊離が可能のため、発酵利用に優れた大豆由来ペプトンです。

主要原料：脱脂大豆粉、消化酵素：植物・微生物由来

■ Soy peptone F KPH

IP (Identity-Preserved) ハンドリングされ、Solabia 独自のプロセスで製造された脱脂大豆粉由来のペプトンです。

主要原料：脱脂大豆粉、消化酵素：植物・微生物由来

■ Wheat peptone KPH

低分子量ペプチドで構成された小麦由来ペプトンで、細胞培養に適しています。動物製品の代替として、細菌や酵母などを効率的に培養できます。

主要原料：小麦、消化酵素：植物・微生物由来

メーカーコード	品名	メーカー	容量	希望納入価格(円)
A223100	Broadbean peptone KPH	Solabia Biotechnology	25kg	照会
A144600	Enzymatic digest of casein KH		25kg	照会
A233100	Lupin peptone KPH		25kg	照会
A163700	Papaic soy peptone KPH		25kg	照会
A253100	Pea peptone KPH		25kg	照会
A243100	Potato peptone KPH		25kg	照会
A163600	Soy Evolution KPH		25kg	照会
A163300	Soy peptone F KPH		25kg	照会
A213100	Wheat peptone KPH		25kg	照会

上記以外にも多数のペプトン・タンパク質加水分解物を取扱っています。

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→培養→微生物用試薬→ペプトン・タンパク質加水分解物

<https://labchem-wako.fujifilm.com/jp/category/01743.html>

和光 Solabia ペプトン

検索



屋井 先蔵 (1863.12.5 ~ 1927.6.1)

東邦大学名誉教授 中村 幹夫

1. はじめに

今日、乾電池は日常生活をする上で欠かせない必需品であるが、乾電池を発明し最初に製品化した人物が屋井先蔵(図1)であることは余り知られていない。アメリカに本部を置く世界最大の学術研究団体であるIEEEは、電気、電子、情報技術やその関連分野の歴史的偉業を顕彰するため「IEEEマイルストーン賞」を設置している。この賞に認定されるためには、25年以上に渡って世の中で高く評価を受けてきた実績が必要である。2014年のマイルストーン賞は「Birth and Growth of Primary and Secondary Battery Industries in Japan, 1893」の名称で、合資会社屋井乾電池、株式会社GSユアサおよびパナソニック株式会社へ授与された。マイルストーン銘板には以下のような碑文が刻まれている。「合資会社・屋井乾電池は1893年に屋井乾電池の発明特許を取得し、日本の乾電池産業を誕生させ、その発展に貢献した。この偉業を継いで、株式会社GSユアサとパナソニック株式会社は、産業機器や家電製品に搭載する一次および二次電池の巨大市場を開拓し、日本の電池産業および家電産業を発展させた」。合資会社・屋井乾電池は現存しないため、授賞式には屋井先蔵の故郷・長岡市と出身校である東京理科大学(当時の東京物理学校)の代表が出席した。乾電池を発明し、日本に乾電池産業を誕生させた市井の大発明家、屋井先蔵とはどのような人物であったか。その生い立ちから見てゆこう。

2. 生い立ち

屋井先蔵は文久3年(1863)越後長岡藩の城下町で下級武士の長男として生まれた。6歳のとき父が亡くなったため、叔父のもとで少年期を過ごした。明治8年(1875)、11歳のとき叔父の知り合いに連れられて東京に行き、神田の時計店で丁稚奉公した。し



図1. 屋井先蔵(写真提供:一般社団法人電池工業会)

かし、過労がたたって病気となり、1年余りで故郷の長岡に戻った。先蔵は東京での丁稚奉公のとき見た様々な最先端の時計に魅せられ、長岡に戻ってからも地元の時計店で丁稚として働いた。元来、機械好きの先蔵は1年ほど経つと簡単な時計であれば修理出来るほどの技術を身に付けた。ぜんまいの力でたくさんの歯車が規則正しく動く時計の修理を通して、先蔵は一つの夢を持つようになった。それはいつの日か動力なしで動き続ける永久機関を発明するという夢である。そのため、昼は時計店で働き、夜は永久機関の発明に向けあれこれ考え続けた。しかし一向に良い案が浮かんでこなかった。先蔵は次第に永久機関を発明するためには、文化、学問の中心である東京に行く、最先端の工学や物理学の勉強をする必要があると考えるようになった。行動力のある先蔵は、時計店での7年間の奉公を終えると、親や親戚の反対を押し切り、単身東京に向かった。明治17年(1884)、先蔵20歳のときである。

3. 受験失敗

東京では同郷の名士で遠戚にもあた

り、後に日本赤十字社社長を務めた陸軍軍医・石黒忠恵(いしぐろ ただのり)の下で書生として働いた。その間、蔵前にある東京職工学校(現:東京工業大学)を受験するため東京物理学校(現:東京理科大学)に入学して受験勉強を始めた。当時の物理学校は夜学であったため、先蔵のように昼間書生として働く若者も勉学に励むことができた。しかし、1年間勉強して臨んだ東京職工学校の受験は学力不足で不合格に終わった。さらに1年間じっくり勉強して満を持して臨んだ2回目の受験には遅刻をしてしまい、試験を受けさせてもらえなかった。先蔵の時計では間に合っていたのに係官の時計では5分の遅刻になっていたためである。念願の東京職工学校への入学が絶望的になり、先蔵は大いに失望した。さらに、この頃になると、長年目標に定めていた永久機関の製作が、実は原理的に不可能であることを学び、一層意気消沈した。

4. 電気時計の発明

東京職工学校の受験失敗を契機に先蔵は石黒邸を離れ、浅草区七軒町(現在の台東区元浅草)の長屋に移り住み、叔父が経営する町工場で職人として働くことにした。東京職工学校の化学工学科を卒業した叔父は、実験教具を製造する合資会社を設立し、それらを各学校に販売していた。この工場での仕事は物造りに強い興味を持っていた先蔵の工作技術を大いに向上させた。この頃、先蔵は一つの具体的な目標を持つようになっていた。それは正確な時間を刻む電気時計の発明である。不正確な時計によって夢に描いていた東京職工学校への入学を絶たれたため、その思いは一層強まっていた。昼間は叔父の工場で働き、夜は自宅の土間を実験場にして電気時計の製作に取り組んだ。最初に解決すべき問題は電源であった。この当時はまだ一般の家庭に電気は引かれておらず、電話や

電信機には電池が用いられていた。電気時計の製作に取りかかった先蔵も、動力としての電池に注目した。電池は1800年イタリアのボルタにより発明され、1836年イギリスのダニエルにより改良された。しかし、この時代の最も実用的な電池は、フランスのルクランシェが1868年に発明した電池であった。このルクランシェ電池では、正極に炭素棒と二酸化マンガ、負極に亜鉛棒、そして電解液として塩化アンモニウム水溶液が用いられており、その起電力は約1.5Vであった。この電池は当時の先蔵にとってとても高価で購入出来なかったため、苦労を重ねて自作した。寝る時間も割いて研究し、3年後の明治22年（1889）、ついに電気時計を完成させ特許申請にこぎつけた。1年半後の明治24年（1891）5月21日、先蔵の製作した電気時計は特許第一二〇五号として登録された（図2）。これは電気に関する日本初の発明であり、電気製品の第一号となった。

5. 乾電池の発明

先蔵の期待に反して、日本初の電気時計は全く売れなかった。なぜ売れないのか、先蔵は自問した。先蔵にとって時計部分には自信があったが、電池部分には気がかりな点があった。それは電解質として用いた塩化アンモニウム水溶液の液漏れである。また、一定電圧を保つため、電解液の補充や電極板の掃除なども必要で、利用者にとっては取り扱いが厄介であった。さらに、冬の寒い日には電解液が凍結して全く使い物にならないこともあった。もっと取り扱いが簡単で効果的な電池を作ることができないだろうか。そこで先蔵は当時日本の頭脳ともいえる帝国大学理科大学（東京大学理学部の前身）の山川健次郎教授や田中館愛橘（たなかだて あいきつ）教授に相談した。特にグラスゴー大学のケルビン卿（ウイリアム・トムソン教授）のもとで熱力学や電磁気学を学び、明治24年

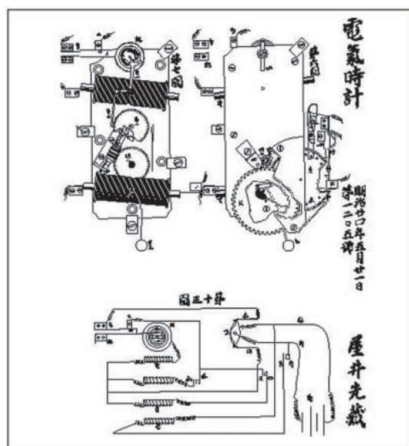


図2. 電気時計の特許明細書（写真提供：一般社団法人 電池工業会）

（1891）に帰国した田中館教授からは、電池の基礎理論や正極における成極（分極）現象など、一人では習得が困難な知識を得ることができた。それに基づき電解質の組成や正極材に改良を加え、より効果的な電池を作成した。次に先蔵が行ったことは、電解液の液漏れ現象を防ぐことであった。そこで、亜鉛器の中の電解液に様々な物質を加えて溶液の変化を注意深く観察した。その結果、灯心を何本にもほぐして加えると電解液が吸収されかなり扱いやすくなることに気づいた。さらに小麦粉、片栗粉、セメント、石膏等、

様々な粉末を加えると電解液が粘性を帯びペースト状になることを見いだした。このような実験を何度も何度も繰り返して行った結果、重量比で灯心と石膏を1：2にすると最適な結果が得られることを明らかにした。次に、小さな紙の容器に二酸化マンガ末、炭末、黒鉛末を加え練り混ぜて粘土状にし、その中央に炭素棒を挿入した。液漏れを完全に防ぐため正極の炭素棒にパラフィン浸透させるなどの工夫を施した。最後に紙の容器を先の亜鉛器の中に入れて封入した。こうして遂に、明治25年（1892）、液漏れのない電池を完成し、乾電池と命名して特許を出願した（図3）。特許出願を機に、先蔵は屋井乾電池合資会社を設立した。そんなとき、帝国大学の田中館教授から、明治26年（1893）5月から開催されるシカゴ万国博覧会（正式にはシカゴ・コロンブス万国博覧会）に帝国大学で製作した最新の地震計を出品するが、その電源として先蔵の乾電池を使用させていただけませんか、との依頼を受けた。こうして、先蔵の乾電池が世界の舞台上に登場することになった。平等院鳳凰堂（図4）を模した豪華な日本館には沢山の美術品や工芸品とともに、欧米先進諸国を凌ぐ最先端の地震計や



図3. 屋井乾電池（写真提供：一般社団法人 電池工業会）



図4. シカゴ万博の日本館「鳳凰殿」(Wikipedia)

その電源としての屋井乾電池が陳列され、参加者の大きな関心呼んだ。万博終了後程なくして先蔵の作った乾電池は、その独創性が認められ特許第二〇八六号として登録された。明治26年(1893)11月21日のことである。

6. 乾電池王

シカゴ万博で国際的な注目を浴びたにも関わらず、先蔵の発明した屋井乾電池は全く売れなかった。その理由は明らかである。当時の家庭には乾電池を必要とする電気製品がほとんど存在しなかったからである。ところが、翌年の明治27年(1894)、状況が一変する。突然、屋井乾電池合資会社は陸軍省から大量の注文を受けた。この年に勃発した日清戦争で陸軍は通信用機器の電源として外国製のルクランシェ電池を使用していたが、厳冬の満州では電解液が凍結し使用不能になってしまった。そこで陸軍は、当時入手可能

な欧米の電池を全て取り寄せて試したが、いずれも目的に適わなかった。唯一、国産の屋井乾電池のみが寒冷地でも使用できることを見いだしたのである。日清戦争は翌年の明治28年(1895)、日本の勝利で終結した。それを知らせる号外には「満州での勝利は厳寒の地でも正常に働いた屋井乾電池のおかげである」と書かれていた。これを契機にして、屋井乾電池の名前は一気に広がり、明治37年(1904)に勃発した日露戦争でも軍から大量の注文を受けた。明治43年(1910)には神田錦町1丁目(現在の千代田区神田錦町1丁目)に屋井乾電池合資会社の本社を新築し、乾電池の本格的な量産体制に入った(図5)。その後も先蔵は乾電池の改良に不断の努力を注ぎ、屋井乾電池合資会社を国内に大きなシェアを持つ大企業に成長させ、「乾電池王」と呼ばれるまでになった。大正14年(1925)には、川崎市に広大な土地を購入し、最先端の乾電池工場を建設した。この頃になると、多くの人は乾電池といえば屋井乾電池のことだと考えるようになった。



図5. 明治時代の屋井乾電池販売部(写真提供:一般社団法人電池工業会)

7. おわりに

世界最高の乾電池を作り、日本に乾電池産業を誕生させた市井の大発明家、屋井先蔵は昭和2年(1927)6月1日、胃がんにより63年の波乱に富んだ生涯を閉じた。また、戦争とともに発

展してきた会社も、第二次世界大戦終了後、経営不振に陥り、昭和25年(1950)に幕を下ろした。そのため屋井乾電池や屋井先蔵の名前も次第に人々の記憶から遠のいていった。しかし、それから64年後の平成26年(2014)、IEEEは屋井先蔵による乾電池の発明を「電気産業の発展に偉大な貢献をした歴史的偉業」として顕彰した。それにより屋井先蔵の名前は再び国内外で脚光を浴び、科学工学発展の歴史上に正しい位置を獲得するに至ったことは、誠に喜ばしいことである。

謝辞

本稿の執筆を勧めて頂いた千葉大学名誉教授根矢三郎先生、京都薬科大学名誉教授桜井弘先生に心より感謝申し上げます。

【参考文献】

- 1) 上山明博:「白いツツジ」(PHP研究所)(2009).
本解説文を書くにあたって、上山明博氏の著書を参考にさせていただいた。上山氏の長期にわたる地道な取材活動に深く敬意を表する。
- 2) <https://ja.wikipedia.org/wiki/IEEE>. (2021年1月20日閲覧)
- 3) https://ieec-jp.org/activity/jchc/milestone_jusho.html (2021年1月20日閲覧)
- 4) 長岡市政だより ながおか, **716**, 8 (2014).
- 5) <https://www.tus.ac.jp/info/about/history.html> 東京理科大学ウェブサイト
- 6) 第6回 でんきの礎, 屋井先蔵, p.24 (一般社団法人電気学会)(2013).
<https://www.iee.jp/foundation/list06/> (2021年1月20日閲覧)
- 7) [https://ja.wikipedia.org/wiki/シカゴ万国博覧会_\(1893年\)](https://ja.wikipedia.org/wiki/シカゴ万国博覧会_(1893年)) (2021年1月20日閲覧)

新型コロナウイルスの遺伝子変異を検出

Wako

SARS-CoV-2 N501Y/E484K/L452R/E484Q Mutation Detection Kit

世界中で新型コロナウイルスの変異株が拡大しており、日本国内でも感染者が多数報告されています。変異株は世界各国で確認されており、感染経路の特定と早急な封じ込めが必要とされています。

当社では、独自開発したプライマーの設計技術により、通常は困難とされている遺伝子点変異の高感度検出を可能にしました。この技術を利用して、迅速かつ簡便にN501Y変異、E484K変異、L452R変異及びE484Q変異を検出できるキットを発売しました。

特長

- 判定が容易
変異型と従来型のプライマー・プローブセット使用時のCt値の比較で判定
- 1-step RT-qPCR法で迅速に変異を検出
約70分で完了
- 独自開発のプライマー・プローブで、高感度に変異を検出
- すべての変異株を同じ反応条件で測定可能
N501Y、E484K、L452R、E484QすべてPCR反応条件が同じであるため、1プレートで測定可能

キット内容

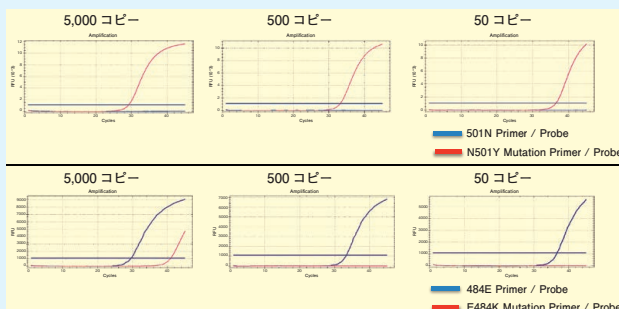
SARS-CoV-2 N501Y Mutation Detection Kitの場合

キット部材	20反応用	プローブ 標識
	200反応用	
RT Enzyme Mix (20×)	20 µL × 1本	—
	200 µL × 1本	
One-Step Reaction Mix (2×)	200 µL × 1本	—
	1 mL × 2本	
501N Wild Type Primer & Probe Mixture	10 µL × 1本	FAM
	100 µL × 1本	
N501Y Mutant Type Primer & Probe Mixture	10 µL × 1本	FAM
	100 µL × 1本	

※E484K、L452R、E484Q変異検出キットも同様に、各変異に特異的に反応するプライマー・プローブが付属しています。
 ※添付文書は当社HPの製品ページからダウンロードして下さい。
 ※本キットの陽性コントロールが必要な場合は当社までお問合せ下さい。

データ

■ アルファ型の変異株(N501Y+、E484K-)の測定例



測定検体：国立感染症研究所より譲渡されたアルファ型の変異株 (QHN001)
 使用キット：SARS-CoV-2 N501Y Mutation Detection Kit [コード No. 287-35701]
 SARS-CoV-2 E484K Mutation Detection Kit [コード No. 281-35601]
 サンプルコピー数：5,000, 500, 50 コピー / Well

N501Y Mutant type Primer/Probe (赤) の増幅曲線が501N Wild type Primer/Probe (青) の増幅曲線より早期に立ち上がったため、N501Y変異ありと判断できた。
 また、E484E Wild type Primer/Probe (青) の増幅曲線がE484K Mutant type Primer/Probe (赤) の増幅曲線より早期に立ち上がったため、E484K変異なしと判断できた。

※ベータ型の変異株、ガンマ型の変異株など、他の変異株の測定データは当社HPをご覧ください。
https://labchem-wako.fujifilm.com/jp/sars_cov_2/mutation/index.html
 アルファ型 (B.1.1.7)：イギリスで最初に検出された変異株
 ベータ型 (B.1.351)：南アフリカで最初に検出された変異株
 ガンマ型 (P.1)：ブラジルで最初に検出された変異株

〈ご使用前に〉

必ず従来(非変異)型検出用のWild Type Primer/Probeと変異型検出用のMutant Type Primer/Probeの両方で検出して下さい。
 両方のCt値を比較し、変異型検出用のMutant Type Primer/ProbeのCt値が小さければ、ウイルスは変異株であると判断します。

コード No.	品名	規格	容量	希望納入価格(円)
NEW 283-35703	SARS-CoV-2 N501Y Mutation Detection Kit	F ^o	20反応用	20,000
NEW 287-35701	SARS-CoV-2 N501Y Mutation Detection Kit	F ^o	200反応用	80,000
NEW 287-35603	SARS-CoV-2 E484K Mutation Detection Kit	F ^o	20反応用	20,000
NEW 281-35601	SARS-CoV-2 E484K Mutation Detection Kit	F ^o	200反応用	80,000
NEW 283-36303	SARS-CoV-2 L452R Mutation Detection Kit	F ^o	20反応用	20,000
NEW 287-36301	SARS-CoV-2 L452R Mutation Detection Kit	F ^o	200反応用	80,000
NEW 289-36403	SARS-CoV-2 E484Q Mutation Detection Kit	F ^o	20反応用	20,000
NEW 283-36401	SARS-CoV-2 E484Q Mutation Detection Kit	F ^o	200反応用	80,000

R₁…2～10℃保存 F…20℃保存 C₈₀…80℃保存 C₁₅₀…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 薬…劇薬 危…危険物 精…向精神薬 麻…特定麻薬向精神薬原料
化…化学法第一種特定化学物質 化…化学法第二種特定化学物質 化…化学兵器禁止法第一種指定物質 化…化学兵器禁止法第二種指定物質 カ…カルタヘナ法
覚…覚せい剤取締法 保…国民保護法
 掲載内容は、2021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、当社HP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。

和光純薬時報 Vol. 89 No. 3
 2021年7月15日発行
 発行責任者 岡本訓明
 編集責任者 門 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://fujifilm.com/ffwk>
 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-jiho@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