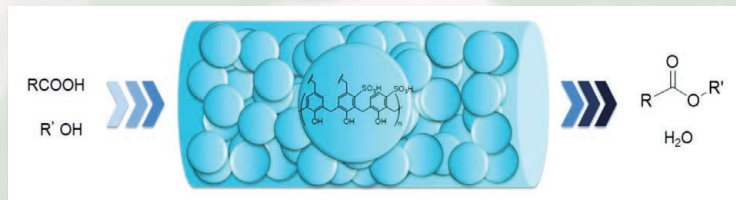


和光純薬時報

April 2022
Vol.90 No.2



【総説】

「バッチならびにフロー式 Fischer-Speier エステル化に適用可能な高分子酸触媒 PAFR II」
山田 陽一、間瀬 俊明、魚住 泰広…………… 2

「歯科用接着系材料の概略」
坂本 猛…………… 5

「細胞外小胞の臨床プロテオミクス解析 -血液を巡る細胞外小胞の多検体自動精製技術の開発-」 村岡 賢、足立 淳…………… 8

「超高純度ヒト骨髄由来間葉系幹細胞 REC」
陶山 隆史、松崎 有未…………… 11

〈テクニカルレポート〉

「遺伝子組換えタンパク質を用いたエンドトキシン測定試薬」
福地 大樹…………… 14

【連載】

〈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—〉 **最終回**

「第4回 半導体製造にかかわる薬品の微量金属（不純物）の影響とその分析方法」
河田 幸寿…………… 16

〈よくわかる BDNF—基礎から臨床まで—〉

「第4回 BDNF/TrkB シグナル もう一つの顔」
安達 直樹…………… 18

〈ヒト iPS 細胞由来分化細胞の創薬応用〉 **最終回**

「第4回 ヒト iPS 細胞由来神経細胞における神経回路機能評価法の構築の試み」
馬場 敦…………… 22

【化学大家】

「アンリ・ベクレル」
中辻 慎一…………… 33

【製品紹介】

有機合成	培養
エステル化触媒「PAFR-II」…………… 4	超高純度ヒト間葉系幹細胞（REC）…………… 13
歯質接着性モノマー…………… 7	iCell® 神経細胞製品…………… 25
硫化物系固体電解質…………… 28	SCF溶液, ヒト, 組換え体…………… 32
分析	免疫
ICP分析用単元素標準液…………… 17	抗proBDNF, モノクローナル抗体（3C10H）…………… 21
食品分析用標準品…………… 26	レビス® Human MCP-1（CCL2）ELISA Kit…………… 29
局方試験用試薬…………… 26	タマビジン™ 2-REV, 組換え体, 溶液…………… 29
ポジティブリスト関連農薬標準品…………… 27	抗Arg1, ウサギ, 抗iNOS, ウサギ…………… 30
PFCs（PFOS, PFOA, PFHxS）試験用試薬…………… 28	蛍光標識 抗Iba1, ウサギ…………… 30
遺伝子	細胞生物
MagCapture™ エクソソームアイソレーションキットPS Ver.2…………… 10	アセチルCoA検出用蛍光プローブ「RH-NH ₂ 」…………… 31
精製EV用マイクロRNAエキストラクター®キット…………… 36	L A L
	パイロスター™ ネオ…………… 15
	機器
	CellVoyager™ CQ1…………… 25

【お知らせ】

農薬・動物用医薬品混合標準液検索のご案内…………… 27

動物細胞用培地カタログのご案内…………… 32

はじめに

有機合成反応の原子効率（生成物／原料）の向上とE-factor（廃棄物／原料）の低減は、有機化学やグリーンケミストリーだけでなく、産業応用においても重要なファクターである。脱水反応は最も基本的な反応の一つであり、理想的な触媒を用いた脱水反応では水が唯一の副生成物となるため、生合成・化学合成のいずれにおいても頻繁に利用されている。具体的には、カルボン酸とアルコールを反応させてエステルを得るFischer-Speierエステル化反応¹⁾が、油、香水、医薬品、化粧品、塗料、接着剤、樹脂、溶剤などの製造に工業規模で実施されている。高活性で再利用可能な触媒を用い、脱水剤を使用せず、無溶媒の条件でエステル化ができれば、より安全で経済的な工業規模の合成経路を提供することができる。この反応は、カルボン酸とアルコールが反応することでエステルと水が生成する平衡反応である。高収率で生成物を得るためには平衡を傾けるための方法を考える必要がある。今までに様々なエステル化触媒が報告されているものの、触媒量や使用するアルコール量、反応温度、水除去などの点でまだ発展途上の段階にある²⁾。

私たちのグループは、Fischer-Speierエステル化反応の不均一系触媒として、多孔質フェノールスルホン酸-ホルムアルデヒド樹脂(PAFR)を開発していた³⁾。この

触媒は、高い触媒活性（バッチ反応および連続フロー反応で触媒量0.7 mol%、最長4日間の運転時間）など、前述のエステル化反応の長所を満たしているが、触媒の再利用性は不十分だった。連続フロー反応では、4日間で触媒が失活した。そこで、水の除去を必要とせず、より安定で高活性、再利用可能かつ実用性を兼ね備えたFischer-Speierエステル化用高分子酸触媒を開発した。

第一世代PAFRが失活した理由は、*p*-フェノールスルホン酸の脱スルホン化が、高温の酸性反応条件下で容易に起こるためである（図1）。この脱スルホン化反応を防ぐために、我々は新規な*m*-フェノールスルホン酸樹脂触媒PAFR IIを設計した⁴⁾。ここでは、より活性が高く、再利用可能な第二世代*m*-フェノールスルホン酸-ホルムアルデヒド樹脂触媒(PAFR II)を開発し、バッチおよび連続フロー条件を考慮してFischer-Speierエステル化反応に適用した結果を紹介する。PAFR IIは、連続フロー条件下で、市販のイオン交換型スルホン酸樹脂触媒よりも高いエステル収率を示すことが明らかになった。

凝集体が多量に生成した。24 時間後温度を下げた。得られた固体を、水、塩酸水溶液、水、2-プロパノール、メタノールで順次洗浄した。真空乾燥後、黒色石炭状固体としてPAFR IIが得られた。

この手順により、機械攪拌式タンクリアクターを用いて、87グラムまでのPAFR IIの調製を実現した。また、元素分析により触媒の再現性を確認したところ、異なる反応スケールで得られた触媒の硫黄含有量は11±0.8 wt%の範囲で再現性があることがわかった。PAFR IIの表面画像を走査型電子顕微鏡（SEM）で観察した。粉碎されたPAFR IIは、比較的均一な粒子径を持つ平坦な鉱石状の凝集体を示した。SEM上のエネルギー分散型X線（EDX）分光分析（EDX/SEM）では、高分子マトリックス上に硫黄原子が均一に分散しており、ナトリウムは検出されなかった。

PAFRとPAFR IIの熱安定性を比較するために、熱重量測定/質量分析（TG-MS）を行った。スルホン酸基の分解は、触媒が不活性化したことを示す直接的な証拠である。両PAFR触媒のスルホン酸基の分解に対応するピークを確認すると、PAFR IIが、分解温度130 °CのPAFRよりもはるかに安定している（分解温度180 °C）ことが明らかになった。

触媒調製

PAFR IIは、硫酸水溶液中で*m*-フェノールスルホン酸ナトリウムとホルムアルデヒド（2 mol equiv）を120 °C（オイルバス温度）、24 時間縮合重合して調製された（図2）。溶液の色は徐々に薄くなり、重合中に暗緑色から黒色の石炭状の固体

PAFRとPAFR IIのバッチ反応での比較

バッチ反応によるアクリル酸とメタノールの直接エステル化において、2つの触媒の再利用性を確認したところ、PAFR IIの方がPAFRよりも安定であることが裏付

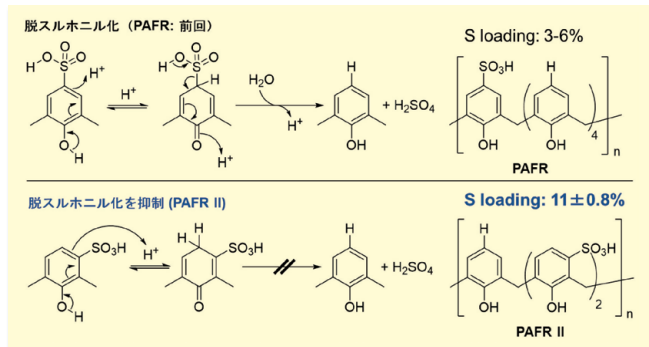


図1. PAFRの脱スルホン化による分解とその抑制のための触媒設計 (PAFR II)

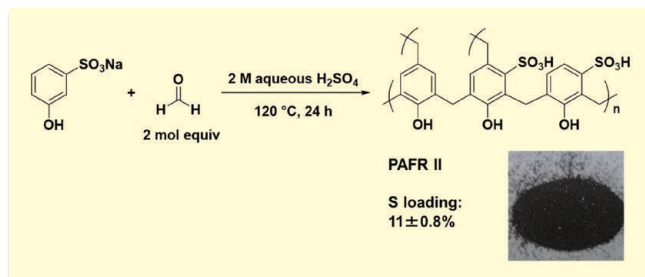


図2. PAFR IIの調製

けられた (図3)。0.5 mol%の触媒を同一の反応条件で試験したところ、最初の反応サイクルでは同様の触媒活性を示し、アクリル酸メチルがそれぞれ83%(PAFR)および86%(PAFR II)の収率で得られた。触媒は回収され、前回の反応条件で次の反応サイクルに再利用された。PAFR IIは触媒活性を失うことなく9回再利用できたのに対し、PAFRの再利用性は徐々に低下した。

フロー式エステル化での様々な固体触媒とPAFR IIとの比較

高活性で安定した不均一系高分子酸触媒PAFR IIが得られたので、次の段階は、連続フローでのFischer-Speierエステル化反応⁵⁾を実現することだった。PAFR IIをはじめ、市販の様々な不均一

系酸触媒の触媒活性を、水を除去することなく反応温度90℃で比較した (図4)。アクリル酸とエタノール (2 mol equiv) の混合物を、1.1 mmol SO₃HのPAFR IIまたは他の様々な触媒を充填した触媒充填カラムに、25 μL/minの流速で通液した。PAFR IIは、DIAION SK104H (収率76%)、DIAION PK208 (収率74%)、Dowex 50Wx2 (収率76%)、Amberlyst 16 wet (収率70%) および Amberlyst 15 dry (収率57%) などの他の触媒に比べ高い収率でアクリル酸エチルを与えた (収率95%)。

バッチ式・フロー式エステル化での基質一般性

PAFR IIが高い触媒活性を示したため、フロー式およびバッチ式の両条件で、

様々なカルボン酸とアルコールの直接エステル化について検討した (図5)。連続フロー反応系の模式図を示す。アクリル樹脂は需要が高く、プレキシガラスなどの建築材料や装飾材料として建築業界で広く使用されている。フロー式の条件において、水の除去をすることなく、90℃で98%という高い収率でアクリレートエステル生成物が得られた。また、脂肪酸エステルも高収率で生成した。末端オレフィン結合を有するエステル、例えば酢酸アリルは80%以上の収率で、酢酸3-フェニルプロピルは77%で得られた。多くの連続フロー反応では、バッチ反応よりも高い生成物収率が得られた。連続フロー反応では、生成したエステルとともに水が生成したが、凝集して水滴となった。

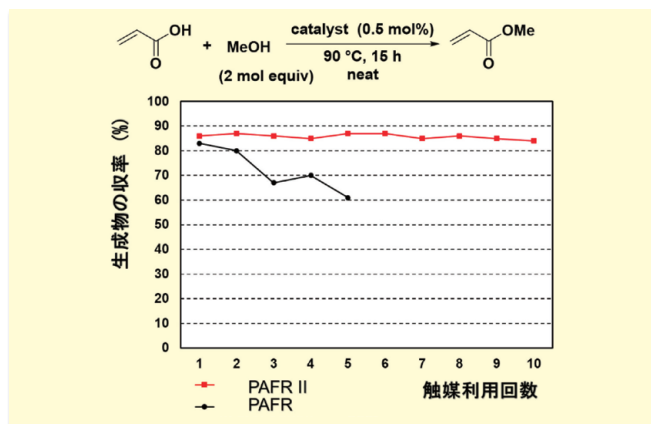


図3. PAFRとPAFR IIのバッチ式反応での再利用性

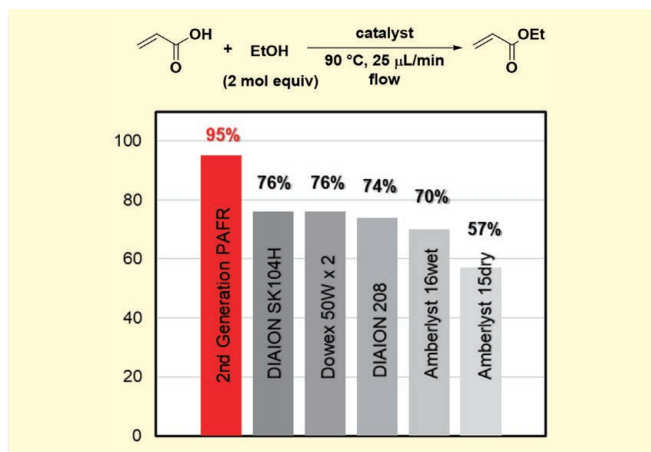


図4. フロー式エステル化での触媒活性の比較

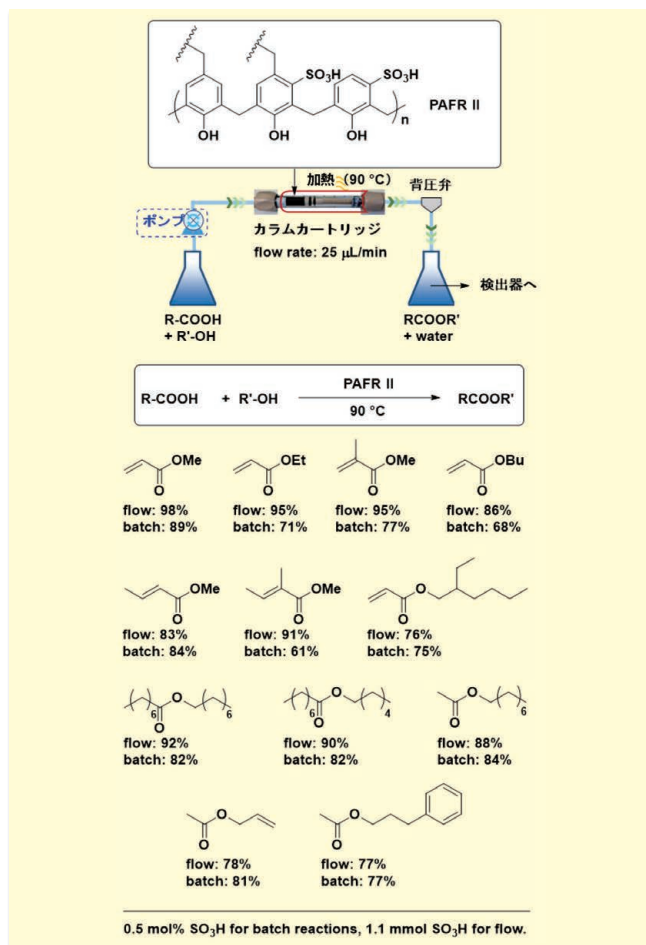


図5. バッチ・フロー式での基質一般性

フロー式バイオディーゼル燃料合成への応用

オレイン酸とリノール酸を主成分とするバイオマスをバイオディーゼルに変換するモデル反応にもPAFR IIを適用した(図6)。連続フローによる直接エステル化は、リサイクル食用油からバイオディーゼルの製造するための有力なルートとなり得る。この用途では、固体酸触媒は、過剰なアルコールや大きな触媒負荷のために、うまく機能しないことが報告されている。PAFR IIによるバッチ反応条件下では、オレイン酸およびリノール酸は、それぞれ82%および90%の収率で対応するエステルに変換された。また、連続フローエステル化では、オレイン酸は2週間以上にわたって92%から94%の変換率が得られ、リ

ノール酸は1週間にわたり90%の変換率が得られた。これらの結果は、この第二世代PAFR触媒を用いたバイオディーゼル生産プロセス応用の可能性を示すものであった。

終わりに

第一世代PAFRよりもスルホン酸含有量が高く、熱安定性に優れた第二世代メタフェノールスルホン酸-ホルムアルデヒド樹脂触媒PAFR IIが開発された。より大きなスケールで調製しても、触媒活性や触媒反応温度での安定性に悪影響はなかった。この触媒はカルボン酸とアルコールの直接エステル化を連続フローとバッチ処理の両方で促進し、対応するエステルを高収率で与えた。また、PAFR IIを充填したフローリアクターでは、触媒活性を

失うことなく数ヶ月間基質を変換した。現在、さらなるエステル化の可能性、ならびに様々な酸触媒促進型有機変換反応への適用を進めている。

謝辞

PAFR II開発研究は多くの共同研究者とともに実施された。理化学研究所のHao Hu博士、太田元氏、Heeyoel Baek博士、篠原賢太氏、大野綾氏に深謝申し上げます。これら一連の研究の一部はJST ACT-C (#JPMJCR12ZC)、JST ACCEL (#JPMJAC1401)、AMED (#19ak0101115h)、日本学術振興会(#24550126, #20655035, #15K05510)、武田科学振興財団、内藤記念財団、公益信託医用薬物研究奨励富岳基金、理化学研究所のご支援により進められたものである。心より御礼申し上げます次第である。

【参考文献】

- 1) Fischer, E. and Speier, A. : *Chem. Ber.*, **28**, 3252 (1895).
- 2) 最近の優れた例については以下の論文を参考にされたい。(a) Ishihara, K. *et al.* : *Science*, **290**, 1140 (2000). (b) Manabe, K. *et al.* : *J. Am. Chem. Soc.*, **123**, 10101 (2001). (c) Sakakura, A. *et al.* : *Org. Lett.*, **14**, 30 (2012). (d) Pirez, C. *et al.* : *ACS Catal.*, **2**, 1607 (2012). (e) Xu, X-H. *et al.* : *RSC Adv.*, **3**, 3848 (2013).
- 3) (a) Minakawa, M. *et al.* : *Org. Lett.*, **15**, 5798 (2013). (b) Baek, H. *et al.* : *Sci. Rep.*, **6**, 25925 (2016). (c) Kim, Y-H. *et al.* : *Synlett*, **27**, 29 (2016).
- 4) Hu, H. *et al.* : *Org. Lett.*, **22**, 160 (2020).
- 5) Furuta, A. *et al.* : *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **90**, 607 (2017).

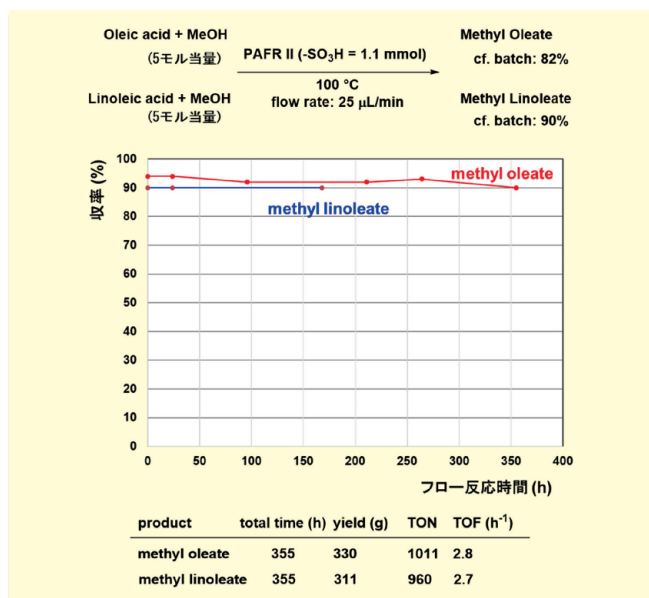


図6. フロー式連続エステル化によるバイオディーゼル燃料の合成

メタ位がポイント!! フェノールスルホン酸エステル化触媒

PAFR-II

本品は、フロー反応及びバッチ反応に使用できる「エステル化」に有効な固体酸触媒です。

コード No.	品名	規格	容量	希望納入価格(円)
162-28971	PAFR-II	有機合成用	1g	23,000
168-28973	[<i>m</i> -Phenolsulfonic Acid-Formaldehyde Resin]		5g	80,000

Wako



詳細はこちら

☐: 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、2022年4月時点での情報です。最新情報は、当社HPをご参照下さい。

はじめに

歯科用接着系材料とは、歯質と修復物や補綴物を接着するための材料である。歯が虫歯になったとき、虫歯になった部分を削り、修復物あるいは補綴物といわれる「詰め物」をする。このような物質は、貴金属または非貴金属の合金、セラミックスや有機-無機複合体から構成されており、それら自体には接着性はない。

特に、充填材（フィラー）を含む歯科用有機材料の特徴として、金属冠の装着とは異なり、虫歯の部分のみの最低限の切削で、修復を行うことができるため21世紀になって提唱されたMI（Minimal Intervention）治療のコンセプトに合致した材料として普及した。また、高分子材料は色調が調整しやすいので、有機材料が現在では歯科医院での虫歯治療の主な手法の1つとなっている¹⁾（図1）。

このような接着性のない修復物には、専用の接着材が必要であり¹⁾、歯科用接着系材料はこれらの多様な材質に対して、十分な接着性が求められる。さらに、口腔内は、常に唾液による湿った環境で、歯質や修復物は咬合や咀嚼のような強い荷重にさらされており、かつ摂食により急激な酸性度や温度変化にも暴露されている環境であるので、このような過酷な接着環境に対して長期に耐えなければならない。

歯科用接着系材料には、接着材と接着性レジンセメントがあり、成分は共

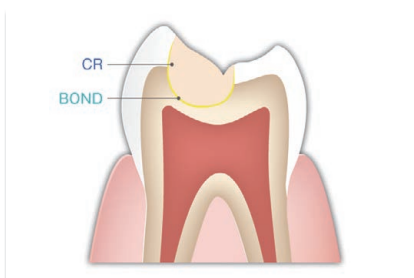


図1. 天然歯の構造とコンポジット修復の模式図

通する部分が多いが、用途は多少異なる。前者は、虫歯を切削などで取り除いた後、その空隙を修復する際に、修復用充填材（コンポジットレジン）の充填前に歯質にあらかじめ塗布して光により予備的に硬化させて充填材により硬化させて充填を完了する（図2）。後者は、歯冠（クラウン）などの補綴物と虫歯除去後、形状を調整した歯質と接着し、かつ両者の間隙を充たしながら装着させるために使用する。

歯科用接着材について

接着材を構成する材料は、メタクリレートモノマー、添加剤（開始剤など）、増粘剤（ヒュームドシリカなどの無機物）と溶媒である。このような接着系材料は可視光あるいは化学的反応で開始するラジカル重合を用いて硬化させ、光重合では可視光によって硬化させることが歯科特有の技術であ

る。また、光増感剤としてカンファーキノンが代表的である。モノマーは、近年アクリルアミドを用いる製品もあるが、ほとんどメタクリレートであり、複数の機能性モノマーが用いられている²⁾。

歯科用接着材の歯質に対する接着機構は、脱灰（エッチング）、浸透（プライミング）と硬化（ボンディング）からなる（図3）。脱灰とは、歯質の表面を化学的に削ることである。ヒドロキシapatiteのカルシウム分が、接着材の酸性成分によって処理されることで、表面が部分的に溶かされ粗造化される。脱灰過程はエナメル質と象牙質では多少異なる。エナメル質が95%以上無機質（ヒドロキシapatite）から構成されているのに対して、象牙質では、約20%の有機物を含み、その60%程度がコラーゲン線維である²⁾。

したがって、象牙質は脱灰を受けるとコラーゲン線維が海綿状に露出す



図2. 1液性歯科用接着材の使用手順

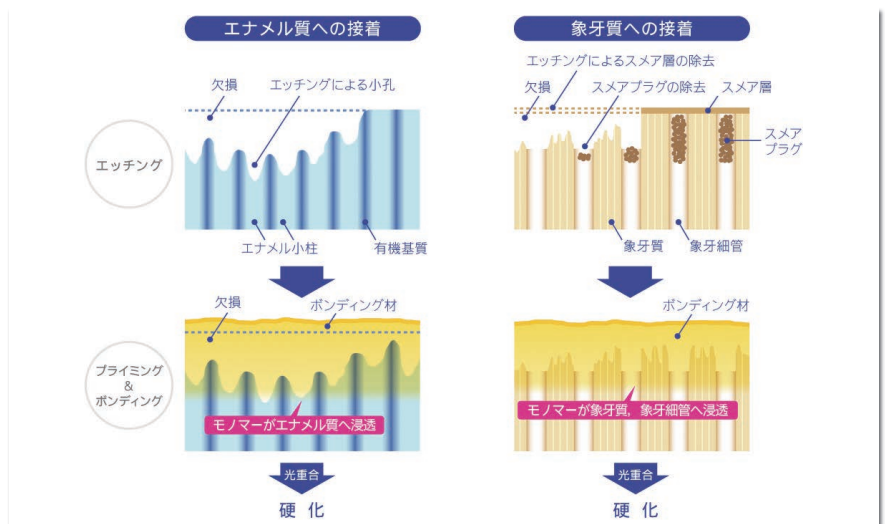


図3. 歯質に対する接着機構

る。一般に象牙質の方が脱灰を受けやすく、過度に脱灰が進むとコラーゲン線維が収縮するので、接着材成分が浸透しにくくなり、接着力低下の要因となる。浸透とは、粗造化された表面に対して接着材成分が浸透することであり、ボンディングでは浸透したモノマーが光によって硬化することによって接着の工程が完結する。

接着材の技術的変遷では、接着の過程ごとに3液性であったものから2液性や1液性へ移行しているが、これは接着工程における簡便性やテクニカルエラーを追求した結果である。ただし、操作の簡便性の追求と接着耐久性のバランスが求められ、2液性は接着耐久性において1液性よりも臨床的に信頼が高いというように、それぞれ利点と欠点が相補的である²⁾。理想的には、簡単な手順で、どのような条件でも、多様な接着対象に対して再現性よく接着できることであるが、この課題解決は非常に難しい。

構成する成分とは？

接着材は、複数のモノマーが用いられ、それらの機能性に応じて使い分けられる。例えば、歯質に対するエッチングを行い、その後ポリマーのネットワークに取り込まれる接着性モノマーと呼ばれる酸モノマー、硬化した接着材の物理的な強度を保つための複数のメタクリレート基をもつ架橋性モノマー

(ジメタクリレート)あるいは接着材成分の接着対象への浸透やぬれ拡がりを担う低粘度のモノマーなどがある²⁾(図4)。

特に、接着性モノマーは、1液性接着材の発展に大きく貢献したモノマーであり(図5)、酸性基がリン酸であるMDPが代表的であり、歯科用接着材としてのMDPに関する科学的蓄積の実績が多くある³⁾。

また、酸性基がジカルボン酸である4-METは、接着材に古くから用いられているモノマーであり^{2,3)}、接着材組成としては、その酸無水物である4-METAとして配合し、接着材組成内で加水分解させて用いられることが多い。4-METの機能は、リン酸モノマーよりも酸性度が低く、象牙質への作用を比較的温和にすることができることである(図5)。

近年、接着性モノマーとして開発したM-TEG-P[®]は、両親媒性であることが大きな特徴である。既存のリン酸モノマーは、水に対して不溶性であり、接着材は硬化する直前に溶媒を風乾させる。多くのモノマーは非水溶性なので、硬化する直前に成分が不均一になる課題があり、これが接着の不首尾につながる可能性がある。

M-TEG-P[®]は連結基部分をテトラエチレングリコール鎖にすることにより、リン酸モノマーが両親媒性となり、組成の分離を防ぐことができる。また、接着材のぬれ性の改善も期待で

きる(図5)。M-TEG-OHは、水酸基をもちM-TEG-P[®]の前駆体であるが、中性の両親媒性モノマーである。M-TEG-P[®]に比べ粘度が低く、相溶性が高いモノマーなので、反応性希釈剤に使用できる。また、水酸基をもつモノメタクリレートであり、ビルディングブロックとしても有用である。

レジンセメントとは？

レジンセメントは、歯科の発展において合着材に分類される。従来、自己接着性をもたず、材質の異なるいろいろな種類があり多岐にわたる。これらのうち、有機系のはメタクリレートが主流で、接着材の原料と共通するが用途は異なる。自己接着性はないため、接着材が必要である⁴⁾。

レジンセメントの分類の中で、接着性をもつものが2003年より登場し現在では多数の接着性レジンセメントが発売されている⁵⁾。これらは、接着性モノマーを含有し接着機構も接着材と同じであるが、溶媒を含まず脱灰は限定的である。

補綴物を装着時に使用するので、光照射で効果的に開始できないことを考慮して、2種類のペーストあるいは粉末を混和することによる酸化還元重合と併用する(Dual cure)。レジンセメントの課題は、接着材と同様に、接着力や接着耐久性の問題と操作性などがある。とくに接着耐久性に関しては、

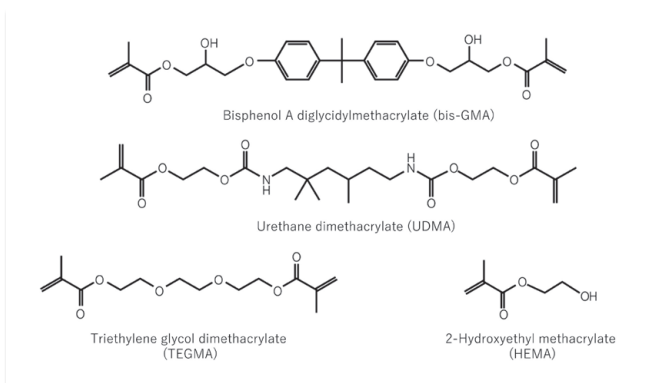


図4. 歯科で一般的なメタクリレート

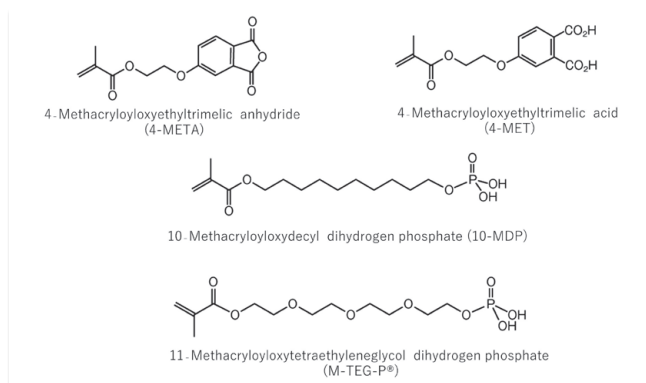


図5. 接着性モノマー

材料工学的試験結果と臨床結果との隔たりも指摘されている。

レジンセメントの組成は、接着材組成と比較して溶媒が省かれるが、接着剤と同様に無機フィラーを含み、その含有量は60重量%程度である。無機フィラーには、シリカ、アルミナ、ジルコニアなどの複合体が用いられるが、接着材（レジンセメント）層の構造を強固に保ち、重合収縮を低減するための成分である。

また、フィラーは、酸モノマーと併用する硬化の過程で中和にも作用し、組成物の初期は酸性であるが、中和が進み加水分解によるポリマーネットワークなど結合開裂防止に寄与し、材料の劣化を防ぐことに貢献する。

近年、工業用途で開発された特殊な形状の無機フィラーが注目されている。この粒子は2012年、多孔質の二酸化チタンナノ粒子を超高速で合成できる画期的な手法を開発したことによって生み出された^{6,7)}。この方法では、メタノールに原料のチタンイソプロポキシドと補助剤のカルボン酸を加え、約300～400℃に加熱するシンプルな手法で、合成時間はわずか10分と短時間である⁶⁾。さらにこの手法を用いて、内部が詰まった中実構造と内部が中空の構造を作り分けることにも成功し、得られたナノ粒子が日本の特別天然記念物、阿寒湖のマリモによく似た形をしていることから「MARIMO (Mesoporous Architected Roundly Integrated Metal Oxide)」

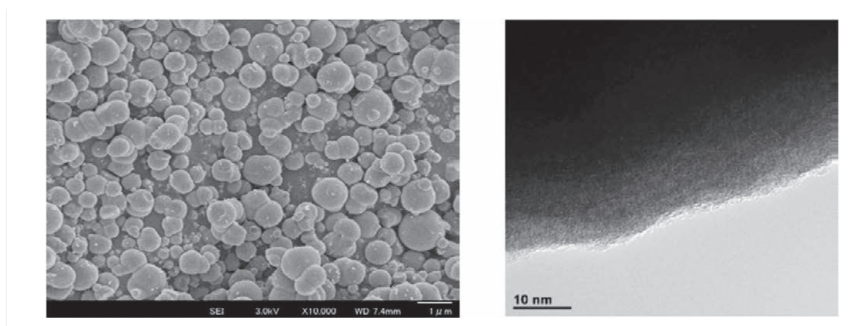


図6. 球状多孔質ジルコニア粒子 (左: SEM 右: TEM)

と名付けられ、応用研究が進められている (図6)。

この「MARIMO」のジルコニア粒子⁷⁾ (比表面積 300 m²/g) は、非多孔質ジルコニア (比表面積4～9 m²/g) と比較すると、「MARIMO」配合のレジンセメントの接着強さの向上に寄与することが明らかとなった。新規の歯科用レジンセメントに応用すると、簡便な操作 (光照射のみ) によって、強力に接着することができる。このような新規無機フィラーの応用は、歯科だけでなく他の分野での接着材料に対して、性能向上が期待できる。

ラーの形状、成分などを工夫して有機物と共同し、歯科接着の要求に耐える硬化物を形成することである。このような材料の応用によって、接着材を必要としないコンポジットレジン (0ステップ、修復材料) の実現の可能性が期待できる。

【参考文献】

- 1) Bart, V. M. *et al.* : *Dent. Mater.*, **24**, 1 (2005).
- 2) 坂本猛, 木村洋明, 大川内一成, 水田悠介, 林未季: 日本接着学会誌, **52**, 152 (2016).
- 3) Norbert, M., Ulrich, S. and Jörg, Z. : *Dent. Mater. J.*, **21**, 895 (2005).
- 4) Tomas, H. *et al.* : *Dent. Mater.*, **28**, 1183 (2012).
- 5) William, M. and Jack, L. F. : "Resin-based cements used in dentistry, Handbook of oral biomaterials", Pan Stanford Publishing Pte Ltd (2014).
- 6) Farkfun, D. *et al.* : *Chem. Commun.*, **53**, 6704 (2017).
- 7) Pengyu, W. *et al.* : *J. Supercrit. Fluids*, **80**, 71 (2013).

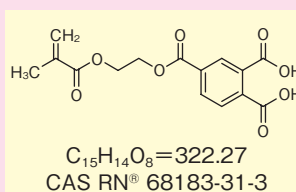
まとめ

歯科用接着系材料に関する課題は、簡便性と接着の信頼性を共存させることである。有機化合物には、良好なエッチング、化学的相互作用あるいは組織や構造への浸透性、重合性が望まれ、無機フィラーに関しては、強固で耐久性のある構造実現のために、フィ

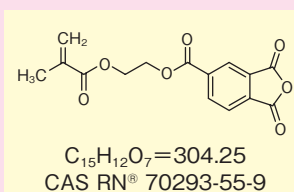
歯質接着性モノマー

Wako

コード No.	品名	規格	容量	希望納入価格 (円)
139-19051	4-MET	有機合成用	5g	35,000
136-19061	4-META	有機合成用	5g	30,000



4-MET



4-META

☐₂₀…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、2022年4月時点での情報です。最新情報は、当社HPをご参照下さい。

細胞外小胞の臨床プロテオミクス解析 —血液を巡る細胞外小胞の多検体自動精製技術の開発—

医薬基盤・健康・栄養研究所 プロテオームリサーチプロジェクト 村岡 賢、足立 淳

はじめに

近年、がん、神経疾患、心血管疾患、感染症など様々な医学研究分野において、細胞外小胞の研究が進められている。細胞外小胞は、タンパク質、核酸や脂質などを内包しており、これらの構成成分が細胞や疾患ごとに違いを示し、様々な機能を持ち疾患の病態変化に大きく影響を与えていることが知られている。そのため、血液などから採取した細胞外小胞は、病気の早期発見、モニタリング、薬効効果などのバイオマーカーを含むのではないかと期待されている。本稿では、筆者が現在までに行ってきた神経変性疾患における細胞外小胞の機能解析とバイオマーカー探索、大規模なプロテオミクス解析に向けた血液由来細胞外小胞の多検体自動精製技術について紹介する。

細胞外小胞

細胞外小胞は、様々な組織、細胞により分泌される脂質二重膜で囲まれた膜小胞の総称であり、分泌経路、生合成、サイズの違いから、多胞体と細胞膜が融合し細胞外へ分泌されるエクソソーム (40-200nm)、細胞膜から直接出芽し細胞外へ分泌されるマイクロベシクル (200-1000nm)、アポトーシスを起こした細胞から分泌されるアポトーシス小胞 (1000-5000nm) に分類されている。細胞外小胞は血液、尿、唾液、脳脊髄液などの体液中で観察され、様々なタンパク質、核酸、脂質などが含まれており、細胞間の情報伝達に重要であることが報告されている¹⁾。近年、悪性腫瘍、炎症性疾患や神経疾患などの疾患との関連性が数多く報告されており、疾患の診断、予後予測のバイオマーカー探索、治療への応用研究に期待が集まっている²⁾。また、血液中の細胞外小胞を用いた診断は、低

侵襲的であることから継続的な観察において患者の負担が軽減され、疾患の変化を捉えることができるため開発が急がれている。

神経変性疾患における細胞外小胞

加齢にともないリスクが高くなる神経変性疾患は、高齢化が進む日本において、目を背けることができない疾患の一つとなっている。アルツハイマー病、筋萎縮性側索硬化症、パーキンソン病を含む神経変性疾患における細胞外小胞の役割についての研究は、ここ10年ほどで目覚ましい進展が見られた。2006年にRajendranらによりアルツハイマー疾患の原因因子の一つであるアミロイドベータが細胞外小胞の内外に存在すること、細胞外小胞の特異的タンパク質であるALIXがアルツハイマー患者の脳内のアミロイド斑に存

在することが報告された³⁾。2012年にはSamanらによってもう一つの原因因子であるタウタンパク質の過剰発現細胞由来の細胞外小胞にタウタンパク質が内包されていることが確認された⁴⁾。筆者は、アルツハイマー病疾患の脳組織由来の細胞外小胞に内包されているタウタンパク質は、凝集体の形成に重要であるSerine396のリン酸化 (pS396 tau) が確認され、コントロール群と比較して有意に上昇していることを見出した (図1a, b)⁵⁾。更には、それらのタウタンパク質はオリゴマーを形成した状態で細胞外小胞に内包されていることが確認され、マウス、細胞の実験でタウの凝集、伝播のためのseed (種) として細胞外小胞と共に重要な機能を持つことを報告した⁶⁾。また、アルツハイマー病の脳組織由来 (スクロース濃度勾配遠心法)、脳脊髄液由来 (MagCapture™ Exosome Isolation Kit PS; 富士フイルム和光純薬、293-

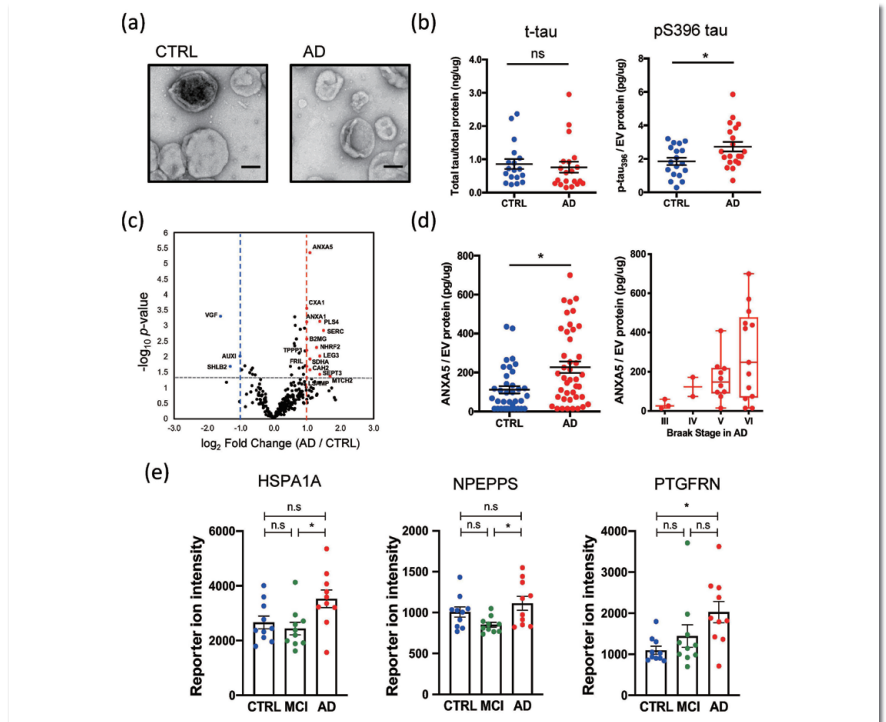


図1. 神経変性疾患における細胞外小胞の機能とバイオマーカー開発

(a) 透過型電子顕微鏡による細胞外小胞 (b) 細胞外小胞の内外に存在するタウ、リン酸化タウ (c) プロテオーム解析によるタンパク質の発現比較 (d) アルツハイマー疾患脳組織由来細胞外小胞のANXA5の発現上昇 (e) 脳脊髄液由来細胞外小胞のバイオマーカー候補タンパク質
CTRL: 健康者 MCI: 軽度認知障害 AD: アルツハイマー認知症 * : p<0.05

77601) の細胞外小胞のプロテオミクス解析により ANXA5、PTGFRN がコントロール群と比較して発現が上昇していることを示した(図1c, d, e)^{5,7)}。脳髄液は疾患をモニタリングするには最適であるが、脳髄液をその都度採取するのは患者への負担が大きく、侵襲性が低い血液による検査が望まれている。そこで筆者らは、多検体の血液サンプルの細胞外小胞を用いて候補タンパク質を解析、評価することを考え、多検体の処理が可能でかつ、人為的ブレをなくすために、体液由来の細胞外小胞を自動精製可能な技術開発を行った。

血清・血漿由来細胞外小胞の自動精製技術開発

細胞外小胞が体液中に多数含まれており、由来する細胞の変化を包含していると考えられることから、大規模な臨床検体を用いた細胞外小胞のタンパク質の網羅的プロテオミクス解析が盛んに行われている。血液から細胞外小胞を濃縮する方法は、遠心を組み合わせる方法や、平衡密度勾配遠心法、サイズ排除クロマトグラフィー法、親和性を利用した精製法など数多くの方法が報告されている⁸⁾。細胞外小胞を単離する方法によって、単離される細胞外小胞は異なり、また、夾雑物が含まれる割合も異なることから、純度の高い細胞外小胞の精製方法、及び精製方法の標準化も必要となっている。その中でも細胞外小胞のホスファチジルセリンと高い親和性を示す Tim4 タンパク質を介して精製する方法は、他の方法と比較しても夾雑物を最小限に抑制して高純度に濃縮することができる^{9,10)}。細胞外小胞を高純度で精製、濃縮することは、タンパク質のダイナミックレンジを低くすることができ、プロテオミクス解析において微量なタンパク質の同定・定量を可能とする。また、大規模な臨床検体をプロ

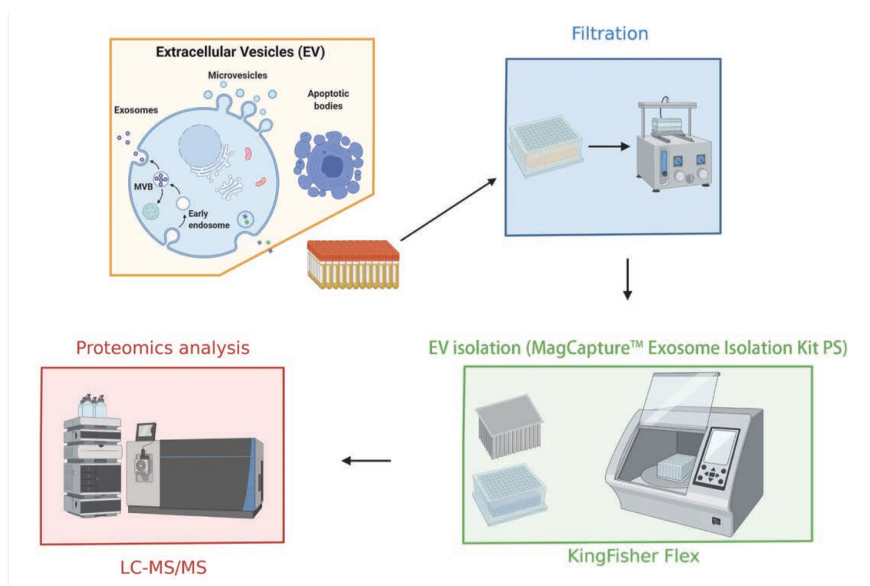


図2. MagCapture™ Exosome Isolation Kit PS を用いた細胞外小胞の自動精製技術開発

テオミクス解析するためには、再現性高く精製するシステムの開発が重要となる。筆者らは、96検体の血清、血漿を96ウェルプレート用加圧送液プロセッサにより filtration の前処理を行い、KingFisher Flex 向けにアレンジした MagCapture™ Exosome Isolation Kit PS により 96検体を一度

に精製する自動精製技術の開発に成功した(図2)。

血清・血漿細胞外小胞のプロテオミクス解析

筆者らは、自動精製技術により精製した細胞外小胞の網羅的プロテオミク

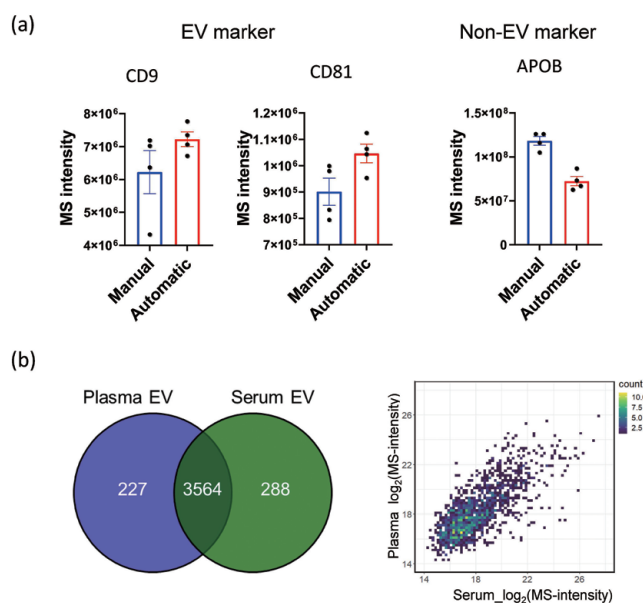


図3. 自動精製した血清、血漿由来細胞外小胞のプロテオミクス解析 (a) 手動・自動精製した細胞外小胞のマーカー比較 (b) 血清、血漿由来細胞外小胞のプロテオーム解析の結果

ス解析を行ったところ、手動精製と比較して自動精製技術では、サンプル間のブレを低く抑えられること、細胞外小胞マーカーのイオン強度が上昇する一方で、血液タンパク質であるアポリポ蛋白Bのイオン強度が大幅に減少していることを確認した(図3a)。臨床検体を用いた解析では、細胞外小胞マーカーを含む4079種類のタンパク質の同定に成功し、血清、血漿由来の細胞外小胞にはいくつかのタンパク質で定量値に大きな違いが見られた(図3b)¹¹⁾。評価するタンパク質において血清、血漿のどちらを選択すべきか目的に応じて議論が必要である。現在は、自動精製技術を用いて、大規模な臨床検体のプロテオミクス解析を行っており、脳組織由来の細胞外小胞特異的マーカータンパク質候補の同定に成功している¹¹⁾。

を含む体液中でがん、変性疾患、感染症などの検出やモニタリングができること期待される検査方法であり、細胞外小胞のリキッドバイオプシーへの応用が期待されており、研究開発が益々盛んになることが予測される。血液の細胞外小胞のプロテオミクス解析は、マーカーの探索だけではなく病態の機能解明にも役立つことが期待され、大規模な臨床検体を解析することは非常に重要となる。我々が開発した自動精製技術は一度に多検体処理が可能であり、再現性に優れ、血液中のタンパク質のコンタミネーションも抑えることが確認されている。さらに、現在はプロテオミクス解析のための前処理の自動化にも成功しており(論文投稿中)、疾患のバイオマーカー探索、診断キットの開発に大きく貢献することが期待される。

は、ボストン大学(現Mayo clinic)の池津庸哉先生の下で行った研究であり、細胞外小胞の自動化精製については富士フイルム和光純薬株式会社の協力の下医薬基盤研究所にて進められたものである。この場を借りて、心からお礼申し上げます。

【参考文献】

- 1) Kowal, J. et al. : *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **113**, E968 (2016).
- 2) Shiromizu, T. et al. : *Sci. Rep.*, **7**, 12782 (2017).
- 3) Rajendran, L. et al. : *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **103**, 11172 (2006).
- 4) Saman, S. et al. : *J. Biol. Chem.*, **287**, 3842 (2012).
- 5) Muraoka, S. et al. : *Alzheimers Dement.*, **16**, 896 (2020).
- 6) Ruan, Z. et al. : *Brain*, **21**, 72 (2020).
- 7) Muraoka, S. et al. : *Cells*, **9**, 1959 (2020).
- 8) Li, P. et al. : *Theranostics*, **7**, 789 (2017).
- 9) Nakai, W. et al. : *Sci. Rep.*, **6**, 33935 (2016).
- 10) Muraoka, S. et al. : *Methods*, **177**, 35 (2020).
- 11) Muraoka, S. et al. : *iScience*, (2022) in press, DOI 10.1016/j.isci.2022.104012

おわりに

リキッドバイオプシーは、血液や尿

謝辞

神経変性疾患の細胞外小胞の研究

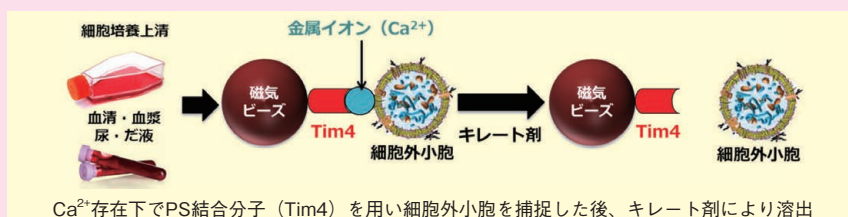
エクソソーム抽出・精製試薬

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、当社独自の精製法「PSアフィニティー法」を採用したエクソソーム抽出・精製試薬です。

PSアフィニティー法の原理



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

本品を使用したエクソソーム多検体精製受託サービスも開始しました。

詳細は当社HPまたは担当営業にお問合せ下さい。

関連製品

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

※本品は在庫がなくなり次第、終売となります。

☐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、2022年4月時点での情報です。最新情報は、当社HPをご参照下さい。

超高純度ヒト骨髄由来間葉系幹細胞REC

島根大学 医学部 生命科学講座、PuREC 株式会社 陶山 隆史、松崎 有未

はじめに

間葉系幹細胞 (MSC) は、抽出した骨髄細胞から、MSCの培養皿への接着性を利用して比較的簡単な手順で分離することができ、主に*in vitro*で軟骨や骨への分化誘導を行い、その後、局所移植を行うなどの臨床研究が行われてきた。

近年、MSCはサイトカインなどの様々な体液性因子を産生し、T細胞や樹状細胞などの炎症細胞に作用して、強い免疫抑制・抗炎症作用を発揮することが報告されている¹⁾。この効果を利用して、ヒト骨髄由来のMSCは、移植片対宿主病 (GVHD) の再生医療製品として承認され、臨床現場で使用されている^{2,3)}。その他にも、低ホスファターゼ症⁴⁾、潰瘍性大腸炎やクローン病などの炎症性腸疾患⁵⁾、心筋梗塞、B型肝炎⁶⁾、糖尿病⁷⁾、全身性エリテマトーデス⁸⁾、進行多発性硬化症⁹⁾、脊髄損傷¹⁰⁾、変形性関節症¹¹⁾、乳がん保存療法後の乳房再建¹²⁾、筋ジストロフィー¹³⁾ など、幅広い疾患を対象とした臨床研究が進行中である (図1)。そのほとんどで、治療に必要な細胞数は1患者あたり1~10億個¹⁴⁾と設定されており、この場合、品質を維持したまま大量の細胞を培養する必要がある。

培養 MSC の性質と問題点

現在広く用いられているMSCの多くは、骨髄単核細胞を培養皿に播種し、2~3週間の培養後に出現する線維芽細胞様のコロニー形成細胞を回収して得られる (図2上段)。しかし、この方法で得られた接着性細胞集団 (以下、培養MSCと記載) には、分化能が低い、あるいは完全に失われた老化細胞や間葉系以外の血球その他の細胞が混入していることはよく知られており、我々が調べた限り、分化・増殖能を有する未分化細胞、つまり真の幹細胞

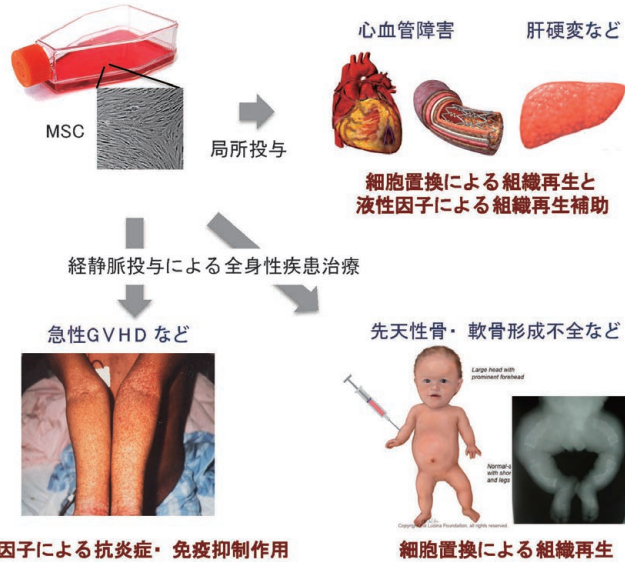


図1. 間葉系幹細胞が持つ機能と臨床応用

胞は1000細胞あたり1~3個という低い頻度でしか含まれていない¹⁵⁾。また、培養MSCは、増殖サイクル数が限られており、通常4~6回の継代で増殖能を失い、分化能も著しく低下する (以上、未発表データ)。また、継代中に細胞の性質に変化が生じ、骨髄では遊走性を維持していたMSCが培養中に遊走性を失ってしまうため、経静脈投与による全身疾患治療には適用できないことも報告されている^{16,17)}。

培養MSCが持つこれらの欠点は特に臨床応用の現場で大きな問題となりうる。すなわち、細胞集団の純度の低さは製造されたロット間での細胞機能の差となり、培養による細胞老化は大

量培養の制約となる。また遊走性の欠如は投与方法が限定される、などの困難が生じることが容易に予想できる。

超高純度間葉系幹細胞 REC の発見

これらの問題を解決するために、我々は接着培養に頼らずに骨髄細胞から直接MSCを分離する先行分離法を開発した (図2下段)。LNGFR (CD271) とTHY-1 (CD90) の2つの細胞表面タンパク質を指標に、セルソーターを用いて、LNGFRとTHY-1の共陽性細胞 (LT細胞) を直接分離することで、ヒト骨髄由来単核細胞からヒトMSCを

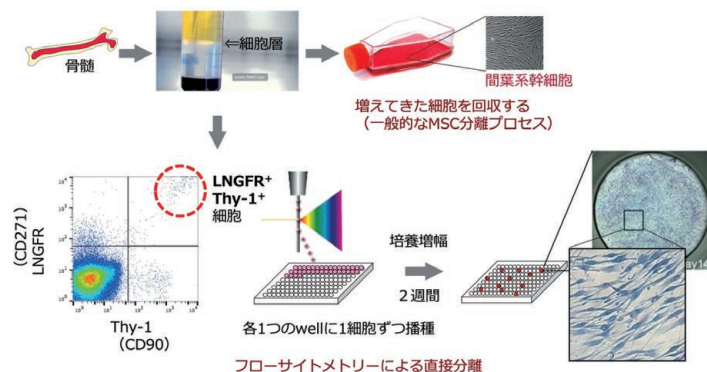


図2. 一般的な MSC 培養プロセスと超高純度ヒト間葉系幹細胞 (REC) の分離法

濃縮分離できることを報告した¹⁸⁾。LT細胞は、6個に1個という極めて高い頻度で線維芽細胞様のコロニーを形成する。計算上、全骨髓単核細胞の約3万倍にコロニー形成細胞が濃縮されている。

さらに、96ウェルプレートでLT細胞をシングルセルソーティングした後、各ウェルを個別に観察し、増殖が速く2週間後にはコンフルエントになったクローンをREC (Rapidly Expanding MSC Clone)、3週間後にコンフルエントになったクローンをMEC (Moderately Expanding MSC Clone)、さらに遅れてコンフルエントになったクローンをSEC (Slowly Expanding MSC Clone) と分類した(図3)。

これら3グループの細胞機能を詳細に解析した結果、RECはMECやSECに比べて、①細胞形態が小さく均一であること、②細胞老化の指標の一つであるSA-β-galで染色されない新鮮な細胞であること、③増殖期の指標であるKi67がほぼ全細胞で陽性であること、④10継代以上の長期培養が可能であること、⑤脂肪、骨、軟骨への高い分化能を保持していることなどがわかった。またRECの最も大きな特長として、⑥マウスに静脈内投与しても肺毛細血管に捕捉される細胞は見られず、遊走性を保持していた。

以上の結果から、RECは現在市販されている培養MSCと比較して、増殖能・分化能・遊走能全てにおいて高く、かつ形態的にも機能的にも均一性が高い細胞集団である。

おわりに

我々はこの超高純度ヒト骨髄由来間葉系幹細胞RECを臨床に応用すべく、2021年には低ホスファターゼ症に対する探索的治験を開始した。また、脊柱管狭窄症、変形性関節症などの疾患をターゲットとした非臨床および臨床研

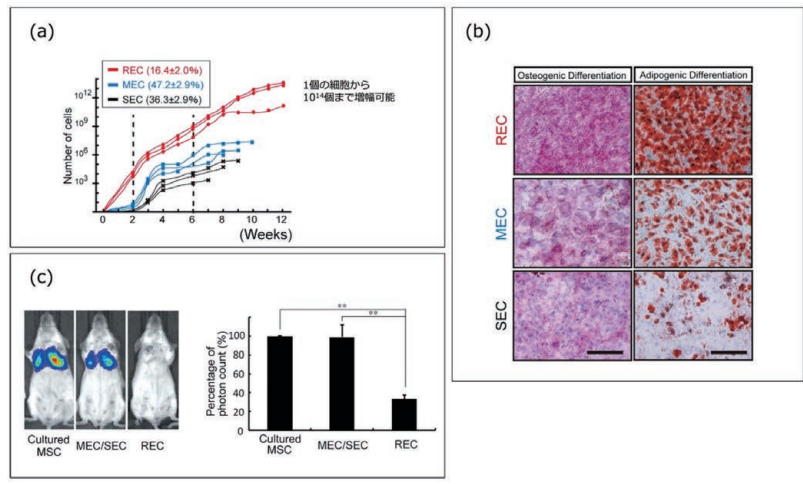
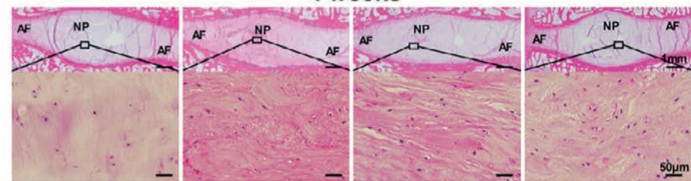
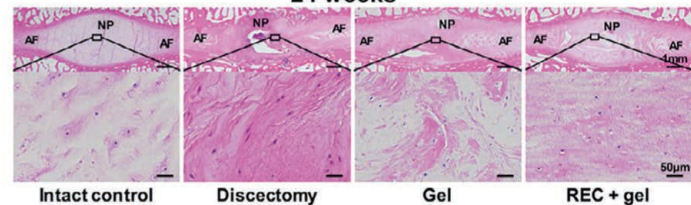


図3. 超高純度ヒト間葉系幹細胞 (REC) の特徴
(a) 増殖能 (b) 分化能 / 骨分化 (ALP 染色)、脂肪分化 (Oil Red O 染色)
(c) 遊走能 / マウスへの移植実験 (ルシフェラーゼによる発光イメージング解析)

a Hematoxylin and Eosin 4 weeks

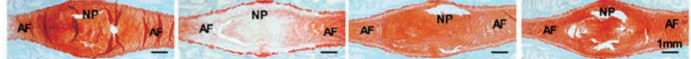


24 weeks

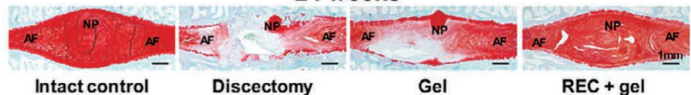


b Safranin-O

4 weeks



24 weeks



c

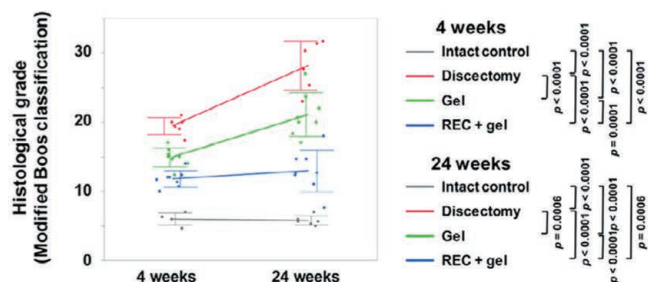


図4. REC を用いた椎間板ヘルニアモデル (ヒツジ) の治療効果
(a) HE 染色 (b) Safranin-O 染色 (c) Histological grade

究を現在進めている。特に大動物を用いたヘルニアモデルでは、RECとアルギン酸ナトリウムゲルの混合物を髄核摘出後の髄腔内に投与することで椎間板変性を効果的に予防できるなどの高い臨床効果を認めており¹⁹⁾、来年度中に探索的治験に入る予定である（図4）。

一般的な培養MSCが持つ全ての問題点をクリアしたRECはMSCによる治療効果が認められた全疾患をより効果的に治療できる可能性を秘めており、今後より多くの難治性疾患治療への展開が期待される。

【参考文献】

- Ghannam, S., Bouffi, C., Djouad, F., Jorgensen, C. and Noël, D. : *Stem Cell Res. Ther.*, **1** (1), 2 (2010).
- Muroi, K., Miyamura, K., Okada, M., Yamashita, T., Murata, M., Ishikawa, T., Uike, N., Hidaka, M., Kobayashi, R., Imamura, M., Tanaka, J., Ohashi, K., Taniguchi, S., Ikeda, T., Eto, T., Mori, M., Yamaoka, M. and Ozawa, K. : *Int. J. Hematol.*, **103** (2), 243 (2016).
- Miyamura, K. : *Int. J. Hematol.*, **103** (2), 155 (2016).
- Taketani, T., Oyama, C., Mihara, A., Tanabe, Y., Abe, M., Hirade, T., Yamamoto, S., Bo, R., Kanai, R., Tadenuma, T., Michibata, Y., Yamamoto, S., Hattori, M., Katsube, Y., Ohnishi, H., Sasao, M., Oda, Y., Hattori, K., Yuba, S., Ohgushi, H. and Yamaguchi, S. : *Cell Transplant.*, **24** (10), 1931 (2015).
- Otagiri, S., Ohnishi, S., Miura, A., Hayashi, H., Kumagai, I., Ito, Y. M., Katsurada, T., Nakamura, S., Okamoto, R., Yamahara, K., Cho, K. Y., Isoe, T., Sato, N. and Sakamoto, N. : *BMJ Open Gastroenterol.*, **5** (1), e000206 (2018).
- Volarevic, V., Markovic, B. S., Gazdic, M., Volarevic, A., Jovicic, N., Arsenijevic, N., Armstrong, L., Djonov, V., Lako, M. and Stojkovic, M. : *Int. J. Med. Sci.*, **15** (1), 36 (2018).
- Bhansali, A., Asokumar, P., Walia, R., Bhansali, S., Gupta, V., Jain, A., Sachdeva, N., Sharma, R. R., Marwaha, N. and Khandelwal, N. : *Cell Transplant.*, **23** (9), 1075 (2014).
- Sun, L., Wang, D., Liang, J., Zhang, H., Feng, X., Wang, H., Hua, B., Liu, B., Ye, S., Hu, X., Xu, W., Zeng, X., Hou, Y., Gilkeson, G. S., Silver, R. M., Lu, L. and Shi, S. : *Arthritis Rheum.*, **62** (8), 2467 (2010).
- Connick, P., Kolappan, M., Crawley, C., Webber, D. J., Patani, R., Michell, A. W., Du, M. Q., Luan, S. L., Altmann, D. R., Thompson, A. J., Compston, A., Scott, M. A., Miller, D. H. and Chandran, S. : *Lancet Neurol.*, **11** (2), 150 (2012).
- Pal, R., Venkataramana, N. K., Bansal, A., Balaraju, S., Jan, M., Chandra, R., Dixit, A., Rauthan, A., Murgod, U. and Totey, S. : *Cytotherapy*, **11** (7), 897 (2009).
- Koizumi, K., Ebina, K., Hart, D. A., Hirao, M., Noguchi, T., Sugita, N., Yasui, Y., Chijimatsu, R., Yoshikawa, H. and Nakamura, N. : *Osteoarthritis Cartilage*, **24** (8), 1413 (2016).
- O'Halloran, N., Courtney, D., Kerin, M. J. and Lowery, A. J. : *Breast Cancer (Auckl)*, **11**, 1178223417726777 (2017).
- Ichim, T. E., Alexandrescu, D. T., Solano, F., Lara, F., Campion, R. de N., Paris, E., Woods, E. J., Murphy, M. P., Dasanu, C. A., Patel, A. N., Marleau, A. M., Leal, A. and Riordan, N. H. : *Cell Immunol.*, **260** (2), 75 (2010).
- Galipeau, J. and Sensébé, L. : *Cell Stem Cell*, **22** (6), 824 (2018).
- Colter, D. C., Class, R., DiGirolamo, C. M. and Prockop, D. J. : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **97** (7), 3213 (2000).
- Rombouts, W. J. and Ploemacher, R. E. : *Leukemia*, **17** (1), 160 (2003).
- Morikawa, S., Mabuchi, Y., Kubota, Y., Nagai, Y., Niibe, K., Hiratsu, E., Suzuki, S., Miyauchi-Hara, C., Nagoshi, N., Sunabori, T., Shimmura, S., Miyawaki, A., Nakagawa, T., Suda, T., Okano, H. and Matsuzaki, Y. : *J. Exp. Med.*, **206** (11), 2483 (2009).
- Mabuchi, Y., Morikawa, S., Harada, S., Niibe, K., Suzuki, S., Renault-Mihara, F., Houlihan, D. D., Akazawa, C., Okano, H. and Matsuzaki, Y. : *Stem Cell Reports*, **1** (2), 152 (2013).
- Ukeba, D., Yamada, K., Suyama, T., Lebl, D. R., Tsujimoto, T., Nonoyama, T., Sugino, H., Iwasaki, N., Watanabe, M., Matsuzaki, Y. and Sudo, H. : *EBioMedicine*, **76**, 103845 (2022).

超高純度ヒト間葉系幹細胞 (REC)



超高純度ヒト間葉系幹細胞 (REC) は、フローサイトメトリーと選択的マーカーを用いた細胞分離方法により得られた間葉系幹細胞 (MSC) です。通常の接着法で得た間葉系幹細胞とは異なり、RECは一切の夾雑細胞を含まず、長期間の培養増幅が可能です。また、一定期間の培養後も分化・遊走能が維持されています。さらに凍結細胞として保存が可能で、いつでも研究に用いることができます。

▶ 間葉系幹細胞に求められる性質

- 増殖性：未分化性を失わずに自己増殖する機能
- 分化能：多種多様な細胞に変化することのできる機能
- 遊走性：体内を循環し適切な場所へ移動し生着する機能
- 用途：骨疾患・免疫疾患・慢性的な炎症性疾患など、治療の難しい疾患を治癒に導く作用
- 移植方法：従来型の局所移入だけでなく全身性移入が可能



RECはこれらの条件をすべて満たしています

コード No.	メーカーコード	品名	容量	希望納入価格 (円)
387-16591	REC-LU-05	超高純度ヒト間葉系幹細胞 (REC)	1Vial	75,000

【使用上の注意】

本品は、試験・研究の目的のみに使用されるもので、ヒトへの使用や商業利用は禁止されています。ヒト由来原料を含むためバイオセーフティーレベル2施設での取扱いをお願いします。

☐…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、2022年4月時点での情報です。最新情報は、当社HPをご参照下さい。

遺伝子組換えタンパク質を用いたエンドトキシン測定試薬

富士フイルム株式会社 バイオサイエンス&エンジニアリング研究所 福地 大樹

はじめに

エンドトキシンはグラム陰性細菌の細胞壁外膜に存在するリポ多糖 (Lipopolysaccharide) であり、血中に入ると極微量で発熱性を示し、大量ではエンドトキシンショックから死に至るような強い毒性を示すことがある¹⁾。グラム陰性細菌は環境中に広く存在しているため製造工程に混入するリスクがあり、また混入したエンドトキシンは耐熱性のため容易に失活しないことから、注射剤や医療機器はエンドトキシン汚染を厳密に管理することが求められている。近年、再生医療、ワクチン、抗体や核酸医薬に関連する製品の開発が盛んに行われているが、そのような製品においてもエンドトキシン管理は重要である。

エンドトキシンは、カプトガニの血球抽出成分の血液凝固系を利用した試薬(ライセート試薬; Limulus Amebocyte Lysate, LAL) を用いて測定されているのが現在の主流であるが、カプトガニ保護、試薬の安定供給、製品ロット間差の解消及び試験の安定性の向上を目的として、人工原料である遺伝子組換えタンパク質を用いたエンドトキシン測定試薬の開発が各LALメーカーで進められるようになってきた。

エンドトキシン試験法の測定原理

エンドトキシン試験法はカプトガニの血球成分より調製されたライセート試薬を用いてエンドトキシンを検出または定量する方法である。カプトガニの血球抽出成分にはエンドトキシンに対して凝固を引き起こす反応系が存在し、この凝固反応は複数のセリンプロテアーゼ前駆体が順次活性化するカスケード反応に基づいている(図1)。エンドトキシンがカプトガニ血球抽出成分に含まれるC因子を活性化し、続いて活性化型C因子がB因子を活性化する。次に活性化型B因子が凝固酵素前駆体を活性化し、活性化した凝固酵素が基質であるコアギュロゲンを加水分解することにより凝固性タンパク質である

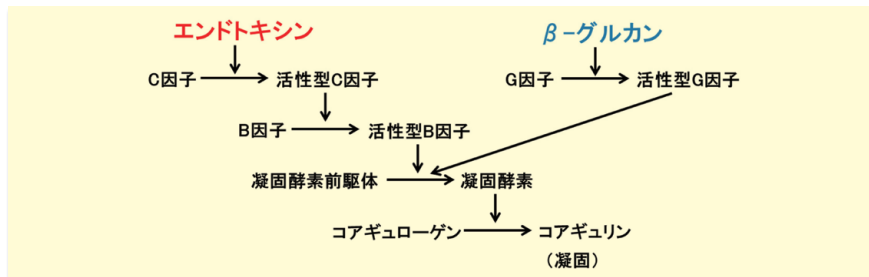


図1. エンドトキシン、β-グルカンによる凝固反応カスケード

コアギュリンに変換し、生じた不溶性ゲルにより凝固が起こる。また、カプトガニの血球抽出成分にはβ-グルカンに反応するG因子から始まるカスケード反応も存在しておりβ-グルカンによっても凝固反応が起こるが(図1)、エンドトキシンのみを対象とする場合にはG因子の除去、またはG因子から始まるカスケード反応を抑制して測定する。

エンドトキシンの測定方法

エンドトキシン測定には大きく分けて、ライセート試薬のゲル形成を指標とするゲル化法、ゲル化に伴う濁度変化を吸光度または透過率を用いて測定する比濁法、及び合成基質の加水分解による発色を指標にする比色法の3種類がある。比色法はゲル化法、比濁法に比べ感度が高い。遺伝子組換えタンパク質を用いたエンドトキシン測定試薬には、発色合成基質を用いた比色法以外に蛍光合成基質を用いた測定法も存在する。

遺伝子組換えタンパク質を用いたエンドトキシン測定試薬

現在、各社より上市されている遺伝子組換えタンパク質を用いたエンドト

キシン測定試薬は、C因子の遺伝子組換えタンパク質を使用した1因子系試薬と、C因子、B因子、凝固酵素前駆体の遺伝子組換えタンパク質を使用した3因子系試薬の2種類に分類される(図2)。前者の1因子系試薬は3因子系試薬に比べ1テストあたりのコストは安く抑えられるが、カスケード反応による増幅がないため生成するプロテアーゼ活性が小さく蛍光基質を使用した蛍光検出を行う必要がある。3因子系試薬は1因子系に比べ生成する酵素活性が大きく、発色で検出可能なため一般的なプレートリーダーで測定可能である。また近年、エンドトキシンに対する特異性に関してB因子が重要な役割を果たしているという報告があり^{2,3)}、C因子のみの1因子系ではなく、C因子、B因子、凝固酵素前駆体を含む3因子系でエンドトキシンを測定する意義は大きい。富士フイルム和光純薬では3因子系での開発を進め、他社商品と同等以上の性能を有する遺伝子組換えタンパク質を使用したエンドトキシン測定試薬(パイロスター™ネオ)を発売した。

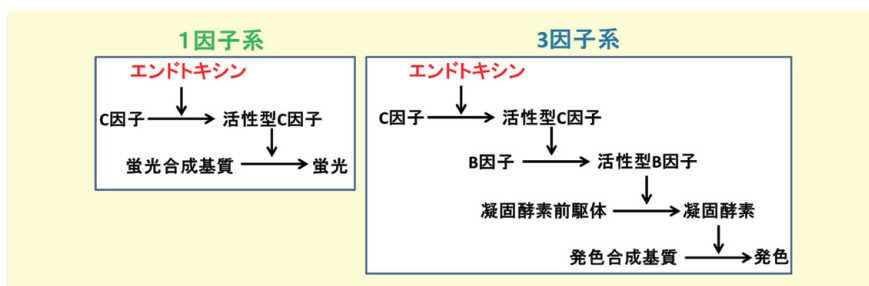


図2. 遺伝子組換えタンパク質を使用したエンドトキシン検出試薬の種類

⑤ パイロスター™ ネオ

今回富士フイルム和光純薬が発売したパイロスター™ ネオは遺伝子組換えタンパク質を使用した他社商品と比較して以下のような特長を有している。ブランク値上昇を極力抑え、安定的な制御が可能となったため、他社3因子系よりも低濃度のエンドトキシン濃度から測定可能となった(表1)。またライセート試薬の一般的な解析方法の一つである比色時間分析法で測定するため、カイネティック測定のできる恒温プレートリーダー、及び一般的なソフトウェアを用い、測定・解析可能である。パイロスター™ ネオは0.001 EU/mL ~ 50 EU/mLまでの幅広いエンドトキシン濃度を定量でき、高い相関の検量線(相関係数0.980以上)が得られる試薬である。

⑥ おわりに

現在使用されているエンドトキシン測定試薬は生物原料を使用したライセート試薬が主流であり、人工原料である遺伝子組換えタンパク質を使用し

表1. パイロスター™ ネオと他社商品との比較

因子	パイロスター™ ネオ	他社商品 1	他社商品 2	他社商品 3
		3 因子系	1 因子系	
定量範囲(EU/mL)	0.001 ~ 50 (比色時間分析法)	0.005 ~ 50(比色時間分析法) 0.002 ~ 0.1(反応速度法)	0.005 ~ 5	0.005 ~ 50
検出方法	発色	発色	蛍光	蛍光

たエンドトキシン測定試薬はまだ歴史が浅く普及していないのが現状である。こうした中、2021年に欧州薬局方では蛍光法を用いた遺伝子組換えC因子試薬が一般試験法として記載された。最新版である第十八改正日本薬局方では参考情報として、「エンドトキシン試験法と測定試薬に遺伝子組換えタンパク質を用いる代替法」が記載されたが、エンドトキシン試験法で規定されている「カプトガニの血球抽出成分より調製されたライセート試薬」には該当しないとされている。米国薬局方でも遺伝子組換えエンドトキシン測定試薬は代替法としての位置づけである。代替法として使用する際は、ライセート試薬を用いたエンドトキシン試験法と比較して同等以上の真度、精度、感度、特異性などが得られること

を確認する必要がある、そのような比較検討の取組みが報告されている⁴⁾。今後、遺伝子組換えタンパク質を用いたエンドトキシン測定試薬の使用検討が進むと思われるが、代替法として検討している製薬企業などのユーザーに受け入れられるにはこうした要求事項に応える必要がある。ユーザーニーズと、環境及びカプトガニ保護を両立できるように取り組んでいきたい。

【参考文献】

- 1) 棚元憲一：エンドトキシンと医薬品の品質管理，国立医薬品食品衛生研究所報告，126，19 (2008)。
- 2) Kobayashi, Y. et al. : J. Biol. Chem., 290, 19379 (2015)。
- 3) Tsuchiya, M. : Int. J. Dev. Res., 10, 36751 (2020)。
- 4) 菊池裕 他：医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス，48, 252 (2017)。

遺伝子組換えエンドトキシン検出用試薬

パイロスター™ ネオ

Wako

本品は、カプトガニの血球抽出成分を原料として使用せず、遺伝子組換え技術により製造した次世代のエンドトキシン測定用試薬です。従来の当社のライセート試薬及び世界の主要LAL製品と同じカプトガニ種 (*Limulus polyphemus*) 由来配列の組換え3因子 (C因子、B因子、凝固酵素前駆体) と、pNA発色合成基質の組合せで開発した高感度エンドトキシン特異的測定試薬です。

特長

- 定量範囲は0.001 ~ 50 EU/mLであり、高感度で広範囲の定量が可能
- 比色法でお使いの測定システム (吸光プレートリーダー) にて測定可能
- ライセート試薬と同じカスケード反応のため、従来法と高い相関性
- (1→3)-β-D-グルカン感受因子を含まないため、(1→3)-β-D-グルカンによる偽陽性のリスクなし
- 溶解後、約4時間の冷蔵保存が可能で、-30℃で2週間までの凍結保存が可能のため、試薬の無駄を減らすことが可能
- バキュロウイルス不含でカルタヘナ法非該当

コード No.	品名	定量範囲	規格	内容量	希望納入価格(円)
NEW 294-36731	PYROSTAR™ Neo ^{Ref}	0.001 ~ 50 EU/mL	エンドトキシン検出用	50回用 (2.7mL用 × 1本)	30,000

詳細は当社 HP をご覧下さい。

https://labchem-wako.fujifilm.com/jp/lal/products/pyrostar_neo.html

^{Ref}…2 ~ 10℃保存 ^F…-20℃保存 ³⁰…-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、2022年4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4回 半導体製造にかかわる薬品の微量元素（不純物）の影響とその分析方法

富士フイルム株式会社 R&D 統括本部 エレクトロニクスマテリアルズ研究所 河田 幸寿

求められる超高純度化技術

近年、半導体の微細化・高性能化により製造プロセスの複雑さが増している。それに伴い、品質トラブルが増加し、従来のような歩留り立ち上げ及び安定生産が困難になってきた。

特に難解な問題と考えられているのが、歩留りに影響を与える欠陥の特定とその欠陥を引き起こす原因物質の特定である。半導体の製造には多くの装置や薬品が使用され、これらが複雑に絡み合うため、その特定にはメーカー各社の協力が必要になる。そこで、半導体製造に関わるすべての薬品、装置から部品まで、欠陥の発生リスク低減のために、サプライチェーン全体を通してそれぞれ厳しい品質管理が求められている。

富士フイルム株式会社 エレクトロニクスマテリアルズ (EM) 事業の製品群に対しても、「超高品質＝超高純度」薬液の要望が高まり、薬品の精製技術の開発が必要な状況となっている。しかし、それ以前に目指す超高純度における評価技術（品質見極め）が確立されておらず、半導体業界全体の課題ともなっている。

長い間、半導体業界において技術開発の指標として活用されてきたITRS (International Technology Roadmap for Semiconductors) に代わってスタートしたIRDS(International Roadmap for Devices and Systems) では、歩留まり改善における2023年までの短期的な重要課題として、複数種類の致命的な欠陥の検出および分類とS/N比が挙げられている。

欠陥の検出および分類が困難な理由の一つは、微細化に伴って、管理が求められる欠陥のサイズがますます小さくなっていることがある。2019年7月に公開された最新ロードマップ2018年版では、2020年に対応が求められるウェハ上の電氣的に活性な微細粒子（主に金属）のサイズを3.5nmと掲げ

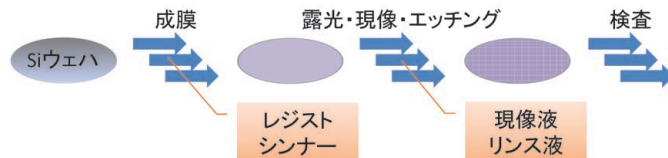


図1. 欠陥検査プロセスフロー

ているが、市販されている装置だけでは検出が困難な領域であり、検査手法自体が技術課題となっている。

微量元素（不純物）の影響とその分析方法

超高品質において特に管理が必要となるのが、微量元素である。薬液中に残存する微量元素は、電気特性および加工形状に異常を発生させる可能性がある。そこで、特に厳しい管理が必要となり、可能な限り微量元素を除去することが求められる。フォトリソグラフィープロセスにおける薬液、例えばレジスト、シンナー、現像液、リンス液や下層材料に金属不純物が残存し、それがパターン中もしくはパターン上に存在すると、続くエッチングプロセスにおいて加工異常を発生させる恐れがある。当社では、当社薬液製品が顧客プロセスにおいて、品質事故を起こすことを未然に防ぐために独自の検査手法を開発している。

しかし、この加工異常のような致命的と判断できるウェハ上の欠陥を確認する評価（図1）には、多くの特殊な装置やプロセス材料が必要となる。

そこで、薬液供給メーカーが用いる微量元素の計測手段としてもっとも一

般的な手法は、ICP-MSを用いた薬液の検査である。この手法は、汎用的な計測では最も感度が高く、一桁pptレベルの管理を可能にする。ただし、この薬液中の微量元素濃度を管理する場合にも、歩留りもしくは致命的と判断できているウェハ上の欠陥との間に相関関係を見いだす必要はある。

品質管理、昔と今

当社EM事業における主力製品の一つとして、ArF液浸レジストがある。ArF液浸レジストを使用したリソグラフィープロセスは、2007年の45nmノードから実用化されたが、当時の品質管理では、微量元素の要求は、一桁ppbレベルにすぎなかった。

管理の対象となる金属元素としては、一般的には、装置や設備、人が介在する作業が汚染源となる、Al、Ca、Cr、Cu、Fe、K、Mg、Mn、Na、Ni、Znが挙げられるが、半導体メーカーもしくは薬液によっては、その他20元素を超える管理が必要な場合も多くある。

ところが、微細化によってプロセスが煩雑化し、より多くの新規薬液が必要になり始めた22nmノード以降、品質トラブルにより量産化までが長期化

H																	He																																	
Li	Be											B	C	N	O	F	Ne																																	
Na	Mg											Al	Si	P	S	Cl	Ar																																	
K	Ca	Sc	Ti	V	Cr	Mn	Fe	Co	Ni	Cu	Zn	Ga	Ge	As	Se	Br	Kr																																	
Rb	Sr	Y	Zr	Nb	Mo	Tc	Ru	Rh	Pd	Ag	Cd	In	Sn	Sb	Te	I	Xe																																	
Cs	Ba		Hf	Ta	W	Re	Os	Ir	Pt	Au	Hg	Tl	Pb	Bi	Po	At	Rn																																	
Fr	Ra																																																	
<table border="1" style="width:100%; text-align:center;"> <tr> <td>La</td><td>Ce</td><td>Pr</td><td>Nd</td><td>Pm</td><td>Sm</td><td>Eu</td><td>Gd</td><td>Tb</td><td>Dy</td><td>Ho</td><td>Er</td><td>Tm</td><td>Yb</td><td>Lu</td> </tr> <tr> <td>Ac</td><td>Th</td><td>Pa</td><td>U</td><td colspan="14"></td> </tr> </table>																		La	Ce	Pr	Nd	Pm	Sm	Eu	Gd	Tb	Dy	Ho	Er	Tm	Yb	Lu	Ac	Th	Pa	U														
La	Ce	Pr	Nd	Pm	Sm	Eu	Gd	Tb	Dy	Ho	Er	Tm	Yb	Lu																																				
Ac	Th	Pa	U																																															

図2. 一般的な管理対象金属元素

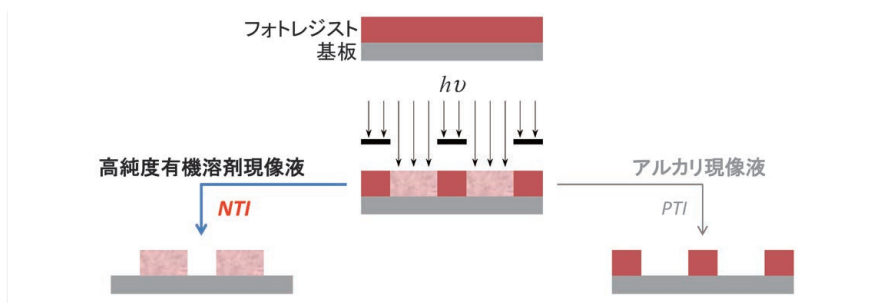


図3. 現像プロセス

するようになった。これによりサブ10nmノードからは、一桁pptを見据えた微量元素の管理やそれに付随したウェハプロセスを用いた検査が必要になってきている。

また、レジストだけでなく、その周辺薬液にも品質要求が高まっている。アルカリ現像液やレジスト希釈塗布液、ArF露光技術の延命として、当社が推進しているNTI (Negative Tone Imaging) プロセスで用いられる有機溶剤現像液やリンス液、これら薬液は非常に厳しい品質要求を受け開発したものであり、現状では顧客の要望を満

たしているが、さらなる改善も評価技術開発と併せて継続している。

終わらないテクノロジーの進化

2007年ITRSでは、微細化・高集積化を進めるMooreの法則を極限まで追求するMore Mooreに対して、微細化限界論によって登場した機能的多様化をMore than Mooreと定義した。

半導体メーカーによって戦略は様々だが、現在、最先端の7nm世代の量産では、微細化継続を可能にするEUVプロセスの適用も開始されている。IRDSでは微細化は2028年まで続き、

その後は3D VLSI化が進行するとしている。このように今後さらなる微細緻密構造化が計画されており、これらのプロセスに適用される薬品は、ppqレベルの管理が必要になると考えられ、計測装置および計測の正確さを判定するための標準試料においてもさらなる改善が必要である。

本記事は、2020年4月に当社HP (siyaku blog) 向けにご執筆いただきました内容となります。

ーシリーズ終了にあたってー

2021年7月 (Vol. 89 No. 3) から始まりました「微量元素分析 ーさまざまな分野での活用事例とその重要性ー」は本稿をもちまして最終回を迎えました。本誌に寄稿いただきました先生方にこの場を借りてお礼申し上げます。おかげさまで本シリーズでは微量元素分析、特にICP分析に関する情報をさまざまな視点でお届けできました。

読者の皆様におかれましては、全4回にわたって続いた本連載をご愛読いただきお礼申し上げます。皆様のICP分析の一助になりましたら幸いです。

ICP分析用単元素標準液

Wako

不純物元素を保証しているICP分析用単元素標準液にオスミウム標準液を追加しました。

コード No.	品名	規格	容量	希望納入価格(円)
157-03601	オスミウム標準液 (Os 1000)	ICP分析用	100mL	30,000
217-01651	超純水	ICP分析用	1L	6,000

ラインアップ

青塗りの元素のICP分析用標準液を取扱っています。

詳細は、当社HPをご覧ください。

<https://labchem-wako.fujifilm.com/jp/category/00442.html>

ICP分析用単元素標準液 和光

検索

Q & A

Q エクストン：クロム標準液 (コードNo. 039-25451) とクロム (Ⅲ) 標準液 (コードNo. 039-25831) は何が違うの？

A アンサー：使用しているクロムの価数が異なります。クロム標準液は六価クロム [CrO₃] を使用しており、クロム (Ⅲ) 標準液は三価クロム [Cr(NO₃)₃] を使用しています。

六価クロムは**劇物**になりますが、三価クロムは**普通物**のため保管や、使用時の取扱いが容易です。

また、多元素一斉分析に用いる混合標準液を調製する際に、六価クロムと一部の金属 (例.鉛など) が反応し、沈殿が析出する可能性があります。沈殿物が析出すると、標準液の濃度が変化し、測定結果の信頼性を損なう恐れがあります。六価クロムと反応する元素種を測定する際には、クロム (Ⅲ) 標準液 (コードNo. 039-25831) の使用をおすすめします。

・クロム標準液 (コードNo. 039-25451) 組成: CrO₃ in 5w/w% HNO₃

・クロム (Ⅲ) 標準液 (コードNo. 039-25831)

組成: Cr(NO₃)₃·9H₂O in 5w/w% HNO₃

第4回 BDNF/TrkB シグナル もう一つの顔

昭和大学 医学部 安達 直樹

はじめに

シリーズ第3回までで見てきたように、BDNF/TrkBシグナルは、神経回路の正常な発達や神経伝達調節において有益な機能を果たす。そのため、BDNF/TrkBシグナルの障害は脳の疾患の原因ともなり、その賦活化をターゲットとした創薬研究も数多くなされている。しかし今回は、そんなBDNF/TrkBの機能が、私たちの健康にとって「敵」となりうる事例について見ていきたい。

最初に主要なBDNF/TrkBシグナルについても一度確認をして、個別の疾患におけるBDNF/TrkBシグナルの関わりを紹介する。

BDNF/TrkB シグナル経路

MAPK/ERK 経路

TrkB受容体のTyr490とTyr515残基が活性化されると、これらのチロシン部位にShcアダプタータンパク質がドッキングし、Grb2 (Growth factor receptor-bound protein 2)をリクルートすることで、GTPase Rasと複合体を形成し、次にMAPK(mitogen activated protein kinase)/ERK (extracellular signal regulated kinase) 経路を活性化する。MAPK/ERKキナーゼは、転写因子CREB(cAMP response element binding protein)をリン酸化して活性化する。リン酸化されたCREBは核内に移動し、様々な遺伝子のプロモーターに結合して転写を調節することで、細胞の生存や分化、増殖を促進する。

PI3K/Akt経路

PI3 (Phosphoinositide 3) キナーゼ経路の活性化は、Tyr515残基のRasの複合体を取り込み、PI3K/Akt経路とMEK/MAPK経路という複数のカスケードを活性化させる。PI3K/Aktカスケードの活性化は、神経細胞の生存、成長および分化に不可欠なタンパ

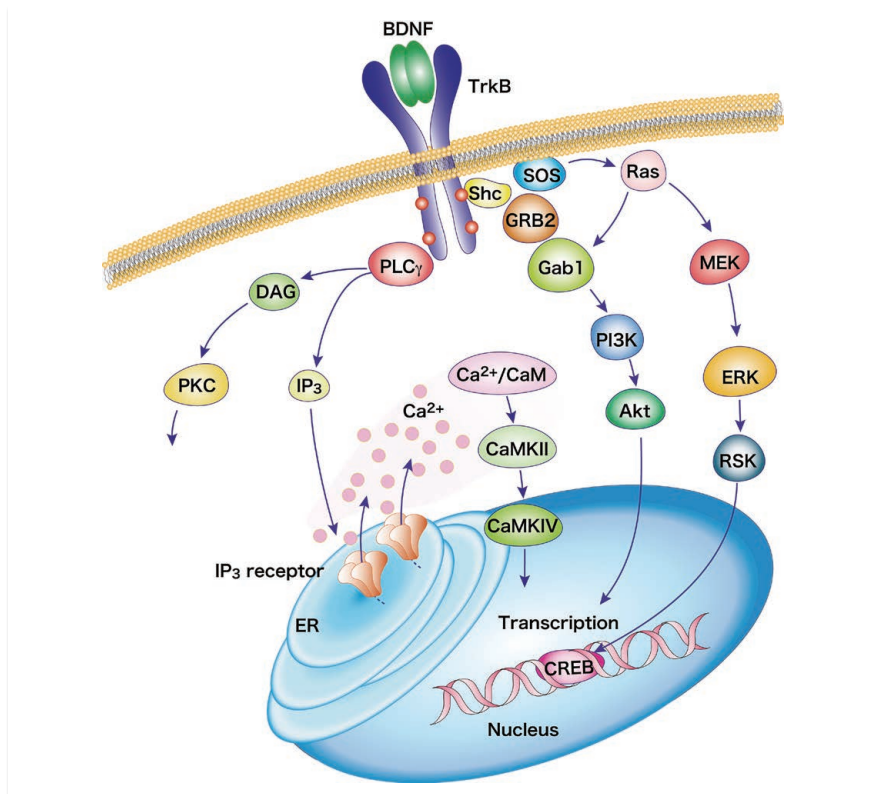


図. BDNF/TrkB シグナル経路 筆者ら文献³⁷⁾より改変

ク質群を制御する。

PLC γ 経路

TrkB受容体のTyr816残基がリン酸化されると、PLC γ (phospholipase C γ) 経路が活性化され、IP₃、DAG (diacyl glycerol)が生成される。PLC γ /IP₃経路は、小胞体からのカルシウム放出をもたらす、CaMK II (Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II)を活性化し、これによりCREBリン酸化を活性化する。一方、DAGの生成は、PKC (Protein kinase C)を活性化する。CaMKII・PKCの活性化は、細胞の生存や神経突起伸長、シナプス可塑性を担う。

薬物中毒における BDNF/TrkB シグナル

BDNF/TrkBシグナルは、脳の「報酬系」神経回路の可塑的な変化を促進することによって、コカイン中毒など

の薬物依存症に関わる¹⁾。報酬系を担う脳領域の基底状態において、BDNFは腹側被蓋野 (VTA)、扁桃核、海馬、前頭皮質で高発現している一方で、背側線条体と側坐核 (NAc)での発現量は低い²⁾。これに対しTrkBは脳全体に広く発現している³⁾。齧歯類を用いた研究において、コカイン曝露は、これら報酬関連領域のBDNFレベルを上昇させることがわかっている^{4,5)}。また、コカイン中毒の動物モデルでは、VTAやNAcへのBDNF注入やBDNF/TrkBの強制発現によっては、条件付け場所嗜好性やコカイン探索行動、離脱症状が亢進し、抗BDNF抗体の注入やBDNF/TrkBのノックダウンによっては、これらの行動が抑制される⁶⁾。コカインによるNAcなどにおけるBDNF/TrkBシグナルの増強が、AMPA型グルタミン酸受容体のサブユニットの構成を転写・翻訳レベルで調節することによってシナプスの可塑

的变化を引き起こし、中毒症状の発現に関わるというモデルが示されている¹⁾。一方、齧歯類の研究において、内側前頭前野皮質 (mPFC) のBDNF/TrkBシグナル増強が、コカイン中毒症状において抑制的な役割を果たすことから⁷⁾、BDNF/TrkBシグナル抑制をターゲットとしたコカイン中毒治療は、NAcやVTA領域に限定したものであれば、十分に効果を発揮する可能性がある。

慢性疼痛における BDNF/TrkB シグナル

痛みの感覚刺激は、後根神経節ニューロンが一次求心性神経となり、脊髄後角に存在する二次ニューロンに興奮性の入力を送ることによって伝達されるが、この脊髄後角ニューロンの興奮性増大が、神経障害性疼痛の大きな要因となっていることが知られている。脊髄後角のBDNF/TrkBシグナルの増強が、神経障害性疼痛発症と進行に、以下の3つのメカニズムで、大きく寄与する可能性が指摘されている。

① KCC2

脊髄には、一次求心性神経のシナプス前抑制と後角投射ニューロンのシナプス後抑制という、2つの異なる抑制メカニズムが存在し、痛みの信号を制御している。BDNFはこの抑制性GABA作動性シナプスの調節に関与して痛覚過敏を引き起こす⁸⁾。ここで鍵となるのは、potassium chloride co-transporter 2 (KCC2) の機能である。KCC2は膜貫通型のタンパク質で、細胞内の塩化物イオン (Cl⁻) を細胞外に汲み出すことで、細胞外のCl⁻濃度を高め、GABAを受容したシナプス後細胞がGABA受容体開口時に過分極するという、GABAの抑制性を担保するポンプである⁹⁾。神経障害性疼痛の動物モデルでは、脊髄後角においてBDNFの発現が上昇し、KCC2タンパク質の発現が低下する¹⁰⁾。さらに、TrkB/FcキメラまたはTrkB阻害剤

K252aの髄腔内投与によって、末梢神経損傷による脊髄後角のKCC2発現低下がブロックされ、神経障害性疼痛が緩和される¹¹⁾。まだ詳細はわかっていないが、BDNF/TrkBシグナルの中でも、Shc経路とPLC γ 経路とが連動して活性化された場合に、KCC2の転写抑制が起こるようである¹²⁾。

② 興奮性の増強

神経損傷モデルにおいて、BDNFによるTrkB受容体の活性化は、前シナプス部におけるグルタミン酸のシナプス小胞の蓄積を増やすことでシナプス伝達が増強することや、NMDA型受容体の機能を増強させることで、神経障害性疼痛を発症させる可能性も指摘されている¹³⁾。脊髄後角ニューロンのTrkB受容体にBDNFが結合すると、FynキナーゼによるGluN2B (NR2B) サブユニットのリン酸化を介して、後根神経節ニューロン-脊髄後角ニューロン間シナプスの長期増強を誘導し、中枢性感作と神経障害性疼痛を引き起こすと考えられている^{14,15)}。

③ グリア細胞の活性化

上でBDNFによる脊髄後角ニューロンの興奮性増大が神経障害性疼痛を引き起こすメカニズムを見てきたが、神経損傷時に、最初にBDNFを供給するのはどの細胞であろうか？ これまでの研究によって、BDNFの供給源がグリア細胞であることがわかってきている。

末梢神経損傷などによって活性化したミクログリアは、多くのサイトカイン (IL-2, TNF- α , BDNFなど) を産生・放出し、神経炎症反応と神経免疫応答の両方を誘導することで、疼痛過敏症の病態形成において重要な役割を果たす¹⁶⁾。活性化したミクログリア細胞では、BDNF産生が増加し、細胞移動が活発になり、TNF- α 放出を増加する¹⁷⁾。さらに、外因性BDNFによってミクログリアが活性化し、細胞遊走

とTNF- α 放出を増加させることから、神経損傷時にはミクログリア由来のBDNFがオートクラインに作用して、さらに自身を活性化するという、正の循環ループ機構が存在する可能性がある¹⁸⁾。また、脊髄後角のアストロサイトの活性化によっても、BDNFと炎症性サイトカインレベルが上昇するなど¹⁹⁾、アストロサイトも、持続的な中枢感作の主要な構成要素とみなされている²⁰⁾。本来、BDNFの産生と放出は神経細胞を保護し、生存を促進するため、急性の危険因子 (神経損傷など) への応答としてのBDNFの産生や放出増加は、生物として適応的であるはずなのだが、負のフィードバック機構が存在しないことが原因で、神経障害性疼痛の進行に伴って、中枢神経系が非適応状態へと変化しているのかもしれない。

てんかんにおける BDNF/TrkB シグナル

現在、世界の人口の約0.5~1%が罹患しているてんかんは、脳の神経細胞群が突然過活動する慢性進行性の中枢神経系障害である²¹⁾。てんかんは、自発的反復発作を特徴とし、一時的な脳機能障害や神経障害、認知機能低下など、さまざまな深刻な事態を引き起こす²²⁾。臨床研究において、てんかん患者の大半が健常者よりも血清中のBDNF値が高いことが知られている (Iughettaら、2018年) (Demirら、2020年)。また、てんかんの動物モデルでは、BDNFとTrkBが、特に側頭部と海馬領域で増加する²³⁾。このようなマウスてんかんモデルにおいて、TrkBを欠失させたり²⁴⁾、TrkB受容体を一過性に阻害したりすることで²⁵⁾、てんかん発作の発生を著しく減少させることができる。さらに、ラットの海馬領域にBDNFを投与すると、てんかん発作を誘発しうる²⁶⁾。

BDNF/TrkBシグナルは、どのようにてんかん発症にかかわるのだろうか

か。現在までに、主に3つのメカニズムが提唱されている。①BDNFはリアノジン受容体を介したCa²⁺放出と活性酸素種 (ROS) 産生を誘導し²⁷⁾、神経細胞の損傷とアポトーシスを促進する²⁸⁾。②TrkB活性化の上昇がKCC2の発現を低下させることで、GABAニューロンによる抑制効果を低下させる²⁵⁾。③BDNF/TrkBシグナルの増強が、海馬歯状回顆粒細胞の軸索である苔状線維において異常発芽を起こし、脳内の異常興奮回路の形成を引き起こす²⁹⁾。

BDNF/TrkBのてんかん発症における正確な役割は、BDNFの発現量、発現する脳部位、その上流および下流分子などとの関係から、まだまだ議論の余地があるが、BDNF/TrkBシグナル伝達経路に含まれる多くのタンパク質や分子は、臨床的なてんかんの検出や治療の分子標的として期待されており、てんかんの臨床治療やリスクの評価、予後予測に活用できる可能性がある。

がんにおける BDNF/TrkB シグナル

BDNF/TrkBシグナルは、細胞のがん化、浸潤や転移の促進、そして化学療法に対する抵抗性の原因となることが明らかにされている。

TrkBを過剰発現させた神経堤由来の細胞株をマウスに移植すると、10日後に急速に成長する腫瘍を形成し、腫瘍形成後7日以内にすべてのマウスが死亡した³⁰⁾。また、脳腫瘍形成細胞は、TrkBを過剰に発現し、自身がBDNFを産生する限り、EGFなど本来の成長因子がなくても生存できることから、オートクラインで自身の生存を維持する能力を獲得していると考えられる³¹⁾。

腫瘍の治療を困難にする要因として、他の臓器への転移がある。腫瘍細胞からすると転移は自身の生き残りをかけたイベントである。細胞外基質か

ら離れることで起こる細胞死 (アノイキス) の壁を突破し³²⁾、遺伝子発現を変化させることによって、上皮性から間葉性へと性質を変え (上皮-間葉転換)、血液を介して離れた臓器への移動に耐えられるようにしなければならない^{32, 33)}。興味深いことに、腫瘍細胞は、TrkBの活性化によってPI3キナーゼが常時活性化状態となることで、アノイキスに対する抵抗性を上げ、転移の成功率を高めるようだ^{32, 33)}。本稿では詳細なメカニズムについては割愛するが、BDNF/TrkBシグナルが内因性・外因性のアポトーシスに対して抑制的に働くことで、抗がん剤化学療法に対する抵抗性を付与していると考えられている³⁴⁾。

このように、BDNF/TrkBシグナルはがんの形成や転移、治療抵抗性に寄与する一方で、“有益”な機能も報告されている。メラノーマを移植したマウスは、環境エンリッチメント (遊び道具などがいくつもあるケージで飼育) の条件では、ナチュラルキラー細胞およびT細胞による細胞傷害性が増強され、腫瘍の成長が著しく抑制されることが見いだされた^{35, 36)}。環境エンリッチメントマウスの視床下部ではBDNFの発現が増加しており、このBDNFをノックダウンすると、環境エンリッチメントによる腫瘍抵抗性が消失することから³⁵⁾、視床下部におけるBDNF上昇が環境エンリッチメントによる抗腫瘍作用の鍵となっていると考えられている。

おわりに

本稿では、我々の健康にとって都合の悪い、BDNF/TrkBシグナルの「もう一つの顔」を見てきたが、基本的にはBDNFがTrkBに結合することによって、種々の細胞内シグナルカスケードが活性化され、その結果、シナプス伝達を調節したり、細胞の生存や増殖を促進したりする点では、有益な機能を果たす場合と変わらない。た

だ、BDNF/TrkBシグナルが異所的に、もしくは過剰に活性化されることで、私たちの健康を脅かす存在にもなるのだ。

脳の疾患や機能障害に対する治療効果や、視床下部を介した抗がん作用への期待から、脳におけるBDNFの発現を上昇させることを目的として、AMPA型グルタミン酸受容体の反応を高めるアロステリックモジュレーター (ampakineと総称される) の開発が行われてきた。あるampakineでは、急性投与から数日以内に脳のいくつかの領域でBDNF産生を最大20倍まで増加させることが示されたが、意図しない発作原性作用が現れるなど、これらの薬剤の臨床応用には高い壁がある。しかし最近、発作性の副作用を示さず、加齢に伴う記憶障害を改善する最初のampakineが報告され³⁶⁾、明るい光も見えてきている。

今回、負の側面に焦点を当てることで、BDNF/TrkBシグナルが適切な領域で適度に活性化されることの必要性和、臨床応用に向けた基礎的な研究の積み重ねの重要性を再認識できたかと思う。

【参考文献】

- 1) Li, X. and Wolf, M. E. : *Behav. Brain Res.*, **279**, 240 (2015).
- 2) Conner, J. M. et al. : *J. Neurosci.*, **17**, 2295 (1997).
- 3) Krause, S. et al. : *J. Neurosci. Res.*, **86**, 411 (2008).
- 4) Graham, D. L. et al. : *Nat. Neurosci.*, **10**, 1029 (2007).
- 5) Horger, B. A. et al. : *J. Neurosci.*, **19**, 4110 (1999).
- 6) Bahi, A. et al. : *Psychopharmacology (Berl)*, **199**, 169 (2008).
- 7) Berglind, W. J. et al. : *Eur. J. Neurosci.*, **26**, 757 (2007).
- 8) Malan, T. P. et al. : *Anesthesiology*, **96**, 1161 (2002).
- 9) Janssen, S. P. et al. : *Neurochem. Int.*, **60**, 21 (2012).
- 10) Malcangio, M. : *Neurobiol. Pain*, **1**, 1 (2017).
- 11) Yajima, Y. et al. : *J. Neurochem.*, **93**, 584 (2005).
- 12) Lee-Hotta, S. et al. : *Neurochem. Int.*, **128**, 32 (2019).

- 13) Wang, L. N. *et al.* : *J. Neurosci. Res.*, **90**, 1249 (2012).
 14) Li, S. *et al.* : *Neurochem. Res.*, **42**, 2712 (2017).
 15) Ding, X. *et al.* : *Neurobiol. Dis.*, **73**, 428 (2015).
 16) Tsuda, M. *et al.* : *Trends Neurosci.*, **28**, 101 (2005).
 17) Zhang, X. *et al.* : *Cell. Physiol. Biochem.*, **34**, 715 (2014).
 18) Zhou, W. *et al.* : *Neurosci. Lett.*, **756**, 135965 (2021).
 19) Chiang, C. Y. *et al.* : *Neurochem. Res.*, **37**, 2419 (2012).
 20) Liu, T. *et al.* : *Neurosci. Bull.*, **28**, 131 (2012).
 21) Fisher, R. S. *et al.* : *Epilepsia*, **55**, 475 (2014).
 22) Thijs, R. D. *et al.* : *Lancet*, **393**, 689 (2019).
 23) Wang, X. *et al.* : *Front. Pharmacol.*, **12**, 758232 (2021).
 24) He, X. P. *et al.* : *Neuron*, **43**, 31 (2004).
 25) Liu, G. *et al.* : *Neuron*, **79**, 31 (2013).
 26) Scharfman, H. E. *et al.* : *Exp. Neurol.*, **174**, 201 (2002).
 27) Yang, N. *et al.* : *Oxid. Med. Cell. Longev.*, **2020**, 6687185 (2020).
 28) Ghadiri, T. *et al.* : *Neurosci. Lett.*, **709**, 134384 (2019).
 29) Skupien-Jaroszek, A. *et al.* : *PLoS One*, **16**, e0239111 (2021).
 30) Yin, B. *et al.* : *Oncogene*, **34**, 761 (2015).
 31) Lawn, S. *et al.* : *J. Biol. Chem.*, **290**, 3814 (2015).
 32) Bao, W. *et al.* : *PLoS One*, **8**, e70616 (2013).
 33) Kupferman, M. E. *et al.* : *Oncogene*, **29**, 2047 (2010).
 34) Radin, D. P. and Patel, P. : *Anticancer Res.*, **37**, 3983 (2017).
 35) Cao, L. *et al.* : *Cell*, **142**, 52 (2010).
 36) Radin, D. P. *et al.* : *Biomed. Pharmacother.*, **84**, 806 (2016).
 37) Numakawa, T. *et al.* : *World J. Biol. Chem.*, **1**, 133 (2010).

神経分野の研究に!

Wako

抗proBDNF, モノクローナル抗体 (3C10H)

BDNF (Brain-derived Neurotrophic Factor、脳由来神経栄養因子) は NGF ファミリーに属する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、うつ病をはじめとした精神神経マーカー候補と考えられています。

BDNF には前駆体である proBDNF が存在し、proBDNF はプロセッシングを受けることで成熟した mBDNF (mature BDNF) となります。一方、proBDNF は mBDNF とは異なり、細胞死、成長円錐の収縮、樹状突起棘の収縮、及び長期抑圧を促進する作用を示すことが知られています¹⁾。

本品は、proBDNF を特異的に認識するマウスモノクローナル抗体です¹⁾。

製品概要

- 組成：PBS, 0.05% アジ化ナトリウム
- 抗体濃度：ラベル記載 初回製造ロット：1.09mg/mL
- クローンNo.：3C10H
- 抗原：合成ペプチド (KVRPNEENNKDADLY)
- 免疫動物：マウス
- 抗体サブクラス：IgG2b・κ
- 種交差性：マウス
- エピトープ：proBDNF 76-90 a.a.
- アプリケーション：ELISA 1 : 100-10,000
免疫沈降 1 μg/mL

【参考文献】

- 1) Kojima, M. *et al.* : *Int. J. Mol. Sci.*, **21**, 3984 (2020).

コード No.	品名	規格	容量	希望納入価格(円)
NEW 019-28411	Anti proBDNF, Monoclonal Antibody (3C10H)	☑	免疫化学用 100 μL	50,000

関連製品

Mature BDNF 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
298-83901	Mature BDNF ELISA Kit Wako, High Sensitive	☑	免疫化学用 96回用	83,000

抗BDNF抗体

コード No.	品名	規格	容量	希望納入価格(円)
017-28071	Anti BDNF, Monoclonal Antibody (2D7)	☑	免疫化学用 100 μL	50,000
014-28081	Anti BDNF, Monoclonal Antibody (3C8)	☑	免疫化学用 100 μL	50,000

当社では、神経精神疾患関連製品を多数取揃えています。詳細は当社HPをご覧ください。

試薬事業トップ→ライフサイエンス→神経科学→ELISA/アッセイキット(神経科学)

https://labchem-wako.fujifilm.com/jp/category/lifescience/assay_kit/neuro_disease/index.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、2022年4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4回 ヒト iPS 細胞由来神経細胞における神経回路機能評価法の構築の試み

東京大学大学院 薬学系研究科 薬品作用学教室 馬場 敦

はじめに

医薬品開発の過程において、中枢神経系への安全性の問題により脱落した化合物は約1/4程度を占めると報告されており、依然として大きな課題である¹⁾。その内訳をみると、中枢神経系への副作用発現により脱落する候補化合物の割合は、非臨床試験の段階では約7%程度であるのに対し、臨床試験では34%と全臓器のうち最大となっている²⁾。この結果は、非臨床試験段階での副作用予測が必ずしも十分に機能していないことを示唆し、*in vitro*においてよりヒト生体神経系に近い評価系を開発する必要性を示している。また、中枢神経疾患は医薬品開発の主要な標的のひとつであるが³⁾、神経機能を指標とする有効な探索スクリーニング系は乏しい。これらの課題に対しヒトiPS細胞由来神経細胞 (hiPSC-N) は、①実験動物の代替として利用できること②動物とヒトとの種差を克服できる可能性があること③疾患患者由来iPS細胞からの分化誘導によりアプローチの難しい中枢神経疾患の病態モデルが作製できることから、創薬過程で有効利用することが期待されている⁴⁾。

評価系構築におけるヒト iPS 由来神経細胞利用の現状と課題

生体内の神経細胞は細胞種毎に異なった形状、神経伝達物質とその受容体、イオンチャネルを発現しており、これらの性質は分化誘導したhiPSC-Nでも保持されている。しかしながら汎用されているげっ歯類由来培養神経細胞に比べ、hiPSC-Nは機能的に成熟するのにより多くの時間を要することがわかっている。このことはヒト生体内では最終位置に移動し分化を終了した神経細胞が一年以上かけて成熟するということと対応し、細胞内部の固有の機構によるものと考えられる⁵⁾。成熟促進の目的で、①生体内を模倣した培地や培地添加物 (BrainPhysTM、

Neurobasal PlusTMなど)、②プレート上での配置と自己集積を可能にする培養プレート (Cell-able[®]、MicroBrain^{®6)} など)、③アストロサイトなどグリア細胞との共培養法⁷⁾、④3D培養脳オルガノイド作製^{5,8,9)} など種々の開発が行われている。現状で市販のhiPSC-Nを使用した場合、一ヶ月程度の培養期間が必要であり、更なる改良とスループット性を高めた簡便な評価系の必要性が高い。

これまでのところhiPSC-Nを用いて微小電極アレイ (microelectrode array : MEA) による*in vitro*評価系の開発が進んでおり、2D培養で化合物の痙攣誘発性の予測を可能にしている¹⁰⁾。しかしながら生体内では、これらの神経細胞は個々にランダムなネットワークを形成しているように見えたとしても、巨視的に見ればある程度均質かつ限定された種類の細胞がクラスター (たとえば大脳皮質の各層や、海馬の領域など) を形成しており、他のクラスターへと神経線維を伸展し接続している¹¹⁾。*in vitro*でこのようなクラスタードネットワークを再現する試みは古くから存在したが、実験系の安定性や再現性に課題があり、これまで普及してこなかった^{12,13)}。これらが簡便に実現すれば神経ネットワークの機能評価に繋がることが期待される。現在私たちが3D網目構造足場材を用いて行っている研究について以下に紹介する。

ゼラチン不織布を用いたクラスタードネットワーク作製の試み

ゼラチンは動物結合組織の主成分であるコラーゲンより抽出されたアミノ酸ポリマーであり、親水性で細胞接着性に優れているため、培養用コーティング基材として古くから用いられてきた。これらゼラチンを繊維状に成形し作製した網目構造は、細胞が生存増殖できる空隙をもち、足場材あるいは3D構造体の封入体として利用するこ

とが可能である¹⁴⁾。Genocel[®]として日本毛織 (株) より販売されているゼラチンハイドロゲル繊維不織布 (GHFN) は繊維同士が結合したネットワーク構造を有し、光透過性に優れ、長期培養にも安定である。今回我々は繊維素材・繊維径・空隙・不織布の厚みなどを改変し最適化したGHFNを用いた。GHFNを培養プレートに設置し、hiPSC-N (iCell[®] DopaNeurons) を播種したところ、細胞は網目構造の間隙においてGHFN-培養プレート界面に凝集体を形成した。培養2日目には各凝集体より複数の神経突起が伸展しており、培養16日目までに各凝集体が接続した。この構造体はある程度まとまった大きさの球状の凝集体より複数の神経突起が束状にまとまって連結していた。共焦点イメージング装置 CellVoyagerTM CQ1 (横河電機) を用い確認したところ、3D構造体の性質をもちつつほぼ同一平面上での撮影が可能であった。凝集体の大きさと神経突起の太さは、使用するGHFNの網目径によりある程度制御できる。Ca蛍光指示薬を用いて神経発火を経時測定したところ、クラスター内部では各細胞の神経発火とともに複数細胞の同時発火、さらに複数クラスターでの同期発火が観察できた。これらCa変動の幅・頻度もGHFNの網目径に依存した。各クラスター領域のCa変動を図1Dに示す。大きなCa変動に着目した場合、各クラスターの同期しやすさは明確にわかれており、複数回測定しても再現可能であった。すなわち構造体内部には連結強度の異なる複数のネットワークが互いに重なり合う状態で存在することが示唆される。また、画像中のクラスター間距離は最長で数mm以上離れているが、一定頻度で全てのクラスターが同期し発火する。各クラスターの同期発火のタイミングには再現性よくわずかなズレがあり、同一平面上の撮影で単一クラスターからの伝達が評価可能と考えられた。作製した構造体

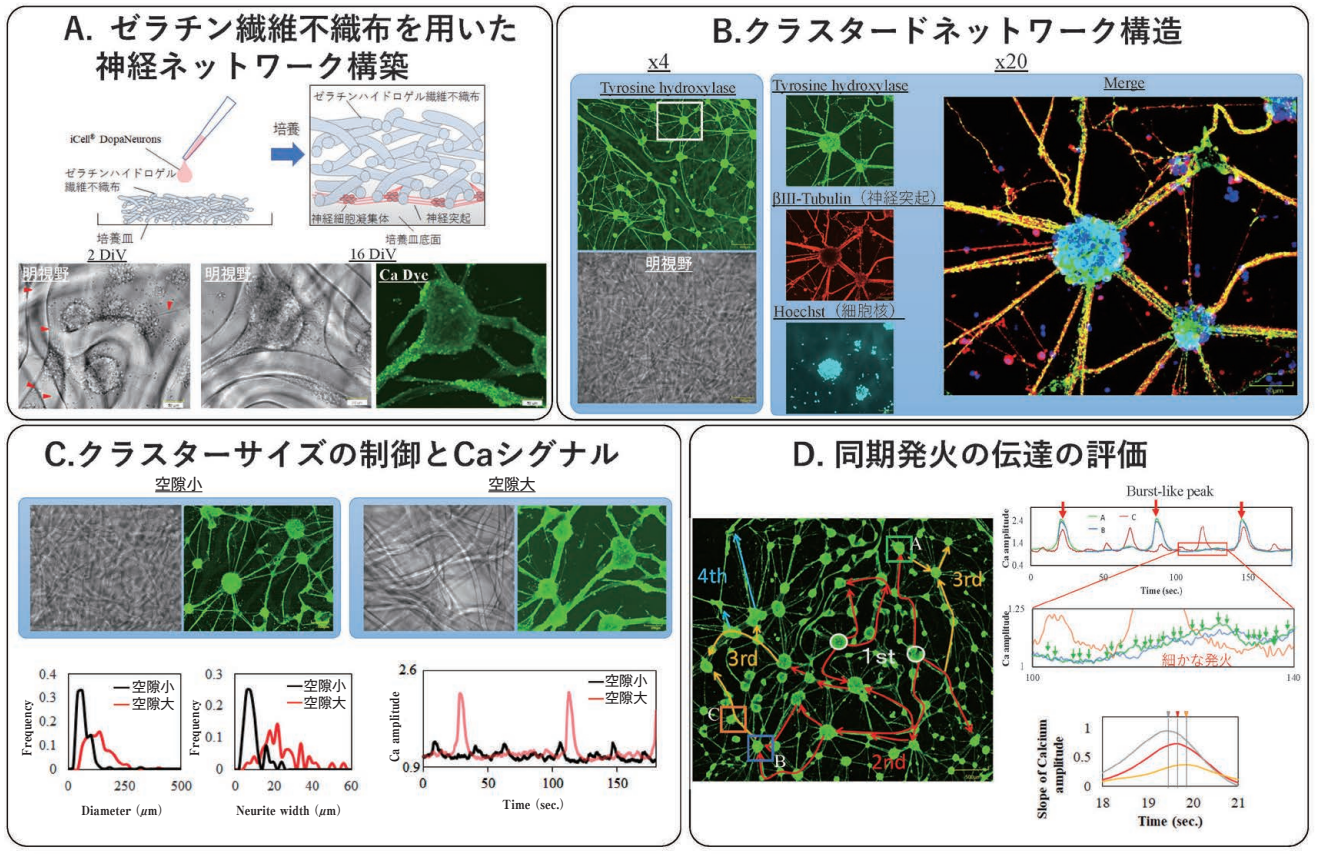


図1. ゼラチンハイドロゲル繊維不織布 (GHFN) を用いた iPS 細胞由来神経細胞クラスタードネットワークの構築

実験には iCell® DopaNeurons (FUJIFILM Cellular Dynamics) を使用した。培養プレート上に設置した GHFN 上に $6,000 \text{ cells/mm}^2$ で播種し、BrainPhys Neuronal Medium (STEMCELL Technologies) で維持培養した標本を使用した。EarlyTox (Molecular Device) を負荷した標本で Ca イメージングを行った (3 frame/秒)。画像取得および解析には、共焦点イメージング装置 (CellVoyager™ CQ1, 横河電機) および CellPathfinder™ (横河電機) を用いた。(A) (上段) 作製した標本の模式図。播種した細胞は GHFN を通過し培養プレートとの界面で凝集体を形成し固定されている。各凝集体は神経突起由来の太い線状構造体で連結しており、培養底面から離れた空間に GHFN 繊維に支持される。(下段左) 培養2日目標本の明視野像。赤矢頭は凝集体より伸展する神経突起を示す。(下段中右) 16 日目標本の明視野像と、Ca イメージング画像。(B) 培養15日目の固定標本の蛍光抗体染色像。PFA 固定・洗浄のち、anti-Tyrosine Hydroxylase (ドーパミン神経; 緑)・anti-βIII-Tubulin (神経突起; 赤)・Hoechst33342 (核; 青) で三重染色した。神経細胞の細胞体がほぼ凝集体内部に集積し、突起状構造体内部に複数の神経突起が存在する。(C) GHFN の網目径を変え作製した標本例。(上段) 播種前 GHFN の明視野像と作製した培養16日目の標本の Ca 蛍光像。(下段) 作製した標本のクラスタ径 (左)、突起状構造体の直径 (中) の分布、Ca 変動の代表例 (右)。空隙径によりクラスタ径、突起径、Ca 変動いずれも変化する。(D) 同期発火伝達の評価法。(右上) 任意3点のクラスタの Ca 変動を重ね合わせたもの。クラスタ間でタイミングが同期する大きな変動の他に、法則のみられない小さな変動が観察できる。多点クラスタ間で Ca 変動が同期した場合、Ca 蛍光変化の傾きをプロットし (右下) 変曲点を検出しピークのタイミングのずれを可視化した。元波形でほぼ同期していたとしても、厳密にピーク位置のズレがあることがわかる。(左) 作製した構造体の Ca 蛍光像。同期発火の伝達途中3点のクラスタはそれぞれの左のトレースに対応する。各クラスタ間をどのように伝達していたかを矢印で示した。この標本では中心2箇所で生じた発火が、それぞれクラスタを乗り越えて伝達していたことが可視化できた。

はGHFNによりプレート上に保持されており、一ヶ月以上維持できた。

上記手法により作製した構造体に、各種薬物を添加した例を図2に示す。*in vitro* でてんかん様活性を引き起こすことが知られている K^+ チャンネル阻害薬4アミノピリジン (4-AP) を適用した場合、濃度依存的に総発火数が増加するとともに同期発火の間隔が短縮

した。ラスタープロットで多点クラスタの発火と同期を可視化したところ、発火数の増加とともに同期発火のシグナルが埋没することが観察された。図1Dで示すように同期発火のタイミングのずれから伝達の順番が解析できたことから、神経伝達あるいは伝導を抑制する各種薬物の効果を検討した。 Na^+ チャンネル阻害薬テトロドトキ

シン、カルバマゼピンの適用によりクラスタ間の大発火が同期なくなり、最終的には大発火が消失した。また、グルタミン酸遊離および受容体阻害薬であるリルゾールの適用により、発火振幅は著しく減弱した。これらの結果から、①すくなくとも大発火 (同期発火) が神経伝達・伝導を介することが示唆され、②各クラスタにはド

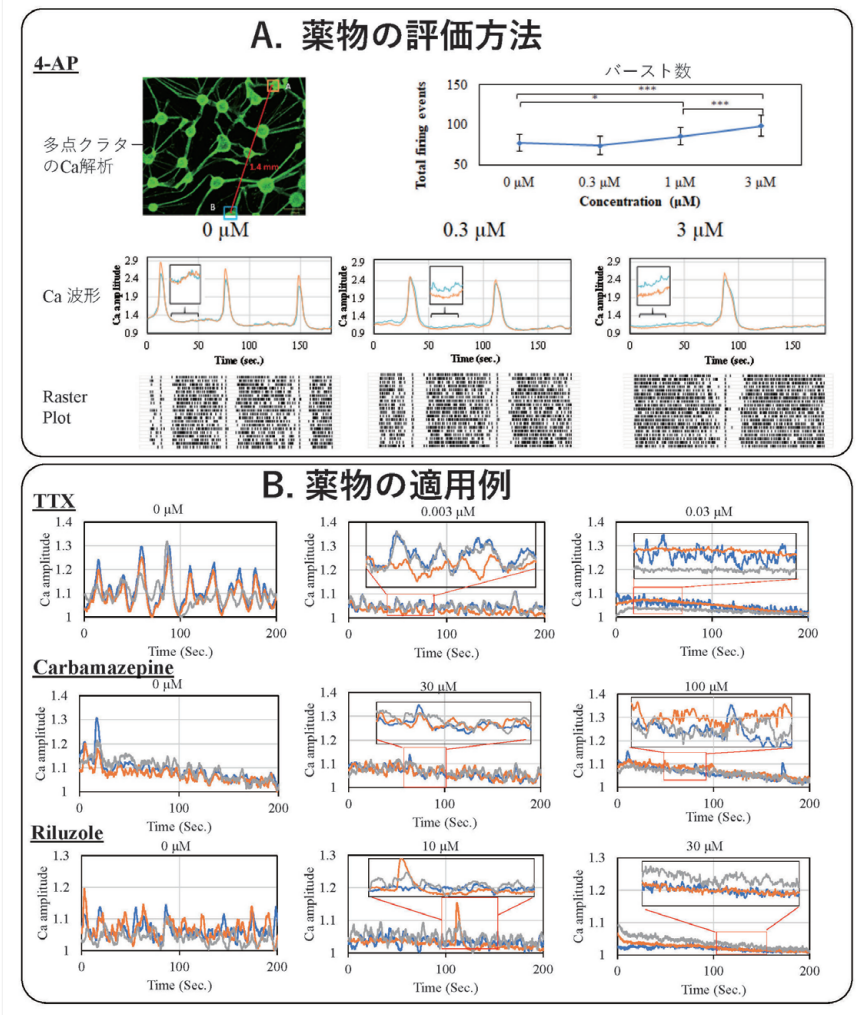


図2. iPS細胞由来神経細胞クラスターネットワークにおける薬剤応答の評価

培養15日目の標本にEarlyTox[®] (Molecular Device)を負荷し、薬物を累積投与10分後、各濃度毎に3分間のCaイメージングを行なった(3 frame/秒)。画像取得および解析には、共焦点イメージング装置(CellVoyager[™] CQ1, 横河電機)およびCellPathfinder[™] (横河電機)を用いた。(A) 神経細胞の興奮性を上昇させるK⁺チャネル阻害薬4-アミノピリジン(4-AP)を適用したときの実験例。タイムラプス画像よりCa蛍光像(上段左)の各クラスター部の平均蛍光強度を算出し、代表的2クラスターのトレースを示した(中段)。このクラスター間では大きな変動パターンが一致しているが、小変動はクラスター毎に異なる。変動にはクラスター内小集団の発火も含まれる。全クラスターについて全ての変動のピークを算出しクラスタープロットを作成した(下段)。4-APの濃度依存的に発火数が増加(上段右)し、かつ同期の間隔が延長した。(B) 電位依存性Na⁺チャネル阻害薬テトロドトキシン(TTX, 上段)、カルバマゼピン(中段)、グルタミン酸遊離および受容体阻害薬であるリルゾール(下段)を適用したときの、各3クラスターのトレース。

パミン神経のみでなく多種の神経が含まれる集合体であることが明らかとなった。

最後に

本系における薬剤の効果はクラスターを構成する細胞種に依存することが予想され、興奮性/抑制性神経やグ

リア細胞などとの混合播種により改良を試みる予定である。今後はMEA計測や各種薬剤の適用により既存の評価系との補完性あるいは外挿性を検証する。また、近年、複雑な精神症状を呈する疾患が神経ネットワーク形成の破綻に起因することが少しずつ明らかになってきており、本系での疾患hiPSC-N

の利活用とその構造評価により*in vitro*評価系構築への応用も期待したい。

謝辞

本稿の執筆にご協力いただきました、日本毛織(株)早乙女俊樹様、東京大学大学院薬学系研究科化学物質安全性評価システム構築社会連携講座の澤田光平客員教授、加藤英里子様、テクノプロR&D(株)岸森弘子様にご礼申し上げます。

【参考文献】

- Walker, A. L. *et al.* : *Exp. Biol. Med.* (Maywood), **243**, 1037 (2018).
- Cook, D. *et al.* : *Nat. Rev. Drug Discov.*, **13**, 419 (2014).
- Authier, S. *et al.* : *J. Pharmacol. Toxicol. Methods*, **81**, 37 (2016).
- Silva, M. C. and Haggarty, S. J. : *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **1471**, 18 (2020).
- Woodruff, G. *et al.* : *PLoS One*, **15**, e0240991 (2020).
- Suzuki, I. K. and Vanderhaeghen, P. : *Development*, **142**, 3138 (2015).
- Kayama, T. *et al.* : *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **495**, 1028 (2018).
- Sakaguchi, H. *et al.* : *Stem Cell Reports*, **13**, 458 (2019).
- Costamagna, G. *et al.* : *Int. J. Mol. Sci.*, **22**, 2659 (2021).
- Ishibashi, Y. *et al.* : *Toxicol. Sci.*, **184**, 265 (2021).
- Bassett, D. S. *et al.* : *Nat. Rev. Neurosci.*, **19**, 566 (2018).
- Gabay, T. *et al.* : *Physica A*, **350**, 611 (2005).
- Teller, S. *et al.* : *PLoS Comput. Biol.*, **10**, e1003796 (2014).
- Matsuno, K. *et al.* : *Regen. Ther.*, **14**, 160 (2020).

シリーズ終了にあたって

2021年04月(Vol. 89 No. 2)から始まりました「ヒトiPS細胞由来分化細胞の創薬応用」は、本稿をもちまして最終回を迎えました。本誌に寄稿いただきました先生方へ、この場を借りて御礼申し上げます。本シリーズではヒトiPS細胞由来分化細胞について、その創薬応用に視点を据えた情報をお届けしました。皆様のiPS細胞研究、そして創薬への展開の一助になりましたら幸いです。全4回に渡った本連載をご愛読いただき御礼申し上げます。

iCell[®] 神経細胞製品

コード No.	メーカーコード	品名	容量	納入単位	希望納入価格 (円)
iCell[®] ドーパミン神経細胞 01279 株					
551-33511	C1087	iCell [®] DopaNeurons 01279 Cells	☑	≥1.0×10 ⁶ cells/vial	1Vial 131,000
551-33371	C1028		☒	≥5.0×10 ⁶ cells/vial	1Vial 236,000
iCell[®] GABA 作動性神経細胞 01434 株					
556-33321	C1012	iCell [®] GABANeurons 01434 Cells	☒	≥4.0×10 ⁶ cells/vial	1Vial 270,000
iCell[®] GABA 作動性神経細胞 01279 株					
559-33311	C1008	iCell [®] GABANeurons 01279 Cells	☒	≥4.0×10 ⁶ cells/vial	1Vial 270,000
iCell[®] グルタミン酸作動性神経細胞 01279 株					
554-33501	C1060	iCell [®] GlutaNeurons 01279 Cells	☑	≥1.0×10 ⁶ cells/vial	1Vial 131,000
558-33381	C1033		☒	≥6.0×10 ⁶ cells/vial	1Vial 246,000
iCell[®] 運動神経細胞 01279 株					
554-33481	C1050	iCell [®] Motor Neurons 01279 Cells	☑	≥1.0×10 ⁶ cells/vial	1Vial 131,000
557-33471	C1048		☒	≥3.0×10 ⁶ cells/vial	1Vial 241,000

iCell[®] 神経細胞製品の推奨培養液・サプリメント及びアプリケーション情報を含めた iCell[®] 製品情報は当社 HP をご覧下さい。

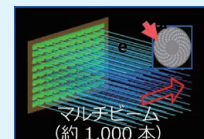
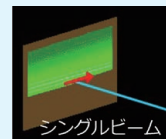
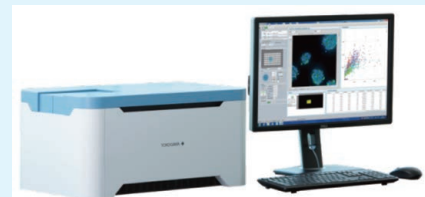
共焦点定量イメージサイトメーター

YOKOGAWA ◆

CellVoyagerTM CQ1

本品は、細胞を高精度に撮影し、簡単な操作で数値解析できるイメージサイトメーターです。マルチビームスキャン方式は高速だけでなく、1ビームあたり非常に低いレーザー強度で高効率に蛍光色素を励起できるので、低光毒性かつ蛍光退色を大幅に抑えられます。

CQ1 は、広視野ニポウディスク方式の採用により、従来機の4視野分を一度にスキャンできるため、より高速かつ高精細な撮影が可能になりました。

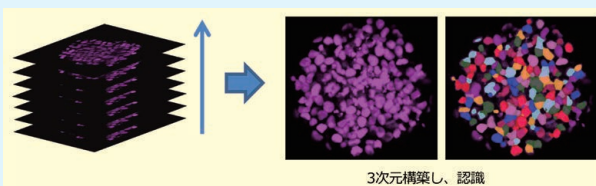


特長

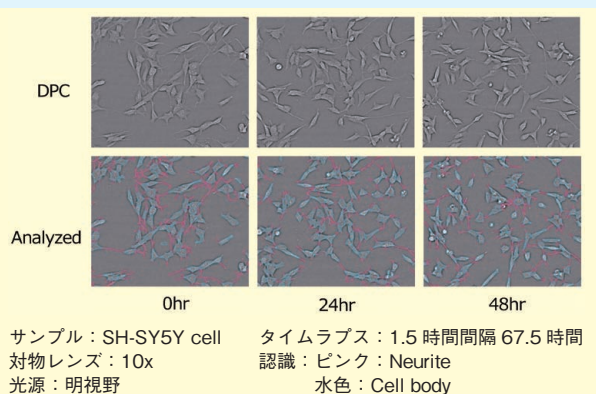
- 共焦点画像撮影からスクリーニング、タイムラプス 3D解析まで対応
- コンパクトかつ操作しやすいソフトウェア
- ラベルフリー解析・機械学習機能^{*1}
- 各種ロボットに対応

3次元解析

- 共焦点画像を立体構築し、三次元解析ができる。
- 体積や3次元の位置情報を簡単に測定できる。



アプリケーション例

■ 神経突起伸長のタイムラプスラベルフリー解析^{*1}

明視野画像から DPC (デジタル位相差) 画像を作成、機械学習機能を使用して神経突起、細胞質を認識した。

^{*1} DPC (デジタル位相差) 画像を作成、機械学習機能にはハイコンテンツ解析ソフトウェア CellPathfinderTM (オプション) が必要です。

詳細は、当社 HP をご覧下さい。試薬事業トップ→機器・機材→イメージング関連機器→CellVoyagerTM CQ1
<https://labchem-wako.fujifilm.com/jp/equipment/products/00053.html>



品目追加

食品分析用標準品

Wako

機能性成分分析用標準品

機能性表示食品のガイドラインでは「機能性関与成分とは特定の保健の目的に資する成分と定義され、定性確認及び定量確認が可能な成分である。」とされています*1。

近年、食品の機能性成分に対して成分基原や含量を正確に定性・定量する意識が高まってきています。当社では、機能性成分の定性・定量にご使用いただける標準品を取揃えています。この度、下記品目を新たに発売しました。

*1 消費者庁HP (https://www.caa.go.jp/policies/policy/food_labeling/foods_with_function_claims/assets/foods_with_function_claims_210322_0002.pdf (2022年3月8日閲覧)) より

コード No.	品名 ^{*2}	規格	容量	希望納入価格(円)	主な試験対象となる機能性成分
NEW 046-34811	1-Deoxyojirimycin Standard	食品分析用	50mg	35,000	桑の葉イミジュガー
近日発売 087-10621	3-Hydroxy-3-methylbutyric Acid Calcium Salt Standard	食品分析用	100mg	照会	HMBカルシウム
NEW 084-10631	3-Hydroxytyrosol Standard	食品分析用	100mg	18,000	オリブ由来ヒドロキシチロソール

*2 製品の由来は「主な試験対象となる機能性成分」の項目に記載の由来植物とは異なる場合があります(由来を保証する製品ではありません)。

その他標準品・測定用キットも取揃えています。詳細は当社HPをご覧ください。

試薬事業トップ→分析→食品・栄養・機能性成分
https://labchem-wako.fujifilm.com/jp/category/analysis/nutrition_functionality/index.html

平成30年6月改正食品衛生法「指定成分等」分析用標準品

健康食品に「医薬品に該当する成分を配合したり、医薬品と紛らわしい効能などの表示・広告を行うこと」は薬機法で禁止されています。近年、ダイエットや強壯を標榜した「いわゆる健康食品」に医薬品が添加された「無承認無許可医薬品」による健康被害が発生し、問題となっています。平成30年6月の食品衛生法改正により、食品衛生上の危害発生防止の観点から、特別の注意を必要とする「指定成分等」が選定されました。当社では、「指定成分等」の分析にご使用いただける標準品を取揃えています。

RF…2～10℃保存 F…20℃保存 R…80℃保存 RS…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、2022年4月時点での情報です。最新情報は、当社HPをご参照下さい。

コード No.	品名	規格	容量	希望納入価格(円)	指定成分
038-22001	Coptisine Chloride	局方生薬試験用(薄層クロマトグラフィ用)	10mg	25,500	ドオウレン
067-02191 063-02193	Forskolin	生化学用	10mg 25mg	15,500 32,000	コレス・フォルスコリン
085-08691	(E)-Isoferulic Acid	局方一般試験法用	20mg	18,700	ブラックコホシ
112-01131	Kwakhurin Standard ^{*3}	食品分析用	5mg	30,000	ブレリア・ミフィカ

*3 qNMRにより値付けされた純度(%)が表示された標準品です。

詳細は当社HPをご覧ください。

試薬事業トップ→分析→食品衛生・自然毒→無承認無許可医薬品分析→無承認無許可医薬品等分析用試薬

<https://labchem-wako.fujifilm.com/jp/category/01985.html>

品目追加

局方試験用試薬

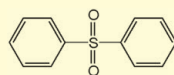
Wako

当社では、局方試験にご使用いただける試薬を多数取揃えています。この度、下記の新製品を発売しました。

局方生薬試験用

ジフェニルスルホン

日本薬局方 一般試験法 試薬・試液に記載されている定量用ジフェニルスルホンとしてご使用いただけます。定量用ジフェニルスルホンは生薬「ソヨウ」定量法に使用されます。



C₁₂H₁₀O₂S = 218.27
 CAS RN® 127-63-9

コード No.	品名	規格	容量	希望納入価格(円)
NEW 040-34831	Diphenyl Sulfone	局方生薬試験用(定量用)	100mg	24,000

上記以外にも局方生薬試験用製品を取揃えています。詳細は当社HPをご覧ください。

試薬事業トップ→分析→医薬品品質試験・局方試験→生薬試験→生薬

<https://labchem-wako.fujifilm.com/jp/category/00683.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。

農薬標準品

	コード No.	品 名	規格	容量	希望納入価格 (円)
■ ブロフランチド標準品	NEW 025-19641	Broflanilide Standard	Res ⁺ 残留農薬試験用	100mg	30,000
■ フェナザキン標準品	NEW 064-06981	Fenazaquin Standard	Res ⁺ 残留農薬試験用	100mg	14,000
■ シラフルオフェン標準品	NEW 199-11193	Silaf luofen Standard	Res ⁺ 残留農薬試験用	100mg	14,000
■ ペンフルフェン標準品	NEW 166-28991	Penflufen Standard	Res ⁺ 残留農薬試験用	100mg	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→標準品→残留農薬・動物用医薬品分析用標準品
<https://labchem-wako.fujifilm.com/jp/category/01942.html>

欲しい混合標準液がすぐに見つかる！

農薬・動物用医薬品混合標準液検索

農薬・動物用医薬品混合標準液検索は、当社の約250種類の農薬・動物用医薬品混合標準液を「成分名」及び「CAS RN[®]」から検索することができます。検索結果には製品の他にも、当社推奨カラムや関連する公定法へのリンクも掲載しています。

一斉分析の際の混合標準液の選定に是非ご活用下さい。

POINT!

- 「成分名で探す」または「CAS RN[®]で探す」から「検索キーワード」を設定し、検索できます。
※「成分一覧から探す」では、表示されるキーワード一覧からの一括登録が可能です。
- 検索結果には、下記の情報が表示されます。
 - 成分名①をクリック→単品標準品のページへ移動
 - 当社推奨の分析カラム②のリンクをクリック→製品詳細ページへ移動
 - 公定試験法③のリンクをクリック→試験法のページへ移動

検索結果：43 件 20件 50件 1 2 3 4 >

混合標準液

> **農薬混合標準液 PL-5-1 (各20µg/mlアセトン溶液)**
Pesticide Mixture Standard Solution PL-5-1 (each 20µg/ml Acetone Solution)

①	成分	成分 (英名)	CAS RN [®]	成分別名	成分別名 (英名)
	EPN	アクリナトリン		アセトクロール	イソキサチオン
				イソプロカルブ	イプロベンホス
				2, 4-シクロロ-2-(1, 2, 4-トリアゾール-1-イル)アセトアニリド	エスプロカルブ
				エトフェンプロックス	カスサホス
				クロルプロファミ	シクロシメット
				シメタメトリン	シメチルビンホス (Z体)
				シメトリン	ソキサミド
				ターバ(シル)	テトラコナゾール
				テニルクロール	トリシクラゾール
				トリブホス	ピラフルフェンエチル
				(E)-ピリフェノックス	ピリメタニル
				フェノチオカルブ	フェンスルホチオン
				フルチアセトメチル	フルミクロラックベンチル
				プロチオホス	プロバクロール
				プロメトリン	プロモホス
				ペナラキシル	ペンフレゼート
				ホサロン	メブロニル

② **推奨カラム** > 製品名が表示されます。 > 製品名が表示されます。

③ **公定試験法** > ○○○○○○○○○○○○○○○ > ○○○○○○○○○○○○○○

詳細は当社HPをご覧ください。
試薬事業トップ→分析→農薬・動物用医薬品混合標準液検索バナー
<https://labchem-wako.fujifilm.com/jp/product/search/pesticides.html>

Res⁺…2～10℃保存 F…20℃保存 Res⁺…80℃保存 Res⁺…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、2022年4月時点での情報です。最新情報は、当社HPをご参照下さい。






有機ふっ素化合物の分析に！

PFCs(PFOS, PFOA, PFHxS)試験用試薬

Wako






有機ふっ素化合物(PFCs)であるペルフルオロオクタン
スルホン酸(PFOS)やペルフルオロオクタン酸(PFOA)は
環境中で分解されにくく、高い蓄積性も有するため、POPs
条約を始めとしたさまざまな規制の対象となっています。
国内では、2020年4月1日にPFOS・PFOAの水道水質規制
における位置づけが「要検討項目」から「水質管理目標設
定項目」に変更され、暫定目標値が適用されました。また、
2021年4月よりペルフルオロヘキサンスルホン酸(PFHxS)
が「要検討項目」に追加されました。当社ではPFCs分析
に使用できる分析カラム、溶媒、標準品を取揃えています。
この度、PFOA、PFHxS標準品を発売しました。

標準品

コードNo.	品名	規格/メーカー	容量	希望納入価格(円)
168-28951	Perfluorohexanesulfonic Acid Potassium Salt [*] 	環境分析用	100mg	照会
518-28833	Perfluorooctane Sulfonic Acid (100µg/mL in MeOH)  	AccuStandard Inc.	1mL	8,100
161-28941	Perfluorooctanoic Acid Standard [*]  	環境分析用	100mg	13,000

※直鎖化合物の含量が明確な標準品です。

安定同位体標識化合物





コードNo.	品名	メーカー	容量	希望納入価格(円)
552-40251	Potassium Perfluoro-1-hexanesulfonate (¹³ C ₆ , 99%), 50µg/mL in Methanol 	Cambridge Isotope Laboratories, Inc.	1.2mL	149,000
550-37621	Perfluorooctanesulfonate (PFOS), Sodium Salt (¹³ C ₈ , 99%), 50µg/mL in Methanol  	Cambridge Isotope Laboratories, Inc.	1.2mL	143,000
517-28901	Perfluorooctanoic Acid (PFOA), (¹³ C ₈ , 99%), 50µg/mL in Methanol  	Cambridge Isotope Laboratories, Inc.	1.2mL	149,000

前処理カラム

コードNo.	品名	規格	容量	希望納入価格(円)
291-33441	Presep [®] PFC-II (60mg/3mL)	試料前処理用	10本 x10	55,000
296-32651	Presep [®] -C Agri (Short)	試料前処理用	10個 x5	39,000

「Presep[®] PFC-II」は、シリンジ型、「Presep[®]-C Agri (Short)」はコマ型の固相抽出カラムです。どちらも2020年3月30日改訂の水質管理目標設定項目の検査方法を参考にしたPFOS、PFOAの添加回収試験において、良好な結果が得られています。また「Presep[®] PFC-II」は、PFOS、PFOA、PFHxSを含むPFCs 6成分を良好に回収することができます。

溶媒

コードNo.	品名	規格	容量	希望納入価格(円)
011-22251	Acetonitrile  	PFOS・PFOA分析用	1L	6,250
130-15941	Methanol  	PFOS・PFOA分析用	1L	3,520
216-01361	Ultrapure Water	PFOS・PFOA分析用	1L	2,600
212-01363			3L	7,350

PFOS・PFOA分析適合性試験において、溶媒中のPFOS、PFOAが基準値以下であることを保証した溶媒です。詳細は当社HPをご覧ください。

試薬事業トップ→分析→水質→環境水・排水→PFCs (PFOS, PFOA, PFHxS) 分析用試薬

<https://labchem-wako.fujifilm.com/jp/category/00353.html>

全固体電池の研究・開発に







硫化物系固体電解質

Wako

現在の主流電池であるリチウムイオン二次電池は、軽量でエネルギー密度が大きいという特長がある一方、電解液に有機溶媒が用いられているため、発火する懸念があり安全性に問題があります。リチウムイオン二次電池より高い安全性を有し、高出力特性、高エネルギー密度を兼ね備えた次世代電池として、近年全固体電池が注目を集めています。当社では、全固体電池の電解質として有望視されている硫化物系固体電解質の原料をラインアップしました。全固体電池の研究・開発にぜひご利用下さい。

特長





- 高純度品 (99.9%以上)
- 鉄、コバルトなどの高遷移金属の不純物含量を保証
- 吸湿を防ぐため特殊な外装を使用

コードNo.	品名	CAS RN [®]	規格	容量	希望納入価格(円)
071-06791	Germanium(IV) Sulfide [GeS ₂] 	12025-34-2	電池研究用	5g	26,000
128-06891	Lithium Sulfide [Li ₂ S] 	12136-58-2	電池研究用	5g	19,000
126-06892				25g	68,000
165-28841	Phosphorus Pentasulfide [P ₂ S ₅]  	1314-80-3	電池研究用	5g	7,000
161-28843				50g	12,000
200-21121	Tin(IV) Sulfide [SnS ₂]  	1315-01-1	電池研究用	5g	20,000

その他の電池関連試薬は当社HPをご覧ください。

試薬事業トップ→合成・材料→電池材料

<https://labchem-wako.fujifilm.com/jp/category/synthesis/battery/index.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、2022年4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、尿中のMCP-1を LBIS 短時間・微量検体・高感度で測定可能

レビス® Human MCP-1 (CCL2) ELISA Kit

富士フイルムワコーシバヤギ株式会社のレビス® サイトカインELISAキットシリーズに新たにHuman MCP-1が追加されました。既存品では感度が得られず測定できなかった正常検体、低濃度検体を高感度に再現性良く測定可能です。

Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) は、76 アミノ酸から成る分子量8,600の細胞遊走活性を示すサイトカインスーパーファミリーです。炎症性メディエーターとして単球・マクロファージなどの免疫担当細胞からだけでなく、血管内皮細胞、線維芽細胞、尿細管上皮細胞、平滑筋細胞などの多くの細胞から分泌されます。

MCP-1を含む多くのケモカインは分泌細胞及び平滑筋において炎症性刺激 (TNF- α , IL-1などによる) を受けると誘導され、特にMCP-1とその受容体CCR2は脂肪組織に骨髄由来のマクロファージを動員させ炎症を介したインスリン抵抗性の発症に深く関与しています。また、炎症領域に単球・マクロファージを引き寄せると考えられ、慢性炎症疾患に対する治療のターゲットとしても注目されています。

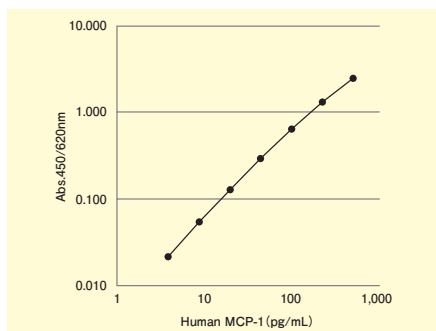
特長

- カルタヘナ法非該当 (バキュロウイルス不含)
- 微量な検体で測定可能
- 短時間で測定可能 (全反応時間: 3時間50分)
- 環境に優しい防腐剤を使用
- 高い精度と再現性

性能

- 検体: ヒト血清、血漿 (ヘパリン/EDTA)、尿、培養上清
- 測定範囲: 3.85 ~ 500pg/mL (標準曲線範囲)
- アッセイ内変動 (5重測定, 2検体): 平均C.V.値: 15%未満
- アッセイ間変動 (3重測定, 3検体, 4日間): 平均C.V.値: 15%未満

〈標準曲線(例)〉



キット内容

- 抗体固相化96ウェルプレート 1枚
- 標準品 (凍結乾燥) 1本
- 緩衝液 60mL × 1本
- ビオチン結合抗体 (凍結乾燥) 1本
- ペルオキシダーゼ・アビジン結合物 100 μ L × 1本
- 発色液 (TMB) 12mL × 1本
- 反応停止液 12mL × 1本
- 濃縮洗浄液 (10 \times) 100mL × 1本

コードNo.	メーカーコード	品名	容量	希望納入価格(円)
638-53411	AKH-MCP1	LBIS Human MCP-1 (CCL2) ELISA Kit	96回用	70,000

ビオチンと可逆的結合可能な耐熱性 アビジン様タンパク質

Wako

タマビジン™ 2-REV, 組換え体, 溶液

本品は、タモギタケ (*Pleurotus cornucopiae*) からクローニングされたアビジン様タンパク質タマビジン™ 2のアミノ酸改変体です。ビオチンと可逆的に結合する性質を持ち、ビオチンの過剰添加によりビオチン化合物とタマビジン™ 2-REVの結合を解離することができます。

製品概要

- タンパク質濃度: 約1mg/mL
- 形状: 液体
- 等電点: 約7.2
- 熱安定性: T_m = 約80 $^{\circ}$ C
- 起源: *E. coli* expressed mushroom (*Pleurotus cornucopiae*)
Tamavidin™ 2-REV

コードNo.	品名	規格	容量	希望納入価格(円)
201-21271	Tamavidin™ 2-REV, recombinant, Solution	免疫化学用	1mL	22,000

関連製品

タマビジン™ 2-REV固定化磁気ビーズ

コードNo.	品名	規格	容量	希望納入価格(円)
136-18341	MagCapture™ Tamavidin™ 2-REV	遺伝子研究用	2mL	40,000
133-18611	MagCapture™ HP Tamavidin™ 2-REV	遺伝子研究用	2mL	58,000

アビジン・ストレプトアビジン

コードNo.	品名	規格	容量	希望納入価格(円)
013-28291	Avidin, from Egg White	生化学用	10mg	8,000
019-28293	Avidin, from Egg White	生化学用	50mg	28,500
015-24231	Avidin, Neutralized, from Egg White	免疫化学用	10mg	10,500
011-24233	Avidin, Neutralized, from Egg White	免疫化学用	50mg	43,000
198-17861	Streptavidin	免疫化学用	1mg	5,700
194-17863	Streptavidin	免疫化学用	5mg	13,000
192-17864	Streptavidin	免疫化学用	25mg	47,000

マクロファージマーカー

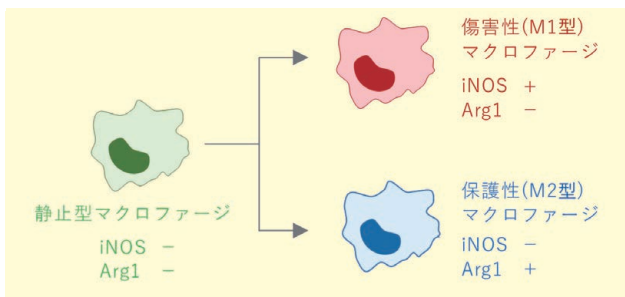
Wako

抗 Arg1, ウサギ

抗 iNOS, ウサギ

中枢神経系グリア細胞の一つであるミクログリアや末梢で貪食細胞として働くマクロファージは通常静止型として存在しますが、LPSなどの刺激が加わることで活性化ミクログリア/マクロファージへと変化します。さらに活性化ミクログリア/マクロファージには傷害性 (M1型) と保護性 (M2型) の2種類があり、それぞれ免疫機能に関与します¹⁾。iNOSはM1型、Arg1はM2型ミクログリア/マクロファージのマーカーとしてそれぞれ知られています。

本品は、iNOS及びArg1に対するウサギポリクローナル抗体です。マクロファージの免疫細胞染色に使用可能であることを確認しています。



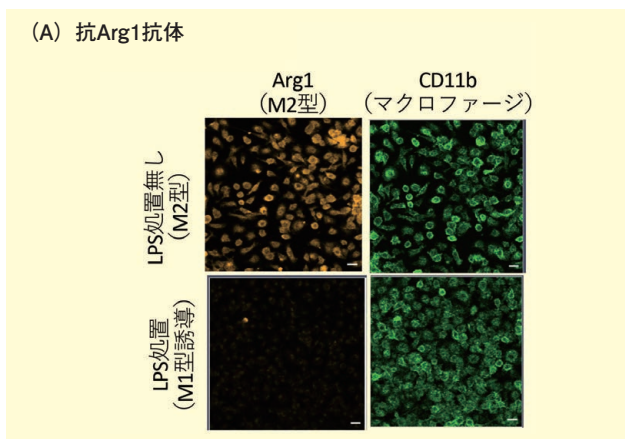
+ : 発現レベル高、- : 発現レベル低

製品概要

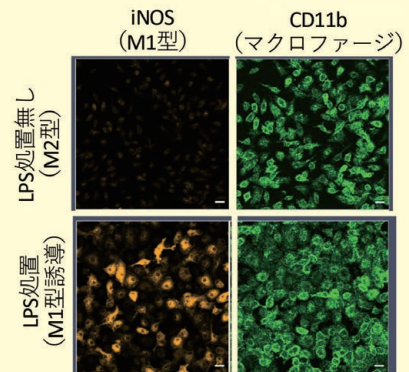
バッファー組成	PBS, 0.05%アジ化ナトリウム
抗体濃度	ラベルに記載
抗原	合成ペプチド
交差性	マウス
アプリケーション	免疫細胞染色 1:100-500

データ

免疫細胞染色



(B) 抗iNOS抗体



サンプル：マウス骨髄由来マクロファージ (M2型)
LPS濃度：500ng/mL
一次抗体：(A) 抗 Arg1, ウサギ [コード No. 018-28361]
(B) 抗 iNOS, ウサギ [コード No. 015-28371]
抗体濃度：一次抗体 (Arg1, iNOS ともに) 1 : 500

マウス骨髄由来マクロファージを LPS 処置し、(A) 抗 Arg1 抗体と (B) 抗 iNOS 抗体を用いて免疫細胞染色を行った。

【参考文献】

1) Hu, X. et al. : *Nat. Rev. Neurol.*, 11 (1), 56 (2015).

コード No.	品名	規格	容量	希望納入価格 (円)
018-28361	Anti Arg1, Rabbit	免疫化学用	100µL	40,000
015-28371	Anti iNOS, Rabbit	免疫化学用	100µL	40,000

ミクログリアマーカー

Wako

SPICA Dye™ 594 標識 抗 Iba1, ウサギ

緑色蛍光色素(488)標識 抗 Iba1, ウサギ

Iba1は神経系のミクログリア特異的に発現している約17kDaのタンパク質で、ミクログリアマーカーとして使用されます。この度、新たな蛍光標識抗体2製品をラインアップに追加しました。

本品は当社抗Iba1, ウサギ(コードNo. 019-19741)に新規高耐光性蛍光色素である、Alexa Fluor594領域のSPICA Dye™ 594 (Ex=575nm, Em=611nm) 及びFITC領域の緑色蛍光色素(488) (Ex=501nm, Em=513nm) を標識した抗体です。標識二次抗体による検出操作の手間を省くことができます。

製品概要

品名	抗 Iba1, ウサギ, SPICA Dye™ 594 結合	抗 Iba1, ウサギ, 緑色蛍光色素(488) 結合
コード No.	012-28401	282-37691
バッファー組成	PBS, 0.05%アジ化ナトリウム	
抗体濃度	ラベルに記載	
標識	SPICA Dye™ 594 (Ex=575nm, Em=611nm)	緑色蛍光色素(488) (Ex=501nm, Em=513nm)
抗原	合成ペプチド (Iba1 の C 末端配列相同)	
交差性	マウス、ラット	ラット
アプリケーション	免疫組織染色 (凍結切片) 1 : 200-2,000	

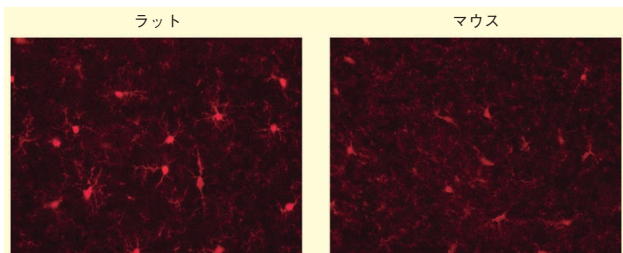
[次頁に続く]

☐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、2022年4月時点での情報です。最新情報は、当社HPをご参照下さい。

データ

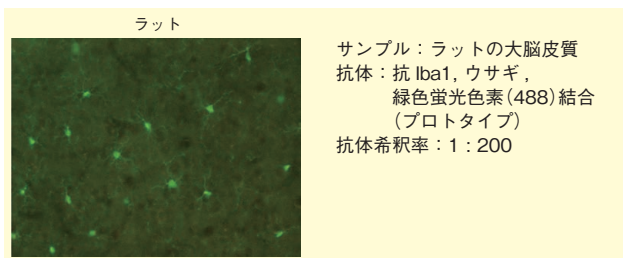
免疫組織染色

(SPICA Dye™ 594標識 抗Iba1, ウサギ抗体)



サンプル：ラット、マウスの大脳皮質
抗体：抗 Iba1, ウサギ, SPICA Dye™ 594 結合
抗体希釈率：1 : 200

(緑色蛍光色素(488)標識 抗Iba1, ウサギ抗体)



サンプル：ラットの大脳皮質
抗体：抗 Iba1, ウサギ,
緑色蛍光色素(488)結合
(プロトタイプ)
抗体希釈率：1 : 200

※ SPICA Dye™：富士フイルム株式会社によって開発された高耐光性の新規蛍光物質です。

コードNo.	品名	規格	容量	希望納入価格(円)
012-28401	Anti Iba1, Rabbit, SPICA Dye™ 594-conjugated	免疫化学用	100μL	50,000
282-37691	Anti Iba1, Rabbit, Green Fluorochrome (488)-conjugated (Prototype)	免疫化学用	100μL	50,000

関連製品

コードNo.	品名	規格	容量	希望納入価格(円)
019-19741	Anti Iba1, Rabbit (for Immunocytochemistry)	免疫化学用	50μg	40,000
013-27691	Anti Iba1, Rabbit (for Paraffin Section)	免疫化学用	50μg	45,000
011-27991	Anti Iba1, Goat	免疫化学用	100μL	45,000
016-26461	Anti Iba1, Rabbit, Biotin-conjugated	免疫化学用	100μL	45,000
013-26471	Anti Iba1, Rabbit, Red Fluorochrome (635)-conjugated	免疫化学用	100μL	48,500
016-20001	Anti Iba1, Rabbit (for Western Blotting)	免疫化学用	50μg	40,000
012-26723	Anti Iba1, Monoclonal Antibody (NCNP24)	免疫化学用	10μL	15,000
016-26721	Anti Iba1, Monoclonal Antibody (NCNP24)	免疫化学用	50μL	45,000
017-27591	Anti Human Iba1, Monoclonal Antibody (NCNP27)	免疫化学用	10μL	18,000
013-27593	Anti Human Iba1, Monoclonal Antibody (NCNP27)	免疫化学用	50μL	40,000
015-28011	Anti Iba1, Rabbit, SPICA Dye™ 568-conjugated	免疫化学用	100μL	50,000

Ref...2 ~ 10℃保存 F...- 20℃保存 30...- 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、2022年4月時点での情報です。最新情報は、当社HPをご参照下さい。

アセチル CoA のアッセイに 蛍光プローブ「RH-NH₂」

Wako

アセチルCoAはエネルギー代謝で中心的な役割を果たす重要な中間体であり、炭水化物、アミノ酸及び脂質を分解してエネルギーを得る場合、ほとんどがTCA回路でアセチルCoAとして酸化されます。一方、細胞内のアセチルCoAをアッセイする方法はほとんどなく、アセチルCoAを可視化できるプローブはこれまでありませんでした。東京大学の山次先生らは、アセチルCoAを検出する蛍光プローブとして、テトラメチルローダミン骨格を有するRH-NH₂を開発しました^{1,2)}。HeLa S3細胞をRH-NH₂ (2 μmol/L) で処理すると、RH-NH₂がミトコンドリアに局在し、アセチルCoAにより誘起された弱い蛍光を発する様子が観測され、さらに促進剤であるトリブチルホスフィンを加えると1分以内で蛍光強度の増大が確認できます(図)。アセチルCoAのアッセイに、ぜひご活用下さい。

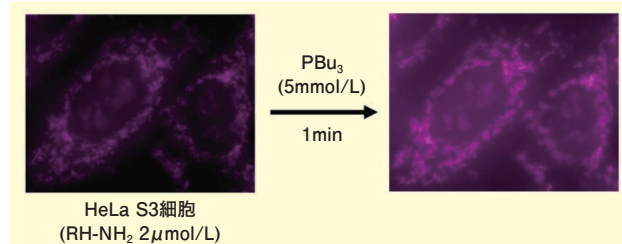
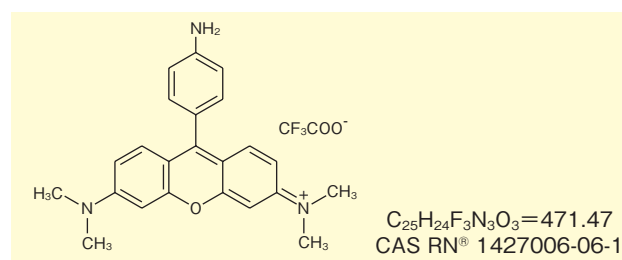


図. RH-NH₂ による細胞内アセチル CoA の蛍光検出

特長

- 細胞内のアセチルCoAの可視化が可能
- 使いきりの1mg包装



【参考文献】

- 1) Komatsu, H. et al.: *Chem. Commun.*, **49** (28), 2876 (2013).
- 2) 山次健三、金井求：和光純薬時報, **90** (1), 11 (2022).

コードNo.	品名	規格	容量	希望納入価格(円)
181-03521	RH-NH ₂	細胞生物学用	1mg	25,000

その他の蛍光プローブ試薬は当社のHPをご覧ください。
試薬事業トップ→ライフサイエンス→イメージング→蛍光プローブ(生体分子)

https://labchem-wako.fujifilm.com/jp/category/lifescience/tissue_clearing_imaging/fluorescence_probe_biomolecule/index.html

血球系、免疫系細胞への分化誘導、培養に

SCF 溶液, ヒト, 組換え体

Wako

SCF (Stem Cell Factor: 幹細胞因子) は、c-KIT受容体を介したシグナル伝達により造血を調節する成長因子です。多能性幹細胞から造血幹細胞、赤血球や血小板のような血球系細胞、T細胞やNK細胞のような免疫系細胞への分化誘導や培養に使用されます。

本品は、フィルター滅菌済みの溶液品のため、溶解やフィルター滅菌操作を行わずにそのまま培地に添加でき、溶解時のコンタミやフィルター滅菌時のタンパク質のロスを防ぐことができます。

本品は、味の素株式会社が製造しています。また、独立行政法人 医薬品医療機器総合機構 (PMDA) より再生医療等製品材料適格性確認書が発行されており、本品の構成成分及び各種構成成分の製造工程に使用される成分に、生物由来原料基準への適合性を示す必要があるヒト・動物由来成分はない、と判断されています。

特長

- 再生医療等製品材料適格性相談 確認書取得済み
- 溶解操作が不要な溶液品
- フィルター滅菌済みのため、そのまま培地に添加可能

溶液品の利点

粉末溶解時に懸念される下記のリスクが回避できます。

- 溶媒添加時のコンタミ
- フィルター滅菌時のフィルターへの吸着によるロス
- タンパク質濃度の保証
- 溶媒選択ミスによる失活

製品概要

- 起源: *Corynebacterium glutamicum* expressed human Stem Cell Factor
- 組成: 20mmol/L HEPES, pH 7.7 (0.2 μmフィルター滅菌済み)
- 純度 (SDS-PAGE): 95%以上
- タンパク質濃度: 0.10 ~ 0.14mg/mL
- 生物学的活性 (EC₅₀): 1.0 ~ 20ng/mL
(レポーターアッセイ用U2OS細胞を用いたc-KITりん酸化活性測定)
- エンドトキシン: 0.1EU/μg未満

コード No.	品名	規格	容量	希望納入価格 (円)
195-19071	SCF Solution, Human, recombinant	細胞培養用	10μg	43,000
191-19073			50μg	160,000

関連製品

幹細胞因子 (SCF)

SCFの粉末製品です。使用時には、適切な溶媒に溶解後、必要に応じフィルター滅菌を行ったのちに培地に添加して下さい。

コード No.	品名	規格	容量	希望納入価格 (円)
製造工程で動物由来原料を使用				
193-12811	Stem Cell Factor, Human, recombinant	細胞生物学用	10μg	41,900
199-12813			1mg	照会
製造工程で動物由来原料を使用せずに製造				
197-15511	Stem Cell Factor, Human, recombinant, Animal-derived-free	細胞生物学用	10μg	41,900
191-15514			250μg	照会
193-15513			1mg	照会

サイトカイン溶液

いずれもフィルター滅菌済みのため、そのまま培地に添加してご使用いただけます。

コード No.	品名	規格	容量	希望納入価格 (円)
再生医療等製品材料適格性確認書取得済み				
014-27621	Activin A Solution, Human, recombinant	細胞培養用	10μg	44,000
010-27623			50μg	154,000
原薬等登録原簿 (マスターファイル: MF) 登録品				
062-06661	bFGF Solution, MF	細胞培養用	50μL	100,000
068-06663			50μL×4	325,000

※原薬等登録原簿 (マスターファイル) への登録は、厚生労働省 (独立行政法人医薬品医療機器総合機構) による、品質及び安全性に関する確認または評価が行われたことを意味するものではありません。

動物細胞用培地カタログ

当社取扱いの動物細胞培養に使用される培地をまとめたカタログです。D-MEM や RPMI-1640 といった汎用培地から再生医療研究用培地まで幅広く約 50 品目収載しています。

カタログをご希望の場合は、当社 HP のカタログ請求ページより PDF 版をダウンロードいただけます。

<https://labchem-wako.fujifilm.com/jp/PG1857A1/download/index.html>



Refrigerated (2~10°C), F (20°C), H (80°C), L (150°C) storage conditions. Displayed without symbol indicates room temperature storage. Other abbreviations refer to the back cover. Content is as of April 2022. For the latest information, please refer to our website.

アンリ・ベクレル (1852. 12. 15 ~ 1908. 8. 25)

兵庫県立大学名誉教授 中辻 慎一

1. ベクレル家の伝統の継承者

天然に存在するウラン¹⁾には、放射線を出す働き、すなわち放射能をもっていることは現在では当然のことのように知られている。ウランの化合物やウラン自身が放射能をもっていることは、フランスのアンリ・ベクレル Antoine Henri Becquerel によって1896年に初めて発見された。今回は、物質（ウランおよびその化合物）からの放射能を初めて発見した、アンリ・ベクレルを紹介する（図1）^{2,3)}。

アンリ・ベクレルは、エドモン・ベクレル Alexandre Edmond Becquerel (1820-1891) を父、Aurélié Quénard (1829-1890) を母として、1852年12月15日にパリで生まれ、本年は生誕170周年に当たる。父エドモン・ベクレルは、当時パリの国立工芸院 Conservatoire national des arts et métiers (CNAM) の応用物理学教授で、後に国立自然史博物館 Muséum national d'histoire naturelle (MNHN) (図2) 応用物理学部門の教授となる科学者であった⁴⁾。また、祖父アントワーヌ・セザール・ベクレル Antoine-César Becquerel (1788-1878)



図2. アンリ・ベクレルが放射能を発見した国立自然史博物館の応用物理学研究室 (Wikipedia*)

※ https://fr.wikipedia.org/wiki/Muséum_national_d'histoire_naturelle (2021年11月30日閲覧)

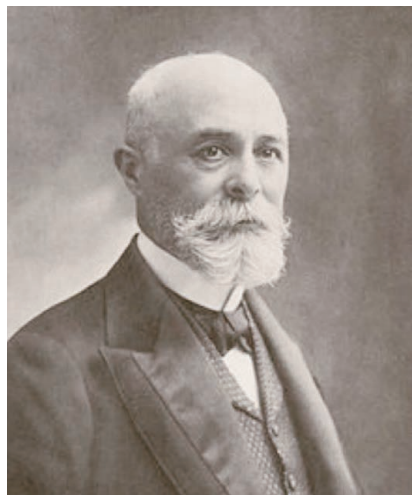


図1. アンリ・ベクレル (Wikipedia*)

※ <https://ja.wikipedia.org/wiki/アンリ・ベクレル> (2021年11月30日閲覧)

も長年に亘って国立自然史博物館応用物理学教授を務め、ベクレル家は科学の名門一家であった。後年にはアンリ・ベクレルも、祖父や父が占めていたポストを受け継ぐこととなり、約1世紀に亘って続くベクレル家の伝統の継承者となった。

2. 青年期から壮年期へ

アンリ・ベクレル（以後アンリと略記）は、パリのルイ14世リセ（高校）で学び、この頃から理系科目が得意であった。20歳になると、祖父や父も学んだ理工系の名門校エコール・ポリテクニク（図3）に入学して（1872年）工学を学び、2年後にそこを卒業した。1874年（22歳）に



図3. エコール・ポリテクニクの正門 (Wikipedia*)

※ https://en.m.wikipedia.org/wiki/École_Polytechnique (2021年11月30日閲覧)

は、エコール・デ・ボン・ゼ・ショセ（国立土木学校）の工学コースに入学し、3年後（25歳）に学位を授与された。この学位は、後年の研究の基盤として役立つと言われる。

この間の1876年（24歳）には母校エコール・ポリテクニクの講師に任命されたが、翌1877年（25歳）には、政府の橋梁・道路部門の技術者として任用された。しかし、翌1878年（26歳）には自然史博物館の助手に任命され、父エドモン・ベクレルが行っていた“リン光”の研究を始めた。さらに自身も、光を当てた物質による光吸収や発光と、それによる光色の変化に強く興味を引かれて研究を進め、これが博士論文（1888年）のテーマとなった。その後、再びエコール・ポリテクニクの物理部門に戻ったが、自然史博物館の応用物理学部門長であった父エドモンが逝去したのちの1892年（40歳）にはそのポストを継いで、博物館の教授となった。さらに、1895年（43歳）には母校エコール・ポリテクニクの教授にも任命されて、講義を担当した。

アンリの初期の研究は主に光の吸収や発光（特にリン光）に関するものであって、結晶の光吸収（博士論文のテーマ：“Recherches sur l'absorption de la lumière” 光の吸収に関する研究）、円偏光の研究、リン光性結晶などの研究を行った。これらの研究成果が認められて、1889年（37歳）にフランス科学アカデミーの会員に推挙された。後述のように、この発光の研究が、のちに放射能の発見という世紀の大発見に繋がったのであった。

3. 天然放射能の発見

1895年ドイツ・ヴェルツブルク大学のレントゲンが、真空管の中で電子を速いスピードで陽極にぶつけると、発光とともに物体を透過する力の強い光線、すなわちX線が出ることを発見した。レントゲンからX線の発見を知らされた数学者・物理学者アンリ・ポアンカレは、科学アカデミーにおいてそれを報告するとともに、発光するものから X線が出るのではないかとの示唆を

与えた。それを聞いたアンリ・ベクレルは、リン光研究用として父エドモンより引き継いで手元にあったウランの化合物（硫酸ウラニルカリウム）を用いて、早速1896年の初頭に次のような実験を行った。すなわち、写真乾板を黒い紙で包んでおき、その上にウラン化合物を載せて、太陽光の当たるところに出しておいた。そして、その乾板を現像してみると、ウラン化合物の形のとおり感光していた。従って、この時点では、当初の予想通りX線が発生しているものと考えた。次に、ウラン化合物と黒い紙の間に硬貨を置いて実験すると、その硬貨の影ができたので、ある厚さの金属は通さないということもわかった。さらに、光に当たった化合物が化学変化して蒸気のようなものを出し、それが黒い紙を通して感光する可能性もあったので、ガラス板を間に入れて実験したが、結果は同じであった。アンリはこの実験結果を、“Sur les radiations émises par phosphorescence”（リン光によって発せられる放射について）というタイトルで、2月24日の科学アカデミーに於いて発表した⁵⁾。

さらに、2月26日にこの実験を続けようとしたが、2月末のパリの空は曇って太陽が顔を見せなかった。そこでアンリは、黒い紙で包んだ写真乾板の上にウラン化合物を載せたまま、机の引き出しにしまっておいた。しかし、天気の良い日が続き、やっ

と晴れた3月1日に実験を再開しようとしてサンプルを取り出した。そのとき、「何日も暗所に置いたので、直射光線には当たっていないが、非常に薄いにもあるいは感光しているかも知れない」という考えが頭に浮かんだ。そして、試しにその乾板を現像してみたところ、薄いどころか今までになくはっきりと感光していた。驚いたアンリは実験を繰り返し、ウラン化合物は、太陽光線を当てようと当てまいと関係なく、写真乾板を感光させる働きをもっていることを確かめた（図4）。すなわち、ウラン化合物は、それまでに発見されていたX線やケイ光・リン光などと異なり、外からエネルギーを与えなくても、自発的に放射線を出すということを発見したのであった。この発見は、“Sur les radiations invisibles émises par les corps phosphorescents”（リン光性物体から発せられる目に見えない放射について）というタイトルで、3月2日の科学アカデミーに於いて発表された（図5）⁵⁾。

この1896年3月1日の科学史上で有名な放射能の発見は偶然の産物であって、セレンディピティー Serendipityの代表的な例として挙げられる⁶⁾。しかしながら、これは祖父や父から受け継いだリン光や写真に関する研究と、アンリのもつ探究心や卓越した観察眼が結実した結果とみなすことができよう。まさに、同じフランスの碩学ルイ・パスツールが言った「待ち構

えた心」(les esprits préparés)に女神が微笑んだ瞬間であった。

その後も彼はこの興味深い性質を示すウラン化合物について研究を進め、ウラン化合物から発せられるこの放射線はまわりの空気を帯電させることなどの知見を科学アカデミーで次々と発表した（3月だけでも他に3報）。

アンリはまた、5月18日の例会では“Émission de radiations nouvelles par l'uranium métallique”（金属ウランからの新しい放射線の放出）というタイトルの発表を行い、ウラン元素を含むものであれば固体でも液体でも同じ放射線を出し、金属ウランではその化合物よりも効果が強いことを確認している⁵⁾。

このウランから発せられる放射線を、彼自身は“ウラン線” (rayon uranique) と呼んだが、マリー・キュリーらは“ベクレル線” (rayon de Becquerel) と呼び、ウランが放射線を出す能力はのちにマリー・キュリー⁷⁾によって“放射能” (Radioactivité) と名付けられた。

このように、アンリは最初に計画していた、リン光性化合物に光照射してX線を発生させるという実験から、当初は思いもよらなかったセレンディピティーによって、ウラン化合物が自発的に放射線を出す放射能をもっていることを発見したのであった。

4. その後の放射能研究の展開と晩年

アンリの発見は、当初は周囲の科学者を驚かせたものの、彼自身その後は次第

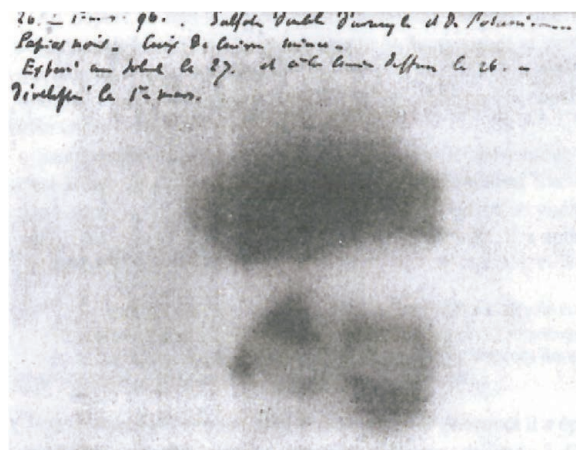


図4. 感光した写真プレート（上部に自筆メモ書きが見られる）（文献2）

PHYSIQUE. — Sur les radiations invisibles émises par les corps phosphorescents.
Note de M. HENRI BECQUEREL.

« Dans la dernière séance, j'ai indiqué sommairement les expériences que j'avais été conduit à faire pour mettre en évidence les radiations invisibles émises par certains corps phosphorescents, radiations qui traversent divers corps opaques pour la lumière.

» J'ai pu étendre ces observations, et, bien que je me propose de continuer et de développer l'étude de ces phénomènes, leur actualité me conduit à exposer, dès aujourd'hui, les premiers résultats que j'ai obtenus.

» Les expériences que je rapporterai ont été faites avec les radiations émises par des lamelles cristallines de sulfate double d'uranyle et de potassium

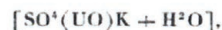


図5. 3月2日に発表された論文の冒頭部分（原著論文コピー）

に関心が薄れていった。ちょうどそのような頃に、ピエール・キュリーと結婚してマリイ・キュリーとなったばかりのポーランド出身の女性科学者マリア・スクロドフスカは、学位論文の研究テーマを探していた。そして彼女が目にしたのが、新しい放射線に関するアンリ・ベクレルの報告であった。彼女は、ウランの放射線に似た性質をもっている物質が他にもあるのではないかと考えて、新たな研究に着手した。そして、1898年にドイツのG. C. シュミットとほぼ同時に、トリウム化合物が同様な性質を示し、ウランよりもっと強い活性を示すことを見出した。

さらに同年マリイは、ウラン鉱石ピッチブレンドではウラン含有量に比べて数倍の放射能があることから、何か未知の物質(元素)があるのではないかと推察した。そして、化学的分離手法を丹念に適用して、夫ピエールとともに1898年に新しい放射性元素のポロニウムとラジウムを相次いで発見したのであった。この彼らの歴史的成果は、アンリ・ベクレルによって科学アカデミーで紹介された。

また、翌1899年にイギリスのE. ラザフォードは、ウランからの放射線が、薄いアルミニウム箔に吸収されるものとそれを通過するものに分かれることを示し、前者を α 線、後者を β 線と呼んだ。

このような新発見が相次いだことから、アンリのウラン放射線の研究成果は、一般に広く受け入れられることとなり、その発見から7年後の1903年度のノーベル物理学賞が、アンリ・ベクレルとマリイおよびピエール・キュリーに授与された。

ところで、マリイとピエール・キュリーは、同じパリ市内の自然史博物館やエコール・ポリテクニクとそれほど離れていない市立物理化学学校で研究しており、アンリとは距離的にも近い関係にあった。マリイおよびピエール・キュリーの目覚ましい発見に触発されたアンリは、2人と交わりながらさらに放射線の研究を展開した。そして、1899年にはラジウム化合物を用いて、ラザフォードによって確認された α 線および β 線が磁気的にも分離されることを

示した。

また、当時新しく発見されたラジウム化合物は、治療薬や人工肥料などへ適用することによって、新たに人類に幸せをもたらす夢の物質となることが期待された。このようなときに、アンリはピエール・キュリーとともにラジウム放射線の生理学的作用について研究し、ラジウム化合物を長時間皮膚にさらすと炎症を生ずることを観察して1901年に発表した。恐らく当時のアンリには放射能被ばくの恐怖は殆ど念頭になく、キュリー夫妻からもらったラジウム化合物入りのガラス管をベストのポケットに入れて持ち歩いていたといわれる。彼はノーベル賞受賞から5年後の1908年8月25日、放射能の被ばくがその原因とされる心疾患によって亡くなった。享年55歳であった。

5. 後継者と放射能の単位について

アンリは1877年にLucie Zoé Jamin (1857-1878) と結婚し、2人の間にジャン・ベクレル Jean Becquerel (1878-1953) が誕生したが、生後ほどなく妻を亡くしている。その後1890年にはLouise Désirée Lorieux (1864-1945) と再婚したが、2人の間には子宝は恵まれなかったようである。

ベクレル家の伝統は、幸いにもそのひとり息子ジャンによって受け継がれた。ジャンは、父アンリと同様にエコール・ポリテクニクを卒業し、国立土木学校を経て、父の死後の1909年に自然史博物館のポストを引き継いだ。彼は、結晶の光学的性質や磁性について研究し、特に磁場中での偏光面の回転を解析した。また、1919年から1924年の間には母校エコール・ポリテクニクの教授も務め、特に相対論の教育や研究を熱心に進めた。従って、国立自然史博物館やエコール・ポリテクニクにおけるベクレル家の科学の伝統は、約1世紀半の長きに亘って守られたのであった。

また、アンリ・ベクレルについては、放射能の量を表す単位にその名前が残されている。すなわち、放射性物質から放

射線がどのくらい出ているかという事を表すのに、放射性核種が1秒間に崩壊する原子の個数を表す単位としてベクレル(Bq)が使われている(1975年の国際度量衡総会にて制定された)。その測定は、シンチレーション検出器やガイガー・ミュラー計数管などによって行われる。

2011年の東京電力福島原子力発電所事故以来、スウェーデンの科学者に由来し、生体の被爆による生物学的影響の大きさを表す単位「シーベルト」とともに、アンリ・ベクレルに由来するこの単位「ベクレル」を日常的に耳にすることが多くなったのは、まだ記憶に新しいところであろう。

謝辞

本稿の執筆を勧めていただいた大阪大学名誉教授鈴木晋一郎先生に心より感謝申し上げます。

【参考文献】

- 1) 桜井弘著:「元素111の新知識(第2版増補版)」, p. 370-378(講談社ブルーバックス)(2013).
- 2) Jean-Louis Basdevant: "Henri Becquerel: découverte de la radioactivité", *Bibnum* (Open Edition Journal), 1-12 (2008). (<https://journals.openedition.org/bibnum/848>, 2021年7月28日閲覧).
- 3) 阪上正信:「H. Becquerelと放射能の発見100年」, 化学史研究, **23**, 167 (1996).
- 4) 中辻慎一:「光起電力現象の発見者 Edmond Bequerel」, 化学, **75** (8), 47 (2020).
- 5) 物理学史研究刊行会編:「物理学古典論文叢書7「放射能」(東海大学出版会)(1970).
- 6) R. M. ロバーツ著、安藤喬志訳:「セレンディピティー 思いがけない発見・発明のドラマ」, p. 202-206 (化学同人)(1993).
- 7) 島尾永康:「マリイ・キュリー」, 和光純薬時報, **70** (4), 2 (2002).

精製エクソソームからのRNA抽出に！

Wako

精製 EV 用 マイクロ RNA エキストラクター[®] キット

本品は、細胞培養上清や血清・血漿などから精製したエクソソーム溶液のmiRNAを含むTotal RNA抽出に最適化したキットです。この最適化により、当社従来品（マイクロRNAエキストラクター[®] SPキット；コードNo. 295-71701）よりも高濃度でのRNA回収を実現しました。

近年、エクソソームのmiRNAプロファイル解析の需要はますます高まっています。本品を使用することで、精製エクソソーム溶液から高効率にmiRNAを含むRNAを回収することができます。エクソソーム研究にお役立て下さい。

特長

- 精製エクソソーム溶液からのRNA抽出に最適化
- 高いRNA回収率
- フェノール及びクロロホルム不要
- 抽出RNAはRT-qPCR、マイクロアレイ、NGSに使用可能

適応サンプル

細胞培養上清及び血清・血漿などから精製したエクソソーム溶液

キット内容

- 溶解液 9.0mL×1本
- 還元剤 80 μL×1本
- タンパク質分解酵素液 200 μL×1本
- 促進剤 200 μL×1本
- 洗浄液 I 5mL×1本
- 洗浄液 II 5mL×2本
- 溶出液 1mL×2本
- スピんカラム 20本
- コレクションチューブ 20本

*キット以外に下記試薬が必要です。

- 1) 2-プロパノール（コードNo. 168-21675）
- 2) エタノール（コードNo. 054-07225）
- 3) 1-ブタノール（コードNo. 022-16035）

※ホスファチジルセリン（PS）結合分子を用いて細胞外小胞を金属イオン依存的に捕捉した後、キレート剤により溶出する方法。MagCapture[™] Exosome Isolation Kit PS Ver.2（コードNo. 290-84103）の使用により、本手法でのエクソソーム精製が行えます。

コード No.	品名	規格	容量	希望納入価格(円)
294-84601	microRNA Extractor [®] Kit for Purified EV	遺伝子研究用	20回用	40,000

QuantifluorはPromega Corporationの商標または登録商標です。

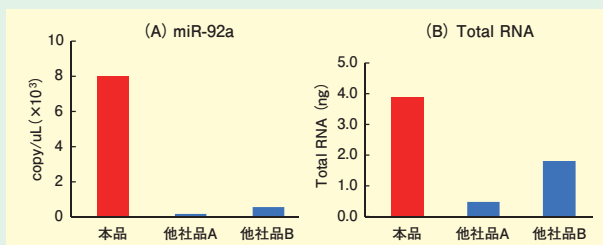
F…2～10℃保存 F…20℃保存 F…80℃保存 F…150℃保存 表示がない場合は室温保存です。
 特定 毒…特定毒物 毒…毒物 劇…劇物 毒…毒薬 劇…劇薬 危…危険物 精…向精神薬 特…特定麻薬向精神薬原料
第1…化審法 第一種特定化学物質 第2…化審法 第二種特定化学物質 化禁1…化学兵器禁止法 第一種指定物質 化禁2…化学兵器禁止法 第二種指定物質 カルタヘナ…カルタヘナ法
覚…覚せい剤取締法 国保…国民保護法
 掲載内容は、2022年4月時点での情報です。上記以外の法律及び最新情報は、当社HPをご参照下さい。

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。

データ

RNA抽出・定量



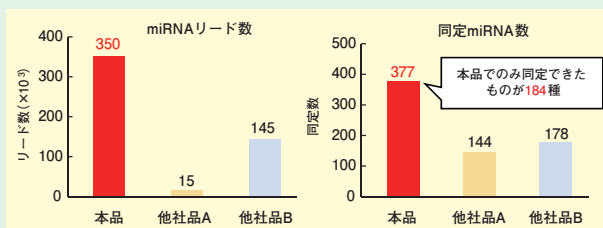
臍帯由来間葉系幹細胞をEV-Up[™] MSCエクソソーム産生用培地 [コードNo. 053-09451, 298-84001] で培養後、培養上清を回収した。回収後、PSアフィニティー法[®]を用いてエクソソームを精製し、本品及び他社品でRNA抽出を行った。抽出物のRNA量をRT-qPCRとQuantifluor RNA System (Promega) によりそれぞれ測定した。

(A) RT-qPCRによるmiR-92aの定量データ

(B) Quantifluor RNA SystemによるTotal RNA測定データ

本品は、他社品よりも高い抽出効率を示した。

次世代シーケンサー (NGS) による解析



臍帯由来間葉系幹細胞をEV-Up[™] MSCエクソソーム産生用培地 [コードNo. 053-09451, 298-84001] で培養後、培養上清を回収した。回収後、PSアフィニティー法[®]を用いてエクソソームを精製し、本品及び他社品でRNA抽出を行った。抽出物に対してNGS解析 (Small RNA-Seq) を行った。本品で抽出したサンプルは、他社品よりもmiRNAのリード数が多く、miRNAの同定数も多いことが示された。

和光純薬時報 Vol. 90 No. 2

2022年4月15日発行

発行責任者 増田雅信

編集責任者 大西礼子

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-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