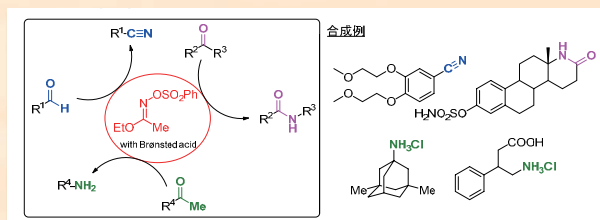


# 和光純薬時報

October 2021  
Vol.89 No.4



オキシム試薬による官能基変換

## 【総説】

- 「ヒドロキシルアミン等価体オキシム試薬によるアミド/アミン/ニトリルへの官能基変換」 兵藤 憲吾…………… 2  
 〈テクニカルレポート〉  
 「超耐熱性エンド型セルラーゼの開発とその応用例」 仙波 弘雅、坪井 宏和、石川 一彦…………… 6  
 「間葉系幹細胞由来エクソソーム産生用無血清培地の開発 エクソソームを利用した再生医療の実現に向けて」 丸谷 祐樹、山根 昌之…………… 8

## 【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—〉  
 「第2回 食品に含まれるヒ素化合物について」 橘田 規…………… 10  
 〈ミクログリア研究の最前線—基礎から臨床へ—〉 **最終回**  
 「第6回 ミクログリア-アストロサイト連関による脳卒中の制御」 小泉 修一…………… 12  
 〈よくわかるBDNF—基礎から臨床まで—〉  
 「第2回 BDNF 発生発達期の機能と発達障害との関係」 鈴木 辰吾…………… 14  
 〈ヒトiPS細胞由来分化細胞の創薬応用〉  
 「第2回 ヒトiPS細胞やオルガノイドを用いたSARS-CoV-2研究」 出口 清香、高山 和雄…………… 17

## 【化学大家】

- 「ヨアン・オーガスト・アルフェドソン」 白勢 洋平…………… 29

## 【製品紹介】

### 有機合成

- O-ベンゼンスルホニルアセトヒドロキサム酸エチル…………… 5  
 マリモ粒子…………… 20

### 分析

- ひ素標準液…………… 11  
 JCSS…………… 21  
 局方生薬試験用オイゲノール…………… 21  
 ニトロソアミン類標準品…………… 22  
 ポジティブリスト関連農薬標準品…………… 22

### 免疫

- Mature BDNF ELISAキットワコー…………… 16  
 オキシトシンELISAキットワコー…………… 23  
 抗SARS-CoV-2 S-RBD IgG ELISAキットワコー…………… 24

### 細胞生物

- セルラーゼ, 超耐熱性, 組換え体, 溶液…………… 7

### 遺伝子

- EV-Up™ 培地 関連製品…………… 9  
*in vivo*用 EV-Save™ 細胞外小胞ブロック試薬…………… 25  
 アイソスピル ソイル DNA…………… 26

### 培養

- iCell® Products…………… 19  
 SRV™ iPSC Vector シリーズ…………… 27  
 Y-27632…………… 28  
 SOFORO Cryo…………… 28

### ラボウェア

- ガロテクト™…………… 20  
 除菌消臭スプレー FW、天然消臭剤FW…………… 23

## 【お知らせ】

- 生薬試験用試薬カタログのご案内…………… 21 第36回Wakoワークショップ開催のご案内…………… 32

### 1 はじめに

ヒドロキシルアミンは、アンモニアの酸化物の1つであり、単体では潮解性や爆発性を有し、その取り扱いには注意を要する。過去には国内外にてヒドロキシルアミンが原因となる爆発事故が発生し、危険物に指定されている。ヒドロキシルアミンは、単体よりも取り扱いやすい塩酸や硫酸などの鉍酸塩としても扱われるが、オキシム合成時には鉍酸塩を中和するために、化学量論量の塩基を使用する必要があり、反応後には生成物と共に、大量の無機塩が発生することが問題となる。一方で、蚕の蛹に含まれる酵素トランスオキシマーゼは、直接ヒドロキシルアミンを用いることなく、オキシムから別のオキシムを合成するトランスオキシム化反応を起こし、pH 5-6、37℃の条件にて、ピルビン酸オキシムからアセトンやアセトアルデヒドへのトランスオキシム化反応を行うことができる<sup>1)</sup>。

筆者らは、酵素によるトランスオキシム化反応をモチーフに、オキシム化合物を、爆発性を有するヒドロキシルアミンの等価体と見做せると考え、非酵素的に、酸触媒によるトランスオキシム化反応を開発した (Figure 1)<sup>2)</sup>。具体的には、水中にて過塩素酸触媒存在下、アルデヒドもしくはケトンに対して、メチルエチルケトンオキシム (MEKO) をオキシム化剤として用い、非常に温和な条件で触媒的に、対応するアルドオキシムもしくはケトオキシムを合成した。また、反応剤として用いたMEKOは反応後、メチルエチルケトン (MEK) として蒸留によって回収することも可能であり、MEKからはゼオライト触媒によるアンモ酸化によって再びMEKOを合成できる手法も知られていることから、循環型の原料として考えることができる<sup>3)</sup>。

ヒドロキシルアミンの等価体として

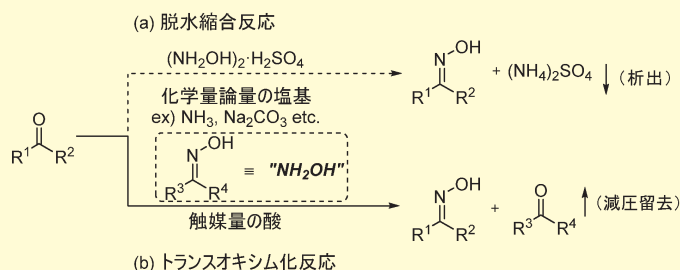


Figure 1. オキシム合成法: (a) 脱水縮合、(b) トランスオキシム化反応

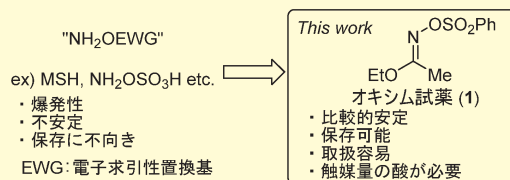


Figure 2. ヒドロキシルアミン等価体オキシム試薬

オキシムを見做す考えをさらに発展させ、ヒドロキシルアミン誘導体であるMSH試薬 (*O*-(mesitylenesulfonyl) hydroxylamine) に着目した<sup>4)</sup>。MSH試薬はヒドロキシルアミンの水酸基にメシチレンスルホニル基が修飾された構造であり、強力な求電子のアミノ化剤として知られている反面、不安定で爆発性があり、保存に不向きなため、逐次試薬を調製して用いる必要があった。筆者らは、オキシムの水酸基に電子求引性置換基が導入されたオキシムを、トランスオキシム化反応を駆使すれば、MSH試薬のようなヒドロキシルアミン誘導体の等価体として扱えると考えた (Figure 2)。合成したオキシム試薬 1は、アルゴン雰囲気下で冷凍庫にて長期保存が可能であるとともに、DSCによる熱分析から発熱開始温度が従来のMSH試薬 (15 wt%水を含む) の62℃から156℃へ大幅に上昇したことから、オキシム試薬がMSH試薬に比べ安定性が向上したことが確かめられた。次に、試薬としての特徴であるオキシム試薬を用いた種々の官能基変換反応について説明する。

### 2 ケトンからの二級アミド合成

オキシムを出発原料とするベックマン転位からは、二級アミドが得られ、特にラクタム合成に対して有効であり、今なおナイロン6の製造など工業的にも極めて汎用性が高い方法である。一般的な合成法では、化学量論量の強酸や高温条件を要するが、近年温和な条件のもと、有機分子触媒による合成法が開発されている<sup>5)</sup>。一方で、ケトオキシムの前駆体であるケトンからベックマン転位を経て直接二級アミドを合成する方法は、ケトンのカルボニル炭素の隣接位に対して、形式的にNH挿入される反応となるだけでなく、オキシムの合成及びその幾何異性体を分離精製する工程を省略することができ、魅力的な方法であるが、それほど多くの報告例はない。その主な反応剤には、ヒドロキシルアミン鉍酸塩とヒドロキシルアミン誘導体であるMSH試薬が知られている。しかしながら、高温下では不安定で爆発性を示すヒドロキシルアミンを苛酷な反応条件で用

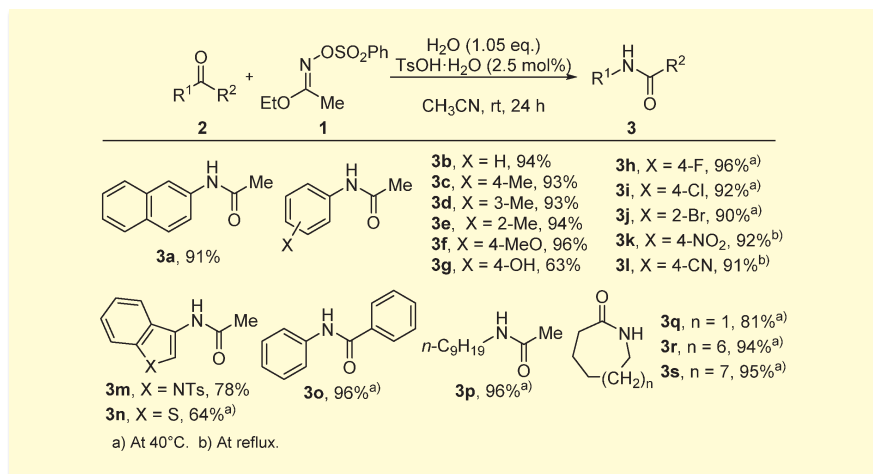


Figure 3. 二級アミドの基質一般性

いる必要があった<sup>6)</sup>。また、MSH試薬を用いた場合には、温和な条件で反応が進行するものの、*O*-メシチレンスルホニル-ケトンオキシム形成後に塩基性アルミナ/メタノールを処すことで段階的にアミドを合成するため、やや手間がかかる<sup>7)</sup>。そこで、筆者らはヒドロキシルアミン等価体として開発したオキシム試薬を用い、ケトンから直接的な二級アミドの合成を行った<sup>8)</sup>。

トシル酸一水和物を触媒として、アセトニトリル中、2'-アセトナフトン **2a** とオキシム **1** を用いて室温にて反応条件の最適化を行ったところ、予想に反し、ほとんど対応するアミドは得られなかった。しかし、興味深いことに、水の添加量を増すにつれてアミドの収率が向上した。そこで、水の役割を明らかにするために、同位体酸素 <sup>18</sup>O 水を用いてアミド合成を行った結果、ESI-MS 測定より、得られたアミドのうち 53% のアミドが <sup>18</sup>O ラベル化されていることが分かった。この実験事実から、反応に添加した水の一部はアミドのカルボニル酸素を形成する際に消費されることが明らかになった。

そして、最適化された反応条件を基に、様々なケトン類を原料にして、トシル酸一水和物 2.5 mol% を触媒に用い、オキシム転移/バックマン転位を経るアミド合成を行った (Figure 3)。

アセトフェノン類では、芳香環上に電子供与性置換基を有する場合、室温にて対応するアミドが得られた (**3c-3g**)。ハロゲン化アリアルでは 40°C、電子求引性置換基であるニトロ基やシアノ基では、反応性が低下し、還流条件において、目的とするアミドを高収率で得ることができた (**3h-3l**)。また、ヘテロ環であるインドールやベンゾチオフェンについても対応するアミドを与えた (**3m**, **3n**)。芳香族-芳香族ケトンのようなベンゾフェノンや鎖状のアルキル-アルキルケトンでは、40°C で対応するアミドを収率良く合成でき、環状脂肪族ケトンからはラクタムを首尾よく与えた (**3o-3s**)。

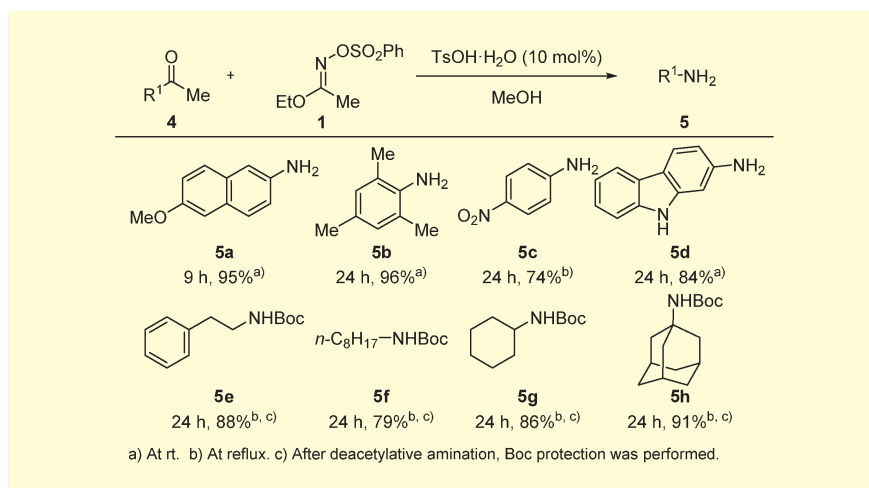
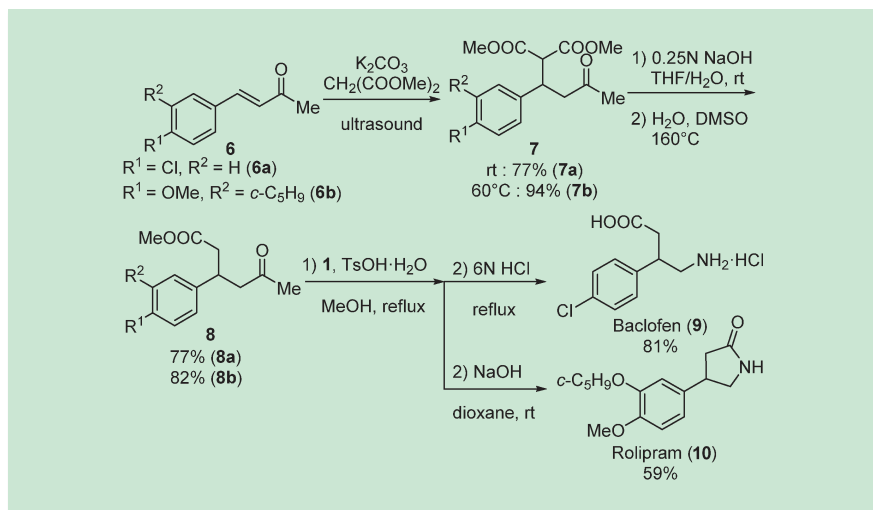


Figure 4. 脱アセチル型アミノ化反応の基質一般性

### 3 アセチルアレーンからの脱アセチル型アミノ化反応

ケトンからの直接的な二級アミド合成では、バックマン転位後に生じたニトリリウムイオンに添加した水が付加してアミドが生じることを明らかにした。ここで得られた知見の基、ニトリリウムイオンを水で捕捉するのではなく、アルコールによってニトリリウムイオンを分解すれば、ピナー反応のように、イミデートを経由して、オルトエステルとともに、アンモニアが副生するかの如く、アミンが生成すると考えた<sup>9)</sup>。

アミド合成の最適条件を基に、添加剤を水からメタノールに変更して反応を行ったところ、思惑通り、24時間後に、対応する芳香族アミンが得られた。さらに、溶媒をアセトニトリルからメタノールに変更した時には、反応が加速し、9時間で反応は完結した。次に、得られた最適な反応条件下で、様々なアセチルアレーン **4** に対する芳香族アミノ化反応を実施した (Figure 4)。両オルト位に置換基を有する場合には、反応時間が長くなる傾向があった (**5b**)。電子求引性置換基では、供与性置換基に比べ、反応性が劣り、60°C の加熱を必要とした (**5c**)。そし



Scheme 1. 脱アセチル型アミノ化反応による医薬品合成例

て、ヘテロ環を有する基質についても反応の進行を確認することができた(5d)。また、アセチルアルカンから一級、二級、三級アルキルアミンの合成も可能であった(5e-5h)。

脱アセチル型アミノ化反応の応用として、遷移金属フリーでの2種類の $\gamma$ -アミノ酪酸(GABA)医薬品類の合成を行った(Scheme 1)。両化合物は、benzylidenacetone誘導体**6**を出発原料として用い、マロン酸ジメチルを付加させ、その後加水分解及び脱炭酸反応によって、鍵中間体**8**を合成した。化合物**8**に対して、脱アセチル型アミノ化反応を実施した後に、酸による加水分解を行いBaclufen**9**(筋弛緩剤)を、塩基による環化反応によってRolipram**10**(抗炎症薬)を合成した。

## 4 アルデヒドからのニトリル合成

通常、アルデヒドに対してヒドロキシルアミンを反応させると、脱水縮合してアルドオキシムが得られ、さらにアルドオキシムを脱水することでニトリルへと2段階で変換することができる<sup>10)</sup>。しかし、オキシム試薬をアルデヒドと反応させた場合には、水酸基に修飾された高い電子求引性置換基の効

果によって、アルドオキシムで反応が終結せず、一気にニトリルまで官能基変換される(Figure 5)<sup>11)</sup>。具体的には、触媒にはトリフルオロメタンスルホン酸を用い、塩化メチレン中、種々のアルデヒドとオキシム試薬を反応させると、芳香族アルデヒドでは、電子求引性置換基や電子供与性置換基に関わらず反応は進行した(12a-12i)。またメトキシ基については、オルト、メタ、パラ位と置換基の位置が異なる場合にも問題なく反応が進行した(12c-12e)。ヘテロ環についても首尾よく反応が進行し、インドールの場合には触媒をビス(トリフルオロメタンスルホン酸)イミドとし、30 mol%用いるこ

とで良好な収率が得られた(12j、12k)。脂肪族アルデヒドについては、直鎖や $\alpha$ -分岐型アルデヒドも高い反応性を示した(12l、12m)。

## 5 おわりに

以上のように、筆者らは不安定で取り扱いに注意を要するヒドロキシルアミンの等価体として比較的安定なオキシム試薬を用いることによって、ケトンからは二級アミド、アセチルアレン及びアルカンからは脱アセチル型アミノ化反応により第一級アミン、アルデヒドからはニトリルへと官能基変換させることができた。この試薬によって、従来まで官能基変換するのに2、3ステップ要した反応もワンステップで実施できるため、ステップエコノミーとなる。また、いずれの反応についても汎用性の高い有機酸で行えるため、遷移金属フリーで実施できる点も魅力的である。

## 6 謝辞

本研究を実施するにあたり、ご助言賜りました龍谷大学理工学部 内田欣吾 教授に深く感謝申し上げます。また、実際に研究を遂行するにあたり、大石高輝 修士、長谷川源和 修士、山崎勝之 学士、富樫晃典 学士はじめ関

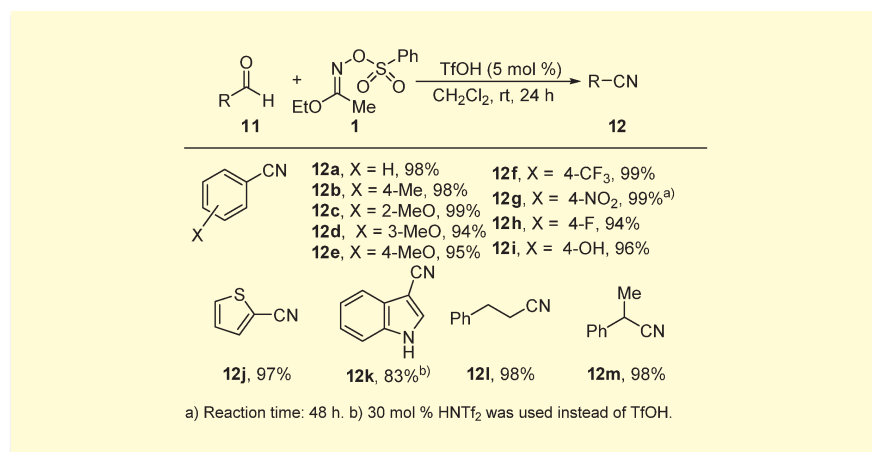


Figure 5. ニトリルの基質一般性



わった学生らに感謝致します。ESI-MS測定では、龍谷大学理工学部 浅野昌弘 博士にご協力頂き、同位体酸素<sup>18</sup>O水については、ご提供頂きました大陽日酸株式会社 前田広正 様、御尽力頂きました和研薬株式会社 大川拓哉 様に御礼申し上げます。そして、本研究は有機合成化学協会カネカ研究企画賞及び宇部興産学術振興財団学術奨励賞による助成金によって支援を受けて行われたものであり、関係諸機関に深く感謝申し上げます。

最後に、本研究に御関心をお持ち頂き、オキシム試薬を市販化して頂くとともに、執筆の機会を与えて頂きました富士フィルム和光純薬株式会社 大野桂二 氏、三宅寛 氏及び関係者の皆様に厚く御礼申し上げます。

### 〔参考文献〕

- 1) Yamafuji, K. : *Nature*, **171**, 745 (1953).
- 2) Hyodo, K. *et al.* : *Green Chem.*, **18**, 5788 (2016).
- 3) Song, F. *et al.* : *Appl. Catal. A : General*, **327**, 22 (2007).
- 4) Tamura, Y. *et al.* : *Synthesis*, **1** (1977).
- 5) (a) Furuya, Y. *et al.* : *J. Am. Chem. Soc.*, **127**, 11240 (2005). (b) Vanos, C. M. *et al.* : *Chem. Sci.*, **1**, 705 (2010). (c) Mo, X. *et al.* : *J. Am. Chem. Soc.*, **140**, 5264 (2018).
- 6) Selected example) Mahajan, S. *et al.* : *Tetrahedron Lett.*, **56**, 1915 (2015).
- 7) Tamura, Y. *et al.* : *Synthesis*, 215 (1973).
- 8) Hyodo, K. *et al.* : *J. Org. Chem.*, **83**, 13080 (2018).
- 9) Hyodo, K. *et al.* : *Org. Lett.*, **21**, 2818 (2019).
- 10) Recent selected examples) (a) Ishihara, K. *et al.* : *Angew. Chem. Int. Ed.*, **41**, 2983 (2002). (b) Yamaguchi, K. *et al.* : *Angew. Chem. Int. Ed.*, **46**, 3922 (2007). (c) Yu, L. *et al.* : *Org. Lett.*, **16**, 1346 (2014).
- 11) Hyodo, K. *et al.* : *Org. Lett.*, **19**, 3005 (2017).



### トランスオキシム化反応 (オキシム転移反応)

アルデヒド (ケトン) とオキシムを酸触媒存在下反応させると、アルデヒド (ケトン) 由来のオキシムとオキシム由来のカルボニル化合物が生成する。

### ベックマン転位

ケトン由来のオキシムであるケトオキシムを酸触媒存在下反応させると、分子内転位反応が起きて二級アミドが生成する。

### ビナー反応

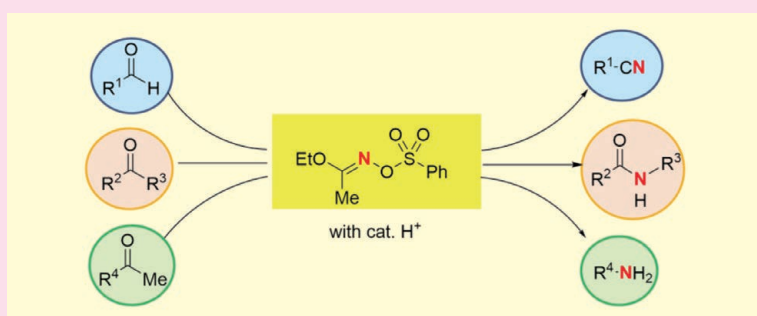
塩化水素などの酸存在下、ニトリルとアルコールが縮合してイミダートが得られる反応。

## 種々の官能基変換が可能なオキシム反応剤

### O-ベンゼンスルホニルアセトヒドロキサム酸エチル

本品は、種々の官能基変換ができる優れた反応剤です。

Wako



詳細はこちら



コード No.	品名	規格	容量	希望納入価格(円)
055-09411	Ethyl O-Benzenesulfonylacetohydroxamate <span style="border: 1px solid black; padding: 0 2px;">F</span>	有機合成用	5g	18,000
053-09412			25g	45,000

### 関連製品

コード No.	品名	規格	容量	希望納入価格(円)
207-13402	<i>p</i> -Toluenesulfonic Acid Monohydrate	試薬特級	25g	1,700
201-13405			500g	3,550
208-06663	Trifluoromethanesulfonic Acid <span style="border: 1px solid black; padding: 0 2px;">I</span>	和光特級	10g	3,500
200-06662			25g	5,000
202-06661			100g	17,000

R…2~10℃保存 F…20℃保存 I…80℃保存 H…150℃保存 表示がない場合は室温保存です。その他の略号は、巻末をご参照下さい。掲載内容は、2021年10月時点での情報です。最新情報は、当社HPをご参照下さい。

## 超耐熱性エンド型セルラーゼの開発とその応用例

大関株式会社 総合研究所 仙波 弘雅、坪井 宏和  
 国立研究開発法人 産業技術総合研究所 石川 一彦

### ◆はじめに

世界的なバイオエタノール産業への関心の高まりとともに、セルロース加水分解酵素（セルラーゼ）の研究が盛んに行われてきた。特に糸状菌 *Trichoderma reesei* は多量のセルラーゼを菌体外に分泌することから多くの研究が行われており、現在様々な分野で使用されている。一方で *T. reesei* 由来セルラーゼに代表される一般的なセルラーゼは熱安定性が低いことが多く、60℃程度の温度でその機能を失ってしまう。そのため高温条件で行われることが多い糖化工程などでの使用には不向きであり、高温で安定なセルラーゼの開発が望まれている。そこで本稿では高温条件下でも使用可能な超好熱性古細菌 *Pyrococcus horikoshii* 由来耐熱性セルラーゼについて、更なる耐熱化とその応用例について概説する。

### ◆耐熱性エンドグルカナーゼとその超耐熱化

沖縄近海の熱水鉱床から単離された超好熱性古細菌 *P. horikoshii* の生産するエンド型セルラーゼ（エンドグルカナーゼ：EG）は、至適温度が100℃以上と非常に高い耐熱性を有する。我々はこの耐熱性エンドグルカナーゼに対してアミノ酸点変異導入を行うことで熱安定性の更なる向上を目指した。既存酵素との配列比較から熱安定性に寄与する可能性のある箇所へアミノ酸置換を導入した変異体を作成し、熱安定性を指標としたスクリーニングを行った結果、98℃、30分間加熱処理後の残存活性が野生型と比較して約3倍に向上した変異酵素が取得できた（図1a）。この変異酵素は野生型酵素と比較して高温下での安定性に優れており、100℃近い高温条件下での長時間の反応においても高い活性を保持していた（図1b）。さらに我々は糸状菌を宿主とした独自の異種タンパク質高発現システムを利用して本酵素の大量発現にも成功しており、この酵素が高温条件に長時間晒される

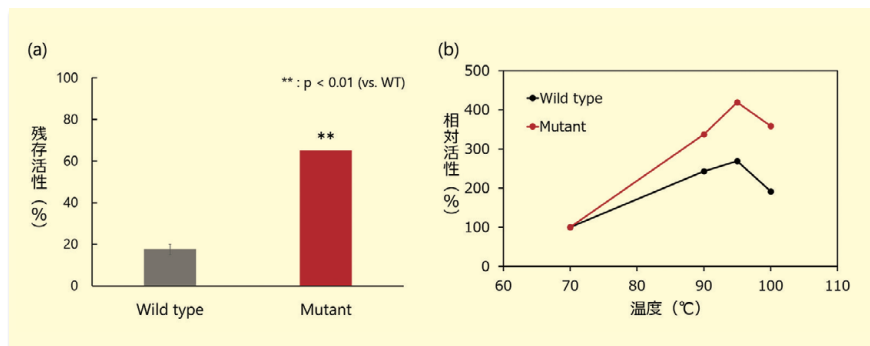


図1. 超耐熱性エンドグルカナーゼの耐熱性評価

- (a) アミノ酸置換を導入することで耐熱性酵素の更なる耐熱化に成功した。熱安定性の評価は98℃、30分間加熱後の残存活性を、カルボキシメチルセルロース (CMC) を基質とした70℃、10分間反応時の活性にて評価した。アミノ酸置換前 (Wild Type) と比較して、アミノ酸置換導入後 (Mutant) は残存活性が約3倍に向上した。
- (b) 70℃～100℃で1時間の反応を行った際の活性値を評価した。アミノ酸置換導入により熱安定性が向上しているため、高温での反応においてより高い活性を維持しており、特に100℃近い温度で顕著な差が見られた。

過酷な条件において簡便に使用できる有用な酵素となると期待している。

### ◆超耐熱性エンドグルカナーゼのナノセルロースへの応用

超耐熱性エンドグルカナーゼが効果を発揮する分野として、ナノセルロース分野への応用が考えられる。近年、天然セルロースからセルロースナノファイバー (CNF) やセルロースナノクリスタル (CNC) のようなナノセルロースを調製して新しいバイオ素材とする研究開発が加速している。特に、鋼鉄の5分の1の軽さで5倍の強度を有するCNFは、軽量・高強度・高弾性・低熱膨張・安全安心な天然物・再生型資源といった優れた特徴を持ち、その早期社会実装に向けた各種取り組みが進んでいる。図2で示すよ

うに、天然植物を粉砕して得られる結晶性セルロース (図2A) を物理的に微細化することでCNFの調製が可能になる (図2B)。さらに、CNFにエンドグルカナーゼを作用させると、アビセルのような微結晶セルロース由来のCNFは透明になる (図2C)。これはCNFがエンドグルカナーゼにより完全糖化されたわけではなく、非結晶領域が取り除かれたことによる現象である。ナノセルロースは結晶性セルロースを主体とした多様な特徴を有する天然再生型素材であるが、普及に向けた最大の問題は既存材料と比較した時にコストが高いことであり、コストを下げるためには高効率生産技術の開発、さらには、量産効果が得られるレベルで大量に消費できる用途を見いだ

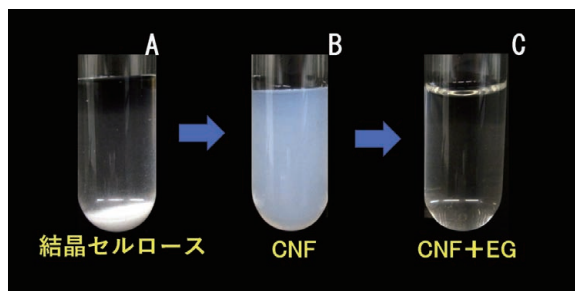


図2. CNFの調製とエンドグルカナーゼによる透明化

結晶セルロースを物理的に微細化することでCNF (B) が得られる。ここにエンドグルカナーゼ (EG) を作用させることで非結晶領域が取り除かれ、透明化したCNF (C) が得られる。

す必要がある。プロセスを工夫すれば、エンドグルカナーゼを用いて様々なナノセルロースを高効率で造り分けることも可能<sup>1)</sup>、用途に合わせて最適なナノセルロースの特徴を把握し、そのナノセルロースの効果的な製造方法を構築することも可能である。また、様々な環境での安定性が高い耐熱性エンドグルカナーゼを用いたナノセルロースの加工工程において見いだされた研究成果より、エンドグルカナーゼと物理的処理、イオン液体等を併用することで、各種植物系バイオマス高効率糖化においても有用な知見が得られている<sup>2)</sup>。

#### ◆超耐熱性エンドグルカナーゼのイオン液体耐性

イオン液体は一般的に100℃以下の温度で液体として存在するイオン性化合物の総称である。このイオン液体は、比較的温和な条件でセルロースを溶解することが可能であり、新たなセルロースの前処理方法として期待されている。具体的には、イオン液体にセルロースを溶解させた後、水を加えて再生セルロースを得ることで、その強固な結晶構造が一部破壊され、続くセルラーゼ処理の効率を飛躍的に高めることができる。一方で、一般的なセル

ラーゼはイオン液体の存在によってその活性が大きく低下してしまうことが知られている。イオン液体に溶解したセルロースから再生セルロースを回収する場合、10～15%程度のイオン液体が残存すると考えられるが、10%のイオン液体の残存は、セルラーゼの活性を70%～85%も低下させることが報告されている<sup>3)</sup>。そこで再生セルロースを効率的に分解するため、残存するイオン液体に対して高い耐性をもつセルラーゼの探索が進められており、耐熱性や耐塩性を有する酵素にはイオン液体に対して耐性を有する酵素が存在することが報告されている<sup>4)</sup>。今回我々が開発した超耐熱性エンドグルカナーゼについても、1-ブチル-3-メチルイミダゾリウムクロリド ([Bmim][Cl]) および1-エチル-3-メチルイミダゾリウムクロリド ([Emim][Cl]) 存在下での活性を評価したところ、20% (w/v) [Bmim][Cl] または [Emim][Cl] 存在下でも90%以上の活性を維持することが明らかとなり、本酵素は耐熱性のみならず、非常に高いイオン液体耐性も有することが明らかとなった。よって本稿で紹介した超耐熱性エンドグルカナーゼはイオン液体処理を施した再生セルロースの分解に

おいて強力なツールとなることが期待される。

#### 【参考文献】

- 1) Teixeira, R. S. S. et al. : *Carbohydr. Polym.*, **128**, 75 (2015).
- 2) Teixeira, R. S. S. et al. : *Bioresour. Technol.*, **149**, 551 (2013).
- 3) Engel, P. et al. : *Green Chem.*, **12**, 1959 (2010).
- 4) Datta, S. et al. : *Green Chem.*, **12**, 338 (2010).



#### エンド型セルラーゼ (エンドグルカナーゼ)

セルロースを分解する酵素の内、セルロース内部から切断する様式の酵素。主にセルロース内部の非結晶領域に作用する。セルロースを分解する酵素には、他にセルロースの末端から切断しセロビオースを遊離するエキソグルカナーゼ (セロビオヒドロラーゼ) が存在する。

#### ナノセルロース

セルロースを物理的または化学的に微細化したもので、その性状によってセルロースナノファイバーやセルロースナノクリスタルなどに分類される。その性質から強化剤やゲル化剤、増粘剤といった様々な用途への応用が期待されている。

## セルロースナノファイバー (CNF)・繊維・バイオマスの加工に

Wako

### セルラーゼ, 超耐熱性, 組換え体, 溶液

本品は、超好熱性古細菌 *Pyrococcus horikoshii* 由来の耐熱性エンド型セルラーゼを改変し、さらなる耐熱性を付与した酵素です。高温条件下で高い酵素活性を維持します。

#### 特長

- 90℃以上で高活性維持  
94℃、30分経過後も活性維持。至適温度：100℃
- 最適pH 5.0
- 非晶性セルロースに作用するエンド型セルラーゼ

#### 用途

- CNF加工
- 繊維加工
- バイオマス (森林資源、農産物不食部) の加工

CNF：セルロースナノファイバーは植物由来セルロースを原料にした新素材です。鋼鉄より軽く、強度が高く、熱膨張率が低いため構造材料として、また有限資源である石油や石炭に代わるプラスチック原料として応用が期待されます。

コード No.	品名	規格	容量	希望納入価格 (円)
035-25811	Cellulase, Hyperthermostable, recombinant, Solution	細胞生物学用	10mL	36,000

Refr...2～10℃保存 E...20℃保存 H...80℃保存 HS...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10月時点での情報です。最新情報は、当社HPをご参照下さい。



## 間葉系幹細胞由来エクソソーム産生用無血清培地の開発 エクソソームを利用した再生医療の実現に向けて

富士フイルム和光純薬株式会社 ライフサイエンス研究所 丸谷 祐樹、山根 昌之

### ◆はじめに

細胞外小胞 (Extracellular vesicle : EV) は、細胞より放出される脂質二重膜の小胞体で細胞間のコミュニケーションツールとしての機能を持つ。EVの一種として分類されるエクソソームは、種々の生体機能の制御に関わると考えられており、疾患バイオマーカーや治療用製剤への利用が期待されている。治療用製剤への利用においては抗炎症や抗線維化といった効果を有する間葉系幹細胞 (Mesenchymal stem cell : MSC) 由来のエクソソームが最も注目されており、近い将来の実用化への期待は大きい。このように、MSC由来エクソソーム実用化の期待が高まる中、治療用製剤としてのエクソソームを製造する技術開発が盛んに行われてきている。

本稿では、我々が独自に開発したMSC由来エクソソーム産生用無血清培地を治療用エクソソームの産生に用いる有用性について紹介する。

### ◆MSC由来エクソソーム

エクソソームは、CD9、CD63、CD81などをマーカータンパク質とする、細胞から分泌される直径30-100nm程度の脂質二重膜の膜小胞であり、タンパク質や核酸(DNA、mRNA、miRNA)、脂質などの細胞由来成分を含有している<sup>1,2)</sup>。一方、MSCは、骨髄や脂肪、臍帯といった組織から樹立できる中胚葉由来の体性幹細胞であり、脂肪、骨、軟骨への分化能を有する。さらに、MSCはこのような分化能に加えて、抗炎症、抗線維化、あるいは免疫抑制を誘導する分泌物効果を発揮するが、近年これらの効果がエクソソームによるものであることが示唆されている<sup>3)</sup>。このような背景の下、MSC由来エクソソームを利用した治療用製剤の注目度が急激に高まりつつある。

### ◆MSC由来エクソソーム産生用無血清培地の開発

MSC由来エクソソームの産生に使用する培地としては、ウシ由来エクソ

ソームを除去したウシ胎児血清 (EV-depleted FBS) を添加した基礎培地をはじめいくつかの培地が使用されている<sup>4,5)</sup>。しかし、これらはいずれもMSCの生存維持を目的とした組成であり、エクソソーム分泌や生物活性効果に最適化されたものは開発されていない。そこで我々は、MSCがエクソソーム産生を行うために適した環境を提供できる無血清かつアニマルフリーの培地で、高性能と高生物活性を両立させたEV-Up<sup>TM</sup>基礎培地とサプリメント (以下、EV-Up<sup>TM</sup>培地と表記) を開発した。

### ◆EV-Up<sup>TM</sup>培地を用いた培養により得たエクソソームの産生量と活性について

EV-Up<sup>TM</sup>培地は、任意の増殖用培地で80-90%コンフルエントまで培養した後培地交換して3-5日間培養を行うという使用方法を推奨している (図1)。通常、血清培地から無血清培地に切り替える場合は馴化作業を必要とする場合が多いが、EV-Up<sup>TM</sup>培地はFBSを含む血清培地で増殖させた細胞であっても直接交換できるという点を特長のひとつとしている。

骨髄由来MSCを血清培地で増殖さ

せた後にEV-depleted FBSを含む基礎培地、もしくはEV-Up<sup>TM</sup>培地に切り替えて5日間培養した後の細胞数と細胞生存率を測定したところ、細胞数と生存率が高い状態で維持されていることが確認された (図2 A, B)。次に、PSアフィニティー法にて精製したエクソソームの粒子数をナノ粒子トラッキング解析法 (NTA) で比較した<sup>6)</sup>。その結果、EV-Up<sup>TM</sup>培地を用いて得たエクソソームは、EV-depleted FBSを添加した基礎培地に比べ、粒子数が約2.6倍に増加することが確認された (図3A)。さらに、PSアフィニティー法を応用したエクソソーム定量技術であるPS ELISA法によりエクソソーム量の比較を行ったところ、NTAと同様にエクソソームマーカータンパク質であるCD9、CD63及びCD81の増加も確認された<sup>6,7)</sup> (図3B)。

最後に、各培地で培養したMSC由来エクソソームの生物活性を比較するために、ヒト胎児肺由来正常線維芽細胞 (TIG3) における線維化抑制効果について評価した。その結果、一般的に用いられている基礎培地にEV-depleted FBSを添加した培地に比べ、EV-Up<sup>TM</sup>培地で培養したMSC由来の

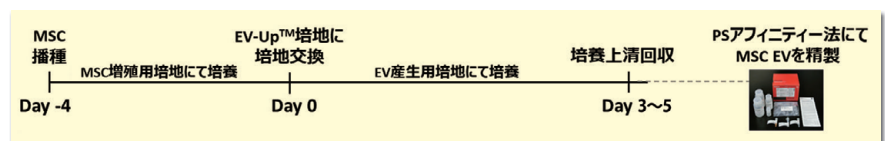


図1. EV-Up<sup>TM</sup> 培地の推奨プロトコル

EV-Up<sup>TM</sup> 培地の推奨プロトコルは、任意の増殖培地を用いて80-90%コンフルエントまで培養した後、EV-Up<sup>TM</sup> 培地に交換する。その後3-5日間培養を行い、培養上清を回収する。回収した培養上清からはPSアフィニティー法によりエクソソームを回収することが可能である。

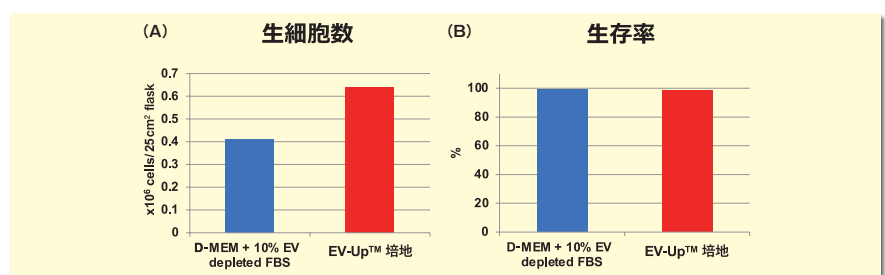


図2. EV-Up<sup>TM</sup> 培地を用いて培養したMSCの細胞生存率

EV-Up<sup>TM</sup> 培地に培地交換して5日後の細胞数 (A) と細胞生存率 (B) を測定した結果。



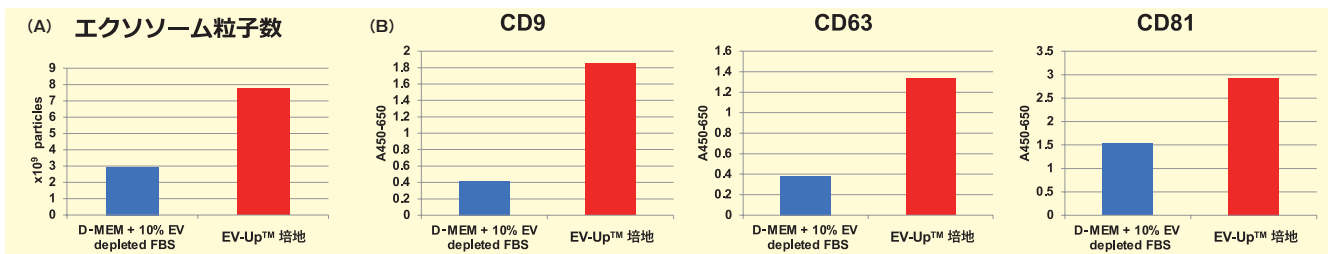


図3. EV-Up™ 培地を用いた培養後のエクソソーム粒子数比較及びエクソソームマーカー比較  
各培地で得た培養上清 1mL から取得されたエクソソームの NTA による粒子数比較 (A) と PS ELISA によるエクソソームマーカー解析結果 (B)。

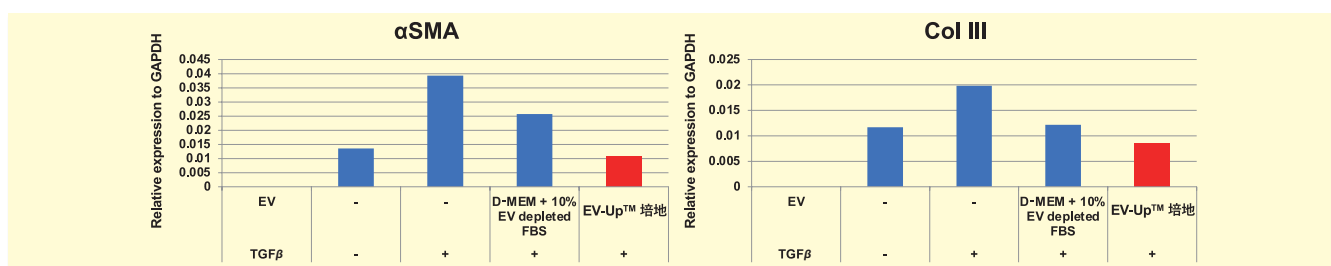


図4. EV-Up™ 培地を用いた培養後のエクソソーム生物活性比較 (抗線維化活性)  
PS アフィニティー精製したエクソソーム 5×10<sup>8</sup>particles/mL を、TGFβ で刺激したヒト胎児肺由来線維芽細胞 (TIG3 細胞) に添加し、Real-Time PCR 法を用いた線維化マーカー (αSMA, Collagen III) 遺伝子発現定量により、抗線維化活性を比較した。

エクソソームの方が極めて高い抗線維化効果を有することが明らかになった (図4)。

以上の結果より、EV-Up™ 培地は高い生物活性を保持したMSC由来エクソソームを高収量で調製可能な革新的な培地であることが明らかとなった。

#### ◆おわりに

今回我々は、MSCに最適化した無血清かつアニマルフリーのエクソソーム産生

用培地であるEV-Up™ 培地を開発した。本培地は高活性なエクソソームの産生量向上のみならず、無血清かつアニマルフリーという特長から、治療用製剤プロセスにおける品質の安定性向上においても寄与できる可能性が示唆される。今後エクソソームを利用した治療用製剤の実用化が世界中で進められていく中、我々が開発した培地は有用な製造技術のひとつとして広く活用されることが期待される。

#### 【参考文献】

- 1) Colombo, M. et al. : *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, **30**, 255 (2014).
- 2) Mathieu, M. et al. : *Nat. Cell Biol.*, **21** (1), 9 (2019).
- 3) Phinney, D. G. and Pittenger, M. F. : *Stem Cells*, **35** (4), 851 (2017).
- 4) Rajendran, R. L. et al. : *Sci. Rep.*, **7** (1), 15560 (2017).
- 5) Lai, R. C. et al. : *Stem Cell Res.*, **4** (3), 214 (2010).
- 6) Nakai, W. et al. : *Sci. Rep.*, **6**, 33935 (2016).
- 7) Ma, Y. et al. : *Sci. Rep.*, **11** (1), 13471 (2021).

## EV-Up™ 培地 関連製品

Wako

コード No.	品名	規格	容量	希望納入価格 (円)
<b>EV-Up™ 培地*</b>				
053-09451	EV-Up™ EV Production Basal Medium for MSC, AF	細胞培養用	95mL	12,000
298-84001	EV-Up™ MSC EV Production Supplement, AF	細胞培養用	100mL用	18,000
<b>Exosome 抽出・精製</b>				
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

\*基礎培地とサプリメントを混合することで、EV-Up™ 培地 (完全培地) として使用できます。2 製品あわせてご購入下さい。

EV-Up™ 培地 (基礎培地及びサプリメント) のサンプルを配布しています。詳細は、当社 HP もしくは担当営業にお問合せ下さい。

## 第2回 食品に含まれるヒ素化合物について

一般財団法人日本食品検査 事業本部 試験部門 橘田 規

### 1. ヒ素の化学形態及び毒性

ヒ素 (As) は、地殻において主に  $As_3S_3$ 、 $As_4S_4$ 、 $FeAsS$  などの硫化物として存在し、火山活動や鉱物の風化などの自然現象によって環境中に放出されるため、大気、陸地、河川、湖沼及び海洋に広く存在する元素である。自然環境中におけるヒ素の主な化学形態は、酸素を配位した無機ヒ素である亜ヒ酸 (As (III)) 及びヒ酸 (As (V)) である (図1)。これらは海洋生態系を食物連鎖を通して代謝変換を受けるため、海洋生物の組織中で主にモノメチルアルソン酸 (MMA)、ジメチルアルシン酸 (DMA)、アルセノベタイン (AsBe)、アルセノコリン (AsC) 等の有機ヒ素として存在する (図1)。

ヒ素化合物の毒性はその化学形態に大きく依存することが知られている。概して、有機ヒ素よりも無機ヒ素のほうが、また酸化数は5価よりも3価のほうが高い毒性を示す。無機ヒ素による急性中毒では、口腔、食道などの粘膜刺激の後、食道に痛みが現れ、数分から数時間後には嘔吐、腹痛、下痢などの症状が見られる。重篤な場合には、激しい嘔吐・下痢、筋けいれん、心筋障害、腎障害などの症状が現れ、早いと24時間以内に死亡する。有機ヒ素では急性毒性や末梢神経毒性は認められていないが、MMA (III)、DMA (III) については生体に悪影響を及ぼす可能性が指摘されている。

国際がん研究機関 (IARC) が2004年に行った発がん性評価では、「飲料水中のヒ素」をヒトに対して膀胱癌、肺癌、皮膚癌を引き起こす証拠が十分あるとしてグループ1 (ヒトに対して発がん性がある) に分類している。2012年の再評価では、無機ヒ素化合物をグループ1、DMA (V) 及びMMA (V) をグループ2B (ヒトに対して発がん性の可能性がある)、AsBeやヒトにおいて代謝されないその他の有機ヒ素化合物をグループ3 (ヒトに対する発がん性について分類できない) に分類している。

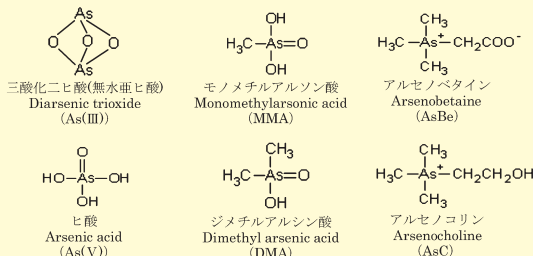


図1. 代表的なヒ素化合物

### 2. 食品からのヒ素の摂取

2016年度～2018年度の厚生労働科学研究で実施されたマーケットバスケット方式のトータルダイエツトスタディーにより推定された総ヒ素及び無機ヒ素の1日・1人当たりの摂取量を図2に示した。総ヒ素の摂取量については、 $134\mu\text{g}/\text{man}/\text{day}$ の魚介類 (58.3%)、 $72.6\mu\text{g}/\text{man}/\text{day}$ のその他の野菜・海藻類 (31.6%)、 $13.8\mu\text{g}/\text{man}/\text{day}$ のコメ及びその加工品 (6.0%) が総和に占める割合が大きい。ほとんどの野菜はヒ素の含量が低く、魚介類と昆布、わかめ等の海藻類に含まれる総ヒ素のほとんどは比較的影響の程度が小さいアルセノシュガーやAsBe等の有機ヒ素であることが報告されている。一方、毒性の強い無機ヒ素の摂取量については、 $12.4\mu\text{g}/\text{man}/\text{day}$ のコメ及びその加工品 (73.8%)、 $2.2\mu\text{g}/\text{man}/\text{day}$ のその他の野菜・海藻類 (13.1%) が総和に占める割合が大きい。コメ及びその加工品の総ヒ素に占める無機ヒ素の割合が

89.9%と高いのは、コメは土壤中の無機ヒ素が溶け出しやすい水田ほ場で長期間栽培される間に無機ヒ素を内部に取り込むためである。

### 3. コメ中ヒ素の化学形態別分析

国際食品規格を策定するコーデックス委員会は、コメは他の農産物に比べヒ素濃度が相対的に高く、灌漑用水や調理用水による汚染を通じ、無機ヒ素の経口摂取に大きく寄与するとして、コメに含まれる無機ヒ素濃度について最大基準値 (精米:  $0.2\text{ mg}/\text{kg}$  (2014)、玄米:  $0.35\text{ mg}/\text{kg}$  (2016)) を設定し、2017年には「コメ中ヒ素の汚染の防止と低減に関する実施規範 (CXC 77-2017)」を策定した。これを受けて、農林水産省はコメ中無機ヒ素の含有実態を調査するとともに、無機ヒ素の低減に係る技術開発を進めている。このような背景から、コメ中の無機ヒ素と有機ヒ素を分離して低濃度まで定量する必要があり、この目的に適した分析法として高速液体クロマトグラフ誘導結合

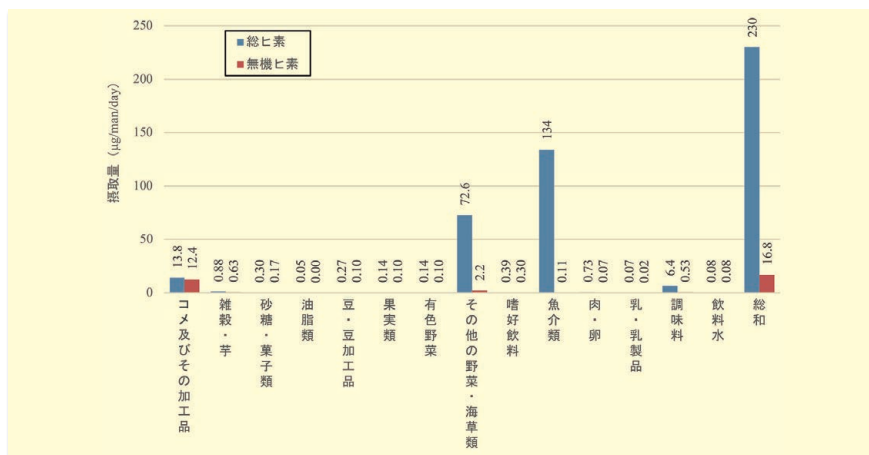


図2. 食品群別の総ヒ素及び無機ヒ素の1日・1人当たりの摂取量

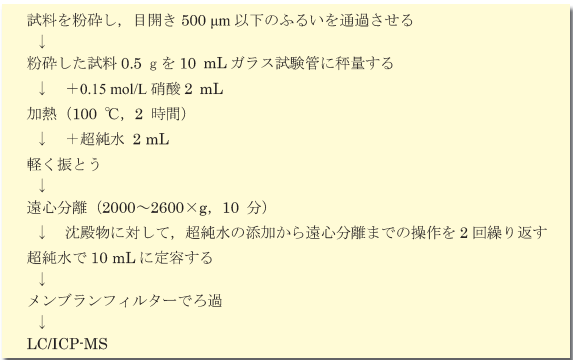


図3. 玄米中ヒ素の化学形態別分析法のフローチャート

プラズマ質量分析 (HPLC/ICP-MS) を用いた化学形態別分析法が広く用いられている。化学形態別分析法は、抽出、加熱、希釈などの前処理工程において、各ヒ素化合物の化学形態が変化しないよう配慮して構築されている (図3)。

各ヒ素化合物の分離には高速液体クロマトグラフ (HPLC) が、分離された各ヒ素化合物の検出には高感度な誘導結合プラズマ質量分析 (ICP-MS) が適している。各ヒ素化合物の酸解離定数はそれぞれ異なり、移動相のpH条件によって陽イオン、陰イオン、両性イオン、非イオン等の複数の形態で同時に存在する場合があるため、1-ブタンスルホン酸ナトリウムを塩基性化合物分析用、テトラメチルアンモニウムヒドロキシドを酸性化合物分析用のイオン対試薬とした逆相イオン対クロマトグラフィーを用いることが多い (図4)。この分析法は室間共同実験による妥当性確認が行われた信頼性の高いものであり、汚染実態調査等に使用されている。

#### 4. おわりに

コメやヒジキなどでは他の食品と比べて無機ヒ素が多く含まれているが、日本の食

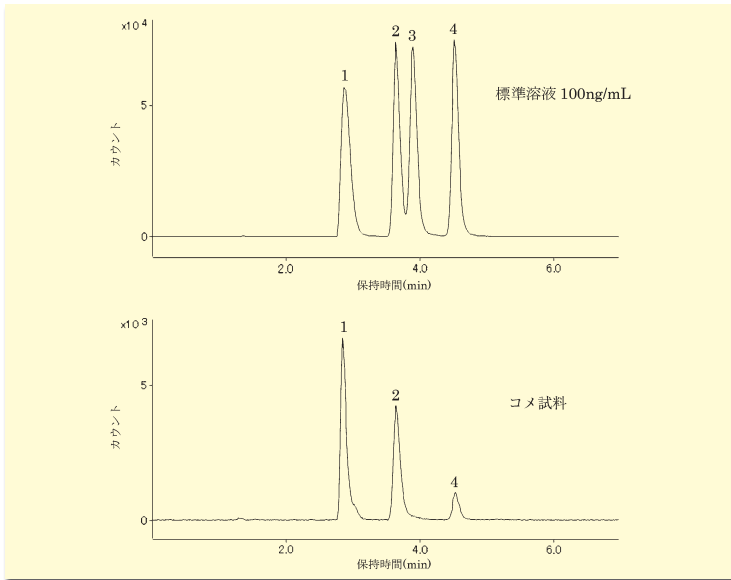


図4. LC/ICP-MSによるヒ素化合物の抽出イオンクロマトグラム  
 カラム: CAPCELL PAK C18MG (内径 4.6 mm, 長さ 250 mm, 粒径 5 μm)  
 移動相: 0.05 % (v/v) メタノール, 10 mmol/L 1-ブタンスルホン酸ナトリウム, 4 mmol/L マロン酸, 4 mmol/L テトラメチルアンモニウムヒドロキシド (pH3.0)  
 流量: 0.75 mL/min  
 RF 出力: 1.55 kW  
 プラズマガス流量 (Ar): 15 L/min  
 キャリアガス流量 (Ar): 1.0 L/min  
 補助ガス流量 (Ar): 0.90 L/min  
 分析種: 1. As (V) 2. As (III) 3. MMA 4. DMA

文化に基づく通常の摂取の範囲ではヒ素中毒を起こすなどの健康に悪影響が生じたとの報告はない。食品安全委員会の評価でも「バランスの良い食生活を送っていただければ問題ない」とされていることから、特定の食品に偏らずバランスの良い食生活を心がけることが重要である。

#### 【参考文献】

- 1) 化学物質・汚染物質評価書 食品中のヒ素, 食品安全委員会 (2013).
- 2) 平成30年度厚生労働行政推進調査事業費補助金 食品の安全確保推進研究事業 食品を介したダイオキシン類等有害物質摂取量の評価とその手

- 法開発に関する研究 総括・分担研究報告書, 厚生労働省 (2019).
- 3) CODE OF PRACTICE FOR THE PREVENTION AND REDUCTION OF ARSENIC CONTAMINATION IN RICE, CXC 77-2017, CODEX (2017).
  - 4) コメ中ヒ素の低減対策の確立に向けた手引き, 農林水産省 (2019).
  - 5) Preliminary Report On International Validation Of Analytical Method To Determine Inorganic Arsenic In Rice, CCCF 17th Session agenda item 14, CODEX (2013).
  - 6) 中村洋監修, 公益社団法人日本分析化学会編: 「LC/MS, LC/MS/MSの基礎と応用」(オーム社) (2014).

コード No.	メーカーコード	品名	規格/メーカー	容量	希望納入価格(円)
013-15501	-	Arsenic Standard Solution (As 100) 国産II	JCSS	100mL	4,200
013-15481	-	Arsenic Standard Solution (As 1000) 国産II	JCSS	100mL	4,100
013-27571	-	Arsenic Standard Solution (As 1000) 国産II	ICP分析用	100mL	5,300
632-16051	NMIJ CRM 7912-a	Arsenate [As(V)] Solution 国産II	産業技術総合研究所	50mL	12,150
631-09671	NMIJ CRM 7901-a	Arsenobetaine Solution 国産II	産業技術総合研究所	10mL	9,580
634-18211	NMIJ CRM 7913-a	Dimethylarsinic Acid Solution 国産II	産業技術総合研究所	10mL	12,690

☐<sup>2</sup>…2~10°C保存 ☐<sup>20</sup>…20°C保存 ☐<sup>80</sup>…80°C保存 ☐<sup>150</sup>…150°C保存 表示がない場合は室温保存です。その他の略号は、巻末をご参照下さい。  
 掲載内容は、2021年10月時点での情報です。最新情報は、当社HPをご参照下さい。



## 第6回 ミクログリア-アストロサイト連関による脳卒中の制御

山梨大学大学院 総合研究部 医学域 薬理学講座 小泉 修一

### はじめに

グリア細胞が脳機能に果たす役割が次々と明らかにされている。特に種々の脳疾患時には、グリア細胞が、素早く、大きく、多様に変化することから、これらグリア細胞の変化が脳の異常及び修復過程で重要な役割を果たすのではないかと考えられるようになってきている。これらの仮説は、少しずつ受け入れられるようになってきているが、明らかにすべき課題が幾つも残されている。例えば、グリア細胞研究は*in vitro*と*in vivo*の結果の乖離が大きく、これまで*in vitro*のみで得られていた実験結果は単純に*in vivo*には外挿出来ないことである。また、これまでの研究はミクログリア、アストロサイト、オリゴデンドロサイト等、それぞれのグリア細胞種毎に分けた研究が多く、異種グリア細胞間コミュニケーションの結果として脳機能が制御されている、との意識が希薄であった点である。もちろんグリア細胞研究の歴史と経験はまだ浅く、まずは各グリア細胞の性質を明らかにすることは非常に重要であるが、最近の研究ではグリア細胞はアセンブリとして異種グリア細胞間で連携することで脳機能を制御している可能性が様々な形で示唆されるようになってきた。本稿では、*in vivo*脳卒中モデルにおけるミクログリア-アストロサイト連関に注目し、そのコミュニケーションが脳機能制御に果たす役割の重要性について述べる。

### ミクログリア-アストロサイト連関

ミクログリアは脳内外環境の変化に非常に敏感で、微細な変化を感知し、脳変化に先行して変化する。例えばミクログリアは、中年期にすでに活性化し老化を先導する<sup>1)</sup>、筋萎縮性側索硬化症等の神経変性疾患では発症前に活性化し疾患の発症・難治化<sup>2)</sup>に関係

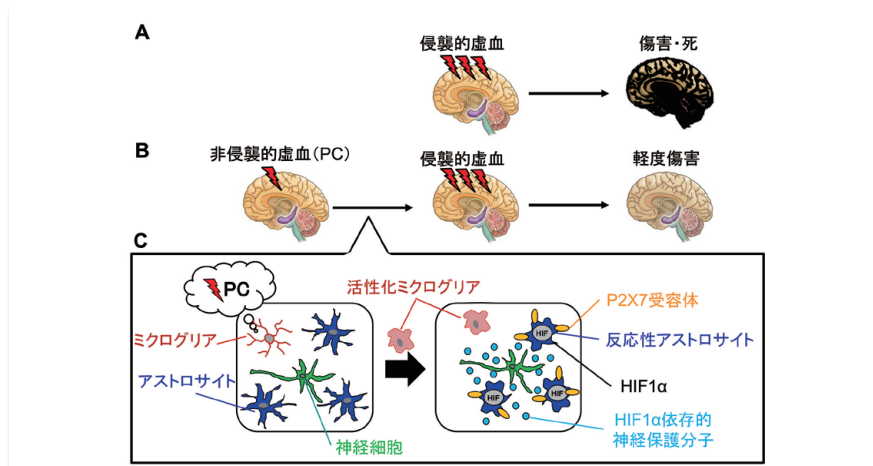


図. グリアコミュニケーションによる虚血耐性獲得メカニズム  
A. 侵襲的脳虚血により神経細胞は重度の傷害または死に至る。B. 非侵襲的虚血(PC)を経験すると、侵襲的虚血に対して抵抗性を獲得する虚血耐性が誘導される。C. PCのような軽度の刺激は、先ずミクログリアが感知する。ミクログリアは活性化型ミクログリアに変化し、直接虚血耐性誘導に関与する一方、アストロサイトの活性化(反応性アストロサイト)を誘導する。反応性アストロサイトは複数のメカニズムで虚血耐性形成に貢献するが、特にP2X7受容体発現及びP2X7受容体依存的HIF1 $\alpha$ 発現による神経保護メカニズムは持続的かつ強力な虚血耐性として知られている。

する。活性化したミクログリアは直接神経細胞の機能を制御するが、アストロサイトに作用することで脳機能に影響する。外傷性脳損傷モデルでは、先ずミクログリアが傷害を感知してそれをアストロサイトに伝えることで保護機能を発揮し<sup>3)</sup>、また炎症を感知したミクログリアはアストロサイトにその情報を伝えることで神経細胞の機能を制御する<sup>4)</sup>。

非侵襲的な虚血ストレスを先行して経験すると、その後の侵襲的虚血に対する抵抗性が獲得できる現象「虚血耐性」は、実験的にも臨床的にも良く知られている(図A, B)。一過性中大脳動脈閉塞(MCAO)モデルマウスにおいて、先ず最初に強い変化が認められる細胞はミクログリアであり、次いでアストロサイトが変化する<sup>5)</sup>。顕著な傷害を起こさない非侵襲的MCAO(プレコンディショニング, PC)であっても、敏感なミクログリアは活性化型に変化する。また、非侵襲的MCAO以外のPCによっても虚血耐性が誘導されるクロス虚血耐性現象が知られているが、クロス虚血耐性を誘導する代表的なPCはグラム陰性細菌細

胞壁成分のlipopolysaccharide (LPS)である。LPSは中枢では特にミクログリアのToll様受容体4に強く作用することから、虚血耐性誘導にミクログリアが必須であることが示唆されている。これらミクログリア性虚血耐性誘導メカニズムには、I型インターフェロンを介した経路が強く関連しているが、他にもミクログリア依存的グリア伝達物質、サイトカイン及び神経栄養因子等も大きな役割を有している。ミクログリアは、これらにより神経細胞に直接的に作用するだけでなく、アストロサイト等の他種グリア細胞に作用することで間接的に虚血耐性を誘導するメカニズムを有しており、近年は後者の重要性が示唆されている。

### ミクログリアからアストロサイトへのシグナル

PCを感知したミクログリアはどのようにして情報をアストロサイトに送るのであろうか? 種々のDAMPが知られているが、ATPは最初のシグナルとして重要である。脳卒中初期及びLPS負荷ミクログリアの最初の応答変化として、ATP/P2受容体シグナルの

大きな変化がある。LPSを感知したミクログリアは、Vesicular nucleotide transporter を発現させることで、ATPの開口放出を亢進させる<sup>6)</sup>。また、脳卒中を感知したミクログリアは、通常発現していないP2Y1受容体を発現させて、ATPを受容し、ミクログリア自身の機能を大きく変化させる<sup>7)</sup>。特にATPは、脳卒中以外でも、高度の興奮性刺激が起こった場合<sup>4)</sup>、外傷性脳損傷<sup>3)</sup>等の初期応答において、ミクログリアからアストロサイトへの情報シグナルとして中心的な役割を果たす。ミクログリア自身にも脳保護作用はあるが<sup>7)</sup>、先ずはより敏感なミクログリア情報を感知して、より脳保護作用が強力なアストロサイトにその情報を伝える、というカスケードが種々の脳疾患に対応する独自の安全装置として機能していることが示唆される。

### 虚血耐性実行細胞としてのアストロサイト

PCにより、アストロサイトは活性化型（反応性アストロサイト）となる。これを抑制すると虚血耐性が消失することから、反応性アストロサイトは虚血耐性誘導の必要条件であると言える。反応性アストロサイトは虚血耐性誘導の実行細胞であり、自身が直接、あるいは神経細胞や他細胞とコミュニケーションを取ることで間接的に虚血耐性誘導で中心的な役割を果たす。例えば、反応性アストロサイトは

神経保護分子産生、興奮性神経伝達物質及び有毒物質の除去機能亢進、エネルギー代謝制御等その作用は多岐にわたるが、特にP2X7受容体を介した作用が強力である<sup>5, 8, 9)</sup>。PCにより、反応性アストロサイトはアストロサイト特異的に大量（100倍以上）かつ長期的（8週間以上）にP2X7受容体を発現亢進させ、本受容体依存的にhypoxia inducible factor1 $\alpha$ （HIF1 $\alpha$ ）を誘導することで非常に強い虚血抵抗性を発揮する（図）。このアストロサイト特異的なP2X7受容体発現亢進メカニズムをはじめ、虚血耐性型アストロサイトの誘導メカニズムについては不明点が多い。上述したように、PCによる反応性アストロサイト誘導に先行してミクログリアが活性化することから、ミクログリアが虚血耐性型アストロサイトを誘導していると考えられている。しかしその是非、ミクログリアに誘導されるアストロサイト表現型の多様性等に関しては、まだ不明な点が多く残されており、今後のさらなる研究が必要である。さらに、ミクログリアはどのようにして非侵襲的でマイルドなPCを感知するのか？ どのような表現型に変化するのか？ ミクログリアからアストロサイト及び神経細胞に伝えるシグナルはそれぞれ何か？ 等々、解らない事だらけである。しかし、ミクログリア-アストロサイトが脳内環境の変化をリレーのように伝え、それに対する脳内応答性を変化させるメカ

ニズムは、種々の脳疾患に先行して起こる共通の現象と考えられる。従って、極めて波及効果の大きな現象であることが示唆され、今後の研究の進展が待たれる。

### おわりに

虚血耐性を例としてグリア細胞の脳機能制御における重要性を示した。ミクログリア及びアストロサイトそれぞれが、虚血耐性を誘導するポテンシャルを有しているが、実はミクログリア-アストロサイト連関による相互作用がより重要な役割とリンクしている可能性が高い。グリア細胞種それぞれに関する研究が盛んになってきたが、今後はこのような異種細胞間相互作用による神経細胞制御に関する視点が増え、益々重要になることが予想される。

### 【参考文献】

- 1) Zhang, G. *et al.* : *Nature*, **497**, 211 (2013).
- 2) Sanagi, T. *et al.* : *J. Neurosci. Res.*, **88**, 2736 (2010).
- 3) Shinozaki, Y. *et al.* : *Cell Rep.*, **19**, 1151 (2017).
- 4) Pascual, O. *et al.* : *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **109**, E197 (2012).
- 5) Hirayama, Y. *et al.* : *J. Neurosci.*, **35**, 3794 (2015).
- 6) Imura, Y. *et al.* : *Glia*, **61**, 1320 (2013).
- 7) Fukumoto, Y. *et al.* : *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, **39**, 2144 (2019).
- 8) Hirayama, Y. and Koizumi, S. : *Glia*, **65**, 523 (2017).
- 9) Hirayama, Y. and Koizumi, S. : *Neurosci. Res.*, **126**, 53 (2018).

## 「ミクログリア研究の最前線－基礎から臨床へ－」シリーズ：結びのことば

九州大学大学院 薬学研究院 薬理学分野 津田 誠

和光純薬時報2020年第3号から連載がスタートした「ミクログリア研究の最前線－基礎から臨床へ－」のレビューシリーズも、本号のミクログリアとアストロサイトの連関による脳卒中の制御に関する総説をもって全6回を完結することとなった。本シリーズでは、ミクログリアが重要な役割を担う疾患として、アルツハイマー病、てんかん、脳梗塞、精神疾患、慢性疼痛などを取り上げ、その最新知見と展望を非常にわかりやすく、かつミクログリアの魅力や余すことなく解説いただいた。非常に多忙な中ご執筆いただいた、世界のミクログリア研究を牽引する気鋭の先生方に改めて心より感謝申し上げますとともに、ミクログリア研究の成果から依然克服できない神経疾患のメカニズムの解明や診断・治療法の開発が実現する日を楽しみにしつつ、本シリーズの結びのことばとしたい。



## 第2回 BDNF 発生発達期の機能と発達障害との関係

香川大学 医学部 鈴木 辰吾

## はじめに

BDNFは神経活動依存的に神経細胞から放出される栄養因子であり、シナプスの再編を誘導して記憶や学習に関与する。一方、BDNFは、発達期の脳において、神経細胞の生存の維持や分化誘導、シナプス形成やシナプス結合の誘導などのさまざまな作用を有するため、その重要性は理解されているものの、その機能の本体を捉えることが難しい。近年の研究より、発達期におけるBDNFの発現低下が神経回路の形成異常に関連する可能性が示唆されており、その異常が発達障害に繋がる可能性も指摘されている。そこで今回は、発達期の脳におけるBDNFの発現、機能、役割について記したのち、BDNFと発達障害との関係について解説を行う。

## 発達期の脳における BDNF の発現

BDNFは脳の広範な領域において発現しており、特に、海馬、扁桃体、大脳、小脳などにおける発現が高い<sup>1, 2)</sup>。大脳皮質や海馬では、主に興奮性の神経細胞において強く発現しており、神経細胞以外では、ミクログリアなどに発現している。BDNFはマウスの胎生11.5日齢から脳で発現が確認できるが、特に生後において発現が上昇する<sup>3, 5)</sup>。BDNFの発現は、神経伝達物質であるGABAやグルタミン酸、そして脱分極を起因とする細胞内カルシウムシグナルに影響されることから、これらの神経科学的要因と発生に依存した転写因子の発現変化との組み合わせにより、BDNFの発現が生後の発達に従い上昇してくるものと考えられる。一方、この時期における、BDNFの高親和性受容体であるTrkBの発現は大きく変動しない。

BDNFの発現は、DNAのメチル化によって抑制されることが広く知られている<sup>6)</sup>。ストレスを負荷した動物モデルやヒトの病態において観察されるBDNFの発現低下とDNAのメチル化の関連を示唆する報告は多数存在している。一方、BDNF

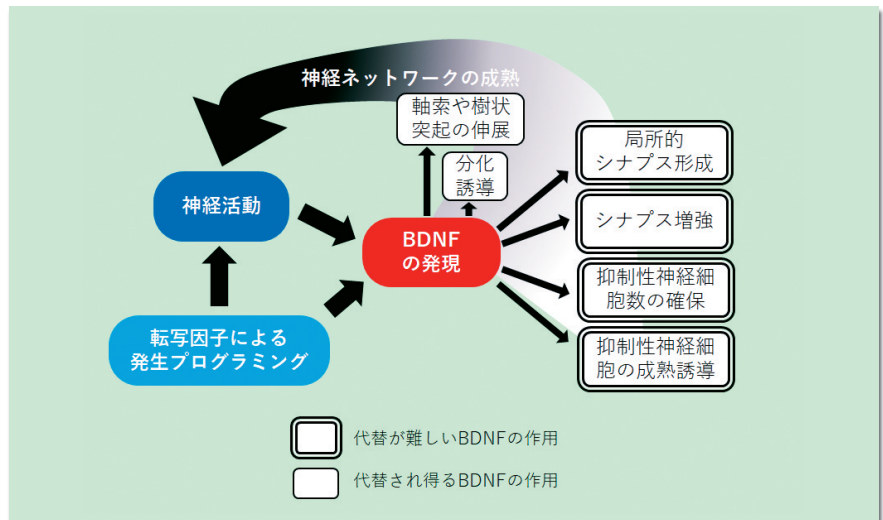


図. 発達期における BDNF の作用

の発現を抑制する因子として、miRNAや内因性のBDNFアンチセンスRNAの存在が明らかになっている<sup>7, 8)</sup>。BDNFは、それぞれ異なる発現調整を受けた多数の転写物として発現されるが、全てのmRNAは同一のコーディング領域を持つため、同一のアミノ酸配列を持つBDNF蛋白質のみを生成する。そのためBDNFの転写物の多様性は、蛋白質としての配列の多様性を生むのではなく、時空間的な発現パターンの多様性に寄与するものと考えられる<sup>9)</sup>。例えば、BDNFのmRNAは恒常的にも神経活動依存的にも転写されるが、これらは異なる転写物として生成される。また、BDNFはプロ体として合成され、切断により成熟型BDNFとなる<sup>10)</sup>。プロセッシングを受けた成熟型BDNFの部位にあたるアミノ酸配列は高度に保存されており、ヒト、マウス、ラット間では全く相違がない。

## BDNF が持つ神経細胞への活性

発達過程の神経細胞に与えることができるBDNFの活性は多岐にわたる。まず、神経幹細胞の増殖や神経細胞への分化を促すことができる。また、BDNFは神経細胞の生存維持、細胞移動を誘導し、そして軸索や樹状突起の分岐、樹状突起数などを増やすことができる<sup>11)</sup>。さらに、BDNFはシナプスの成熟を誘導するとともに、シナプス数の増加、後シナプスの肥大化、シナプス間の神経科学的結合の調整、長期増強の促進を誘導することができる<sup>12)</sup>。一方、組織によっては、軸索の刈込みの促進などの作用を持つことも報告されている<sup>13)</sup>。これらの多岐にわたる作用は、さまざまな時期における脳のさまざまな部位、そしてさまざまな実験系において観察された現象である。

## 発達期における BDNF の特筆すべき役割

これだけの作用があるため、BDNFが欠損すると神経回路を作ることなど到底できないように思える。しかし意外にも、BDNFノックアウトマウスにおける脳の構造は我々の予想よりも正常に近い。もちろん、BDNF欠損の影響は大きく、ほとんどのBDNFノックアウトマウスは心臓の形成不全などの脳ではない組織の影響により生後数日で死んでしまうが、なかには2-4週間生存できる個体も存在する<sup>14)</sup>。その脳において、BDNFが高発現する大脳皮質や海馬を観察してみても、一部が欠損したり、層構造が大きく乱れたりするような変化は見られない。これはBDNFの持つ活性の多くが、他の内的因子によって代替され得ることを示している。BDNFは生後に発現上昇する蛋白質であるため、脳の発達におけるその特異的な機能は、生後において発揮されると考えられる。



実際、生き残ったBDNFノックアウトマウスやヘテロノックアウトマウス、またBDNFを神経細胞において特異的に欠損させたマウスでは、生後に形成される神経回路や神経回路形成後におけるシナプス間情報伝達の異常が見られる<sup>15)</sup>。そして個体においては、これらの異常が学習および記憶障害や行動異常として観察される。そのため、代替の難しいBDNFの最も中心的な機能は、生後における神経回路の形成と脳の機能維持への寄与と捉えることができる。胎児期に大まかな未熟なものとして作られた脳の神経回路は、生後に、環境からの刺激や経験を反映させた上で成熟し、完成する。BDNFはこの後半の過程とそれ以降に最も特性を発揮する因子と言える。

BDNFの欠損によって表出する現象の一つとして、海馬や大脳皮質における抑制性神経細胞数の減少が挙げられる<sup>14)</sup>。抑制性神経細胞は、細胞移動の後、静止し、局所の回路に取り込まれるが、その際、生存競争にさらされる。一方、BDNFのノックアウトマウスにおいて、興奮性神経細胞の数には変化が見られない。BDNFは興奮性神経細胞において高発現しているため、興奮性神経細胞から分泌されたBDNFが抑制性神経細胞の移動を促し、その後、生存競争を促すことによって、局所的な抑制性神経細胞の数を調整しているものと考えられる。神経細胞の生存を誘導できる因子は多数あると考えられるため、この時期の抑制性神経細胞の生存が特にBDNFに依存しているものと思われる。

また、BDNFのヘテロノックアウトマウスやコンディショナルノックアウトマウスにおける大脳皮質や海馬の観察から、BDNFは軸索の進展と誘導よりも、末梢における分岐、そしてシナプス形成自体に最も影響を与えることが示唆されている<sup>16)</sup>。同様に、樹状突起の数や分岐数にもBDNFは影響を及ぼすことから、BDNFは軸索と樹状突起の分岐を促進してシナプス数を増やすための土台をまず作り、その上で、シナプス形成を誘導することによって、

シナプス数を実際に増加させているのであろう。ただし、小脳や網膜などでは、BDNFがシナプスや軸索の刈込みに寄与することも知られているため、脳全体におけるBDNFのシナプス形成への作用を一義的に捉えることはできない。また、成熟後の海馬のスライスを用いた研究より、BDNFは単一の樹状突起上のスパインから選択的に放出され、シナプス特異的な長期増強を誘導できること<sup>17)</sup>、樹状突起や細胞体から放出されたBDNFは近傍に存在する神経細胞に最も作用すること<sup>18, 19)</sup>が報告されている。このことから、発生の過程においても、BDNFは局所的に放出されることによって、限局的な範囲におけるシナプスの数を相対的に増加させるために機能している可能性が考えられる。

また、BDNFは抑制性神経細胞の成熟にも強く関与している。BDNFを強制発現させたマウスでは、抑制性神経細胞の発達が促進され、抑制性神経細胞の発達に依存した視覚野の臨界期の終了が前倒しされる<sup>5)</sup>。実際には、感覚刺激が入力するようになって活性化した神経細胞が放出するBDNFと発生の遺伝子プログラムによって発現が上昇してきたBDNFの総和により、抑制性神経細胞の発達が調整され、臨界期の終了が決定されているのであろう。また、臨界期に入る前のBDNFノックアウトマウスの大脳皮質では、パルプアルブミン陽性の抑制性神経細胞の電気生理的性質や形態の未熟さが観察される<sup>20)</sup>。このことから、臨界期の前段階における局所回路形成においても、BDNFによる抑制性神経細胞への成熟誘導作用が重要であることが理解できる。大脳皮質の局所回路が正しく形成されるためには、順番に従った神経細胞種別の活性化が必要であると考えられていることから<sup>21)</sup>、発達期における一過的なBDNFの発現変動が、局所回路の構造に影響を与え、成熟後の脳機能に影響を与える可能性が十分に考えられる。また、成熟した大脳では、パルプアルブミン陽性の抑制性神経細胞同士がギャップジャンクションで結合されており、同期的

活動やリズムの生成を主導している。そのため、発達期におけるBDNFの発現低下が、局所的な回路形成に加えて、同期的発火にも影響を及ぼし、脳の機能に影響を与える可能性も考えられる。実際、パルプアルブミン陽性の抑制性神経細胞において、BDNFのシグナル伝達を遺伝子組み換えマウスを用いて特異的に阻害すると、同期的活動やリズム形成に影響を及ぼすことが報告されている<sup>22)</sup>。

一方、BDNFは成熟後の海馬における興奮性神経細胞が作る神経ネットワーク内のシナプス増強に関与することが古くから研究されているが<sup>23)</sup>、発達期におけるBDNFの役割は十分に解明されていない。しかし、BDNFは、海馬や大脳皮質における興奮性神経細胞の樹状突起上に存在するスパインの数や成熟に対して正に影響を及ぼし得ることから、興奮性神経細胞同士の結合にも影響を及ぼしていると考えられる。興奮性神経細胞が作る神経ネットワークは情報処理系の主幹であり、広域ネットワークの接続にも関わるため、BDNFがこれらの回路形成に果たす役割の解明が強く望まれる。

## BDNFと発達障害との関係

胎児期を含めた発達期におけるストレスが、BDNFの発現低下を誘導し、その結果として正常な脳の発達が阻害され、発達障害や精神疾患の発病の素因となり得るといふ仮説が広く知られている。この仮説を裏打ちするように、さまざまなストレスを負荷したモデル動物においてBDNFの発現変動が確認されている<sup>24)</sup>。胎生期においては、母体への拘束ストレスや心理的ストレスの負荷により、海馬におけるBDNFの発現低下とDNAのメチル化が観察されている<sup>24)</sup>。また、生後における母子分離ストレスによっても海馬や前頭前皮質においてBDNFの発現は低下し、シナプス数の減少なども観察される<sup>4)</sup>。母子分離ストレスによるBDNFの発現低下においては、これに伴ったヒストンのメチル化状態の変化やBDNFの発現を制御するmiRNAの発現増加も報告されている<sup>24)</sup>。

そして、胎生期や新生児期においてストレスを受容した動物では、発達後における社会性低下や不安様行動が観察されるため、発達期におけるBDNFの発現低下が、発達過程の神経回路形成になんらかの影響を及ぼし、その影響が成熟後にまで及ぶという可能性が考えられる。また、発達期におけるBDNFの作用を考えると、ストレスによるBDNFの発現低下が、例え一過的、局所的なものであっても、個体に永続的な影響をもたらす可能性が考えられる。

一方、ヒトでは、血中BDNF濃度と精神疾患との関連を調べた研究成果が多数報告されている。血中BDNFは血小板由来と考えられているが、それ自身の意味は不明である。しかし、脳内におけるBDNFのメチル化状態と血中におけるBDNFのメチル化状態が、個体内ではばらつきがあり相関は見られないものの、集団としては相関することが動物実験によって確認されている<sup>25)</sup>ことから、ヒトにおける血中BDNF濃度を扱った実験結果は、集団としては、脳の反応として外挿できるものと考えられている。

精神疾患の中でも、血中BDNFとの関連がより研究されているのが自閉症スペクトラム障害である。自閉症スペクトラム障害の患者では血中BDNFの上昇が確認されている一方、新生児における検査では、血中BDNF濃度の低下と自閉症スペクトラム障害の発症の優位な関連が示されている<sup>26)</sup>。そのため、自閉症スペクトラム障害においては、脳が発達する段階においてはBDNFの発現が低く、脳が成熟した後に発現が高くなると考えられる。興味深いことに、このような現象は、母子分離ストレスを負荷した動物においても観察される。母子分離ストレスを与えた動物では、前述のように発達期における

BDNFの発現低下が観察される一方、母子分離ストレス負荷を終了した後にBDNFの発現が正常群に対して上昇する<sup>4)</sup>。理解されている事象を繋げて考えると、発達期におけるBDNFの一過的な発現低下が抑制性神経細胞の成熟を抑制し、結果的に興奮性神経細胞の活動が盛んになることにより、BDNFがより放出されるようになるモデルが考えられるが、未解明な部分が多く、想像の域を超える仮説とは言えない。



また注意欠陥多動性障害 (ADHD) と血中BDNFとの関係には、発達期から大人にかけての低下などが報告されているものの<sup>27)</sup>、まだ見解は定まっていない。BDNFの低下とADHDとの関連は、BDNFの機能低下が黒質ドパミン作動性神経細胞の発達低下につながり、ADHDの発症に関与するという仮説によって補完されている。この仮説は、BDNFが黒質のドパミン作動性神経細胞の生存維持や発達、分化に強い影響を与えることを示した多くの研究によって支えられている。




## おわりに

これまでの多くの基礎研究より、発達期のBDNFの働きが明らかになってきた。しかしながら、神経回路が構築される際の役割の全貌はまだ明らかになっていない。これは、神経回路の構造と動作原理の解明が現在進行中であることが何よりの理由であるが、その中でBDNFが果たす役割の重要性に疑いの余地はなさそうである。このブラックボックスの中で働くBDNFの役割の解明が進むことにより、発達障害との関連も明らかになり、治療法や介入法の開発へと繋がるのが期待される。

## 【参考文献】

- 1) Hofer, M. et al. : *EMBO J.*, **9**, 2459 (1990).
- 2) Timmusk, T. et al. : *Neuron*, **10**, 475 (1993).
- 3) Pöyhönen, S. et al. : *Front. Physiol.*, **10**, 486 (2019).
- 4) Ohta, K. I. et al. : *J. Neurochem.*, **141**, 179 (2017).
- 5) Huang, Z. J. et al. : *Cell*, **98**, 739 (1999).
- 6) Zheleznyakova, G. Y. et al. : *Behav. Brain Funct.*, **12**, 17 (2016).
- 7) Zhang, Y. et al. : *Biomed. Pharmacother.*, **80**, 207 (2016).
- 8) Lee, S. T. et al. : *Ann. Neurol.*, **72**, 269 (2012).
- 9) West, A. E. et al. : *Handb. Exp. Pharmacol.*, **220**, 67 (2014).
- 10) Deinhardt, K. and Chao, M. V. : *Neuropharmacology*, **76**, 603 (2014).
- 11) Numakawa, T. et al. : *Histol. Histopathol.*, **25**, 237 (2010).
- 12) Zagrebelsky, M. and Korte, M. : *Neuropharmacology*, **76**, 628 (2014).
- 13) Choo, M. et al. : *Nat. Commun.*, **8**, 195 (2017).
- 14) Jones, K. R. et al. : *Cell*, **76**, 989 (1994).
- 15) Cunha, C. et al. : *Front. Mol. Neurosci.*, **3**, 1 (2010).
- 16) Cohen-Cory, S. et al. : *Dev. Neurobiol.*, **70**, 271 (2010).
- 17) Harward, S. C. et al. : *Nature*, **538**, 99 (2016).
- 18) Horch, H. W. et al. : *Neuron*, **23**, 353 (1999).
- 19) Horch, H. W. and Katz, L. C. : *Nat. Neurosci.*, **5**, 1177 (2002).
- 20) Itami, C. et al. : *J. Neurosci.*, **27**, 2241 (2007).
- 21) Kimura, F. and Itami, C. : *J. Neurosci.*, **39**, 3784 (2019).
- 22) Xenos, D. et al. : *Cereb. Cortex*, **28**, 3399 (2018).
- 23) Lu, Y. et al. : *Neurobiol. Learn. Mem.*, **89**, 312 (2008).
- 24) Miao, Z. et al. : *Int. J. Mol. Sci.*, **21**, 1375 (2020).
- 25) Duffy, H. B. D. and Roth, T. : *Front. Hum. Neurosci.*, **14**, 594244 (2020).
- 26) Skogstrand, K. et al. : *Transl. Psychiatry*, **9**, 252 (2019).
- 27) Galvez-Contreras, A. Y. et al. : *Front. Psychiatry*, **8**, 126 (2017).

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

 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10月時点での情報です。最新情報は、当社HPをご参照下さい。



## 第2回 ヒト iPS 細胞やオルガノイドを用いた SARS-CoV-2 研究

京都大学 iPS 細胞研究所 出口 清香、高山 和雄

## 1. はじめに

新型コロナウイルス (SARS-CoV-2) による感染症 (COVID-19) は、2019年12月に中国で最初に症例報告されたのち、2020年1月には日本や米国、韓国、豪州、英国で、2月にはブラジルでも感染者の存在が確認され、2020年3月には世界保健機関 (WHO) によりパンデミックが宣言された。2021年9月1日現在、SARS-CoV-2感染者数は2.18億人、死亡者数は452万人であり、いまだに収束の兆しは見えない。SARS-CoV-2はヒトを含む霊長類への感染能は高いが、野生型マウスには感染しづらいため、感染実験に使用可能な動物種に制限がある。また、実験動物を大量に使用することは倫理的に難しい。そのため、ヒト人工多能性幹 (iPS) 細胞やオルガノイドなどの*in vitro*評価系を用いたSARS-CoV-2研究が活発に行われている。本総説では、ヒト生体に近い機能を有するヒトiPS細胞由来分化細胞およびオルガノイドを用いたSARS-CoV-2研究の最新の研究成果に関して概説したい。

## 2. 各種臓器モデルを用いた SARS-CoV-2 感染実験

COVID-19の主たる症状は呼吸器障害であるが、多臓器不全に陥る例も数多く報告されている。そのため、呼吸器だけでなくあらゆる臓器におけるSARS-CoV-2感染による影響が検証されている。これまでに、多様な臓器のヒトiPS細胞由来分化細胞およびオルガノイドを用いたSARS-CoV-2感染実験が実施されているため (表1)、それらの一部を紹介する。

呼吸器の各部位のうち気管支と肺胞のモデルを用いたSARS-CoV-2感染実験が最も活発に研究されている。著者らは、凍結ヒト気管支上皮細胞から気管支オルガノイドを作製し、SARS-CoV-2の気管支への感染を再現した<sup>1)</sup>。我々のオルガノイドには、気管支を構成する基底細胞や線毛細胞、ゴブレット細胞、クラブ細胞が含まれており、基底細胞の一部にSARS-

CoV-2が感染する様子を確認した。また、Huangらは、ヒトiPS細胞からII型肺胞上皮細胞を分化誘導し、SARS-CoV-2の肺胞への感染を再現した<sup>2)</sup>。SARS-CoV-2に感染したII型肺胞上皮細胞では界面活性剤として働く肺サーファクタント蛋白質Cなどが発現低下すること、NF- $\kappa$ Bシグナルが活性化することを明らかとした。

COVID-19患者において、心筋障害や神経障害、下痢等も頻繁に見られることから、心筋や脳、腸管モデルを用いたSARS-CoV-2感染実験も実施されている。Perez-Bermejoらは、ヒトiPS細胞から分化誘導した心筋細胞へはSARS-CoV-2が感染する一方で、心臓線維芽細胞および内皮細胞には感染しないこと

表1. ヒト iPS 細胞やオルガノイドを用いた SARS-CoV-2 感染実験および COVID-19 治療薬探索

	細胞種	由来細胞	SARS-CoV-2 感染の可否	感染阻害が確認された薬物、化合物	参考資料
呼吸器	肺胞オルガノイド <sup>a</sup>	生体肺組織	+	IFN- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$	12)
	肺胞オルガノイド <sup>a,b</sup>	ヒト iPS 細胞	+	レムデシビル、カモスタット	2)
	気道オルガノイド	ヒト ES 細胞	+	レムデシビル、カモスタット、SARS-CoV-2 中和抗体 CB6	13)
	肺胞オルガノイド	ヒト ES 細胞	+	レムデシビル、SARS-CoV-2 中和抗体 CB6	13)
	気道上皮細胞	ヒト iPS 細胞	+	レムデシビル	14)
	小気管支オルガノイド <sup>b</sup>	生体肺組織	+	—	15)
	肺芽オルガノイド <sup>b</sup>	胎児肺組織	+	IFN- $\lambda$ 1	15)
	肺オルガノイド	生体肺組織	+	カモスタット	8)
	肺胞オルガノイド	生体肺組織	+	カモスタット	16)
	気道オルガノイド	生体肺組織	+	—	16)
	肺オルガノイド	ヒト ES 細胞	+	イマチニブ、ミコフェノール酸、キナクリン二塩酸塩、クロロキン	17)
	気管支オルガノイド <sup>b</sup>	凍結ヒト気管支上皮細胞	+	カモスタット	1)
心臓	心筋細胞	ヒト iPS 細胞	+	レムデシビル、N-アセチル-L-ロイシル-L-ロイシル-L-メチオナル、可溶性 ACE2、ACE2 中和抗体	7)
	心筋細胞	ヒト iPS 細胞	+	ACE2 中和抗体、アロキシタチン、レムデシビル、IFN- $\beta$ 、アピリモド、パフィロマイシン、Z-FY (tBu)-DMK	5)
	心筋細胞	ヒト ES 細胞	+	—	18)
腸管	腸管オルガノイド	ヒト ES 細胞	+	レムデシビル、FURIN 阻害ペプチド EK1	4)
	大腸オルガノイド	ヒト ES 細胞	+	イマチニブ、ミコフェノール酸、キナクリン二塩酸塩	17)
腎臓	腎臓オルガノイド	ヒト ES 細胞	+	可溶性 ACE2	19)
	腎臓オルガノイド	ヒト ES 細胞	+	可溶性 ACE2	6)
血管	血管オルガノイド	ヒト iPS 細胞	+	可溶性 ACE2	6)
	内皮細胞	ヒト ES 細胞	—	—	18)
脳	ドーパミン作動性ニューロン	ヒト ES 細胞	+	—	18)
	大脳皮質ニューロン	ヒト ES 細胞	—	—	18)
	脳オルガノイド	ヒト iPS 細胞	+	ACE2 中和抗体、COVID-19 患者の脳脊髄液	20)
	脈絡叢オルガノイド <sup>b</sup>	ヒト ES 細胞	+	—	3)
	脳細胞	ヒト iPS 細胞	—	—	21)
	大脳皮質オルガノイド	ヒト iPS 細胞	—	—	21)
	海馬オルガノイド	ヒト iPS 細胞	—	—	21)
	視床下部オルガノイド	ヒト iPS 細胞	—	—	21)
	中脳オルガノイド	ヒト iPS 細胞	—	—	21)
	脈絡叢オルガノイド	ヒト iPS 細胞	+	—	21)
ミクログリア	ヒト ES 細胞	—	—	18)	
膵臓	膵臓内分泌細胞	ヒト ES 細胞	+	—	18)
肝臓	肝臓オルガノイド	ヒト iPS 細胞	+	—	18)
血液	マクロファージ	ヒト ES 細胞	—	—	18)

<sup>a</sup> 主要な構成細胞は II 型肺胞上皮細胞

<sup>b</sup> オルガノイドの気液界面培養も実施





を確認した。SARS-CoV-2に感染した心筋細胞の約20%で筋原線維の断片化が生じていた。Pellegrinらは、ヒト胚性幹(ES)細胞から大脳オルガノイドを作製し、SARS-CoV-2感染実験を行った<sup>3)</sup>。SARS-CoV-2は、大脳オルガノイド構成細胞のうち、脈絡叢上皮細胞に感染する一方で、ニューロンやグリア細胞にはほとんど感染しなかった。また、脈絡叢オルガノイドにおけるSARS-CoV-2感染実験を行ったところ、脳脊髄液に含まれるアポリポ蛋白質J (APOJ) がオルガノイド内部から培地中に漏出しており、血液-脳脊髄液関門の破綻を再現した現象が確認された。Krügerらは、ヒトES細胞から腸管オルガノイドを作製し、SARS-CoV-2感染実験を行った<sup>4)</sup>。腸管オルガノイド構成細胞のうち、腸管上皮細胞および腸管内分泌細胞、パネート細胞には感染するが、ゴブレット細胞には感染しづらいことが確認された。

以上のように、ヒトiPS細胞由来分化細胞およびオルガノイドを用いてSARS-CoV-2感染実験を行うことで、感染標的となる臓器やその構成細胞だけでなく、感染することにより生じる臓器障害が明らかにされてきた。今後、複数の臓器からなるオルガノイド等を活用することにより、COVID-19による多臓器不全の機序をより詳細に理解できるようになると期待される。

### 3. ヒト iPS 細胞やオルガノイドを用いた COVID-19 治療薬探索

ヒトiPS細胞由来分化細胞やオルガノイドは、SARS-CoV-2研究で汎用されているVero細胞やCalu-3細胞、HuH-7細胞、HEK293細胞等の細胞株と比べて、よりヒト臓器・細胞機能を忠実に反映していることから、治療薬候補の抗ウイルス効果だけでなく、臓器・細胞機能への影響も評価可能であると考えられる。そのため、ヒトiPS細胞由来分化細胞やオルガノイドを用いたCOVID-19治療薬開発を行うことによって、臨床予測性の高いCOVID-19

創薬研究が実現すると期待されている。

SARS-CoV-2の細胞内でのゲノム複製を阻害する目的で、レムデシビルやEIDD-2801等のRNA依存性RNAポリメラーゼ(RdRp)阻害剤が用いられる。レムデシビルは複数のグループで強力な抗ウイルス効果が確認されている。Huangらの報告では、SARS-CoV-2に感染したヒトiPS細胞由来II型肺胞上皮細胞にレムデシビルを作用させると、細胞内ウイルスゲノム量が約10<sup>5</sup>分の1に低下した<sup>2)</sup>。Perez-Bermejoらの報告では、SARS-CoV-2に感染する前からヒトiPS細胞由来心筋細胞にレムデシビルを作用させると、非作用群と比較して細胞内ウイルスゲノム量を約10<sup>5</sup>分の1に抑えることができた<sup>5)</sup>。KrügerらのヒトES細胞由来腸管オルガノイドにおいてもレムデシビルは治療効果を示し、細胞内ウイルスゲノム量が約10<sup>4</sup>分の1まで低下した<sup>4)</sup>。

SARS-CoV-2の侵入を阻害するため、ウイルス受容体であるヒトアンジオテンシン変換酵素2 (ACE2) の可溶性組換え蛋白質を利用した検討が実施されている。Monteilらは、ヒトiPS細胞由来血管オルガノイドおよびヒトES細胞由来腎臓オルガノイドにおいて、可溶性ACE2作用によるウイルス侵入阻害効果を確認した<sup>6)</sup>。Bojkovaらも、ヒトiPS細胞由来心筋細胞において、可溶性ACE2を作用させると細胞内ウイルスゲノム量が低下することを報告した<sup>7)</sup>。可溶性ACE2に関しては、現在APERION Biologics社が主体となりフェーズ2試験が進行中である。

カモスタットやナファモスタットは、SARS-CoV-2のスパイク(S)蛋白質のプライミングを行うII型膜貫通型セリンプロテアーゼ(TMPRSS2)を阻害することから、SARS-CoV-2侵入阻害剤としての利用が試みられている。著者らは、凍結ヒト気管支上皮細胞由来の気管支オルガノイドにカモスタットを作用させることで、細胞培養上清中のウイルスゲノムコピー数が約20分の1に減少すると報告した<sup>1)</sup>。Liらは、ヒト生体組織由来肺オルガノイドに対しカモスタットを前処理すると、感染後

に細胞培養上清中のウイルスゲノムコピー数が約10分の1に減少すると報告した<sup>8)</sup>。さらに、ヒト前立腺癌由来細胞LNCap細胞では、TMPRSS2発現がアンドロゲン受容体の発現により制御されているため、アンドロゲン受容体拮抗薬エンザルタミドによってSARS-CoV-2感染が阻害されることを示した。しかし、肺オルガノイドではTMPRSS2がアンドロゲン受容体の直接的な制御を受けないため、エンザルタミドの感染阻害効果を確認できず、直接TMPRSS2を標的とするカモスタットのみSARS-CoV-2感染が阻害されることも明らかとした。

以上のように、ヒトiPS細胞由来分化細胞およびオルガノイドは抗ウイルス薬の評価に有用なツールであることが示されている。既存薬の評価に限らず、大規模な創薬スクリーニングを実施することで、画期的な新薬の創出への貢献も期待されている。また、組織炎症を再現できるオルガノイド等を用いることで、抗炎症薬の開発も可能になると考えられる。

### 4. ヒト iPS 細胞を用いた SARS-CoV-2 感染および COVID-19 重症化の個人差研究

COVID-19患者の約8割は無症状あるいは軽症であるが、約2割は重症化する。加齢や既往歴、人種差、遺伝情報など様々な因子が重症化に関与すると報告されている。近年のCOVID-19重症化患者におけるゲノムワイド関連解析等からも示唆されるように、個々人の遺伝的背景の差異はCOVID-19の症状の個人差の重要な一因であると考えられる。ヒトiPS細胞は様々な遺伝的背景を持つ個人から樹立できることから、遺伝的要因とCOVID-19の関係性を調査するために活用され始めている。

COVID-19の死亡率には性差があり、男性の方が死亡率が高いことが報告されている。そこで、著者らは、ヒトiPS細胞を用いて、SARS-CoV-2感染効率の性差を再現できるか検証した。ACE2を発現させたヒトiPS細胞を用いて、SARS-

CoV-2感染実験を行ったところ、男性由来iPS細胞の方が細胞培養上清中のウイルスゲノムコピー数が多いことを確認した<sup>9)</sup>。男性由来iPS細胞の方が女性由来iPS細胞よりもTMPRSS2の発現量が高い傾向にあったことから、この差がSARS-CoV-2感染効率の性差に影響している可能性がある。

ヒトiPS細胞はゲノム編集が高効率にできる細胞であることから、SARS-CoV-2に関連した遺伝子変異の機能解析も実施されている。Dobrindtらは、*FURIN*遺伝子に存在する一塩基多型 (SNP) がSARS-CoV-2感染にどのように影響するか調べるため、SNPを導入したヒトiPS細胞を用いたSARS-CoV-2感染実験を行った<sup>10)</sup>。SNP rs4702を有するヒトiPS細胞由来肺胞上皮細胞と神経細胞の両方で、SNP rs4702を持つ方が*FURIN*の発現レベルが低く、細胞内のウイルスゲノム量が少ないことが確認された。Wangらは、アポリポ蛋白質E (ApoE) 遺伝子のアイソフォームがCOVID-19重症化にどのように影響するか調べた<sup>11)</sup>。ApoE4アイソフォームを持つアルツハイマー病患者由来iPS細胞においてゲノム編集操作を行い、ApoE3アイソフォームに変換したのちSARS-CoV-2感染実験を行った。その結果、ApoE4 iPS細胞由来神経細胞の方

がSARS-CoV-2の感染効率が高かった。また、ApoE4 iPS細胞由来神経細胞ではSARS-CoV-2感染によって神経突起長が大幅に短くなった。さらに、ApoE4 iPS細胞由来アストロサイトでは断片化したDNAが多数検出された。レムデシビルによる抗ウイルス効果にApoEアイソフォームは影響しないことも確認した。

以上のように、SARS-CoV-2感染およびCOVID-19重症化の個人差の再現と原因究明研究にヒトiPS細胞が有用であることが証明されつつある。これまでに多様な集団からiPS細胞が樹立されているため、樹立済みのヒトiPS細胞を活用することでCOVID-19の個人差研究が加速することが期待される。

## 5. おわりに

ヒトiPS細胞由来分化細胞およびオルガノイドを用いて、SARS-CoV-2感染細胞の特定やSARS-CoV-2感染による臓器応答の解析などが実施されてきた。また、レムデシビルや可溶性ACE2をはじめとして多くの治療薬の評価が行われてきた。最新の研究では、ヒトiPS細胞を用いたCOVID-19の個人差研究も行われている。今後、ヒトiPS細胞由来分化細胞およびオルガノイドを用いることで、SARS-CoV-2生活環およびCOVID-19病態のさ

らなる理解が進み、画期的な新薬が創出されることを期待する。

## 【参考文献】

- 1) Suzuki, T. *et al.* : *bioRxiv*, 2020.05.25. 115600 (2020).
- 2) Huang, J. *et al.* : *Cell Stem Cell*, **27**, 962 (2020).
- 3) Pellegrini, L. *et al.* : *Cell Stem Cell*, **27**, 951 (2020).
- 4) Krüger, J. *et al.* : *Cell. Mol. Gastroenterol. Hepatol.*, **11**, 935 (2020).
- 5) Perez-Bermejo, J. A. *et al.* : *Sci. Transl. Med.*, **13**, eabf7872 (2021).
- 6) Monteil, V. *et al.* : *Cell*, **181**, 905 (2020).
- 7) Bojkova, D. *et al.* : *Cardiovasc. Res.*, **116**, 2207 (2020).
- 8) Li, F. *et al.* : *Nat. Commun.*, **12**, 866 (2021).
- 9) Sano, E. *et al.* : *bioRxiv*, 2021.02.22.432218 (2021).
- 10) Dobrindt, K. *et al.* : *Stem Cell Reports*, **16**, 505 (2021).
- 11) Wang, C. *et al.* : *Cell Stem Cell*, **28**, 331 (2021).
- 12) Katsura, H. *et al.* : *Cell Stem Cell*, **27**, 890 (2020).
- 13) Pei, R. *et al.* : *Protein Cell*, **1** (2020).
- 14) Yin, X. *et al.* : *Cell Rep.*, **34**, 108628 (2021).
- 15) Lamers, M. M. *et al.* : *EMBO J.*, **40**, e105912 (2021).
- 16) Youk, J. *et al.* : *Cell Stem Cell*, **27**, 905 (2020).
- 17) Han, Y. *et al.* : *Nature*, **589**, 270 (2021).
- 18) Yang, L. *et al.* : *Cell Stem Cell*, **27**, 125 (2020).
- 19) Wysocki, J. *et al.* : *J. Am. Soc. Nephrol.*, **32**, 795 (2021).
- 20) Song, E. *et al.* : *J. Exp. Med.*, **218**, e20202135 (2021).
- 21) Jacob, F. *et al.* : *Cell Stem Cell*, **27**, 937 (2020).

## SARS-CoV-2/COVID-19研究に

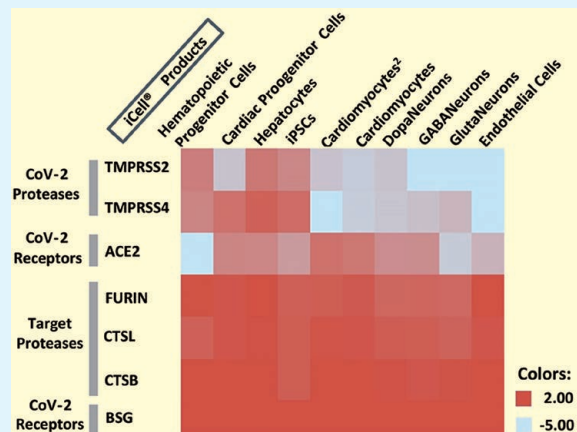
### iCell® Products

iCell® Products は、FUJIFILM Cellular Dynamics, Inc. のヒト iPS 細胞由来分化細胞で、100 報以上の論文で使用されています。創薬スクリーニングや毒性試験などの創薬開発にご使用いただけます。

iCell® Products アプリケーション・  
動画ライブラリ公開中！



右図. iCell® 製品における COVID-19 関連主要遺伝子の発現解析  
2021 年 2 月度 FCDI 社 Newsletter から抜粋 (抜粋元: <https://www.fujifilmcdi.com/disease-modeling/icell-products-in-sars-cov-2-covid-19-research/>)。





## 球状多孔質金属酸化物粒子

### マリモ粒子

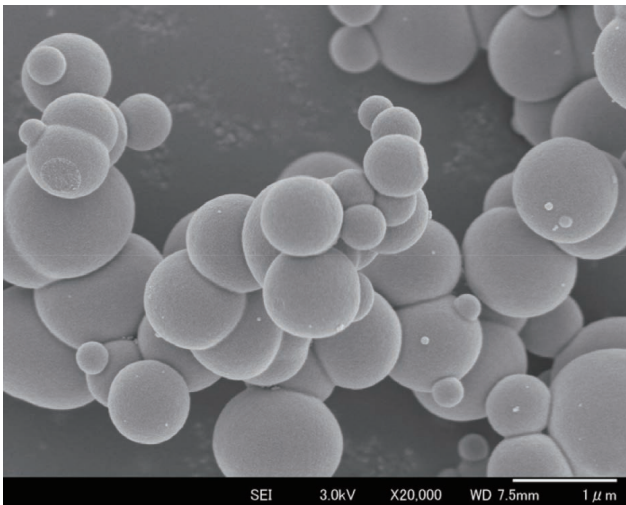
Wako

本品は、高知工科大学の小廣教授らの研究グループが開発した球状多孔質金属酸化物粒子です。金属酸化物にはジルコニア (ZrO<sub>2</sub>) が用いられています。形状がマリモに似ていることからMARIMO粒子 (mesoporous architected roundly integrated metal oxide)<sup>1)</sup> と呼ばれます。

多孔質材料は表面積が極めて大きくナノスケールの大きさの細孔内部にさまざまな物質を導入できるため、吸着剤や触媒担体など多岐に渡る用途での利用が期待される機能性材料の一つです。

### 特長

- 球状粒子
- 表面ナノ凹凸構造
- 高温耐性触媒担体や高分子フィラーなどに利用可能



マリモ粒子 (ZrO<sub>2</sub>) のSEM画像例

(データご提供：高知工科大学 環境理工学群 小廣和哉先生)

### 【参考文献】

1) Wang, P. and Kobiro, K.: *Chem. Lett.*, **41**, 264 (2012).

コードNo.	品名	規格	容量	希望納入価格(円)
139-19171	マリモ粒子 (ZrO <sub>2</sub> )	機能性無機材料用	5g	照会

近日発売

## ガロン瓶専用保護ジャケット

### ガロテクト™

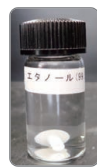
Wako

本品は、ガロン瓶専用の保護ジャケットです。「ガロン瓶を持ち上げた時にぶつかって割れた」などのお客様の声を受け、日々の試験研究活動に少しでも安心をプラスしたいという思いで開発しました。



### 特長

- 11種類の溶媒の耐溶性試験を実施
- 10kgの重りで耐久性試験を実施
- 蓋の開閉を200回行い、緩みがないことを確認
- 分別が不要なオールプラスチック
- 保管庫にジャストフィット!



耐溶性試験の様子



ネジ部分もプラスチック



保管庫にジャストフィット!

- ・本品は、ガロン瓶の強度を高めるものではありません。
- ・本品は、使用溶媒や環境によって、思わぬ破損、劣化が起こることがあります。そのため、支柱だけを持つなど、本品だけを持つ行為は推奨していません。

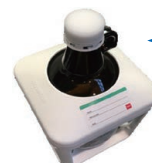
### 今なら専用シールをプレゼント!

ガロテクト™をご購入いただいたお客様に、名前シールをプレゼントしています。

シールは全6色! 溶媒種に応じて好きな色をご使用いただけます。

※数量に限りがありますので、お早めにご購入下さい。

＼見やすい名前シール／



360°見やすいデザイン  
溶媒名、開封日などをご記入いただけます。  
使いやすい全6色!

コードNo.	品名	規格	容量	希望納入価格(円)
293-36321	GalloTect™	無規格	1個	2,800

詳細は当社HPをご覧ください。

試薬事業トップ→常用試薬・ラボウェア→ラボウェア→安全・保護用品→ガロテクト™

<https://labchem-wako.fujifilm.com/jp/category/02166.html>

## 新製品ラインアップ追加

Wako

### JCSS

JCSSとはJapan Calibration Service Systemの略称であり、計量法に基づく計量法トレーサビリティ制度を表しています。JCSS標準物質は、SIトレーサビリティが確保されており、JCSS標準付証明書が添付された製品です。

この度、実用標準液の濃度拡大の認定を取得し、硝酸性窒素、亜硝酸性窒素、硫黄、りん標準液について従来の製品より高濃度の製品をラインアップしました。硫黄、りん標準液については不純物元素を保証し、ICP分析用の標準液としても使用可能です。

### 組成

品名	組成
硝酸性窒素標準液 [NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (Nとして)1000]	NaNO <sub>3</sub> in water 濃度:1,000mg/L[硝酸性窒素(N)として]
亜硝酸性窒素標準液 [NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> (Nとして)1000]	NaNO <sub>2</sub> in water 濃度:1,000mg/L[亜硝酸性窒素(N)として]
硫黄標準液 [SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> (Sとして)1000]	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> in water 濃度:1,000mg/L[硫黄(S)として]
りん標準液 [PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> (Pとして)1000]	H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> in water 濃度:1,000mg/L[りん(P)として]

コードNo.	品名	規格	容量	希望納入価格(円)
NEW 144-09891	硝酸性窒素標準液 [NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (Nとして)1000]	JCSS	100mL	6,300
NEW 147-09901	亜硝酸性窒素標準液 [NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> (Nとして)1000]	JCSS	100mL	6,300
近日発売 191-19051	硫黄標準液 [SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> (Sとして)1000]	JCSS	100mL	照会
近日発売 167-28921	りん標準液 [PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> (Pとして)1000]	JCSS	100mL	照会

### 関連製品

品名	組成
硝酸イオン標準液 (NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> 1000)	NaNO <sub>3</sub> in water 参考濃度:226mg/L[硝酸性窒素(N)として]
亜硝酸イオン標準液 (NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> 1000)	NaNO <sub>2</sub> in water 参考濃度:304mg/L [亜硝酸性窒素(N)として]
硫酸イオン標準液 (SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> 1000)	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> in water 参考濃度:334mg/L[硫黄(S)として]
りん酸イオン標準液 (PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> 1000)	H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> in water 参考濃度:326mg/L[りん(P)として]

コードNo.	品名	規格	容量	希望納入価格(円)
149-06443	硝酸イオン標準液 (NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> 1000)	JCSS	100mL	6,000
146-06453	亜硝酸イオン標準液 (NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> 1000)	JCSS	100mL	6,000
198-10823	硫酸イオン標準液 (SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> 1000)	JCSS	100mL	6,000
164-17463	りん酸イオン標準液 (PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> 1000)	JCSS	100mL	6,000

Ref…2~10℃保存 F…-20℃保存 S…-80℃保存 SS…-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10月時点での情報です。最新情報は、当社HPをご参照下さい。

## 品目追加 局方生薬試験用

Wako

### オイゲノール

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)対応のオイゲノールを新たにラインアップに追加しました。

本品は、日本薬局方一般試験法 試薬・試液のオイゲノール、薄層クロマトグラフィー用に適合しています。生薬「チョウジ」の確認試験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 057-09471	Eugenol <span style="float:right">Ref ㊦</span>	局方生薬試験用 (薄層クロマトグラフィー用)	100mg	照会

### 関連製品

コードNo.	品名	規格	容量	希望納入価格(円)
036-25841	Cholic Acid <span style="float:right">Ref ㊦</span>	局方生薬試験用 (薄層クロマトグラフィー用)	10mg	9,000
049-34661	Deoxycholic Acid <span style="float:right">Ref ㊦</span>	局方生薬試験用 (薄層クロマトグラフィー用)	10mg	9,000
048-34631	Diphenyl Sulfone Standard <span style="float:right">Ref ㊦</span>	生薬試験用	100mg	24,000
134-19121	Mangiferin <span style="float:right">Ref ㊦</span>	局方生薬試験用 (定量用)	20mg	85,000
194-19041	Saikosaponin a,d Mixture Standard Reagent <span style="float:right">F ㊦</span>	局方生薬試験用 (定量用)	100μg	45,000
194-18941	Saikosaponin b <sub>2</sub> Standard Reagent <span style="float:right">Ref ㊦</span>	局方生薬試験用 (定量用)	20μg	18,000

## 『生薬試験用試薬』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>



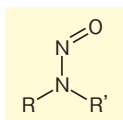


## 医薬品の不純物分析に！

### ニトロソアミン類標準品



ニトロソアミン類は、アミン窒素上の水素がニトロソ基に置換された構造を持つ化合物群で、一部の化合物は発がん性を持つことが知られています。ニトロソアミン類は一般に、二級アミンと亜硝酸が反応して生成されるため、医薬品の製造過程で不純物として生成されることがあります。最近では、サルタン系、ラチニジン系医薬品からニトロソアミン類が検出され、回収される事案がありました。これを受け、欧州医薬品庁（EMA）は、2019年9月にニトロソアミンの混入リスクを評価し、適切なリスク軽減策を講じるよう通達しました。国内では厚生労働省からサルタン系医薬品におけるNDMA及びNDEAの管理指標が設定されています。



### 標準品

コード No.	品名	規格	容量	希望納入価格 (円)
NEW 149-09961	<i>N</i> -Nitrosodi- <i>n</i> -butylamine Standard [NDBA] <span style="border: 1px solid black; padding: 0 2px;">F</span> <sup>°</sup> <span style="border: 1px solid black; padding: 0 2px;">C</span> <sup>°</sup>	クロマトグラフ用	100mg	照会
NEW 141-09921	<i>N</i> -Nitrosodiethylamine Standard [NDEA] <span style="border: 1px solid black; padding: 0 2px;">F</span> <sup>°</sup> <span style="border: 1px solid black; padding: 0 2px;">C</span> <sup>°</sup>	クロマトグラフ用	100mg	照会
NEW 145-09941	<i>N</i> -Nitrosodiisopropylamine Standard [DIPNA, NDIPA] <span style="border: 1px solid black; padding: 0 2px;">F</span> <sup>°</sup> <span style="border: 1px solid black; padding: 0 2px;">C</span> <sup>°</sup>	クロマトグラフ用	50mg	照会
147-03781	<i>N</i> -Nitrosodimethylamine Standard [NDMA] <span style="border: 1px solid black; padding: 0 2px;">R</span> <sup>°</sup> <span style="border: 1px solid black; padding: 0 2px;">F</span> <sup>°</sup>	ガスクロマトグラフ用	1g	4,200
NEW 140-09991	<i>N</i> -Nitrosodi- <i>n</i> -propylamine Standard [NDPA] <span style="border: 1px solid black; padding: 0 2px;">F</span> <sup>°</sup> <span style="border: 1px solid black; padding: 0 2px;">C</span> <sup>°</sup>	クロマトグラフ用	100mg	照会
NEW 142-09951	<i>N</i> -Nitrosoethylisopropylamine Standard [EIPNA, NEIPA] <span style="border: 1px solid black; padding: 0 2px;">F</span> <sup>°</sup> <span style="border: 1px solid black; padding: 0 2px;">C</span> <sup>°</sup>	クロマトグラフ用	50mg	照会
NEW 146-09971	<i>N</i> -Nitrosomethylaminobutyric Acid Standard [NMBA] <span style="border: 1px solid black; padding: 0 2px;">F</span> <sup>°</sup> <span style="border: 1px solid black; padding: 0 2px;">C</span> <sup>°</sup>	クロマトグラフ用	50mg	照会
NEW 140-10001	<i>N</i> -Nitrosomethylethylamine Standard [NEMA] <span style="border: 1px solid black; padding: 0 2px;">F</span> <sup>°</sup> <span style="border: 1px solid black; padding: 0 2px;">C</span> <sup>°</sup>	クロマトグラフ用	50mg	照会
NEW 148-09931	<i>N</i> -Nitrosomethylphenylamine Standard [NMPA] <span style="border: 1px solid black; padding: 0 2px;">F</span> <sup>°</sup> <span style="border: 1px solid black; padding: 0 2px;">C</span> <sup>°</sup>	クロマトグラフ用	50mg	照会
NEW 143-09981	<i>N</i> -Nitroso- <i>N'</i> -methylpiperazine Standard [MeNP] <span style="border: 1px solid black; padding: 0 2px;">F</span> <sup>°</sup> <span style="border: 1px solid black; padding: 0 2px;">C</span> <sup>°</sup>	クロマトグラフ用	50mg	照会
NEW 147-10011	<i>N</i> -Nitrosodiethylamine-d <sub>10</sub> Standard [NDEA-d <sub>10</sub> ] <span style="border: 1px solid black; padding: 0 2px;">F</span> <sup>°</sup> <span style="border: 1px solid black; padding: 0 2px;">C</span> <sup>°</sup>	クロマトグラフ用	50mg	照会
NEW 144-10021	<i>N</i> -Nitrosodimethylamine-d <sub>6</sub> Standard [NDMA-d <sub>6</sub> ] <span style="border: 1px solid black; padding: 0 2px;">F</span> <sup>°</sup> <span style="border: 1px solid black; padding: 0 2px;">C</span> <sup>°</sup>	クロマトグラフ用	100mg	照会

## CIL社 安定同位体標準品

溶媒：CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> ※ NLM-7647-Sのみ CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>  
濃度：1mg/mL

メーカーコード	品名	容量	希望納入価格 (円)
NEW DLM-11196-1.2	<i>N</i> -Nitroso-di- <i>n</i> -butylamine (NDBA) (D <sub>18</sub> , 98%)	1.2mL	照会
NEW DLM-7982-S	<i>N</i> -Nitrosodiethylamine (D <sub>10</sub> , 98%) <span style="border: 1px solid black; padding: 0 2px;">R</span> <sup>°</sup> <span style="border: 1px solid black; padding: 0 2px;">F</span> <sup>°</sup>	1mL	45,000
NEW DLM-2130-S	<i>N</i> -Nitrosodimethylamine (D <sub>6</sub> , 98%) <span style="border: 1px solid black; padding: 0 2px;">R</span> <sup>°</sup> <span style="border: 1px solid black; padding: 0 2px;">F</span> <sup>°</sup>	1mL	45,000
NEW CDLM-7279-S	<i>N</i> -Nitrosodimethylamine ( <sup>13</sup> C <sub>2</sub> , 99%; D <sub>6</sub> , 98%) <span style="border: 1px solid black; padding: 0 2px;">R</span> <sup>°</sup> <span style="border: 1px solid black; padding: 0 2px;">F</span> <sup>°</sup>	1mL	78,000
NEW NLM-7647-S	<i>N</i> -Nitrosodimethylamine ( <sup>15</sup> N <sub>2</sub> , 98%) <span style="border: 1px solid black; padding: 0 2px;">R</span> <sup>°</sup> <span style="border: 1px solid black; padding: 0 2px;">F</span> <sup>°</sup>	1mL	83,000
NEW DLM-2131-S	<i>N</i> -Nitroso-di- <i>n</i> -propylamine (D <sub>14</sub> , 98%) <span style="border: 1px solid black; padding: 0 2px;">R</span> <sup>°</sup> <span style="border: 1px solid black; padding: 0 2px;">F</span> <sup>°</sup>	1mL	45,000
NEW DLM-12279-1.2	<i>N</i> -Nitrosomethylethylamine (D <sub>3</sub> , 98%)	1.2mL	照会
NEW DLM-8254-1.2	<i>N</i> -Nitrosomorpholine (D <sub>6</sub> , 98%) <span style="border: 1px solid black; padding: 0 2px;">R</span> <sup>°</sup> <span style="border: 1px solid black; padding: 0 2px;">F</span> <sup>°</sup>	1.2mL	77,000
NEW DLM-11195-1.2	<i>N</i> -Nitrosopiperidine (D <sub>10</sub> , 98%) <span style="border: 1px solid black; padding: 0 2px;">F</span> <sup>°</sup>	1.2mL	照会
NEW DLM-8252-1.2	<i>N</i> -Nitrosopyrrolidine (D <sub>6</sub> , 98%) <span style="border: 1px solid black; padding: 0 2px;">R</span> <sup>°</sup> <span style="border: 1px solid black; padding: 0 2px;">F</span> <sup>°</sup>	1.2mL	77,000

詳細は当社 HP をご覧下さい。

試薬事業トップ→医薬品 製造・品質管理→医薬品試験用試薬→ニトロソアミン類

<https://labchem-wako.fujifilm.com/jp/category/02128.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



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

- フルオキサストロビン標準品
- メタミホップ標準品
- メチルテトラプロール標準品
- スルホキサフロール標準品（異性体混合物）

コード No.	品名	規格	容量	希望納入価格 (円)
NEW 067-06971	Fluoxastrobin Standard <span style="border: 1px solid black; padding: 0 2px;">R</span> <sup>°</sup> <span style="border: 1px solid black; padding: 0 2px;">F</span> <sup>°</sup>	残留農薬試験用	100mg	29,000
新品 135-19151	Metamifop Standard <span style="border: 1px solid black; padding: 0 2px;">R</span> <sup>°</sup> <span style="border: 1px solid black; padding: 0 2px;">F</span> <sup>°</sup>	残留農薬試験用	20mg	照会
NEW 131-19131	Metyltetraprole Standard <span style="border: 1px solid black; padding: 0 2px;">R</span> <sup>°</sup> <span style="border: 1px solid black; padding: 0 2px;">F</span> <sup>°</sup>	残留農薬試験用	50mg	29,000
NEW 190-19021	Sulfoxaflor Standard (mixture of isomers) <span style="border: 1px solid black; padding: 0 2px;">R</span> <sup>°</sup> <span style="border: 1px solid black; padding: 0 2px;">F</span> <sup>°</sup>	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・更新していきます。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>

R<sup>°</sup>…2～10℃保存 F<sup>°</sup>…-20℃保存 C<sup>°</sup>…-80℃保存 R<sup>°</sup>F<sup>°</sup>…-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10月時点での情報です。最新情報は、当社 HP をご参照下さい。

## スッキリ消臭!

GIKA

### 除菌消臭スプレーFW

### 天然消臭剤FW

昨今の情勢より、室内でいかに快適に過ごせるようになるか注目が高まっています。

当社では、除菌効果と消臭効果を兼ね備えたスプレーと、即効性と持続的な効果に着目した消臭剤を発売しています。

#### ■ 除菌消臭スプレーFW

本品は、主成分のよう素で抗菌・抗ウイルス・消臭効果を発揮します。スプレー後のイヤな臭い（塩素臭）、金属腐食や漂白の心配がありません。不燃性のため、保管の際も安心です。



	除菌消臭スプレーFW	塩素系除菌剤	アルコール系除菌剤
除菌力	○	○	○
金属腐食しにくい	○	×	○
漂白しにくい	○	×	○
有毒ガスが発生しない	○	×	○
不燃性	○	○	×

○：あり ×：なし ※自主試験

#### ■ 天然消臭剤FW

本品は、100%天然成分由来の固形消臭剤で、継続的にペットやタバコ、カビなどの臭いを強力に消臭します。植物抽出エキスと天然フミン酸に含まれる成分により、微生物の発生を抑制し、臭気を抑えます。

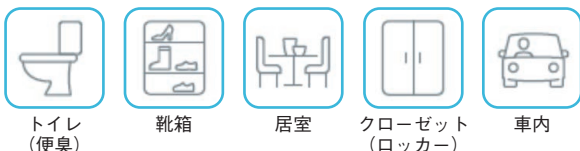


代表的な臭気成分5つ（硫化水素、トリメチルアミン、アンモニア、ホルムアルデヒド、アセトアルデヒド）すべてにおいて、設置後30分で90%以上、設置後45分で95%以上の消臭効果が得られました（自主試験）。

#### 使用例

用途や場所を選ばず、さまざまなシーンでご使用いただけます。

- 除菌消臭スプレー：研究室、キッチンまわり、トイレ、居室、玄関、寝具、衣服や靴、クローゼットなど
- 天然消臭剤：研究室、キッチンまわり、トイレ、ゴミ箱、洗面所、居室、玄関、靴箱、車内など



Refrigerator: 2~10°C保存    Fridge: 20°C保存    Freezer: 80°C保存    High Freezer: 150°C保存    表示がない場合は室温保存です。その他の略号は、巻末をご参照下さい。掲載内容は、2021年10月時点での情報です。最新情報は、当社HPをご参照下さい。

コードNo.	品名	メーカー	容量	希望納入価格(円)
NEW 638-47541	除菌消臭スプレーFW	ギカ	380mL ×8	6,800
NEW 631-47531	天然消臭剤FW	ギカ	150mL ×8	4,800

## 幸せホルモン測定用

Wako

### オキシトシン ELISA キットワコー

オキシトシンは9アミノ酸からなるペプチドホルモンで、幸せホルモン、愛情ホルモンと言われています。ストレス緩和、学習能力向上、抗不安、抗恐怖効果もあり、精神疾患（自閉症、うつなど）の治療効果も期待されています。

本品は、検体中のオキシトシンを測定可能なELISAキットです。簡便な前処理で測定可能であり、従来前処理法として行われていたC18カラムや有機溶媒を用いた精製が不要です。

#### 特長

- 簡便な前処理で測定可能：C18カラム不要
- 少量検体で測定可能：最低50μLで測定可能
- 短時間で測定可能：2時間半

#### 性能

検量線範囲	4.00-1,024pg/mL
測定対象	オキシトシン
測定対象検体	ヒト唾液、尿、血漿、血清 マウス血漿、血清 ラット血漿、血清
必要検体量	50μL (n=1) 200μL (n=2の場合の推奨量)
測定時間	2時間半
検出法	発光系 ※測定には発光プレートリーダーが必要です。

コードNo.	品名	規格	容量	希望納入価格(円)
NEW 292-84401	Oxytocin ELISA Kit Wako Ref	免疫化学用	96回用	照会

#### 関連製品

コードNo.	メーカーコード	品名	規格/メーカー	容量	希望納入価格(円)
296-83201	—	Mature BDNF ELISA Kit Wako Ref	免疫化学用	96回用	69,000
298-83901	—	Mature BDNF ELISA Kit Wako, High Sensitive Ref	免疫化学用	96回用	83,000
335-40841	4084-v	Oxytocin F	ペプチド研究所	0.5mg	3,800



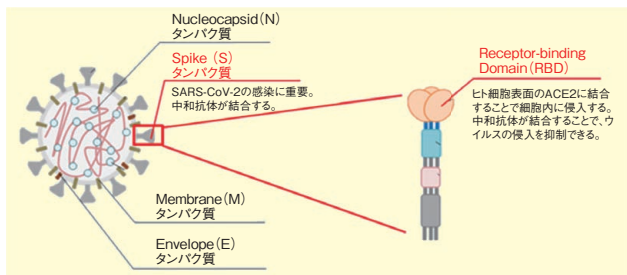
## SARS-CoV-2 に対する中和活性と高い相関を持つ IgG 抗体を測定可能

Wako

### 抗SARS-CoV-2 S-RBD IgG ELISA キットワコー

本品は、SARS-CoV-2 スパイクタンパク質受容体結合ドメイン (S-RBD : S-protein Receptor-binding domain) に対するIgG抗体量を定量可能なELISAキットです。本品で測定したIgG抗体量と検体中のSARS-CoV-2に対する中和活性との間には高い相関性があることが報告<sup>1)</sup>されています。

ウイルス中和試験は労力と時間を要するだけでなく、バイオセーフティレベル3 (BSL3) 施設が必要となります。本品ではSARS-CoV-2を扱うことなく、検体中の中和活性と高い相関を示すSARS-CoV-2 S-RBDに対するIgG抗体量を測定できます。



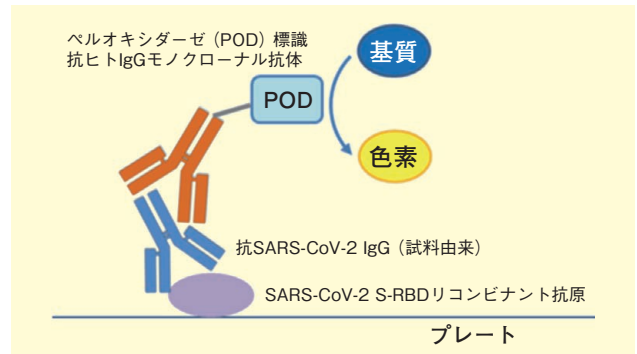
本品と同じELISA系を用い、SARS-CoV-2患者血液中のSタンパク質及びNタンパク質に対する15種類の抗体を測定したところ、過去の感染指標としては、Sタンパク質に対する抗体が優れていることが明らかになりました。また、中和活性との相関を調べるために中和活性試験を行った結果、15種類の抗体のうちS-RBDに対するIgG抗体が中和活性と最も良く相関することが示されました<sup>1)</sup>。

### キット内容

反応に必要なすべての試薬類(計11種類)が含まれています。

- SARS-CoV-2 Sタンパク固相化プレート 96ウェル×1プレート
- ペルオキシダーゼ(POD)標識抗体溶液 6mL×1本
- 濃縮洗浄液(10×) 100mL×1本
- 発色液(TMB溶液) 11mL×1本
- 反応停止液(1N HCl) 11mL×1本
- 検体希釈液(0U/mL) 100mL×2本
- 抗SARS-CoV-2 IgG 標準品-1(62.5U/mL) 500μL×1本
- 抗SARS-CoV-2 IgG 標準品-2(125U/mL) 500μL×1本
- 抗SARS-CoV-2 IgG 標準品-3(187.5U/mL) 500μL×1本
- 抗SARS-CoV-2 IgG 標準品-4(250U/mL) 500μL×1本
- プレートシール 3枚

### 測定原理



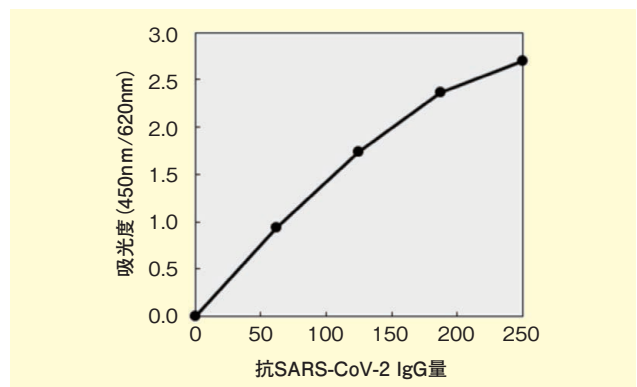
1. SARS-CoV-2 S-RBDリコンビナント抗原を固相化したプレートに試料を加えて反応
2. 試料中の抗SARS-CoV-2 IgGがプレート上の抗原と結合
3. POD標識抗ヒトIgGモノクローナル抗体(マウス)を反応
4. 抗原-抗SARS-CoV-2 IgG-POD標識抗体の複合体が形成
5. 吸光度測定装置でウェル中のPOD活性を測定 (450nm/620nm)

※ウェル内のPOD活性は抗SARS-CoV-2 IgG量に比例する。

### キット性能

検量線測定範囲	2-250U/mL (自社単位)
測定対象	SARS-CoV-2 Sタンパク質 RBD 領域に対するIgG抗体
測定対象検体	ヒト血清及び血漿
必要検体量	5μL
測定時間	3時間
検出法	発色系

### 〈検量線例〉



### 【参考文献】

- 1) Fujigaki, H. et al. : *J. Immunol.*, **206** (10), 2393 (2021).

コードNo.	品名	規格	容量	希望納入価格(円)
290-84201	Anti SARS-CoV-2 S-RBD IgG ELISA Kit Wako	免疫化学用	96回用	87,000

☐20~25℃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10月時点での情報です。最新情報は、当社HPをご参照下さい。

## エクソソームの *in vivo* 試験に！

### *in vivo* 用 EV-Save™ 細胞外小胞ブロッキング試薬

Wako

EV-Save™細胞外小胞ブロッキング試薬は、細胞外小胞 (EVs) の凍結保護<sup>\*1</sup>及びチューブやピペットチップといった実験器具への吸着を抑制する試薬です。当社では、新たに医薬品添加剤として使用実績のある成分のみを原料に使用した*in vivo*用EV-Save™をラインアップに追加しました。動物実験にご活用下さい。

※1 エクソソームは凍結融解を繰り返すことにより損傷することが知られています (Bosch, S. *et al.* : *Sci. Rep.*, **6**, 36162 (2016)).

### 特長

- 医薬品添加剤として使用実績のある成分のみ使用  
⇒ *in vivo* 実験に使用可能
- EVsを凍結から保護  
⇒ -80℃での保管が可能
- EVsの実験器具への吸着を抑制  
⇒ 回収効率がUP！
- サンプルに添加するだけの簡単操作

### 製品概要

#### ■ 適用アプリケーション

以下の実験で、EVsの解析に問題が無いことを確認しています。

1. Nanoparticle Tracking Analysis (NTA)
2. ELISA
3. 蛍光染色
4. 細胞へのEVs添加実験

\* 血清・血漿や夾雑物が多いサンプルに本品を使用した場合、吸着防止効果は得られにくくなります。

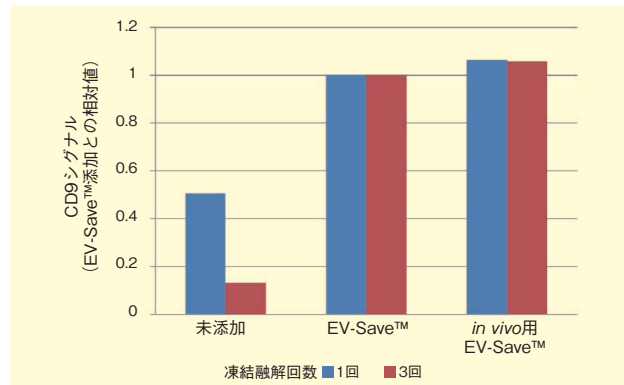
\* 限外ろ過には使用できません。限外ろ過が必要な場合は、EV-Save™細胞外小胞ブロッキング試薬 (コードNo. 058-09261) のご使用をご検討下さい。

#### ■ *in vivo* 用 EV-Save™ と EV-Save™ の比較

	<i>in vivo</i> 用 EV-Save™ (コード No. 050-09461)	EV-Save™ (コード No. 058-09261)
体外への排出	排出可能とされる分子量の成分のみを採用	データなし
成分の医薬品添加剤としての使用実績	あり	なし
動物実験への使用	可能	データなし
限外ろ過への適用	不可	可能

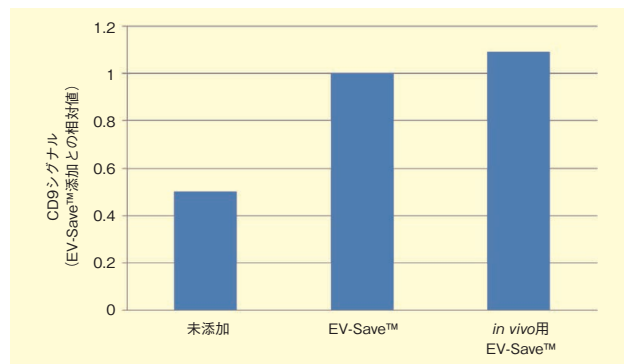
## データ

### ■ エクソソームの凍結保護効果



*in vivo*用 EV-Save™及びEV-Save™をPSアフィニティー法<sup>\*2</sup>により精製したCOLO201細胞由来エクソソームに添加し、1回もしくは3回凍結融解を繰り返した。その後、サンプルチューブ内のエクソソーム量をPS Capture™エクソソームELISAキット (ストレプトアビジンHRP) (コードNo. 298-80601) により測定した。結果、EV-Save™未添加の場合、凍結融解によりエクソソームマーカであるCD9シグナルは低下したが、このシグナル低下は*in vivo*用 EV-Save™及びEV-Save™を添加することにより抑制された。

### ■ エクソソームの吸着抑制効果



*in vivo*用 EV-Save™及びEV-Save™をPSアフィニティー法<sup>\*2</sup>により精製したCOLO201細胞由来エクソソームに添加し、16時間、4℃で保管した。その後、サンプルチューブ内のエクソソーム量をPS Capture™エクソソームELISAキット (ストレプトアビジンHRP) により測定した。結果、EV-Save™未添加の場合、エクソソーム量 (CD9シグナル) は低下したが、これは*in vivo*用 EV-Save™及びEV-Save™を添加することにより抑制された。

※2 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EV精製が行えます。

コード No.	品名	規格	容量	希望納入価格 (円)
050-09461	EV-Save™ Extracellular Vesicle Blocking Reagent for <i>in vivo</i>	遺伝子研究用	1mL	12,800



## スピнкаラムを用いた 土壌からのDNA抽出・精製キット アイソスピン ソイル DNA



本品は、スピнкаラムを用いて土壌サンプルからDNAを抽出・精製するためのキットです。

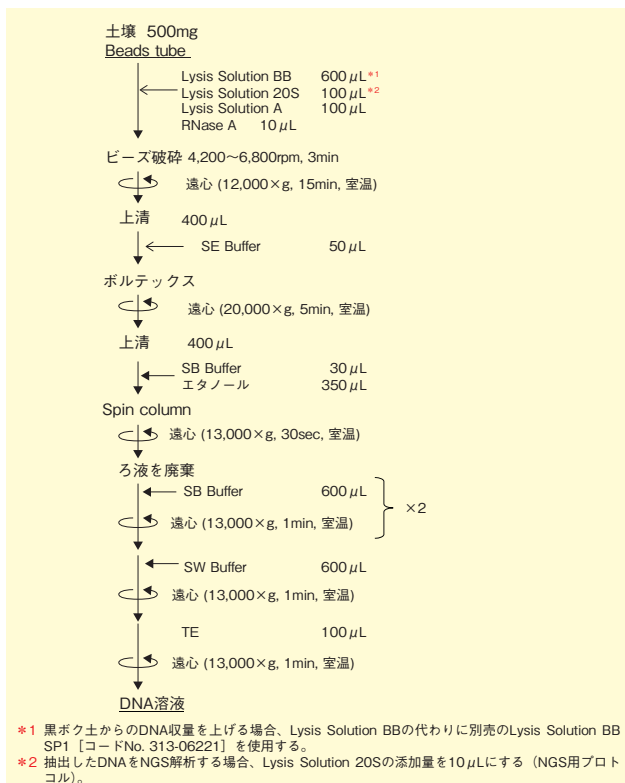
土壌サンプルに最適化したバッファー系とビーズビーターによる物理的な破碎の併用によって、非火山灰土壌だけでなく火山灰土壌の黒ボク土からも効率よくDNAを抽出することが可能です。また、精製工程においては、独自開発したスピнкаラムを採用しており、フェノールやクロロホルムなどの毒性有機溶媒を使用することなく、迅速・簡便にDNAを精製することが可能です。

※本品は、東京大学TLOが所有する特許のライセンスを受けて製造販売しています。

### 特長

- 土壌から高品質なDNAを抽出可能
- 抽出したDNAをNGS解析で使用可能
- 黒ボク土などの火山灰土壌からも効率よくDNA抽出可能
- 約45分で土壌DNA抽出可能
- RNase Aがキットに付属

### 標準プロトコル

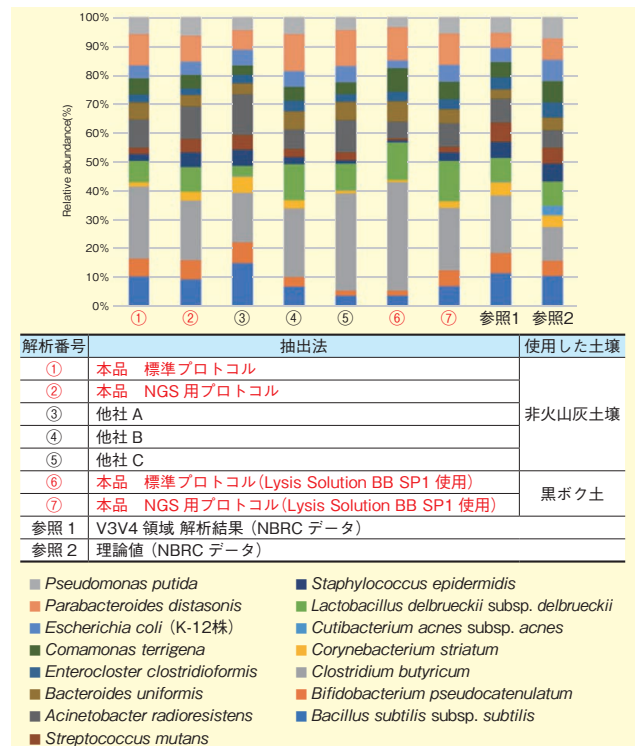


※使用上のご注意：本品以外にビーズ式破碎装置 (2mLチューブ対応のもの) が必要です。

### キット内容

● Lysis Solution BB	30mL × 1本
● Lysis Solution 20S	5mL × 1本
● Lysis Solution A	5mL × 1本
● SE Buffer	2.5mL × 1本
● SB Buffer	62mL × 1本
● SW Buffer	30mL × 1本
● TE (pH 8.0)	5mL × 1本
● RNase A (100mg/mL)	0.5mL × 1本
● Beads Tube	50本 × 1袋
● Spin Column	50本 × 1袋

### 実験例



オートクレーブ処理した土壌サンプル (①~⑤)：非火山灰土壌、⑥⑦：黒ボク土) にNBRC<sup>\*3</sup>菌体カクテル (Cell-Mock-001) を添加し、本品の各プロトコルと、他社品 (A社、B社、C社) の各社プロトコルでDNAを抽出した。それぞれの方法で抽出したDNAについて、16S rRNA遺伝子 (V3V4領域) をNGS解析して比較した。

本品のNGS用プロトコルで抽出したDNAの解析データは、NBRCが示す参考データ (参照1) と近い結果が得られた。また、黒ボク土においても、Lysis Solution BB SP1 (別売) を使用することで同様の結果が得られた。

\*3 NBRC：製品評価技術基盤機構バイオテクノロジーセンター

コード No.	品名	容量	希望納入価格 (円)
310-09151	ISOSPIN Soil DNA	50回用	54,000
313-06221	Lysis Solution BB SP1 <sup>*4</sup>	50mL	3,200

\*4 火山灰土壌 (黒ボク土) 用別売オプション Buffer

## ヒト iPS 細胞樹立試薬

### SRV™ iPSC Vector シリーズ



SRV™ (ステルス型RNAベクター) iPSC Vectorは、iPS細胞の樹立に必要な初期化遺伝子を搭載したRNAベクターです。初期化遺伝子を1つのRNAベクター上に搭載しているためiPS細胞を高い効率で誘導できます。また、RNAベクターであるため宿主DNAゲノムへの干渉がなく、細胞内の免疫反応を回避することにより細胞質で安定した初期化遺伝子の発現を可能にしています。さらに、iPS細胞樹立後のベクター除去も容易です。今回、新たに6個の初期化遺伝子を搭載したSRV™ iPSC-3 Vector、SRV™ iPSC-4 Vectorの2種類をラインアップに加えました。初めてiPS細胞を樹立する方、染色体への挿入なしで効率よく作りたい方におすすめの製品です。

### 特長

- 単一RNA上にすべての転写因子が搭載され、高効率でのリプログラミングを実現
- SRV™は染色体への挿入がなく細胞質で安定に発現
- iPS細胞へのリプログラミング後、SRV™を短時間で消去することが可能
- ヒト、マウスなど幅広い宿主域の分裂細胞・非分裂細胞に関わらず遺伝子を導入
- EGFP搭載で遺伝子導入の効率や消去の様子がすぐに判定可能
- フィーダー細胞不要
- 遺伝子導入以降の過程はBSL1で扱うことが可能  
※遺伝子導入はBSL2で取扱う必要がある。

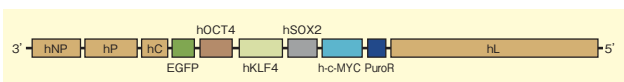
### ラインアップ

SRV™ iPSC Vectorには、搭載する初期化遺伝子の数、及び、ベクター消去システムの違いにより、4種類のベクターがあります。

- 4個の初期化遺伝子を搭載 (OCT3/4、KLF4、SOX2、c-MYC)

SRV™ iPSC-1 Vector : siRNA 導入でベクター消去

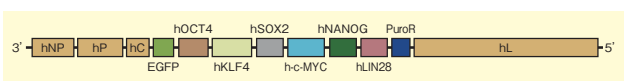
SRV™ iPSC-2 Vector : 初期化に伴い自動的にベクター消去



- 6個の初期化遺伝子を搭載 (OCT3/4、KLF4、SOX2、c-MYC、NANOG、LIN28)

SRV™ iPSC-3 Vector : siRNA 導入でベクター消去

SRV™ iPSC-4 Vector : 初期化に伴い自動的にベクター消去



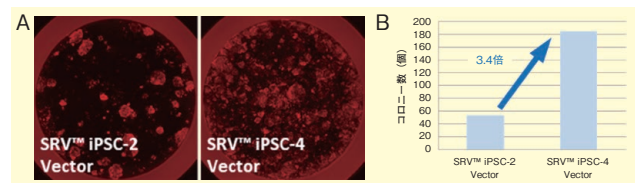
### iPS 細胞の作製効率

ベクター名	iPSC-1	iPSC-2	iPSC-3	iPSC-4
線維芽細胞	5%	—	20%	0.8%
末梢血単球、 末梢血単核球	—	0.05%	—	0.2%
CD34 陽性細胞	9%	17%	8%	18%
推奨する標的細胞	線維芽細胞	末梢血単球・ 単核球、CD34 陽性細胞	線維芽細胞	末梢血単球・ 単核球、CD34 陽性細胞

作製効率は本品の実験プロトコルを用いたFeeder-free条件下でのデータです。他の細胞をiPS細胞誘導の親細胞として用いる場合は、プロトコルの最適化を検討していただく必要があります。

### データ

#### ● 単球の初期化



A. SRV™で遺伝子導入した細胞を48-well plateに $1 \times 10^5$  cells/wellで播種した。遺伝子導入後14日目の細胞におけるTRA-1-60抗体染色像。

B. AのTRA-1-60陽性コロニー数の比較。  
(各2wellをカウントした平均)

SRV™ iPSC-4 Vectorは、SRV™ iPSC-2 Vectorよりも多くTRA-1-60陽性コロニーを誘導できる。

コード No.	メーカーコード	品名	対象	容量	希望納入価格(円)
388-19061	S1011624A	SRV™ iPSC-1 Vector	非営利機関	0.1mL	90,000
385-19071	S1011624P		営利機関	0.1mL	135,000
383-19131	S1011624T		トライアル	0.01mL	20,000
382-19081	S1011694A	SRV™ iPSC-2 Vector	非営利機関	0.1mL	90,000
389-19091	S1011694P		営利機関	0.1mL	135,000
380-19141	S1011694T		トライアル	0.01mL	20,000
NEW 388-19701	S1011626A	SRV™ iPSC-3 Vector	非営利機関	0.1mL	160,000
NEW 384-19661	S1011626P		営利機関	0.1mL	240,000
NEW 385-19711	S1011626T		トライアル	0.01mL	40,000
NEW 381-19671	S1011696A	SRV™ iPSC-4 Vector	非営利機関	0.1mL	160,000
NEW 388-19681	S1011696P		営利機関	0.1mL	240,000
NEW 385-19691	S1011696T		トライアル	0.01mL	40,000
384-19041	S0011590A	SRV™ control Vector	非営利機関	0.1mL	30,000
381-19051	S0011590P		営利機関	0.1mL	45,000

※本品のご購入にあたっては「使用承諾書」の提出をお願いしています。

SRV™製品は、iPSアカデミアジャパン株式会社、FUJIFILM Cellular Dynamics, Inc.、ときわバイオ株式会社との間で各々締結されたiPS細胞技術に関する特許の非独占的なライセンス契約に基づき販売されています。お客様が製品の開発・販売あるいはサービスの提供などの営利目的でSRV™製品を使用される場合には、別途iPSアカデミアジャパン株式会社、FUJIFILM Cellular Dynamics, Inc.、及び、ときわバイオ株式会社とお客様との間で技術利用に関するライセンス契約を締結いただく必要があります(製品により、締結いただく契約先が異なります)。なお、非営利団体による学術、教育目的での使用は営利目的とはみなされません。

❄️...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10月時点での情報です。最新情報は、当社HPをご参照下さい。



## 自主GMP生産体制で製造する高品質培地添加剤!!

Wako

### Y-27632

近年、ヒトES/iPS細胞を用いた再生医療等製品の開発がますます進んでいます。当社では、その開発に貢献できる原材料を供給するため、ICH Q7原薬GMPのガイドラインを参考に自主GMP生産体制を構築しました。

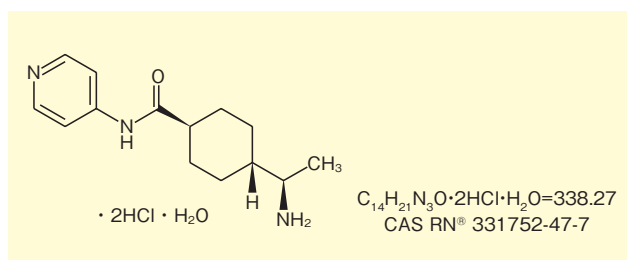
製造工程や分析方法のバリデーション、生産設備のクオリフィケーションを自主GMP生産体制の下で実施し、清浄度管理された区域で合成・精製・小分けを行うことにより、恒常的に高品質に管理された製品をご提供します。

Y-27632は、ROCK (Rho-associated coiled-coil forming kinase/Rho結合キナーゼ) 阻害剤の一つです。ROCKシグナル伝達系による血管平滑筋の収縮など、種々の作用を有しています。

再生医療分野では、ヒトES/iPS細胞の細胞分散時の細胞死抑制や、ヒトES/iPS細胞の凍結保存後の細胞生存率の向上、ヒトES/iPS細胞の三次元培養時の使用も報告されており、ヒトES/iPS細胞の培養時には必須の化合物です。

### 規格(案)

- 含量 (HPLC) : 99.5%以上
- 溶解性 : 水に可溶
- エンドトキシン : 0.25EU/mg未満
- マイコプラズマ否定試験済み
- 生菌数試験済み
- 残留溶媒 確認試験実施済み



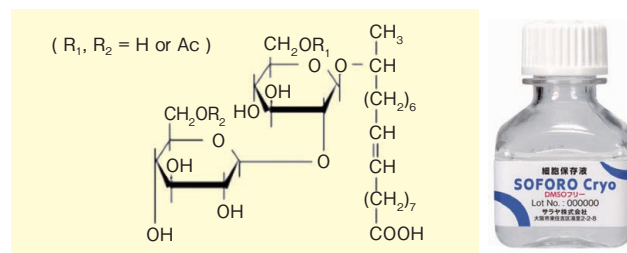
コードNo.	品名	規格	容量	希望納入価格(円)
252-00701	Y-27632	細胞培養用	5mg	120,000
258-00703			25mg	480,000

当社では、ヒトES/iPS細胞研究に寄与するため、原薬等登録原簿(MF)に登録された低分子化合物 (<https://labchem-wako.fujifilm.com/jp/category/00797.html>)、細胞培養用途にエンドトキシンやマイコプラズマ否定試験を実施したCultureSure®低分子化合物 (<https://labchem-wako.fujifilm.com/jp/category/00564.html>) を販売しています。

## DMSO不含の凍結細胞保存液 SARAYA

### SOFORO Cryo

本品は、ソホロースリピッド\*(SL)を配合したDMSOフリーの細胞用凍結保存液です。融解後の細胞生存率が高く、細胞毒性が低いため、融解後は保存液を除去せず、そのまま培養できます。DMSO不含に加え、動物由来成分不含、タンパク質不含のケミカルディファインド組成です。



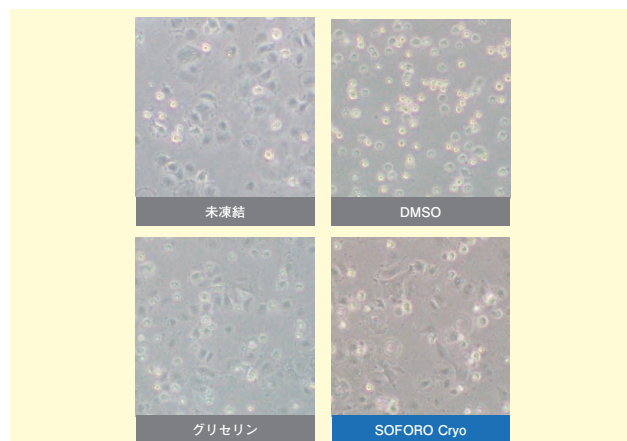
\*ソホロースリピッド：天然酵母による発酵技術から作られる糖脂質型天然界面活性剤で、氷晶形成の抑制効果があります。

### 特長

- DMSO不含
- 解凍後の除去不要
- 動物由来成分不含
- 細胞生存率が高い

### データ

#### hMSCへの凍結保存効果(細胞への影響)



「ソホロースリピッドの細胞凍結保存液としての利用可能性」第17回日本再生医療学会総会(2018)  
野上明日香<sup>1)</sup>、龍見宗樹<sup>1)</sup>、大河原弘達<sup>2,3)</sup>、齋藤充弘<sup>2,3)</sup>、竜瑞之<sup>1)</sup>、平田善彦<sup>1)</sup>、宮川繁<sup>3)</sup>、澤芳樹<sup>3)</sup>  
1) サラヤ株式会社 バイオケミカル研究所 2) 大阪大学医学部附属病院 未来医療開発部 3) 大阪大学大学院医学系研究科 心臓血管外科

SOFORO Cryoでは融解後に除去せずに1時間培養した場合にDMSO及びグリセリンに比べ、未凍結に近い形態を維持し、細胞への影響が少なかった。

コードNo.	メーカーコード	品名	容量	希望納入価格(円)
385-19211	45206	SOFORO Cryo	30mL	15,000

Ⓔ…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10月時点での情報です。最新情報は、当社HPをご参照下さい。

## ヨアン・オーガスト・アルフェドソン (1792. 1. 12 ~ 1841. 10. 28)

愛媛大学大学院 理工学研究科 白勢 洋平

## 1. はじめに

机の上を見渡すと、スマートフォンやノートパソコンなどの小型で便利な電子機器が目に入り、近頃は通りを走る電気自動車やHV車を見かけることも多くなりました。これらの電子機器にはリチウムイオン電池が組み込まれており、資源としてのリチウムは発展する社会を支えるのに欠かせない重要なレアメタルといえるでしょう。2019年にリチウムイオン電池の開発に携わった方々がノーベル化学賞の受賞者に選出されたことも記憶に新しいはず

です。今でこそ社会に欠かせないリチウムですが、その資源的な価値や採掘の方法も歴史と共に大きく変動してきました。リチウム元素の発見は今から約200年前まで遡ります。発見したのは若きスウェーデンの化学者ヨアン・オーガスト・アルフェドソン (Johan August Arfwedson, 1792–1841, 図1) です。彼は1817年にペタル石 (petalite,  $\text{LiAlSi}_4\text{O}_{10}$ , 図2) から新元素リチウムを発見しました。最も軽い金属元素であるリチウムの発見にはアルフェドソンをはじめとした才気あふれる偉大な科学者たちが関わっています。

## 2. アルフェドソンとベルセリウス

アルフェドソンは1792年に卸商と工場経営を営むスウェーデンの裕福な家庭に生まれました。14歳になるまでは家庭で教育を受け、1806年に北欧最古の大学としても名の知れているスウェーデンのウプサラ大学に入学しま

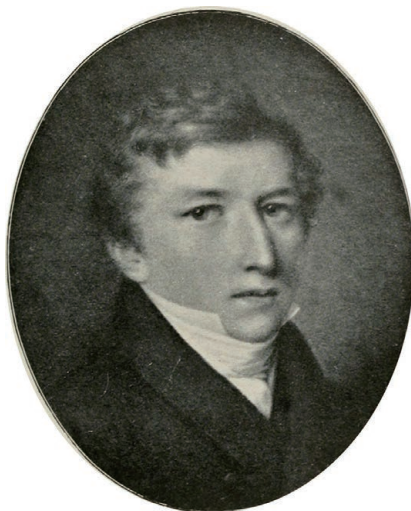
図2. ペタル石 (petalite,  $\text{LiAlSi}_4\text{O}_{10}$ )

図1. ヨアン・オーガスト・アルフェドソン (参考文献1より)

す。ウプサラ大学で鉱山学の学位を取得したのちに、ストックホルムの王立鉱山局に入り、書記官見習いとなりました。そして、彼の人生に大きな影響を与える出会いを果たします。アルフェドソンは、ストックホルムのカロリンスカ医科大学で教授をしていた化学者であり医者でもあったイェンス・ヤコブ・ベルセリウス (Jöns Jacob Berzelius, 1779–1848) の講義に出席し、彼の研究室で鉱物の化学分析をする機会を得ました。ベルセリウスはセレンなどの新元素の発見や、元素記号をアルファベットで表記する方法の考案など化学史を語るうえでは欠かすことのできない人物です。

アルフェドソンがはじめに調べたのはイタリアのヴェスヴィオ山から産出した灰柱石 (meionite,  $\text{Ca}_4\text{Al}_6\text{Si}_6\text{O}_{24}\text{CO}_3$ ) と白榴石 (leucite,  $\text{KAlSi}_2\text{O}_6$ ) でした。さらにマンガン酸化物についても分析を行い、新たな成果を報告します。彼の特筆すべき点はその非常に丁寧な分析のやり方にあったといえるでしょう。ある日のこと、マンガン酸化物の加熱実験を行っているとき、酸化マンガン (II) ( $\text{Mn}^{2+}\text{O}$ ) と酸化マンガン (III) ( $\text{Mn}^{3+}_2\text{O}_3$ ) と異なる生成物が得られました。酸化マンガン (II) 1 g

を加熱して得られたその褐色の生成物は1.0735 gでした。そこで、彼はマンガンと酸素の重量を綿密に計算し、酸化マンガン (II) と酸化マンガン (III) を足し合わせたような化学組成の物質を考えたのです。つまりは、酸化マンガン (II, III) ( $\text{Mn}^{2+}\text{Mn}^{3+}_2\text{O}_4$ ) となり、彼はその質量濃度をMn 72.82%、O 27.18%と計算から求めています。今でこそこれらの化学式や原子量が精確にわかっているため、 $\text{Mn}^{2+}\text{Mn}^{3+}_2\text{O}_4$ は質量濃度Mn 72.03%、O 27.97%であるという数字は計算から簡単に出てきますし、酸化マンガン (II) 1 gを加熱すると酸化マンガン (II, III) ( $\text{Mn}^{2+}\text{Mn}^{3+}_2\text{O}_4$ ) となり、その重量は1.0752 gであろうと数値を導き出せるでしょう。しかしながら、当時のアルフェドソンはこれらを正確に実験から導き出したのです。前述の理論値との重量の差はわずか1.7 mgです。この成果からも彼の分析技術の高さがうかがえます。

マンガンの研究を終えたアルフェドソンは、ベルセリウスからウート島で発見されたペタル石という鉱物を分析のテーマとして与えられました。この鉱物からリチウムを発見することになるわけですが、ペタル石にはホセ・ボニファシオ・デ・アンドラダ・イ・シルバ (José Bonifácio de Andrada e Silva, 1763–1838) という偉人も関わってきます。

アンドラダはブラジルの政治家であり、化学者、鉱物学者、詩人でもありました。彼は1790年頃からヨーロッパ各地で調査と研究を行い、ウート島からいくつもの新種の鉱物を見つけます。そのうちのひとつは特徴的な割れ方をするところから、ギリシャ語の「petalon (葉)」をもとにペタル石 (petalite) と名付けました。同時にリチア輝石 (spodumene,  $\text{LiAlSi}_2\text{O}_6$ , 図3) なども見つけ出し、1800年にドイツ語の雑誌に報告しております。しかし、当時このウート島からの新鉱物の報告



図3. リチア輝石 (spodumene,  $\text{LiAlSi}_2\text{O}_6$ )

に着目した者はあまりおらず、1817年になってようやくスウェーデンの鉱物学者のもとからウト島のベタル石がベルセリウスのもとに届いたのです。

### 3. リチウムの発見

1817年、若きアルフェドソンは師から教わった通りの方法でベタル石の分析を行いました。炭酸カリウムを用いてシリカの量を決定し、炭酸アンモニウムを用いてアルミナの量を求めました。しかしながら、その結果にアルフェドソンは当惑することになります。実験から求められた酸化物の全量が100%にならず、96%にしかならないのです。いくら経験が浅くとも、この単純な実験でここまで大きな分析誤差にはならないだろうと考え、ナトリウムが含まれている可能性を検討することにしました。炭酸カリウムや炭酸ナトリウムを使わずに分析を行ったところ、予想通りに硫酸ナトリウムと思しきものが得られ、酸化ナトリウムの重量に換算してみました。すると、さらに混乱は深まります。今度は全量が100%を超えてしまうのです。若きアルフェドソンは何かミスをしたのではないかと気落ちして師であるベルセリウスに相談しました。すると、話を聞いたベルセリウスはアルフェドソンの行った実験を心から称賛しました。アルフェドソンがきちんと科学的に実験を行い、結果を考察していたからです。誠実に実験を行い、捏造は絶対にするなというのがベルセリウスの研究の作法でした。ベルセリウスは、1818年1月に、アルフェドソンが行った実

験の結果をウィルヘルム・ヒシンゲル (Wilhelm Hisinger, 1766–1852) にこう書き送りました。

「・・・これらの実験事実は、ベタル石が新しいアルカリ元素を含むことを期待させます・・・飽和容量が大きく、ナトリウム塩として計算すると重量が超過するのは、ナトリウム塩よりずっと軽い塩基をふくむからでしょう。それが真実ならアルフェドソンは、たった二度目の鉱物の分析で、たいへん重要な発見をするという幸運を手にしたわけです・・・」

アルフェドソンが新しいアルカリ金属元素を見つけたのは確実に、その化合物の性質も報告しました。しかし、残念ながら単体金属の単離を行うことはできませんでした。師のベルセリウスの助言を受けて、この元素はカリウムやナトリウムと異なり鉱物界から発見されたことから、ギリシャ語の「lithos (石)」にちなんで、「リチウム (lithium)」と名付けることにしました。この新元素の発見ではベルセリウスの貢献はきわめて大きいものです。普通なら発見者には二人の名前が刻まれても良いものですが、師はアルフェドソンひとりの名前で発表させたのです。科学史では、ベルセリウスの貢献は大きなものであるにもかかわらず、アルフェドソンだけがリチウムの発見者とされます。それがベルセリウス自身の希望であり、師の寛大さの表れでした。その後、アルフェドソンはリチア輝石やリチア雲母からもリチウムを見つけ出します。

1818年のはじめに、ベルセリウスのライバルともいわれるイギリスの化学者ハンフリー・デービー (Sir Humphry Davy, 1778–1829) によって、ごくわずかな量ながら金属リチウムの単離が成功しました。同年、クリスチャン・ゴットロープ・グメリン (Christian Gottlob Gmelin, 1792–1860) がリチウムは美しい深紅色の炎色反応を示すことを見つけます。1821

年には、ウィリアム・トマス・ブランド (William Thomas Brande, 1788–1866) が酸化リチウムの電気分解による金属リチウムの単離に成功し、20世紀前半になると金属リチウムの工業的生産方法が確立され、その後の商用利用へとつながっていきます。

### 4. アルフェドソンのその後

アルフェドソンは、リチウム発見の報告ののち、1818年から1819年にかけては、師であるベルセリウスと共にヨーロッパ各地を旅しました。帰国後は自宅の敷地内に実験室をつくり、生涯をそこで過ごすことになりました。1821年にはスウェーデン王立科学アカデミー会員の荣誉に選ばれました。その後も鉱物の分析を続け、同年スイス産の藍晶石やヴェスヴィオ山の霞石や方ソーダ石の分析結果を報告し、金緑石やウラン化合物などの分析にも着手しました。

その後、アルフェドソンは鉱物の名前にもなりました。1823年にイギリスの鉱物学者ヘンリー・ジェイムズ・ブルック (Henry James Brooke, 1771–1857) は、グリーンランドから見つけた新鉱物に、アルフェドソンが鉱物学へもたらした多大なる貢献を讃えて「arfvedsonite (アルベゾン閃石)」と名付けました。このアルベゾン閃石は、暗緑色、板状の結晶で、 $(\text{Na})(\text{Na}_2)(\text{Fe}^{2+}_4\text{Fe}^{3+})\text{Si}_8\text{O}_{22}(\text{OH})_2$ の化学組成で示される角閃石の一種です (図4)。現在では、角閃石グループの鉱物種類分類の体系化に伴って、マグネシウム置換体である苦土アルベゾン閃石



図4. アルベゾン閃石 (arfvedsonite)



(Na) (Na<sub>2</sub>) (Mg<sub>4</sub>Fe<sup>3+</sup>)Si<sub>8</sub>O<sub>22</sub>(OH)<sub>2</sub>をはじめとする5種類の角閃石にアルフェドソンの名前が残っています。いずれもナトリウムなどのアルカリをやや多く含む火成岩に伴う産状が多いです。

1824年には、アルフェドソンは、ベルセリウスとヒシングルが科学アカデミーの鉱物コレクションを整理するのを手伝ったり、ウート島へ行き、ベタル石やリチア輝石などを採取したりしました。しかしながら、その後は化学の研究よりも、相続した資産の管理などに追われてしまい、研究に没頭することはできなくなってしまいます。彼が亡くなる前年には、スウェーデン王立科学アカデミーが、リチウム発見の偉大な功績を讃えて、アルフェドソンに金のメダルを贈りました。1841年10月28日、彼は自宅のあるスウェーデンのヘデンセで眠りにつきました。慎重かつ丁寧な実験を行う若き日のアルフェドソンがたどり着いたリチウムの発見は今なお彼の名と共に歴史に刻まれています。

## 5. リチウム資源

さて、アンドラダはスウェーデンのウート島からベタル石やリチア輝石を見つけ出しておりましたが、これらの含リチウム鉱物はどこにでも一般的に産出するわけではありません。ウート島はストックホルム群島の一つであり、当時は鉄鉱山として有名でした。しかしながらここで重要なのは、鉄鉱石が産出することではなく、鉱山内にペグマタイトという岩体が分布していたことです。ペグマタイトは花崗岩に伴う粗粒な結晶からなる岩石です(図5)。融液時に水やフッ素、ホウ素、リンなどの成分を多く含んでいるためリチウムやセシウム、REE(希土類元素)などの不適合元素が濃集します。言ってしまうと、マグマが固まる際に岩石に入りきらなかった残り物が水と一緒に集まっているのです。ペグマタイトはリチウム資源の採掘対象とな



図5. リチウムペグマタイト

写真下部には紫色の塊状のリチア雲母と、白色の巨大なリチア輝石の結晶が確認できる。

り、カナダのタンコ鉱山という有名なペグマタイト鉱床ではリチア輝石を採掘しています。日本では福岡県にある長垂山のリチウムペグマタイトで、戦時中にリチウムを目的としてリチア雲母が採掘されました。ここは日本で唯一のベタル石の産地でもあります(図6)。しかしながら、採掘当時は鮮やかな紫色のリチア雲母が採掘の目印となっていたので、白色が目立たないベタル石は見逃され、捨てられていたようです。

リチウムは、融剤やグリース、窯業用途に使われていたほか、核融合燃料の材料としても急速に需要が高まりました。冷戦後、リチウムの需要は減少しましたが、今後は電気自動車の普及に伴ってリチウムの消費量が著しく増加することが予想されます。また、採掘方法にも大きな変化がありました。リチウムペグマタイトや粘土鉱床から採掘していたものが、塩湖からの採掘が主流となり大量生産が可能となったために、2000年代になると一度リチウムの価格は大きく下落しました。そし



図6. 福岡県長垂産のベタル石

て、需要の増加に伴ってリチウムの価格はまた値上がりしたのですが、アタカマ塩湖をはじめとするいくつかの大きな塩湖にその埋蔵量は集中しているため、その生産力には極めて大きな地域的偏りがあります。

アルフェドソンによるリチウムの発見から200年少し経った今、リチウムは偏りがあるものの、海水中や地殻中など微量ながら地球上に広く分布していることもわかりました。科学分野や社会に与えた影響を考えると、若きアルフェドソンが測りとった4%の欠落は、今では計り知れないほど重いものとなっています。

## 【参考文献】

- 1) Johan August Arfwedson : [https://fr.wikipedia.org/wiki/Johan\\_August\\_Arfwedson](https://fr.wikipedia.org/wiki/Johan_August_Arfwedson) (2021年5月24日閲覧)
- 2) Johan August Arfwedson : [https://en.wikipedia.org/wiki/Johan\\_August\\_Arfwedson](https://en.wikipedia.org/wiki/Johan_August_Arfwedson) (2021年5月24日閲覧)
- 3) 桜井 弘 : 「元素と化学者 鉱物からアルカリ金属元素リチウムを発見したアルフェドソン」, 月刊うちゅう, 35 (7), 16 (2018).
- 4) Weeks, M. E. and Larson, M. E. : "J. A. Arfwedson and his Services to Chemistry", *J. Chem. Educ.*, 14 (9), 403 (1937).
- 5) 渡辺 正 (翻訳), Per Enghag (原著) : 「元素大百科事典」(朝倉書店) (2014).

