

ドージンニュース

DOJIN NEWS

CONTENTS

Review

金ナノ粒子の調製とそれを利用したバイオセンシング

三浦 佳子・米澤 徹

連載

ライブセルイメージング技術講座 3

櫻井 孝司

Topics on Chemistry

時間分解蛍光測定

池上 天

2005

ISSN0385-1516

No.113

目次

Review

金ナノ粒子の調製とそれを利用したバイオセンシング

名古屋大学大学院工学系研究科 三浦 佳子・

東京大学大学院理学系研究科 米澤 徹 1

ライブセルイメージング技術講座 3

浜松医科大学光量子医学研究センター 櫻井 孝司 10

Topics on Chemistry

時間分解蛍光測定

同仁化学研究所 池上 天 9

Commercial

新製品案内

残留塩素測定キット 14

ピオチン標識用キット 16

蛍光標識用キット 18

試作品

ピオチン標識用キット 17

Q&A

細胞増殖アッセイキット 19

関連商品

SAM 関連試薬 8

お知らせ

TTD-14-crown-4 についてのお知らせ 9

カタログ・パンフレットのご案内 15

キット性能変更 17

販売中止 21

第15回フォーラム・イン・ドージン開催報告 22

製品案内

容量、価格は下記ページをご覧ください。

残留塩素測定キット-SBT法 14

残留塩素測定試薬-SBT法 14

色素液 14

検水調整液 14

Biotin Labeling Kit- NH₂ 16

Biotinylation Kit (Sulfo-OSu) 16

Anti-Nitroguanosine monoclonal antibody

(Clone #NO₂ G52) 16

Fluorescein Labeling Kit-NH₂ 19

Oyster™-556 Labeling Kit-NH₂ 19

Oyster™-656 Labeling Kit-NH₂ 19

Cell Counting Kit 21

Cell Counting Kit-8 21

Cell Counting Kit-F 21

MTT(Iyophilized) 21

HEPES 21

HEPES buffer solution 21

1-Methoxy PMS 21

WST-1 21



平成17年の飛躍を祈って、同仁化学グループ社員でだご汁と豚汁をいただきました。本年もどうぞよろしくお願ひ申し上げます。



金ナノ粒子の調製とそれを利用したバイオセンシング Preparation of Gold Nanoparticles and Their Applications for Biosensing



三浦 佳子
(Yoshiko Miura)
名古屋大学大学院工学研究科



米澤 徹
(Tetsu Yonezawa)
東京大学大学院理学系研究科

[Summary]

Metal nanoparticles exhibit size-dependent optical, electronic, magnetic and catalytic properties, which are of great potential for engineering new materials and sensors. Prospective applications for nanoparticles in small-sized electronic devices, such as single electron transistors as well as in biosensing and bioimaging. Especially, for biosensing and bioimaging applications, gold and silver nanoparticles, which are covalently linked to biomolecules, such as peptides, nucleic acids, and proteins, have been intensively investigated according to their high absorption coefficients at the absorption peak maximum, that is, at ca. 520 nm and ca. 420 nm, respectively. In addition, biosensing using gold nanoparticles can be a cost-effective and easy to use for sintering electron microscopic samples, thanks to their easy preparation and high contrast against electron beams.

In this paper, we would like to concentrate on gold nanoparticles, which can be more stable than silver nanoparticles, because of the stability against oxidation of gold nanoparticles and of stronger bonding formation between Au-S on the particle surface. Some preparative techniques of gold nanoparticles with different sizes and promising biosensing methods with gold nanoparticles will be surveyed.

キーワード：ナノ粒子、金、センシング、染色、プラズモン共鳴、電子顕微鏡

1. はじめに

ナノ粒子が近年のナノテクノロジーブームによって、材料として研究が広く展開されるようになって久しい^{1,2)}。ナノ粒子にも、その材料、目的によって様々な種類のものがあり、光学材料、磁性材料、導電材料としての応用展開が検討されてきている³⁾。特に、可視光の波長程度の粒子径を持つナノ粒子はそれ自体が無色であっても、規則的に集積させることによって、特定の波長のみの光を遮断するフォトニック結晶としての利用が考えられており、可視光の回折による構造色を発現することができる⁴⁾。また、蛍光材料として、最近ではCdS、CdSeなどの半導体粒子にも注目が集まっており、量子ドットを用いたバイオセンシング材料として大いにもてはやされている⁵⁾。また、磁性粒子として知られる酸化鉄は、磁場をかけることによってガン温熱療法に用いられる検討がなされている⁶⁾。

一方、ナノ粒子のうち特に金は染色材料として、教会で古くから使われているステンドグラス、日本では江戸切子などの鮮やかな赤色を出すための材料として使用されてきている。最近では、塗料向け無機顔料や陶器のための着色剤としても利用が始まってきている。こうした金ナノ粒子の広い意味でのバイオセンシングに対する応用展開は、透過型電子顕微鏡のための生体染色剤から始まり、長い間利用され、さらには家庭内で用いられるキットとしての応用にまで広く展開されてきた。これは、金の高い発色性や低いと考えられている毒性によるところも大きい。そして、透過型電子顕微鏡での染色のために様々な大きさのナノ粒子の製造法が開発されてきた⁷⁾。

本小文では、金属、半導体、酸化物など様々な種類があるナノ粒子の中でも金ナノ粒子に焦点をあて、その調製法とバイオセンシングへの実際の応用展開について展望してみたい。

2. 金ナノ粒子の調製法 - 概要

金ナノ粒子は最も古くから研究されてきているナノ粒子であり、様々な製法が知られている。その鮮やかなワインレッドの色彩は、ステンドグラスなどに使用されている。こうした金ナノ粒子はガラス内に存在するイオンが焼結の際に還元されて生じるものである。一方、最近では、陶器の無鉛赤色絵具や無機塗料顔料としても利用されてきている。これらは、液相でナノ粒子を調製し分散液として得て使用するものである。1600年ごろの記述に、塩化金を植物由来のアルコールで還元したとの記述もあると聞くと、こうした液相法での金ナノ粒子調製の科学的研究は1857年、イギリスの有名な化学者であるFaradayによって検討されたものが最初である^{8,9)}。Faradayは、得られた金ナノ粒子分散液が電解質の添加によって不安定になることを見出し、高分子を添加して安定化した。彼の金ナノ粒子分散液は現在でもロンドンで見ることができ、調製法を変えることによってその粒子径を変えることができ、色を変化させることも可能である。ナノ粒子の色は、プラズモン共鳴によるものであり、Mie理論によって検討されているが、一般的には粒子径が大きくなると吸収極大は長波長にシフトすると考えられている¹⁰⁾。

水に分散する金ナノ粒子の調製法として最も利用されているものが、クエン酸やアスコルビン酸を還元剤として用いているもの

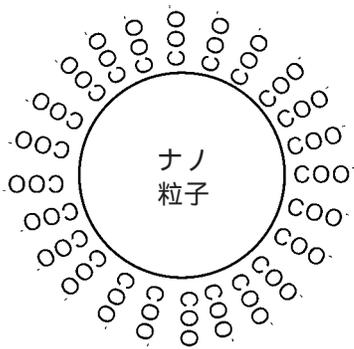


図1 Schematic illustration of independently dispersed gold nanoparticles without stabilizing reagents prepared by citric reduction of AuCl_4^- クエン酸還元法によって調製された無修飾独立分散金ナノ粒子の分散構造の模式図

である¹¹⁻¹²。1973年、Frensはクエン酸を利用した還元によって、粒子径を制御し、なおかつ均一なナノ粒子を作成することを提案した。この報告は、ナノ粒子の材料応用への最初の大きなステップとなったといえる¹¹。決して濃度を高くはできないが、他の保護剤を導入せずともナノ粒子を分散させられる利点を有している。一般的には、これらのナノ粒子は、その表面にクエン酸が吸着し、アニオン性を帯びていると理解されている(図1)。粒子径は約20 nmのものが調製しやすく、この程度の粒子径を持った金ナノ粒子は非常に鮮やかな赤色を示し、その吸収係数も比較的大きい。アスコルビン酸による還元は、Stathisらによって報告されている¹²。還元剤としては、この他に、水素、ホルムアルデヒド、エタノール、タンニン酸、ジボラン、水素化ホウ素塩などが用いられ、また、超音波、光照射、線照射などのエネルギー照射による還元事例も報告されている。

細胞ラベルを考えたとき、小さなナノ粒子を用いるほど、感度と分解能が向上するといっている。しかし、あまり小さいものは、電子線の散乱能も小さく、プラズモン吸収も示さないので、電子顕微鏡観察にも光学的観察にも不向きであると言える。また、粒子径がそろっていれば、粒子径の違いによる多重染色が可能であるので、比較的大きな粒子で単一粒子径のものを得る方法はきわめて重要である。そこで、生体系への応用の観点からよく利用されるいくつかのナノ粒子の製法に関して、次の節で述べることにする。

3. 粒子径をそろえた金ナノ粒子

3.1 ウンデカゴールド

ウンデカゴールドは文字通り Au_{11} クラスターのことを意味する。11個の金原子からなるクラスターがトリアリルフォスフィンとアニオン性リガンドに包埋されている。すでにさまざまにラベルされたものが市販されているが、このような小さなナノ粒子を作成することは難しい。また、ウンデカゴールドはやや黄色い色を示す。粒子径は1 nmを切り、約8.2 nm²である。1分子修飾のウンデカゴールドも市販されており、生体系の修飾剤としては非常に良く利用される金クラスターである。

3.2 グルタチオン

グルタチオン(GSH)とは、グルタミン酸、システイン、グリシン(いずれもアミノ酸)から成るトリペプチドで非タンパク質性のチオール成分として細胞内に大量に存在する。グルタチオンはシステインが真ん中にあり、チオール基に対して、非常に剛直でバルキーな部位がついていると考えられ、実際、グルタチオンの存在下、次節のように、塩化金酸溶液に水素化ホウ素ナトリウムを添加することで単分散で高分散の金ナノ粒子をえることができる¹³。さらに、チオール分子はそれ自体がジスルフィドになる酸化反応を用いて金イオンを還元することができるため、塩化金酸に対して、グルタチオンを大過剰に加えることによって、特別に還元剤を加えることなく、グルタチオンによって保護された金ナノ粒子を合成することが出来る。このとき、GPCカラムを利用することによってナノ粒子をその大きさで分画することができる¹⁴。

3.3 水素化ホウ素ナトリウム還元 - チオール保護

チオールを保護剤として事前に添加し、塩化金酸溶液を水素化ホウ素ナトリウムを滴下することで容易に2~3 nm程度の粒子径を持つ金ナノ粒子を調製することができる。1994年にBurstら報告してから^{15,16}、その容易性、高い再現性、安定性によって広く用いられる方法である。有機溶媒に分散したナノ粒子を得るには、あらかじめ相転移触媒によって塩化金酸を有機相に移してから還元を行う。チオールを保護剤としてナノ粒子を調製するときには、その粒子径は、チオール/金比と、チオールの分子構造によって制御されることが知られている^{17,18}。チオール/金比が大きくなるほど、得られるナノ粒子の粒子径は小さくなり¹⁷、チオール部に対して分子がバルキーになるほどやはり粒子径は小さくなる¹⁸。そのことは、図2に示すように、チオール部に対してバルキーになれば、チオール-金の相互作用力は同じで非常に強いので、ナノ粒子が小さくなる必要があると考えられる。

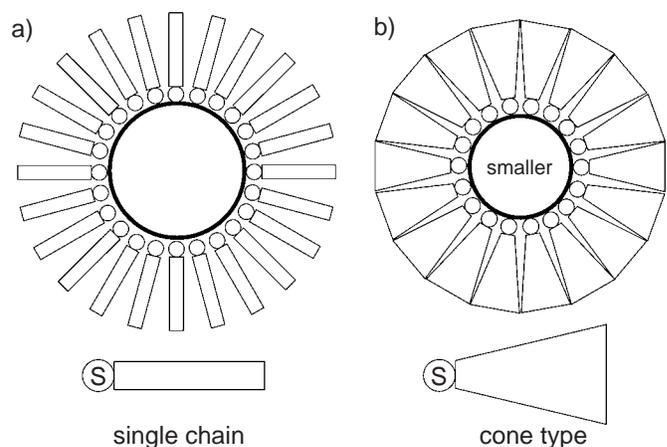


図2 Effect of the ligand structure on gold nanoparticle sizes
ナノ粒子の構造を制御する配位子構造の効果

3.4 リンを用いた還元

塩化金酸水溶液を激しく攪拌しているところにリンエーテル溶液を導入することによって、常温で金ナノ粒子を調製することが出来る。pH調整剤として炭酸カリウムを添加する。数分で塩化金酸の黄色から暗い赤色に変化して、ナノ粒子の合成ができていくことが分かる。また、ナノ粒子溶液を加熱することでナノ粒子は成長するほか、さらに塩化金酸とリン溶液を添加することで、ナノ粒子を太らせることができる¹⁹⁾。

3.5 タンニン酸による還元

3.6に述べるクエン酸がナノ粒子調製のための金属イオン還元剤として有名であるが、クエン酸にタンニン酸を加えることで、還元速度を速めることができる。クエン酸(1ナトリウム)とタンニン酸の混合水溶液を、加熱還流してある塩化金酸溶液に一気に投入する。投入速度が粒子径に影響することもあるので注意が必要である。このとき、タンニン酸が還元の役割を担い、クエン酸が分散剤として働いていると考えることが多い。

3.6 クエン酸による還元

Frensによって開発された方法で¹¹⁾、10 nmを超える金ナノ粒子を単一粒径で供給できるため、広く応用されている。還元剤としてはクエン酸3ナトリウムを用い、塩化金酸の沸騰水溶液に添加する。大きなナノ粒子を生じさせるには、塩化金酸濃度の増大や全体の溶液量の増大を行う。沸騰した塩化金酸水溶液に水溶性チオールとクエン酸を同時に添加しても金ナノ粒子を得ることができる。このとき、チオール/金イオンの量比が粒子径に大きく影響する²⁰⁾。但し、チオールを先に添加したときには、金イオンとチオールとの相互作用によりクエン酸では還元できない。

同様にアスコルビン酸(ビタミンC)によって塩化金酸を還元し、金ナノ粒子を得ることも可能である¹²⁾。

3.7 エタノールによる還元

アルコールがアルデヒドになる酸化反応は、金イオンの還元に利用することができる。pH調整剤として炭酸カリウムを含む塩化金酸水溶液にエタノールを添加し、超音波照射することで、金ナノ粒子を得られる。また、こうした溶液を適切な水溶性高分子の存在下、リフラックスすることで、金ナノ粒子を容易に再現性よく得ることができる²¹⁾。

4. 金ナノ粒子を利用した生体の染色

金ナノ粒子の生体への最もシンプルな応用は、金のプラズモン共鳴による強い発色性を用いた生体や組織の染色である²²⁾。生体染色は、生体組織や分子の生体内分布を調べるのに最も頻りに用いられる方法の一つである。染色によって生体の実態を明らかにすることは、生体組織の基本的な情報だけでなく、遺伝子の発現、酵素の働きを知る貴重な手段である。色素、蛍光、放射線ラベルなど各種の方法が試みられているが、コントラストと特異性の高い生体染色の開発に向けて、絶えず努力が続けられている。金ナノ粒子は、金の分子安定性が金属としては高く、生体に対する毒性も低いと思われ(詳細は後述する)ナノ粒子がナノレベルであることから生体親和性を確保しやすかったことから、金ナノ粒子の応用として早くから試みられてきた。

もちろん、蛍光標識などでも、抗体と結合させて、様々な分子

を修飾することが可能であるが、蛍光の一部を修飾することによって、光学的な性質に影響を与えることもしばしばであるので、新規な蛍光分子の設計には注意が必要である。一方、金ナノ粒子ではその光学特性は金属のプラズモンに基づいているので、退色が少なく、種々の抗体の修飾に耐えることができ汎用性が高い。また、金ナノ粒子が貴金属であることから、光特性を生かして、光学顕微鏡で観察することができる上、透過型や走査型の電子顕微鏡など種々の電子顕微鏡でも、高いコントラストを持つため容易に観察可能である²³⁾。また、有機化学的な染色剤ではないので、酵素活性(特にHRP活性)がないことから、酵素抗体法と併用することも可能で、複雑な生体を重ねて染色する際にも有用である。現在は、抗体結合金ナノ粒子が大量に市販されており、金に銀が接着することを利用し、増感するキットも販売されている。抗体結合金ナノ粒子を利用した生体染色法はもはや定番となったといってもいい。例えば図3のような生体染色写真を得ることができる。特に金ナノ粒子部分はコントラストが強く、簡単に確認することができる。

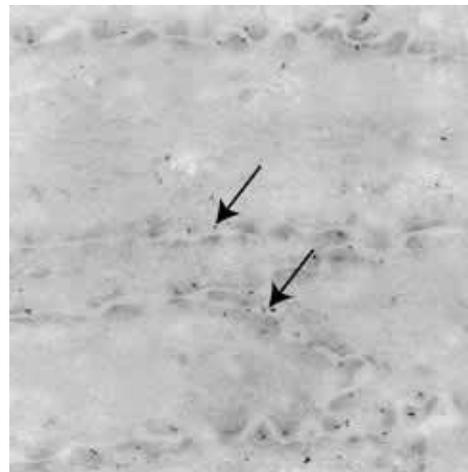


図3 Transmission electron micrograph of a living matter. The inset arrow indicates the gold nanoparticles
生体組織の電子顕微鏡写真。矢印部位が金ナノ粒子

生体染色剤として金ナノ粒子を利用する際には、金独特の発色性を用いているが、これをより高度に利用することも可能である。梶見らは様々な生体分子のバイオイメージングについて報告しているが²⁴⁾、その観察の際にも金ナノ粒子の強い発色性やプラズモン現象は利用価値が高い(図4)。蛍光分子や金ナノ粒子で標識した抗体を用いて、生体膜上の分子をラベルすると、その分子の*in-situ*での動きを観察することができる。蛍光分子(GFPなど)ではその観察時間は10秒以下で、その後著しく退色してしまうのに対して、金ナノ粒子は20分近く観察することが可能であり、生体の動きをリアルに追跡するのに適している。例えば、GPIアンカーである、CD59を標識して、NRK細胞を観察したところ、動きが一時的に分子の拡散運動が一時的に拘束されることを見出した²⁵⁾。このことはGPIアンカー部分が集合したラフトドメインを形成して、シグナル伝達を起こしていることを示している。また、リン

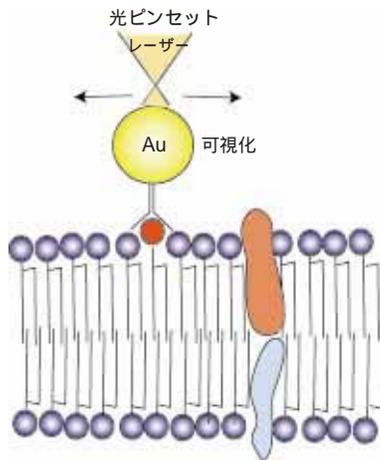


図4 Schematic illustration of single particle tracking with gold nanoparticles

金ナノ粒子を用いた生体膜のイメージングの概略と光ピンセット

脂質の分布についても膜骨格に沿って分布していることがわかった。このように金ナノ粒子を用いることによって、動的な生体の性質を詳細に明らかにすることが可能となっている。

また、金ナノ粒子は発色団として用いることもできるが、強い吸光性も有している。梶見らは前述の実験を発展させて、集光性を利用した膜タンパク質の光ピンセットの開発も報告している²⁴⁾。金ナノ粒子にレーザーをあてると、金ナノ粒子の集光性から光の間には相互作用が働く。このレーザーをずらすとその相互作用に伴って、膜タンパク質を牽引することができるのである。この原理から、膜分子をピンセットのように用いて動かすことができ、光ピンセットと呼ばれている。抗体で染色した金ナノ粒子で膜物質を可視化することができるが、その膜物質を光ピンセットで動かすことによって、膜物質の性質や生体膜の流動性、ドメインなどを詳細に調べることが可能である²⁷⁾。線維芽細胞のCD44を金ナノ粒子で標識化して、細胞膜上を牽引した。その結果、細胞膜上には膜タンパク質の拡散係数の違い、粘弾性の違いが存在することを *in-situ* 測定より明らかにすることができた。更に、膜物質で細胞膜上を走査したところ、膜上の流動性の違いを可視化することができ、アクチン骨格を描くことができた。

このように金ナノ粒子は今までの蛍光分子にはない強い発色性を備えているが、金ナノ粒子と抗体を単に結合しただけでは金ナノ粒子の疎水性が高く、タンパク質の変性を招きやすい。また、金ナノ粒子に対するタンパク質の非特異吸着も考えられる。更に金ナノ粒子がむき出しの状態であれば、粒子同士の凝集をきたしやすいので、単純な生体染色以外（一分子標識、イムノセンシング）の用途に対しては難点が出てくる。そこで、材料化学サイドではよりよい金ナノ粒子の調製方法やコート分子の開発が注視されている。

コンタクトレンズ、人工臓器など、どのような生体材料をとっても生体適合性が高く、タンパク質などの非特異吸着が少ない、表面の需要は高い。このような性質を持つ表面で注目を浴びているのは、ポリエチレングリコール修飾表面で、親水性が高いが、タンパク質の非特異吸着性が少ないことから優れた表面修飾法とし

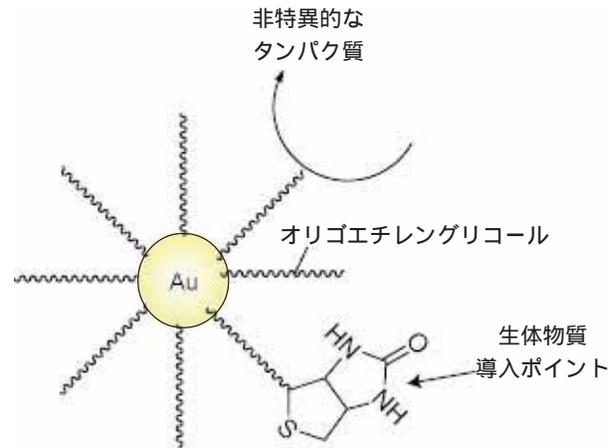


図5 Gold nanoparticles with oligoethylene glycol coating
オリゴエチレングリコールで保護した金ナノ粒子

て知られている²⁸⁾。ポリエチレングリコールを用いて、金ナノ粒子を不活性化することもできるが、エチレングリコール鎖はオリゴマーレベルの長さがあればタンパク質の非特異吸着を防ぐことができる（図5）。トリエチレングリコールチオールで修飾した金ナノ粒子溶液にリゾチームを加えても非特異的な金ナノ粒子の凝集は観察されなかった²⁹⁾。このような不活性な表面の一部を官能基で置換すれば、金ナノ粒子の生体親和性は特異的なものになり、バイオセンシングする上で有用である。また、反応性官能基を導入したポリエチレングリコールを用いた例も報告されている³⁰⁾。

また、金ナノ粒子を生体親和性の高い分子で被覆することで細胞や菌体に積極的に取り込ませることもできる。カチオンで表面を修飾した金ナノ粒子は細胞膜との親和性とナノ粒子の生体浸透性のため、細胞に積極的に取り込まれる。さらにカチオン性の粒子がDNAと親和性を持つことから³¹⁾、金ナノ粒子を用いたジーンデリバリーを行うことができると報告されている³²⁾。しかし、同時にカチオン性の金ナノ粒子については、細胞毒性を有することがわかっており³³⁾、ナノ材料の生体応用への可能性と安全性は注意深く見守る必要があるとされている。

5. 金ナノ粒子を用いたタンパク質や生体リガンドのバイオセンシング

金ナノ粒子によるバイオセンシングについても盛んに検討が行われている。既に実用レベルで盛んに利用されているのは、生体染色と同様で、金ナノ粒子の“色”を用いた、イムノクロマトグラフィーによるバイオセンサーである。金ナノ粒子は発色性がよくかつ退色しないことから、保存安定性、判定の容易性、特別な装置を必要としないなどの長所を發揮する。他の酵素発色法や蛍光標識法などに比べて、センシングに有用である。現在は、妊娠判定キット、糖尿病検査キットなど我々が薬局で目にするものから、医療機関で感染症の検査を受けるときに用いるものまで非常に広く使われている。ここに具体的な方法とその例を示しておく。

イムノクロマトグラフィーのキットはターゲットに対して結合

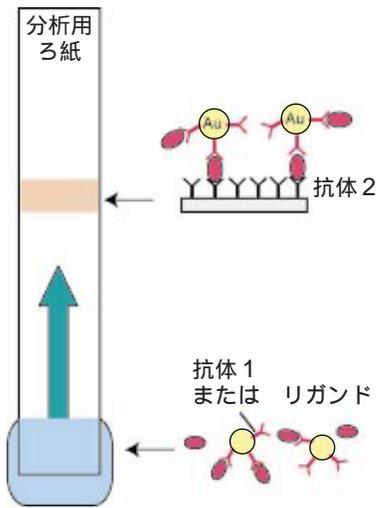


図6 Immunoaffinity chromatography with gold nanoparticles
金ナノ粒子を用いたイムノクロマトグラフィー

する二種類の抗体を用いることによって作成することができる(図6)³⁴。ターゲットとなるタンパク質やウイルスを認識する二種類の抗体を作成し、一つは金ナノ粒子(抗体1またはリガンド)もう一つ(抗体2)はクロマト用紙に結合させておく。試料溶液と金ナノ粒子を混合してから、クロマトグラフィーの操作を行うと、抗体1がターゲットを捉えて、金ナノ粒子と共に移動していく。このターゲットが抗体2によって捉えられると、ターゲットは抗体1と2にサンドイッチされ、抗体2の場所に金ナノ粒子がターゲットと共に沈着し、スポットとして現れることになる。染色方法の一種であるから、金ナノ粒子を用いる必要があるわけではないが、高い発色性を生かすことによって、蛍光では考えられないような高い検出感度を実現することが可能である。例えば、コレラ毒素のBサブユニットのリガンドである、GM1のリポソームに金ナノ粒子を内包させて、コレラ毒素のモノクローナル抗体と組み合わせてセンシングを行った例を紹介しよう³⁵。コレラ毒素と金ナノ粒子を含む溶液を用いて、クロマトグラフィーを行ったところ、fg/mlの濃度から、コレラ毒素はクロマト用紙上で明確なスポットとして検出され、他のタンパク質とは明確に区別された。また、この分析に必要なのは20分足らずであり、PCR法を用いたコレラ菌の検出の方法に比べて遥かに早いことがわかった。金ナノ粒子の濃度を検出するスキャナーと組み合わせれば、金ナノ粒子のスポットから毒素濃度の定量も可能である。このように、抗体を結合させた金ナノ粒子を用いた検査の充実、医療の向上に多いに役立っている。現在も優れた抗体の開発や、抗体に変わる生体リガンドの利用などによって、検査能力の向上が試みられている。

ここで用いている金ナノ粒子の“色”について多少厳密に考えると、金のプラズモン吸収が元になっているので、ナノ粒子の粒径によって制御されている。したがって、均一な金ナノ粒子を用いれば、分光機器と組み合わせ、敏感なバイオセンシングの系を組み立てることができる。多価なタンパク質を用いた、センシングの系を挙げてみよう。ダイメリックなタンパク質であるトロ

ンピンのリガンドを基板上に結合させ、ここにトロンピンを加える³⁶。その後、トロンピンのリガンドを結合させた、粒径一定の金ナノ粒子(12 ± 1 nm)を加えて、タンパク質の量をUVスペクトルと水晶発振子によって測定した。UVスペクトルの530 nm付近に金ナノ粒子に基づく吸収体が現れ、nmオーダーから、検出することができた。また、同様にリガンドを固定化し、トロンピンと金ナノ粒子を加えたところ、トロンピンの検出を行うことができた。一方で、ウシ血清アルブミンなどのタンパク質は検出されなかった。

また、多価なタンパク質としてよく知られているのが、糖鎖認識タンパク質であるレクチンである³⁷。レクチンは多種多様であるが、通常、糖鎖認識部位はタンパク質中に複数あり、多量体のタンパク質であることが多い。金ナノ粒子にポリエチレングリコールをリンカーとしてラクトースを結合させた。この金ナノ粒子は水や緩衝溶液に安定に分散し、アルブミンを加えても変化なく分散していた。このタンパク質にラクトース認識レクチンである、RCA₁₂₀を加えたところ、金ナノ粒子が凝集して、色調がピンクから紫色に変化した(図7)。また、吸光度の変化から $\mu\text{g/ml}$ オーダーで、レクチンを検出できることがわかった。この認識性は金ナノ粒子に結合させたラクトースの量によって変化した。そして、この色調変化は過剰のラクトースを加えることによって、元に戻ることがわかった。その他、マンノースを結合させた金ナノ粒子とコンカナバリンAの組み合わせによっても、著しいUVスペクトルの変化が観察されることがわかっており³⁸、 $\mu\text{g/ml}$ オーダーからの検出が可能である。

球状ウイルスもリガンドとの結合サイトが複数存在することから、多価な結合を利用し、微粒子による検出が可能である。磁性微粒子をアデノウイルスやヘルペスウイルスの抗体と結合させる。この水溶液に対して、ウイルスを加えていくと、それぞれのウイルスに特異的に、磁性微粒子が凝集することが動的光散乱によって観測された。結合の検出感度は未だ低いが、発色性に優れた金ナノ粒子の利用や粒径の調節によって、球状ウイルスは鋭敏に検出可能と予想される³⁹。

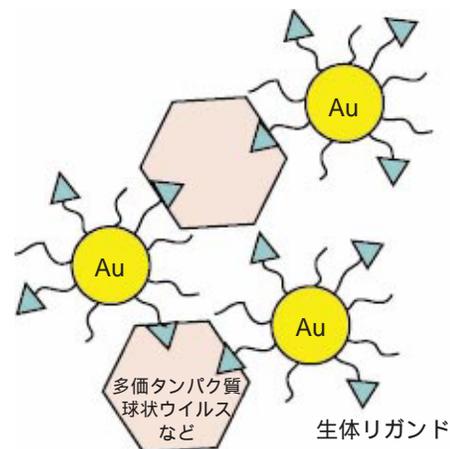


図7 Aggregation of gold nanoparticles with proteins having multi-binding sites
金ナノ粒子を用いた多価タンパク質との凝集体の形成

また、生体リガンド自体の弱い相互作用を金ナノ粒子で増幅して、測定しようとする試みもある。生体ではペプチドとタンパク質、糖鎖とタンパク質といった明確に知られている相互作用の他に、タンパク間や糖鎖間の弱い相互作用の存在が知られており、細胞間接着やシグナル伝達に大きな役割を果たしている。ルイスX糖鎖、ラクトースを結合した金ナノ粒子を調製し、PBSバッファ中で混合した。ルイスX結合金ナノ粒子はCa²⁺イオン存在下で、電子顕微鏡や動的光散乱によって、金ナノ粒子の凝集が観察された。一方、ラクトースでは凝集は見られなかった⁴⁰⁾。

このように、金ナノ粒子の色調やUV活性を生かすことで、生体相互作用を鋭敏に観察することが可能である。医療の高度化、ポストゲノムの解析のためのタンパク質の解析などに威力を発揮することが期待される。

6. 金ナノ粒子を用いたDNA解析

現在、バイオテクノロジー分野において最も需要が多いのは、遺伝子の解析である。遺伝子の解析は、ゲノム解析といった基礎科学分野から、医療診断、そして、親子鑑定や犯罪捜査など使用例を挙げればいとまがない。ゲノムの解析はPCR技術、DNAマイクロアレイの発達によって、迅速化著しい。金ナノ粒子を用いたDNAの解析技術についてはどうであろうか。

DNAは遺伝子として機能しているが、化学的には一本のDNAが相補鎖を伴って、二重らせんを形成する特性を有している。DNAと金ナノ粒子のハイブリダイゼーションは、そもそも金ナノ粒子のアーキテクチャーとして提示された。金ナノ粒子にDNAを結合させて、金ナノ粒子と相補的なDNAと組み合わせた(図8)^{41,42)}。金ナノ粒子を一定の間隔で提示することができ、この金ナノ粒子の分子集合体は温度によって可逆的に集合・解離することができた。この方法は金ナノ粒子のナノ空間制御に優れた方法であり、金ナノ粒子を利用したデバイスや回路の精密設計への利用を示唆している。現在は光リソグラフィーなどのトップダウン的なアプローチとDNAのナノアーキテクチャーによって、精密な金ナノ粒子配置が可能になっている。また、このように金ナノ粒子の配置を精密に制御すると、金ナノ粒子同士の発色性などが粒子間距離によって変化することから、DNAの相補鎖形成を金ナノ粒子で追跡できると考えられた。

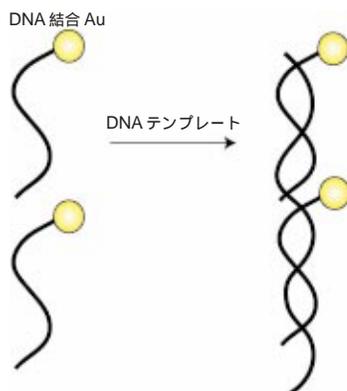


図8 Self-assembly of gold nanoparticles along DNA template
DNAテンプレートに沿って集合した金ナノ粒子組織体

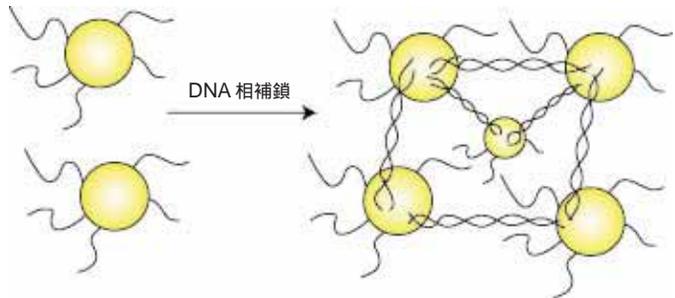


図9 Aggregation of gold nanoparticles by base-pairing DNAs
相補DNA鎖によって形成された金ナノ粒子凝集体

12merのオリゴDNAを結合させた金ナノ粒子を調製し、ここに相補的な配列を含むDNA鎖(24、38、72mer)を加えた(図9)。金ナノ粒子は単独では分散しているが、DNAの二重相補鎖の形成によって、それぞれの金ナノ粒子が架橋され、凝集した⁴³⁾。10 nm程度の金ナノ粒子を用いている場合、凝集によるピークの変化はわずかであるが、基板表面上で金ナノ粒子を凝集させると、吸光度に著しい上昇が見られた。また、50 ~ 100 nmの大きな金ナノ粒子をわずかに加えると、金ナノ粒子のピーク値に大きなシフトが生じて、DNAの二重相補鎖の形成を色調変化で追跡することができた⁴⁴⁾。

また、DNAの解析では、遺伝子のわずかな違いを検出することが重要である。例えば一塩基の違いが疾患に関与することが多いからである。15-mer DNAを結合したDNAに塩を加えていくと、凝集を観察することができるが、相補的なDNAを加えない系、相補的なDNAを加えた系、ミスマッチのDNAを含む系ではその凝集や色調に変化があることがわかった⁴⁵⁾。そして、大変面白いことに金ナノ粒子と溶液の界面に位置する一残基の核酸(この場合、5'末端の核酸)の違いで、凝集挙動には大きな差が見られた。完全相補鎖DNAの場合には凝集に基づく、色調の変化があり、ピークが525 nmから560 nmに変化するのに対して、一塩基違うDNAの場合はピークの変化は観察されなかった。ところが、ミスマッチをDNA相補鎖の中央部に含む場合にはその変化は殆ど観察されなかった。このように金ナノ粒子の凝集と色調変化のみに基づいて、ミスマッチの検出や位置の特定ができる可能性も示唆されている。

相補鎖形成における金ナノ粒子の凝集は色調変化にも現れるが、種々の機器を組み合わせた定量、精密測定も試みられている。DNAを水晶発振子上に固定化して、そのDNAと相補的な金ナノ粒子を加えて、その変化を観測した。DNA相補鎖の形成によって、次々に金ナノ粒子が集積化して、10⁻¹⁰Mオーダーの金ナノ粒子を加えるだけで、QCMの振動数変化となって現れ、基板上的DNAを同定することができた⁴⁶⁾。同様の手法で、金ナノ粒子を表面上に集積化すると、基板近傍に金ナノ粒子が集積化するため、インピーダンスの変化など、電気化学的手法による検出も可能であった。

更にDNAマイクロアレイの可視化やDNAの二重相補鎖形成の解析に用いることもできる。微細に固定化したDNAに相補的なDNAを有する金ナノ粒子を吸着させた。二重相補鎖を形成すると金ナノ粒子がマイクロプレート上に結合する。金ナノ粒子を可視化剤として用いると、ターゲットとなるDNAがpMレベルの低い濃度から検出することが可能であった。また、金ナノ粒子の吸収は530 nm付近であるが、530 nmだけでなく、630 nmのレーザーでも高感度検出が可能だった。さらに、動力学的解析を行ったところ、二重相補鎖の形成は濃度依存的であり、協同的効果によっても相補鎖形成の速度論が変化することがわかった⁴⁷⁾。

このようにDNA解析における金ナノ粒子の利用は多いに可能性がある。未だ、金ナノ粒子の粒径制御といった物理化学的な側面と、DNAの相補鎖の長さ、ミスマッチなどの影響の研究が混在している感がある。しかし、一つ一つの問題をクリアしていけば、その他のバイオセンシング同様、蛍光法などをのり解析技術になると考えられる。

7. おわりに

本小文では、金ナノ粒子のみにターゲットを絞り、その調製法とバイオセンシングへの応用について最近の研究を概観した。ナノ粒子はそのサイズが生体分子のサイズであり、それ自体の取り扱いにもこれまで生体系で応用されてきたテクニックが使われることも可能である。今後は、さらに金のみならず様々なナノ粒子が生物科学分野に利用されてくると思われる。しかしながら、ナノ粒子の基本部分はここにご案内した内容が今後も基礎となって展開されるものと考えている。今後、物理化学、ナノ粒子科学者と生物科学者がひとつとなって、きわめて新しいアイデアのもとにナノ粒子のバイオ応用が展開されることを筆者らは期待し、本小文が幾ばくかの貢献ができれば幸いである。

参考文献

- 1) 細川益男監修、野城清編「ナノパーティクル・テクノロジー」、日刊工業新聞社 (2003).
- 2) 米澤徹監修、「金属ナノ粒子の合成・調製、コントロール技術と応用展開」、技術情報協会 (2004).
- 3) H. Nakamura, Y. Yamaguchi, M. Miyazaki, H. Maeda, M. Uehara and P. Mulvaney, *Chem. Commun.*, 2844 (2002).
- 4) 物質・材料研究機構・粒子アSEMBL研究会編、「粒子集積化技術の世界次世代材料とデバイスへのアプローチ」、工業調査会 (2001).
- 5) I. Umidu, R. Koizumi, A. Sugimoto, M. Inada, T. Makino, A. Sugimura, Y. Sunaga, T. Ishii, and Y. Nagasaki, *Physica*, **E71**, 1102 (2004).
- 6) M. Shinkai, B. Le, H. Honda, K. Yoshikawa, K. Shimizu, S. Saga, T. Wakabayashi, J. Yoshida and T. Kobayashi, *Jpn. J. Cancer Res.*, **92**, 1138 (2001).
- 7) M. A. Hayat, *Colloidal Gold, Principles, Methods and Applications*; Vol. 1, Academic Press: New York, 1989.
- 8) M. Faraday, *Philos. Trans. R. Soc. London*, **147**, 145 (1857).
- 9) M. Kerker, *J. Colloid Interface Sci.*, **112**, 302 (1986).
- 10) S. Link and M. A. El-Sayed, *J. Phys. Chem. B*, **103**, 8410 (1999).
- 11) G. Frens, *Nature (London) Phys. Sci.*, **241**, 20 (1973).
- 12) E. C. Stathis and A. Fabrikanos, *Chem. Ind.*, **27**, 860 (1958).
- 13) S. Chen, H. Yao and K. Kimura, *Langmuir*, **17**, 733 (2001).
- 14) Y. Negishi, Y. Takasugi, S. Sato, H. Yao, K. Kimura, and T. Tsukuda, *J. Am. Chem. Soc.*, **126** 6518 (2004).
- 15) M. Brust, M. Walker, D. Bethell, D. J. Schiffrin, and R. Whyman, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **1994**, 801.
- 16) M. Brust, J. Fink, D. Bethell, D. J. Schiffrin, and C. J. Kiely, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **1995**, 1655.
- 17) D. V. Leff, P. C. Ohara, J. R. Heath, and W. M. Gelbart, *J. Phys. Chem.*, **99**, 7036 (1995).
- 18) T. Yonezawa, K. Yasui, and N. Kimizuka, *Langmuir*, **17**, 271 (2001).
- 19) W. P. Faulk and G. M. Taylor, *Immunochemistry*, **8**, 1081 (1971).
- 20) T. Yonezawa, M. Sutoh, and T. Kunitake, *Chem. Lett.*, **1997**, 619.
- 21) T. Yonezawa and N. Toshima, *J. Mol. Catal.*, **83**, 167 (1993).
- 22) M. A. Hayat, *Colloidal Gold, Principles, Methods and Applications*; Academic Press: New York, 1989.
- 23) 稲沢譲治、津田均、小島清嗣、「顕微鏡フル活用術イラストレイテッド」、秀潤社 (2000).
- 24) 梶見明弘、小林剛、吉村昭彦、徳永万喜洋、「バイオイメージングでここまで理解る」、羊土社 (2003).
- 25) T. Fujiwara, K. Richie, H. Murakoshi, K. Jacobson, and A. Kusumi, *J. Cell. Biol.*, **157**, 1071 (2002).
- 26) E.-L. Florin, A. Pralle, J. K. H. Hörber, E. H. K. Steizer, *J. Struct. Biol.*, **119**, 202 (1997).
- 27) (a) K. Ritchie and A. Kusumi, *J. Biol. Phys.*, **28**, 619 (2002). (b) K. Suzuki, R. E. Sterba, and M. P. Sheetz, *Biophys. J.*, **79**, 448 (2000).
- 28) K. L. Prime and G. M. Whitesides, *Science*, **252**, 161 (1991).
- 29) M. Zheng and X. Huang, *J. Am. Chem. Soc.*, **126**, 12047 (2004).
- 30) T. Ishii, H. Otsuka, K. Kataoka, and Y. Nagasaki, *Langmuir*, **20**, 561 (2004).
- 31) T. Yonezawa, S. Onoue, and N. Kimizuka, *Chem. Lett.*, **31**, 1172 (2002).
- 32) T. Niidome, K. Nakashima, H. Takahashi, and Y. Niidome, *Chem. Commun.*, **33**, 1978 (2004).
- 33) C. M. Goodman, C. D. McCusker, T. Yilmaz, and V. M. Rottello, *Biocunjugate Chem.*, **15**, 897 (2004).
- 34) 石原一彦、畑中研一、山岡哲二、大矢裕一、「バイオマテリアルサイエンス」、東京化学同人 (2003).
- 35) A. Y. Soohyoun, T. R. Decory, A. J. Baeumner, and R. A. Durst, *Anal. Chem.*, **75**, 2256 (2003).
- 36) V. Pavlov, Y. Xiao, B. Shlyahovsky, and I. Willner, *J. Am. Chem. Soc.*, **126**, 11768 (2004).
- 37) H. Ostuka, Y. Akiyama, Y. Nagasaki, and K. Kataoka, *J. Am. Chem. Soc.*, **123**, 8226 (2001).
- 38) D. C. Hone, A. H. Haines, and D. A. Russell, *Langmuir*, **19**, 7141, 2003.
- 39) J. M. Perez, F. J. Simeone, Y. Saeki, L. Josephson, and R. Weissleder, *J. Am. Chem. Soc.*, **125**, 10192 (2003).
- 40) J. M. D. L. Fuente, A. G. Burrientos, T. C. Rojas, J. Rojo, J. Canada, A. Fernandez, and S. Penades, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **40**, 2258 (2001).
- 41) C. A. Mirkin, R. L. Letsinger, R. C. Mucic, and J. J. Storhoff, *Nature*, **382**, 607 (1996).

- 42) A. P. Alivisatos, K. P. Johnsson, X. Peng, T. E. Wilson, C. J. Loweth, M. P. Brochez, and P. G. Schultz, *Nature*, **382**, 609 (1996).
- 43) (a) Y. C. Cao, R. Jin, and C. A. Mirkin, *Science*, **297**, 1536 (2002).
(b) J. J. Storhoff, A. A. Lazarides, R. C. Mucic, C. A. Mirkin, R. L. Letsinger, G. C. Schatz, *J. Am. Chem. Soc.*, **122**, 4640 (2000).
- 44) R. A. Reynolds, C. A. Mirkin, and R. L. Letsinger, *J. Am. Chem. Soc.*, **122**, 3795 (2000).
- 45) K. Sato, K. Hosokawa, and M. Maeda, *J. Am. Chem. Soc.*, **125**, 8102 (2003).
- 46) F. Patolsky, K. T. Ranjit, A. Lichtenstein, and I. Willner, *Chem. Commun.*, 1025 (2000).
- 47) R. Bailey, J.M. Nam, C. A. Mirkin, and J. T. Hupp, *J. Am. Chem. Soc.*, **125**, 13541 (2003).

著者紹介

氏 名：三浦 佳子 (Yoshiko Miura)

年 齢：33 歳

所 属：名古屋大学大学院工学研究科 助手

連 絡 先：〒464-8603 名古屋市千種区不老町
TEL:052-789-2538 FAX:052-789-2528
E-mail: miuray@mol.nagoya-u.ac.jp

出身大学：京都大学大学院工学研究科材料化学専攻

学 位：博士 (工学)

研究テーマ：生体高分子によるナノマテリアルサイエンス

氏 名：米澤 徹 (Tetsu Yonezawa)

年 齢：39 歳

所 属：東京大学大学院理学系研究科 助教授

連 絡 先：〒113-0033 東京都文京区本郷 7-3-1
TEL & FAX: 03-5841-2356
E-mail: yonezawa@nanoparticle.info

出身大学：東京大学大学院工学系研究科工業化学専攻

学 位：博士 (工学)

研究テーマ：金属ナノ粒子の調製と応用、シリコン表面を用いた
単分子膜形成、ナノマテリアルサイエンス主な著書：「金属ナノ粒子の合成・調製、コントロール技術と最適
応用」、米澤 徹 監修、技術情報協会 (2004).Tetsu Yonezawa, "Well-dispersed Bimetallic
Nanoparticles -Nanoparticles of Noble Metals Syn-
thesized in Liquid Phase" in "Morphology-Con-
trolled Materials ~ Advanced Materials Process-
ing and Characterization", Y. Waseda and A.
Muramatsu Eds., Chapter 4, Springer-Verlag, Ber-
lin, pp. 85-112 (2004).

趣 味：フランス語会話

関連商品

SAM 関連試薬

固体表面に種々の分子を配向・集積させる方法の一つである自己組織化法は、簡便に高密度・高配向な自己組織化単分子膜 (Self-Assembled Monolayers : SAMs) を構築することができるため、研究・応用が活発に行われています。特にチオールやジスルフィド等の化合物は、金表面と反応して Au-S 結合し、SAMs を形成します。

SAMs の性質は、そのアルキル鎖長や末端の官能基、主鎖の親水性などにより変化させることができ、多彩な機能を固体表面に導入できると期待されています。このことから、電気・電子及び光機能性材料、固体表面の改質材料などの機能性材料の研究だけでなく、生体関連分野で電気化学的、及び光化学的特性を用いた生体関連物質のセンシングデバイス、タンパク質の電子伝達機能や、構造の解明などの研究が、活発かつ広範囲に行われています。

センサーなどの構築の際には、電極等の表面を制御することが必要とされますが、アルキルチオール類を金表面に吸着させた SAMs は、金修飾電極や表面プラズモン共鳴 (SPR) 水晶共振子マイクロバランス (QCM) 等に利用されています。いずれも、基板となる金表面にチオールやジスルフィドを用いてプローブ分子を固定化し、ターゲット分子との相互作用をそれぞれ電流、共鳴吸収の角度変化、振動数変化として検出しています。

小社では、7 タイプの各種 SAMs 試薬を取り揃えております。詳細は web をご参照、または info@dojindo.co.jp までお問い合わせください。http://www.dojindo.co.jp/kinousei/sams.html

| 品名 | メーカーコード | 注) |
|---|---------|----|
| 11-Amino-1-undecanethiol, hydrochloride | A423 | *1 |
| 8-Amino-1-octanethiol, hydrochloride | A424 | *1 |
| 6-Amino-1-hexanethiol, hydrochloride | A425 | *1 |
| N-Fmoc-Aminoundecanethiol | F287 | *2 |
| N-Fmoc-Aminooctanethiol | F288 | *2 |
| N-Fmoc-Aminohexanethiol | F289 | *2 |
| 10-Carboxy-1-decanethiol | C385 | *1 |
| 7-Carboxy-1-heptanethiol | C386 | *1 |
| 5-Carboxy-1-pentanethiol | C387 | *1 |
| 10-Carboxydecyl disulfide | C404 | *1 |
| 7-Carboxyheptyl disulfide | C405 | *3 |
| 5-Carboxypentyl disulfide | C406 | *3 |
| 4,4'-Dithiodibutyric acid | D524 | *4 |
| Dithiobis(succinimidyl undecanoate) | D537 | *2 |
| Dithiobis (succinimidyl octanoate) | D538 | *2 |
| Dithiobis (succinimidyl hexanoate) | D539 | *2 |
| 11-Ferrocenyl-1-undecanethiol | F246 | *1 |
| 8-Ferrocenyl-1-octanethiol | F247 | *1 |
| 6-Ferrocenyl-1-hexanethiol | F269 | *1 |
| 11-Hydroxy-1-undecanethiol | H337 | *1 |
| 8-Hydroxy-1-octanethiol | H338 | *1 |
| 6-Hydroxy-1-hexanethiol | H339 | *1 |
| Dithiobis(C ₂ -NTA) | D550 | *2 |

注) 以下の各容量をご準備しております。

*1 10 mg, 100 mg *2 10 mg, 50 mg *3 10 mg *4 500 mg

Topics on Chemistry

時間分解蛍光測定

最近、プロテオーム研究において、タンパク質の機能や相互作用の解析が注目を浴びている。例えば、シグナル伝達系を構成するタンパク質と核酸などの生体分子との相互作用は、細胞の分化・増殖・死などの現象と密接な関連があることが知られており、活発な研究がなされている。このような生体分子間の相互作用解析および検出には、その高感度な測定を可能とするため蛍光色素を利用した手法も多く用いられている。

通常、これら生体試料を用いたアッセイには、インナーフィルター、クエンチング、自家蛍光など多様な要因が絡み測定結果に影響を与える。そこで、これらの要因で引き起こされる測定結果の信頼性の低下を抑える技術の一つに時間分解蛍光測定 (TRF: Time-Resolved Fluorescence) がある。TRFは、ユーロピウム (Eu) やルテニウム (Ru) などランタニド錯体を利用した測定技術である。松本らの報告したユーロピウム錯体 $\text{Eu}(\beta\text{-NTA})_3^{*1}$ の蛍光特性は、その蛍光寿命が 500 ms と FITC の 4.5 ns と比較して優れた時間分解能を有し、また広いストークスシフト 276 nm (λ_{exc} : 339 nm, λ_{em} : 615 nm) とシャープな蛍光スペクトルを示す¹⁾。このため、TRFによる測定では、一般的に寿命の短い蛍光性物質の影響を最小限に抑えることが可能となる (Fig. 1)。蛍光寿命が数 ns であるバックグラウンド蛍光を回避するために、励起光照射後、一般的に 200 μs から 600 μs の間でランタニド錯体由来の蛍光を測定する。

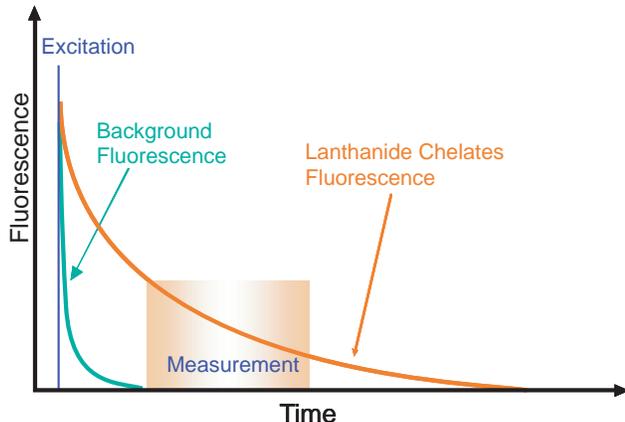


Fig. 1 時間分解蛍光測定

一方で、High Throughput Screening (HTS) における測定には、TRFによる測定結果の信頼性に加えて処理量も求められることから、洗浄・分離の操作が不要なホモジニアスアッセイが望まれる。そこで前述の TRF と蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET: Fluorescence Resonance Energy Transfer) を組み合わせた測定技術 TR-FRET が報告されている²⁾。

TR-FRETでは、ランタニド錯体をドナーとして、フルオレセインやGFPなどのフルオロフォアをアクセプターとして用いる。この両者が近接している場合、ランタニド錯体の光吸収により励起されたエネルギーは、共鳴エネルギー転移によりアクセプターフルオロフォアに転移する。ここでランタニド錯体は時間分解能を有するため、FRETによるシグナルを検出する前に、励起光による試料中の他の化合物やアクセプターからの短寿命蛍光のバック

同仁化学研究所 池上 天

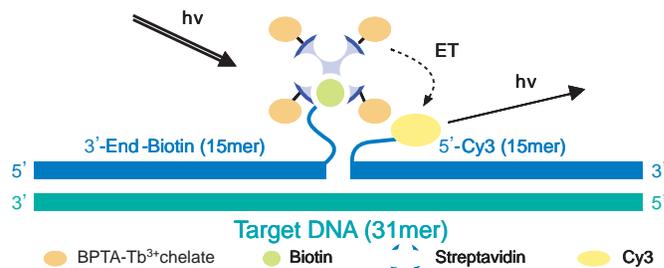


Fig. 2 ホモジニアス DNA ハイブリダイゼーション

グラウンドを抑えることが可能となる。松本らはテルビウムキレート BPTA-Tb^{3+*2} を用いて、ホモジニアスな DNA ハイブリダイゼーションの技術を開発した。ターゲット DNA を検出するプローブとして、一方が 3'-末端にビオチンをつけ BPTA-Tb^{3+} 標識ストレプトアビジンと結合させた DNA、もう一方が 5'-末端に蛍光色素を標識した DNA を用いる。ハイブリダイゼーションが生じると、近接する BPTA-Tb^{3+} から蛍光色素へのエネルギー転移が起り、その結果、アクセプターである色素は自身の 565 nm の蛍光を発する。一方で、ターゲット DNA が検出されない場合、標識されている蛍光色素は紫外光では励起されないため、蛍光は検出されない。これにより、ホモジニアスなターゲット DNA 検出が可能となる (Fig. 2)。

この他、TR-FRET はタンパク質の相互作用など数多くの報告がされており、幅広いアッセイ技術への展開が注目される^{3,4)}。

*1 $\beta\text{-NTA}$: $\beta\text{-naphthoyltrifluoroacetone}$

*2 BPTA: $N,N,N',N'-[2,6\text{-bis}(3\text{'-aminomethyl-1'-pyrazolyl})\text{-4-phenylpyridine}]tetrakis(\text{acetic acid})$

参考文献

- 1) K. Matsumoto, T. Nojima, H. Sano and K. Majima, "Fluorescent Lanthanide Chelates for Biological Systems", *Macromol. Symp.*, **186**, 117 (2002).
- 2) S. Sueda, J. Yuan and K. Matsumoto, "A Homogeneous DNA Hybridization System by Using A New Luminescence Terbium Chelate", *Bioconjugate Chem.*, **13**, 200 (2002).
- 3) M. Gabourdes, V. Bourguine, G. Mathis, H. Bazin and B. Alpha-Bazin, "A homogeneous time-resolved fluorescence detection of telomerase activity", *Anal. Biochem.* **333**, 105 (2004).
- 4) D. J. Moshinsky, L. Ruslim, R. A. Blake and F. Tang, "A Widely Applicable, High-Throughput TR-FRET Assay for the Measurement of Kinase Autophosphorylation: VEGFR-2 as a Prototype", *J. Biomol. Screen.*, **8**, 447 (2003).

TTD-14-crown-4 についてのお知らせ

特許第 3307687 号。本製品を用いたイオン電極は、一部の水処理分野における水質監視用途でオルガノ株式会社へ専用実施権が設定されております。詳細は小社までお問い合わせください。

ライブセルイメージング技術講座

3

～ピントを合わせる～

浜松医科大学量子医学研究センター

櫻井 孝司

(浜松医科大学・21世紀COEプログラム
「メディカルホトニクス」の活動として掲載)

1. はじめに

ライブセルイメージングの第一歩は「細胞に光をあてること」である。今回はイメージングでよく用いられる光の基礎知識を紹介した。今回は光の取り扱いの基礎として、球面レンズによるピント合わせを中心に解説する。顕微鏡システムを使用する際、我々は1)光源の調整、2)細胞への光照射、3)像の検出を行う。実はどの操作もレンズを介したものであり、「光のあて方」だけでなく「光のとらえ方」もレンズによって制御されているわけである。レンズの選択によって像の明るさ・分解能・倍率がおおまかに決まり、調整によって画質やS/N比が改善できる。

2. ピントと焦点

2.1 ピントと焦点のちがひ

ピントの語源をご存知だろうか？オランダ語で照準を合わせるという意の“brandpunt”の外来語とされる。ピントとは観測者によって狙いが定められた2次元平面のある地点や領域を表し、1点ではない。これに対して、焦点(focus)とは光などが集中するある1点を指す。日常ではほぼ同意語として扱われがちな2つの言葉であるが、厳密には異なる意をもつ。カメラ撮影のとき、我々は被写体をファインダー中央域に表示されている枠内に収めながらレンズ繰出し(焦点調整)を行う。こうした観測者の主観に依る照準合わせの動作こそピント合わせであり、狙いが外れると像が不鮮明になる(量ける)。

2.2 身近なピント合わせ

ビデオ顕微鏡システムと光学的な基本構造が類似したもので、我々の日常生活で使用しているものとしてデジタルカメラ、DVD記録再生機やコピー機などがあり、主な働きはやはりレンズによって制御されている。もっとも身近なレンズは我々自身の眼球における角膜(corneal)や水晶体(lens)である。これらを併せると約17ミリの焦点距離をもつレンズとなっており、瞳(pupil)から入射した無限光が網膜(retina)で結像される。毛様体により水晶体の曲率を変えることで焦点距離が調節でき、我々はある範囲の地点に存在する物体にピントを合わせることができる。網膜

に映った範囲を視覚として知覚できるわけであるから、網膜とCCDカメラは光学的には同じ働きを担っているといえる。

3. レンズとは？

レンズは13世紀にロジャーベーコンが発明したとされる。ベーコンが磨いた凸レンズがレンズマメ(ラテン語でlens、ドイツ語でliese)と類似していたことからそう呼ばれたらしいが、現在では光を曲げる光学素子全体を指す。レンズには、1)光を集める、2)像を換えるの2大機能があり、いずれも屈折の法則が基本原理である。光が屈折率差のある媒質間(n_1 n_2)を進行するとき、媒質の境界(界面)で光の進行方向が変わり、その変化は媒質への入射角度(θ)に依存し、以下 から の4法則となる(Fig. 1)。

$\theta = 0$; 界面に垂直に入った光は直進する。

$0 < \theta < \theta_c$; 入射角度(θ_1)と、屈折により曲げられる角度(θ_2)の関係はスネルの法則(snell's law)(1)式となる。

$$n_1 \cdot \sin \theta_1 = n_2 \cdot \sin \theta_2 \dots \dots \dots (1)$$

$\theta = \theta_c$; $n_1 > n_2$ の場合で考えると、 θ_1 よりも θ_2 のほうが早く増加し、先に90度に達する。 $\theta_2 = 90$ のときの角度を臨界角 θ_c (critical angle)といい、屈折光が界面に平行に伝播するようになる。 θ_c は(2)式から求まる。

$$\sin \theta_c = n_2/n_1 \dots \dots \dots (2)$$

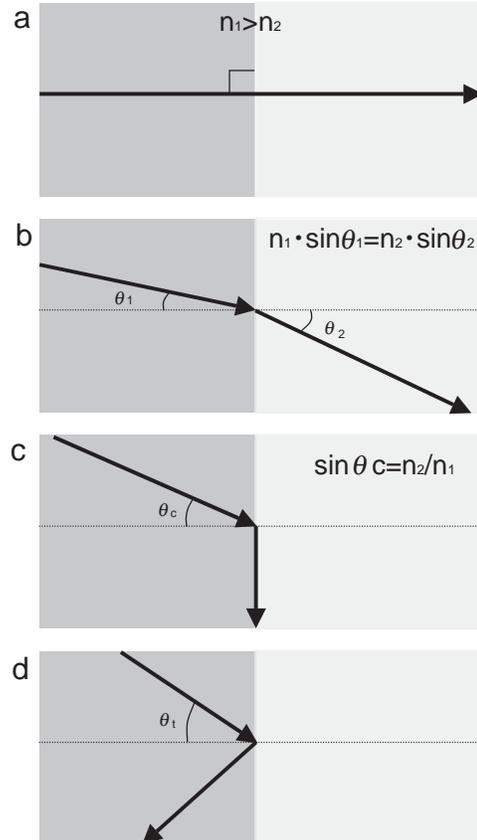


Fig. 1 The angle (θ) of incident light and refraction.
a; $\theta=0$, b; $0 < \theta < \theta_c$, c; $\theta = \theta_c$, d; $\theta > \theta_c$.

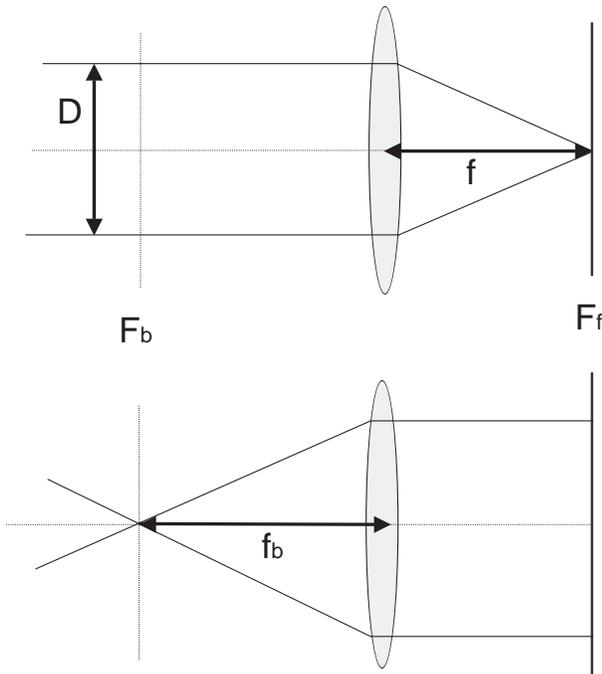


Fig. 2 Planes of front focus (Ff) and back focus (Fb).

$\theta > \theta_c$; θ_c を超えた角度で入射すると屈折光は存在せず、反射光のみとなり、これを全反射 (total internal reflection) とよぶ。光ファイバー (光導波路) は全反射が利用されている。

4. レンズの性能

4.1 焦点

レンズの左側から光軸に平行な光が入射すると、レンズ厚みと収差を無視すれば、光束 (D) の光は前側焦点 (front focus, Ff) に収束する (Fig. 2)。一方、レンズの右側から平行光が入った場合に、光が集まる位置を前側焦点に対して後側焦点 (back focus, Fb) という。光の進行方向には可逆性があるので、行きと反対方向の進行も成立する。たとえば後側焦点の位置に点光源をおけば、レンズからは平行光が出射されることになる。

レンズの位置 (主点) から焦点までの距離を焦点距離といい f で表す。球面レンズの場合、f の値はスネルの法則に従い、レンズの屈折率 (n) と曲率 (r) から決まることになり (3) 式の関係となる。

$$1/f = (n-1) \cdot (1/r_1 - 1/r_2) \dots \dots \dots (3)$$

f の逆数は屈折力 (パワー) と呼ばれる。n の値が大きく、r が小さいほどパワーの大きなレンズとなるが、一方で光が焦点に集まりにくくなり、この現象を収差 (aberration) という。収差はレンズの性質に依存するものと、光の波長によるものがある。前者は球面収差やザイデルの 5 収差と呼ばれ、後者は色収差と呼ばれる。

4.2 開口数

明るいレンズとは、広い範囲から光を束ね、且つ近くに集めることができるものである。従って、レンズの明るさとは、光束の直径 (D) や焦点距離 (f) で決まり、(4) 式で表されるような F

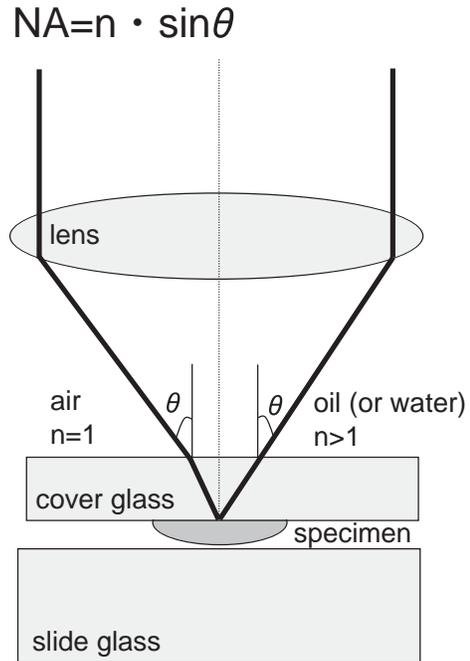


Fig. 3 Definition of NA value.

ナンバーが指標となる。

$$F = f / D \dots \dots \dots (4)$$

さらに、レンズと物体間における媒質の屈折率も含めた明るさの指標として、開口数 (numerical aperture, NA) があり、(5) 式で表される (Fig. 3)。

$$NA = n \cdot \sin \theta \dots \dots \dots (5)$$

現在製作されている対物レンズ (objective lens) の NA 値はカップルする媒体で分類され、ドライ用 ($NA < 1$)、水用 ($0.3 < NA < 1.33$)、標準オイル用 ($0.5 < NA < 1.5$)、特殊オイル用 ($1.1 < NA < 1.65$) の 4 種となっている。

4.3 レーリー分解能

レンズによる集光は無限小の 1 点ではなく、ある有限の大きさがある。この大きさをエアリーディスク (Airy disc) と呼び、その半径 (ϵ) は (6) 式で表され、レーリーリミットと呼ばれる。

$$\epsilon = 0.61 \cdot \lambda / NA \dots \dots \dots (6)$$

$\lambda = 500 \text{ nm}$ 、 $NA = 1.45$ のとき ϵ は約 200 nm となる故に、この付近の数値が光学顕微鏡における XY 平面の分解能限界値となっている。焦点面の厚さは焦点深度 (focal depth) といい、 $\lambda / (NA)^2$ に比例する。焦点深度は光軸 (Z) 方向の分解能ともいえ、その限界値は XY 方向よりも大きくなる。

4.4 倍率

Fig. 4 上においてレンズから a だけ離れた距離にある物体がレンズの反対側の距離 b で像を形成する場合、(7) 式の関係 (合成焦点距離の法則) が成り立つ。

$$1/a + 1/b = 1/f \dots \dots \dots (7)$$

また高さ Y の物体が入射角 (または画角) θ で入射した光が焦点面で像高 Y' になるとき (Fig. 4 中) (8) 式となる。

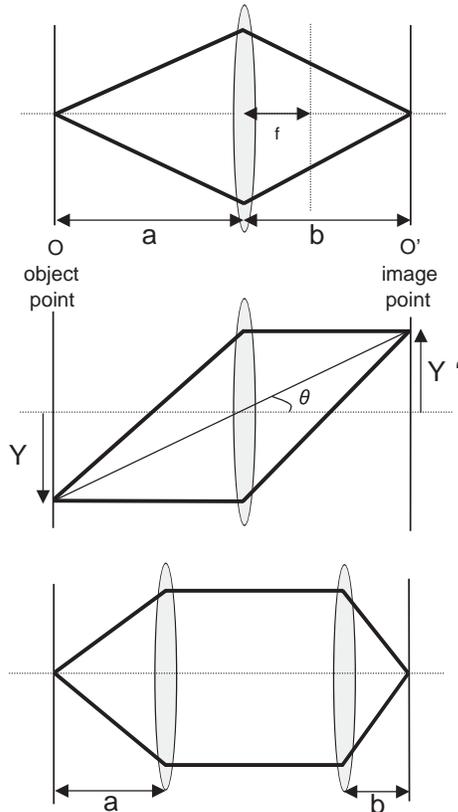


Fig. 4 Magnification of lens. top and middle;non-ICS, bottom;ICS.

$$Y' = f \cdot \tan \theta \dots \dots \dots (8)$$

このYとY'の絶対値の比こそが倍率 (magnification, M) であり、相似関係から(9)式となり、倍率とは要するにaとbの比率のことである。

$$M = Y / Y' = a / b \dots \dots \dots (9)$$

無限遠系(infinity correction system, ICS)光学顕微鏡における倍率は対物レンズと結像レンズの焦点距離の比となっている(Fig. 4下)。結像レンズの焦点距離はニコン製が200ミリ、オリンパス製では180ミリに設定されている。そこで例えばオリンパス製100倍対物レンズ(対物焦点距離は約1.8ミリ)をニコン製顕微鏡にとりつけると111倍となる(ただし空間分解能は不変)。さらに像の明るさは(NA)²/(M)²に比例しており、現行では60倍(NA = 1.45)の対物レンズが最も明るいレンズの部類といえる。

4.5 レンズの分類

これまでレンズの形状が球面であることを前提にしてきたが、レンズはおおまかにわけて次の4つに分類できる

球面レンズ：一般のレンズ、表面の曲率と硝材の屈折率でパワーがきまる。

非球面レンズ：球形以外の曲面(放物面・多項式)できている、円筒型、樽型、フレネル型などがある。

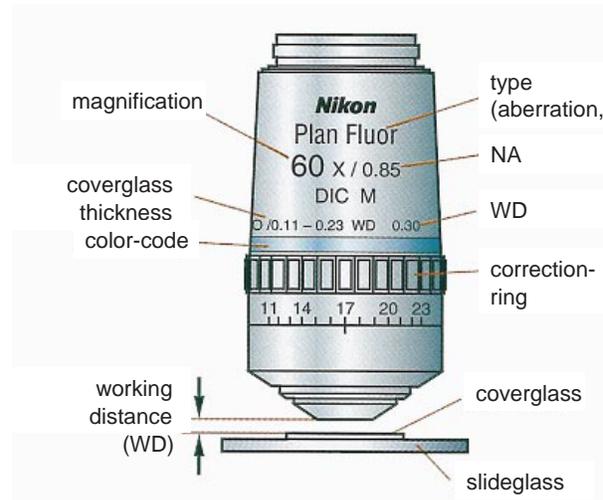


Fig. 5 Scheme of objective lens (60x, PlanFluor, NA=0.85). The lens figure is courtesy from Nikon.

屈折率分布レンズ：レンズ内部に屈折率勾配をつけて光を曲げる。GRIN(セルフォック)円柱レンズなどがある。

回折レンズ：レンズ表面に微細パターンを記録して、ホログラムやフォトリソグラフィなどで用いられる。

5. 対物レンズ

5.1 種類と選択

対物レンズは測定対象に接して光を照射または検出することに用いられ、数枚~10数枚のレンズから構成されている。レンズ枚数は光学性能や用途に依存し、数十種類以上ある。主な性能はFig. 5に示してある通りで、倍率(M)、開口数(NA)、作動距離(working distance, WD)、収差補正(aberration correction)等がある。用途に応じた特殊タイプとして、偏光(polarized contrast)、位相差(phase contrast, Ph)、微分干渉(differential interference contrast, DIC)、暗視野(dark field)などがある。補正環付タイプでは、カバーガラス厚や温度変化により発生する収差の補正ができる。

透過率や色補正の情報はレンズ本体には簡単にしか表示されていないので、厳密な実験を行うときはチェックをおすすめする。例えば紫外領域を用いる場合、我々は専用の対物レンズ(ニコン製でFluor、オリンパス製でF1)を選択するわけだが、実験で用いる波長帯域の透過率が何%であるのか確認したほうがいい。また、色のピントと呼ばれる色収差情報についても、メーカーに問い合わせればかなりのレベルまで教えてもらえる。近年開発された新型プランアポ対物レンズ(ニコン製VC(CFI Plan Apo)、オリンパス製UPLSAPO)は色収差が大幅に改善され、可視光(400~700nm)の帯域では焦点深度以内の誤差となっている。新型対物レンズは近赤外領域においても十分考慮のうえ設計されているので、例えば多光子励起法でも手軽に適用できる。

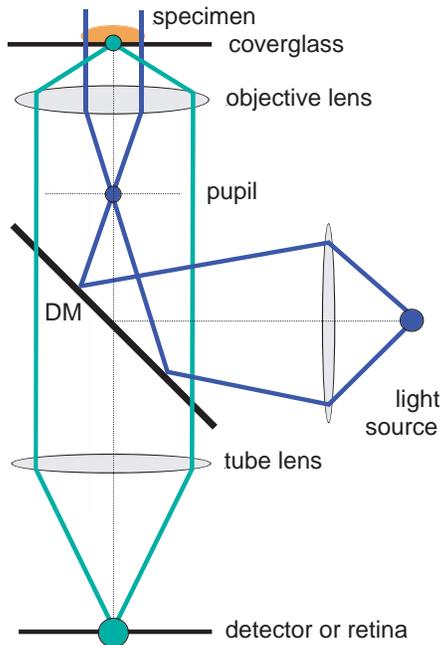


Fig. 6 Optical diagram of basic fluorescence microscope. For excitation of fluorescently-labelled specimen at the focal plane (blue), light source is focused at the pupil (F_0) of objective lens. With tube lens, the emitted fluorescence (green) was concentrated at the plane of detector, or human retina.

5.2 光学的共役関係

二つの内のどちらか一つの点から発した光が他の一つの点に結像する二つの点を共役点(conjugate point)、または光学的共役関係といい、例えば物体と像の関係である (Fig. 6 green)。励起光の光量や照射範囲の調整を適切に行うためには、共役点を確認してほしい。顕微鏡の観察面 (対物レンズ焦点面) と概ね共役関係という位置が存在する。それは視野絞り位置、光検出面や網膜である。共焦点顕微鏡においてピンホール位置は観察面と共役関係となっており、全ての共役点で光を集中させてピントが合うように設計されている。

5.3 瞳とベルトランレンズ

対物レンズの後焦点面はアイポイントと共役であることから瞳とよばれている。瞳面における光束幅、光入射位置、位相板などの調整においてベルトランレンズ (bertrand lens) はたいへん有用である* (Fig. 7)。落射照明のような観察面に光を一様に照明するときは光源と瞳が共役関係となるようにすればよい。例えばランプ光源ならアーク像が瞳面に映るようにし、レーザー光源なら瞳面でビームが絞こまればよい (Fig. 6 blue、Fig. 7a)。共焦点顕微鏡のように観察面でスポット照明を行うときは、瞳面には平行光を入射させる。

*ベルトランレンズ使用上の注意:ベルトランレンズは照明系の調整に大変有用なものであるが、レーザー光など強い光を誤って直視してしまうと最悪で失明することがあるので、フィルター付ゴーグルや CCD カメラを用いるなど慎重に操作いただきたい。

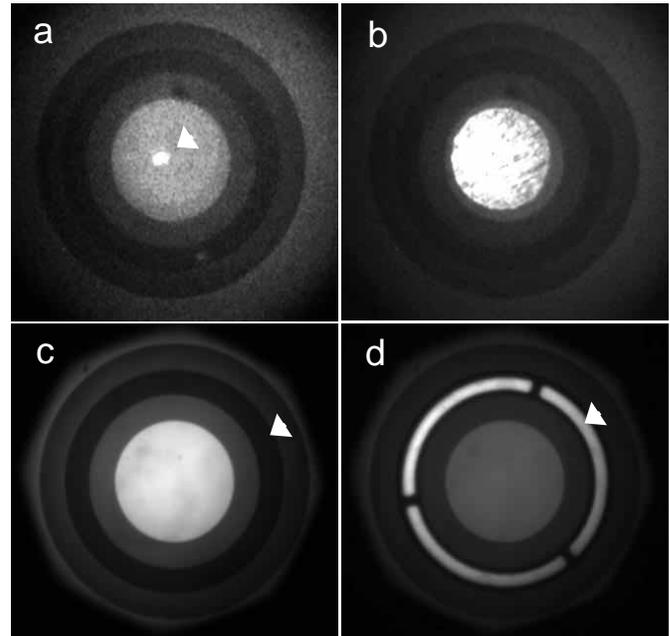


Fig. 7 Images of pupil plane of objective lens with bertrand lens. a; focused laser (arrow), b; defocused laser (center), c; phase plate (arrow), d; overlap of phase plate with annular diaphragm (arrow). Objective lens; 10x, NA=0.25, ADL, Nikon.

6 . おわりに

今回はライブセルイメージング研究において必須と思われるレンズの基礎や対物レンズの知識について大部分を連載 1 で紹介した幾何光学の成書を参考にして解説した。話を簡単にするために、レンズは厚みを無視した薄肉の球面で、全ての光が焦点に集まる (収差がない) という前提とした。ピント合わせとは観測者によるレンズ制御であり、レンズによる光の集め方で空間分解能や倍率 (像の変換) や明るさが規定されていることが理解できたと思う。お手元にある顕微鏡の照明系や結像系の調整や改良を行って、より良い細胞像を得ることに役立てていただくと幸いです。さて、顕微鏡像を改善する場合に最も大切なことは S/N 比を高めることであろう。次回は画像の S/N 比やコントラストを上げるための光学技術や最新顕微鏡について紹介する。

謝辞

本稿執筆において(株)ニコンの松為久美子氏およびオリンパス(株)の田中隆明氏の助言を得た。

対物レンズ情報

ニコン CFI₆₀ シリーズ

<http://www.nikon-instruments.jp/jpn/page/products/list19.aspx>

オリンパス UIS 2 シリーズ

<http://microscope.olympus.com/uis2/jp/>

新製品

残留塩素測定キット

残留塩素測定キット-SBT法 残留塩素測定試薬-SBT法

< 特長 >

- 溶かす手間が不要な溶液タイプ
- 判定しやすい青緑色の発色
- DPDの約2倍の感度
- DPDより極めて低い毒性・変異原性
- 簡単な操作の測定法

小社が新しい残留塩素測定法として開発いたしました残留塩素測定キット-SBT法は、簡単・安全な測定法でどなたにも安心してご使用いただけるという優れた特色をもちております。

これまで残留塩素測定試薬として汎用されていたオルトトリジンは、毒性が高いため、2000年4月に上水試験公定法から削除され、現在DPDが公定法として残留塩素測定試薬の主流となっております。ところが、溶液の安定性が悪いDPDは粉末タイプがほとんどで測定の度に開封し溶かす必要があります。特に浴場施設などでは1日に何度も測定が必要なため、この作業の繰り返しで非常に手間がかかっていました。

残留塩素測定キット-SBT法は、溶液タイプですぐに測定ができるため、貴重な時間の節約のお手伝いができ、さらにDPDより毒性が極めて低く、正確な測定ができる新しい方法です。

< キット内容 >

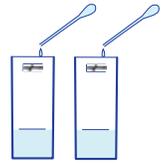
| | |
|-----------------|----|
| 検水調整液（白キャップ点眼瓶） | 1本 |
| 色素液（青キャップ点眼瓶） | 1本 |
| 色調比色計 | 1式 |
| 試験管 | 2本 |
| スポイド | 1本 |

初めてご使用の際は、キットをお求めください。試薬（100回用、500回用）および色素液・検水調整液（組み合わせると2000回相当）は、測定回数にあわせて補充用としてお求めください。

| 品名 | 容量 | 本体価格(¥) | メーカーコード |
|----------------|--------|-----------|---------|
| 残留塩素測定キット-SBT法 | | | |
| set | | 7,000 | ZK01-50 |
| 残留塩素測定試薬-SBT法 | | | |
| 100回用 | | 1,300 | ZK01-60 |
| 残留塩素測定試薬-SBT法 | | | |
| 500回用 | | 5,000 | ZK01-60 |
| 色素液 | 100 ml | 9,000 | ZK01-70 |
| 検水調整液 | 200 ml | 5,000 | ZK01-80 |

< 操作方法 >

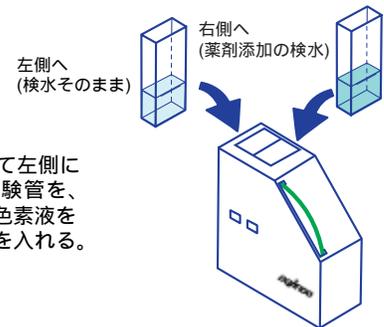
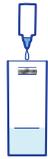
1) 2本の試験管それぞれに白線まで検水(浴槽水、プール水など)を入れる(水位の調整は添付のスポイドで行ってください)。



2) 1つの試験管の検水に検水調整液(白キャップ)を2滴加え、軽く振り混ぜる(振り混ぜずに次の操作に進んだ場合、色が着かない場合があります)。



3) 次に、色素液(青キャップ)を1滴加え軽く振り混ぜる(残留塩素が含まれている場合、直ちに青緑色の溶液となります)。



4) 色調比色計の向かって左側に検水だけがいった試験管を、右側に検水調整液、色素液を入れた検水の試験管を入れる。

5) 2つの窓の色が同じになるように色調比色板を回す。



6) 色調比色計のポイントが指す数値を読む(この数値が検水に含まれる遊離残留塩素濃度で、ppm表示となります)。

< 測定時の注意事項 >

- 検水温度が高いと色が変化し判別しづらくなります。検水温度により比色板(標準 4 ~ 25、高温 30 ~ 35)を使い分けてください。
- 検水調整液、色素液は誤って多く加えても、測定には問題ありません。
- 色調比色板を使って比色する際は、蛍光灯などのあかりにかざして行ってください。
- 使用後の試験管は水で洗浄して保管してください。

SBTの細胞毒性

ヒト子宮ガン細胞(HeLa細胞)を用いて、SBTおよびDPDの細胞毒性を細胞増殖アッセイキット(CCK-8)により求めました。図から求めたLD₅₀はSBT:13,500 μmol/l、DPD:50 μmol/lとなり、SBTはDPDに比べて非常に低い毒性であることがわかります (Fig.1)。

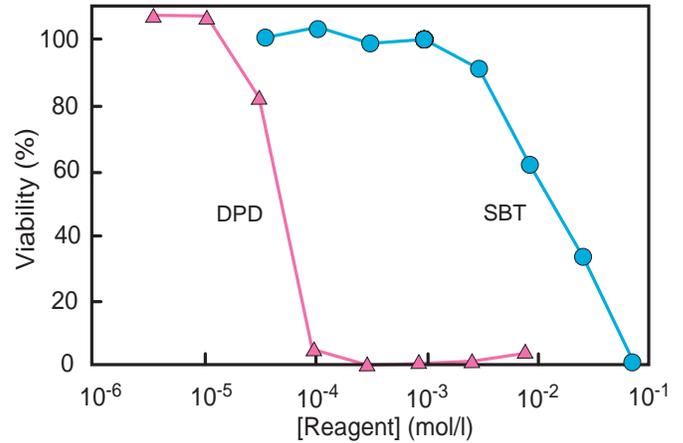


Fig. 1 SBTの細胞毒性

SBT法の遊離塩素選択性

下記のように調製した結合塩素 1 mg/lのサンプルをSBT法とDPD法で発色させ、吸光度の時間経過を測定しました (Fig.2)。DPDは結合塩素と反応して次第に発色しますが、SBTは発色がほとんどありません。

その後、ヨウ化カリウム溶液を添加し総残留塩素を測定すると、SBTとDPDは同等の値を示しました。以上のことから、SBTは遊離塩素に対して選択性が高いということがわかります。

サンプル調製

- 2 mg/l HOCl 溶液
- 2 mg/l NH₄Cl 溶液 (等量)
- 30分間室温放置

測定サンプル

<SBT法>

- サンプル 2.5 ml
- 3 mol/l 酢酸緩衝液 (pH5.2, cont. 0.25% CyDTA) 30 μl
- 20 mmol/l SBT 溶液 15 μl
- 吸光度測定 (675 nm, 5分間)
- ヨウ化カリウム溶液 2.5 mg/50 μl
- 吸光度測定 (675 nm, 15分間)

<DPD法>

- DPD 試薬 (4% DPD-Na₂SO₄) 25 mg
- 0.2 mol/l リン酸緩衝液 (pH6.5, cont. 0.1% CyDTA) 125 μl
- サンプル 2,375 μl
- 吸光度測定 (510 nm, 5分間)
- ヨウ化カリウム溶液 25 mg/50 μl
- 吸光度測定 (510 nm, 15分間)

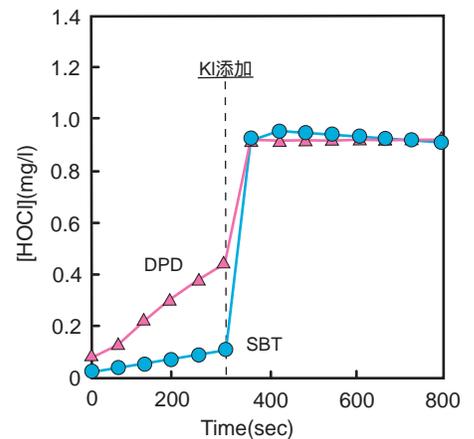


Fig. 2 SBT法の遊離塩素選択性

カタログ・パンフレットのご案内



25版総合カタログ、Labeling Kits データ集、残留塩素測定キット、Cell Biology、分子生物学用等各種パンフレットを準備しております。
ご希望の方は小社マーケティング部までお申しつけください。

E-mail : info@dojindo.co.jp

新製品

開発元 **DOJINDO MOLECULAR TECHNOLOGIES, INC.**

ビオチン標識用キット

Biotin Labeling Kit-NH₂

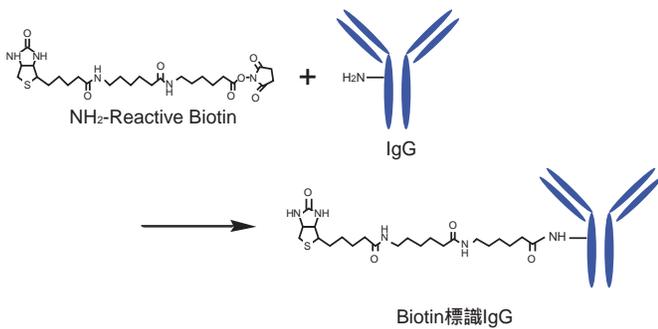
< 特長 >

- 2時間以内にビオチン標識体が調製できる。
- NH₂-Reactive Biotinと混ぜるだけで、安定な共有結合を形成する。
- Filtration Tube を用いた分離操作により高い回収率で標識体が得られる。
- 付属の保存溶液でビオチン標識体の長期保存ができる。

< キット内容 > 3 サンプル標識用

| | |
|----------------------------------|-------------|
| NH ₂ -Reactive Biotin | 3本 |
| Reaction Buffer | 0.5 ml x 1本 |
| WS Buffer | 4 ml x 1本 |
| Filtration Tube | 3本 |

Biotin Labeling Kit - NH₂は、アミノ基を有するタンパク質、特に抗体へビオチンを標識するためのキットです。キット付属のNH₂-Reactive Biotinは、その分子内に活性エステル基を有しているため、アミノ基を有する標的分子と混合するだけで安定な共有結合を形成します。イムノグロブリンG (IgG)のような高分子タンパク質にビオチンを標識する場合、標識反応を阻害するような低分子化合物(トリスなど)や未反応のNH₂-Reactive Biotinは付属のFiltration Tubeを用いて容易に除去することができます。
 * 50 ~ 200 μg のタンパク質を標識できます。
 * 分子量 50,000 以上のタンパク質にご使用できます。



| 品名 | 容量 | 本体価格(¥) | メーカーコード |
|-------------------------------------|-----------|-----------|---------|
| Biotin Labeling Kit-NH ₂ | 3 samples | 12,000 | LK03 |

関連商品

| 品名 | 容量 | 本体価格(¥) | メーカーコード |
|---|-------|-----------|---------|
| Biotinylation Kit (Sulfo-OSu) | set | 35,800 | BK01 |
| Anti-Nitroguanosine monoclonal antibody (Clone#NO ₂ G52) | 50 μg | 65,000 | AB02 |

< 実験例 1 > サンドイッチ ELISA

Anti-CAT IgG 100 μgを本キットを用いてビオチン標識し、サンドイッチ ELISA により Chloramphenicol Acetyltransferase (CAT)を検出した。本キットを用いて作成したビオチン標識抗体を用いた場合、他社のビオチン化キットに比べ、1.5 ~ 2倍高感度であった。

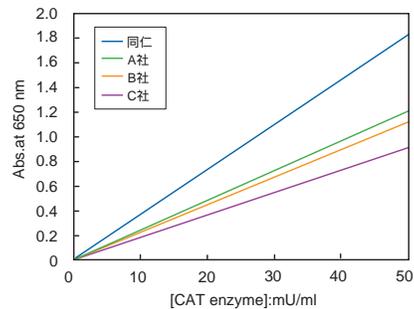
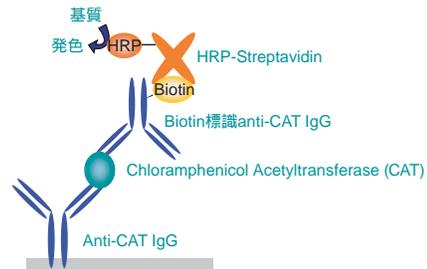


Fig.1 Biotin Labeling Kit-NH₂、及び他社品Kitを用いて作成したビオチン標識 anti-CAT(Chloramphenicol Acetyltransferase)抗体を用いた ELISA

< 実験例 2 > 免疫組織染色

Anti-Nitroguanosine monoclonal antibody(Clone#NO₂G52) 50 μg を本キットを用いてビオチン標識し、肺高血圧剤(モノクロータリン)を投与したラットの肺動脈凍結切片を染色した。肺動脈近傍で8-ニトログアノシンが検出されており、モノクロータリン投与により肺動脈周辺で引き起こされた炎症によるNO産生が示唆された。

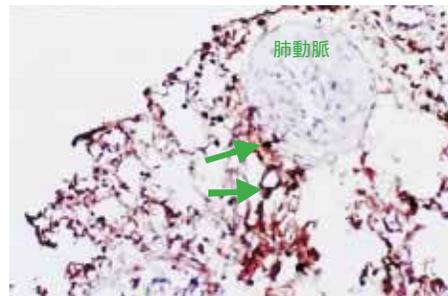


Fig.2 ビオチン標識 Anti-Nitroguanosine monoclonal 抗体を用いて染色した、肺高血圧剤(モノクロータリン)投与ラット肺動脈凍結切片の組織免疫染色像 (x 200、HRP 標識ストレプトアビジン/DAB 染色)
 (画像提供: 北里大学医療衛生学部微生物学教室 北里英郎教授)

試作品

開発元 **DOJINDO MOLECULAR TECHNOLOGIES, INC.**

ビオチン標識用キット

Biotin Labeling Kit-SH

<特長>

- 3時間以内にビオチン標識体が調製できる。
- SH-Reactive Biotinと混ぜるだけで、安定な共有結合を形成する。
- 付属の還元剤を用いることで、遊離SH基を持たないタンパク質への標識も可能である*。
- Filtration Tubeを用いた分離操作により高い回収率で標識体が得られる。
- 付属の保存溶液でビオチン標識体の長期保存ができる。

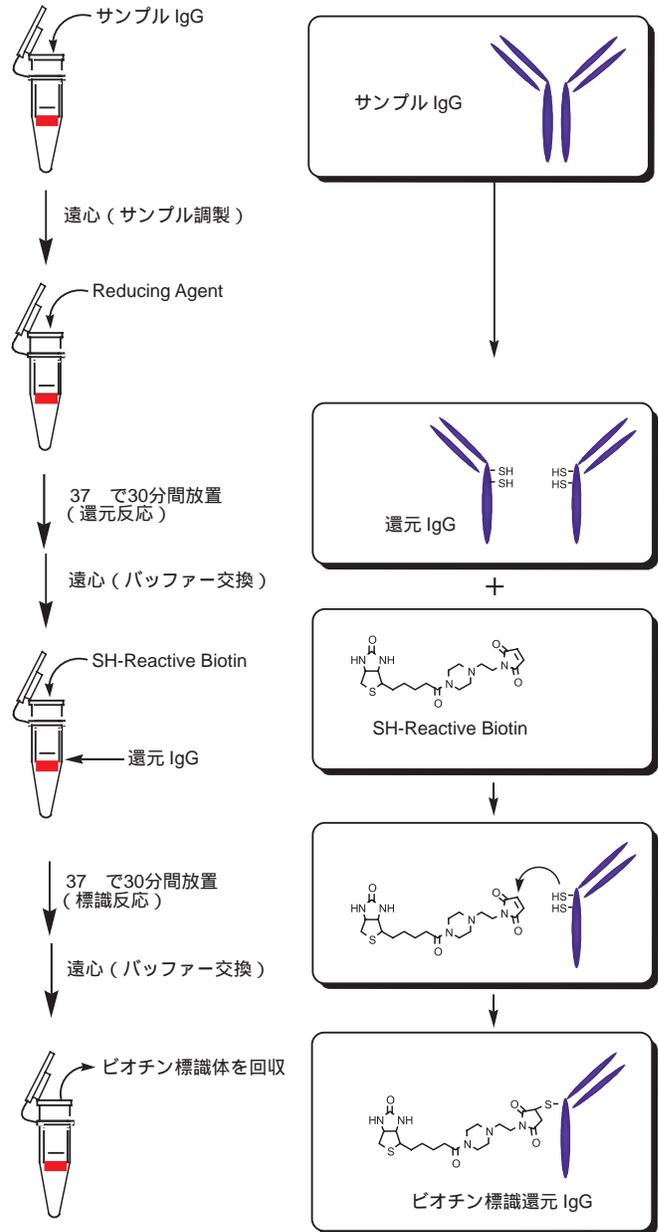
* S-S結合の切断によって、タンパク質の活性が失われる場合があります。

<キット内容> 3 サンプル標識用

| | |
|--------------------|-----------|
| SH-Reactive Biotin | 3本 |
| Reducing Agent | 3本 |
| Reaction Buffer | 1 ml x 1本 |
| WS Buffer | 4 ml x 1本 |
| Filtration Tube | 3本 |

Biotin Labeling Kit-SHは、SH基を有するタンパク質、特に抗体へビオチンを標識するためのキットです。キット付属のSH-Reactive Biotinは、その分子内にマレイミド基を有しているため、SH基を有する標的分子と混合するだけで安定な共有結合を形成します。標的タンパク質がS-S結合を持つ場合には、付属の還元剤を用いて遊離SH基を調製することが可能です(ただし、S-S結合の切断によってタンパク質の活性が失われる場合があります)。イムノグロブリンG(IgG)のような高分子タンパク質にビオチンを標識する場合、付属のFiltration Tubeを用いて簡単にサンプルの前処理を行うことができ、ヒンジ領域のSH基を標識に利用すれば、抗体活性を損なわずにビオチン標識還元IgGを調製することができます。また、未反応のSH-Reactive Biotinは反応後のFiltration Tubeを用いた精製操作により除去されるため、透析やゲルろ過などの処理を行う必要がなく、高純度の標識体を高い回収率で得ることができます。

1回の標識操作に必要なタンパク量は50~200 µgと少量であり、少量の標識体を調製するのに最適です。



ビオチン標識還元IgGの調製法

キット性能変更のお知らせ

アルカリホスファターゼ標識用キットを用いた標識体の活性が向上しました。

<変更点> 従来品の2倍の感度に*

* 小社 実用試験(ELISA)での比較

尚、キットの使用方法については変更ありません。

| 品名 | 容量 | 本体価格(¥) | メーカーコード |
|---|-----------|---------|---------|
| Alkaline Phosphatase Labeling Kit-NH ₂ | 3 samples | 21,000 | LK12 |
| Alkaline Phosphatase Labeling Kit-SH | 3 samples | 21,000 | LK13 |

新製品

開発元 **DOJINDO MOLECULAR TECHNOLOGIES, INC.**

蛍光標識用キット

本製品はモノクローナル抗体などの少量のタンパク質を蛍光標識するためのキットです。本キットは、簡便な操作性、高い回収率、高い再現性などの特長を持っています。標識できるタンパク質量は50 ~ 200 µgで、1キットで3種類のタンパク質を標識することができます。わずか2時間で蛍光標識タンパク質を得ることができ、得られた標識体はそのまま免疫染色などの様々な用途に利用することができます。
(分子量 50,000 以上のタンパク質にご使用できます)

Fluorescein Labeling Kit - NH₂

<特長>

- 約2時間で標識体が調製できる。
- Filtration Tubeを用いた分離操作により高い回収率で標識体が得られる。
- 付属の保存溶液で標識体の長期保存ができる。

<キット内容> 3サンプル標識用

| | |
|---------------------------------------|-------------|
| NH ₂ -Reactive Fluorescein | 3本 |
| WS Buffer | 4 ml × 1本 |
| Reaction Buffer | 0.5 ml × 1本 |
| Filtration Tube | 3本 |

Oyster™-556 Labeling Kit - NH₂
Oyster™-656 Labeling Kit - NH₂

Oyster™-dyeは独Denovo biolabels社が開発した新しいシアニン系蛍光色素です。光安定性が高く、凝集や吸着なども起こりにくい、タンパク質のラベル化に適した蛍光色素です。

<特長>

- 約2時間で標識体が調製できる。
- Filtration Tubeを用いた分離操作により高い回収率で標識体が得られる。
- 付属の保存溶液で標識体の長期保存ができる。
- 蛍光色素の光安定性が高い。
- 蛍光色素の凝集や吸着が起こりにくい。

<キット内容> 3サンプル標識用

| | |
|--|-------------|
| NH ₂ -Reactive Oyster™ dye* | 3本 |
| WS Buffer | 4 ml × 1本 |
| Reaction Buffer | 0.5 ml × 1本 |
| Filtration Tube | 3本 |

* Oyster™-556 dye もしくは Oyster™-656 dye が入っています。

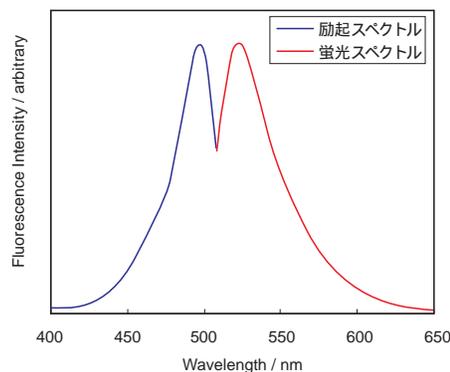
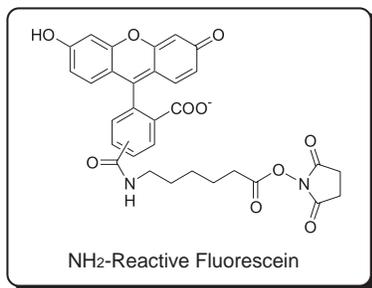


Fig. 1 Fluorescein Labeling Kit - NH₂を用いて作製した標識抗体の励起・蛍光スペクトル

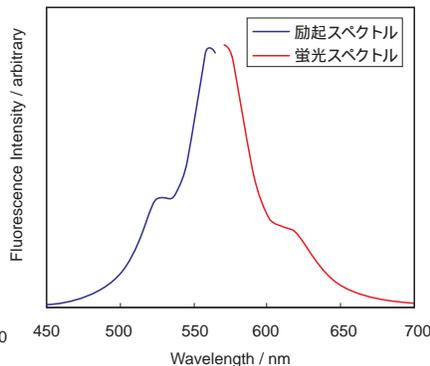
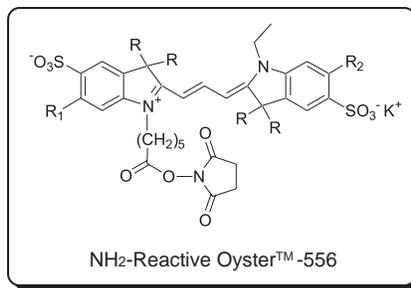


Fig. 2 Oyster™-556 Labeling Kit - NH₂を用いて作製した標識抗体の励起・蛍光スペクトル

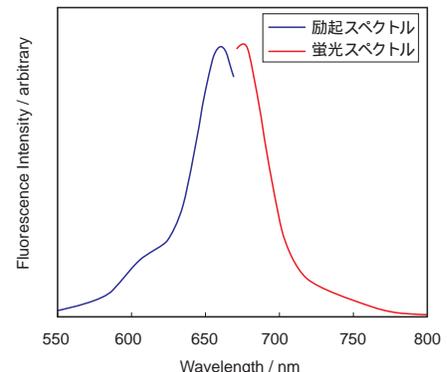
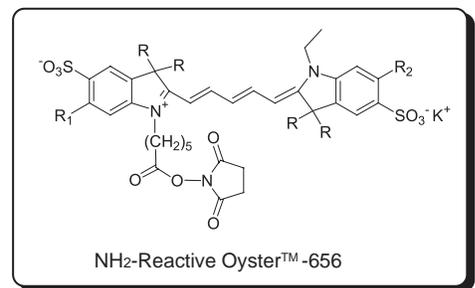


Fig. 3 Oyster™-656 Labeling Kit - NH₂を用いて作製した標識抗体の励起・蛍光スペクトル

Q & A

細胞増殖アッセイキット

Cell Counting Kit Cell Counting Kit-8

小社が細胞増殖測定キットとしてCell Counting Kit(CCK)の販売を始めて10年が経過しました。その間に改良型のCell Counting Kit-8(CCK-8) 蛍光を利用した高感度なCell Counting Kit-Fを開発・製品化して、細胞増殖/細胞毒性試験にご利用いただいております。EUでは動物実験を行っている化粧品販売を2009年までに禁止するという法案が通過するなど、今後、動物実験代替法の活用がますます増えることが予想されます。この機会に、本キットをご使用いただく上で疑問となる点をQ&Aとしてまとめました。

(お問合せ先 Tel: 0120 489548 フリーダイヤル)

Q1 CCK、CCK-8とMTTの違いは何でしょうか？

A1 細胞内の酵素により、テトラゾリウムがホルマザンになるというのは共通したところです。それぞれの違いは、以下の通りです。

【CCKシリーズ】

生成するホルマザンが水溶性である(溶解操作が不要)、測定波長: 400 ~ 450 nm

細胞全体の酵素活性を反映している。

CCK-8: 1ボトルタイプ。CCKより安定性・感度が向上しています。

CCK: 2ボトルタイプ。使用前に混合し、混合後は冷蔵保存で3日以内にご使用ください。

【MTT】

生成するホルマザンが非水溶性である。

(有機溶媒等による溶解が必要)

測定波長: 550 ~ 600 nm

主にミトコンドリアの酵素活性を反映している。

有機溶媒によるホルマザン溶解が必要な分、MTTの方が操作が煩雑である。

< 以下はCCK、CCK-8の測定に関するQ&Aです >

Q2 参照波長の600 nm以上とは何を測定しているのでしょうか？

必ず測定しなければいけないのでしょうか？

A2 必ずしも測定する必要はありません。

600 nm以上というのは試薬の吸収がない波長ですので、試料の濁りを確認することができます。濁りは測定値に影響を与えますので、全体的な濁りを確認し、測定値から差し引くためのものです。

試料によっては、ほとんど濁りのないものや、多少の濁りは気にしない方もいらっしゃいます。実験系にあわせて測定してください。

< 標識体の波長 >

| 品名 | 極大吸収波長 | 極大励起/蛍光波長 |
|--|------------------------|--------------------------------|
| Fluorescein Labeling Kit-NH ₂ | $\lambda_{max}=500$ nm | $\lambda_{ex/em}=495 / 520$ nm |
| Oyster™-556 Labeling Kit-NH ₂ | $\lambda_{max}=565$ nm | $\lambda_{ex/em}=565 / 580$ nm |
| Oyster™-656 Labeling Kit-NH ₂ | $\lambda_{max}=665$ nm | $\lambda_{ex/em}=665 / 680$ nm |

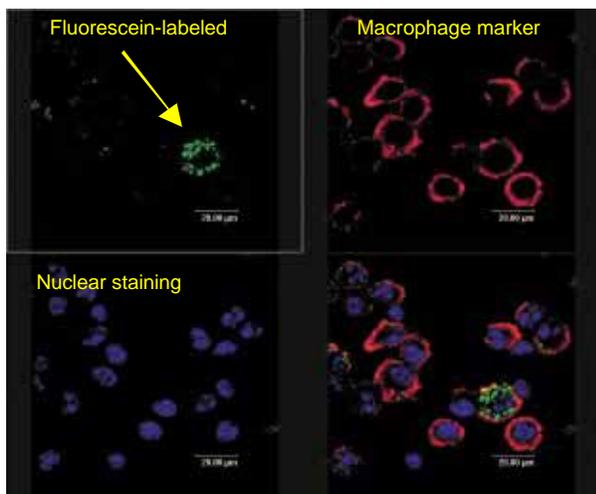
< 本キット以外に必要なもの >

- ・ 10 μ l, 200 μ l マイクロピペッター
- ・ 0.5 ml チューブ
- ・ DMSO またはエタノール
- ・ インキュベーター(37 °C)
- ・ 遠心機(マイクロチューブ用)

< 使用例 >

Fluorescein Labeling Kit-NH₂を用いて標識した抗マクロファージスカベンジャーレセプター抗体を用いて染色したマウス肺の組織染色画像

(画像提供: 熊本大学医学部細胞病理学講座 寺崎泰弘先生)



| 品名 | 容量 | 本体価格(¥) | メーカーコード |
|--|-----------|-----------|---------|
| Fluorescein Labeling Kit-NH ₂ | 3 samples | 21,000 | LK01 |
| Oyster™-556 Labeling Kit-NH ₂ | 3 samples | 21,000 | LK04 |
| Oyster™-656 Labeling Kit-NH ₂ | 3 samples | 21,000 | LK07 |

- Q3 ブランク試験を行うとしたらどんな条件で吸光度を測定すれば良いでしょうか？(細胞単独、細胞+培地、培地のみ、いずれもなし etc.)
- A3 ブランクとして確認するのは3種類の考え方があります。
細胞+培地にて600 nm以上を測定する
細胞自体の濁りなどを確認するためのものです。測定しない方も多くいらっしゃいます(Q2参照)。
細胞+培地にて450 nm(測定波長)を測定する
培地に着色がなければ必要ないと思いますが、確認まで。
培地+試薬(CCK、CCK-8)にて450 nm(測定波長)を測定する。
培地による試薬の誤発色がないかを確認しておく必要があります。
また、薬物添加試験を行われるのであれば、薬物が添加された条件で発色を確認していただきたいと思います。
ブランクとして大きく出てくるのは、の培地に着色がある場合との試薬の誤発色です。
これらをご確認ください。
- Q4 薬物添加試験(毒性試験)を行う際、薬物が発色に影響することはありますか？
- A4 あります。
薬物に還元性があると、CCK(CCK-8)が誤発色することがあります。培地+試薬+薬物で発色を示すかをご確認ください。ブランクとして差し引けないほどの発色が見られる場合には、試薬を添加する前に培地交換をして、系中から薬物を取り除いてください。
- Q5 説明書は96 wellでの測定例が示してありますが、24 wellや12 wellで測定を行う場合の添加量はどのようにすれば良いでしょうか？
- A5 添加量は使用培地量の10分の1が目安です(1 mlであれば試薬を100 μlなど)。
細胞数などにより、試薬の量が少なくても測定できる可能性もありますが、最初は10分の1量でのご使用をおすすめします。
- Q6 同種の細胞であれば、カタログに掲載されている検量線を使用しても良いでしょうか？
- A6 検量線は、ご使用になる細胞の培地条件で作成してください。細胞の活性は条件によりそれぞれ異なりますので、それぞれの検量線が必要となります。
- Q7 細胞により感度は異なりますか？
- A7 付着細胞と浮遊細胞で大きく感度が異なります。
付着細胞であれば、1~4時間発色させることで十分な感度が得られます。しかし、浮遊細胞の場合、発色が弱く十分な感度が得られないことも多々あります。その場合は発色時間を長くしたり、細胞数を増やすことなどをご検討ください。
- Q8 CCK、CCK-8の発色に阻害を与えるような物質は何ですか？
- A8 アスコルビン酸や過剰に存在するグルコースなど一般的に還元物質が共存していると正誤差が生じます。
(通常の培地成分程度であれば無視できる程度)。
フェノールレッドや血清は問題ありません。
フェノールレッドの場合、若干(5%程度)のブランク上昇がみられますが、使用上は問題ありません。含有培地を用いて検量線を引いてください。
また薬剤によっては細胞の機能に影響を与えるものがあるようで、細胞の増殖能は止まっても酵素活性を働かせたり(タンパク合成を行ったり)していると発色を起こしたりします。
負誤差の要因となる物質は、酸化剤や金属塩類(Q13参照)があります。
- Q9 測定値がばらつきますが、どうすればいいでしょうか？
- A9 対数増殖期にある細胞をご使用ください。その他に原因として3点考えられますのでご確認ください。
呈色反応時のインキュベーション中の培地の乾燥
特に外側のwellは蒸発しやすいので、一番外側のwellには培地のみをいれてカウントからはずしてください。これだけでも内側のwellの乾燥防止になります。
発色液がウェルの壁についている
試薬添加時にプレートの底をたたいて振り落としてください。
細胞数が多すぎる(または少なすぎる)
1,000~25,000 cells/well程度で測定を行ってください。
- Q10 呈色反応を途中で止めたい(測定までに時間が空く)のですが、どうすれば反応を止められますか？
- A10 CCK(CCK-8)の発色機構は細胞内に存在する脱水素酵素に依存しているので、呈色反応を止めるにはこの酵素反応を止めることが良いと考えられます。
下記のいずれかの方法で行なってください。
(添加量は96 wellの場合)
0.1 mol/l HClなどの酸を10 μl添加する
もし緩衝能の高い培地をご使用の場合は、もっと濃い酸を添加してください。
アルカリ溶液による反応停止はできません。反応液をアルカリ性になると、生成したホルマゼン色素が青変し、定量性が失われます。
1w/v% SDSを10 μl添加する
SDSを添加される場合には、泡だたないように注意してください。表面に泡があると吸光度が高く出ます。
*反応停止後24時間以内に測定してください。

Q11 感度が高すぎます。細胞数 1,000 ~ 25,000 cells/well 程度とありますが、もっと多い細胞で測定したいと考えています。感度を下げることは可能でしょうか？

A11 試薬添加後のインキュベート時間を短くすることで感度を下げることは可能です。現在、2時間反応させているのであれば1時間にするなどご検討ください。

Q12 培地を除去せず試薬を加えても吸光度測定に問題はないのでしょうか？

A12 基本的には問題ありません。

もし、特殊な培地で還元性物質などを含む場合は、培地と誤発色を起こすことが考えられます。そのような培地では使用できませんので別のものに置換していただく必要があります。次の培地では、バックグラウンドが高く影響があります。

| 使用培地 |
|---|
| IMDM (Iscove's Modified Dulbecco's Medium) |
| McCoy's 5A Medium(modified) |

Q13 添加する薬物の中に金属が入っています。金属が系中に存在することで、発色に影響あるのでしょうか？

A13 金属は CCK、CCK-8 の発色に影響を与えます。終濃度 1 mmol/l の塩化亜鉛、塩化鉄、硫酸銅は、それぞれ 5%、15%、90% 程度発色反応を阻害します。つまり、感度が低く出ます。10 mmol/l の金属では、いずれも 100% 発色を阻害します。上記濃度以下でご使用ください。

Q14 細胞増殖は抑えられていてもタンパク質の合成が促進されている場合は、吸光度と実測の細胞数との間に開きがでる可能性はありませんか？

A14 可能性は十分あります。

CCK、CCK-8 の発色原理は、増殖能そのものを見ているのではなく、細胞内の脱水素酵素による還元性を反映しています。

よって対数増殖期にある細胞であれば、そのときの酵素活性が細胞数と吸光度に相関がとれます。

細胞増殖が抑えられていてもタンパク質合成が促進されている場合は、実際の細胞数より高い数値が出る可能性もあります。

Q15 前培養後、細胞培地から剥がして数える必要がありますか？

A15 最初に対数増殖期にある細胞をトリプシン処理し、血球計算盤で細胞を計数して細胞浮遊液を調製すれば、あとは実際にカウントする必要はありません。しかし、厳密に細胞数をカウントして検量線作成する時は、測定前に一部を剥がしてカウントしてください。

| 品名 | 容量 | 本体価格(¥) | コード | メーカーコード |
|---------------------|-----------|-----------|-----------|---------|
| Cell Counting Kit | | | | |
| | 500 回用 | 11,000 | 349-06461 | CK01 |
| | 2,500 回用 | 32,600 | 345-06463 | CK01 |
| Cell Counting Kit-8 | | | | |
| | 100 回用 | 4,000 | 341-07761 | CK04 |
| | 500 回用 | 11,600 | 347-07621 | CK04 |
| | 2,500 回用 | 33,600 | 343-07623 | CK04 |
| | 10,000 回用 | 99,000 | - | CK04 |

関連商品

| 品名 | 容量 | 本体価格(¥) | コード | メーカーコード |
|-----------------------|----------|-----------|-----------|---------|
| Cell Counting Kit-F | | | | |
| | 100 回用 | 5,400 | 347-07741 | CK06 |
| | 500 回用 | 11,600 | 343-07743 | CK06 |
| MTT (lyophilized) | | | | |
| | 500 回用 | 4,200 | 344-07631 | CK05 |
| | 2,500 回用 | 16,000 | 340-07633 | CK05 |
| HEPES | 25 g | 2,200 | 348-01372 | GB10 |
| | 100 g | 6,400 | 346-01373 | GB10 |
| | 250 g | 13,800 | 340-01371 | GB10 |
| | 500 g | 23,000 | 342-01375 | GB10 |
| | 1 kg | 44,200 | 340-01376 | GB10 |
| HEPES buffer solution | | | | |
| | 100 ml | 11,000 | 345-06681 | GB60 |
| 1-Methoxy PMS | | | | |
| | 100 mg | 5,800 | 345-04001 | M003 |
| | 1 g | 40,000 | 341-04003 | M003 |
| WST-1 | 25 mg | 8,200 | 342-06451 | W201 |
| | 100 mg | 18,000 | 348-06453 | W201 |
| | 500 mg | 61,000 | 346-06454 | W201 |

販売中止のお知らせ

小社都合により、2月1日をもちまして下記製品の販売を中止いたしますのでご連絡申し上げます。
ただし、在庫ある限りは対応できますので、小社または販売店までお早めにお問い合わせください。

| 品名 | 容量 | コード | メーカーコード |
|------------------------|-----|-----------|---------|
| NBD-Cl | 1 g | 343-03701 | N019 |
| Nitrosothiol Assay Kit | set | — | NK06 |

第15回フォーラム・イン・ドージン開催報告

ウイルス - 飛び回る遺伝子 - の分子病理学

昨今、日本でもエイズ患者の数がかなり増加しているようである。また、SARSや鳥インフルエンザなどの新興感染症が人類への新たな脅威として話題になったことは記憶に新しい。それらウイルスによる感染症の予防や治療を考えていくうえで、感染機構の解明が本質的に重要である。今回のフォーラム「ウイルス - 飛び回る遺伝子 - の分子病理学」は、それらがどの程度まで進んでいるのか、どのような課題や限界があるのか等、エイズウイルスを中心とした活発な議論の場となった。しかしそもそも何故、そのような生命体が進化の過程で出現し、この世に存在するのか。今回のフォーラムの演題には、そのようなことも考えて行きたいという意図が込められている。



もともと熊本は北里 柴三郎を生んだ土地で、一昨年は生誕150周年にあたり記念式典が行われた。破傷風菌の純粋培養やペスト菌の発見など、細菌学上の業績のみならず、慶応義塾大学医学部や北里研究所、日本医師会の創設に尽力し、日本の医学の発展への貢献には計り知れないものがある。(当然もらうべきノーベル賞を取り損ねたのみならず、新札には野口 英世が選ばれたことも、熊本県民にとっては残念なことだ。*)

彼が初代所長をつとめた伝染病研究所は、(彼の希望に反して)現在は東大医科学研究所に形を変えており、今回のフォーラムにもそこから岩本 愛吉先生に参加していただいた。



北里博士が医学者としてのスタートを切った熊本大学医学部(当時の古城医学校)には現在、エイズ学研究センターが設置され、世界的なHIV感染症の研究拠点を形成している。また同医学部はヒトT細胞白血病ウイルス(HTLV)の研究でも知られており、今回のフォーラムは時宜を得たテーマであると同時に、熊本で行うという特別な意味もあったと感じている。今回は、代表世話人の山本 哲郎先生(熊本大学)に加えて、この研究分野で活躍され、同時に、エイズ感染予防の啓蒙活動にも積極的な熊本大学の原田 信志先生に当番世話人をお願いした。



内容は、感染前期(セッション1) 感染後期(セッション2)、そして臨床に関してはセッション3と、全体を3つのセッションからなる構成とした。いずれも、それぞれの分野で最も活躍中の研究者による講演が行われ、当日は午後から雨が降る生憎の天気にもかかわらず、会場は活発な討論で熱気に包まれていた。熊本で開催するハンディにもかかわらず遠路からの参加者もおられ、今後もますます内容の充実をはかって行きたいと感じた次第である。(佐々本 一美)

* どちらかというには冷遇され、対立的だった氏だが、当時その官を代表する立場の緒方 正規(東大医学部の初代公衆衛生学教授、後に医学部長)も、同じ熊本の出身であることは奇妙な偶然だ。

尚、講演要旨集は若干の残部がございます。ご希望の方は小社までお問い合わせ下さい。

ホームページアドレス
URL : [http:// www.dojindo.co.jp/](http://www.dojindo.co.jp/)
E-mail : info@dojindo.co.jp

フリーファックス 0120-021557
フリーダイヤル 0120-489548