

ドージンニュース

# DOJIN NEWS

## CONTENTS

### Review

アミロイド結合性化合物を用いたアルツハイマー病診断および治療の可能性  
樋口真人

### 連載

ライブセルイメージング技術講座 4  
櫻井孝司

### Topics on Chemistry

チキソトロピー性(力学応答ゾル-ゲル相転移能)を有する導電性低分子ゲル  
白川美千紘・藤田典史・新海征治

2005 ISSN 0385-1516

# No. 115



目次

Review

- アミロイド結合性化合物を用いたアルツハイマー病診断  
および治療の可能性  
理化学研究所脳科学総合研究センター 樋口真人 ..... 1
- ライブセルイメージング技術講座 4  
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

- チキソトロピー性(力学応答ゾル-ゲル相転移能)を有する  
導電性低分子ゲル  
九州大学大学院 白川美千紘・藤田典史・新海征治 ..... 16

Commercial

新製品案内

- 水質分析用簡易キット ..... 18
- NO 検出キット ..... 21
- 細胞内カルシウムイオン測定試薬 ..... 26

試作品

- 蛍光タンパク標識用キット ..... 22

Q&A

- 蛍光標識用キット ..... 24

お知らせ

- 夏から秋の展示ご案内 ..... 9
- 九州大学・同仁化学組織対応型連携 ..... 17
- フォーラム・イン・ドージン開催のご案内 ..... 17
- 残留塩素測定キット ..... 20
- 販売中止 ..... 21
- 標識用キットシリーズに関する重要なお知らせ ..... 25

製品案内

容量、価格は下記ページをご覧ください。

FSB solution .....	9
BSB solution .....	9
ポナールキット -ABS .....	18
ポナールキットシリーズ .....	19
残留塩素測定キット -SBT 法 .....	20
残留塩素測定試薬 -SBT 法 .....	20
色素液 .....	20
検水調整液 .....	20
NO <sub>2</sub> /NO <sub>3</sub> Assay Kit-FX(Fluorometric) ~ 2,3-Diaminonaphthalene Kit ~ .....	21
NO <sub>2</sub> /NO <sub>3</sub> Assay Kit-C (Colorimetric) ~ Griess Reagent Kit ~ .....	21
Peroxidase Labeling Kit-NH <sub>2</sub> .....	25
Peroxidase Labeling Kit-SH .....	25
Alkaline Phosphatase Labeling Kit-NH <sub>2</sub> .....	25
Alkaline Phosphatase Labeling Kit-SH .....	25
Biotin Labeling Kit-NH <sub>2</sub> .....	25
Biotin Labeling Kit-SH .....	25
Fluorescein Labeling Kit-NH <sub>2</sub> .....	25
Fluo 4-AM .....	26
Fluo 4-AM special packaging .....	26



公害防止機器展およびTOKYO国際公害防止ショーにおける小社の展示(1973年)  
高度経済成長とともに各地で深刻な環境汚染が広がり大きな社会問題となりました。  
小社の展示も当時、分析キットを中心とした公害防止をテーマに掲げていました。

## アミロイド結合性化合物を用いたアルツハイマー病診断および治療の可能性 Potential Utility of Amyloid-binding Compounds in Diagnosis and Treatment of Alzheimer's Disease



樋口 真人  
(Makoto Higuchi)  
独立行政法人理化学研究所  
脳科学総合研究センター

### [ Summary ]

Alzheimer's disease (AD) is a devastating disorder leading to progressive neuronal loss and cognitive deficits, and is pathologically characterized by accumulation of brain amyloid including extracellular senile plaques and intracellular neurofibrillary tangles. Since formation of amyloid lesions is known to precede clinical onset of the disease by 10-20 years, detection of amyloid pathology in brains of living patients could permit prediction of disease onset at a preclinical stage. Such a technology also facilitates assessment of emerging therapeutic approaches to AD that are capable of modifying pathological processes. Small-sized, amyloid-binding compounds, which have recently been exploited by several independent research groups, are targeted at visualization of brain amyloid in human subjects by radiological imaging such as positron emission tomography. We have also generated a fluorine-containing amyloid ligand that is applicable to fluorine-magnetic resonance imaging (fluorine-MRI). Our method does not require radioactivity from the tracer, and thus can circumvent costly production and complex safety control of radioactive materials. The tracer for fluorine-MRI not only has shown its utility in detection of amyloid plaques that form in brains of mice modeling AD, but also offers a potentially practical system for pathological screening in living humans. Moreover, amyloid-binding compounds provide a possibility of radical treatment for brain amyloidosis in AD, because they could halt amyloid formation by interfering with self-association of amyloidogenic molecules.

キーワード：アルツハイマー病、アミロイド、老人斑、神経原線維変化、アミロイドβペプチド、タウ、核磁気共鳴画像 (MRI)

### 1. はじめに

アルツハイマー病は、現在国内に約100万人もの罹患者があり、高齢者の認知機能をおびやかす疾患の中で最も主要なものであると言える。しかも65歳以降は年齢に依存して発症率が指数関数的に増加するので、今後20年間で「高齢者の高齢化」により、高齢者の中でも特に75歳以上の後期高齢者が倍増すると予測されている状況を踏まえると、患者の増加がさらに加速することは必至である<sup>1)</sup>。さらに患者数が多いことのみならず、予後が著しく不良であることも大きな問題である。アルツハイマー病が発症してから患者が死に至るまでの期間は3～6年と考えられている<sup>2)</sup>。この期間において患者の認知機能は進行性に低下するため、生活の質が保たれる期間は生存期間よりもはるかに短くなる。本疾患に対してはコリンエステラーゼ阻害剤を用いてコリン作動性神経障害に対して補償的に治療する方法が一定の効果を挙げているものの、病理変化そのものを食い止める根本的治療法は未だに確立していない。高齢者の神経変性疾患の病理変化として特徴的なのは、多

くの疾患において特定の蛋白・ペプチドがアミロイド線維を形成して脳内に蓄積することで、アルツハイマー病の場合老人斑と呼ばれる細胞外アミロイドと、神経原線維変化と呼ばれる細胞内アミロイドがほぼ例外なく全症例に出現する (Fig. 1)。最近の研究成果により、これらの脳アミロイドがアルツハイマー病の神経変性に密接に関わっていることが明らかにされている<sup>3)</sup>。さらに脳アミロイドは、発症の10～20年前の時点で既に蓄積が始まることが示されている<sup>4)</sup>。従って脳アミロイドはアルツハイマー病の診断と治療における究極のターゲットと考えられる。すなわち脳アミロイドを生体で検出できれば、アルツハイマー病の発症前診断が実現することになるし、脳アミロイド形成を阻害する手段を開発すれば、神経変性を食い止める根本的治療法になる可能性が高い。

本著ではアルツハイマー病の診断薬並びに治療薬としての両方の可能性を秘めたアミロイド結合性化合物について、理化学研究所の当研究チームが同仁化学研究所との共同研究により開発した化合物に関する研究成果を中心に解説を行う。

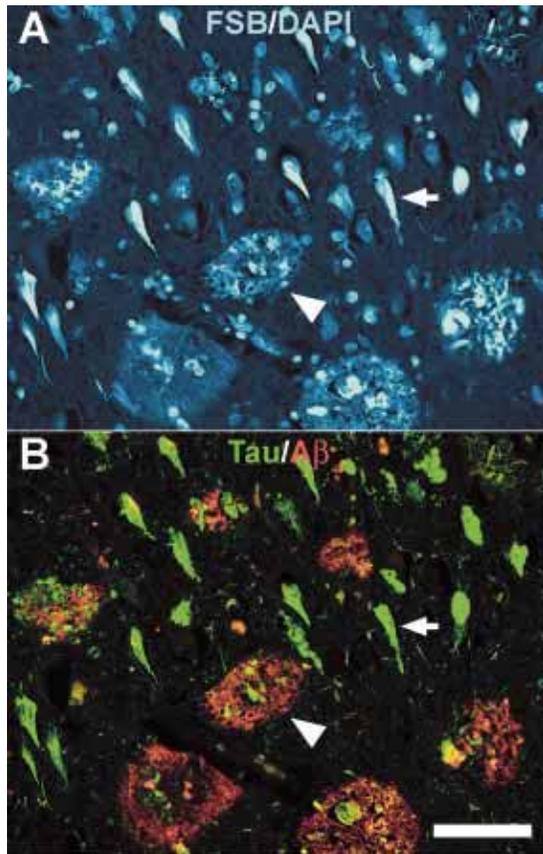


Fig. 1 Amyloid pathology in the brain of an Alzheimer's disease patient. (A) Hippocampal section stained with FSB and DAPI, which are markers for amyloid and nucleus, respectively. Senile plaques (arrowhead) and neurofibrillary tangles (arrow) are abundantly present. (B) The same section immunostained with antibodies against Aβ (red) and tau (green), indicating that senile plaques and neurofibrillary tangles are primarily composed of these amyloidogenic molecules. Scale bar, 100 μm (A and B).

## 2. アミロイド結合性化合物の開発状況

アルツハイマー病の老人斑と神経原線維変化は、それぞれアミロイドβペプチド (amyloid-β peptide; Aβ) とタウ蛋白が異常に蓄積してアミロイド線維を形成した病変である (Fig. 1)。Aβはアミロイド前駆体蛋白 (amyloid precursor protein; APP) が酵素的切断を受けて生成されるが、APPの遺伝子異常により家族性アルツハイマー病が起こることが知られている。また、タウ蛋白の遺伝子異常によっても家族性の神経変性疾患が起こることが分かっている。さらにこれらの異常遺伝子を発現した変異型APPおよび変異型タウ蛋白トランスジェニックマウスでは、それぞれ老人斑と神経原線維変化が形成されることより、APP・Aβとタウ蛋白の異常がアルツハイマー病の脳アミロイド形成をもたらすことが実証されている<sup>5)</sup>。アミロイド線維は蛋白やペプチドが分子内もしくは分子間においてβシート構造を呈することが特徴で、アミロイド結合性化合物もこのβシートに親和性を有し、そのため原則的にはあらゆるアミロイドに対して結合すると考えられる。

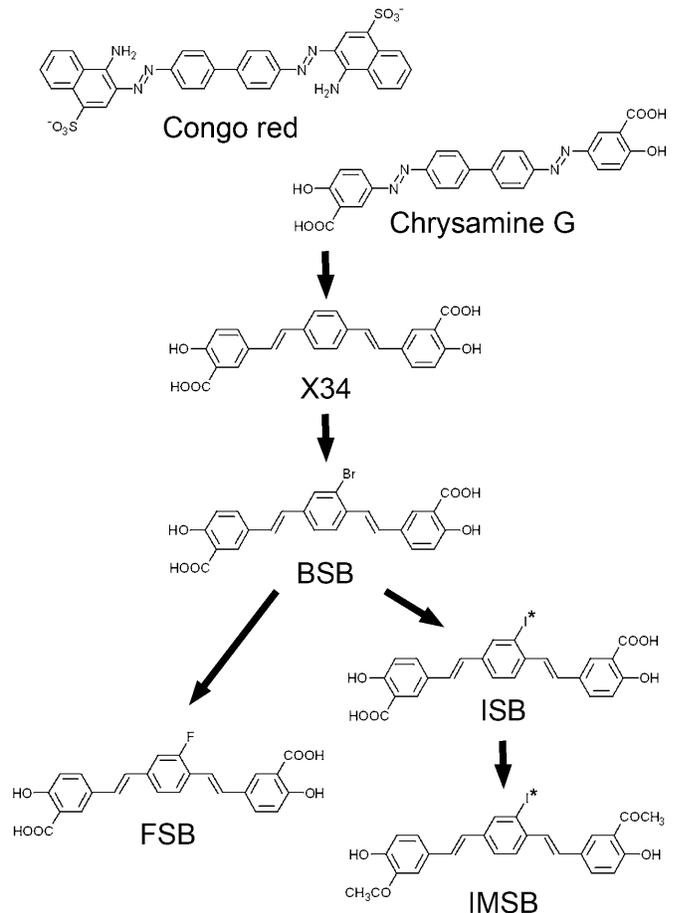


Fig. 2 Congo red derivatives known as candidate tracers for brain amyloid. Radiolabeling sites for PET and SPECT are indicated by asterisks.

アルツハイマー病の脳アミロイド蓄積を病理学的に診断するために、Congo red (Fig. 2) や Thioflavin-S、Thioflavin-T (Fig. 3) などの蛍光染色剤が以前より利用されてきたが、これらの薬剤は「古典的」アミロイド結合性化合物であると言える。このような化合物を放射性アイソトープで標識して生体に投与し、ポジトロン断層撮影 (PET) やシングルフォトン断層撮影 (SPECT) を行えば、体内のアミロイドを可視化できると推察できる。しかしながら血液と脳の間には強固なバリア (血液脳関門) が存在し、一般に極性物質・強電解質など非脂溶性分子や高分子は血中から脳へは容易に移行しない。Congo red や Thioflavin-T は血液脳関門を通過しがたく、静脈内に投与しても脳アミロイドへはほとんど結合しない。そのためこれらの薬剤の構造をヒントにして、脳への移行性を高めたアミロイド結合性化合物が次々に開発されてきた (Fig. 2・3)。これらの化合物は大別すると、(1) Congo red の誘導体 (Fig. 2)、(2) Thioflavin-T の誘導体 (Fig. 3A)、(3) (1)・(2)のいずれにも属さない物質 (Fig. 3B) の3種類からなる。

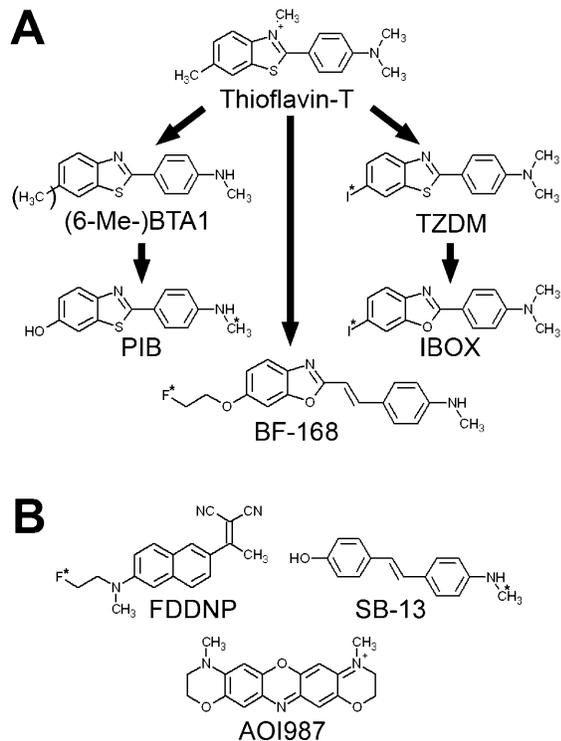


Fig. 3 Non-Congo red derivatives known as candidate tracers for brain amyloid.

(A) Thioflavin-T derivatives. (B) Other derivatives. Radiolabeling sites for PET and SPECT are indicated by asterisks.

### 2.1. Congo red 誘導体

Congo red やその誘導体は両端の官能基が有する電荷により  $\beta$  シートに結合すると考えられる。しかし分子量は約 700 で、このように大きな分子が脳イメージングに適した薬剤となるとは考えにくい。Congo red の類似化合物である Chrysamine G (Fig. 2) は、Congo red よりも脂溶性が高く、分子量も約 480 とかなりコンパクトになっている。この Chrysamine G は静脈内投与により脳内へ移行することが知られている<sup>6)</sup>。しかし、脳への移行性やアミロイドへの結合能はイメージングには十分とは言えず、しかも体内での安定性にも問題がある。そこで Chrysamine G のジアゾ結合をビニル結合に置き換え、ジフェニル構造をフェニル構造に置き換えた X34 というスチリルベンゼン化合物が開発された (Fig. 2)。X34 は分子量が約 400 と Chrysamine G よりもさらに小さくなり、しかもビニル結合への置換によって蛍光性と安定性が増加している<sup>7)</sup>。ところが X34 の合成過程や生体脳イメージング薬剤としての評価に関するデータは論文に掲載されたものが無く、X34 をもとに最適なイメージング手段の開発を進めることは難しい。そのため X34 と同様にスチリルベンゼン構造を持ち、ハ

ロゲン基を含有する (*trans,trans*)-1-bromo-2,5-bis-(3-hydroxycarbonyl-4-hydroxy)styrylbenzene (BSB) が、ペンシルバニア大学の研究グループにより作り出された (Fig. 2)。BSB は脳アミロイドへ良好な親和性を有し、しかも変異型 APP トランスジェニックマウスへ静脈内投与を行うことで、脳内の老人斑が標識されることも確認された<sup>8)</sup>。BSB のプロム基を放射性ヨードに置き換えた ISB および IMSB (Fig. 2) は、SPECT 用の脳アミロイド画像化トレーサーとして使用可能であることが示唆されたが、正常マウスに投与した際の脳移行性は % 投与量で最大 0.15 ~ 0.3% と、決して満足の得られる特性ではなかった<sup>9)</sup>。

Congo red 誘導体の問題点は、分子量が比較的大きいため脳内への移行性を高めることが難しい点にある。そのため最近のアミロイド結合性化合物の開発は、次に述べる Thioflavin-T を起点として進められることが多くなっている。

### 2.2. Thioflavin-T 誘導体

Thioflavin-T の問題点は、4級アミンを含有するためにこの電荷が血液脳関門の通過を妨げることにある。そこでこの部位を中性化した化合物が、脳アミロイドのトレーサーとして作成されている。その一つがピッツバーグ大学の研究グループにより合成された 6-methyl-benzothiazole-aniline (6-Me-BTA) で、中性化と同時にアニリン部位に結合するメチル基の数を減らすことで、分子量を減少させている (Fig. 3)。6-Me-BTA<sup>10)</sup> とその類似化合物は脳アミロイド画像化薬剤としての特性が評価され、特にベンゾチアゾール部位に結合するメチル基を省いた BTA-1 は、静脈内投与により脳へ移行し老人斑へ結合することが、変異型 APP トランスジェニックマウスと二光子励起蛍光顕微鏡を用いた研究で明らかにされている<sup>11)</sup>。さらに同部位をヒドロキシ基に置き換えた 6-hydroxy-BTA-1 は、脳からのクリアランスが良好でイメージング薬剤として適していることが分かり、これをポジトロン放射性アイソトープである <sup>11</sup>C で標識した Pittsburgh Compound-B (PIB、Fig. 3) は、北欧でヒトへ投与されて PET 検査が実施され、前頭葉・側頭葉など老人斑が蓄積しやすい部位において、アルツハイマー病患者では正常高齢者よりもトレーサーが高濃度で集積することが確かめられた<sup>12)</sup>。PIB は現時点における脳アミロイド検出薬剤として、臨床試験が最も進んだ化合物である。

国内では、Thioflavin-T を中性化しさらにベンゾチアゾール部位における S を O に置き換えたベンゾキサゾール化合物で、脳アミロイドの画像化に適した特性を持つものがピーエフ研究所により見つけ出されている。そのうち BF-168 (Fig. 3) は、ポジトロン放射性アイソトープである <sup>18</sup>F で標識され、静注して変異型 APP トランスジェニックマウスの老人斑に結合することが *ex vivo* オートラジオグラフィーで示されている<sup>13)</sup>。このアミロイドトレーサーの開発は東北大学に引き継がれており、最近では BF-168 を凌ぐ結合選択性を持った化合物も作り出され、ヒトへの応用の準備が着々と進展している。

SPECT 用のトレーサーとしては、ペンシルバニア大学で 2-(4'-dimethylaminophenyl)-6-iodobenzothiazole (TZDM) と 2-(4'-dimethylaminophenyl)-6-iodobenzoxazole (IBOX) が作成されている (Fig. 3)。TZDM は Thioflavin-T を中性化しメチル基をヨードに置き換えた化合物で、IBOX はさらに TZDM のベンゾチア

ゾールをベンゾキサゾールに置き換えた化合物である。これらの薬剤はアミロイドに高い親和性を有し、比較的良好な脳移行性とクリアランスを示すことが報告されている<sup>14)</sup>。

### 2.3. その他の化合物

University of California Los Angeles で開発された 2-(1-{6-[(2-fluoroethyl)(methyl)amino]-2-naphthyl}ethylidene)malononitrile (FDDNP)は、アミロイドへ高い親和性を示す脂溶性化合物である (Fig. 3)。FDDNP をポジトロン放射性アイソトープである <sup>18</sup>F で標識し、ヒトに投与して PET 撮影を行った際に、アルツハイマー病患者脳の側頭葉などに集積することが報告されている<sup>15)</sup>。半減期が <sup>11</sup>C より長い <sup>18</sup>F で標識できることは FDDNP の利点であるが、モデル動物で詳細な特性評価が行われていない、ヒトにおいて脳幹部などへの非特異的な集積が多い、などの問題が残されている。

ペンシルバニア大学で開発された 4-N-methylamino-4-hydroxystilbene (SB-13) というアミロイド結合性薬剤は、スチルベン骨格に対して PIB と同様にヒドロキシ基やメチルアミノ基を配置した化合物である (Fig. 3)。<sup>11</sup>C 標識 SB-13 をヒトに投与して行った PET 研究では、アルツハイマー病患者の病変部位に PIB と同様に集積を認め、非特異的な結合のパターンも PIB に似通っていることが示されている<sup>16)</sup>。

ユニークな特性を持つ化合物として、ノバルティス研究所が開発した AOI987 というオキサジン誘導体が挙げられる (Fig. 3)。AOI987 は近赤外波長の蛍光を有するアミロイド結合性化合物で、近赤外光はヘモグロビンにも水にも吸収されにくいことより、生体でも最大数 cm の深さの非侵襲的イメージングを可能にしている。ヒトへの応用は難しいが、モデルマウスで脳アミロイドに対する治療の効果などを評価する際に有用なツールとなる可能性が高い<sup>17)</sup>。

## 3. 核磁気共鳴による脳アミロイドの画像化

これまで脳アミロイドを画像化するための診断薬は、主として放射性アイソトープで標識されて PET や SPECT で利用することを念頭に開発されてきた。しかしながら、アルツハイマー病の発症前診断は大勢の高齢者を対象とすることになるので、PET や SPECT がこの手段として適切であるかどうかは疑問が残る。例えば現時点で国内のアルツハイマー病患者数は約 100 万人であるが、アルツハイマー病予備軍である軽度認知障害 (MCI) を呈する人は、ほぼ同数の 100 万人がそれ以上にのぼると考えられる。さらに将来的に認知障害が出現する以前の、正常高齢者にまで検査の対象を広げると、その数は現在でさえ約 2,500 万人に達する。加えてこのような検査は一生に 1 回実施すればよいのではなく、一定の間隔で複数回行う必要もある。こうした状況を踏まえ、なるべく多くの人々に脳アミロイド検査を実施するためには、放射性アイソトープに頼らない検査法を開発することも重要である。

核磁気共鳴イメージング (MRI) は、放射線を用いない断層撮影技術である。しかも PET や SPECT が物理学的性質より 1 mm 以下の空間分解能を得ることが難しいのに対して、MRI では分解能を数  $\mu\text{m}$  ~ 数十  $\mu\text{m}$  にまで向上させることが可能である。脳アミロイド病変のうち、老人斑は造影剤などを用いなくとも MRI で画

像化しうることが、超高分解能・高磁場 MRI を用いた研究で示されている<sup>18)</sup>。老人斑とその近傍組織には鉄が蓄積するため、これが水素の核磁気共鳴に T2 短縮という形で影響を与え、造影剤を使用しない単純 MRI においても老人斑が T2 強調画像で低信号スポットとして検出されることになる。しかし T2 強調画像で低信号スポットを呈する変化は微小出血など他にも存在することから、老人斑を特異的に検出しているとはいいがたい。また、神経原線維変化など老人斑以外の脳アミロイドはこの方法では検出できないため、応用範囲も限られてしまう。

MRI で脳アミロイドを特異的に検出する技術として、ガドリニウム錯体で標識した A $\beta$  ペプチドを造影剤として用いる手法が開発されている<sup>19)</sup>。常磁性体であるガドリニウムは、周囲にある水素の T1・T2 を短縮させて造影効果をもたらすが、ガドリニウム単独では毒性が強いため、造影の際には錯化合物の形で使用される。

A $\beta$  ペプチドは老人斑に高い結合性を示すが、ガドリニウム錯体も A $\beta$  ペプチドも、このままでは血中に投与しても脳へはほとんど移行しない。そこで putrescine のようなポリアミンをさらに結合させるといった、血液脳関門を通過する工夫が試みられ、実際にモデルマウスの老人斑を造影することが示されている。しかしガドリニウム錯体も A $\beta$  ペプチドも分子量が大きいため、ポリアミンの助けを借りても脳内の老人斑を十分なコントラストで造影することは容易でない。それに加えて、A $\beta$  ペプチドは老人斑以外の脳アミロイドを標識しないので、単純 MRI によるアミロイド検出同様に応用範囲は限定されることとなる。

PET や SPECT では脳移行性のよい小分子が、脳アミロイド検出薬剤として採用されているが、MRI においても同様に小型のアミロイド結合性化合物を標識トレーサーとして利用できれば、きわめて柔軟な薬剤設計が可能になる。そこで理化学研究所の当研究チームと同仁化学研究所は、フッ素 (<sup>19</sup>F) が水素と同様にスピン核運動量を有し、核磁気共鳴現象を示すことに着目し、フッ素を含有するアミロイド結合性化合物を開発した<sup>20, 21)</sup>。フッ素は自然界に存在するアイソトープの 100% が <sup>19</sup>F であるため、化合物中のフッ素も 100% が核磁気共鳴を起こしうる。また、体内には通常フッ素は存在しないので、フッ素化合物を投与して MRI を行えば、内因性バックグラウンドが無い高コントラスト画像を得ることができる。さらに、フッ素の核磁気共鳴信号感度は水素の 83% と高く、薬剤が十分な濃度で目的部位に集積すれば、高い感度で検出しうると考えられる。アミロイド結合性化合物としては、BSB の臭素原子をフッ素原子に置換した (*trans,trans*)-1-fluoro-2,5-bis-(3-hydroxycarbonyl-4-hydroxy)styrylbenzene (FSB) の合成を行った (Fig. 2)。FSB は BSB を上回る蛍光性と老人斑への親和性を示し (Fig. 4A・B)、さらに高い脂溶性を示すことから、脳アミロイド画像化トレーサーとして適した特性を持つと考えられた<sup>20)</sup>。BSB やその類似化合物は前述のように脳への移行性はあまり芳しくなく、FSB にしても Thioflavin-T 誘導体のような高い脳移行性は示さないと推測される。このことは PET のように投与後短時間で撮像を行う必要がある場合には大きな問題となるが、MRI においては化合物が少しずつでも脳へ移行し、アミロイドに結合した後は長時間結合したままであるならば、FSB のような特性の薬剤でも脳アミロイドの画像化に使用できる見込みは大きい。

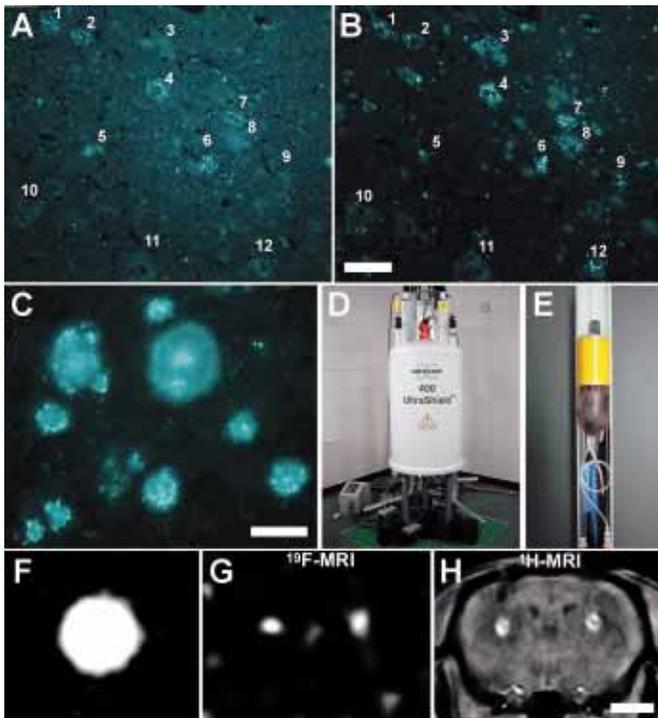


Fig. 4 Characterization of FSB as a tracer for brain amyloid  
 (A and B) Subadjacent sections of temporal cortex from an Alzheimer's disease patient stained with BSB (A) and FSB (B). Note that FSB yields a higher contrast of amyloid lesions than does BSB. (C) Fluorescence photomicrograph of Tg2576 mouse brain after intravenous injection of FSB. Intense signals are obtained on amyloid plaques. (D) Vertical bore, 9.4 Tesla, Bruker microMRI system. (E) MicroMRI probe specifically designed for mouse head. (F) Fluorine-MR image of 1% FSB solution in a test tube. (G) *In vivo* fluorine-MR image of mouse brain after injection of 2.5 μl of 2.5% FSB into the bilateral basal ganglia. (H) Corresponding T1-weighted proton-MR image. Scale bars, 100 μm (A and B); 100 μm (C); and 2 mm (F-H).

しかもBSBは組織染色により老人斑以外にも様々な脳アミロイドに結合することが詳細に示されている数少ない化合物の一つである<sup>22)</sup>。従って、BSB やその誘導体である FSB は、仮にヒトとモデル動物の間で脳アミロイドのコンフォメーションなどに多少の差があったとしても、それを十分にカバーする幅広い親和性スペクトラムを有し、動物とヒトの両方でアミロイドイメージングの妥当性を評価するのに用いることができると考えられる。

上記の経緯より採択された FSB を用いて、変異型 APP トランスジェニックマウス (Tg2576 マウス) における老人斑を可視化する試みがなされた<sup>21)</sup>。まず、FSB 20 mg/kg をマウスに静注し、脳を摘出して切片を作成したところ、老人斑が高いコントラストで蛍光標識されていることが判明した (Fig. 4C)。次に平成 16 年 3 月に理化学研究所に導入された Bruker 社製 9.4 テスラ超高分解能 MRI 装置を用いて、フッ素 MRI 画像を得る実験を試みた。本 MRI 装置は、水素とフッ素の両方に調整された RF コイルを備えており、高感度のフッ素 MRI 撮像が可能である。しかもこのコイルは直径 2.5 cm とマウス頭部のスキャンに特化したサイズにすることで、マウス脳の撮像において 30 μm 前後の高い空間分解能が得られている (Fig. 4D・E)。第一段階として、この装置を用いて FSB の入った試験管をスキャンしてフッ素 MRI 画像を得た (Fig. 4F)。ここでは 3D-RARE というパルスシーケンスが使用されたが、このシーケンスは化合物に含まれるフッ素の T2 が比較的長い場合に有効である。1%FSB 溶液の入った試験管のフッ素 MRI 画像が、1分以内という短時間に高いコントラストで得られたことより、FSB のフッ素も十分長い T2 を有すると考えられた。実験の第二段階として、野生型マウスの脳実質内に 2.5%FSB を直接投与し、投与部位を高信号スポットとするフッ素 MRI の画像が得られることを確かめた (Fig. 4G)。興味深いことに、FSB 投与部位は水素 MRI の T1 強調画像で高信号を呈することが分かった (Fig. 4H)。FSB 同様に BSB を投与することでもこのような信号変化が得られるのに対して、溶媒のみあるいは Congo red 投与では目立った変化は見られなかった。そのため BSB や FSB の構造ないしは特性に由来する要因が、周囲にある水素の T1 を短縮させるの

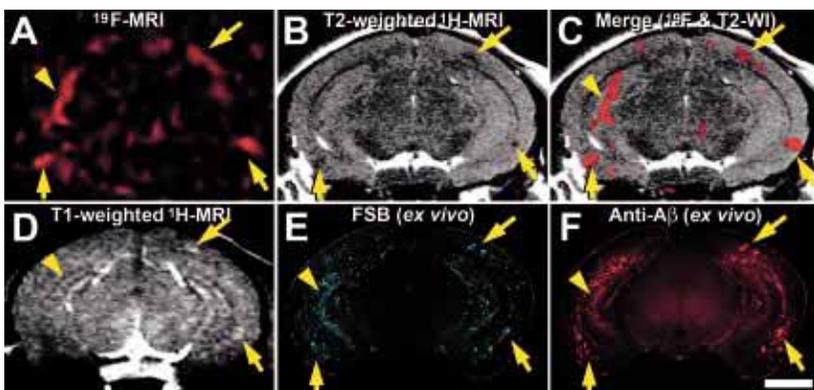


Fig. 5 MRI detection of amyloid plaques in brains of living APP transgenic mice.  
 (A) *In vivo* fluorine-MRI after intravenous injection of FSB (20 mg/kg). Intense signals are found in the cortex (arrows) and hippocampus (arrowhead). (B) T2-weighted proton-MRI obtained after fluorine-MR scans. Low-intensity spots are observed in the cortex (arrows), while no overt changes are found in the hippocampus. (C) Fluorine-MR image superimposed on the corresponding T2-weighted proton-MR data. (D) T1-weighted proton-MRI performed after fluorine-MR scans. High-intensity areas are found in the cortex (arrows) and hippocampus (arrowhead). (E and F) *Ex vivo* examination of brain section from the same mouse to detect FSB (E) and Aβ (F), demonstrating that altered MR signals reflect presence of senile plaques. Scale bar, 2 mm (A-F).

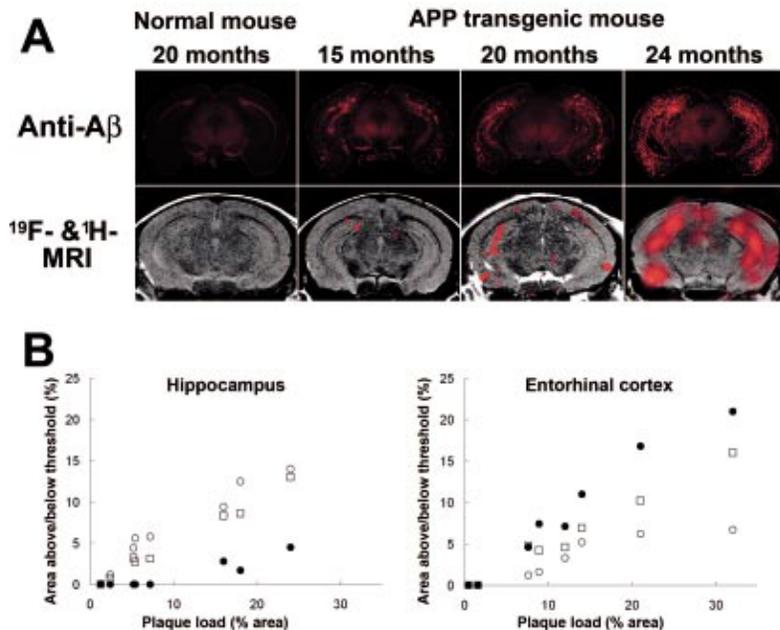


Fig. 6 Correlation between MR signal changes and brain amyloid levels.

(A) *In vivo* fluorine-MRI performed for normal and APP transgenic mice at different ages intravenously injected with FSB. Age-dependent increase of amyloid plaques in transgenic mice, illustrated by A $\beta$  immunostaining, is well correlated with alteration of fluorine-MR signals.

(B) Scatter plots of changes in fluorine-MR (open squares) and T1- (open circles) and T2-weighted (closed circles) proton-MR signals versus brain amyloid levels in the hippocampus and entorhinal cortex of APP transgenic mice.

ではないかと考えられた。さらに第三段階として、FSB 20 mg/kg を APP トランスジェニックマウスに静注し、フッ素 MRI で海馬や嗅内野など老人斑が多い部位に高信号が見出された (Fig. 5A・D)。この高信号領域は、水素モードの単純 MRI の T2 強調画像では低信号スポットとして検出され (Fig. 5B)、さらに同じマウスの脳を摘出して顕微鏡で観察した際に同定された老人斑とも一致していた (Fig. 5E・F)。面白い所見として、FSB 投与後に施行した水素 MRI の T1 強調画像では、老人斑に相当する部位は高信号領域として描出され、FSB が水素 MRI においても造影剤に似た効果のある程度発揮するのではないかと推測された (Fig. 5C)。Tg2576 マウスでは、生後 9 ヶ月頃より老人斑が出現し、加齢に伴って増加するので、月齢の異なるマウスを用いて解析すれば、脳アミロイドの量と MRI 信号強度の相関が分かり、FSB によるアミロイドイメージングの感度・特異性・定量性を知ることができる。そこで月齢 12 ~ 25 ヶ月の Tg2576 マウス 7 匹に対して、海馬および嗅内野における T1 強調水素 MRI、T2 強調水素 MRI、フッ素 MRI の信号変化 (正常マウスとの信号強度の差が見られた部位の面積) を測定し、これらのマウスの脳を摘出して免疫染色により各領域における老人斑の面積を調べてみた。すると海馬では T1 強調水素 MRI とフッ素 MRI が高い感度と定量性で老人斑を検出するのに対し、嗅内野では T2 強調水素 MRI とフッ素 MRI の感度・定量性が優れていることが分かった (Fig. 6)。フッ素 MRI は脳の様々な領域で良好な感度と定量性が得られることから、今回の撮像法の中では最も理想的な結果が得られる手段であると考えられた。さらに FSB の急性毒性を評価する目的で、FSB を正常マウスに静注して 24 時間後に脳・肝臓・心臓・腎臓を調べたところ、イメージングの際と同等の 20 mg/kg という用量ではいずれの臓器にも目立った変化は認められなかったが、用量を 80 mg/kg まで増やすと腎尿細管が壊死をきたした (Fig. 7)。なお、これらの用量で FSB を投与する限り、死亡するマウスはいなかったため、

急性毒性における LD<sub>50</sub> は 80 mg/kg を上回ると考えられた。

上記の研究はフッ素 MRI による脳アミロイドの画像化としては世界初の試みであり、この成果によりアルツハイマー病を生体で検出するツールとして新たな選択肢が加わったことになる。20 mg/kg の用量で明らかな急性毒性は見られなかったものの、イメージング薬剤としてヒトで安全に使用するためには、大雑把に言って投与量を 1/10 ~ 1/100 に減らす必要があると推測される。そのための手段として、(1) 薬剤一分子に含まれるフッ素原子の数を増やす、(2) 脳移行性とアミロイドへの親和性がさらに高い薬剤を開発する、(3) フッ素 MRI 用のコイルを改良して感度を向上させる、などの方法が考えられる。また、例えば今回フッ素 MRI で用いた 3D-RARE というパルスシーケンスは、得られる信号 / ノイズ比が磁場の均一性に大きく依存するので、撮像領域の磁場を効率よく均一に調整する方法を追求する必要もある。FSB は T1 強調水素 MRI でも老人斑の信号強度を変化させることが示されたが、フッ素 MRI の場合は上述のように化合物に含まれるフッ素の数を増やすなどの方法で感度を高め、用量を減らすことが可能であるのに対して、水素 MRI の場合はこれに相当する改善手段がなく、しかも造影効果が薬剤の構造に強く依存するので、脳移行性がよくアミロイドへの親和性が高い薬剤が必ずしも強い造影効果を生むとは限らない。従って、少なくとも当面はフッ素 MRI の技術を改良することが、ヒトへの応用の早道と予測される。

フッ素 MRI によるアミロイドの画像化は、高い分解能と信号 / ノイズ比を実現するために、高磁場の MRI 装置を必要とする。現在ヒトの撮像で用いられている MRI 装置は、高磁場のものでも 3 ~ 4 テスラであるが、例えば国内では放射線医学総合研究所においてサル用の 7 テスラ MRI が開発され、これを用いて 30 ~ 50  $\mu$ m の空間分解能を得ることが目標とされている。このような装置がヒトで実用化されれば、フッ素 MRI でアルツハイマー病患者の老人斑一つ一つを可視化することも不可能ではないと期待される。

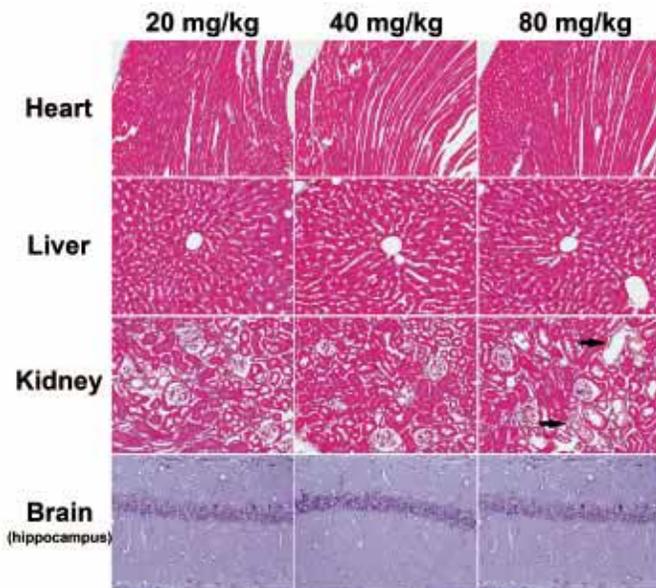


Fig. 7 Assessment of potential acute toxicity of FSB. Wild-type mice were intravenously injected with FSB at different doses, and multiple organs were sampled 24 hours after the administration. No prominent changes are found in any of the tissues from mice treated with 20 and 40 mg/kg FSB, while tubular necrosis is present in the kidney of mice administered with 80 mg/kg FSB (arrows). Sections are stained with hematoxylin-eosin (heart, liver and kidney) and cresyl violet (brain).

#### 4. アミロイドイメージングの課題

アミロイド結合性化合物を用いたPET・SPECTないしはMRIが、本当に高い特異度で早期のアルツハイマー病の病理変化を検出するのかがどうかに関しては、未だに不明な点が多い。脳アミロイドイメージング用に開発されたアミロイド結合性化合物は、全て高い脂溶性を有しているが、このような薬剤は脳アミロイドに到達する前に脂質に富む様々な生体内構造物に捕捉される可能性が高い。白質のミエリンは脂質に富み、脂溶性化合物が非特異的に結合しやすい部位であるし、それ以外にも例えば動脈硬化の原因となる血管内の粥状硬化斑（アテロームプラーク）などに結合する可能性も否定できない。もし血管内に相当量の非特異的結合部位が存在するならば、特にPETやSPECTのように非常に低い用量で投与された薬剤の大半は、血管内で捕捉され脳アミロイドには到達しないことになる。血管内のみならず脳組織内においても、仮に薬剤の親和性が非常に高い( $K_d$ が小さい)がすぐに飽和に達する( $B_{max}$ が小さい)非特異的結合部位が存在するならば、比較的高用量の薬剤を投与した際にはあまり影響がなくとも、PETやSPECTにおいて比放射能の高い薬剤が低用量で投与され

た際に、薬剤のこのような部位への結合が脳アミロイドへの特異的結合を大きく減じる可能性もある。低用量で投与した薬剤が脳アミロイドに結合することを確認する手段としては、小動物用のマイクロPETやマイクロSPECTを用いてモデルマウスにおける薬剤の集積を確かめる方法が考えられるが、現時点ではそのようなやり方で脳アミロイドへの結合が明確に確認された薬剤は存在せず、むしろPIBなどはAPPトランスジェニックマウスに投与してマイクロPETを施行しても、脳アミロイドが豊富な領域への集積は予想よりもはるかに少なかったという報告がある<sup>23)</sup>。また、感度に関しても、例えばPETによる脳糖代謝画像では、MCIの段階において特定の脳領域で糖代謝の低下を検出できるとされており、アミロイドイメージングがMCIあるいはさらにその前段階において、糖代謝画像を上回る感度で病的変化を知ることが可能かどうか、十分に検討する必要がある。MRIによる脳アミロイド画像化の場合も、ヒトに应用されるとなればPETやSPECTと同様にトレーサーの非特異的結合が、動物モデル以上に大きな問題となることが予想される。ただしMRIの場合は、十分な分解能が得られれば大型の老人斑は一個一個描出できるかもしれないので、アミロイドへの集積なのかそれ以外の構造への集積なのかはPETやSPECTより明確に判別できる見込みもある。

画像化の対象となる脳アミロイドは、老人斑にとどまるわけではない。アルツハイマー病の場合は、神経原線維変化も画像化できるかどうか大きな課題となる。神経原線維変化は細胞内アミロイドであるので、トレーサー薬剤は脳へ移行するのみならず、神経細胞の細胞膜を透過する必要がある。今のところアミロイド結合性化合物を用いて動物モデルの神経原線維変化を画像化したという報告はない。現時点における神経原線維変化のモデルマウスは、タウ蛋白のいずれかのアイソフォーム一種を発現させたトランスジェニックマウスが主流であり、一方例えばアルツハイマー病においては6種のタウ蛋白アイソフォーム全てが神経原線維変化を構成するので、モデルマウスとヒトの神経原線維変化は、立体構造などが多少なりとも異なる可能性がある。このことも神経原線維変化トレーサーの評価を難しくしている。当研究チームはFSBを試験的にタウ蛋白トランスジェニックマウスに静注し、同マウスの神経原線維変化にFSBが集積することを確認している。神経原線維変化に集積したFSBをフッ素MRIで検出可能かどうか、現在検討中である。神経原線維変化をはじめとするタウ蛋白アミロイドは、アルツハイマー病以外にも様々な神経変性疾患において認められるので、FSBのように老人斑も神経原線維変化も検出する薬剤は、多様な疾患を初期段階で発見するのに有用となるかもしれない。また、それとは逆に老人斑への結合選択性が特に高い化合物と神経原線維変化への結合選択性が特に高い化合物を使い分けることで、どちらの病理変化が主体なのかを定量的に解析でき、アルツハイマー病とそれ以外の神経変性疾患を鑑別できる可能性も高い。

#### 5. アミロイド結合性化合物による脳アミロイド形成の阻害効果

試験管内でAβペプチドが凝集してアミロイド線維を形成する反応が、Congo redのようなアミロイド結合性化合物により抑制さ

れることは、だいぶ前から知られていた事実である。また、様々な化合物がタウ蛋白に結合してアミロイド線維形成を抑制することも、同様に *in vitro* の実験で示されている。アミロイド結合性化合物を生体に投与して脳アミロイド形成が阻害されるかどうかは、今のところ明確なデータが示されていない。プリオン蛋白による細胞外アミロイドがBSBの投与により抑制される可能性があることは、培養細胞やモデルマウスを用いた実験で証明されている<sup>24)</sup>。同様の手法で化合物をAPPトランスジェニックマウスやタウ蛋白トランスジェニックマウスに投与すれば、老人斑や神経原線維変化の形成が抑えられるかどうか、確かめることができるはずである。治療効果をもたらす薬剤の場合、イメージング用の薬剤とは異なり、脳からのクリアランスは速やかでない方が望ましいかもしれない。治療に最適な動態特性を持つ薬剤の投与により脳アミロイドの形成が阻害されたとしても、神経変性も抑制できるかどうかは不明である。A $\beta$ やタウ蛋白の重合が阻害されることで可溶性のオリゴマーが増加し、これが神経毒性をもたらす可能性も否定できない。いずれにしても、アミロイド結合性化合物がアルツハイマー病やその他の神経変性疾患に対する治療薬として有用かどうかは、動物モデルを用いた詳細な解析によって明らかにする必要があると考えられる。

## 6. アミロイド結合性化合物の将来性

アミロイドイメージングは、アルツハイマー病の早期診断に直接結びつくこともあり、欧米やわが国において国家規模で推進される分子イメージングの中核に位置するプロジェクトである。診断薬としてのアミロイド結合性化合物に今後求められる特性は、より高感度で高い選択性を有することである。選択性に関しては、まず脳アミロイド全般への選択性が高い化合物の開発が望まれる。すなわちアミロイドへの親和性や脳移行性が高い薬剤を探し出す必要がある。次に脳アミロイドの各サブタイプ（老人斑、神経原線維変化など）への選択性が高い化合物を検索することも、鑑別診断の確立のためには重要である。このためには、コンフォメーションの細かな差異を認識できる薬剤を選び出すことが大事と思われる。また、神経原線維変化を生体で検出するためには、脳移行性のみならず、細胞内への移行性も高い薬剤を見つけ出す必要がある。

脳アミロイド病理の可視化によってアルツハイマー病の発症前診断が実現すると、一見正常に見える人々の中でも発症予備軍を探し出せるので、そのような人を正常コントロール群から除外し、真のコントロール群を構築することが可能になる。こうして選別されたコントロール群とアミロイド病理陽性群を用いて、2群間でレベルに差がある血中マーカーを検索することができると期待される。また、2群に分けるのではなく、画像で定量された脳アミロイド量を連続変数として、これと高い相関を持つ血中マーカーを探し出す方法も考えられる。診断に有用な血中マーカーが見出されれば、高齢者人口全体を対象としたアルツハイマー病のスクリーニングも可能となるので、それを開発・確立するための手段としても、アミロイドイメージングの意義は大きい。

アミロイド結合性化合物を用いて脳アミロイドの形成が抑制できれば、アルツハイマー病の病理そのものに対する治療として、新

たな手段が加わることになる。これまでの研究ではA $\beta$ の生成阻害、分解・クリアランス促進など、様々な治療法が開発されてきており、当研究グループもA $\beta$ 分解酵素ネプリライシンの活性化を介した分解促進療法の確立を目指してきたが<sup>25)</sup>、脳アミロイド形成阻害も含めて複数の治療法を組み合わせることで、おのおの用量を低減させ副作用を抑えることができるかもしれない。また、脳アミロイド形成阻害療法には可溶性A $\beta$ を増加させるかもしれないという弱点があり、一方例えばネプリライシンによる分解促進療法の場合は不溶性のA $\beta$ は分解されにくいという弱点があるが、これら2つの治療法を組み合わせれば、脳アミロイド形成阻害療法によりA $\beta$ の不溶化という流れをせき止めた上で、行き場を失った可溶性A $\beta$ をネプリライシンにより処理するという相乗作用も期待できる。

## 参考文献

- 1) 樋口真人、荒井啓行、佐々木英忠、カレントセラピー、**22**, 8 (2004).
- 2) C. Wolfson, D. B. Wolfson, M. Asgharian, C. E. M'Lan, T. Ostbye, K. Rockwood, D. B. Hogan; Clinical Progression of Dementia Study Group, *N. Engl. J. Med.*, **344**, 1111 (2001).
- 3) M. Higuchi, V. M.-Y. Lee, J. Q. Trojanowski, *International Congress Series 1260: The Senescence-Accelerated Mouse (SAM): An Animal Model of Senescence* (eds. Nomura Y, Takeda T, Okuma Y), Elsevier: Amsterdam, the Netherlands pp. 69 (2004).
- 4) J. L. Price, J. C. Morris, *Ann. Neurol.*, **45**, 358 (1999).
- 5) 樋口真人、岩田修永、西道隆臣、*細胞工学*, **23**, 678 (2004).
- 6) W. E. Klunk, M. L. Debnath, J. W. Pettegrew, *Neurobiol. Aging*, **15**, 691 (1994).
- 7) S. D. Styren, R. L. Hamilton, G. C. Styren, W. E. Klunk WE, *J. Histochem. Cytochem.*, **48**, 1223 (2000).
- 8) D. M. Skovronsky, B. Zhang, M.-P. Kung, H. F. Kung, J. Q. Trojanowski, V. M.-Y. Lee, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**, 7609 (2000).
- 9) Z.-P. Zhuang, M.-P. Kung, C. Hou C, D. M. Skovronsky, T. L. Gur, K. Plösl, J. Q. Trojanowski, V. M.-Y. Lee, H. F. Kung, *J. Med. Chem.*, **44**, 1905 (2001).
- 10) W. E. Klunk, Y. Wang, G. F. Huang, M. L. Debnath, D. P. Holt, C. A. Mathis, *Life Sci.*, **69**, 1471 (2001).
- 11) C. A. Mathis, B. J. Bacskai, S. T. Kajdasz, M. E. McLellan, M. P. Frosch, B. T. Hyman, D. P. Holt, Y. Wang, G.-F. Huang, M. L. Debnath, W. E. Klunk, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **12**, 295 (2002).
- 12) W. E. Klunk, H. Engler, A. Nordberg, Y. Wang, G. Blomqvist, D. P. Holt, M. Bergström, I. Savitcheva, G.-F. Huang, S. Estrada, B. Ausén, M. L. Debnath, J. Barletta, J. C. Price, J. Sandell, B. J. Lopresti, A. Wall, P. Koivisto, G. Antoni, C. A. Mathis, B. Langström, *Ann. Neurol.*, **55**, 306 (2004).
- 13) N. Okamura, T. Suemoto, H. Shimadzu, M. Suzuki, T. Shiomitsu, H. Akatsu, T. Yamamoto, M. Staufenbiel, K. Yanai, H. Arai, H. Sasaki, Y. Kudo, T. Sawada, *J. Neurosci.*, **24**, 2535 (2004).
- 14) Z.-P. Zhuang, M.-P. Kung, C. Hou, K. Plössl, D. Skovronsky, T. L. Gur, J. Q. Trojanowski, V. M.-Y. Lee, H. F. Kung, *Nuc. Med. Biol.*, **28**, 887, (2001).

- 15) K. Shoghi-Jadid, G. W. Small, E. D. Agdeppa, V. Kepe, L. M. Ercoli, P. Siddarth, S. Read, N. Satyamurthy, A. Petric, S.-C. Huang, J. R. Barrio, *Am. J. Geriatr. Psychiatry*, **10**, 24 (2002).
- 16) N. P. L. G. Verhoeff, A. A. Wilson, S. Takeshita, L. Trop, D. Hussey, K. Singh, H. F. Kung, M.-P. Kung, S. Houle, *Am. J. Geriatr. Psychiatry*, **12**, 584 (2004).
- 17) M. Hintersteiner, A. Enz, P. Frey, A. L. Jatton, W. Kinzy, R. Kneuer, U. Neumann, M. Rudin, M. Staufienbiel, M. Stoeckli, K. H. Wiederhold, H. U. Gremlich, *Nat. Biotechnol.*, **23**, 577 (2005).
- 18) C. R. Jack Jr., M. Garwood, T. M. Wengenack, B. Borowski, G. L. Curran, J. Lin, G. Adriany, O. H. J. Gröhn, R. Grimm, J. F. Poduslo, *Magn. Reson. Med.*, **52**, 1263 (2004).
- 19) J. F. Poduslo, T. M. Wengenack, G. L. Curran, T. Wisniewski, E. M. Sigurdsson, S. I. Macura, B. J. Borowski, C. R. Jack CR Jr., *Neurobiol. Dis.*, **11**, 315 (2002).
- 20) K. Sato, M. Higuchi, N. Iwata, T. C. Saido, K. Sasamoto, *Eur. J. Med. Chem.*, **39**, 573 (2004).
- 21) M. Higuchi, N. Iwata, Y. Matsuba, K. Sato, K. Sasamoto, T. C. Saido, *Nat. Neurosci.*, **8**, 527 (2005).
- 22) M. L. Schmidt, T. Schuck, S. Sheridan, M.-P. Kung, H. F. Kung, Z.-P. Zhuang, C. Bergeron, J. S. Lamarche, D. Skovronsky, B. I. Giasson, V. M.-Y. Lee, J. Q. Trojanowski, *Am. J. Pathol.*, **159**, 937 (2001).
- 23) H. Toyama, D. Ye, M. Ichise, J. S. Liow, L. Cai, D. Jacobowitz, J. L. Musachio, J. Hong, M. Crescenzo, D. Tipre, J. Q. Lu, S. Zoghbi, D. C. Vines, J. Seidel, K. Katada, M. V. Green, V. W. Pike, R. M. Cohen, R. B. Innis, *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging*, **32**, 593 (2005).
- 24) K. Ishikawa, K. Doh-ura, Y. Kudo, N. Nishida, I. Murakami-Kubo, Y. Ando, T. Sawada, T. Iwaki, *J. Gen. Virol.*, **85**, 1785 (2004).
- 25) T. Saito, N. Iwata, S. Tsubuki, Y. Takaki, J. Takano, S.-M. Huang, T. Suemoto, M. Higuchi, T. C. Saido. *Nat. Med.*, **11**, 434 (2005).

#### 著者紹介

氏 名：樋口 真人 (Makoto Higuchi)  
 所 属：独立行政法人理化学研究所 脳科学総合研究センター  
 神経蛋白質制御研究チーム 非常勤研究員  
 独立行政法人放射線医学総合研究所  
 分子神経イメージング研究グループ  
 分子生態研究チーム チームリーダー  
 連絡先：〒263-8555 千葉市稲毛区穴川4-9-1  
 TEL: 043-206-3249 FAX: 043-253-0396  
 E-mail: mhiguchi@nirs.go.jp

出身大学：東北大学大学院医学研究科

学 位：博士(医学)

研究テーマ：

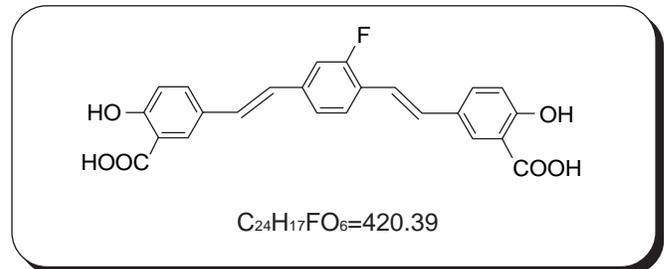
- 1) アルツハイマー病をはじめとする神経変性疾患モデル動物の開発
- 2) アミロイド結合性化合物を用いた神経変性疾患の診断と治療
- 3) 神経精神疾患の病態解明を目的とした生体分子イメージング

#### 関連商品

#### アミロイド染色用蛍光色素(1% FSB in DMSO)

#### FSB solution

化学名 1-Fluoro-2,5-bis(3-carboxy-4-hydroxystyryl)benzene,  
1% DMSO solution



#### <特長>

- アミロイドに対して高い親和性
- 従来の色素に比べ高い検出感度(蛍光強度がBSBの約2倍)
- 溶液タイプのため、染色が容易
- <sup>19</sup>F-MRI 造影剤として使用可能

FSBは従来の色素に比べ、高感度蛍光染色が可能な化合物です。Congo redなどに比べて高感度であったBSBの約2倍の蛍光強度をもっています。これはBSBの臭素をフッ素に変え、重原子効果による蛍光消光をなくしたことから実現しました。アルツハイマー病患者の脳組織およびALアミロイドーシス患者の心臓組織の染色結果から、FSBはCongo redやBSBなどの従来の色素より鋭敏にアミロイド沈着部分を検出していることが確認できます。

また、樋口らは最近、アルツハイマー病モデルマウスを用いた*in vivo*の系でFSBを使用しており、静注数時間後にマウスの脳組織のアミロイド斑部分にFSBが集積していることを確認し、さらにはそのアミロイド斑部分を<sup>19</sup>F-MRIで高感度に検出しています。今後、アルツハイマー病を含めたアミロイドーシスのさらなる研究への応用・発展が期待されます。

品名	容量	本体価格(¥)	メーカーコード
FSB solution	100 µl	25,000	F308
BSB solution	100 µl	20,000	B525

\* 大容量のご提供も可能です。

ご希望の方は小社マーケティング部までお問い合わせください。

#### 夏から秋の展示ご案内

下記会場にて、小社試薬新製品のご紹介を行います。  
皆様のご来場をお待ちしております。

- ・第14回浜松医科大学メディカルホトニクス・コース  
8月8日(月)～12日(金) 浜松医科大学
- ・日本生化学学会第78回大会  
10月20日(木)～22日(土) 神戸国際展示場

## ライブセルイメージング技術講座

### 4

#### ～コントラストをあげる～

浜松医科大学光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

雑誌の表紙には一目で魅かれるような美しい画像が選ばれる。一体どのような絵を印象的と感じるのであるだろうか？模様・配色・モチーフなどもあるだろうが、ピントの合ったコントラストの高い画像であることが多い。ライブセルイメージング研究においても、光信号はより大きく、背景光はより低くした画像の方が良い結果と判断される。つまり光学的な効率が高いほど得られる情報量が多く、学術的に価値のある画像となる。今回は取得する画像の質までこだわってみたい。蛍光のような比較的暗い対象を扱う場合を主体にして、蛍光信号を高めながらノイズを下げて、高コントラスト画像を取得するための基本的な技術を紹介する。

#### 2. S/N比とコントラスト

“より細かく”、“より早く”、“より明るく”細胞のライブ画像を録りたい。これらの要望は空間分解能 (spatial resolution)、時間分解能 (temporal resolution)、S/N比 (signal/noise ratio) を高めれば実現できる。三者の間ではそれぞれ相補的な関係があり、明るさが向上すれば他の二つもあがる。ところで明るさとは何で規定されるか？単純に強い光を適用すれば良いのだろうか？そこでS/N比とコントラストについて考えてみる。

##### 2.1 S/N比

S/N比は信号とノイズの比率で音質や画質の評価に利用され、単位はdBであらわされる<sup>1)</sup>。S/N比が大きいほど高音質・高画質になる。高画質を得るためには、信号を上げてノイズを下げればよい。顕微鏡などの観察系は信号にもっとも影響を与える因子であり、特に光の当て方、ピントの合わせ方が重要である。他方、ビデオカメラなどの撮像系はノイズに多く関与する因子であり、ノイズを軽減しつつ信号を上げたい。フォトンレベルのような極微弱光検出では光信号の増幅ができないため、照明光や検出器由来

のノイズをいかに下げるかが大事になる。

##### 2.2 コントラスト

コントラストはCRTモニタ上などにおける表示画素の暗部から明部までの幅(許容量)のことである<sup>1)</sup>。コントラストが上がると黒い部分はより黒く、白い部分はより白くなり、全体では硬調な表現になる。逆にコントラストが下がると暗部から明部までの幅が広くなり、軟調な表現になる。コントラストを大きく変えても画像自体の信号量やノイズ量は一定であるが、調整効果はS/N比に依存する。S/N比の大きい画像ほど情報を多く抽出でき、人為的に美しく見せるときにも加工しやすい。

##### 2.3 S/N比をあげるには？

光源のパワーは必要量を安定的に扱い、対象からの光信号はロスなく捉える。これらはイメージングに限らず全ての光学分野で共通の留意点である。光の利用効率 (efficiency) をあげることがS/N比向上の第一要件になり、これを意識するだけで相当良い画像を得られるはずである。具体的にどうしたら良いか？光の当て方と録り方に分けて次項に続ける。

#### 3. 光の当て方

##### 3.1 ピントを合わせる

ピント合わせについては前回の解説と重複する部分もあるが、信号量上げるための最重要項目であるので再度簡単に触れる。信号を向上するためのピント合わせには2つの意味がある。1つは対物レンズの前側焦点 (front focus) を見たい標本対象に合わせることであり、もう一方は光源を対物レンズ後側焦点面 (back focal plane) へ適切に入射することである。

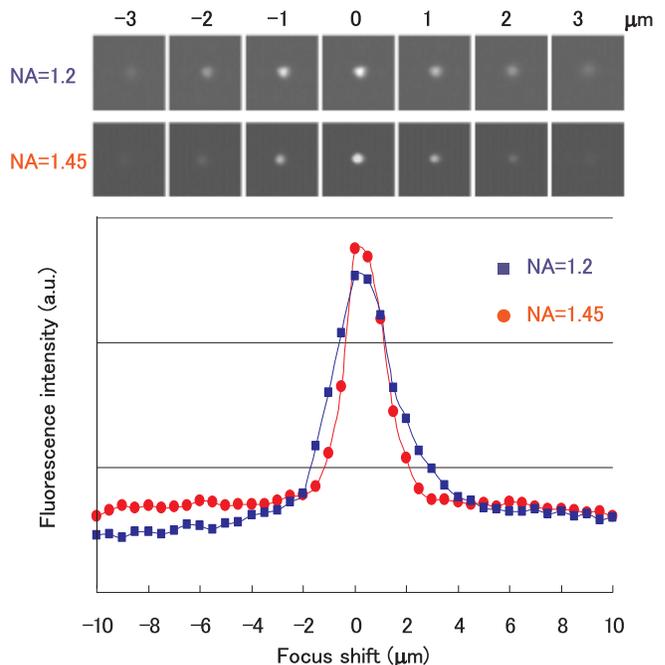


Fig. 1 Changes in fluorescence intensity of fluorobead (diameter=1  $\mu\text{m}$ ) with shift of focus. Objective lenses; 60x UPlanApo NA=1.2 (WI) and NA=1.45 (oil), Olympus.

通常のピント合わせ; 観察対象の輝度が最大となるようにする、または関心領域 (region of interest, ROI) のエッジが明瞭になるようにするとよい。ROIの大きさ(厚さ)とレンズの焦点深度の関係に留意してほしい。焦点深度は対物レンズの開口数(NA)と波長( )から  $\propto 1/NA^2$  に比例する。従って、比較的小さな対象から信号を効率よく得る場合はできるだけ高いNAのレンズと短い波長を適用したほうがよい(Fig. 1)。補正環付きのレンズであれば適切に調整する。低いNAのレンズを用いる利点もある。例えばピントのズレに対して輝度の変化を小さくしたい場合であり、動きや振動の大きな対象を追跡する場合に低NAレンズが有利になる。ピントを一定に保つことは常識のことに思えるが意外と難しい。高NAのレンズの焦点深度は1ミクロン前後になるが、この程度の深度ではわずかに数度の温度変化による熱膨張で大きくずれてしまう。フォーカスのシフト調整部において発生する固有の滑り(ドリフト)も影響大である。このようなピントズレを補正する装置が最近になって主要顕微鏡メーカーで装備されるようになった<sup>\*1,2)</sup>。ピントの自動補正により信号ロスを抑えることができるだけでなく、長時間の安定記録も手軽になってきた。

対物レンズに入射する光のピント合わせ; 対物レンズの瞳における光の集光状態に留意する。現在汎用されている無限遠光学系顕微鏡では、照明光は視野か瞳のどちらかに集中している。落射照明のときは光源のフィラメントやアーク像を瞳に映すように調整し、クリティカル(スポット)照明のときは瞳には平行光束を入射させる。光をできるだけ一点に集中させるためには、輝点が安定している光源と収差の少ない集光光学系を採用する。好ましくない具体例を1つあげる。それは新タイプの対物レンズと旧タイプの照明装置を組み合わせることである。旧タイプ投光管では可視域でさえ十分な色補正がなされていないことがある。新旧混合で使用する場合は対物レンズの性能が十分に発揮できるかどうか色補正を中心に収差をチェックいただきたい。

### 3.2 余分な光を排除する

強い光を標本に当てれば信号は簡単にあげるわけだが、光と色素の反応や、光パワーの集中によって標本がダメージを受けるので、利用できる光量のパワーには限界がある。できるだけ弱い光をROIだけにあてたほうがよく、必要ない光はできるだけ排除したい。

共焦点法(confocal microscope); 発明から50年であり<sup>2)</sup>、S/N比向上が効率よく達成できる手法である<sup>3)</sup>。スポット位置を制御することで標本のROIだけに照射できる。光検出ではピンホール効果により、ピントの合った光だけを集めることができ、ノイズ(暈け)を抑えている。多光子法(multi-photon excitation, MPE)<sup>3)</sup>では色素の励起自体を局所に集中でき、励起光波長が長いので標本への光透過性が高い。色分散の少ないレンズや高出力長波長レーザーが登場してきており<sup>\*4)</sup>、MPE法も随分手軽となってきている。

全反射法(total internal reflection)<sup>4)</sup>; 屈折率の異なる界面に発生する薄い光の層領域にエネルギーを集中できる。ガラスと接着している部分、たとえば細胞膜領域だけを観察する場合は最適な照明法となる。光パワーは全反射界面から離れるにした

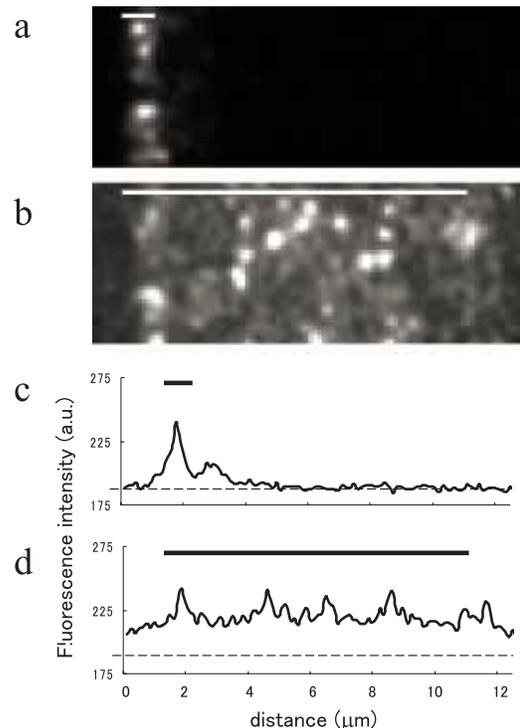


Fig. 2 Imaging of tetramethylrhodamine (TMR) molecules in different widths of illumination field. Horizontal bars indicate the position of illumination, and the width is set approximately at 1 (a & c) and 10 (b & d)  $\mu\text{m}$ . Each bright spot (in a & b) indicates a single molecule of TMR. Horizontal dotted line in line profiles (c, d), dark level of video camera.

がって急激に減衰し、背景光がほとんどなくなる。従って一分子の観察がノイズのない高S/N比検出ができる。全反射法をさらに発展させた方法として薄層光法(thin-layered illumination)<sup>5)</sup>がある。スリットなどを用いて出射光を幅数ミクロン程度まで狭めることで、迷光成分の軽減ができ背景光が下がる(Fig. 2)。薄層光を界面に対して斜めに進行させるようにしたところ、カバーガラス表面から1ミクロン遠ざかった位置にある単一蛍光分子の検出が可能であった。

### 3.3 迷光を抑え透過率は上げる

迷光(stray light)は乱反射や裏面反射による散乱光であり、悪条件が重なると10%以上の背景光上昇になる。原因となる光学パーツはほぼ全部といていい。光酸化、サビやカビへの対策が十分に施されていないので、普通に使用していても自然に劣化する。対物レンズ、カメラ用チューブレンズと蛍光用フィルタ類の劣化は影響が大きいので、性能を定期チェックしてほしい。

通常の蛍光用キューブは干渉フィルタ2枚とダイクロイックミラー1枚から構成される。分解など減多にしないだろうが、次に留意点をあげるのでチェックしてほしい。

波長特性; 透過率や反射率をデータシート参照するなどして調べてほしい。励起光と蛍光は高透過率で、不要な帯域がきちんとカットできるか確認する。ピークの立ち上がり急峻かつピーク性能が安定したフィルタ(Fig. 3a)やビームスプリッタ

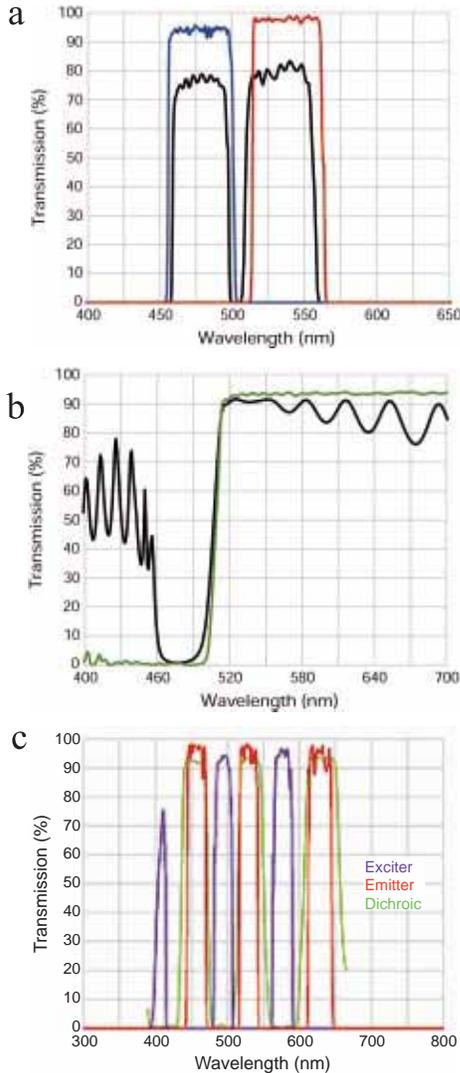


Fig. 3 Spectra of fluorescence filters. a, exciters and emitters for FITC. Blue/red; a hard coating (HC), and black; a semi-hard coating (SC). b, dichroic beamsplitters for FITC. Green; HC. Black; SC. c, multiband filter sets for DAPI, FITC and Texas Red. Blue; 3-band exciter. Red; 3-band emitter. Green; 3-band dichroic. Courtesy from Semrock.

( Fig. 3b ) が登場している。高性能フィルタは DAPI、FITC、Texas Red のような汎用色素の多重観察をする場合に威力が大きい ( Fig. 3c )

コーティング ; 光選択膜と反射防止 ( anti-reflection, AR ) 膜の 2 種から成る。光選択用の薄膜コーティングが格段に進歩しイオンビーム蒸着法によるハードコート (hard-coating, HC)<sup>\*3)</sup> と呼ばれる手法がある。従来法よりシンプルな干渉膜構造であり、透過率などの波長特性が優れている ( Fig. 3 )。裏面反射によるゴースト発生の対策としてはダイクロイックミラーの裏面への AR コート処理がある。良いフィルタ類を採用しても設置に注意してほしい。誘電体多層膜などのコート面を光源側に向けない

と散乱が増大する。  
光吸収帯 ; ダイクロイックミラーで光をわけて反射成分を励起用に用いる場合、不要光をアルマイトなどで吸収することで蛍光キューブ内の乱反射を少なくすることができる。

### 3.4 光源もこだわる

S/N 比は光源でも左右されるので、次の点に留意してほしい。  
必要な輝線のパワーが十分で調光が容易  
パワーが安定  
強度分布が安定

連続波レーザー光 ( CW laser ) が条件をよく満たし、シングル横モード TEM00 で安価な固体式レーザーが利用できるようになってきた<sup>\*4)</sup>。レーザー光の欠点は干渉縞や回折格子発生だが、干渉性 ( coherence ) を軽減する対策を施すとよい。HID など高圧水銀灯は紫外領域を用いるときは明らかに有用だが、輝度変化率や光発生点が不安定と欠点も多い。可視光領域による落射照明用で大きな光パワーを必要としない場合は、ハロゲン光の採用をすすめる。オリンパスからはハロゲンと HID 両用のランプハウスがでている。レーザーとランプ光両方の長所を持ち合わせた光源として、高輝度 LED (light emitting diode)<sup>\*5)</sup> の普及が進んでいる。LED は調光が容易、長時間耐用、熱発生が少なく、小型化が容易、しかも安価と長所が多い。ニコンの病理標本観察システム ( Cool Scope ) やオリンパス小型倒立式顕微鏡 ( MIC-D ) など透過型システム顕微鏡で採用されている。

## 4. 光の録り方

### 4.1 CCD カメラをつかう

光センサによる検出の流れは、光電子増倍転送電流変換データとなる。光検出器には光電子増倍管のような受光素子と CCD ( charge-coupled device ) カメラのような光 / LSI 複合素子の 2 種類があり、両者の違いは検出チャンネル数である。CCD カメラは縦横それぞれで 128 ~ 1,000 チャンネルが標準的でありイメージ形成に優れる。微弱光検出のための感度という点で光電子増倍管のほうが優れていたが、CCD カメラの飛躍的進歩により両者の差はほとんどなくなってきている。CCD カメラは機種によって差があるので注意して選択してほしい。

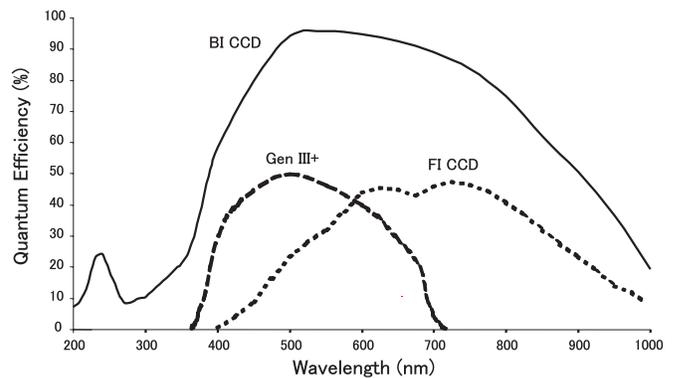


Fig. 4 Typical quantum efficiencies of back-illuminated (BI), front-illuminated (FI) CCD camera and generation (Gen ) image intensifier. Courtesy from Andor technology.

#### 4.2 量子効率の高い CCD カメラを選ぶ

CCD カメラにおける信号は次式で規定される通り、量子効率 (quantum efficiency, QE) 感度と入射光子数の積となる (1 式)

$$\text{信号} = \text{量子効率} \times \text{感度} \times \text{入射光子数} \dots \dots \dots (1)$$

量子効率は光電面で光が電子に変わる効率 (%、mA/W) のことである。波長や電子検出の電極配置 (前面照射; front-illuminated、背面照射式; back-illuminated) によって効率がことなる (Fig. 4)。背面照射型はウエルにたまった電子を検出する電極が光電面の反対側にあり、入射光を効率よく検出できる。そのため量子効率が飛躍的に上がり、500 nm 付近では 90% 以上まで達成できている。

感度 (ゲイン) は電子と電流比の調整できまる。極端な話、感度は何倍でもあげることができるが、信号といっしょにノイズ

も一緒に増えるので S/N 比が上がるわけではない。

入射光子数は CCD サイズと関係があり、一般に CCD のサイズが大きく、画素のサイズが大きいくほうが有利である。また転送方式は受光面における有効面積の目安になり、フレームトランスファ方式が有利である。

#### 4.3 ノイズを減らす

CCD カメラにおけるノイズは主に読出しノイズ (reading noise, Nr) 暗電流 (dark current, Nd) ショットノイズ (shot noise, Ns) があり (Fig. 5) 全ノイズは 2 式で表される。

$$\text{全ノイズ} = (Nr^2 + Nd^2 + Ns^2)^{1/2} \dots \dots \dots (2)$$

Nr; ランダムノイズとも呼ばれ、そのノイズ量は感度に比例、温度の影響少、露光時間と無関係である。Nr の値からダイナミックレンジ (dynamic range, D-range) や感度が概算でき、D-range は入射できる光強度の範囲 (ビット数) を規定しており、CCD のウエルサイズと Nr の比率できまる。ウエルサイズとは 1 つの素子において保持できる電子の数である。要するに Nr が小さければ D-range が大きくとれるので、感度も上げやすい。複数の画素を 1 つと見立てて検出する方法をピニング (binning) という。ピニングにより Nr は減少し、信号が上がる。

Nd; 熱ノイズともいわれ、そのノイズ量は感度にやや比例、温度の影響大、露光時間に比例する。微弱光検出で高感度 CCD カメラを用いるときは最大ノイズ源となるので、液体窒素やペルチェ素子で冷却してノイズ量を抑制する必要がある。-90 度付近に冷却すれば信号に対して 10<sup>-4</sup> 程度にすることができ、長時間露光でもノイズが目立たなくできる。-90 度以下に冷やすと量子効率が下がり始めるので注意が必要である。

Ns; シリコン光電面で発生し、一般に光電面に入射する光量の平方根になる。

#### 4.4 I.I. と EMCCD カメラの活用へ

高 S/N 比検出のためのカメラ性能とは、1 および 2 式から次の 5 点となる。

- 量子効率が高い (波長特性が安定している)
- Nd が小さい (十分に冷却できる)
- D-range が大きい (Nr が小さい)
- CCD 素子が大きい (インチ数に比べて画素数が少ない)
- 感度が安定している (ゲインに直線性がある)

CCD カメラで微弱光を検出するときはイメージインテンシファイア (image intensifier, I.I.) と組み合わせる方法が標準的である<sup>6)</sup>。I.I. はイメージ増倍管であり、第三世代と通称される現行機では光電面・MCP (multi channel plate) ・蛍光面の構造をとる。光電面 (GaAsP) における量子効率が 60% まで上がり、MCP 部でも表面性質・解像度向上・パルス高速制御化など改良が進んでいる (浜松ホトニクス C8600)<sup>\*6)</sup>。I.I. で信号を増幅し、冷却式 CCD カメラでノイズを減らすことで、高 S/N 比の画像取得が達成できる。近年、イメージ増倍・低ノイズの両機能を持ち合わせた電子増倍式 CCD (Electron-multiplying CCD, EM-CCD) が登場した<sup>\*6,7,8)</sup>。CCD 検出面における電子増倍率 (EM gain, EMG) をあげることができ、iXon (ANDOR)<sup>\*8)</sup> では -70 度までのペルチェ冷却により「砂の嵐」が鎮まったクリアな背景で一分子蛍光

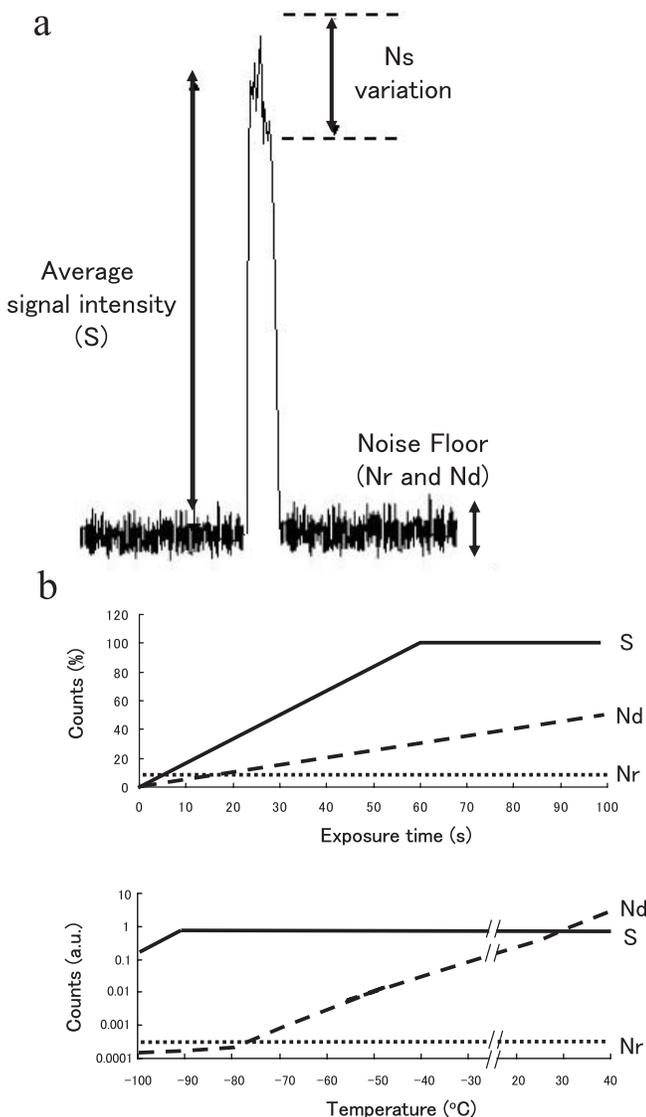


Fig. 5 Signal and noises of CCD camera. a, illustration of noise sources. b, properties of video signal (S), readout noise (Nr) and dark current (Nd).

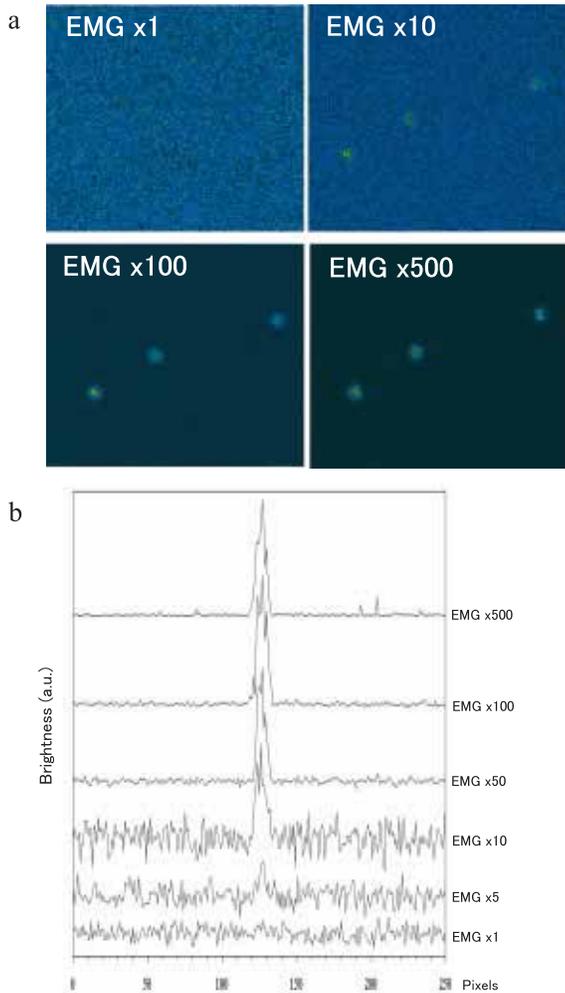


Fig. 6 Effect of the electron-multiplying gain (EMG) on S/N ratio. a, frames of fluorobead, showing images corresponding to variety of increasing EMG (x1, x10, x100, x500). b, intensity profiles through the bottom spot are shown for better visualization of S/N ratio. Courtesy from Andor technology.

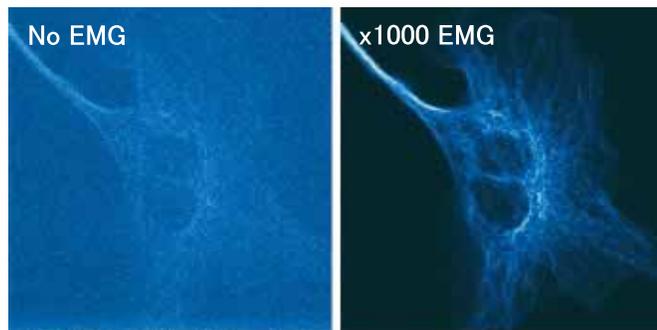


Fig. 7 Epi-fluorescence images of a bovine endothelial cell labelled with Bodipy. Raw image (left) and x1,000 EMG image (right). Courtesy from Andor technology.

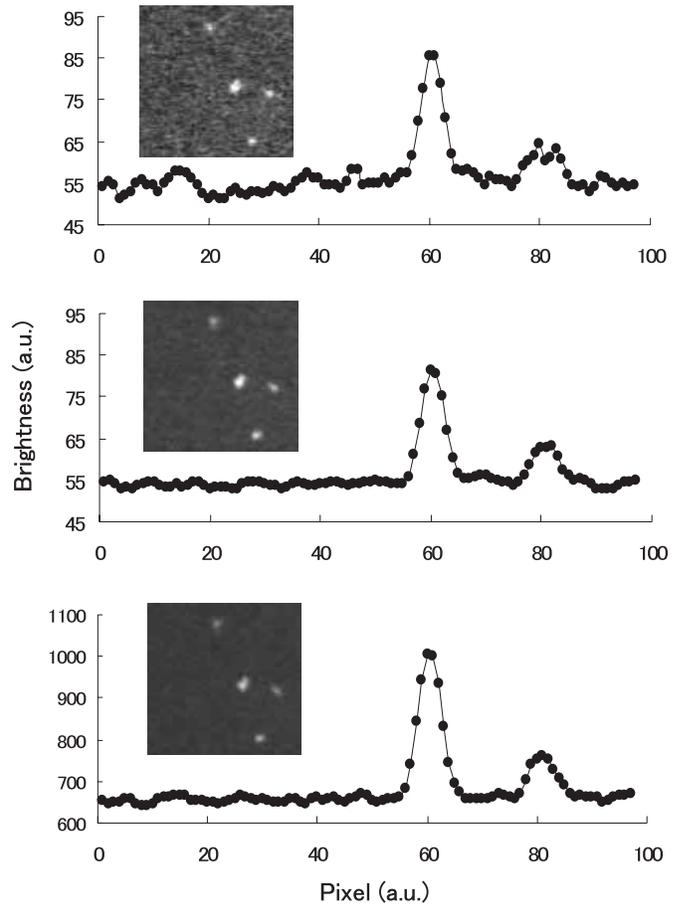


Fig. 8 Effect of the image processing on fluorescence images. Top; raw image, middle; averaged (10 frames), bottom; accumulated (10 frames).

画像を取得することができる (Fig. 6 & 7)<sup>7,8)</sup>。高速イメージングも EM-CCD カメラの特色であり、Nipkow 式共焦点法<sup>9)</sup> と組み合わせることで相乗効果がある。リアルタイム全焦点画像取得装置 (横河電機 CSULS-1) としてシステム化されている (最速 1,000 フレーム / 秒)。

## 5. 画質改善と画像復元

第4項までに述べてきたとおり、光の使い方と捉え方で S/N 比のほとんどが決まる。では記録したあと、画像だけから S/N 比を上げることは不可能なのだろうか？状況によるが汎用画像処理ソフト<sup>10)</sup> で解決できることもあるので、ごく簡単に紹介する。

### 5.1 コントラストを改善する

単なるコントラスト強調だけでは S/N 比アップの効果は低い。画質をより改善できる方法としていくつか紹介する (Fig. 8)

積算 (accumulation); 画像の輝度を積算して信号値を高める。ノイズレベルも増えるが、相対的に滑らかな画像となる。ビット数の高いカメラのほうが飽和 (saturation) しにくい。露光時間を増やしたことでほぼ同じ効果がある。

アベレーシング (averaging); 画像を積算してから平均化する

ことで、輝度を変えずにもともと存在するものは強調され、ランダムノイズは軽減される。対象の動きが平均化速度よりも早いと残像が発生する。

エッジ検出; エッジとはROIの外を縁取る線で、エッジ検出により物体の抽出やパターン認識が容易になる。輝度変化の2次微分によって検出され、ラプラシアンフィルタとも呼ばれる。

## 5.2 ノイズを除去する

画像処理の上ではノイズには規則性のあるものと不規則なもの2種類に分類でき、それぞれに適した手法がある。成功すればノイズの除去によりS/N比は相対的にあがる。失敗して画質が悪くなってしまふ場合もある。

Mean Filter; 正規分布ノイズを取り除くのに適した論理フィルタ。あるROIに集中したスポットノイズの除去に効果的。

高速フーリエ変換 (Fast Fourier Transform, FFT); 周波数解析を行うことで、特定周波数ノイズを除去することができる。縞や網目模様の除去などに効果的。

Median Filter; ランダムノイズを取り除くのに適した非線形形式論理フィルタ。ROIとその近傍領域の輝度値を並べ替えて中央値を出力することで、ごま塩ノイズの除去に効果的。

## 5.3 ボケを除去する

レンズで光を集光するとき完全な一点に絞り込めるわけではない。対物レンズのNAが小さいほど点の絞りこみが低下し、量けが大きくなる。NAに依存した量けを予測したアルゴリズムを用いて、理想的な光学条件で取得した画像を人工的に求めることができ、総称としてデコンボリューション法と呼ばれる。

No neighbor; 2次元デコンボリューション法で、1枚の画像におけるXY平面のボケを改善できる。

Multi neighbor; 2次元デコンボリューション法で、Z軸方向の異なる複数枚の画像からピントぼけを演算しXY平面のボケやノイズを抑制する。

Constrained interactive; 3次元デコンボリューション法で、Z軸方向の異なる複数枚の画像から点拡がり関数 (point spread function, PSF) を求めてピントぼけを改善し、パーチャルセクション画像を取得することができる。

## 6. S/N比を評価する

### 6.1 スタンダード画像を取得する

装置の要素や構成に留意しただけでは、必ずしも見えの良い画像が得られるとは限らず、得られる画像を見ながら最終調整をする必要がある。画質を比較するためには、標準標本として蛍光ビーズの適用が推奨される。市販の蛍光ビーズはほとんどの励起波長に対応しており、粒子径も50 nm ~ 数十 μm までである。蛍光ビーズは褪色がほとんど起きないので、蛍光強度の定量化に汎用される。

### 6.2 画像の評価例

実際の画質評価実験は蛍光ビーズを(コーティング剤を用いて)ガラスに接着させて観察するとよい。通常の蛍光顕微鏡を用いた観察なら直径1 μm程度のサイズ適用が推奨される。この程度の大さになると、わずかな光学条件の変化でも画質から判断しやすくなる。より小さな粒子を用いた測定が必要な場合(一分子イメー

ジング用)には、量子ドット (quantum dot)<sup>\*11)</sup> が有効である。画質の定量には、ラインプロファイル法による輝度分布解析やFFT法による周波数解析が用いられる。Z方向の空間分解能は、フォーカスを変えながら輝度値をプロットし、50%輝度におけるプロットの幅(半値幅)から定量できる (Fig. 1 参照)。

## 7. おわりに

今回は美しい蛍光画像の取得にこだわり、S/N比をあげる基礎技術について光の使い方や録り方の2方向から紹介した。「注意点多い」という印象を抱かれたかもしれないが、対物レンズやカメラの選択が適切であれば、妥当な画像を得られるはずである。また用いるイメージング装置の“スタンダード画像”を取得しておけば、機器性能の変化に鋭敏となるだろうし、蛍光画像における定量精度も高まる。実際のイメージング研究に則してS/N比を深く考察すると、最も大事な点が未解説のまま残っている。それは標本の調製や染色法である。そこで次回からは細胞イメージングにピントを合わせる。

謝辞

本稿執筆において、株式会社ニコン・陸川克二氏、株式会社オプトライン・岩井亮一氏、アンドールテクノロジーリミテッド・谷治正敏氏から情報提供ならびに助言をいただいた。

### 参考文献

- 1) 光と光の記録, 産業開発機構 (2003).
- 2) Minsky M: *U.S. Patent*, No. 3013467 (1961).
- 3) 共焦点顕微鏡活用プロトコル, 羊土社 (2003).
- 4) バイオ高性能機器・新技術利用マニュアル, 蛋白質核酸酵素, **49**, 共立出版(2004).
- 5) T. Sakurai, Y. Wakazono Y, S. Yamamoto, S. Terakawa, *Proc. SPIE.*, **5322**, 108 (2004).
- 6) *in vivo*で見るイメージング, バイオテクノロジージャーナル, **5**, 羊土社 (2005).
- 7) DJ. Denvir, CG. Coates, *Proc. SPIE.*, **4626**, 502 (2002).
- 8) CG. Coates, DJ. Denvir, NG. McHale, KD. Thornbury, MA. Hollywood, *J. Biomed. Opt.*, **9**, 1244 (2004).
- 9) T. Tanaami, S. Otsuki, N. Tomosada, Y. Kosugi, M. Shimizu, H. Ishida, *Appl. Opt.*, **41**, 4704 (2002).

製品情報 HP ;

- \* 1) ㈱ニコン <http://www.nikon-instruments.jp/jpn/products/list/model1.aspx>
- \* 2) オリオンパス㈱ <http://www.olympus.co.jp/jp/lisg/bio-micro/>
- \* 3) ㈱オプトライン <http://www.opto-line.co.jp/jp/index.htm>
- \* 4) ㈱日本レーザー <http://www.japanlaser.co.jp/>
- \* 5) 日亜化学工業㈱ [http://www.nichia.co.jp/jp/product/led\\_top.html](http://www.nichia.co.jp/jp/product/led_top.html)
- \* 6) 浜松ホトニクス㈱ <http://www.hpk.co.jp/Jpn/products/SYS/BioJ.htm>
- \* 7) ㈱日本ローパー <http://www.roper.co.jp/>
- \* 8) アンドールテクノロジーリミテッド <http://www.andor-tech.com/>
- \* 9) 横河電機㈱ <http://www.yokogawa.co.jp/SCANNER/>
- \* 10) ㈱ソリューションシステムズ <http://www.solution-systems.com/>
- \* 11) 住商バイオサイエンス㈱ <http://www.scbio.co.jp/products/quantumdot/index.html>

# Topics on Chemistry

## チキソトロピー性（力学応答ゾル - ゲル相転移能）を有する導電性低分子ゲル

九州大学大学院 白川 三千紘、藤田 典史、新海 征治

ナノ領域においては、構造や形状の僅かなばらつきが物性に大きな影響を与えるために、原子、分子レベルで均一な構造を持つ材料の開発が極めて重要となる。そのためには、大きなものから削り出す(トップダウン)よりは、小さなものから組み上げる(ボトムアップ)ほうが有効な手段であることは想像に難くない。

そのような観点から、近年低分子ゲルの研究が盛んに行われている<sup>1)</sup>。低分子ゲルとはゲル化剤と呼ばれる低分子化合物が、溶液中において一次元に自己集合して擬似的な高分子(超分子ファイバー)を形成し、さらにそれらが絡まり合うことで巨視的に溶媒を固めたものを指す。この過程で形成される超分子ファイバーを、ナノ材料として利用するアイデアに期待が寄せられている。

最近筆者らは、低分子ゲルを利用し、ナノサイズで均一な構造を持つ導電性高分子を得る手法を開発した<sup>2)</sup>。大きな $\pi$ 共役平面を有するポルフィリン型ゲル化剤に、重合部位であるジアセチレンを導入した化合物 1Cu (Fig. 1) は、いくつかの有機溶媒中で一次元状に自己集合し、透明性の高いゲルを形成する。このゲルに紫外光を照射すると、徐々にジアセチレンの重合反応が進行しポリジアセチレンが生成する (Fig. 2)。この反応は基板上においても同様に進行し、AFM 測定により重合後の構造体を観察すると、ほぼ全ての繊維が、一分子幅の超分子ファイバー内に生成した均一な構造のポリジアセチレンであることが明らかとなった (Fig. 3)。

また非常に興味深いことに、重合前の 1Cu のデカリンゲルは、高速攪拌などの力学的な刺激によりゲルを崩壊させゾル状態としても、静置すれば数秒でゲルが再生する性質を示す (Fig. 4)。このような性質は、“チキソトロピー(thixotropy)”と呼ばれるものであり、身近ではボールペンのインクや油性ペンキなどに応用されている。インクやペンキは通常ゲル状態であるが、力学的に加圧されるペン先やはけ先だけはゾル状態となりスムーズに描け、さらに、いったん描いた後は再びゲル状態に戻るために、滲みや液だれを起こすことがない。

筆者らの開発したゲルはチキソトロピー性を有するだけでなく、繊維に紫外光を照射することでそのまま導電性高分子として固定できるというユニークな特徴を持つ。このようなゲルと、最近飛躍的に進歩している“Dip Pen Nanolithography”やインクジェットなどのナノパターニング手法とを組み合わせれば、まさしくボールペンで字を書くように、ナノサイズで配線を施し回路を製作する技術へ利用することが可能である。

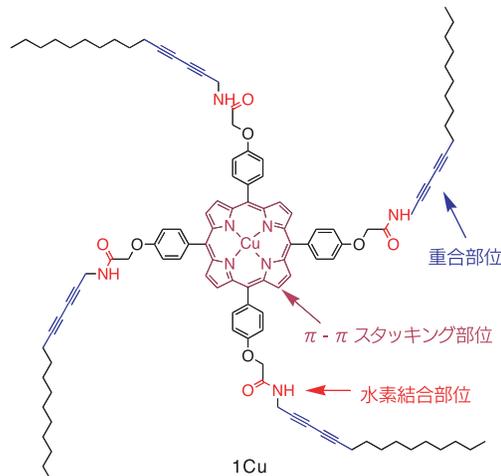


Fig. 1 Structure of 1Cu.

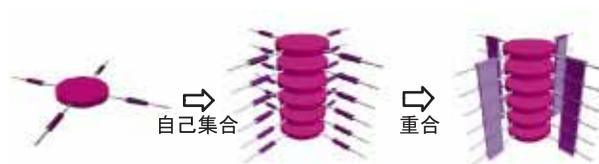


Fig. 2 Schematic illustration of self-assembly of 1Cu and the subsequent photopolymerization of the assembled 1Cu.

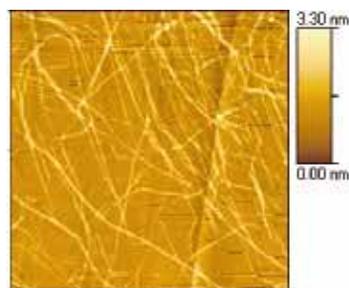


Fig. 3 AFM image of the self-assembled 1Cu after UV irradiation.

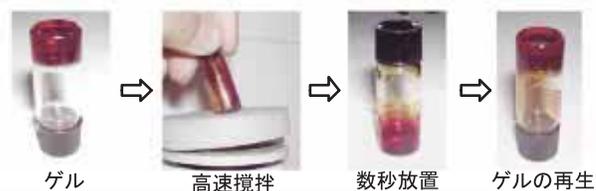


Fig. 4 Photographs showing the thixotropic behavior of the Decalin gel of 1Cu.

### 参考文献

- 1) 総説として; (a) P. Terech, R. G. Weiss, *Chem. Rev.*, **97**, 3133 (1997); (b) D. J. Abdallah, R. G. Weiss, *Adv. Mater.*, **12**, 1237 (2000); (c) S. Shinkai, K. Murata, *J. Mater. Chem.*, **8**, 485 (1998).
- 2) M. Shirakawa, N. Fujita, S. Shinkai, *J. Am. Chem. Soc.*, **127**, 4164 (2005).

著者紹介

氏 名：白川 三千紘 (Shirakawa Michihiro)  
 年 齢：24 歳  
 所 属：九州大学大学院工学府物質創造工学専攻  
 連絡先：〒 812-8581 福岡県福岡市東区箱崎 6-10-1  
 Tel : 092-642-3590 Fax : 092-642-3611  
 E-mail : 3000htcm@mbox.nc.kyushu-u.ac.jp  
 学 位：修士 (工学)  
 研究テーマ：機能性低分子ゲルの開発

氏 名：藤田 典史 (Fujita Norifumi)  
 年 齢：32 歳  
 所 属：九州大学大学院工学研究院応用化学部門 (分子)  
 連絡先：〒 812-8581 福岡県福岡市東区箱崎 6-10-1  
 Tel : 092-642-3590 Fax : 092-642-3611  
 E-mail : nfjtcm@mbox.nc.kyushu-u.ac.jp  
 学 位：博士 (理学)  
 研究テーマ：低分子ゲル・ゾル - ゲル転写

氏 名：新海 征治 (Shinkai Seiji)  
 年 齢：60 歳  
 所 属：九州大学大学院工学研究院応用化学部門 (分子)  
 連絡先：〒 812-8581 福岡県福岡市東区箱崎 6-10-1  
 Tel : 092-642-3585 Fax : 092-632-4357  
 E-mail : seijitcm@mbox.nc.kyushu-u.ac.jp  
 学 位：博士 (工学)  
 研究テーマ：分子認識化学・糖センシング・アロステリズム, 低分子ゲル・ゾル - ゲル転写, 多糖 - 核酸相互作用

九州大学 - 同仁化学組織対応型連携に関するお知らせ

九州大学と小社は、九州大学での優れた研究成果を迅速に実用化することを目的に組織対応型(包括的)連携契約を締結致しました。今後、本紙面上で随時それらの成果をご紹介していく予定です。今回、Topics on Chemistryにてご紹介致しました「チキソトロピー性を示す導電性低分子ゲル」はインク等で重要なチキソトロピー性と電子回路への応用が期待される導電性とを合わせ持ったユニークな材料です。本材料とともに下記の技術に関しても実用化を検討しています。これらにご興味がありましたら小社までお問い合わせ下さい。

No.002 過酸化脂質計測用蛍光試薬

ジフェニルホスフィンのリン原子に対して極めて優れた蛍光特性を有するペリレン類を連結した過酸化脂質計測用蛍光試薬を開発した。例としてジフェニルホスフィンに perylene 3,4,9,10-tetracarboxyl bisimide 誘導体を連結した過酸化脂質計測用蛍光試薬を合成し、脂溶性過酸化物である *m*-chloroperoxybenzoic acid (MCPBA) を添加したところ、ホスフィンオキシド体の形成に伴い蛍光が大きく増強した。本化合物の蛍光波長は十分に長く ( $\lambda_{ex} = 524 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{em} = 535 \text{ nm}$  in methanol) DPPPP のような短波長励起が必要な従来の過酸化脂質計測用蛍光試薬で問題となる生体試料由来の自家蛍光の影響や生細胞へのダメージを大きく軽減できる。また本化合物の反応体 (ホスフィンオキシド体) の蛍光量子収率は極めて高くなっている ( $\sim 1$  in methanol)。このように本試薬は、過酸化脂質計測用蛍光試薬として非常に優れた特徴を有している。

第 16 回フォーラム・イン・ドージン開催のご案内

本年のフォーラム・イン・ドージンは「RNA 干渉」をテーマに下記の日程で開催いたします。是非、ご参加ください。

テーマ：RNA 干渉 - その可能性 -  
 日時：2005 年 12 月 2 日 (金) 9:30-17:30  
 場所：鶴屋ホール (テトリア熊本[鶴屋東館]7F)  
 参加費 / 無料

お問い合わせ・参加申し込み先：  
 フォーラム・イン・ドージン事務局 (担当：蒲野、堀口)  
 E-mail: komine@dojindo.co.jp  
 TEL: 0120-489548 FAX: 0120-021557

- 講演プログラム - (敬称略)

- |                                  |   |
|----------------------------------|---|
| 多比良 和誠 (東京大学大学院工学系研究科).....      | 「バイオ・医学の世界を変える小さな RNA の発現と応用」                 |
| 宮岸 真 (東京大学大学院医学系研究科).....        | 「siRNA 発現ライブラリーを用いた機能遺伝子の検索」                  |
| 桑原 知子 (産業技術総合研究所.....)           | 「Non-coding RNA による成体脳内の神経再生」                 |
| ジーンファンクション研究センター)                |   |
| 野村 一也 (九州大学大学院理学研究院).....        | 「線虫の RNAi で糖鎖の機能を探る」                          |
| 西原 祥子 (創価大学工学部生命情報工学科).....      | 「RNAi による網羅的糖鎖機能解析」                           |
| - ショウジョウバエからヒト糖鎖機能へ -            |   |
| 小原 道法 (東京都臨床医学総合研究所).....        | 「siRNA による C 型肝炎ウイルスの <i>in vivo</i> ターゲティング」 |
| 落谷 孝広 (国立がんセンター研究所).....         | 「アテロコラーゲンによる生体への siRNA デリバリーとがん転移抑制への応用」      |
| 横田 隆徳 (東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究部)..... | 「siRNA の神経疾患への応用」                             |

## 改良品 7月20日発売

### 水質分析用簡易キット

#### ポナールキット -ABS

<改良点>

- 抽出液をベンゼンから安全な溶媒に変更。

合成洗剤の成分の一つとしてABS(アルキルベンゼンスルホン酸系)などの陰イオン界面活性剤が大量に使用されています。これらは各地の河川、湖沼を汚染するため、飲料水源や環境生物への影響が懸念されています。

これまで合成洗剤の有無、あるいは量を確認するために公定分析法であるメチレンブルー法(MB法)が用いられてきましたが、MB法は抽出操作を2回繰り返し、抽出相の洗浄操作を必要とすることなど操作が煩雑で測定時間も長かかっていました。

ポナールキット-ABSは、陰イオン界面活性剤測定用として理想的な性能を持った試薬である「Co-5-Cl-PADAP」を錠剤化し、操作を簡便にしています。そのため、化学分析の経験がない方でも、水中の陰イオン界面活性剤を迅速に測定できるキットになっています。

この度、安全にお使いいただくために抽出液をベンゼンからアニソール/シクロヘキサン混合溶媒に変更致しました。抽出液の変更による感度の変化はなく、これまでと同様にご使用頂けます。

引き続き、ご愛用頂きますようお願い致します。

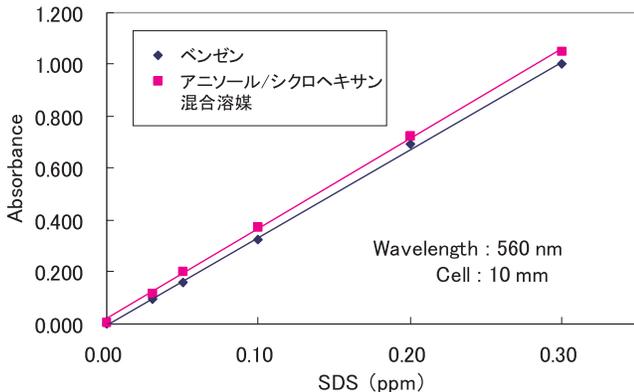


Fig. 1 抽出液変更前後における検量線の感度比較

\* SDS : (Sodium dodecyl sulfate) ドデシル硫酸ナトリウム

キット内容	1) 発色試薬錠	50錠
	2) 抽出液	55 ml x 2本
	3) 測定用フラスコ	1個
	4) 標準色	1枚
	5) スポイト	2本
	6) ピンセット	1本
	7) 説明書	1部
補充キット内容	1) 発色試薬錠	50錠
	2) 抽出液	55 ml x 2本

#### ABS 測定標準操作法

- 1) 検水を添付の 52 ml メスフラスコの下の方の標線まで入れる。
- 2) 発色試薬錠を 1 錠加え、栓をして転倒混和し溶解する。
- 3) 抽出液をメスフラスコの上の方の標線まで加え (2 ml) 栓をして 30 秒間よく振り混ぜる。
- 4) 5 分間静置した後、有機相の色の濃さを標準色と比較し、最も近い濃度の ppm 値を読み取る。

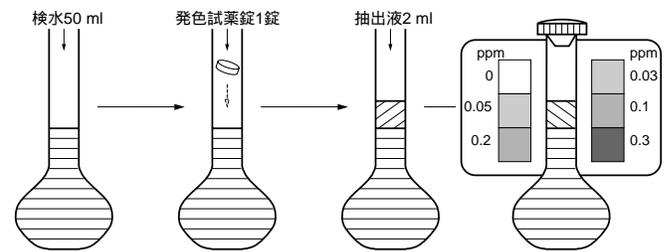


Fig. 2 ABS 測定標準操作法

#### 操作上の注意点

1. 本キットは主に河川、湖沼水中の極低濃度の陰イオン界面活性剤を測定対象としています。0.3ppm 以上の検水は超純水で希釈して測定してください。
2. 検水の pH が 3 ~ 9 より外れている場合は pH7 付近まで中和して測定してください。
3. 測定器具を洗剤で洗浄した場合は、十分にすすぎを行ってください。
4. 抽出液の瓶を開封する際は、抽出液が飛び出さないようにゆっくり開封してください。  
万が一、抽出液が手に付着した場合は、直ちに水道水で洗い流してください。

品名	容量	本体価格(¥)	コード	メーカーコード
ポナールキット-ABS				
1 set (50 回用)		11,000	347-04181	PK01
ポナールキット-ABS 補充薬品				
1 set (50 回用)		6,200	344-04191	PK01-50

## 関連商品

### 水質分析用簡易キットシリーズ

#### ポナールキット

<特長>

- 操作法が簡単で、誰にでも容易に使いこなせる
- 測定原理はJIS法などに準じている
- 短時間で結果が得られる
- 持ち運びが簡単で、野外・現場での分析が容易
- 薬品類は使用に便利で安定な形状
- 国の排水基準の限度以下も測定できる
- 妨害物質の影響がなるべく少なくなるよう調整済み

国や都道府県の環境汚染防止基準を守るために、公定法(JIS法など)による正確な分析が必要とされています。しかしながら、公定法は分析操作が面倒で高度の分析技術や精密な分析機器を必要とし、結果が得られるまでに長時間かかります。

ポナールキットは、分析が専門でない方や現場での分析で、手軽に素早く公定法に準じた結果が得るように小社が開発し、皆様に長年ご愛用頂いている水質分析用簡易キットシリーズです。

Table ポナールキットの種類

品名	測定対象項目
ABS	陰イオン界面活性剤
CN・T	全シアン
CN・T-L	全シアン(低濃度用)
COD	化学的酸素要求量
COD-L	化学的酸素要求量(低濃度用)
Cr・6-	6価クロム
Cr・T-	全クロム
Cu	銅イオン
DO	溶存酸素
F	フッ素イオン
Fe	鉄イオン
Ni	ニッケルイオン
WH	水の硬度

品名	容量	本体価格(¥)	コード	メーカーコード
ポナールキット-CN・T	1 set (100回用)	42,000	344-03351	PK02
ポナールキット-CN・T 補充薬品	1 set (50回用)	5,400	347-03341	PK02-50
ポナールキット-CN・T-L	1 set (100回用)	44,000	349-03781	PK03
ポナールキット-CN・T-L 蒸留補充薬品	1 set (100回用)	12,000	346-03791	PK03-50
ポナールキット-CN・T-L 発色補充薬品	1 set (100回用)	13,200	349-03801	PK03-60

品名	容量	本体価格(¥)	コード	メーカーコード
ポナールキット-COD	1 set (30回用)	26,200	344-03091	PK04
ポナールキット-COD 補充薬品	1 set (30回用)	25,600	341-03501	PK04-50
ポナールキット-COD・L	1 set (30回用)	26,200	343-03321	PK05
ポナールキット-COD・L 補充薬品	1 set (30回用)	25,600	348-03511	PK05-50
ポナールキット-Cr・6-	1 set (50回用)	20,000	345-03761	PK07
ポナールキット-Cr・6- 補充薬品	1 set (50回用)	10,000	342-03771	PK07-50
ポナールキット-Cr・T-	1 set (50回用)	27,000	341-03741	PK09
ポナールキット-Cr・T- 補充薬品	1 set (50回用)	13,600	348-03751	PK09-50
ポナールキット-Cu	1 set (50回用)	17,800	347-03461	PK10
ポナールキット-Cu 補充薬品	1 set (50回用)	8,000	344-03471	PK10-50
ポナールキット-DO	1 set (30回用)	15,000	340-02231	PK11
ポナールキット-DO 補充薬品(A,B,C)	1 set (30回用)	10,800	345-03043	PK11-50
ポナールキット-DO 補充薬品(D)	1 set (30回用)	9,600	342-03053	PK11-60
ポナールキット-F	1 set (30回用)	19,400	347-02241	PK12
ポナールキット-F 補充薬品	1 set (30回用)	9,000	343-03061	PK12-50
ポナールキット-Fe	1 set (50回用)	20,600	341-03481	PK13
ポナールキット-Fe 補充薬品	1 set (50回用)	6,000	348-03491	PK13-50
ポナールキット-Ni	1 set (50回用)	20,000	345-03521	PK14
ポナールキット-Ni 補充薬品	1 set (50回用)	7,400	342-03531	PK14-50
ポナールキット-WH	1 set (50回用)	9,200	341-03121	PK15
ポナールキット-WH 補充薬品(A)	1 set (100回用)	4,200	348-03131	PK15-50
ポナールキット-WH 補充薬品(B)	1 set (100回用)	8,400	345-03141	PK15-60

## お知らせ

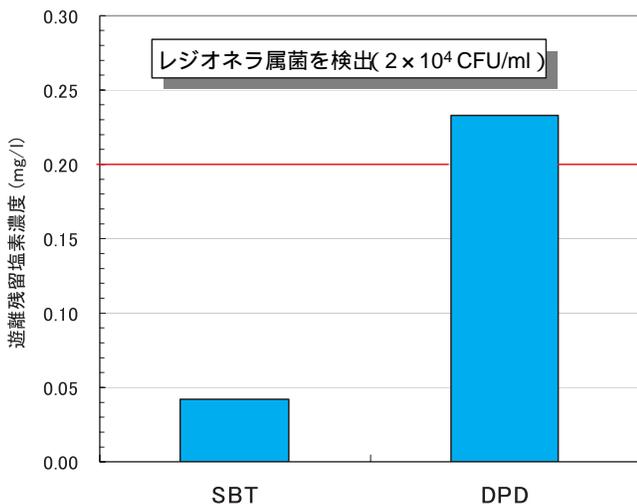
### 残留塩素測定キット

#### 残留塩素測定キット-SBT法

浴槽水の衛生管理における遊離残留塩素測定の必要性

厚生労働省はレジオネラ属菌感染の対策として、平成15年2月14日「公衆浴場における衛生等管理要領」を改正（厚生労働省健康局長通知第0214004号）し、浴場の施設設備および浴槽水の消毒について詳細な管理基準を定めました（浴槽水中の消毒に塩素系消毒剤を用いる場合は、浴槽水中の遊離残留塩素濃度を頻繁に測定して記録し、0.2～0.4 mg/l程度に保ち、かつ、最大で1.0 mg/lを超えないように努めるよう管理すること）。浴槽水中には、入浴者の汗や微生物などの有機性汚染物が多数存在します。このため殺菌効果が低いとされる結合塩素が生成し易く、残留塩素の管理には注意を払わなければなりません。結合塩素との反応性が懸念されるDPD法では、結合塩素が共存する条件で正確に遊離残留塩素濃度を測定する際、発色後5秒以内に数値を読み取ることが望ましいとされています（「衛生試験法・注解2005」P735）。しかし、実際の測定では試薬の溶解や比色板を用いた目視による濃度決定に少なからず時間を要し、結合塩素による発色が原因で誤った遊離残留塩素濃度を測定してしまう可能性があります。

結合塩素（クロラミン）を含むサンプルを調製し、これをSBT法とDPD法で発色させて5分後に測定した時の遊離残留塩素濃度およびこのサンプルを用いたレジオネラ属菌の殺菌効果を確認しました。本条件でレジオネラ属菌は残留塩素濃度不足のため、殺菌されていませんでした。SBT法では塩素濃度不足と測定されましたが、DPD法では殺菌に十分な遊離塩素濃度があると誤測定されました。

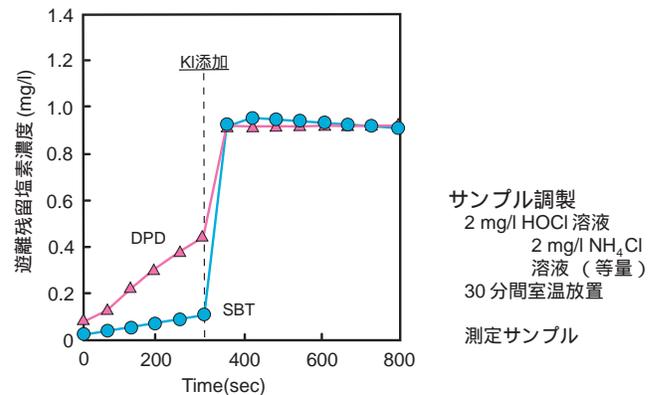


初めてご使用の際は、キットをお求めください。試薬(100回用、500回用)および色素液・検水調整液(組み合わせると2000回相当)は、測定回数にあわせて補充用としてお求めください。

#### DPD法より高い遊離残留塩素選択性

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。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でした。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。



#### <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-Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) 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)

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			
1 set (100回用)		7,000	ZK01-50
残留塩素測定試薬-SBT法			
100回用		1,300	ZK01-60
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

新製品

NO 検出キット

**NO<sub>2</sub>/NO<sub>3</sub> Assay Kit-FX (Fluorometric)**  
 ~ 2,3-Diaminonaphthalene Kit ~

<改良点>

- キットの安定性が向上
- 酵素反応におけるインキュベーション時間が30分(従来比1/2)
- 容量を200回用に変更(従来比2倍)

「NO<sub>2</sub>/NO<sub>3</sub> Assay Kit-FX」は、「NO<sub>2</sub>/NO<sub>3</sub> Assay Kit-F」と同様にNO<sub>2</sub><sup>-</sup>とDAN (2,3-Diaminonaphthalene)の反応を利用して、試料中のNOを蛍光法で間接的に測定するキットです。酵素反応条件等を見直すことによって「NO<sub>2</sub>/NO<sub>3</sub> Assay Kit-F」と比較して、安定性が向上し、アッセイにかかる時間を短くしました。また、容量を従来の2倍の200回用としています。

一酸化窒素(NO)が情報伝達物質として多くの生理的現象に関与していることが明らかとなり、NOに関する研究が盛んに行われています。NOは水中で加水分解され最終的にNO<sub>2</sub><sup>-</sup>とNO<sub>3</sub><sup>-</sup>になるため、NO<sub>2</sub><sup>-</sup>と同時にNO<sub>3</sub><sup>-</sup>も測定する必要があります。本キットは還元酵素を含み、NO<sub>3</sub><sup>-</sup>をNO<sub>2</sub><sup>-</sup>に還元できるのでNO<sub>2</sub><sup>-</sup>とNO<sub>3</sub><sup>-</sup>両方の濃度測定が可能です。本キットは1~10 μmol/lの濃度領域に適しています。より高濃度の場合、「NO<sub>2</sub>/NO<sub>3</sub> Assay Kit-C」をご利用ください。尚、本キットの発売に伴い5月末で「NO<sub>2</sub>/NO<sub>3</sub> Assay Kit-F」を販売中止とさせていただきます。

<検量線例>

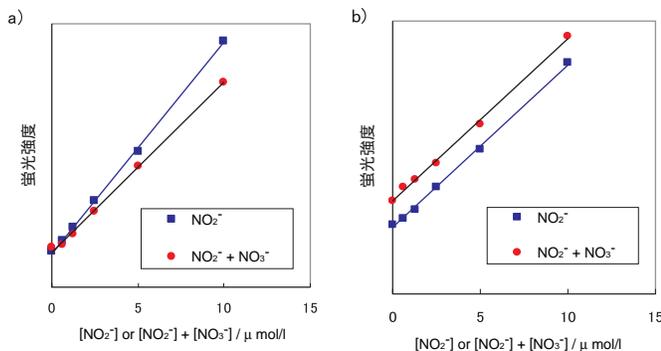


Fig.1 NO<sub>2</sub>/NO<sub>3</sub> Assay Kit-FX を用いて測定した、NO<sub>2</sub><sup>-</sup> と NO<sub>2</sub><sup>-</sup>+NO<sub>3</sub><sup>-</sup> の検量線  
 a) Buffer Solution 中 b) 培地 (DMEM) 中

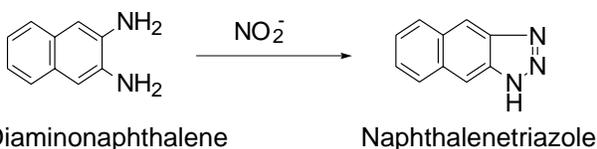


Fig. 2 2,3-Diaminonaphthalene と NO<sub>2</sub><sup>-</sup> との反応

<キット内容> 200回用

Buffer Solution (1本 = 200回用)	1本
NaNO <sub>2</sub> Standard Solution (1本 = 100回用)	2本
NaNO <sub>3</sub> Standard Solution (1本 = 100回用)	2本
Nitrate Reductase (1本 = 100回用)	2本
Enzyme Cofactors (1本 = 100回用)	2本
Fluorescence Reagent (DAN) Solution(1本 = 200回用)	1本
Stop Solution (1本 = 200回用)	1本

品名	容量	本体価格(¥)	メーカーコード
NO <sub>2</sub> /NO <sub>3</sub> Assay Kit-FX(Fluorometric) ~ 2,3-Diaminonaphthalene Kit ~	200回用	25,000	NK08

関連商品

**NO<sub>2</sub>/NO<sub>3</sub> Assay Kit-C (Colorimetric)**  
 ~ Griess Reagent Kit ~

Griess 法は、古くから良く知られている NO<sub>2</sub><sup>-</sup> の定量法で、Sulfanilamide と NO<sub>2</sub><sup>-</sup> が反応して生じるジアゾニウム塩化合物と、Naphthylethylenediamine のアゾカップリングを利用しています。

一酸化窒素(NO)の代謝物である NO<sub>2</sub><sup>-</sup> を測定するという間接的な方法ではありますが、簡便で信頼性も高いため、NO の間接的定量法として広く用いられています。

本キットは、Griess 法を用いて、簡便に NO<sub>2</sub><sup>-</sup> と NO<sub>3</sub><sup>-</sup> を定量するために還元酵素、標準液等を組合せたものです。10 ~ 100 μmol/l の濃度領域測定に適しています。

品名	容量	本体価格(¥)	コード	メーカーコード
NO <sub>2</sub> /NO <sub>3</sub> Assay Kit-C (Colorimetric) ~ Griess Reagent Kit ~	100回用	24,800	344-07991	NK05

販売中止のお知らせ

小社都合により下記製品の販売を中止いたしましたので、ご連絡申し上げます。  
 尚、在庫ある限り対応できますので、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
NO <sub>2</sub> /NO <sub>3</sub> Assay Kit-F II(Fluorometric) ~ 2,3-Diaminonaphthalene Kit ~	100回用	347-07981	NK04
Diethyl ether,(AV.POV)	500 ml × 6	346-03931	AV01

## 試作品

### 蛍光タンパク標識キット

蛍光タンパク標識キットは抗体などの高分子に Allophycocyanin(APC)、B-Phycoerythrin(B-PE)または R-Phycoerythrin(R-PE)の蛍光タンパク (Phycobiliprotein) を標識するためのキットで、それぞれNH<sub>2</sub>タイプ、SHタイプの2種類があります。NH<sub>2</sub>タイプはその構造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、SHタイプはその構造内にマレイミド基を有しているためスルフヒドリル基を有する標的分子と、それぞれ混合するだけで安定な共有結合を形成します。標的タンパク質がスルフヒドリル基をもっていない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)。

蛍光タンパクがフルオレセインなどの低分子の蛍光色素に比べて優れている点として、下記のことが挙げられます。

- 蛍光タンパク1分子あたり、APCでクロモフォアを6個、B-PEとR-PEは30個含んでいるので、1分子あたりの蛍光強度が高い。

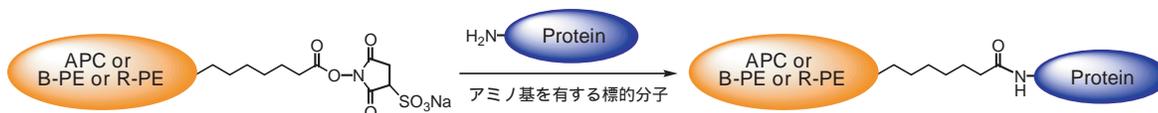


Fig. 1 蛍光タンパク標識キットNH<sub>2</sub>タイプの標識反応

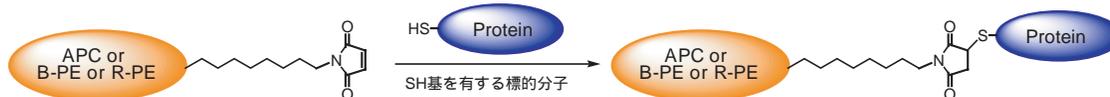


Fig. 2 蛍光タンパク標識キットSHタイプの標識反応

- 励起スペクトルの幅が広いので、種々の波長で励起できる。APCはHe-Neレーザーの633 nm、またはKrイオンレーザーの647 nmに適しており、660 nm付近で赤色の蛍光を発する。FITCやR-PEと異なり、Arレーザーでは励起されない。R-PEはArレーザーの488 nmやキセノンランプあるいは水銀アークのようなブロードな光源では適当な蛍光フィルターを用いて励起され、570 nm以上でオレンジ色の蛍光を発する。特にFITCとR-PEの二重標識の組み合わせでは、両者とも488 nmで励起されるがFITCは530 nm付近に緑色、R-PEは570 nm以上でオレンジ色の蛍光を発する。
- 他のタンパク質と結合しても、蛍光色素の特性が変化しない。

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。短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組織染色、FACSなどの様々な用途に利用することができます。本キットには標識に必要なすべての試薬と作製した蛍光タンパク標識体を保存するための溶液が含まれています。標識対象物には、分子量50,000以上のサンプルをご使用ください。

#### < 標識体の波長 >

品名	標識体の最大吸収波長	標識体の最大蛍光波長
Allophycocyanin Labeling Kit - NH <sub>2</sub> , -SH	650 nm	660 nm
B-Phycoerythrin Labeling Kit - NH <sub>2</sub> , -SH	546 nm	575 nm
R-Phycoerythrin Labeling Kit - NH <sub>2</sub> , -SH	566 nm	578 nm

#### < 本キット以外に必要なもの >

- 10 μl, 200 μl, 1000 μl マイクロピペッター
- インキュベーター (37 °C)
- 0.5 ml チューブ
- 遠心機 (マイクロチューブ用)

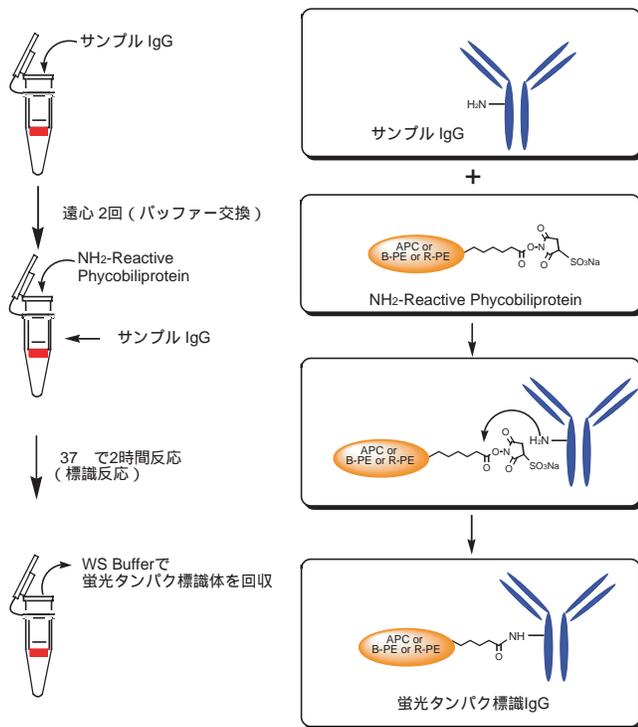
**Allophycocyanin Labeling Kit - NH<sub>2</sub>**  
**B-Phycoerythrin Labeling Kit - NH<sub>2</sub>**  
**R-Phycoerythrin Labeling Kit - NH<sub>2</sub>**

< 特長 >

約 2.5 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。  
 50 ~ 200 μg のタンパクの標識が可能。

< キット内容 >

- ・ NH<sub>2</sub>- Reactive Phycobiliprotein      ・ Reaction Buffer
  - ・ WS Buffer      ・ Filtration Tube
- Phycobiliprotein : Allophycocyanin または B-Phycoerythrin  
 または R-Phycoerythrin



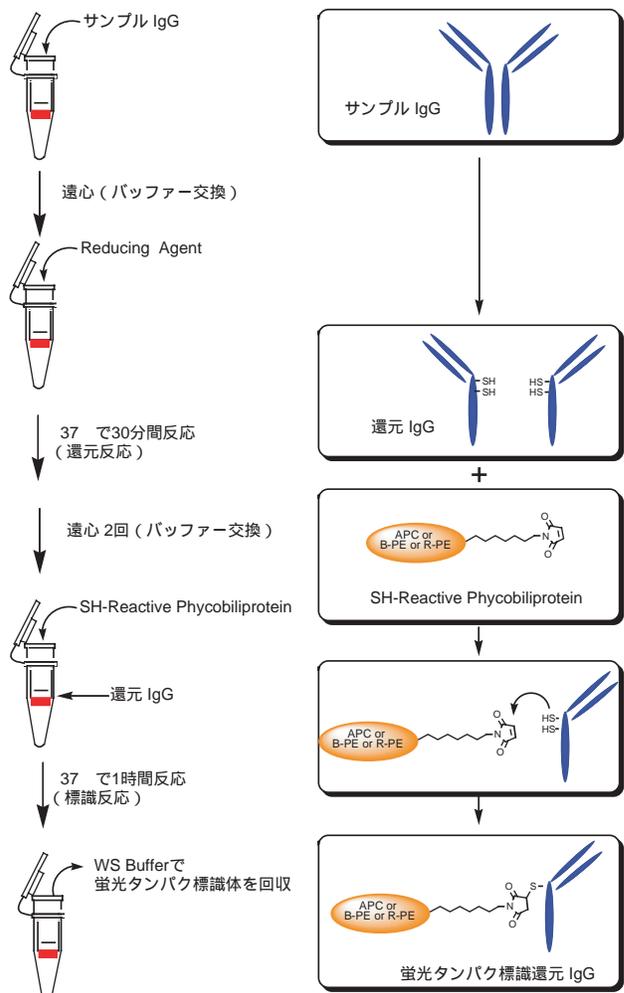
**Allophycocyanin Labeling Kit - SH**  
**B-Phycoerythrin Labeling Kit - SH**  
**R-Phycoerythrin Labeling Kit - SH**

< 特長 >

約 2.5 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。  
 50 ~ 200 μg のタンパクの標識が可能。

< キット内容 >

- ・ SH- Reactive Phycobiliprotein      ・ Reducing Agent
  - ・ RA Solution      ・ Reaction Buffer      ・ WS Buffer      ・ Filtration Tube
- Phycobiliprotein : Allophycocyanin または B-Phycoerythrin  
 または R-Phycoerythrin



## Q &amp; A

## 蛍光標識用キット

Fluorescein Labeling Kit-NH<sub>2</sub>

Q1 IgG以外のタンパク質にも標識することはできますか？

A1 分子量50,000以上のNH<sub>2</sub>基をもつタンパク質であれば標識できます。低分子はチューブの膜を通過するため標識できません。

Q2 使用できるIgGが少量しかないのですが、標識できるでしょうか？

A2 使用できるIgGの量は50～200 μgとしています。この範囲であれば性能に大きな違いはみられません。10 μgのIgGでも標識可能ですが、バックグラウンドの上昇などの問題が生じる可能性があります。

Q3 サンプルは溶液になっても問題ないでしょうか？

A3 問題ありません。

ただし、チューブ上で遠心や反応溶液の添加を行いますので、サンプル溶液の容量は100 μl以下にしてください。また、サンプル(IgGなど)の濃度が50 μg/100 μl以下である場合は、Filtrationを繰り返してタンパク量が50～200 μg/100 μlとなるように濃縮します。溶液をFiltration tubeに入れて遠心して溶液を除く操作を数回行ってください。フィルター上に残っているサンプル量が50～200 μgとなればよいので、改めて溶解させる必要はありません。

Q4 サンプル溶液中の共存物は反応に影響しますか？

A4 共存物の種類により影響することがあります。

溶液中にどのような物質が含まれるかを確認の上、状況に応じてラベル化に用いるタンパク質の精製を行い、標識反応にご使用ください。

<高分子：分子量1万以上>

影響する可能性があります。

BSAやゼラチンなど高分子でアミノ基をもつ化合物は、Filtration Tubeでも除くことができません。そのため標識され、蛍光性不純物として影響します。反応に使用する前に別途除去操作を行ってください。

一方、アミノ基を持たない化合物でも、高分子の不純物が多いとフィルターの目詰まりの原因になり、標識・精製操作に支障がでる可能性もあります。

\* Fluorescein Labeling Kit-NH<sub>2</sub>に限らず他のLabeling Kitに関しても同様の注意が必要です。

Q5 添付の保存バッファーでなくとも標識体の保存はできますか？

A5 可能です。

実験系の条件にあったバッファーに溶解し保存してください。ただし、標識後の安定性に関しては小社安定性データをそのまま利用することはできませんので別途、安定性をご確認下さい。

Q6 キット自体を冷凍保存してもよいですか？

A6 キットをそのまま冷凍保存しないでください。

NH<sub>2</sub>-Reactive Fluoresceinのみを冷凍して、他は冷蔵してください。

冷凍保存すると性能に影響する部品があります。

例えば、Filtration Tubeは、凍結するとメンブランにクラックや割れが生じて、濾過能力に影響します。

また、バッファーも冷凍することにより、緩衝能に影響する可能性があります。一度凍結されるとキットの性能を保証できなくなりますので、ご注意ください。

Q7 NH<sub>2</sub>-Reactive FluoresceinはDMSOに溶解後、保存できますか？

A7 長期の保存はできません。反応直前に溶解し、すぐに使用してください。

DMSOに含まれる水分によりNH<sub>2</sub>-Reactive Fluoresceinが徐々に加水分解され、標識率が低下する可能性があります。

Q8 プロトコルの操作方法で、IgGにはいくつ蛍光基が導入されますか？

A8 IgG 1分子に対し、Fluoresceinが4～7個導入されます。

Q9 プロトコルの操作で未反応の色素は除去できますか？

A9 NH<sub>2</sub>-Reactive Fluoresceinは低分子であるため、Filtration tubeでほとんど除くことができます。

ただ一部の未反応や分解したFluoresceinが若干残ることがあります。除きたい場合には、さらに2回ほど洗浄してください。ただし組織染色などで使う場合は、壊れた色素による吸着などの問題はないと考えられます。

Q10 それぞれのモル吸光係数から標識率を算出する時に[0.22]がかけてありますが、この数値は何でしょうか？

A10 Fluoresceinの標識率の式は下記の通りです。

$$\text{Fluorescein/タンパク質の標識率} = \frac{A_{500}/60,000}{(A_{280}-A_{500} \times 0.22)/(\epsilon \text{ of protein})}$$

A<sub>500</sub>: 500 nmの吸光度

A<sub>280</sub>: 280 nmの吸光度

ε: タンパク質の280 nmでのモル吸光係数

60,000は500 nmでのFluoresceinのモル吸光係数で、右辺の分子はFluoresceinのモル数になります。

Fluoresceinは280 nmと500 nmに吸収があり、280 nm/500 nmの比が[0.22]です。280 nmの吸光度は「タンパク質の吸光度 + Fluoresceinの吸光度」となっていますので、500 nmの吸光度に0.22を掛けたもの引くことにより、タンパク質のみの吸光度が求められます。この吸光度をモル吸光係数で割ることで、分母はタンパク質のモル数となり、タンパク質1分子あたりに導入されたFluoresceinの個数として算出されます。

関連商品

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

標識用キットシリーズ

Dojindo Labeling Kitsは活性化試薬とFiltration tubeにより、抗体等を簡単に標識するためのキットです。

標識方法としてはアミノ基標識用のNH<sub>2</sub>タイプとスルフヒドリル基標識用のSHタイプの2種類のキットがあります。NH<sub>2</sub>タイプはN-hydroxy succinimide (NHS)で活性化した試薬を用いており、タンパク質等のNH<sub>2</sub>基に標識することが出来ます。SHタイプはmaleimide基で活性化しており、還元抗体などSH基を有するサンプルへ標識することができます。

前処理-反応-精製まで全て一つのFiltration tube上で行うことができ、3時間以内に標識体が得られます。1回の標識操作で50~200 μgのサンプルを処理することができます。Filtration tubeを用いた精製はゲルろ過や透析などに比べ標識体の回収率が高く、貴重なサンプルの標識に適しています。キットには保存溶液が付属しており、標識体を安定に保存することができます。また、得られた標識体は、免疫組織染色、ELISA、ウエスタンブロットなどの様々な用途に利用することができます。Peroxidase、Alkaline Phosphatase、ビオチン、蛍光など各種キットをシリーズで取り揃えておりますので、ご利用ください。

品名	容量	本体価格( ¥ )	メーカーコード
Peroxidase Labeling Kit - NH <sub>2</sub>	3 samples	17,000	LK11
Peroxidase Labeling Kit - SH	3 samples	17,000	LK09
Alkaline Phosphatase Labeling Kit - NH <sub>2</sub>	3 samples	21,000	LK12
Alkaline Phosphatase Labeling Kit - SH	3 samples	21,000	LK13
Biotin Labeling Kit - NH <sub>2</sub>	3 samples	12,000	LK03
Biotin Labeling Kit - SH	3 samples	12,000	LK10
Fluorescein Labeling Kit - NH <sub>2</sub>	3 samples	21,000	LK01

<免疫組織染色例>

Fluorescein Labeling Kit-NH<sub>2</sub>を用いてマクロファージに発現するレセプターに対する抗体を標識し、マウス肺を染色した。レセプター発現部位が特異的にFluoresceinによって染色された。

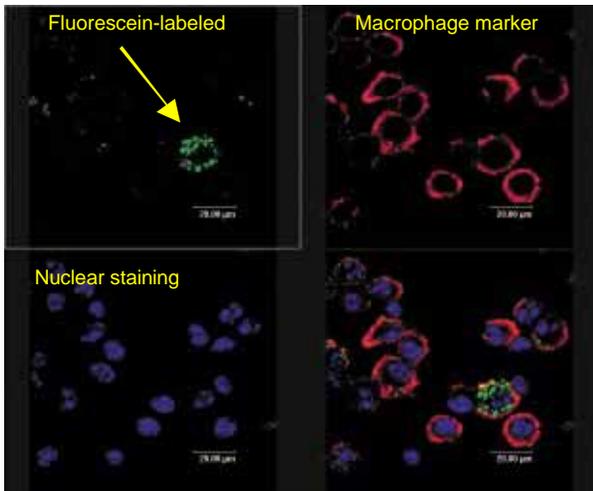


Fig. マウス肺の組織染色画像  
 a) マクロファージに発現するレセプターの抗体をFluorescein Labeling Kit-NH<sub>2</sub>で標識した標識抗体で染色  
 b) マクロファージのマーカーで染色  
 c) 核染色  
 d) 多重染色画像

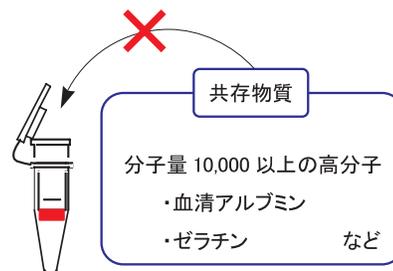
(画像提供: 熊本大学医学部細胞病理学講座 寺崎泰弘先生)

Dojindo Labeling Kits に関する重要なお知らせ

キット添付の取扱説明書には記載しておりますが、標識する試料溶液中に標識対象以外の分子量10,000以上の物質が含まれる場合、キット付属のFiltration Tubeではこれらの共存物質を除去することができないため、標識反応や操作に支障をきたす恐れがあります。キット使用の際はあらかじめ精製した試料溶液をご使用ください。

また、市販の抗体には安定化剤としてゼラチンや血清アルブミンなどの高分子物質が添加されている場合があります。共存物質をご確認の上、これらの物質が含まれる際はあらかじめアフィニティークラムなどにより精製を行い、標識反応にご使用ください。

\* Labeling Kit 類全てに関して注意が必要です。



新製品

細胞内カルシウムイオン測定試薬

**Fluo 4-AM**  
**Fluo 4-AM special packaging**

< 特長 >

- ・アルゴンレーザー励起(488 nm)による蛍光強度が Fluo 3 の約 2 倍。
- ・Fluo 3 と同様に共焦点レーザー顕微鏡(CLSM)やフローサイトメーターなどで測定・観察が可能。

Fluo 4 は Fluo 3 のクロロ基(Cl)をフルオロ基(F)へと置きかえた構造を持つカルシウム蛍光プローブです。より電子吸引性の高いフルオロ基に置き換わったことで、励起極大波長は Fluo 3 よりも約 10 nm 短波長側にシフトしています(Fig. 1, Table)。これはアルゴンレーザーの波長により近いものです。そのため、アルゴンレーザー励起による Fluo 4 の蛍光強度は Fluo 3 の約 2 倍と高感度です(Fig. 2)。

Fluo 4 の  $Ca^{2+}$  親和力は Fluo 3 と近い値であるため(Fluo 3 :  $K_d = 0.4 \mu\text{mol/l}$ , Fluo 4 :  $K_d = 0.35 \mu\text{mol/l}$ )、汎用されている Fluo 3 と同様に、共焦点レーザー顕微鏡やフローサイトメーターなどの装置を用いた細胞内のカルシウムイオンの観察に有用です。Fluo 4-AM は Fluo 4 のカルボキシル基を脂溶性のアセトキシメチルエステル体にして細胞膜透過性としたものです。細胞懸濁液に混ぜるだけで容易に細胞内に取り込まれ、細胞内のエステラーゼにより加水分解されて Fluo 4 を再生し、細胞内  $Ca^{2+}$  を蛍光モニターできます。

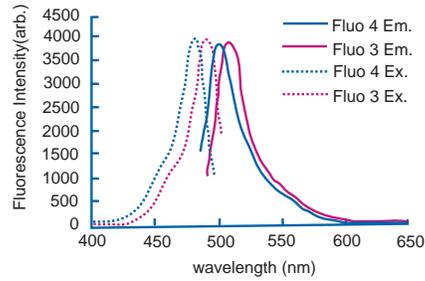


Fig. 1 Fluo 4およびFluo 3の励起・蛍光スペクトル

1  $\mu\text{mol/l}$  Fluo 4 (or Fluo 3), 20 mmol/l HEPES, 0.1 mmol/l  $CaCl_2$ , pH 7.4

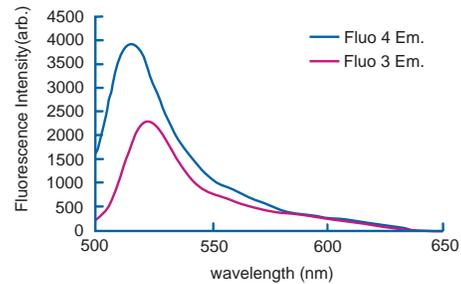


Fig. 2 Fluo 4およびFluo 3のアルゴンレーザー励起での蛍光スペクトル

1  $\mu\text{mol/l}$  Fluo 4 (or Fluo 3), 20 mmol/l HEPES, 0.1 mmol/l  $CaCl_2$ , pH 7.4

Fluo 4-AM ラット海馬初代培養細胞実験例

Table Fluo 4および Fluo 3の励起・蛍光極大波長

	Fluo 4	Fluo 3
励起極大波長	495 nm	508 nm
蛍光極大波長	518 nm	527 nm



Fig. 3-a Ca濃度変化

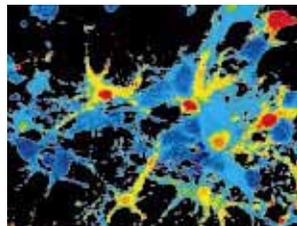


Fig. 3-b Ca濃度分布 (蛍光強度比の疑似カラー表示)

Fig. 3 ラット海馬初代培養細胞を 10  $\mu\text{mol/l}$  DHPG で mGluR 刺激したときの Ca 濃度変化(a)および ↑a の時点での Ca 濃度分布(b)。

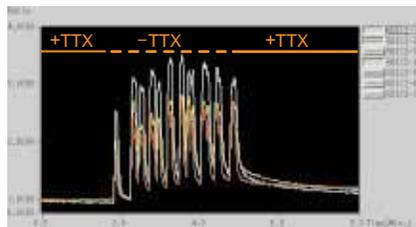


Fig. 4-a Ca濃度変化

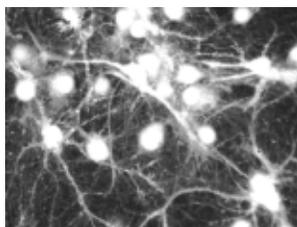


Fig. 4-b Fluo 4-AM 染色蛍光像

Fig. 4 ラット海馬初代培養細胞で、TTX のない状態では自発的に興奮状態となり、ニューロン間で同期して、Ca 濃度が変化している(a)。b は興奮時の Fluo 4-AM 染色蛍光像(Fluo 4-AM 5  $\mu\text{mol/l}$ , 45 min)。

(画像提供：科学技術振興機構 カルシウム振動プロジェクト 中村 健先生)

品名	容量	本体価格(¥)	メーカーコード
Fluo 4-AM	1 mg	39,000	F311
Fluo 4-AM special packaging	50 $\mu\text{g} \times 8$	29,000	F312

ホームページアドレス

URL : <http://www.dojindo.co.jp/>  
E-mail : [info@dojindo.co.jp](mailto:info@dojindo.co.jp)

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