



DOJIN NEWS

2016 No.158
ISSN 0385-1516
ドージンニュース

CONTENTS

●Review

キレート試薬としての
フルオロン型キサンテン系色素の合成と
吸光光度分析への応用
大阪薬科大学
藤田 芳一

●Topics on Chemistry

Cytotoxicity LDH Assay Kit-WST
を使用した細胞傷害性試験
株式会社同仁化学研究所 緒方 秀樹



表紙撮影：阿蘇市米塚
photo：永島俊介氏

CONTENTS

Review

- キレート試薬としてのフルオロン型キサンテン系色素の合成と吸光光度分析への応用 • [1]
大阪薬科大学 藤田 芳一

Topics on Chemistry

- Cytotoxicity LDH Assay Kit-WSTを使用した細胞傷害性試験 • [10]
株式会社同仁化学研究所 緒方 秀樹

Commercial

- 細胞毒性測定 LDH Assay Kit • [11]

新製品

- タンパク質チオール数の解析試薬 • [12]
- チオールを有するタンパク質の回収・解析用試薬 • [12]
- マイトファジー検出蛍光プローブ • [13]
- ミトコンドリア染色試薬 • [13]

開発中

- 抗体標識キット • [9]
- 硫化水素検出用蛍光プローブ • [12]

お知らせ

- 学会のご案内 • [13]
第27回フォーラム・イン・ドージンのご案内 • [14]

新製品案内

*容量・価格等の詳細は各ページをご覧ください。

タンパク質チオール数の解析試薬

-SulfoBiotics- PEG-PCMal

チオールを有するタンパク質の回収・解析用試薬

-SulfoBiotics-
Biotin-HPDP (WS) solution

マイトファジー検出蛍光プローブ

Mitophagy Detection Kit

ミトコンドリア染色試薬

MitoBright Red
MitoBright Deep Red

※希望納入価格には消費税等は含まれておりません。

キレート試薬としてのフルオロン型キサンテン系色素の合成と吸光光度分析への応用

Synthesis of the fluorone-type xanthene dyes as a chelating reagent and application to spectrophotometric analysis



藤田 芳一

大阪薬科大学名誉教授
大阪信愛女学院
サエラ薬局
グラムール美容専門学校

Abstract

We synthesized 2, 6, 7-trihydroxy xanthene-3-one type (fluorone-type) xanthene dyes having excellent properties as a chelating reagent, and developed novel spectrophotometric methods of various metal ions, pharmaceuticals, biogenic constituents by incorporating analytical creativity such as the ternary complex formation reaction and/or the competitive complexation reaction in surfactant micellar media. Further developed methods were applied to a variety of real samples. In addition, some reaction mechanisms in employed analytical conditions were clarified by determined the binding parameters, thermodynamic parameters and so on. I introduce the outline in the present review.

1. はじめに

分析化学は、医薬品分析、環境分析、食品分析、臨床分析等あらゆる分野に汎用されている必要不可欠な基盤技術のひとつであり、この分析化学の発展には分析機器の発展に代表されるハード面での進歩、分析試薬とその利用法の開発に代表されるソフト面での進展がその両輪である。一方、光分析法の代表である吸光度法は、簡便、迅速、再現性に優れた方法として金属あるいは非金属、さらには医薬品、生体成分などの分析に汎用されるなど、応用範囲は極めて広いが、その反面、目的によっては感度、選択性においてやや不十分な場合があり、その他の機器分析の著しい進歩発展により、新しい反応原理の探索や新しい有機試薬の開発も含め、その活用面における新しい可能性を開拓しようとする研究は近年余り活発には行われていないのが現状である。

しかしながら、吸光度法は、測定値をモル吸光係数 (ε) で一義的に説明できる、安価な機器を用いて簡易な操作で信頼しろるデータが比較的高感度に得られるなどの特徴を有し、ハード面では、(1) 吸光度 0.001 を再現性よく測定できる分光光度計が開発されたこと、ソフト面では、(2) 高次錯体生成反応などの新しい方法の開発利用が可能したこと、(3) 高感度、高選択性的新規有機試薬の開発利用が可能したこと、また、(4) フローインジェクション法 (FIA) や自動分析に適用されやすい、(5) 測定結果を目視で確認できる、(6) 化学平衡論的に考察しやすい、(7) 干渉に対して対処しやすい、(8) スペシエーション分析が可能であるなど、極めて多様な特長を有する優れた分析法であることには変わりない¹⁻³⁾。さらに、最近、臨床化学分野などでは、反応容器とセルを兼ね多数のウェルを備え、多数検体を同時に吸光度測定できるマイクロプレート計測法^{4, 5)} やナノテクノロジーを活用した分離・計測技術であるマイクロチップ計測法⁶⁻⁹⁾ が著しく発展してきている。さらに、簡便性、迅速性、経済性などの面で優れたスポットテスト、試験紙法などの目視分析^{10, 11)} も数多く登場しており、吸光度法の守備範囲も広がっている。

2. 吸光度法の感度と有機試薬

吸光度法の感度 ε は、Braude の経験則¹²⁾ $\varepsilon = \kappa P a$ ($\kappa : 10^{20}$ 程度の定数、 P : 遷移確率、 a : 皇色化学種の吸収断面積) より、 a と P に依存する。従って、高感度分析法を設定するためには、この a を可能な限り大きくするか、 P の遷移確率が高い $\pi - \pi^*$ 遷

移を起こしやすい有機試薬を利用することが極めて有効である。 a を大きくするソフト面での一つの方策として、三元錯体(三成分錯体)^{1, 3, 13-17)} の利用、すなわち金属イオン、錯生成剤並びに有機試薬の三者による錯体を生成させる反応系の利用が非常に有利であることが推察される。三元錯体としては、一般に混合配位子錯体、混合金属錯体、混合原子価錯体、イオン会合錯体などに分類されるが、このうち化学分析に広く利用されているのは、混合配位子錯体並びにイオン会合錯体である。

有機試薬は、一般にはキレート試薬とイオン会合試薬に二大別^{1, 18-24)} されるが、高感度有機試薬の条件としては、キノイド構造を形成できる高度に発達した π 電子系(発色団)を持ち、その有効面積が大きく、五・六員環キレートを形成できる位置に塩基性官能基(錯生成基)及び電子供与性基(助色団)を持つなどのほか、高次錯体が生成し易いなどの特徴を有するキサンテン系、トリフェニルメタン系、アゾ系、アントラキノン系、アリザリン系、チアジン系、クマリン系、ポルフィリン系などの色素が汎用されている。

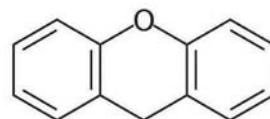


図 1 キサンテン系色素の基本骨格

キサンテン系色素は、図 1 に示すような基本骨格をとるが、本色素群は、(1) キノイド構造(キノノイド型)を形成できる高度に発達した π 電子系を有し、発色団としての有効面積が大きいためモル吸光係数 (ε) が大きい、(2) ベンゼン環が酸素で架橋されているため、酸素自身のもつ共有電子対によって、HOMO エネルギーを増大させるとともに、構造中の $C = O$ などが LUMO エネルギーを減少させ、結果として HOMO-LUMO ギャップが小さくなり、吸収極大波長が長波長にシフトする、(3) 高い水溶性である、(4) 合成が比較的容易である、(5) 生体毒性が少ない、などの優れた特性を持つほか、酸性色素のフルオレセイン誘導体や塩基性色素であるローダミン誘導体に代表されるように、蛍光性を示すものが多く、吸光・蛍光両面からの追跡が可能で、分析化学分野で汎用されているのは勿論のこと、さらにその可能性の拡大を求めて、蛍光イメージング分野^{25, 26)}、医療分野、環境・エネ

ルギー分野などの様々な分野において応用・発展が展開されている非常に興味深い化合物である。

筆者らもキサンテン系、トリフェニルメタン系、アゾ系、アミン系などの有機試薬の利用と分析化学的創案により多くの物質の測定法を開発してきたが、本総説において、これらのうち、筆者らが長年携わってきたキサンテン系、特にフルオロン型キサンテン系色素の吸光度分析への利用について紹介する。

3. フルオロン型キサンテン系色素の合成

3-1. フルオレセインの合成とキレート試薬としてのフルオロン型キサンテン系色素

キサンテン系色素の合成は、1871年Bayer²⁷⁾による無水フタル酸とレゾルシノールに塩化亜鉛を加えて溶融縮合して得られたフルオレセインの合成が基礎となり、それ以来、極めて多数の誘導体が創出されている（図2）。

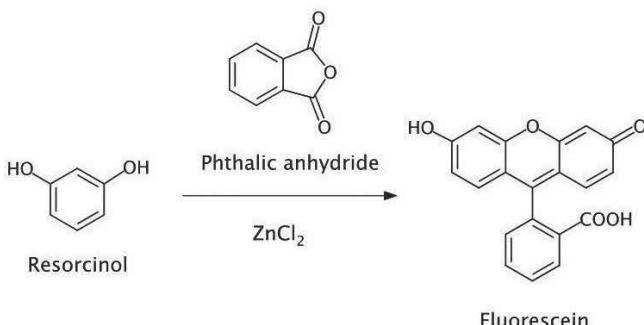


図2 フルオレセインの合成スキーム

一般に、分子骨格中にO、N、Sなどを持つ有機試薬は、それらの非共有電子対を使って金属イオンと配位結合をつくることができるが、特に五・六員環キレートを形成しやすいような分子構造のときはエントロピー増大などのキレート効果によって極めて安定な錯体を形成する。このキレート錯体は、金属イオンと環構造を形成する配位原子によって(O,O)配位、(O,N)配位、(N,N)配位、(O,S)配位、(N,S)配位、(S,S)配位の6つのタイプに分けられ、金属イオンの選択性はこれらの6つのタイプで異なってくるが、(O,O)配位のキレート試薬は、ほとんどすべての金属イオンと反応し、(O,N)配位の試薬も同様の傾向がある。

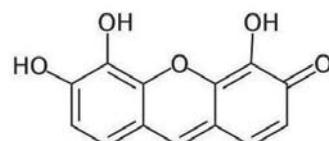
一方、フルオレセインは、その構造上、イオン会合試薬になり得るが、キレート試薬とはいえない。キサンテン系色素にキレート試薬としての機能を持たせるためには、キサンテン環を(O,O)配位のカテコール型（ジオール型）にするのが最も合理的な方法であり、この目的のためには、次の二つのタイプの色素の設計が考えられる。一つは、図3のようなピロガロールレッド（PR）に代表される4,5,6-トリヒドロキサンテン-3-オン型（I型）ともう一つはフェニルフルオロン（PF）で代表される2,6,7-トリヒドロキサンテン-3-オン型（II型、以下フルオロン型とする）である。筆者らもI型及びII型の両方を使用しているが、II型はI型に比べ、吸収極大波長が短波長にシフトするが、蛍光性を有している、塩基性下で安定である、 ε が大きい、合成が比較的容易などの長所があり、有機試薬としての優位性を認めている。本フルオロン型キサンテン系色素も多くの研究者によって合成利用されているが、筆者らは、これまでほとんど利用報告がなかつ

たフルオレセインの2,7位にヒドロキシ基を導入したo-カルボキシフェニルフルオロン（OCPF、当初は、Palatýら^{28, 29)}の命名に従って、o-ヒドロキシヒドロキノンフタレン、QnPhあるいはQPとしていたが、フルオロン型キサンテン系色素の統一名称としてOCPFとした）に着目し、分析化学的利用に着手した。次いで、OCPF以外のフルオロン型キサンテン系色素を系統的に合成し、それらを種々の物質の分析に応用した。

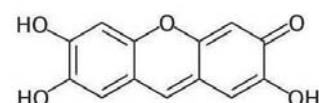
3-2. OCPFの合成

Lieberman³⁰⁾の方法に従って、まず、硫酸存在下、無水酢酸と1,4-ベンゾキノンを30～50°Cで反応させ、1,2,4-ベンゼントリオールトリアセテート（Tri-Ace）を得る³¹⁾。次に得られたTri-Aceと無水フタル酸を無水塩化亜鉛（または硫酸、ベンゼンスルホン酸）存在下、加熱縮合反応させた後、反応物を5%水酸化ナトリウム液で溶解し、濾液に30%酢酸を加えpH 4.0付近に調整した。本液を数週間程度、冷暗所に静置し、沈殿した粗OCPFを濾取した。続いて、メタノール/エタノール/水より、精製OCPFを得た（図4）。

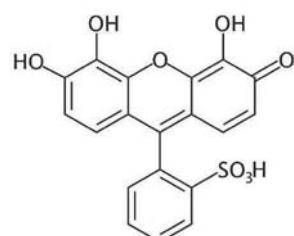
[¹H-NMR(DMSO-d₆, 300 MHz) : δ 9.65(s, 1H), 8.95(s, 1H), 8.18(d, 1H, J = 7.7 Hz), 7.82(t, 1H, J = 7.2 Hz), 7.73(t, 1H, J = 7.2 Hz),



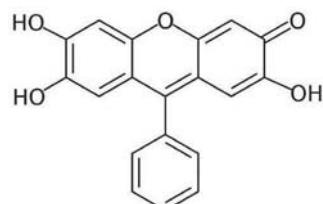
4, 5, 6-トリヒドロキサンテン-3-オン型



2, 6, 7-トリヒドロキサンテン-3-オン型(フルオロン型)



PR



PF

図3 フルオロン型キサンテン系色素

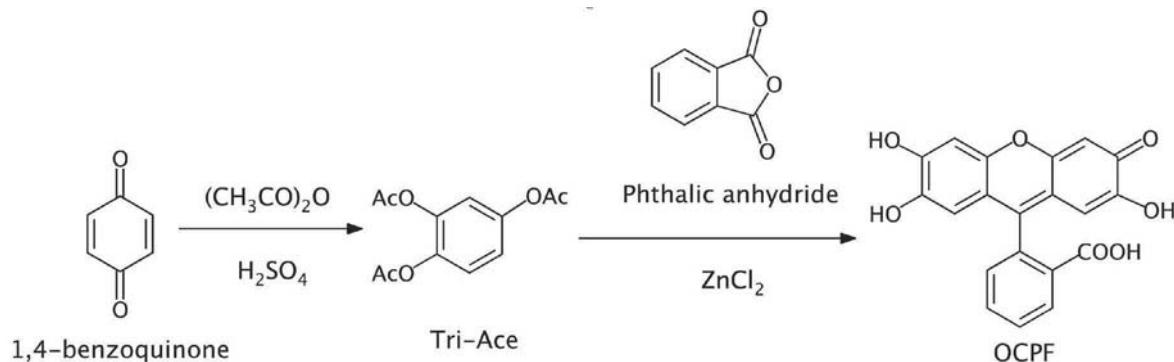


図4 OCPFの合成スキーム

7.42(d, 1H, $J = 7.8$ Hz), 6.65(s, 2H), 6.00(s, 2H)
[HRMS(FAB) calcd for $\text{C}_{20}\text{H}_{13}\text{O}_7$: 365.0661, Found : 365.0659]
IUPAC名: 2' 3' 6' 7' -tetrahydroxyspiro[isobenzofuran-1(3H),9'-[9H]-xanthen]-3-one

3-3. OCPFの結晶構造

キサンテン系色素は、化学プローブとして極めて有用な機能性色素であるが、その構造的知見は、分光学的手法によるものがほとんどで、X線構造解析による分子立体構造の決定は極めて少ない。これは、本色素群の合成における縮合条件によっては副生成物が生じやすい、構造的に互変異性体が存在しやすいなどのため、精製及び結晶化が困難であることが原因となっている。筆者らは最近、OCPFの結晶化に成功した³²⁾ので、その結晶構造を図5

(上)に示す。その結果、OCPFは推測通り、先に報告した *o*-スルホフェニルフルオロン (SPF)³³⁾ 及びフルオレセインナトリウム³⁴⁾と同様に平面構造であるキサンテン環とベンゼン環が単結合した二平面構造を有しており、二平面の角度は $69.22(5)^\circ$ であった。また、キサンテン環に結合している4つのC-O距離は全て等価であり、全てOH基であることが確認できた。また、COOH基のC-O、C=O距離は区別できず、解離して COO^- 型となつており、図5(下)のような構造であることが推定された。

3-4. SPFの合成

Sano³⁵⁾ の方法に従って、3-2の操作で得た Tri-Ace と *o*-ベンズアルデヒドスルホン酸ナトリウムをメタンスルホン酸存在下、エタノール中、還流させながら加熱縮合反応させた後、反応物を5%水酸化ナトリウム液で溶解し、濾液に30%酢酸を加え弱酸性に液性調整した。本液を1週間程度、冷暗所に静置し、沈殿した粗 SPF を濾取した。続いて、メタノール/水より、精製 SPFを得た(図6)。

[¹H-NMR(DMSO-*d*₆, 300 MHz) : 10.2(br, s, 1H), 8.03(dd, 1H, $J = 8.0, 1.2$ Hz), 7.68(td, 1H, $J = 7.6, 1.2$ Hz), 7.60(td, 1H, $J = 7.6, 1.4$ Hz), 7.28(s, 2H), 7.23(dd, 1H, $J = 7.6, 1.1$ Hz), 6.65(s, 2H)].
[HRMS(FAB) calcd for $\text{C}_{19}\text{H}_{13}\text{O}_7\text{S}$: 401.0331, Found : 401.0345]
IUPAC名: [2-(2,6,7-trihydroxy-3-oxo-3H-xanthen-9-yl)benzenesulphonic acid]

3-5. SPFの結晶構造

ジメチルスルホキシド (DMSO)：エタノール(1:1)の混液中で再結晶したところ、X線回折に耐えうる赤色針状結晶として得た。得られた赤色針状結晶のORTEP図を図7に示すが、SPFは、キサンテン環とベンゼン環が $1.492(2)\text{\AA}$ の単結合で結合した二平面構造で、その平面間の角度は $81.08(4)^\circ$ とほぼ直行していた。キサンテン環は2位、3位、6位、7位に4つのOH基を有し、C2-O2、C3-O3、C6-O6、C7-O7の結合距離はそれぞれ、 $1.355(2)$ 、 $1.332(2)$ 、 $1.334(2)$ 、 $1.348(2)\text{\AA}$ で、3つのOH基にそれぞれDMSOが水素結合を形成していた。X線回折の結果から、SPFは、ベンゼンスルホン酸からのプロトン供与により、キサンテン骨格が共鳴構造となっていることが示唆され、フェノールスルホンフタレン³⁶⁾と同様、ラクトン環を形成しないイオン化したスルホ基を持つ双性イオン型であることが証明された。

3-6. その他のフルオロン型キサンテン系色素の合成

OCPF及びSPF以外に合成した主なフルオロン型キサンテン系

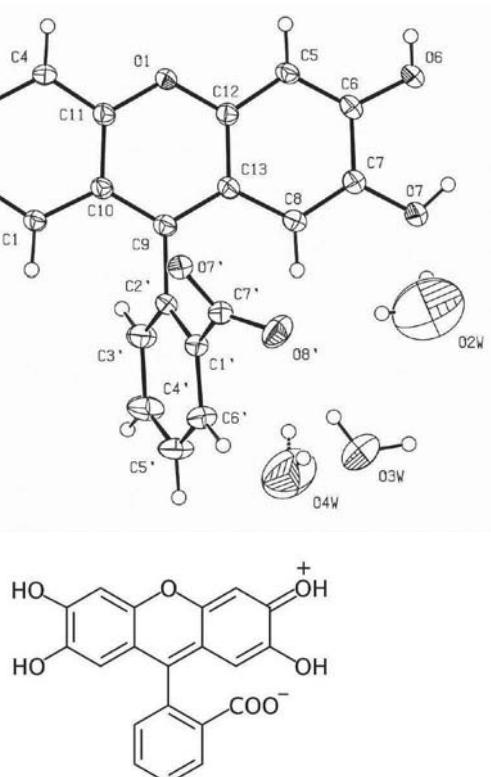


図5 OCPFの結晶構造

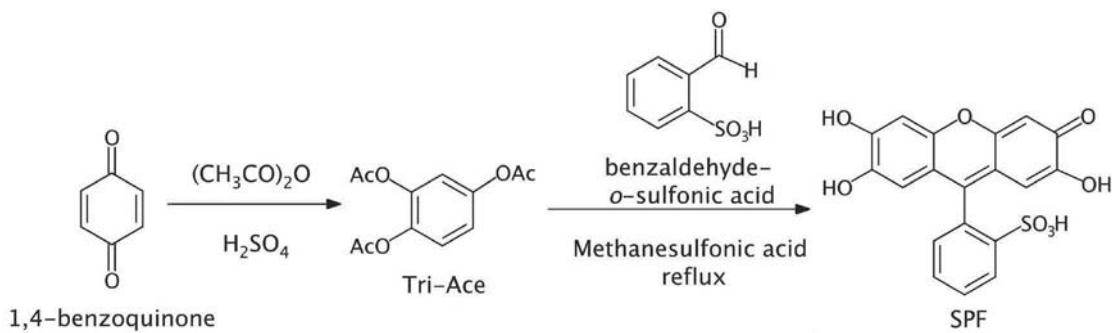


図 6 SPF の合成スキーム

色素を図 8 と表 1 に示す。オルト位(X 位)にカルボキシ基を有する3',4',5',6'-テトラフルオロ-o-カルボキシフェニルフルオロン(TF.CPF)、3',4',5',6'-テラクロロ-o-カルボキシフェニルフルオロン(TCI.CPF)、3',4',5',6'-テトラブロモ-o-カルボキシフェニルフルオロン(TBr.CPF)は、OCPF と同様、該当するテラハロゲン化無水フタル酸と Tri-Ace を加熱縮合反応させることにより得ることができた。4,5-ジブロモ-o-カルボキシフェニルフルオロン(DBr.CPF)は、OCPF を冰酛酸下、臭素との反応により目的の色素を得た。その他のフルオロン型キサンテン系色素のm-カルボキシフェニルフルオロン(MCPF)、p-カルボキシフェニルフルオロン(PCPF)、フェニルフルオロン(PF)、サリチルフルオロン(SF)、o-ブロモフェニルフルオロン(OBPF)、バニリルフルオロン(VF)などは、SPF と同様、Sano の方法により得ることができた。

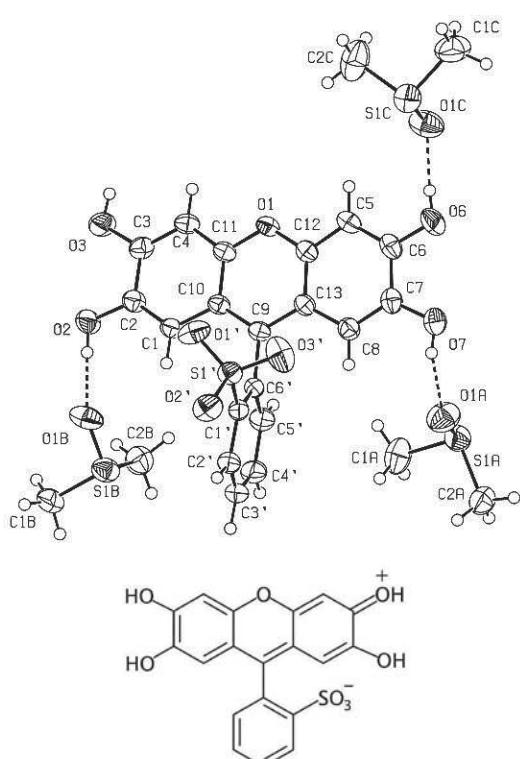


図 7 SPF の結晶構造

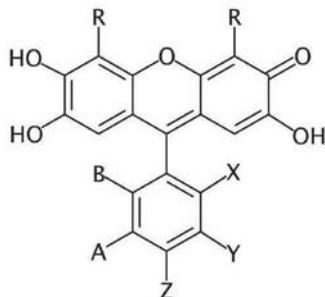


図 8 フルオロン型キサンテン系色素の構造

表 1 各フルオロン型キサンテン系色素の置換基

Dye	X	Y	Z	A	B	R
OCPF	COOH	H	H	H	H	H
SPF	SO ₃ H	H	H	H	H	H
MCPF	H	COOH	H	H	H	H
PCPF	H	H	COOH	H	H	H
PF	H	H	H	H	H	H
SF	OH	H	H	H	H	H
OBPF	Br	H	H	H	H	H
VF	H	OCH ₃	OH	H	H	H
DBr.CPF	COOH	H	H	H	H	Br
TF.CPF	COOH	F	F	F	F	H
TCI.CPF	COOH	Cl	Cl	Cl	Cl	H
TBr.CPF	COOH	Br	Br	Br	Br	H

4. フルオロン型キサンテン系色素の吸光光度分析への応用

4-1. 測定反応系の設計

合成したフルオロン型キサンテン系色素を三元錯体生成反応に用い、さらに界面活性剤により形成されるミセルに取り込まれ水相内で行わせれば、(1) 高次錯体生成に伴う高感度化と呈色錯体

の安定化、(2) 選択性の向上、(3) ミセル界面への濃縮効果による感度の上昇と安定性の増大、(4) ミセル内に生成錯体が取り込まれることによる錯体生成反応の加速、(5) 水溶性呈色錯体の生成に基づく溶媒抽出操作が不要となることによる定量操作の簡略化と再現性の向上、(6) 呈色錯体の水溶液中の沈殿の防止、などの効果が期待でき極めて有効であると考えられる¹⁾。また、フルオロン型キサンテン系色素と金属イオンとの間の呈色錯体生成反応液中に、その金属イオンと錯生成能を有する非金属、有機化合物のような被分析物質を共存させることにより、競合的錯生成反応を起こさせ、その結果としての呈色錯体の退色、すなわち吸光度の減少を利用する分析法の考案も、高次金属錯体生成反応系においては、極めて有効と考えられる。

4-2. 無機化合物の吸光光度分析

有機試薬を用いた金属イオンの吸光光度分析の歴史は古く、今まで多くの分析法³⁷⁻⁴⁰⁾が報告されているが、1970年代より、陽イオン性界面活性剤の第四級アンモニウム塩ミセル界面下に、有機試薬、金属イオン及び第四級アンモニウム塩間の三元錯体生成反応を用いた水相内の金属イオンの高感度で選択性に優れた吸光光度法^{15, 16, 41-45)}が数多く登場した。一般に、陽イオン性界面活性剤と有機試薬を併用すると、呈色錯体の安定化に伴う吸収帯の長波長シフトや、高次錯体生成に伴う吸収強度の増大などの効果が出現する場合が多く、極めて分析化学的に有利となるので、現在も金属イオン定量の主流になっている。筆者らも陽イオン性界面活性剤(あるいは他の界面活性剤との併用による混合ミセル中)を併用して多くの金属、非金属の吸光光度法を開発した。以下に、色素別に分類し、() 内に見かけの(有効)モル吸光係数 ($\text{dm}^3 \text{mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$) とその分析法での主な特徴などを示した。また、↓を付してあるものは、競合的錯生成反応による吸光度の減少を利用した方法である。

金属イオンの定量として、OCPF を用いて、鉄(III) (1.7×10^5 リン酸塩緩衝液⁴⁶⁾、 1.2×10^5 サポニン共存下⁴⁷⁾、 1.2×10^5 メンブランフィルター捕集法⁴⁸⁾) あるいは総鉄イオン⁴⁹⁾ (1.3×10^5 、種々の緩衝液中の OCPF と鉄の組成比/ESR 測定)、アルミニウム(III) (1.3×10^5 リン酸塩緩衝液⁴⁶⁾、 2.1×10^5 混合ミセル中⁵⁰⁾)、スズ(IV)⁵¹⁾ (8.2×10^4)、銅(II)⁵²⁾ (1.6×10^5)、モリブデン(VI)⁵³⁾ (1.3×10^5)、ウラン(VI)⁵⁴⁾ (9.4×10^4 、OCPF の酸解離指数)、パラジウム(II)⁵⁵⁾ (1.0×10^6 低濃度陽イオン性界面活性剤共存下)、クロム(VI)⁵⁶⁾ (1.6×10^5)、マンガン(II)⁵⁷⁾ (1.4×10^5)、チタン(IV) (1.9×10^5 非イオン性界面活性剤共存下⁵⁸⁾)、 3.1×10^5 過酸化水素共存下⁵⁹⁾、 2.2×10^5 、強酸性下での OCPF の酸解離平衡/OCPF と Ti の反応速度定数/安定度定数/反応機構⁶⁰⁾、ハフニウム(IV)⁶¹⁾ (1.2×10^5 、F⁻共存下)、ゲルマニウム(IV)⁶²⁾ (1.7×10^5)、インジウム(III)⁶³⁾ (1.3×10^5)、スカンジウム(III)⁶⁴⁾ (1.0×10^5)、バナジウム⁶⁵⁾ (8.7×10^4 アスコルビン酸共存下)、ガリウム(III)⁶⁶⁾ (1.5×10^5 混合ミセル中)、コバルト(II)⁶⁷⁾ ($\downarrow 4.2 \times 10^8$ 、H₂O₂ 共存下/混合ミセル中)、ビスマス(III)⁶⁸⁾ (9.0×10^4)、亜鉛(II)⁶⁹⁾ (9.2×10^4 キトサン共存下)、ニッケル(II)⁷⁰⁾ (9.0×10^4 混合ミセル中)、ロジウム(III)⁷¹⁾ (7.3×10^5 三次微分法)、タンタル(V)⁷²⁾ (1.0×10^5)、タンタル(V) およびニオブ(V)⁷³⁾ (2.2×10^5 、 2.0×10^5 混合ミセル中/分離定量)、ガドリニウム(III)⁷⁴⁾ (1.2×10^5 混合ミセル中)の分析法を開発した。

SPF を用いて、パラジウム(II)⁷⁵⁾ (1.2×10^5)、ゲルマニウム(IV)⁷⁶⁾ (1.7×10^5 、有機ゲルマニウムも定量)、VF を用いて、アンチモン(V)⁷⁷⁾ (5.0×10^4)、コバルト(II)⁷⁸⁾ (1.3×10^5)、シアノコバ

ラミンも定量)、MCPF を用いて、アルミニウム(III)⁷⁹⁾ (1.7×10^5 、汚染の改善と再現性検討)、SF を用いて、ジルコニウム(IV)⁸⁰⁾ (1.7×10^5 F⁻共存下)、OBPF を用いて、銅(II)⁸¹⁾ (3.6×10^5)を定量した。

非金属の定量として、OCPF と銅(II)を用いる CN⁻(↓)⁵²⁾、SF とジルコニウム(IV)を用いる F⁻⁸⁰⁾ (2.1×10^5)、OCPF と鉄(III)を用いるリン酸イオン⁸²⁾ (2.5×10^5)、SPF とチタン(IV)を用いる H₂O₂⁸³⁾ ($\downarrow 1.9 \times 10^5$ 、EDTA 共存下)、OCPF とチタン(IV)を用いる H₂O₂⁸⁴⁾ ($\downarrow 2.3 \times 10^5$ 、EDTA 共存下/尿酸及びグルコースも定量)。

4-3. 有機化合物の吸光光度分析

生体成分や医薬品などの有機化合物の吸光光度法⁸⁵⁻⁸⁹⁾としては、有機試薬との共有結合で生成する呈色体を利用する方法、被分析物質の酸化還元能を利用する方法、被分析物質の錯生成能を利用する方法など³⁾ が従来より利用されているが、錯生成能を利用する吸光光度法には、単に金属イオンあるいは有機試薬などの錯生成剤との反応により生成する二元錯体の吸光度測定による方法が用いられていた。生体成分や医薬品などの有機化合物は、生理活性を示すものが多く、その分子骨格中には、O、N、Sなどを持つので、その非共有電子対を使って金属イオンと配位結合をつくることができる所以、有機試薬、金属イオン及び有機化合物の三者間での三元錯体が生成すると考えられるが、三元錯体生成反応を利用した有機化合物の分析法、すなわち有機試薬(錯生成剤)と金属イオンを併用した定量法としては、原子吸光度法⁹⁰⁾が知られているのみで、生成する三元錯体の吸光度測定による方法は報告されていなかった。また、前述したように、錯生成能を有する有機化合物と有機試薬の金属イオンとの競合的錯生成反応の結果である吸光度の減少を利用する方法も非常に有効であると考えられる。

本三元錯体生成反応あるいは競合的錯生成反応がおこり得るか否かは、使用する錯生成剤あるいは被分析物質中の錯生成基の性質、並びに使用する金属イオンの特性、すなわち、配位基の塩基性、金属イオンの電荷、イオン半径、配位数、電子配置、生成する錯体の大きさと構造など、種々の重要な因子の総合的な効果により左右される^{1, 90-94)}ので、どのような反応が起るかを予測して反応系を設計することは困難な場合が多いが、被分析物質の構造、錯生成能、HSAB 則^{95, 96)}、Irving-Williams 序列⁹⁷⁾、Mellor-Malley 序列⁹⁸⁾などを考慮して金属イオンを選択し、有機試薬との組み合わせにより、かなりの程度の反応の予測も可能であると考えられる。また、錯生成剤として用いる有機試薬は、必然的に金属イオンに対し高感度を示すものが有利と考えられるので、フルオロン型キサンテン系色素を中心に検討した。以下に、開発した医薬品、生体成分の吸光光度分析について、色素別に、色素と金属イオンの組み合わせを記載し、() 内に見かけの(有効)モル吸光係数 ($\text{dm}^3 \text{mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$) とその分析法での主な特徴などを示した。また、↓を付してあるものは、競合的錯生成反応による吸光度の減少を利用した方法である。

OCPF とウラン(VI)を用いて、チアミン⁹⁹⁾ (4.9×10^4)、パパベリン¹⁰⁰⁾ (4.7×10^4)、レセルビン¹⁰¹⁾ (6.8×10^4)、ネオマシン及びトブラマイシン¹⁰²⁾ (1.3×10^5 、 1.2×10^5)、ゲンタマイシン¹⁰³⁾ (4.2×10^5 メンブランフィルター捕集法)、OCPF とパラジウム(II)を用いるセファレキシン及びアンピシリン¹⁰⁴⁾ ($\downarrow 2.4 \times 10^5$ 、 2.9×10^5)、チオ尿素¹⁰⁵⁾ ($\downarrow 3.6 \times 10^5$)、クレアチニン¹⁰⁶⁾ ($\downarrow 2.3 \times 10^5$)、5-ヨードウラシル¹⁰⁷⁾ ($\downarrow 1.1 \times 10^5$)、イソニアジド¹⁰⁸⁾

($\downarrow 6.2 \times 10^5$, 低濃度陽イオン性界面活性剤共存下)、グルコサミン¹⁰⁹⁾ ($\downarrow 8.4 \times 10^5$, アミノ糖類)、尿酸¹¹⁰⁾ ($\downarrow 6.5 \times 10^5$)、ファモチジン¹¹¹⁾ ($\downarrow 6.3 \times 10^5$, グアニジノ基含有薬物)、クロルプロマジン¹¹²⁾ (2.2×10^4)、OCPFとマンガン(II)を用いるストレプトマイシン¹¹³⁾ (2.4×10^5)、マレイン酸クロルフェニラミン¹¹⁴⁾ (6.5×10^4 , F⁻共存下)、塩化セチルピリジニウム¹¹⁵⁾ (3.8×10^4 , 長鎖第四級アンモニウム塩)、クロルヘキシジン¹¹⁶⁾ (5.9×10^4 , 疎水性相互作用/熱力学的パラメーター)、スペルミン¹¹⁷⁾ (1.4×10^5 , アセチルスペルミンも定量/FIAも検討)、OCPFとジルコニウム(IV)を用いる塩化ツボクラリン¹¹⁸⁾ (3.0×10^4 , F⁻共存下)、ミノサイクリン¹¹⁹⁾ (5.5×10^4 , F⁻共存下)、ペルベリン¹²⁰⁾ (4.2×10^4 , F⁻共存下)、OCPFと銅(II)を用いるスペルミン¹²¹⁾ (7.0×10^5)、インスリン¹²²⁾ (8.2×10^4)、OCPFとセリウム(IV)を用いるスルピリン¹²³⁾ ($\downarrow 1.2 \times 10^5$)、OCPFと鉄(III)を用いるアデノシン三リン酸¹²⁴⁾ (1.1×10^6 , 有機リン化合物)、クエン酸¹²⁵⁾ (3.2×10^5 , 種々の食品中)、ナリジクス酸¹²⁶⁾ (1.2×10^5 , ピリドンカルボン酸)、ヘパリン¹²⁷⁾ (4.6×10^6 , ムコ多糖類)を定量した。

SPFとウラン(VI)を用いるヒト血清アルブミン¹²⁸⁾ (以下HSA, 1.6×10^6 , HSAと γ -グロブリンの呈色差が小)、SPFとチタン(IV)を用いるHSA¹²⁹⁾ (3.4×10^6 , 結合パラメーター/熱力学的パラメーター)、総タンパク質¹³⁰⁾ (5.2×10^6 HSA)、塩化リゾチーム¹³¹⁾ (8.3×10^5)、SPFと鉄(III)を用いるグリチルリチン¹³²⁾ (8.3×10^5)、SPFとニオブ(V)/ビスマス(III)を用いるHSA¹³³⁾ (5.2×10^6)、SPFとモリブデン(VI)を用いるクロルプロマジン¹³⁴⁾ (4.6×10^4)、SPFと銅(II)を用いるキニーネ¹³⁵⁾ (2.0×10^5 , サーキュラミズム)、SPFとニオブ(V)を用いるHSA¹³⁶⁾ (1.7×10^6 , 目視法も検討)、SPFとガリウム(III)を用いるクロルプロマジン¹³⁷⁾ (1.2×10^5)、SPFとマンガン(II)を用いるポリリジン¹³⁸⁾ (4.2×10^6 , 塩基性ボリアミノ酸)、DBr.CPFとアルミニウム(III)を用いる β -フェニルピリビン酸¹³⁹⁾ (8.4×10^4 , ケト酸・ヒドロキシ酸)、PFと鉄(III)を用いるノルエピネフリン¹⁴⁰⁾ (1.7×10^5 , 力テコールアミン)の定量法を開発した。

TCI.CPFとマンガン(II)を用いるプロタミン¹⁴¹⁾ (3.6×10^5 , 塩基性タンパク質)、PCPFとチタン(IV)を用いるEDTA¹⁴²⁾ ($\downarrow 2.5 \times 10^5$ H₂O₂共存下, アミノボリカルボン酸類)、PCPFとチタン(IV)を用いるミノサイクリン¹⁴³⁾ (1.2×10^5)、PCPFと鉄(III)を用いるアスコルビン酸¹⁴⁴⁾ (2.1×10^6 , 陽イオン性界面活性剤のcmc/呈色反応機構)、TF.CPFとマンガン(II)を用いるヒストン(9.0×10^5 DNA結合タンパク質¹⁴⁵⁾, 9.2×10^6 メンプランフィルター捕集法/色彩色差法¹⁴⁶⁾)などの医薬品、生体成分の定量法を開発した。

5. その他の吸光光度分析と蛍光光度分析への利用

その他、フルオロン型キサンテン系色素以外の色素を利用した吸光光度分析について、特筆すべきものを列挙する。

キレート試薬としての4,5,6-トリヒドロキサンテン-3-オノン型キサンテン系色素として、PRとモリブデン(VI)を用いるHSA¹⁴⁷⁻¹⁴⁹⁾ (1.4×10^6 , 現在の臨床現場での尿タンパク質定量法の標準法として確立)、NO₂⁻¹⁵⁰⁾ ($\downarrow 1.0 \times 10^5$, 分析化学若手初論文賞)、キレート試薬としてのトリフェニルメタン系色素のピロカーテコールバイオレットとスズ(IV)を用いるHSA¹⁵¹⁾ (3.0×10^6)、クロムアズロールBとベリリウム(II)を用いるHSA¹⁵²⁾ (3.8×10^6 , FIAも検討)、キシレノールオレンジとジルコニウム(IV)を用いる

HSA¹⁵³⁾ ($\downarrow 8.4 \times 10^7$, HSAに極めて特異的)を定量した。

イオン会合試薬としてのフルオレセイン誘導体のエオシンと銀(I)を用いるアデニン (1.1×10^5 アデニンに特異的¹⁵⁴⁾, 3.0×10^5 メンプランフィルター捕集法¹⁵⁵⁾, 色彩色差法も検討/イオン会合錯体/熱力学的パラメーター/走査型電子顕微鏡写真)、エオシンとアデニンを用いる銀(I)¹⁵⁶⁾ (1.1×10^5 , 三次微分法も検討/イオン会合錯体/熱力学的パラメーター)、エオシンと銀(I)及びアデニンを用いるメルカプトプリン¹⁵⁷⁾ ($\downarrow 3.5 \times 10^5$, 生理活性チオール類)、エオシンとガリウム(III)を用いるミノサイクリン¹⁵⁸⁾ (8.6×10^4 , 1.6×10^7 メンプランフィルター捕集法/色彩色差法も検討/イオン会合錯体/熱力学的パラメーター)、フロキシンとチアミンを用いるパラジウム(II)¹⁵⁹⁾ (1.0×10^5 , メンプランフィルター捕集法/走査型電子顕微鏡写真)の定量法などである。

最後に、フルオロン型キサンテン系色素は蛍光を有するので、本試薬を利用して金属イオンを蛍光光度分析した。文献の記載は割愛するが、定量した金属イオンは、スズ(IV)、バナジウム、ウラン(VI)、タンクステン(VI)、鉄(III)、ジルコニウム(IV)、ガリウム(III)、アルミニウム(III)などでいずれもフルオロン型キサンテン系色素が有している蛍光の消光を利用した方法である。

その他キサンテン系色素関連化合物の蛍光面への利用として、フルオレセインヒドラジド¹⁶⁰⁾ やローダミンBヒドラジド(RBH)¹⁶¹⁾ を用いる活性酸素種の蛍光光度分析、フルオレセインとローダミンの構造的ハイブリッドの蛍光イメージングプローブ Rhodol 化合物(RD)の創出¹⁶²⁾、色素分子の凝集により蛍光が増大するアミノベンゾピロキサンテン系色素などを創出¹⁶³⁾ した。更に、フルオレセイン合成反応過程を利用してアルデヒド類の蛍光光度分析¹⁶⁴⁾、フルオレセイン分解物の2,4-ジヒドロキシベンゾイル安息香酸(2,4-DBA)を利用して¹⁶⁵⁾ したレゾルシノール類の蛍光光度分析などの分析法も開発している(図9)。

6. おわりに

今回、筆者の研究室の主要テーマである「キサンテン系色素の利用研究」のうち、キレート試薬としての優れた特徴を有しているフルオロン型キサンテン系色素の合成と金属イオン、無機物、生体成分、医薬品などの吸光光度分析への応用について記載した。特に、筆者が考案したミセル界面下、有機試薬と金属イオンの両者を用いる生体成分、医薬品の分析法、すなわち三元錯体利用法(場合により四元錯体の生成も考えられる)は、定量感度において ε が 10^5 以上、ときには 10^6 ~ 10^7 に及ぶ極めて高感度を示すものもみられるが、この ε が非常に大きくなる理由の一つは、高分子の被分析物質に対する金属-色素錯体の結合サイト数が極めて大きいことに起因すると考えられる。このことを踏まえると、高感度化を達成するためには、単に呈色化学種の吸収断面積だけでなく、呈色化学種のかさ、すなわち体積も十分考慮することが必要であることが示唆される。また、錯生成能を有する被分析物質とキレート試薬の金属イオンに対する競合的錯生成反応の結果としての呈色化学種の退色、すなわち吸光度の減少を利用する分析法も、金属イオンとキレート試薬が高次錯体を生成する反応系においては、有効モル吸光係数(ε)が著しく大になり、極めて有効であると考えられる。

今後、色素の構造的知見だけでなく、金属-色素錯体、被分析物質-金属-色素三元錯体などの結晶構造からの構造的考察、キサンテン系色素の構造と蛍光性の関連性、ミセル界面下での金属イオンやキサンテン系色素の挙動や反応性の解明など、解決しなければならない課題も多い。また、キサンテン系色素は、基本的

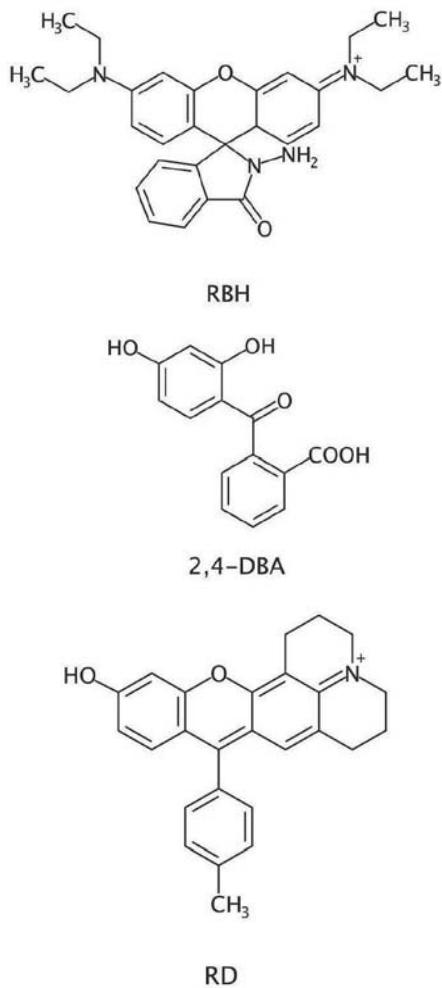


図9 キサンテン系色素の関連化合物

にはヘテロ原子の酸素、窒素を含む共役系有機化合物なので、 π 電子の取り扱いに優れている分子軌道法による電子スペクトル、エネルギー準位、電子密度分布などの情報に基づき、金属錯体の結合の本質、反応性の問題などを解明することが必要である。

本稿で紹介した研究は、故森 逸男大阪薬科大学名誉教授のご支援とご助言のもと、大阪薬科大学薬品分析学教室、第二分析化学教室、臨床化学研究室のスタッフおよび学生の皆さんの協力のもとに行われたものである。この場をお借りして心よりお礼申し上げます。

キサンテン系色素は古くから、種々の面でフルオレセイン誘導体だけでなくローダミン誘導体も度々検討されているが、まだま多く多くの研究課題を残している古くて新しい機能性豊かな魅力ある有機試薬であり、今後さらに「キサンテン系色素の利用研究」が進展していくことを期待したい。

[参考文献]

- 1) 無機応用比色分析編集委員会編、無機応用比色分析 6、共立出版 (1979).
- 2) 四ツ柳隆夫、伊藤純一、化学の領域、**1977**, 31, 56.
- 3) 藤田芳一、ぶんせき、**2008**, 596.
- 4) 堀口高英、間中淳、久保田俊夫、五十嵐淑郎、分析化学、**2005**, 54, 885.
- 5) 間中淳、尾崎佑佳、五十嵐淑郎、分析化学、**2008**, 57, 131.
- 6) 北森武彦、庄司習一、馬場嘉信、藤田博之編、マイクロ化学チップスの技術と応用、丸善 (2004).
- 7) P. Lode, *Clin. Biochem.*, **2005**, 38, 591.
- 8) A. J. DeMello, *Nature*, **2006**, 442, 394.
- 9) 館知也、加地範匡、渡慶次学、馬場嘉信、分析化学、**2007**, 56, 521.
- 10) 吉本敬太郎、金子恵美子、四ツ柳隆夫、分析化学、**2000**, 49, 363.
- 11) 金子恵美子、ぶんせき、**2002**, 562.
- 12) E. A. Braude, *J. Chem. Soc.*, **1950**, 379.
- 13) A. K. Babko, *Talanta*, **1968**, 15, 721.
- 14) T. L. Har and T. S. West, *Anal. Chem.*, **1970**, 43, 136.
- 15) 坂口武一、化学の領域、**1977**, 124.
- 16) 西田宏、ぶんせき、**1977**, 33.
- 17) 山本勝巳、ぶんせき、**1978**, 48.
- 18) 大西寛、化学の領域、**1979**, 34, 65.
- 19) 喜納兼勇、現代化学、**1998**, 12.
- 20) 水本昌二、岩知道正、桐栄恭二、ぶんせき、**1980**, 234.
- 21) 大木道則、田中元治編、岩波講座 現代化学 11 物質の分離と分析 下、岩波出版 (1980).
- 22) 日本分析化学会編、分析化学実験ハンドブック、丸善 (1997).
- 23) 日本分析化学会編、分析化学便覧、丸善 (2001).
- 24) 水本昌二、ぶんせき、**2003**, 734.
- 25) 浦野泰照、化学、**2006**, 61, 23.
- 26) 浦野泰照、化学工業、**2006**, 58, 329.
- 27) A. Baeyer, *Chem. Ber.*, **1871**, 5, 255.
- 28) V. Palaty, *Chem. & Ind.(London)*, **1961**, 18, 211.
- 29) J. Wrbský and J. Fogl, *Collection Czechoslov. Chem. Commun.*, **1970**, 35, 2497.
- 30) C. Lieberman, *Chem. Ber.*, **1901**, 34, 2300.
- 31) J. Thiele, *Chem. Ber.*, **1898**, 31, 1247.
- 32) T. Yamaguchi, M. Hoshino, K. Miyachi, S. Kamino, R. Nakahara, M. Doi, M. Asano, H. Matsumura and Y. Fujita, *Anal. Sci.*, **2016**, 32, x9.
- 33) S. Kamino, M. Doi, T. Yamaguchi, H. Tominaga, E. Amano, S. Umehara, M. Naito, C. Yamazaki and Y. Fujita, *Anal. Sci.*, **2006**, 22, x35.
- 34) K. Yamaguchi, Z. Tamura and M. Maeda, *Acta Cryst.*, **1997**, C53, 284.
- 35) H. Sano, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **1958**, 31, 974.
- 36) H. Kanazawa, K. Senga, Z. Tamura and Y. Ittaka, *Anal. Sci.*, **1994**, 10, 521.
- 37) 無機応用比色分析編集委員会編、無機応用比色分析 1 ~ 6、共立出版 (1979).
- 38) Z. Holzbecher, L. Diviš, M. Král, L. Šúcha and F. Vlachil, *Handbook of Organic Reagents in Inorganic Analysis*, John Wiley & Sons Inc. (1976).
- 39) 日本分析化学会編、分析化学実験ハンドブック、丸善 (1987).
- 40) 日本分析化学会編、分析化学便覧、丸善 (2001).
- 41) 上野景平、分析化学、**1971**, 20, 736.
- 42) 石橋信彦、小原人司、表面、**1971**, 10, 20.
- 43) V. P. Antonovich, M. M. Novoseleva and V. A. Nazarenko, *Zh. Anal. Khim.*, **1984**, 39, 1157. (*J. Anal. Chem. USSR*, **1984**, 39, 917)
- 44) 四ツ柳隆夫、星野仁、五十嵐淑郎、ぶんせき、**1985**, 496.
- 45) Z. Marczenko, *Separation and Spectrophotometric Determination of Elements*, John Wiley & Sons (1976).
- 46) 藤田芳一、森逸男、榎健寿、分析化学、**1975**, 24, 253.
- 47) Y. Fujita, I. Mori, K. Fujita and Y. Nakahashi, *Chem. Pharm. Bull.*, **1988**, 36, 254.
- 48) I. Mori, Y. Fujita, M. Toyoda and M. Kashiwagi, *Fresenius Z. Anal. Chem.*, **1991**, 340, 57.
- 49) M. Hoshino, H. Yasui, H. Sakurai, T. Yamaguchi and Y. Fujita, *Yakugaku Zasshi*, **2011**, 131, 1095.
- 50) I. Mori, Y. Fujita, K. Fujita, T. Tanaka, Y. Nakahashi and Y. Yano, *Eisei Kagaku*, **1987**, 385.
- 51) 森逸男、藤田芳一、榎健寿、分析化学、**1976**, 25, 388.
- 52) 森逸男、藤田芳一、榎健寿、分析化学、**1977**, 26, 480.
- 53) 森逸男、藤田芳一、鎌田吉介、榎健寿、分析化学、**1978**, 27, 259.
- 54) 森逸男、藤田芳一、榎健寿、薬学雑誌、**1978**, 98, 1145.
- 55) 森逸男、藤田芳一、榎健寿、分析化学、**1979**, 28, 685.

- 56) 森 逸男, 藤田芳一, 橋 健寿, 分析化学, **1979**, 28, 707.
- 57) I. Mori, Y. Fujita and K. Sakaguchi, *Bunseki Kagaku*, **1982**, 31, E239.
- 58) I. Mori, Y. Fujita and K. Sakaguchi, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **1982**, 55, 3649.
- 59) I. Mori, Y. Fujita, H. Kawabe, K. Fujita, Y. Koshiyama and T. Tanaka, *Anal. Sci.*, **1985**, 1, 429.
- 60) M. Hoshino, S. Kamino, S. Mitani, M. Asano, T. Yamaguchi and Y. Fujita, *Talanta*, **2011**, 85, 2339.
- 61) 山崎みどり, 森 逸男, 藤田芳一, 北野尚子, 鎌田吉介, 分析化学, **1984**, 33, 170.
- 62) S. Kitano, I. Mori, Y. Fujita and Y. Kamada, *Bunseki Kagaku*, **1984**, 33, E163.
- 63) I. Mori, Y. Fujita, K. Fujita, Y. Koshayama and H. Kawabe, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **1986**, 59, 958.
- 64) I. Mori, Y. Fujita, K. Fujita, A. Usami, H. Kawabe, Y. Koshayama Y and T. Tanaka, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **1986**, 59, 1623.
- 65) I. Mori, Y. Fujita, H. Kawabe, K. Fujita, T. Tanaka, H. Kawabe, Y. Nakahashi and A. Yoshii, *Anal. Lett.*, **1987**, 20, 747.
- 66) I. Mori, Y. Fujita, H. Kawabe, K. Fujita, T. Tanaka, Y. Nakahashi and M. Ilzuka, *Anal. Lett.*, **1988**, 21, 279.
- 67) I. Mori, Y. Fujita, K. Fujita, Y. Nakahashi, Y. Kishada, T. Tanaka and S. Ishihara, *Fresenius Z. Anal. Chem.*, **1988**, 330, 619.
- 68) I. Mori, Y. Fujita, K. Fujita, R. Fujita, Y. Nakahashi and K. Kato, *Talanta*, **1988**, 35, 879.
- 69) Y. Fujita, I. Mori I and M. Toyoda, *Anal. Sci.*, **1990**, 6, 607.
- 70) I. Mori, Y. Fujita, M. Toyoda, A. Obana, M. Nakamura and S. Oka, *Anal. Lett.*, **1990**, 23, 2303.
- 71) Y. Fujita, I. Mori, M. Toyoda and S. Maekubo, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **1991**, 64, 1689.
- 72) I. Mori, Y. Fujita, K. Ikuta, M. Toyoda, C. Fukuda and K. Kato, *Anal. Lett.*, **1991**, 24, 871.
- 73) I. Mori, Y. Fujita, M. Toyoda, S. Kubo, C. Fukuda and K. Kato, *Fresenius J. Anal. Chem.*, **1992**, 342, 80.
- 74) I. Mori, Y. Fujita, M. Toyoda and K. Tanaka, *Anal. Lett.*, **1992**, 25, 2377.
- 75) I. Mori, T. Yabuki, Y. Fujita and T. Matsuo, *Anal. Lett.*, **1996**, 29, 833.
- 76) 富田秀明, 寒川訓明, 浅野麻実子, 山口敬子, 松村人志, 藤田芳一, 分析化学, **2016**, 56, 刊刷中。
- 77) I. Mori, Y. Fujita, M. Toyoda, A. Obana, M. Nakamura and S. Oka, *Talanta*, **1991**, 38, 343.
- 78) M. Hoshino, M. Matsushita, M. Samma, M. Asano, T. Yamaguchi and Y. Fujita, *Chem. Pharm. Bull.*, **2011**, 59, 721.
- 79) S. Kamino, T. Yamaguchi, T. Mori, M. Miyamoto, Y. Kusumi and Y. Fujita, *Anal. Sci.*, **2005**, 21, 1549.
- 80) 清水久実代, 森田好美, 田中久美子, 神野伸一郎, 藤本剛, 山口敬子, 藤田芳一, 分析化学, **2007**, 56, 773.
- 81) T. Yamaguchi, M. Samma, S. Kamino, M. Matsushita, T. Hashimoto and Y. Fujita, *Anal. Sci.*, **2009**, 25, 1457.
- 82) Y. Fujita, I. Mori, S. Kitano, H. Kawabe and Y. Koshayama, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **1985**, 58, 815.
- 83) Y. Fujita, I. Mori and M. Toyoda, *Anal. Sci.*, **1991**, 7, 327.
- 84) Y. Fujita, I. Mori, M. Toyoda and T. Matsuo, *Anal. Sci.*, **1994**, 10, 827.
- 85) F. D. Snell and C. T. Snell, *Colorimetric Methods of Analysis*, Vol. III IV, D. Van Nostrand Co. Inc. (1953).
- 86) F. Feigl, *Spot Tests in Organic Analysis*, Elsevier Pub. Co. (1956).
- 87) M. Pesez and J. Bartos, *Colorimetric and Fluorimetric Analysis of Organic Compounds and Drugs*, Marcel Dekker (1974).
- 88) 坂口武一編, 薬品分析化学, 南江堂 (1971).
- 89) 日本分析化学会編, 薬品分析化学, 丸善 (1971).
- 90) F. Basolo and R. G. Pearson (奥野久輝訳), 無機反応機構—溶液内における金属錯体一, 東京化学同人 (1975).
- 91) 日本分析化学会編, 錯形成反応, 丸善 (1974).
- 92) 山根靖弘, 田中 久, 喜谷喜徳編, 無機生物化学, 南江堂 (1980).
- 93) 上野景平編, キレート化学 (3) 平衡と反応編 I, 南江堂 (1980).
- 94) 山崎一雄, 山寺秀雄編, 無機化学全書別巻 錯体 (下), 丸善 (1981).
- 95) R. G. Pearson, *J. Am. Chem. Soc.*, **1963**, 85, 3533.
- 96) R. G. Pearson, *Science*, **1966**, 151, 172.
- 97) D. H. Irving and J. P. Williams, *Nature*, **1948**, 162, 746.
- 98) D. P. Mellor and L. E. Maley, *Nature*, **1948**, 161, 436.
- 99) 森 逸男, 藤田芳一, 坂口紀美子, 橋 健寿, 分析化学, **1981**, 30, 261.
- 100) I. Mori, Y. Fujita and K. Sakaguchi, *Bunseki Kagaku*, **1982**, 31, E77.
- 101) Y. Fujita, I. Mori and S. Kitano, *Bunseki Kagaku*, **1984**, 33, E195.
- 102) Y. Fujita, I. Mori and S. Kitano, *Chem. Pharm. Bull.*, **1984**, 32, 1214.
- 103) I. Mori, Y. Fujita, K. Fujita, T. Tanaka, H. Kawabe and Y. Koshiyama, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **1986**, 59, 2585.
- 104) I. Mori, Y. Fujita and Sakaguchi, *Chem. Pharm. Bull.*, **1982**, 30, 2599.
- 105) I. Mori, Y. Fujita and S. Kitano, *Bunseki Kagaku*, **1982**, 31, E305.
- 106) I. Mori, Y. Fujita and S. Kitano, *Chem. Pharm. Bull.*, **1983**, 31, 1389.
- 107) Y. Fujita, I. Mori and S. Kitano, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **1983**, 56, 2167.
- 108) Y. Fujita, I. Mori and S. Kitano, *Bunseki Kagaku*, **1983**, 32, E199.
- 109) T. Yamaguchi, M. Inoue, K. Miyachi, H. Tominaga and Y. Fujita, *Anal. Sci.*, **2004**, 20, 387.
- 110) T. Yamaguchi, K. Hasegawa, S. Kamino, K. Miyachi, H. Tominaga and Y. Fujita, *Anal. Sci.*, **2007**, 23, 223.
- 111) 碓野里絵, 黒川央, 須崎菜穂子, 富田真由, 加地真也, 山口敬子, 藤田芳一, 分析化学, **2009**, 58, 715.
- 112) I. Mori, Y. Fujita and S. Kitano, *Bunseki Kagaku*, **1983**, 32, E1.
- 113) Y. Fujita, I. Mori and S. Kitano, *Chem. Pharm. Bull.*, **1983**, 31, 1289.
- 114) Y. Fujita, I. Mori and S. Kitano, *Bunseki Kagaku*, **1983**, 32, E327.
- 115) Y. Fujita, I. Mori and K. Fujita K, *Anal. Sci.*, **1985**, 1, 815.
- 116) Y. Fujita, I. Mori and M. Toyoda, *Anal. Sci.*, **1990**, 6, 807.
- 117) K. Miyachi, K. Moriyama, T. Yamaguchi, H. Tominaga, S. Kamino and Y. Fujita, *Anal. Sci.*, **2007**, 23, 1103.
- 118) Y. Fujita, I. Mori, S. Kitano and Y. Kamada, *Bunseki Kagaku*, **1983**, 32, E375.
- 119) Y. Fujita, I. Mori and S. Kitano, *Chem. Pharm. Bull.*, **1983**, 31, 4016.
- 120) Y. Fujita, I. Mori, S. Kitano and Y. Kamada, *Bunseki Kagaku*, **1984**, 33, E445.
- 121) Y. Fujita, I. Mori, S. Kitano and Y. Kamada, *Bunseki Kagaku*, **1984**, 33, E103.
- 122) 内藤雅人, 中島寛人, 大木正伸, 神野伸一郎, 山口敬子, 藤田芳一, 分析化学, **2007**, 56, 781.
- 123) I. Mori, Y. Fujita and S. Kitano, *Bunseki Kagaku*, **1984**, 33, E383.
- 124) I. Mori, Y. Fujita, K. Fujita, Y. Koshiyama and H. Kawabe, *Chem. Pharm. Bull.*, **1986**, 34, 2236.
- 125) I. Mori, Y. Fujita, K. Fujita and T. Tanaka T, *Eisei Kagaku*, **1987**, 33, 56.
- 126) I. Mori, Y. Fujita, K. Fujita and T. Tanaka, *Chem. Pharm. Bull.*, **1987**, 35, 865.
- 127) 好田稔規, 玉木冴子, 宮地加奈子, 森山健三, 森本茂文, 山口敬子, 藤田芳一, 分析化学, **2010**, 59, 873.
- 128) Y. Fujita, I. Mori, M. Toyoda, K. Kato, M. Nakamura and T. Nakanishi, *Chem. Pharm. Bull.*, **1990**, 38, 956.
- 129) Y. Fujita, I. Mori and M. Toyoda, *Anal. Sci.*, **1991**, 7(Suppl), 771.
- 130) Y. Fujita, I. Mori, M. Toyoda and T. Matsuo, *Anal. Sci.*, **1997**, 13, 513.
- 131) 内藤みつる, 森 逸男, 松尾敬子, 藤田芳一, 分析化学, **1997**, 46, 1003.
- 132) Y. Fujita, I. Mori, M. Toyoda and T. Matsuo, *Anal. Sci.*, **1996**, 12, 115.
- 133) T. Yamaguchi, E. Amano, S. Kamino, S. Umehara, C. Yanaihara and Y. Fujita, *Anal. Sci.*, **2005**, 21, 1237.
- 134) 山崎智香子, 須崎菜穂子, 中尾昌弘, 神野伸一郎, 山口敬子, 藤田芳一, 分析化学, **2006**, 55, 733.
- 135) 山崎智香子, 臣永宏, 三馬女久美, 碓野里絵, 神野伸一郎, 山口敬子, 藤田芳一, 分析化学, **2007**, 56, 879.
- 136) 桦井友梨奈, 坂井暖菜, 川上由莉恵, 神野信一郎, 山口敬子, 藤田芳一, 分析化学, **2008**, 57, 637.
- 137) 須崎菜穂子, 加地真也, 宮地加奈子, 森山健三, 神野伸一郎, 山口敬子, 藤田芳一, 分析化学, **2010**, 59, 727.
- 138) 加地真也, 富田真由, 星野満, 神野伸一郎, 浅野麻実子, 山口敬子, 藤田芳一, 分析化学, **2011**, 60, 619.

- 139) Y. Fujita, I. Mori, S. Kitano and Y. Koshiyama, *Chem. Pharm. Bull.*, **1985**, 33, 242.
 140) Y. Fujita, I. Mori, K. Fujita, S. Kitano and T. Tanaka, *Chem. Pharm. Bull.*, **1985**, 33, 5385.
 141) Y. Fujita, I. Mori and M. Toyoda, *Anal. Sci.*, **1992**, 8, 693.
 142) Y. Fujita, I. Mori, M. Toyoda and T. Matsuo, *Anal. Sci.*, **1998**, 14, 1157.
 143) 星野 満, 森 逸男, 本松未帆, 中谷健三, 山口敬子, 藤田芳一, 分析化学, **2001**, 50, 547.
 144) Y. Fujita, I. Mori, T. Matsuo, M. Hoshino, Y. Shigemura and M. Shimano, *Anal. Sci.*, **2001**, 17, 853.
 145) H. Kadobayashi, T. Nakamori, T. Yamaguchi and Y. Fujita, *Chem. Lett.*, **2004**, 33, 610.
 146) 臣永 宏, 門林宏子, 山口敬子, 神野伸一郎, 西村美智子, 藤田芳一, 分析化学, **2006**, 55, 127.
 147) Y. Fujita, I. Mori, S. Kitano and Y. Kamada, *Bunseki Kagaku*, **1983**, 32, E379.
 148) 藤田芳一, *ぶんせき*, **1997**, 486.
 149) Y. Fujita, *ICMR Annals*, **2000**, 20, 237.
 150) 池田知穂, 中原良介, 西岡有佳, 黒川央, 山口敬子, 藤田芳一, 分析化学, **2009**, 58, 675.
 151) 藤田芳一, 森 逸男、松尾敬子, 分析化学, **1995**, 44, 733.
 152) Y. Fujita, I. Mori and M. Toyoda, *Anal. Sci.*, **1992**, 8, 313.
 153) K. Miyachi, H. Kurokawa, S. Morimoto, K. Tabuse, M. Asano, T. Yamaguchi and Y. Fujita, *Chem. Lett.*, **2012**, 41, 58.
 154) Y. Fujita, I. Mori, S. Kitano, H. Kawabe and Y. Kamada, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **1984**, 57, 1828.
 155) 西村美智子, 中島 桂, 藤本 剛, 山口敬子, 藤田芳一, 分析化学, **2005**, 54, 761.
 156) Y. Fujita, I. Mori, M. Toyoda and T. Matsuo, *Anal. Sci.*, **1993**, 9, 829.
 157) Y. Fujita, I. Mori and T. Yamaguchi, *Anal. Sci.*, **2002**, 18, 981.
 158) 田中景子, 西岡有佳, 香西佑美, 山口敬子, 藤田芳一, 分析化学, **2008**, 57, 643.
 159) Y. Fujita, I. Mori, M. Toyoda, Y. Nakahashi, K. Ikuta and K. Kato, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **1989**, 62, 3260.
 160) R. Nakahara, T. Fujimoto, M. Doi, K. Morita, T. Yamaguchi and Y. Fujita, *Chem. Pharm. Bull.*, **2008**, 56, 977.
 161) M. Asano, H. Doi, K. Baba, M. Taniguchi, M. Shibano, S. Tanaka, M. Sakaguchi, M. Takaoka, M. Hirata, R. Nakahara, T. Yamaguchi, H. Matsumura and Y. Fujita, *J. Biosci. Bioeng.*, **2014**, 117, 98.
 162) S. K amino, H. Ichikawa, S. Wada, Y. Horio, Y. Usami, T. Yamaguchi, T. Koda, A. Harada, K. Shimanuki, M. Arimoto, M. Doi and Y. Fujita Y, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2008**, 18, 4380.
 163) S. K amino, Y. Horio, S. Komeda, K. Minoura, H. Ichikawa, J. Horigome, A. Tatsumi, S. Kaji, T. Yamaguchi, Y. Usami, S. Hirota, S. Enomoto and Y. Fujita, *Chem. Commun.*, **2010**, 46, 9013.
 164) 太田早苗, 山口敬子, 藤田芳一, 分析化学, **2004**, 53, 959.
 165) 松村有里子, 喜谷勇輝, 中原良介, 神野伸一郎, 加藤貴大, 柏田佑亮, 山口敬子, 藤田芳一, 分析化学, **2009**, 58, 743.

[著者プロフィール]

氏名：藤田 芳一 (Yoshikazu Fujita)

所属：大阪薬科大学、大阪信愛女学院、サエラ薬局、

グラムール美容専門学校

連絡先：〒532-0004 大阪府大阪市淀川区西宮原2-3-35-1511

TEL & FAX : 06-6391-3343

E-mail : fujiyoshikazu5@gmail.com

出身大学：大阪薬科大学

学位：薬学博士

専門分野：分析化学、臨床化学

主な研究テーマ：病態関連物質の分析法の開発とキャラクタリ

ゼーション

開発中 DOJINDO MOLECULAR TECHNOLOGIES, INC.

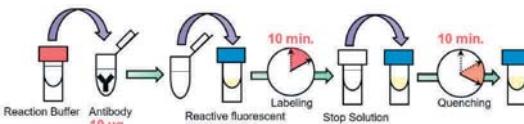
抗体標識キット

Ab-10 Rapid HiLyte Fluor™ 555 Labeling Kit
Ab-10 Rapid HiLyte Fluor™ 647 Labeling Kit
Ab-10 Rapid Biotin Labeling Kit

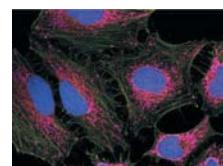
<特長>

1. 少量の抗体を標識
2. 抗体と標識剤を混ぜるだけ
3. 30分以内で標識可能

Ab-10 Rapid Labeling Kitシリーズは、10 µgの抗体に30分以内でビオチンや蛍光色素を標識するためのキットです。本キットに含まれる標識剤は、活性エステルを導入しており、抗体と混合するだけで安定な共有結合を形成します。本キットには標識に必要な全ての試薬が含まれています。



Ab-10 Rapid Labeling Kitによる標識操作



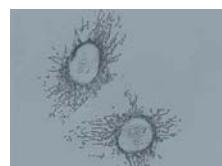
ミトコンドリアおよびアクチ

ンの二重染色像 (HeLa 細胞)

アクチン : HiLyte Fluor™ 555

ミトコンドリア : HiLyte Fluor™ 647

核 : DAPI



ミトコンドリアの DAB 染色像

(HeLa 細胞)

抗ミトコンドリア抗体に Biotin を標

識後、POD 標識ストレプトアビシン

および DAB を用いて染色

関連製品

少量抗体（10 µg）標識用キット

品名	容量	希望納入価格(¥)	メーカーコード
Ab-10 Rapid Fluorescein Labeling Kit	3 samples	24,000	LK32
Ab-10 Rapid Peroxidase Labeling Kit	3 samples	19,000	LK33
Ab-10 Rapid R-Phycoerythrin Labeling Kit	3 samples	28,000	LK34

抗体・タンパク（50-200 µg）標識用キット

品名	容量	希望納入価格(¥)	メーカーコード
Fluorescein Labeling Kit - NH ₂	3 samples	22,200	LK01
HiLyte Fluor™ 555 Labeling Kit - NH ₂	3 samples	22,200	LK14
HiLyte Fluor™ 647 Labeling Kit - NH ₂	3 samples	22,200	LK15
R-Phycoerythrin Labeling Kit - NH ₂	3 samples	45,600	LK23
Allophycocyanin Labeling Kit - NH ₂	3 samples	45,600	LK21
Biotin Labeling Kit - NH ₂	3 samples	12,800	LK03
Alkaline Phosphatase Labeling Kit - NH ₂	3 samples	22,200	LK12
Peroxidase Labeling Kit - NH ₂	3 samples	18,200	LK11

この他にも標識用キットを取り揃えております。

Topics on Chemistry

Cytotoxicity LDH Assay Kit-WST を使用した細胞傷害性試験

株式会社同仁化学研究所 緒方 秀樹

1960 年 Nachlas らにより遊離 LDH（乳酸脱水素酵素）を指標とした細胞傷害性試験が行われて以降、細胞の状態を確認する手法の一つとして LDH アッセイは今なお世界中で論文数は増え続けている（文末の参考図）。様々な研究分野で使用されている LDH アッセイは、主に細胞傷害性の裏付けデータとして測定されている。今回は近年発表されている論文の中から 4 報を紹介する。

Watanabe らは膜たんぱく質であるアクアポリン（AQP）の機能と疾患への関連を研究している¹⁾。AQP は細胞内への水の取り込みに関係していることが知られているが、水以外にもグリセロール、H₂O₂などの低分子も透過させることができ明らかになってきており、細胞の増殖や遊走などにも関与していると考えられている。Watanabe らは、AQP-9 が H₂O₂ の透過に関与していることを確認するため、siRNA により AQP-9 をノックダウンした HepG2 細胞を用い、細胞外から細胞内への H₂O₂ 取り込み抑制については、H₂O₂ 検出蛍光プローブ（CM-H₂DCFDA）によって確認している。その際、H₂O₂ の取り込みが抑制されたことによる細胞傷害性の変化を Cytotoxicity LDH Assay Kit-WST を用いた遊離 LDH の測定によって確認している。コントロール細胞では、H₂O₂ 取り込みにより CM-H₂DCFDA の蛍光が確認され、同時に遊離 LDH の測定により細胞傷害性も確認されている。一方、AQP-9 をノックダウンした細胞では、細胞内で H₂O₂ は確認されず、また細胞傷害性もないことが遊離 LDH 測定による裏付けデータで確認されている（図 1：イメージ）。

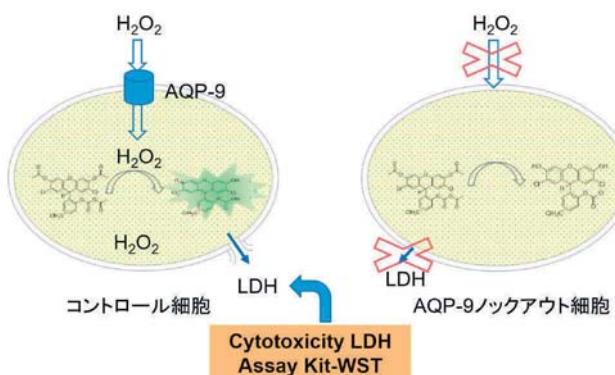
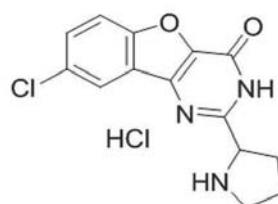
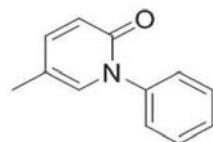


図 1 AQP-9 ノックアウトによる細胞内 H₂O₂ および遊離 LDH の検出イメージ

また、Shu-fang Jin らは突発性肺線維症治療薬として承認されている Pirfenidone（図 2）の作用機序を研究しており、その中で Cell Counting Kit-8 と Cytotoxicity LDH Assay Kit-WST を併用して評価を行っている²⁾。マウス線維芽細胞 C3H10T1/2 における Pirfenidone の抗増殖性および抗線維化作用とキナーゼ阻害剤である XL413（図 2）の Pirfenidone のエンハンサー効果が調査されている。Cell Counting Kit-8 を使用し Pirfenidone 単独よりも XL413 を加えることにより、Pirfenidone の抗増殖性が有意に増強されていることが示された。また、この抗増殖性の増強が XL413 による細胞毒性によるものではないことが Cytotoxicity LDH Assay Kit-WST を用いて確認されている。



Pirfenidone

XL413

図 2 Pirfenidone および XL413 の構造式

これらの研究の他にも Liping Wu らは、初代ヒト上皮細胞（HEECs）を弱酸により刺激し、その際の ATP 放出を調査しているが、その際に ATP の放出だけではなく遊離 LDH の増大がないことを確認している³⁾。

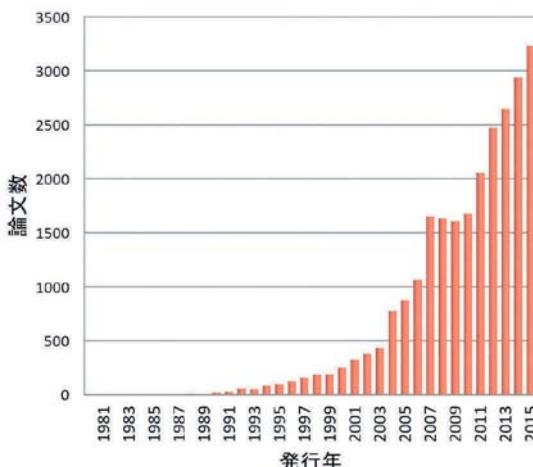
また、Wakatsuki らは、初代培養の神経細胞において 6-hydroxydopamine によってアポトーシスを誘導し、それを確認するマーカーとして、caspase3、annexin V そして遊離 LDH を測定して確認している⁴⁾。

このように細胞傷害性については測定原理の異なる複数の指標を用いることで実験の裏付けを行うことができる。小社でも細胞増殖／細胞毒性測定用の試薬、細胞染色用色素など各種取り揃えており、これらの試薬を組み合わせて使用することで細胞内メカニズムの解明に役立てていただきたい。

[参考文献]

- 1) S. Watanabe, et al., *Biochem. Biophys. Res. Com.*, **2016**, 471, 191.
- 2) S. Jin, et al., *Exp. Cell. Res.*, **2015**, 339, 289.
- 3) L. Wu, et al., *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, **2015**, 309, G695.
- 4) S. Wakatsuki, et al., *J. Cell. Biol.*, **2015**, 211, 881.

[参考図]



遊離 LDH 測定と生細胞測定（MTT 法や WST 法など）を併用した論文数の推移（小社調べ）

DOJINDO MOLECULAR TECHNOLOGIES, INC.

細胞毒性測定 LDH Assay Kit

Cytotoxicity LDH Assay Kit-WST

<特長>

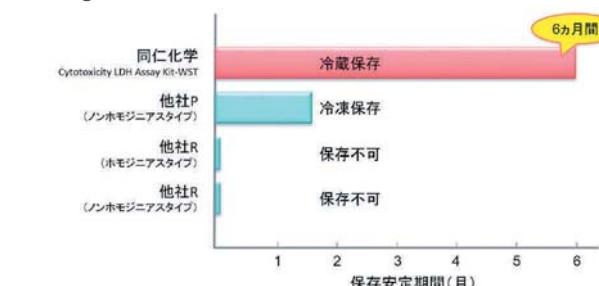
1. 2種の測定法を選択可能
2. 測定毎の溶液調製が不要
3. $[^{51}\text{Cr}]$ リリースアッセイのようなラジオアイソトープは不要

本キットは、生細胞と反応せず、かつ、細胞にダメージを与えないため、生細胞と死細胞が混在する細胞培養液中に直接試薬を加えても細胞傷害を測定することが可能です（ホモジニアスアッセイ）。なお、一般的に用いられる細胞培養液を取り出してLDH活性を測定する方法も可能です（ノンホモジニアスアッセイ）。また、安定性の高い試薬を用いているため、調製した溶液は長期間保存でき、用時調製する必要がありません。そのため、多検体アッセイから、少ない検体数の測定にも対応することができます。

選べる2種の測定方法

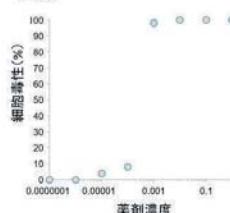


Working solution 調液後の安定性評価

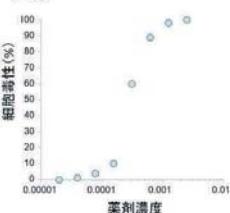


品名	容量	希望納入価格(¥)	メーカーコード
Cytotoxicity LDH Assay Kit-WST	100 tests	9,600	
	500 tests	25,400	CK12
	2000 tests	38,000	

図①

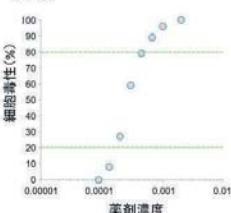


図②



被験物質の濃度設定

図③



新製品 DOJINDO MOLECULAR TECHNOLOGIES, INC.

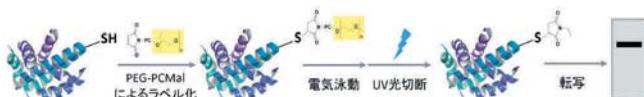
タンパク質チオール数の解析試薬

-SulfoBiotics- PEG-PCMal

<特長>

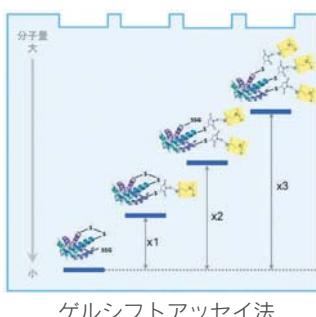
1. タンパク質の SH 基数が目視でわかる
2. ウエスタンプロット時のバンドがクリア
3. 約 5 K のバンドシフト幅で明瞭に SH 基数を判定

タンパク質のチオール修飾は、代表的な翻訳後修飾の一つであり、生体内のレドックス変化に応答して生じます。チオールの翻訳後修飾によるタンパク質の機能制御を理解するためには、個々のチオールの酸化還元状態を検出することが必要不可欠です。



PEG-PCMal の反応原理

PEG-PCMal を用いることによりタンパク質のチオールの数を電気泳動法により可視化することが可能ですが、マレイミド基を有する PEG-PCMal はタンパク質のチオールと結合し、分子量約 5 kDa 増加したバンドとして分離・検出されます。更に、PEG-PCMal は光分解機能を有するため、電気泳動後のゲルに UV 光を照射することで、ラベル化されたタンパク質から切り離されます。そのため、ラベル化する前と同様にウエスタンプロットに適用可能です。



ゲルシフトアッセイ法

品名	容量	希望納入価格(¥)	メーカーコード
-SulfoBiotics- PEG-PCMal	1 mg × 1	8,000	SB20
	1 mg × 10	50,000	

関連製品

初めてタンパク質のレドックス状態を解析される方は下記のキットをお勧め！

-SulfoBiotics- Protein Redox State Monitoring Kit Plus

本キットには標識試薬、反応バッファー、細胞溶解用バッファー等が揃っているため、解析したいタンパク質を準備するだけですぐに標識できます。また標識剤には分子量約 15 kDa の Protein-SHifter Plus を使用しており、PEG-PCMal と同様に光切断可能なためウエスタンプロット解析にも適用できます。

品名	容量	希望納入価格(¥)	メーカーコード
-SulfoBiotics- Protein Redox State Monitoring Kit Plus	5 samples	23,000	SB12
	20 samples	50,000	

本製品は東京工業大学の久堀教授、原助教らにより開発された製品です。

新製品 DOJINDO MOLECULAR TECHNOLOGIES, INC.

チオールを有するタンパク質の回収・解析用試薬

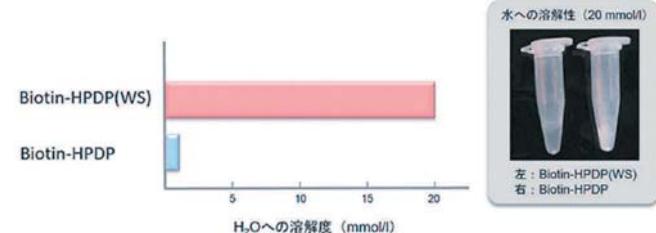
-SulfoBiotics- Biotin-HPDP (WS) solution

<特長>

1. 高い水溶性を実現
2. Biotin switch 法に適用
3. ビオチン標識後の切断が可能

-SulfoBiotics- Biotin-HPDP (WS) solution は、ニトロシル化、スルフヒドリル化、パルミトイル化などのタンパク質チオール修飾の解析法として知られている Biotin switch 法に適用できる試薬です。本品を用いることで Biotin switch 法でタンパク質のスルフヒドリル(SH)基にジスルフィド結合を介してビオチンを導入後、ストレプトアビシン固定化樹脂と還元剤を用いてビオチンラベル化タンパク質を精製することができます。

試薬の溶解性の比較



従来より Biotin switch 法には Biotin-HPDP が汎用されていますが、Biotin-HPDP は溶媒に対する溶解性が非常に低く、有機溶媒を用いて溶解する必要があります。-SulfoBiotics- Biotin-HPDP (WS) solution は、水への溶解性を飛躍的に向上したことで有機溶媒を用いる必要がなく、高い濃度でのビオチン化反応が可能です。本品は 20 mmol/l の水溶液タイプのため希釈混合するだけで使用できます。

品名	容量	希望納入価格(¥)	メーカーコード
-SulfoBiotics- Biotin-HPDP (WS) solution	500 µl	20,000	SB17

開発中 DOJINDO MOLECULAR TECHNOLOGIES, INC.

硫化水素検出用蛍光プローブ

HSip-1

HSip-1 は、硫化水素と反応し強い蛍光 (Ex 491 nm, Em 516 nm) を生じます。またグルタチオンやシステインとは反応しない硫化水素特異的な蛍光色素です。※細胞内イメージング用試薬「HSip-1 DA」も別途開発中です。

本試薬に関するお問い合わせは、info@dojindo.co.jp までご連絡下さい。



左：硫化水素なし
右：硫化水素あり

新製品 DOJINDO MOLECULAR TECHNOLOGIES, INC.

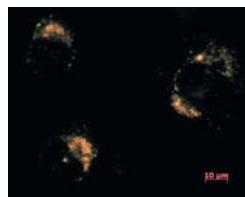
マイトファジー検出蛍光プローブ

Mitophagy Detection Kit

<特長>

1. 低分子蛍光試薬を用いてマイトファジーを簡便に検出
2. 生細胞のミトコンドリアを特異的に染色
3. 共有結合により高い滞留性

マイトファジーは酸化ストレスやDNA損傷等により不良化したミトコンドリアを選択的に除去するシステムです。本キットの蛍光プローブは、細胞内の正常なミトコンドリアに集積し化学結合により固定化され、マイトファジーが誘導されると蛍光が増強し可視化できます。



励起フィルター：550±25 nm
蛍光フィルター：605±35 nm

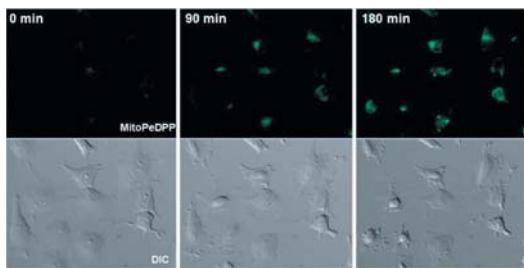
Parkin 発現 HeLa 細胞を用いたマイトファジー染色像
Parkin 発現 HeLa 細胞を用いて carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone (CCCP) によりマイトファジーを誘導。本試薬を生細胞中に添加し、マイトファジーを確認した。

品名	容量	希望納入価格(¥)	メーカーコード
Mitophagy Detection Kit	1 set	36,000	MD01

関連製品

**ミトコンドリア膜脂溶性過酸化物検出蛍光試薬
MitoPeDPP**

MitoPeDPP は、ミトコンドリアに局在化するトリフェニルホスホニウム基を分子内に持つため、細胞膜を透過してミトコンドリアに集積します。ミトコンドリアに集積した MitoPeDPP は、膜中の脂溶性過酸化物によって特異的に酸化され蛍光を発します。酸化 MitoPeDPP の励起および蛍光波長はそれぞれ 452 nm、470 nm で、測定試料への光によるダメージや試料由來の自家蛍光の影響を軽減できることから、蛍光顕微鏡を用いた脂溶性過酸化物のイメージングが可能です。



Rotenone を用いた脂溶性過酸化物の検出例

Rotenone 添加直後（左）、添加 90 分後（中）、添加 180 分後（右）の HeLa 細胞を観察。添加 90 分後より MitoPeDPP により脂溶性過酸化物を検出した。

品名	容量	希望納入価格(¥)	メーカーコード
MitoPeDPP	5 μg × 3	18,000	M466

新製品 DOJINDO MOLECULAR TECHNOLOGIES, INC.

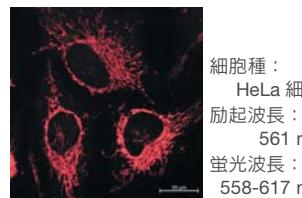
ミトコンドリア染色試薬

**MitoBright Red
MitoBright Deep Red**

<特長>

1. 生細胞のミトコンドリアを特異的に染色
2. ミトコンドリア内での共有結合による高い滞留性
3. 既存ミトコンドリア染色剤との高い相関

MitoBright は生細胞のミトコンドリアを特異的に染色する蛍光試薬です。MitoBright の染色は、ミトコンドリアの膜電位に依存しており、細胞膜透過後正常なミトコンドリアに集積し、蛍光を発します。また、共有結合により固定化することで滞留性が向上しています。



細胞種：
HeLa 細胞
励起波長：
561 nm
蛍光波長：
558-617 nm

MitoBright Red による染色像



細胞種：
HeLa 細胞
励起波長：
640 nm
蛍光波長：
656-700 nm

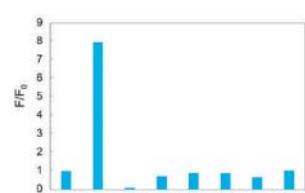
MitoBright Deep Red による染色像

品名	容量	希望納入価格(¥)	メーカーコード
MitoBright Red	50 μg × 3	9,800	MT07
MitoBright Deep Red	50 μg × 3	9,800	MT08

関連製品

**ミトコンドリア局在型一重項酸素検出蛍光プローブ
Si-DMA for Mitochondrial Singlet Oxygen Imaging**

一重項酸素検出試薬 Si-DMA は、silicon rhodamine (SiR) 骨格を蛍光団とし、一重項酸素反応部位としてアントラセンを有した構造を持つ蛍光プローブであり、この Si-DMA は、容易に細胞膜透過しミトコンドリアに集積後、選択的に一重項酸素と反応して強い蛍光を発します。このことから Si-DMA は、ミトコンドリア一重項酸素のリアルタイムイメージングが可能な蛍光色素として今後の研究への応用が期待されます。



品名	容量	希望納入価格(¥)	メーカーコード
Si-DMA for Mitochondrial Singlet Oxygen Imaging	2 μg	20,000	MT05

学会のご案内

第 13 回アジアミトコンドリア学会

第 16 回日本ミトコンドリア学会

期日：2016 年 10 月 30 日（日）～11 月 1 日（火）

会場：TKP ガーデンシティ品川（東京都港区）

展示ブースでお待ちしております。

ぜひ、お立ち寄り下さい。



27th Forum in DOJIN

低酸素応答の光と影

日時 2016.10.28[金]
9:30~17:00(開場9:00)

場所 熊本ホテルキャッスル2F
熊本市中央区城東町4-2

主催 株式会社同仁化学研究所 後援 株式会社ケミカル同仁

Program

9:30~9:35 主催者挨拶 上野 右一郎(株式会社同仁化学研究所)

9:35~9:45 世話人挨拶 山本 哲郎(元熊本大学大学院 生命科学研究部 分子病理学分野)

9:45~10:15 ミニレクチャー

河北 誠(特定医療法人萬生会 熊本第一病院)
「エリスロポエチン物語—純化の歩みと遺伝子クローニングへの道のり—」

Session 1 10:15~11:15 山本 哲郎(元熊本大学大学院 生命科学研究部 分子病理学分野)

10:15~11:15 山本 雅之(東北大大学 医学系研究科 医化学生物)

「エリスロポエチン産生の制御機構」

11:15~12:00 藤田 祐一(名古屋大学大学院 生命農学研究科 植物分子生理学研究分野)

「光合成と窒素固定の酸素パラドックスの統御機構」

12:00~13:30 昼食(株式会社同仁化学研究所「製品紹介」12:30~13:15)

Session 2 13:30~14:15 三隈 将吾(熊本大学大学院 生命科学研究部 環境分子保健学分野)

13:30~14:15 三浦 恭子(北海道大学 遺伝病制御研究所 動物機能医科学研究室)
「低酸素環境に適応した齧歯類「ハダカデバネズミ」の
老化耐性・がん化耐性のメカニズム」

14:15~15:00 魏 范研(熊本大学大学院 生命科学研究部 分子生理学分野)

「RNA修飾による生体機能制御
および酸素応答とのクロストーク」

15:00~15:15 コーヒーブレイク

Session 3 15:15~16:00 富澤 一仁(熊本大学大学院 生命科学研究部 分子生理学分野)

15:15~16:00 原田 浩(京都大学 放射線生物学研究センター ゲノム動態研究部門)

「がん・低酸素・HIF-1」

16:00~16:45 武田 恵彦(東京大学大学院 医学系研究科 循環器内科)

「心血管リモデリングにおける低酸素シグナル」

16:45~17:00 閉会挨拶 富澤 一仁(熊本大学大学院 生命科学研究部 分子生理学分野)

17:00~18:30 ミキサー

参加費
無料
定員
140名

問い合わせ
参加申込先 Tel:0120-489548 Fax:0120-021557 E-mail:info@dojindo.co.jp

Dojindo

ホームページアドレス

URL : <http://www.dojindo.co.jp/>
E-mail : info@dojindo.co.jp

フリーファックス
フリーダイヤル

0120-021557
0120-489548

Dojinニュース No.158 平成28年9月9日発行
株式会社同仁化学研究所 DOJINDO LABORATORIES
熊本県上益城郡益城町田原 2025-5 〒861-2202
発行責任者 満田健一 編集責任者 永田貴裕 年4回発行 許可なくコピーを禁ず