

抗酸化・エクソソーム

—総説—

DPPH 法による抗酸化活性評価

高知大学 島村 智子

細胞外小胞、エクソソームの特性と機能

京都大学 下田 麻子、秋吉 一成

—注目の研究—

食品由来抗酸化成分の生体内活性

株式会社同仁化学研究所 清野 涼

近赤外蛍光色素を用いた内在的エクソソームのラベル化技術

株式会社同仁化学研究所 下村 隆

新製品

抗酸化能測定キット—DPPH ラジカル消去活性 P.5

脂肪滴染色蛍光試薬 P.8

細胞内代謝測定キット P.15

細胞老化検出キット P.16

細胞数補正キット P.16

ミトコンドリア膜電位測定キット P.17

開発中

バイオフィルム検出キット P.7

ミトコンドリア染色蛍光試薬 P.13

エクソソーム染色蛍光試薬 P.14





表紙撮影：熊本県阿蘇市西小園 かぶと岩展望所
photo：永島俊介氏

CONTENTS

Review

DPPH 法による抗酸化活性評価 ●———— [1]

高知大学 島村 智子

細胞外小胞、エクソソームの特性と機能 ●———— [9]

京都大学 下田 麻子、秋吉 一成

Topics on Chemistry

食品由来抗酸化成分の生体内活性 ●———— [4]

株式会社同仁化学研究所 清野 涼

近赤外蛍光色素を用いた内在的エクソソームのラベル化技術 ●—— [14]

株式会社同仁化学研究所 下村 隆

Commercial

抗酸化能測定キットー SOD 様活性 ●———— [6]

血圧上昇抑制効果測定キット ●———— [6]

微生物増殖アッセイキット ●———— [7]

新製品

抗酸化能測定キットー DPPH ラジカル消去活性 ●———— [5]

脂肪滴染色蛍光試薬 ●———— [8]

細胞内代謝測定キット ●———— [15]

細胞老化検出キット ●———— [16]

細胞数補正キット ●———— [16]

ミトコンドリア膜電位測定キット ●———— [17]

開発中

バイオフィルム検出キット ●———— [7]

ミトコンドリア染色蛍光試薬 ●———— [13]

エクソソーム染色蛍光試薬 ●———— [14]

お知らせ

近日出展予定の学会 ●———— [4] [13]

DPPH 法による抗酸化活性評価

Evaluation of Antioxidant Capacity by DPPH Assay



島村 智子

高知大学
農林海洋科学部農芸化学科
准教授

Abstract

So far various assay methods have been reported for the evaluation of antioxidant capacity. These methods are based on a wide variety of measurement principles such as hydrogen atom transfer and single electron transfer. Among various assay methods, we selected the 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH)

assay as the candidate for the standard method to evaluate the antioxidant capacity of natural food additives. In order to prove the applicability of the DPPH assay, an inter-laboratory evaluation was conducted using four types of natural food additives (antioxidant: tea extract, grape seed extract, enju extract, and D- α -tocopherol) and 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid (Trolox) as analytical samples; 14 laboratories participated in this evaluation. This result revealed that the proposed protocol of the DPPH assay showed high repeatability within the same laboratory. In addition, the assay was found to exhibit satisfactory reproducibility on the basis of the RSD ratio (reproducibility relative standard deviation/repeatability relative standard deviation). Thus, it was concluded that the proposed protocol of the DPPH assay is applicable as a standard method to evaluate the antioxidant capacity of natural food additives. We recently proposed the microplate assay kit for the DPPH assay (DPPH Antioxidant Assay Kit) on the basis of the validated protocol. The results obtained from the microplate assay kit were also introduced in this review.

1. はじめに

1.1 抗酸化物質

酸化ストレスの結果生じる活性酸素種をはじめとするフリーラジカルは、生体障害の大きな原因の一つであり、老化や動脈硬化、糖尿病などの生活習慣病、及びその合併症などの発症に密接に関連していることが知られている。一方、生物は活性酸素種やフリーラジカルに対して、優れた防御システムを構築することによって自らを守っている。そのような役割を担うものを総称して抗酸化物質という。我々は様々な抗酸化物質を体内で生産したり、食物から取り入れたりしている。抗酸化物質には、酵素やタンパク質などの高分子化合物やビタミン類やポリフェノール類などの低分子化合物が存在する。一方、食品の場合、食品成分の酸化は色味の悪化、オフフレーバーの発生などの品質劣化の原因となる。特に、不飽和脂肪酸を構成脂肪酸として含む脂質は、加工・調理や長期保存の際に空気中の酸素と接触することによって酸化的劣化（変敗）を生じ、不快な臭い、味の変化、色の変化、粘度の増加などの品質劣化の原因となる。従って、食品の品質管理上、食品成分の酸化による変質を防止し、品質の安定性を向上することを目的に添加される酸化防止剤（抗酸化物質）は非常に重要な役割を果たしている。

1.2 既存添加物の現状

日本国内で使用されている食品添加物は、指定添加物と既存添加物に大別される。指定添加物は、国が安全性・有効性を確認した合成添加物であり、成分含量、あるいは成分組成に基づく規格基準が設定されている。一方、既存添加物は 1995 年の食品衛生法の改正に伴い、経過措置的に使用が認められているものである。しかし、酸化防止剤用途の既存添加物の多くは複数成分が抗酸化力価に関与しており、すべての抗酸化成分の同定、定量を行うことは現実的には困難である。このような既存添加物については成

分含量、あるいは成分組成に基づく規格基準が設定できないことから、品質確保のために主要な成分組成と抗酸化力価の確認の組み合わせにより規格設定することが望ましい。そのため、著者らは厚生労働科学研究費補助金食品の安全確保推進研究「既存添加物の安全性確保のための規格基準設定に関する研究」（平成 26-28 年度）をはじめとする一連の研究¹⁻⁶⁾において、酸化防止剤の抗酸化力価評価に対する標準法の確立を目的とした研究を実施した。

1.3 抗酸化活性評価法の現状

抗酸化活性評価については、多種多様な原理に基づく方法が開発され実際に利用されている⁷⁾。分類としては、HAT (Hydrogen Atom Transfer) 機構と SET (Single Electron Transfer) 機構に大別される。抗酸化物質がフリーラジカルに水素原子を供与することで基質の酸化を抑制する原理を利用するのが HAT 機構であり、代表的な方法として oxygen radical absorption capacity (ORAC) 法や low density lipoprotein (LDL) 酸化法が挙げられる。一方、SET 機構は、抗酸化物質がフリーラジカルや酸化物に 1 電子を供与することで基質を還元するものである。種々のラジカル発生剤と検出プローブの組み合わせが提案されており、代表的な方法として 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) 法 (図 1)、2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid (ABTS) 法、ferric ion reducing antioxidant power (FRAP) 法などが挙げられる。この他に、スーパーオキシドアニオン (O_2^-)、ヒドロキシルラジカル ($\cdot OH$) などの活性酸素種の消去活性を評価する方法も汎用されている。また、抗酸化活性評価においては、反応溶液中に発生させた活性酸素種やフリーラジカルを直接的に分光学的に検出する直接法と、活性酸素種やフリーラジカルと反応するプローブと試料とを競合させる競合法の分類も存在する。直接法の代表例としては電子スピン共鳴 (Electron Spin Resonance: ESR) 法、競合法の代表例としては O_2^- 消去活性測定法の 2-(4-Iodophenyl)-3-(4-



図1 DPPH法原理と室間共同試験に用いた測定手順

nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium, monosodium salt (WST-1) 法などが挙げられる。

2. DPPH 法による酸化防止剤の力価評価

2.1 標準法候補の選定

酸化防止剤用途の既存添加物に対して抗酸化力価に基づく規格基準を導入するためには、標準法の確立が必要であったが、前述の通り抗酸化活性評価法は既に多数報告され実用されている状況にあった。そこで、(1) 過去の研究において使用されてきた実績があること、(2) 短時間での測定が可能であること、(3) 特殊な測定機器を必要としない汎用性の高い分光学的測定法であることの3つの条件を標準法の選定条件とし、ラジカル消去活性測定法であるDPPH法とABTS法、 O_2^- 消去活性測定法であるWST-1法を候補として予備的な室間共同試験等を実施し、その結果を考慮して最終的にDPPH法を標準法の第一候補として選定した¹⁾。

2.2 DPPH 法に関する室間共同試験²⁾

DPPH法はその簡便性から食品の抗酸化活性評価やスクリーニングに広く利用されてきた方法である。それゆえに変法も多く存在し、一定のプロトコールが決定されていない状況にあった。従って、DPPH法を酸化防止剤力価評価の標準法として設定するためには、その目的に対する一定のプロトコールを決定し、妥当性確認（当該分析法が設定した分析の目的を達成できることを科学的に証明すること）を行う必要があった。

そこで、図1に示した測定手順、測定に用いる試薬類、試薬調製手順、測定に用いる機器の性能、データ処理方法などを詳細に記述した標準手順書を作成し、14試験室による室間共同試験を実

施した。本試験では、標準手順書と一緒に既存添加物に分類される酸化防止剤チャ抽出物、ブドウ抽出物、エンジュ抽出物、d- α -トコフェロールと標準物質である6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid (Trolox) を分析試料として各試験室に配布し、DPPH法による抗酸化力価の評価を行った。

抗酸化力価評価終了後に各試験室から報告された測定結果を集約し、解析を行った。統計解析においては、酸化防止剤4品目とTroloxの IC_{50} (50%阻害濃度)、及びTrolox等価活性 (TEAC) について外れ値検定を行った後、併行標準偏差 (S_r)、室間再現標準偏差 (S_R)、併行再現相対標準偏差 (併行条件で繰り返し分析した分析値の相対標準偏差: RSD_r)、室間再現相対標準偏差 (室間再現条件で繰り返し分析した分析値の相対標準偏差: RSD_R) を求めた。表1にTEACに関する解析結果を示した。化学分析に対する室間共同試験の妥当性確認の判断指標の一つとして RSD_r/RSD_R の値が1.5-2であることが報告されている。この判断指標に基づくと、ブドウ種子抽出物を除く3品目の酸化防止剤において良好な室間再現精度が認められた。加えて、本試験で得られたDPPH法による抗酸化力価評価結果は、同一試験室内での再現性が極めて高いことが判明した。このことから、標準手順書に記載したDPPH法のプロトコールは酸化防止剤用途の既存添加物の抗酸化力価評価法として適用可能であると判断した。

2.3 DPPH 法によるチャ抽出物の抗酸化力価評価⁵⁾

先に記した室間共同試験においてDPPH法の妥当性確認を行った。一方、DPPH法で評価した抗酸化力価が酸化防止剤中の有効成分含量を反映し得るか否かは確証がない状況であった。そこで、比較的組成の解明が進んでいるチャ抽出物を用い、主要カテキン類 (カテキン (C)、エピカテキン (EC)、ガロカテキン (GC)、エピガロカテキン (EGC)、カテキンガレート (Cg)、エピカテキンガレート (ECg)、ガロカテキンガレート (GCg)、エピガロカテキンガレート (EGCg)) 含量と抗酸化力価の関係について調べた。チャ抽出物は既存添加物名簿収載品目リストに酸化防止剤、製造用剤として収載されており、既存添加物の中でも加工食品への使用頻度が高く、かつ含有成分 (= 有効成分) の解析や定量法の開発が比較的進んでいるものである^{8, 9)}。一方で、産地や製法の違いにより成分組成が製品間で大きく異なり、成分含量や成分組成を指標とした規格基準設定が困難な品目でもある。

市販のチャ抽出物14品目 (紅茶抽出物1品目、ウーロン茶抽出物1品目を含む) の抗酸化力価とカテキン含量の測定を行ったところ、ウーロン茶抽出物は飽和濃度でも阻害率が50%に達せずTEACを求めることができなかった。一方、その他13品目については抗酸化力価評価が可能であった。また、品目ごとの抗酸化力価、及びカテキン組成は大きく異なることが判明した。次いで、

表1 室間共同試験結果 (TEAC)

	チャ抽出物	ブドウ種子抽出物	エンジュ抽出物	D- α -トコフェロール
試験室数	12 (2) *	14 (0)	14 (0)	14 (0)
平均	2.34	1.77	0.80	0.45
併行標準偏差 (S_r)	0.05	0.04	0.02	0.01
併行再現相対標準偏差 (RSD_r , %)	2.1	2.5	2.5	2.3
室間再現標準偏差 (S_R)	0.09	0.17	0.03	0.02
室間再現相対標準偏差 (RSD_R , %)	3.8	9.3	3.8	3.7
RSD_R / RSD_r	1.8	3.8	1.5	1.6

* : 括弧内の数字は外れ値と判断された試験室数

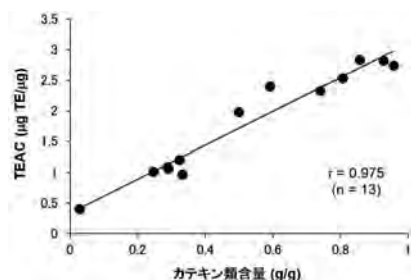


図2 既存添加物チャ抽出物の抗酸化力価と主要カテキン類含量の関係

表2 DPPH法 バッチ法とマイクロプレート法の比較

	TEAC (g TE/g)	
	バッチ法	マイクロプレート法*
緑茶	0.171	0.160
後発酵茶	0.086	0.102
ピーマン	0.007	0.008
パプリカ	0.018	0.019

* : DPPH Antioxidant Assay Kit

抗酸化力価とカテキン類含量の間の相関について調べたところ、両者の間の相関係数は0.975 ($n = 13$)であり、有意な直線性が認められた ($p > 0.001$) (図2)。このことから、DPPH法で求めた抗酸化力価はチャ抽出物中の有効成分含量を反映し得ると判断した。

加えて、カテキン類含量に基づき算出した抗酸化力価の予測値とDPPH法で求めた実測値との関係を調べ、各種カテキン類の抗酸化力価への寄与率を算出した。その結果、EGCgの寄与率が最も高く79%であった。また、本試験で定量を行った8種類のカテキン類の寄与率の合計は90%であった。すなわち、残り10%は主要カテキン類以外の未知成分の寄与があることが判明した。現実的には、残り10%の寄与率を示す有効成分を網羅的に同定、定量することは極めて困難である。本試験結果は、多種な有効成分を含むチャ抽出物の有効成分含量を抗酸化力価として概ね反映可能であることを示したものであり、DPPH法で求めた抗酸化力価の品質規格基準としての有用性を実証するデータとなり得ると考えている。

3. マイクロプレート法への展開

上記の通り、酸化防止剤の抗酸化力価評価の標準法としてDPPH法が有用であることを実証した。図1に示した通り、本法は試験管やマイクロチューブを反応場とするバッチ法である。DPPH法は数ある抗酸化活性評価法の中でも比較的シンプルな原理に基づく簡便な手法であるが、多検体の同時分析を行うにはやや難があることは否めない。そこで、より簡便性と迅速性を追求し、反応系をスケールダウンしたマイクロプレート法 (DPPH Antioxidant Assay Kit) に展開した。本キットでは、煩雑な試薬秤量や吸光度調整の必要がなく、反応試薬の調製に必要な作業はDPPHとTroloxのエタノールへの溶解作業のみとなっている。また、96穴マイクロプレートを反応場とすることにより、多検体の同時測定を可能とした。

本キットを用いて食品試料の抗酸化活性測定を行った結果を表2に示した。バッチ法との比較の結果、本キットで求めたTEAC

はバッチ法と大差なく、再現性にも問題がなかった。従って、本アッセイキットは食品試料の抗酸化活性評価に利用可能であると判断した。

4. おわりに

本稿では、酸化防止剤用途の既存添加物の抗酸化力価評価に対するDPPH法の適用性について検討した一連の研究、ならびにマイクロプレート法への展開について紹介した。前述の通り、抗酸化活性評価法は数多く存在し、DPPH法以外にも食品試料の抗酸化活性評価法としての妥当性確認を終了した分析法も存在する。抗酸化活性評価は食品試料の機能性評価のスクリーニングを行う際に高頻度で実施されるものであるが、分析法の選択の際には、その原理、特徴、適用性、得られた結果の解析方法について十分に理解した上で実施することが必要である。

謝辞

酸化防止剤の力価評価法の確立に関する研究におきましては、国立医薬品食品衛生研究所食品部 穂山浩部長、食品添加物部 杉本直樹室長、多田敦子室長、高知大学 受田浩之教授、九州大学 松井利郎教授、福岡女子大学 石川洋哉教授にご指導賜りました。心より御礼申し上げます。

【参考文献】

- 1) 島村智子, 松浦理太郎, 徳田貴志, 杉本直樹, 山崎壮, 松藤寛, 松井利郎, 松本清, 受田浩之, 食科工, **2007**, 54, 482-487.
- 2) T. Shimamura, Y. Sumikura, T. Yamazaki, A. Tada, T. Kashiwagi, H. Ishikawa, T. Matsui, N. Sugimoto, H. Akiyama and H. Ukeda, *Anal. Sci.*, **2014**, 30, 717-721.
- 3) 山内良子, 深水さやか, 小浜友妃子, 島村智子, 柏木丈弘, 受田浩之, 穂山浩, 松井利郎, 石川洋哉, *日食保蔵誌*, **2014**, 40, 55-63.
- 4) 山内良子, 石井佐弥, 草場悠里, 小林弘司, 島村智子, 受田浩之, 穂山浩, 石川洋哉, *日食保蔵誌*, **2016**, 42, 189-196.
- 5) 島村智子, 伊藤裕才, 久保勇人, 柏木丈弘, 石川洋哉, 松井利郎, 山崎壮, 多田敦子, 杉本直樹, 穂山浩, 受田浩之, *日食化誌*, **2017**, 24, 10-15.
- 6) 草場悠里, 山内良子, 小林弘司, 島村智子, 伊藤裕才, 受田浩之, 穂山浩, 石川洋哉, *日食保蔵誌*, **2018**, 44, 115-124.
- 7) D. Huang, B. Ou and R. L. Prior, *J. Agric. Food Chem.*, **2005**, 53, 1841-1856.
- 8) 厚生省生活衛生局通知 別添1 “既存添加物名簿収載品目リスト” 平成8年5月23日, 衛化第56号, **1996**.
- 9) 消費者庁次長通知 “食品衛生法に基づく添加物の表示等について” 平成22年10月20日, 消食表第377号, **2010**.

【著者プロフィール】

氏名: 島村 智子 (Tomoko Shimamura)
 所属: 高知大学 農林海洋科学部農芸化学科
 〒783-8502 高知県南国市物部乙200
 TEL: 088-864-5193
 E-mail: tomokos@kochi-u.ac.jp
 出身学校: 愛媛大学大学院連合農学研究科
 学位: 博士 (農学)
 専門分野: 食品化学
 現在の研究テーマ: 地域資源の機能性解明

Topics on Chemistry

食品由来抗酸化成分の生体内活性

株式会社同仁化学研究所 清野 涼

高齢化社会に伴い、今日では健康維持・増進を目的とした予防医学的研究、特に生活習慣病と食品に関する研究が盛んに行われている。中でも、生体内で産生される活性酸素種（ROS）を消去できる抗酸化食品（および食品成分）への関心が高まっている。本稿では、食品由来抗酸化成分の細胞および生体内活性に関して紹介する。

ROSは脂質やDNA等の様々な生体内構成成分の酸化・変性（酸化ストレス）を惹起し疾患の発症や健康障害を招くことが知られている^{1, 2, 3, 4)}。食生活の乱れによる肝臓への過剰な脂質の取り込みは酸化ストレスおよびそれに伴う細胞障害を招く。その結果脂肪肝等の肝疾患へと進展する。果実等に含まれるビタミンC（VC）や甲殻類等に含まれるアスタキサンチン（ATX）は共に抗酸化活性を有する食品成分であり、これらが脂肪肝に対して細胞レベルで有効性を示すことが報告されている¹⁾。Yangらはヒト肝がん由来細胞であるHepG2にオレイン酸を投与した脂肪肝細胞モデルを用いて、VC及びATX処置によりROSの減少および細胞障害が抑制されることを明らかにした。驚くべきことに、これら食品由来抗酸化成分はROSの減少のみならず、脂肪酸分解に関与する遺伝子発現を促進することで脂肪滴（中性脂質を多く含む細胞小器官）を減少させることも明らかとなった。

一方、酸化ストレスは血糖値を下げるインスリンの働きを妨げ、糖尿病の発症に促進的に寄与することが知られている。Wangらは抗酸化活性成分ポリフェノールを含む桑の実（*Morus alba* L.）の抽出物が、ストレプトゾトシン誘発糖尿病モデルマウスの血中グルコース量を減少させ、さらに生体内の防御機構である抗酸化酵素であるスーパーオキシドジスムターゼ（SOD）を活性化することを報告している²⁾。同様に、ポリフェノールを含むキマメ（*Cajanus cajan*）抽出物に関してもアロキサン誘発糖尿病モデルラットの血中グルコース量を減少させることが報告されている³⁾。興味深いことに、キマメは抽出方法の違いにより抗酸化活性だけでなく高血圧症に関与するアンジオテンシンⅠ変換酵素（ACE）の阻害活性を示すことから⁴⁾、幅広い生体内活性を有することが示唆された。

このように、食品由来抗酸化成分は様々な生体内活性を有しており、食品機能を評価する際には第一選択として抗酸化活性を評価するケースが多い。一方で、抗酸化活性評価法はこれまでに様々な方法が開発されており、抗酸化活性を正しく評価するために複数の分析手法を用いることが増えてきている。実際、本稿で紹介した食品成分の抗酸化活性は1,1-Diphenyl-1-picrylhydrazyl（DPPH）法を含めた複数手法を用いて評価している例が多く、抗酸化活性を多角的に評価することが重要視されつつある。

本稿では、食品由来抗酸化成分の様々な生体内活性や多角的な抗酸化活性評価の重要性に関して紹介してきた。今後、食品由来抗酸化成分の様々な機能が明らかとなることで、食品が生活習慣病に対する予防医学的アプローチの一つとなることが期待される。

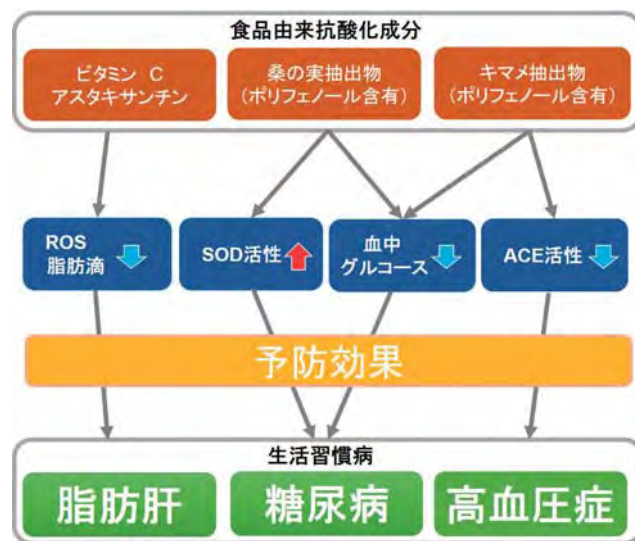


図1 食品由来抗酸化成分の生活習慣病に対する予防効果

[参考文献]

- 1) J.-P. Yang, et al., "Effects of Antioxidants in Reducing Accumulation of Fat in Hepatocyte", *Int. J. Mol. Sci.*, **2018**, *19*, 2563.
- 2) Y. Wang, et al., "Antidiabetic and Antioxidant Effects and Phytochemicals of Mulberry Fruit (*Morus alba* L.) Polyphenol Enhanced Extract", *PLOS ONE*, **2013**, *8*, 7.
- 3) N. N. Uchegbu and C. N. Ishiwu, "Germinated Pigeon Pea (*Cajanus cajan*): a novel diet for lowering oxidative stress and hyperglycemia", *Food Sci. Nutr.*, **2016**, *4* (5), 772-777.
- 4) A. I. Olagunju, et al., "Antioxidant properties, ACE/renin inhibitory activities of pigeon pea hydrolysates and effects on systolic blood pressure of spontaneously hypertensive rats", *Food Sci. Nutr.*, **2018**, *6*, 1879-1889.

近日出展予定の食品分野の学会

食品保蔵科学会

期日：2019年6月22日（土）～23日（日）
会場：中村学園大学（福岡市）

食品科学工学会

期日：2019年8月29日（木）～31日（土）
会場：藤女子大学北16条キャンパス（札幌市）

展示ブースにてお待ちしております。
本学会展示に関する詳細は後日小社HPにてご案内いたします。

新製品

抗酸化能測定キットー DPPH ラジカル消去活性

高知大学の島村らは DPPH (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl) *を用いた施設間差の少ない抗酸化活性測定法を報告しています¹⁾。本製品は、その方法に準拠したマイクロプレートアッセイで、一定品質の試薬をキット化しマニュアル化することで試薬調製の煩雑さを軽減するとともに、データのバラつきを抑えた分析が可能になりました。

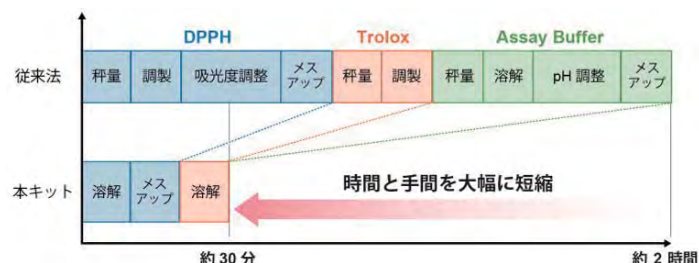
* 総説と Topics on Chemistry の化合物名は 1,1-Diphenyl-1-picrylhydrazyl であり表記が異なりますが、同じ化合物です。

1) T. Shimamura et al., *Anal. Sci.*, **2014**, 30, 717-721.

<試薬の調製手間を削減>

DPPH および Trolox は溶液状態で不安定なため用時調製が必要ですが、測定に大きく影響する DPPH は吸光度による含有確認をしなければならず、溶液調製には時間を要します。本キットでは測定に使用する試薬が小分けされており、短時間で溶液を調製でき、直ぐに実験を開始できます。

* DPPH の溶解操作には超音波洗浄機が必要です。



<操作は試薬の添加だけ>

96 穴マイクロプレートに試薬とサンプルを添加し、30 分間反応するだけの簡単な操作です。



<高い再現性を実現>

これまで施設間差や日間差によるデータの再現性の低さが問題となっていました。本キットでは、試薬品質、プロトコル、解析法を吟味することで、再現性の高いデータを得ることができるようになりました。

一定品質の試薬

測定結果に大きく影響する DPPH の純度と含量を一定品質で提供いたします。

最適化された測定条件

測定時の pH や溶媒が抗酸化能の測定誤差となります。影響因子を排除した最適化マニュアルを用意しました。

標準物質との比較で算出

日間・施設間差の問題を Trolox を基準とした評価 (TEAC) 法により大幅に改善しました。

<施設間差の確認>

3 施設において、本 DPPH 法による抗酸化物質の測定を行いました。実験では、既知の抗酸化物質である没食子酸、カテキン、モリンをサンプルとしてキュベットを用いた分光光度計による測定を行い、Trolox 等価活性値 (TEAC) として算出した結果、施設間で測定値の差は殆どみられませんでした。

施設毎での抗酸化活性の測定

	抗酸化活性 (TEAC : $\mu\text{gTE}/\mu\text{g}$)		
	没食子酸	カテキン	モリン
施設 A	4.52	2.66	1.10
施設 B	3.66	2.45	0.90
施設 C	3.70	1.86	0.90
平均	3.96	2.32	0.97

参照元 : T. Shimamura et al., *NipponShokuhin Kagaku Kogaku Kaishi*, **2007**, 54, 482 - 487.

本製品は、高知大学農林海洋科学部農芸化学科 島村智子先生のご指導の下、製品化しました。

品名	容量	希望納入価格(¥)	メーカーコード
DPPH Antioxidant Assay Kit	100 tests	6,400	D678
	500 tests	19,000	

* 本品 1 セットあたり、100 tests : 1-3 サンプル、500 tests : 8-15 サンプル測定できます。(n = 3、8 段階希釈の場合)

さらに詳しい情報は HP にご案内しております。

DPPH 同仁

検索

抗酸化能測定キットー SOD 様活性

SOD Assay Kit-WST

Superoxide dismutase (SOD) は、生体内に存在する抗酸化酵素であり、活性酸素種 (ROS) の一つであるスーパーオキシド (O_2^-) を消去する働きがあります。本キットは 96 穴マイクロプレートを使い SOD 様活性を簡便に測定することができます。

< 操作 >

96 穴マイクロプレートを用い、サンプル調製から測定まで約 1 時間で完了します。



< 測定例 >



高知大学の島村らは
碓石茶 (ゴイシチャ)
の製造工程毎に SOD
様活性をキットで測定
しています。

参照元: 島村, 日本食品科
学工学会誌, 55(12), 640.

< DPPH 法との比較 >

DPPH ラジカル消去活性と併用することで、異なる指標で抗酸化能を確認することができます。

測定法	原理	反応溶媒	標準物質	特徴
SOD 様活性	系中で発生させた O_2^- と被検物質を反応後、残存する O_2^- を WST-1 により比色測定 (450 nm) する。	水	不要	- 生体内ラジカル (O_2^-) が指標 - 水溶性サンプルに適応 - 還元能のあるサンプルは測定が難しい
DPPH ラジカル消去活性	紫色に吸収のある DPPH ラジカルを被検物質が還元することで、低下する吸光度 (517 nm) を測定する。	水 / エタノール	Trolox	- 食品サンプルの測定報告例が多い - 水溶性の低いサンプルにも適応 - 生体内に存在しないラジカルが指標

・上記内容は、同仁化学研究所の製品概要です。

試しやすい 100 tests 包装を製品ラインナップに追加しました。

品名	容量	希望納入価格(¥)	メーカーコード
SOD Assay Kit-WST	100 tests	8,800	S311
	500 tests	22,900	

本キットを使用した研究報告例を小冊子に掲載しております。

はじめての酸化ストレス 同仁 [検索](#)

血圧上昇抑制効果測定キット

ACE Kit-WST

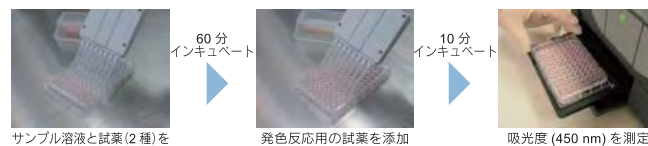
高血圧疾患には、体内酵素「ACE (アンジオテンシン I 変換酵素)」が大きく関与していることが報告されており、ACE の働きを阻害する食品は、血圧上昇を抑える機能性食品として注目されています。本キットは、食品サンプルの血圧上昇抑制効果の有無を簡単に確認することができます。

目的に応じて 2 種類のプロトコルをご用意しております。

目的	未知試料を測定したい	ACE 阻害活性値を測定したい
実験例	ACE 阻害活性の有無の測定 コントロール サンプル ACE 阻害活性の有無を吸光度の低下により確認する。	IC₅₀ の測定 サンプル濃度 サンプルの希釈倍率毎で測定し ACE 活性を 50% 阻害する濃度を算出する。
サンプル数	14 (50 tests), 28 (100 tests)	2 (50 tests), 4 (100 tests)

< 操作 >

試薬を 96 穴マイクロプレートに添加し、吸光度を測定。



品名	容量	希望納入価格(¥)	メーカーコード
ACE Kit-WST	50 tests	38,000	A502
	100 tests	70,000	

微生物増殖アッセイキット

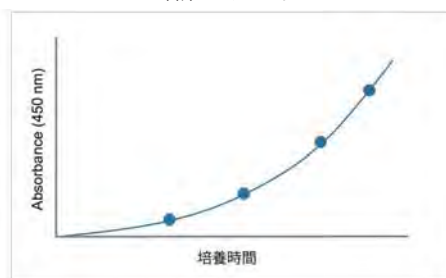
Microbial Viability Assay Kit-WST

微生物はエネルギー代謝活動により細胞内に NAD(P)H を生成します。本キット中の色素 WST-8 は電子メディエーターを介して NAD(P)H により還元され、オレンジ色の水溶性色素 WST-8 ホルマザンとなります。この色素量は微生物のエネルギー代謝活性に比例するため、吸光度を確認することで、その微生物の生存率や活性度合を確認することができます。また液体培地で使用できるため、従来の寒天培地を使った平板培養法に比べ、評価にかかる時間を大幅に短縮することができます。

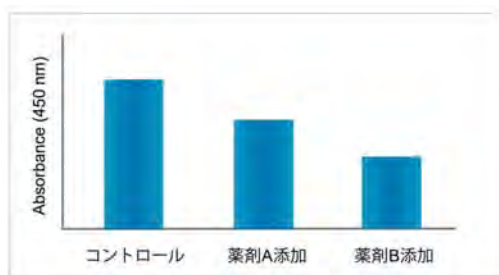
<測定例>

微生物の増殖活性測定や生存率の確認、薬剤感受性試験に応用できます。

増殖アッセイ

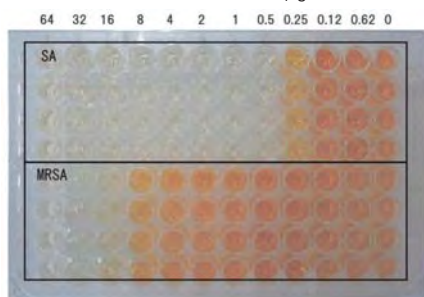


生存への影響を比較



薬剤感受性試験

抗生物質 (Oxacillin) 濃度 (μg/mL)



黄色ブドウ球菌 (SA) およびメチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA) を 96 ウェルプレートに播種後、各濃度に調整した抗生物質を添加しました。6 時間 37℃ でインキュベート後、試薬を添加し更に 2 時間発色反応を行いました。その結果、生存細胞が存在するウェルのみ発色がみられ、目視にて容易に抗生物質の抗菌効果を確認できました。

品名	容量	希望納入価格(¥)	メーカーコード
Microbial Viability Assay Kit-WST	100 tests	6,000	M439
	500 tests	21,300	

<操作>

96 well プレートに菌懸濁液を準備し、試薬を添加するだけで微生物の代謝活性に応じた色素の発色が得られます。



<測定実績のある菌種>

様々な微生物種での測定実績をご紹介します。

微生物種		インキュベート時間	
		1h	4h
Yeast	<i>Candida utilis</i>	5.53×10^7	6.18×10^6
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	8.70×10^5	2.65×10^5
	<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	1.65×10^5	2.47×10^4
Gram-positive bacteria	<i>Bacillus cereus</i>	6.70×10^5	6.77×10^4
	<i>Bacillus subtilis</i>	2.45×10^5	6.71×10^5
	<i>Corynebacterium glutamicum</i>	1.69×10^6	2.47×10^5
	<i>Enterococcus faecalis</i>	5.18×10^7	1.76×10^6
	<i>Lactobacillus casei</i>	8.40×10^7	2.34×10^6
	<i>Listeria monocytogenes</i>	5.07×10^6	6.46×10^5
	<i>Micrococcus luteus</i>	8.29×10^5	1.29×10^5
	<i>Staphylococcus aureus</i>	2.78×10^6	2.71×10^5
	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	5.53×10^6	1.12×10^6
Gram-negative bacteria	<i>Acetobacter sp.</i>	2.53×10^7	7.39×10^6
	<i>Escherichia coli</i>	1.31×10^7	2.86×10^5
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1.76×10^7	5.59×10^5
	<i>Proteus mirabilis</i>	7.42×10^6	1.35×10^6
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1.76×10^8	1.78×10^7
	<i>Salmonella enteritidis</i>	2.55×10^7	1.06×10^6
	<i>Salmonella typhimurium</i>	1.73×10^7	2.60×10^6
	<i>Serratia marcescens</i>	7.15×10^7	5.08×10^6
	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	2.90×10^7	1.03×10^7
	<i>Yersinia enterocolitica</i>	1.92×10^7	5.46×10^6

※表に示された細胞密度 (CFU/mL) は、発色試薬添加後 1 時間または 4 時間インキュベートし、得られた吸光度 (460 nm) が 0.5 以上であった各微生物毎の細胞密度 (CFU/mL)。

開発中

バイオフィルム検出キット

バイオフィルムの形成から検出までを簡便に行えるキットを開発中です。

ご興味ございましたら小社カスタマーサポートまでお問合せください。

E-mail: info@dojindo.co.jp Free Dial: 0120-489548

新製品

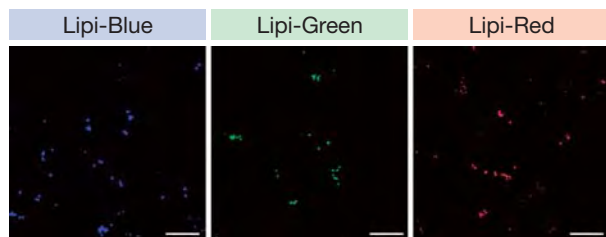
脂肪滴染色蛍光試薬

Lipi シリーズ (Blue, Green, Red)

Lipi シリーズは、脂肪親和性の高い低分子蛍光試薬であり、疎水性環境下で蛍光が増強します。そのため、試薬を添加するだけで生細胞および固定化細胞中の脂肪滴を明瞭に観察することができます。

< 脂肪滴の染色例 >

Oleic acid を添加した HeLa 細胞を生細胞の状態、Lipi シリーズの各色素にて染色しました。



< 染色条件 >

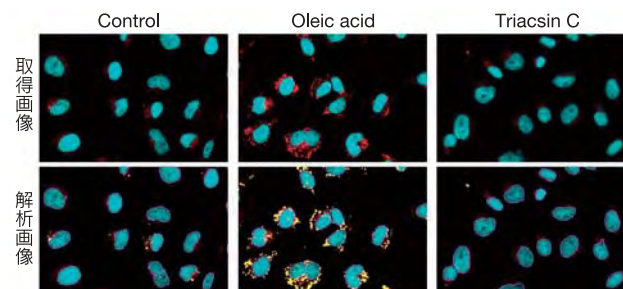
HeLa 細胞の培養液中に 200 $\mu\text{mol/L}$ Oleic acid を添加、一晚培養後に細胞を PBS で洗浄し Lipi シリーズの各色素 (Lipi-Blue/Green : 0.1 $\mu\text{mol/L}$ 、Lipi-Red : 1 $\mu\text{mol/L}$) にて 15 分間染色し観察。

< 検出条件 >

Lipi-Blue: Ex 405 nm, Em 450-500 nm
Lipi-Green: Ex 488 nm, Em 500-550 nm
Lipi-Red: Ex 561 nm, Em 565-650 nm
スケールバー: 20 μm

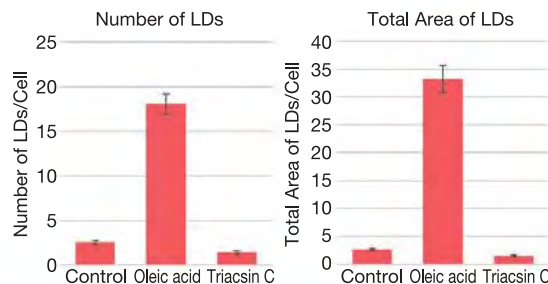
< 共焦点定量イメージサイトメーターによる定量解析 >

HepG2 細胞を Oleic acid または Triacsin C を含む増殖培地で培養後細胞を固定化。その後、Lipi-Red (1 $\mu\text{mol/L}$) および DAPI (1 $\mu\text{g/mL}$) にて染色し、共焦点定量イメージサイトメーター (横河電機株式会社 CQ1) を用い脂肪滴と核の画像を撮影した。解析にはソフトウェア CellPathfinder を用い、個々の脂肪滴と核を認識し、細胞あたりの脂肪滴の数と面積を算出しました。



< 検出条件 >
脂肪滴 (赤):
Ex 561 nm,
Em 580-653 nm
核 (青):
Ex 405 nm,
Em 417-477 nm

< 解析画像 >
黄枠線: 脂肪滴
紫枠線: 核



本製品の測定原理と使用例を示した論文が公開されました。

Y. Tatenaka, H. Kato, M. Ishiyama, K. Sasamoto, M. Shiga, H. Nishitoh and Y. Ueno, "Monitoring Lipid Droplet Dynamics in Living Cells by Using Fluorescent Probes", *Biochemistry*, **2019**, 58 (6), 499-503.

< 市販試薬との性能比較 >

Lipi シリーズでは、既存の脂肪滴染色試薬の課題 (選択性、フィルター適応性、滞留性) を大幅に改善しました。また、色素ラインナップの充実により、多重染色時の色素選択が容易に行えるようになりました。

	同仁化学製品			市販品 (T 社)		
	Lipi-Blue	Lipi-Green	Lipi-Red	Oil Red O (比色)	Nile Red	試薬 B
生細胞の染色	○	○	○	×	○	○
固定化細胞の染色	○	○	○	○	○	○
脂肪滴への選択性 (低バックグラウンド)	○	○	○	×	×	△
他色素との共染色*1	○	○	○*2	n/d	×	○
生細胞内での滞留性	○	○	×	n/d	×	×

※ 1. 共染色時の推奨フィルターについては HP の Q & A をご覧ください。
※ 2. 緑色蛍光と共染色する際は、550 nm 以下の緑色蛍光フィルターをご使用下さい。
※ 3. GFP 蛍光フィルター (500-540 nm) では緑色蛍光の漏れ込みがあります。

品名	容量	希望納入価格 (¥)	メーカーコード
Lipi-Blue	10 nmol	18,000	LD01
Lipi-Green	10 nmol	18,000	LD02
Lipi-Red	100 nmol	18,000	LD03

※ 35 mm dish : 10 ~ 50 枚分

アプリケーションデータは小社 HP よりご覧いただけます。

脂肪滴 同仁 検索

細胞外小胞、エクソソームの特性と機能

Properties and Functions of Extracellular Vesicles / Exosomes



下田 麻子

京都大学
工学研究科高分子化学専攻
博士研究員



秋吉 一成

京都大学
工学研究科高分子化学専攻
教授

Abstract

Extracellular vesicles (EVs), such as exosomes and microvesicles, play important roles in cell-cell communication including cellular signaling, cell proliferation, immune modulation, and cancer metastasis. EVs are released by all types of cells and found in various body fluids. The functions and components of EVs rely on the status of their original cells or tissues. In this review, we would like to introduce the current advances of EV studies.

1. はじめに

我々ヒトを含む多細胞生物は様々な種類の細胞から構成されており、その機能を維持するために絶えず細胞間でコミュニケーションを取っている。細胞から細胞へと情報を伝える方法としては、細胞同士が接着することにより刺激を伝達する機構やホルモン、細胞増殖因子、サイトカインなどを細胞が分泌することで近くの細胞、又は離れた組織へと運ぶ方法などが良く知られている。近年、これらに加え、細胞がタンパク質や核酸などの情報伝達物質を含む脂質二重膜で囲まれた数十～数百ナノメートルのサイズの細胞外小胞（細胞外小胞）を細胞外へと分泌し、生理学的ならびに病理学的なプロセスに重要な役割を果たしていることがわかってきた¹⁾。

初めて細胞由来の小胞が発見されたのは1940-1960年代であり、血漿の高速遠心分離により得られる50 nm程度の血小板由来の小さな膜小胞（platelet dust）が血液凝固を促進することが報告された²⁾。その後、1980年代にJohnstoneらがヒツジの網状赤血球の成熟過程で不要となったタンパク質を分泌する100 nm前後の分泌顆粒をエクソソームと命名したのが細胞外小胞の歴史の始まりである³⁾。この時は単なる細胞の老廃物を排出するための道具と認識されていたが、1990年代には免疫細胞由来のエクソソームが免疫調節機能を持つことや、内部にmicro RNA (miRNA)が存在し、他の細胞へと運ばれることが発見され、細胞外小胞は新たな細胞間コミュニケーションツールとして注目されるようになった。

現在までにあらゆる細胞が細胞外小胞を分泌し、様々な体液中（血液、尿、唾液、母乳など）に存在することが報告されている。由来の細胞によりその機能も異なり、がんの転移、ウイルスやバクテリアの感染の媒介、疾患マーカー、組織修復など多岐にわたっている^{4, 5)}。一方で、細胞外小胞の分類法や回収方法、細胞への取り込みのメカニズムなど未だ曖昧な点も多く、多くの課題が

残されているのが現状である。本稿では、細胞外小胞の基本的な性質やその機能、疾患の治療や診断への応用に向けた最新の動向について紹介する。

2. 細胞外小胞の種類と分類^{1, 6)}

国際細胞外小胞学会（International Society for Extracellular Vesicles; ISEV）⁷⁾は“細胞から放出される核を持たない（複製できない）脂質二重膜で囲まれた粒子”を細胞外小胞と定義している。細胞外小胞は産生機構の違いから①エクソソーム、②マイクロベシクル、③アポトーシス小胞に分類されている（図1）。

エクソソームは50-150 nm程度のサイズのエンドサイトーシス過程で形成されるエンドソーム膜由来の小胞であり、主な構成

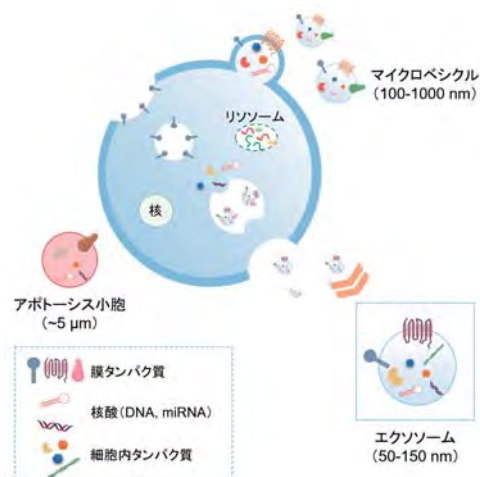


図1 細胞外小胞の種類

成分は脂質、タンパク質、核酸（micro RNA, messenger RNA, DNA）である。一般的に多くのエクソソームには後期エンドソームに含まれる多胞体（multivesicular body: MVB）関連タンパク質（ALIX, TSG101）や熱ショックタンパク質（HSP70, HSP90）、膜貫通タンパク質ファミリーのテトラスパニン（CD9, CD63, CD81）が多く含まれているため、これらをエクソソームマーカーとしているが、細胞の種類により発現量は異なるため、あくまでもひとつの目安として考えられている。最近の報告では、Zhangらがエクソソームをさらに細かくサイズで分離し、～35 nmの粒子を exomere、60-80 nmの粒子を small-exosomes、90-120 nmの粒子を large-exosomes と命名し、それぞれタンパク質、脂質、核酸、N型糖鎖の発現パターンが異なることを示している⁹⁾。

マイクロベシクルは100-1,000 nmと幅広いサイズの小胞とされ、細胞膜から直接出芽して細胞外へと分泌される点がエクソソームと異なる。産生機構は異なるものの、構成成分やサイズ共にエクソソームと共通するものが多く、完全に分離するのは難しいのが現状である。一方、アポトーシス小胞はアポトーシスを起こした細胞がマイクロベシクルと同様に膜から出芽される粒子であるが、マイクロメートルオーダーであり、2,000×g程度の低速遠心で分離されるため、他の2つとは区別がしやすい。細胞外小胞を培養細胞や血液などの体液から回収する方法は表1に示すように様々な手法が報告されている⁹⁾。細胞外小胞は単一ではなくヘテロな集団であることから、特定のタンパク質や脂質成分を持つ微粒子を単離したい場合を除いては、現時点ではサイズや密度で分離する超遠心法が標準的な手法として受け入れられている。

3. 細胞外小胞のイメージング手法

体内での細胞外小胞の挙動を追跡するには、①蛍光色素、②発光プローブ、③放射性同位元素またはMRI造影剤を用いたラベリングが重要である（図2）¹⁰⁾。

最も多く使用されているのは①の蛍光色素であり、その種類も豊富である。細胞外小胞の脂質二重膜を染める試薬としてRhodamine B (R18)、DiI、DiO、DiD、PKH67、PKH26といった多くの色素があり、これらは細胞外小胞を回収後に混合するだけという簡便な方法であることから良く用いられている。しかし、標識後に未反応の色素を除く作業によりサンプルロスが生じることや細胞外小胞同士または色素同士の凝集でミセルを形成してしまうといった問題点もある。CFSE (carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester) は膜透過性の蛍光色素であり、細胞内のエステラーゼによりCFSEのアセテート基が切断され、蛍光性となり、活性エステル基が細胞内タンパク質と共有結合することで安定的に蛍光が観察できることから、上述の脂溶性色素と同様に用いられている。Jonesらのグループは高分解能フローサイトメーターおよびナノトラッキング法を用いた粒子径測定による



図2 細胞外小胞の標識法

検討で、CFSEによる染色とサイズ排除クロマトグラフィーによる未反応の色素の除去が最も細胞外小胞のラベリングに適していると報告している¹¹⁾。

蛍光色素に代わるより高感度な標識として②の発光プローブは細胞外小胞の体内動態の観察に適していると考えられている。Takahashiらは発光レポータータンパク質 Gaussia luciferase (gLuc) とエクソソーム移行性タンパク質 lactadherin の融合タンパク質を発現したプラスミドDNAをマウスのメラノーマ細胞へと導入することでgLuc標識細胞外小胞を得ることに成功している¹²⁾。また、メラノーマ細胞および他の種類の細胞から回収したgLuc標識細胞外小胞をマウスへ静脈注射投与すると、マクロファージに取り込まれることで速やかに血中から消失することを明らかにしている¹³⁾。Laiらは、gLucとPDGFR (Platelet-derived growth factor receptor) の膜貫通ドメインを融合させ、得られたgLuc標識細胞外小胞の体内動態を観察し、全身投与により腫瘍へと運ばれることを示した¹⁴⁾。Hikitaらは、高感度で長時間安定に発光する深海エビ由来のルシフェラーゼ NanoLuc® (Nluc) とエクソソームマーカーであるCD63の融合タンパク質を発現させた細胞を作製し、Nluc標識細胞外小胞の産生量や*in vitro*での細胞への取り込み、*in vivo*での組織分布を高感度で検出することを報告した¹⁵⁾。

臓器や組織の深部での細胞外小胞の分布を観察するには③の放射性同位体またはMRI造影剤を用いた標識が有効である。Hwangらは脳血流の測定に良く用いられる^{99m}Tc-HMPAOを用い

表1 細胞外小胞の回収法

方法	操作	収量	純度	時間	費用
超遠心	低速遠心にて細胞残渣除去後に 100,000-200,000×g で超遠心	○	○	○	○
限外ろ過	目的のサイズに応じたフィルターを用いて分離	○	○	○	△
密度勾配遠心	超遠心で得られた粗分画をさらに密度勾配遠心にかけて精製する	○	◎	△	○
ポリマー沈殿法	ポリマーによる低速遠心沈降	◎	△	○	△
免疫沈降法	細胞外小胞のマーカータンパク質や脂質に対するアフィニティー法	△	◎	○	△

て細胞外小胞を標識し、脳血流シンチグラフィにて臓器への分布を調べている。その結果、フリーの ^{99m}Tc -HMPAO が脳へと集積したのに対し、 ^{99m}Tc -HMPAO 標識細胞外小胞は主に肝臓へと取り込まれ脳への集積は見られず、また表面の物性への影響もほとんどないことを示した¹⁶⁾。磁気共鳴画像 (MRI: magnetic resonance imaging) 検査も画像診断に有用であり、造影剤の1つである USPIO (ultrasmall superparamagnetic iron oxide particles) は血中安定性が高く、転移リンパ節の診断への有効性が示されている。細胞外小胞を回収後に USPIO を内包させる方法や¹⁷⁾、細胞へと取り込ませてから USPIO 内包細胞外小胞を回収する方法¹⁸⁾ などが報告されているが、半減期が長い細胞外小胞が分解された後もシグナルが残ることや、観察に比較的多くの細胞外小胞を必要とするなどの短所もある。実験の目的に応じて標識法を選択することが重要である。

4. 細胞外小胞と細胞との相互作用

細胞から分泌された細胞外小胞が受け手側の細胞へどのように情報を伝え、生理学的または病理学的機能変化をもたらすのかを解明するには、細胞との相互作用メカニズムを知ることが鍵となる。微粒子と細胞の相互作用にはそのサイズ、表面分子の種類が大きく影響する。細胞表面には多くのレセプターや接着因子が存在しており、細胞外小胞にも由来細胞が有するそれらの因子が受け継がれていることから、細胞と細胞外小胞との相互作用には様々な経路が考えられている。

一般的には、細胞内への取り込み経路については、膜融合や各種エンドサイトーシス (ファゴサイトーシス、マクロピノサイトーシス、受容体またはラフト介在エンドサイトーシスなど) が関連していることがわかっており、どの経路で細胞と相互作用するかについては、やはりエクソソーム表面分子あるいは受け手側の細胞膜表面分子に依存する¹⁹⁾。細胞接着分子であるテラスパニンや ICAM-1 (Intercellular Adhesion Molecule 1)、インテグリンなどは細胞外小胞の受容体介在エンドサイトーシスに重要な

役割を果たしていることが知られている。Hoshino らはがん細胞由来のエクソソームに発現しているインテグリンの種類により転移の臓器特異性を予測できることを報告している²⁰⁾。他にもフィブロネクチンとヘパラン硫酸プロテオグリカン、マクロファージや樹状細胞に発現する膜貫通タンパク質 TIM-4 とリン脂質のホスファチジルセリンなど多くの分子が同定されている²¹⁾。

我々は細胞外小胞表面の糖鎖の機能に関する研究を進めている。細胞膜表面の脂質およびタンパク質表面を覆う糖鎖は細胞の増殖、接着、分化などの生体応答やタンパク質や脂質の機能調節といった様々な生命現象に重要な役割を担っており、細胞外小胞表面の糖鎖もこれらの現象に関連していることが考えられる²²⁾。しかし、細胞外小胞研究においてタンパク質や核酸の構造よりも複雑な構造を持つ糖鎖についての議論はこれまでにほとんどされてこなかった。筆者らは糖鎖とレクチンの相互作用を利用するレクチンアレイに注目し、細胞外小胞の構造を壊すことなく簡便かつ高感度に表層糖鎖のパターンを解析することに成功した。脂肪由来ヒト間葉系幹細胞由来細胞外小胞の表層糖鎖をレクチンアレイにて解析したところ、シアル酸認識レクチンと特に強く結合し、細胞表面にあるシアル酸認識レクチンである Siglec (sialic acid-binding immunoglobulin-type lectin) を発現する細胞に取り込まれることを明らかにした (図3)²³⁾。現在、様々な種類の細胞由来の細胞外小胞について解析を行っており、細胞内取り込みへの関与のみならず、細胞外小胞の多様性における糖鎖の役割やタンパク質や核酸に代わるバイオマーカーとしての利用についても検討を進めている。

5. 細胞外小胞による疾患の診断

がん細胞由来細胞外小胞に特異的な miRNA やタンパク質に関する研究は年々増大しているが、これを疾患の診断マーカーとして応用する試みが盛んに行われている。患者への負担をなるべく少なくし、がんを早期発見するために血液や尿などの体液で診断するリキッドバイオプシーが注目されているが、この診断法に細

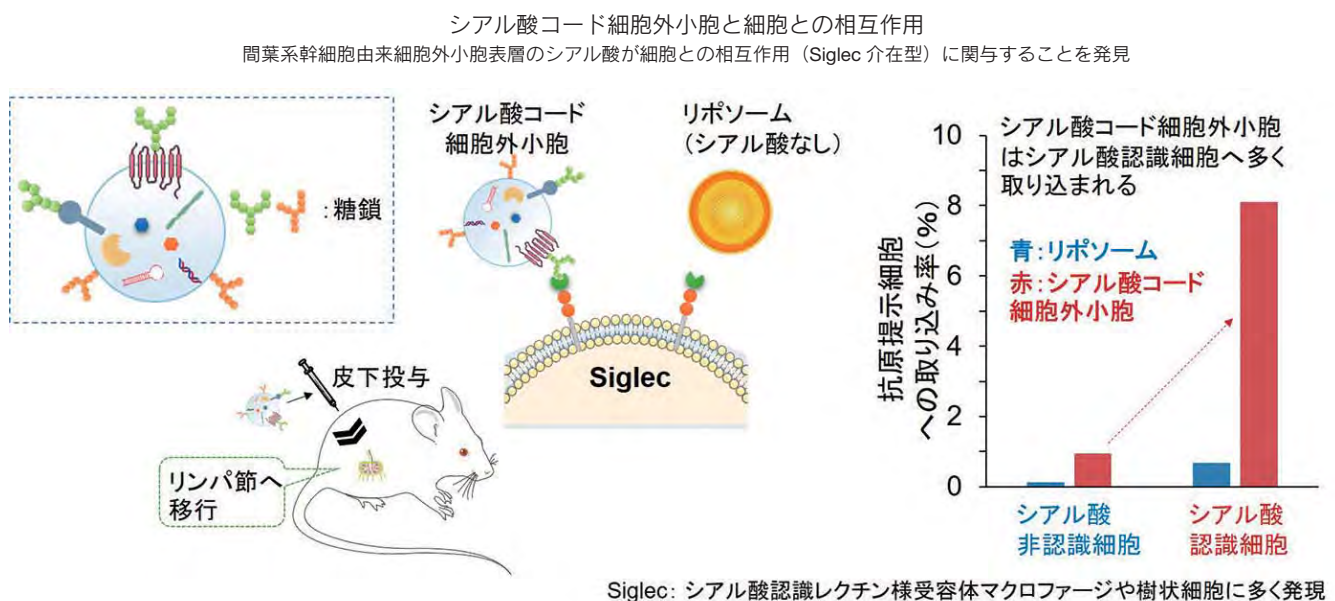


図3 細胞外小胞表面糖鎖と細胞の相互作用

胞外小胞が有用である。2008年にTaylorらは卵巣がんの特異的なマーカーとして8種類のmiRNAが血清中の細胞外小胞に含まれることを確認した²⁴⁾。この報告を皮切りに血清、血漿、尿、脳脊髄液などのあらゆる体液サンプルから得られる細胞外小胞に含まれるmiRNAが肺がん、大腸がん、すい臓がん、子宮頸がん、膠芽腫といった様々ながんにおいて診断マーカーとなりうる事がわかっていく²⁵⁾。日本でも落谷らのグループが2014年にExoScreen法と呼ばれる血液中のがん細胞由来の細胞外小胞を分離することなく短時間で高感度に検出できる手法を開発した。この手法はエクソソームマーカーとがんの特異的なマーカーの2種類に対する抗体を固定化した光増感剤ビーズを用いることでがんの早期診断を可能とするものである²⁶⁾。また、馬場らのグループは、従来法では効率的な回収が困難であった尿中の細胞外小胞を、酸化亜鉛からなるナノサイズのワイヤで1mLの尿から99%以上を捕捉する新規手法の開発に成功した。この方法を用いることで、様々ながん患者の尿由来細胞外小胞中のmiRNAを高感度に検出が可能となり、がん特異的なmiRNAを発見している²⁷⁾。現在、miRNAのみならず細胞外小胞に含まれる脂質やタンパク質の発現レベルががん患者で高い値を示すことも報告されている²⁸⁾。

6. 細胞外小胞の医療応用

細胞外小胞の生物学的機能に関する研究は近年急速に進展し、数多くの論文が報告されている。由来細胞の種類に応じて、細胞外小胞の機能が生体にとって正に制御されるのか、または負に制御されるのかが決まってくる。例えば、最も多く研究が行われているがん細胞由来の細胞外小胞においては、細胞外小胞に含まれる炎症性サイトカインやmiRNAにより、薬剤耐性、がんの転移や血管新生を促すことによる腫瘍の増大といった負の作用を引き起こすことがわかっていく²⁹⁾。また、骨髄由来免疫抑制細胞の活性化やエフェクターT細胞のアポトーシス誘導による腫瘍の増大など免疫系の細胞への働きも報告されている。活性化T細胞に発現する免疫チェックポイント分子の1つであるPD-1 (programmed cell death-1) のリガンドPD-L1 (programmed death-ligand 1) は腫瘍細胞で発現が増大することで免疫回避しているが、最近ChenらはこのPD-L1が腫瘍細胞由来細胞外小胞として分泌され、CD8陽性T細胞の機能を抑制することで腫瘍の増大を引き起こすことを報告している³⁰⁾。一方で、正に制御される機能についても多くの研究が行われている。例えば、母乳由来の細胞外小胞に含まれるmiRNAは乳児の免疫システムの発達に重要な役割を示すことが報告されている³¹⁾。さらには、哺乳類のみならず果物や野菜といった食物からも“細胞外小胞様のナノ粒子”が分泌され、内部に機能性のmiRNAやタンパク質を含有していることもわかってきた。ショウガ由来のナノ粒子はアルコール誘導性肝障害の抑制効果が見られ、またグレープフルーツ由来のナノ粒子に標的細胞へのターゲティング能を付与することで薬物送達のキャリアとしても有用であることが示されている³²⁾。これらの他にも様々な興味深い機能が報告されているが、最近の総説を参照していただきたい^{33), 34)}。

細胞外小胞を用いた治療法についての可能性も示唆されている。細胞外小胞の内部へ超音波照射やエレクトロポレーション法で抗がん剤、生理活性物質、siRNAなどを内包させ目的の細胞へと送達するナノキャリアとしての応用研究が行われている³⁵⁾。回収した小胞をそのまま用いるだけでは内包効率や細胞選択性が十分ではないことがほとんどであることから、細胞外小胞の表面の改変技術などの取り組みも行われており、今後の発展が期待される

³⁶⁾。一方で、新たながん免疫ワクチンとして悪性のメラノーマや非小細胞肺がん、大腸がんに対する治療ではすでに第1, 2相臨床試験が行われており、安全性や有効性が確認されている³⁷⁾。珠玖らのグループは、細胞傷害性T細胞由来の細胞外小胞が、がん由来の間葉系間質細胞に選択的に取り込まれアポトーシスを誘導し、結果としてがんの浸潤と転移を抑制することを見出しており、臨床を目指した研究を進めている³⁸⁾。

また、間葉系幹細胞は骨、脂肪、軟骨、神経などのあらゆる細胞への分化能を持つ細胞であり、特に再生医療分野で注目されている。間葉系幹細胞が分泌する細胞外小胞も同様の効果が見られると考えられることから、最近注目されている。組織(腎臓、肝臓、皮膚、角膜)損傷モデルで細胞の増殖、血管新生、再構築などが行われているほか、T細胞、B細胞、NK細胞などの免疫担当細胞の機能を調節する機能も報告されている^{39), 40)}。しかし、細胞外小胞が多様性を示すのと同時に、間葉系幹細胞も由来する組織や分化の度合いにより構成成分も機能も変化するため更なる条件検討が必要とされる。

7. おわりに

ここ10数年の間に細胞外小胞に関する研究はその機能の多様さからライフサイエンスの幅広い分野で注目されている。しかし、単離法や分類法、品質管理や適切な保存方法などの明確な定義はなく、今後の研究成果が期待される。現在様々なデータベースが公開されており⁴¹⁾、昨年にはISEVにより世界中の研究者がまとめた細胞外小胞の基本的なガイドラインも更新された(MISEV2018)⁴²⁾。細胞外小胞の基本的な機能の解析から実際の医療への応用を実現するために、医工連携による研究が必要であると考えられる。

[参考文献]

- 1) M. Mathieu, et al., *Nat. Cell Biol.*, **2019**, 21, 9-17.
- 2) P. Wolf, *Br. J. Haematol.*, **1967**, 13, 269-288.
- 3) R. M. Johnstone, et al., *J. Biol. Chem.*, **1987**, 262, 9412-9420.
- 4) M. Colombo, et al., *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, **2014**, 30, 255-289.
- 5) A. Shimoda, et al., *Sci. Rep.*, **2016**, 6, 18346.
- 6) B. György, et al., *Cell Mol. Life Sci.*, **2011**, 68, 2667-2688.
- 7) ISEV the International Society for Extracellular Vesicles (<https://www.isev.org/>)
- 8) H. Zhang, et al., *Nat. Cell Biol.*, **2018**, 20, 332-343.
- 9) D. Gulei, et al., *Bioconj. Chem.*, **2018**, 29, 635-648.
- 10) S. T. Chuo, et al., *J. Biomed. Sci.*, **2018**, 25, 91.
- 11) A. Morales-Kastresana, et al., *Sci. Rep.*, **2017**, 7, 1878.
- 12) Y. Takahashi, et al., *J. Biotechnol.*, **2013**, 165, 77-84.
- 13) C. Charoenviriyakul, et al., *Eur. J. Pharm. Sci.*, **2017**, 96, 316-322.
- 14) C. P. Lai, et al., *ACS Nano*, **2014**, 8, 483-494.
- 15) T. Hikita, et al., *Sci. Rep.*, **2018**, 8, 14035.
- 16) D. W. Hwang, et al., *Sci. Rep.*, **2015**, 5, 15636.
- 17) P. Kjellman, et al., *Nanomedicine*, **2014**, 10, 1089-1095.
- 18) A. Busato, et al., *Int. J. Nanomedicine*, **2016**, 11, 2481-2490.
- 19) L. A. Mulcahy, et al., *J. Extracell. Vesicles*, **2014**, 3, 24641.
- 20) A. Hoshino, et al., *Nature*, **2015**, 527, 329-335.
- 21) A. Gonda, et al., *Mol. Cancer Res.*, **2019**, 17, 337-347.
- 22) A. Varki, *Glycobiology*, **2017**, 27, 3-49.
- 23) A. Shimoda, et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **2017**, 491, 701-707.
- 24) D. D. Taylor and C. Gercel-Taylor, *Gynecol. Oncol.*, **2008**, 110, 13-21.
- 25) M. Salehi and M. Sharifi, *J. Cell Physiol.*, **2018**, 233, 6370-6380.
- 26) Y. Yoshioka, et al., *Nat. Commun.*, **2014**, 5, 3591.

- 27) T. Yasui, et al., *Sci. Adv.*, **2017**, 3, e1701133.
- 28) W. Guo, et al., *Oncol. Rep.*, **2017**, 38, 665-675.
- 29) X. Zhang, et al., *J. Hematol. Oncol.*, **2015**, 8, 83.
- 30) G. Chen, et al., *Nature*, **2018**, 560, 382-386.
- 31) N. Kosaka, et al., *Silence*, **2010**, 1, 7.
- 32) J. Xiao, et al., *PeerJ*, **2018**, 6, e5186.
- 33) R. Kalluri, *J. Clin. Invest.*, **2016**, 126, 1208-1215.
- 34) C. F. Ruivo, et al., *Cancer Res.*, **2017**, 77, 6480-6488.
- 35) D. Ingato, et al., *J. Control Release*, **2016**, 241, 174-185.
- 36) E. J. Bungulawa, et al., *J. Nanobiotechnology*, **2018**, 16, 81.
- 37) J. Wang, et al., *Front Pharmacol.*, **2017**, 7, 533.
- 38) N. Seo, et al., *Nat. Commun.*, **2018**, 9, 435.
- 39) J. Burrello, et al., *Front Cell Dev. Biol.*, **2016**, 4, 83.
- 40) D. G. Phinney and M. F. Pittenger, *Stem. Cells*, **2017**, 35, 851-858.
- 41) Vesiclepedia (<http://www.microvesicles.org/>),
EVpedia (<http://evpedia.info/>),
and EV-TRACK (<http://evtrack.org>)
- 42) C. Théry, et al., *J. Extracell. Vesicles*, **2018**, 7, 1535750.

[著者プロフィール]

氏名：下田 麻子 (Asako SHIMODA)
 所属：京都大学 工学研究科高分子化学専攻
 〒615-8530
 京都府京都市西京区京都大学桂
 京都大学工学研究科附属桂インテックセンター 302 号室
 Tel：075-383-2153

E-mail：shimoda.asako.4n@kyoto-u.ac.jp

出身学校：東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科

学位：博士（学術）

専門分野：生体機能高分子、細胞外小胞

氏名：秋吉 一成 (Kazunari AKIYOSHI)

所属：京都大学 工学研究科高分子化学専攻

〒615-8510

京都府京都市西京区京都大学桂 A3-317

Tel：075-383-2589

Fax：075-383-2590

E-mail：akiyoshi@bio.polym.kyoto-u.ac.jp

出身学校：九州大学大学院工学研究科

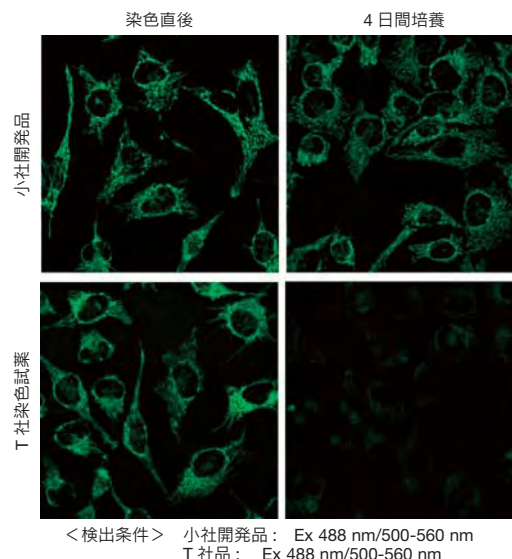
学位：博士（工学）

専門分野：生体機能高分子、バイオインスパイアード材料、糖鎖
 工学、人工細胞工学、DDS

開発中

ー長期培養後の観察が可能ー
 ミトコンドリア染色蛍光試薬 (Green, Red, Deep Red)

小社ではこれまでのミトコンドリア染色試薬を改良し、生細胞のミトコンドリア滞留性を高めた染色試薬を開発しております。本開発品は、遺伝子発現操作を必要とせず、簡便にミトコンドリアの形態を長期間にわたり評価することができます。



HeLa 細胞を HBSS にて洗浄後、開発品もしくは T 社品を添加しミトコンドリアを染色し、HBSS にて洗浄後培地に入れ替え 4 日間培養し観察を行いました。その結果、T 社品は蛍光強度が 4 日後に大きく低下したのに対し、小社開発品は蛍光強度が維持され、ミトコンドリアを明瞭に観察できました。

ご興味ございましたら小社カスタマーサポートまでお問合せください。(E-mail: info@dojindo.co.jp Free Dial: 0120-489548)

近日出展予定の学会

第 92 回生化学会大会

期日：2019 年 9 月 18 日（水）～ 20 日（金）

会場：パシフィコ横浜

第 78 回日本癌学会学術総会

期日：2019 年 9 月 26 日（木）～ 28 日（土）

会場：国立京都国際会館（京都）

日本防菌防黴学会第 46 回年次大会

期日：2019 年 9 月 25 日（水）～ 26 日（木）

会場：千里ライフサイエンスセンター（大阪）

第 19 回日本ミトコンドリア学会

The 16th Conference of the Asian Society of Mitochondrial Research and Medicine

期日：2019 年 10 月 3 日（木）～ 5 日（土）

会場：ソラリア西鉄ホテル（福岡）

展示ブースにてお待ちしております。
 本学会展示に関する詳細は後日小社 HP にてご案内します。

Topics on Chemistry

近赤外蛍光色素を用いた内在的エクソソームのラベル化技術

株式会社同仁化学研究所 下村 隆

エクソソームは細胞から放出される 150 nm 以下の細胞外小胞である。発見された当初は細胞内の不要物として考えられてきたが、研究により細胞間のコミュニケーションツールとして働くことが明らかとなってきている。具体的には、エクソソームの中には mRNA や miRNA、タンパク質などが含まれており、細胞間を行き来し、別の細胞へ内包する物質を送達している。最近、がん細胞から放出されるエクソソームが、がんの悪性化や転移に深く関わっていることが報告されており、がんの早期診断用のバイオマーカーとしてのエクソソーム研究が進められている¹⁾。

エクソソームが細胞や組織に対して、どのように相互作用しているかを確認する手段としてイメージング技術が有用である。特に蛍光顕微鏡を用いると、一細胞レベルでのエクソソームの相互作用をリアルタイムでモニターすることができる。エクソソームの膜構造は細胞膜と似ていることから、脂溶性の蛍光性膜染色色素がエクソソームの染色剤として使用されている。蛍光性膜染色色素はエクソソームの脂質二重膜に色素骨格の長鎖アルキル鎖を挿入し、強い蛍光を発するものが汎用される。市販品として、PKH67($\lambda_{ex/em} = 490/502$ nm), PKH26($\lambda_{ex/em} = 551/567$ nm), DiR($\lambda_{ex/em} = 750/780$ nm) などがあり、500-800 nm という広範囲での蛍光観察が可能である。これにより、複数のエクソソームを任意の色素の組み合わせで染色し、多色でのエクソソームの取り込みイメージングすることが可能である。また、近赤外光は生体透過性が高く、組織の深い所にも到達することから、近赤外領域の蛍光性膜染色蛍光色素は *in vivo* イメージングに利用される。

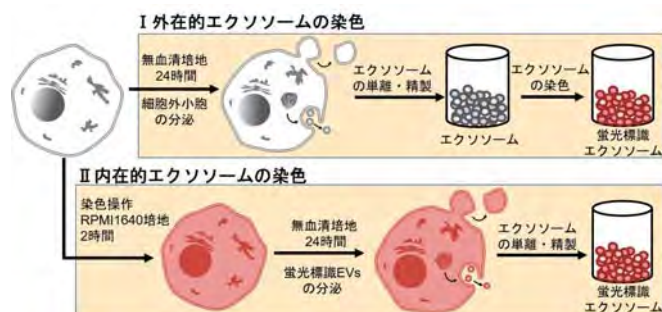


図 1. NIR-AZA を用いた外在的 / 内在的エクソソーム染色法

蛍光性膜染色色素によるエクソソーム染色の方法は、まず生体サンプルからエクソソームを精製し、色素と混合して染色後、過剰の色素を除去する(図 1- I, 外在的エクソソームの染色)。染色には、抗体によるラベル化、色素の共有結合や受動拡散の方法があり、過剰な色素の除去には超遠心法やゲル濾過法が用いられる。これらは多くの文献で実施報告されているが、染色操作によりエクソソーム本来の構造と性質が異なることが懸念されている。Monopoli らは、染色操作によるエクソソームへの影響を低減する為に、細胞を蛍光色素で染色し、その細胞から放出されるエクソソームを得る方法(図 1- II, 内在的エクソソームの染色)を開発した²⁾。

本手法は、効率的に細胞内に取り込まれる性能を有する近赤外蛍光色素(NIR-AZA、($\lambda_{ex/em} = 686/716$ nm))を使用し、細胞から分泌されるエクソソームを染色するものである(内在的エクソソームの染色)。具体的には、FBS 含有 RPMI 培地で KellyCis83

細胞を培養し、5 μ mol/L の NIR-AZA を含む RPMI 培地で染色したのち、無血清 RPMI 培地中でエクソソームを分泌させる。次に上清を回収し、超遠心法によりエクソソーム画分を得た後、染色されたエクソソームと未染色のエクソソームを原子間力顕微鏡、フローサイトメトリー、NTA (ナノ粒子トラッキング分析) 及びウェスタンブロットにより比較評価している。特に NTA 分析の結果では、エクソソーム粒子のサイズ分布が染色-未染色間ではほぼ一致しており、内在的ラベル化がエクソソーム本来の特性を変化させないこと、また染色能においても外在的ラベル化に比べ内在的ラベル化が優位であると報告している。

今回紹介した技術は、免疫染色、結合試薬の利用など、既存のエクソソーム染色法に対し、簡便かつエクソソーム本来の特性を維持できるという利点があるが、エクソソームを直接染色できないのは課題であろう。現在、エクソソームの研究は、免疫、神経、癌、内分泌など幅広い研究領域で注目をあびているが、技術的に未開発な部分が多くある。エクソソーム研究を発展させる更なる新技術開発が望まれる。

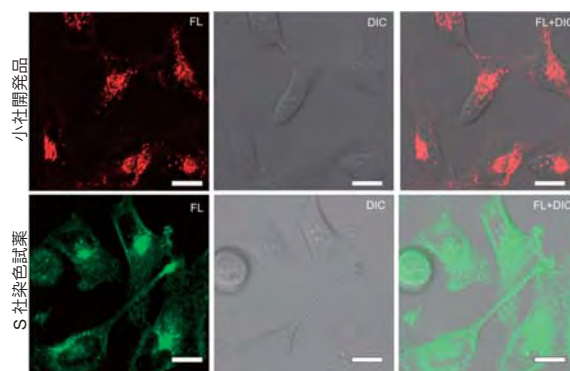
参考文献

- 1) L. M. Shen, et al., *ACS Appl. Nano Mater.*, **2018**, 1, 2438-2448.
- 2) M. P. Monopoli, et al, *Chem. Commun.*, **2018**, 54, 7219.

開発中

エクソソーム染色蛍光試薬

エクソソームは、50-150 nm の細胞外小胞であり、細胞間コミュニケーションツールとして注目されています。小社では、一細胞レベルでエクソソームの取り組み解析が可能な染色試薬を開発しています。本試薬は外在的エクソソーム染色法を採用しています。



< 検出条件 > 小社開発品: Ex 561 nm / Em 558-617 nm
S 社品: Ex 488 nm / Em 558-644 nm

単離したエクソソームを開発品または S 社染色剤で染色後、HeLa 細胞に加え一晩インキュベートしたのち観察を行いました。S 社に比べ、開発品は明瞭にエクソソームを染色しました。

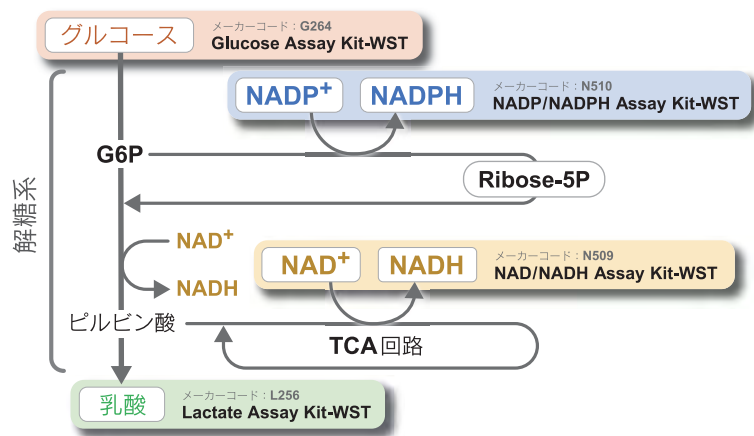
ご興味ございましたら小社カスタマーサポートまでお問合せください。(E-mail: info@dojindo.co.jp Free Dial: 0120-489548)

新製品

細胞内代謝測定キット

細胞内の代謝システムである解糖系や TCA 回路、ペントース-リン酸経路の解析は、細胞状態を理解する上で重要であり、グルコース、乳酸および、NAD(P)⁺/NAD(P)H などの代謝産物を指標に評価されています。

細胞内代謝関連マップと疾患サンプルの評価例で理解が深まる



はじめて代謝を測定される方へ

様々な疾患による細胞内代謝の変動を表やマップで紹介しております。また参考論文も掲載しておりますので、論文執筆時の引用文献としてもご活用頂けます。詳細は小社 HP にてご覧ください。

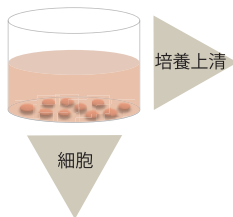
細胞内代謝 同仁 検索



糖尿病疾患に関する情報を新たに追加しました。

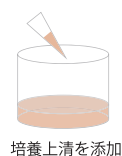
はじめてでも簡単な操作

細胞を準備



グルコース 乳酸 の測定手順

- ・培養上清をプレートに移し発色試薬と混合するだけの簡便操作
- ・培養上清を2つに分け、Glucose および Lactate の両キットでの同時評価が可能



37℃で30分間
インキュベーション

解析

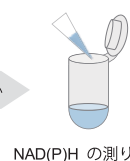
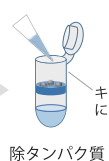
プレートリーダー
吸光度測定 (450 nm)

※細胞をサンプルとしても使用可能です。詳しくは製品 HP へ。

NAD⁺/NADPH NAD⁺/NADH の測定手順

- ・前処理をより簡便にするため、細胞溶解バッファと除タンパク質用チューブをキットに同梱*
- ・NAD(P)H と NAD(P)⁺ の測り分けは、サンプルの加温操作のみで完結

同仁化学だけ！



37℃で1時間
インキュベーション

解析

プレートリーダー
吸光度測定 (450 nm)

併せて使うと便利！代謝活性測定の際、細胞数を補正することでデータの信頼性が向上します。
細胞数補正キット [メーカーコード: C544] は本誌 P16 をご参照ください。

品名	容量	希望納入価格(¥)	メーカーコード
Glucose Assay Kit-WST	50 tests	18,000	G264
	200 tests	38,000	
Lactate Assay Kit-WST	50 tests	29,000	L256
	200 tests	68,000	
NAD/NADH Assay Kit-WST	100 tests	54,000	N509
NADP/NADPH Assay Kit-WST	100 tests	54,000	N510

新製品

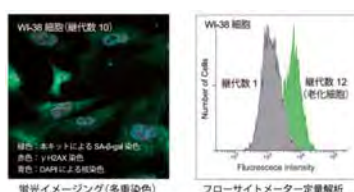
細胞老化検出キット

小社の細胞老化検出キットは、老化細胞の指標として用いられる SA- β -gal (senescence-associated β -galactosidase) 活性を特異的に検出することができます。各キットには蛍光にて検出可能な β -galactosidase 基質 (SPiDER- β Gal) を採用しており、蛍光顕微鏡・フローサイトメーター・プレートリーダーに適用した製品をラインアップしております。

蛍光顕微鏡、フローサイトメーター用

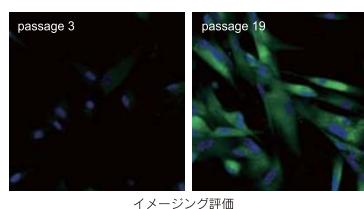
Cellular Senescence Detection Kit - SPiDER- β Gal

従来の検出法 (X-gal 法) では、比色染色した老化細胞を目視にてカウントしており定量が困難でした。本キットは、フローサイトメーターによる定量解析が可能になりました。

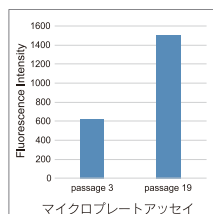


<測定例>

継代数の異なる WI-38 細胞を用い Cellular Senescence Detection Kit - SPiDER- β Gal [メーカーコード: SG03] によるイメージング評価 (左図) および Cellular Senescence Plate Assay Kit - SPiDER- β Gal [メーカーコード: SG05] によるマイクロプレートアッセイ (右図) を行いました。



イメージング評価

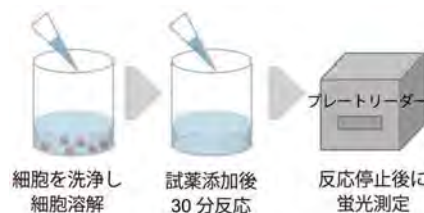


マイクロプレートアッセイ

新製品 マイクロプレートリーダー用

Cellular Senescence Plate Assay Kit - SPiDER- β Gal

96 ウェルプレートに試薬を加えるだけで SA- β -gal 活性の数値化、更には多検体の評価にも利用することができます。



<検出条件 (右図)>
Ex 535 nm / Em 580 nm

<検出条件 (左図)>
緑色: Ex 488 nm / Em 500-600 nm (Cellular Senescence Detection Kit - SPiDER- β Gal による SA- β -gal 染色)
青色: Ex 405 nm / Em 450-495 nm (DAPI [メーカーコード: D523] による核染色)

結果、継代数を重ねた細胞では、SA- β -gal の亢進が双方の解析結果で確認されました。なお、マイクロプレートアッセイでは核を指標にした細胞数補正キット [メーカーコード: C544 (下記参照)] で得られた結果を SA- β -gal 活性の補正に用いました。

品名	容量	希望納入価格(¥)	メーカーコード
Cellular Senescence Plate Assay Kit - SPiDER- β Gal	20 tests 100 tests	11,000 32,000	SG05
Cellular Senescence Detection Kit - SPiDER- β Gal	10 assays	38,000	SG03

本キットを用いた論文情報は HP に掲載しています。

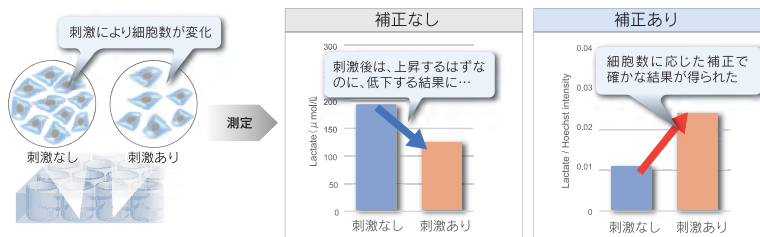
細胞老化 同仁 検索

新製品

細胞数補正キット

Cell Count Normalization Kit

マイクロプレートを用いた細胞の解析では、得られる結果がウェル中の細胞数により変化する場合があります。その際には、サンプル中の細胞数に応じた測定値の補正 (ノーマライゼーション) が必要になります。本キットは、核染色試薬 (Hoechst 33342) を用いた核を指標とする手法を採用しています。



細胞内代謝 (乳酸) の測定例

品名	容量	希望納入価格(¥)	メーカーコード
Cell Count Normalization Kit	200 tests 1000 tests	8,000 20,000	C544

新製品

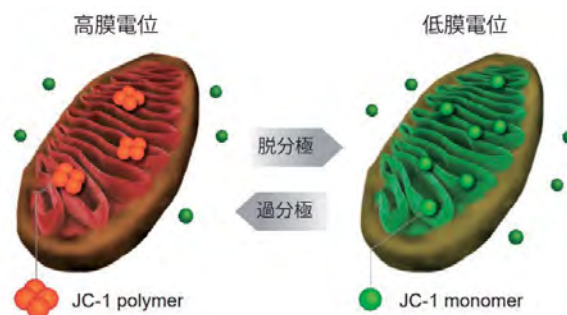
ミトコンドリア膜電位測定キット

JC-1 MitoMP Detection Kit

ミトコンドリアは、ATP 等のエネルギー産生場であり、その活性の変化や機能障害ががんや老化、神経変性疾患などと密接に関連しています。そのため、ミトコンドリアの状態を理解することは重要であり、その指標としてエネルギー産生に伴い生じる膜電位差が評価されています。

<測定原理>

ミトコンドリアが正常で膜電位が保たれた状態では JC-1 が凝集し赤色の蛍光を発し、膜電位が低下すると JC-1 が単量体として存在し緑色の蛍光を発します。この赤色と緑色の蛍光強度比より、ミトコンドリア膜電位の変化を評価することができます。

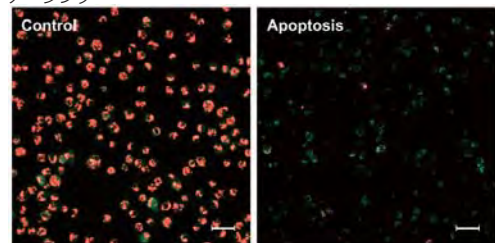


<各種機器による解析例>

Jurkat細胞をアポトーシス誘導剤である Staurosporine で処理し、本キットを用いて染色した後、蛍光顕微鏡、フローサイトメーター、プレートリーダーにより解析しました。

蛍光顕微鏡

アポトーシス誘導により変化した膜電位を色の変化で明瞭にイメージング



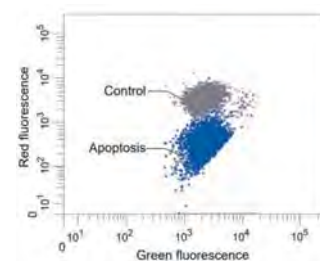
〈検出条件〉

Green : Ex 488 nm / Em 500-550 nm
Red : Ex 561 nm / Em 560-610 nm

スケールバー : 80 μm

フローサイトメーター

個々の細胞の膜電位変化を定量解析

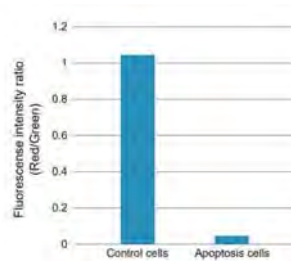


〈検出条件〉

Green : Ex 488 nm / Em 515-545 nm
Red : Ex 488 nm / Em 564-604 nm

プレートリーダー

ウェル中のすべての細胞を対象に膜電位の変化を確認



〈検出条件〉

Green : Ex 485 nm / Em 525-545 nm
Red : Ex 535 nm / Em 585-605 nm

FAQ

Q. 以前使用した JC-1 は溶けにくかったのですが、本キットの JC-1 も溶けにくいのですか？

A. 本キットでは難溶性の JC-1 を容易に溶解可能なプロトコルを準備しており、従来の課題を克服しております。



既存の JC-1 本キットの JC-1

Q. 1 キットの使用回数を教えてください。

A. 使用回数の目安は以下の通りです。

蛍光顕微鏡	フローサイトメーター	マイクロプレートリーダー
25 枚 (35 mm dish 使用時)	100 回	5 枚 (96 穴マイクロプレート使用時)

Q. 染色時、血清入り培地は使用できますか？

A. 血清入り培地は使用可能です。

Q. JC-1 染色後の細胞の洗浄には、HBSS の代わりに PBS を使用できますか？

A. 細胞へのダメージを軽減するために、HBSS の使用を推奨しております。そのため、HBSS がお手元ない場合は、培地での洗浄を推奨します。

Q. 実績のある細胞種を教えてください。

A. 小社では、HeLa、Jurkat 細胞の実績があります。その他の細胞種については、小社カスタマーサポートまでお問合せください (Free Dial: 0120-489548, E-mail: info@dojindo.co.jp)。

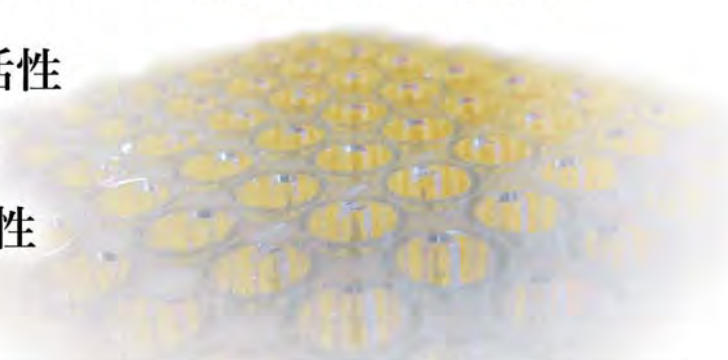
品名	容量	希望納入価格(¥)	メーカーコード
JC-1 MitoMP Detection Kit	1 set	23,000	MT09



食品の機能性を 簡単に

抗酸化能、血圧降下測定をキット化

- ・ DPPH 消去活性
- ・ SOD 様活性
- ・ ACE 阻害活性



抗酸化能測定キット	DPPH Antioxidant Assay Kit
SOD 様活性測定キット	SOD Assay Kit - WST
ACE 阻害活性測定キット	ACE Kit - WST

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 0120-021557
フリーダイヤル 0120-489548
(受付時間：平日 9:00 ~ 17:00)
(土・日・祝日は除く)