

アミノ酸トランスポーター

—総説—

ホウ素中性子捕捉療法 (BNCT) に用いる
腫瘍標的ホウ素アミノ酸 BPA の動態研究

大阪公立大学 服部 能英、切畑 光統

—注目の研究—

分析化学と共に歩んだ46年間の軌跡

分析機器の開発の歴史と人的分析の在りし姿とは？

株式会社同仁化学研究所 日高 三男

新製品

脂肪酸取り込み検出キット P.5

リソソーム染色試薬 Deep Red P.11

リソソーム pH 検出用色素 P.14

リソソーム pH 検出キット P.15

お役立ち

エクソソーム研究学術セミナー第2回 アーカイブ動画案内 P.17



CONTENTS

Review

- ホウ素中性子捕捉療法 (BNCT) に用いる
腫瘍標的ホウ素アミノ酸 BPA の動態研究 ●———— [1]
大阪公立大学 服部 能英、切畑 光統

Topics on Chemistry

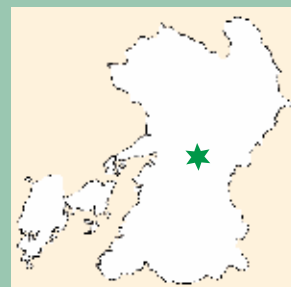
- 分析化学と共に歩んだ 46 年間の軌跡
分析機器の開発の歴史と人的分析の在りし姿とは？ ●———— [6]
株式会社同仁化学研究所 日高 三男

Commercial

- 細胞膜関連研究用試薬 ●———— [10]
エンドサイトーシス検出試薬 ●———— [13]
新製品
脂肪酸取り込み検出キット ●———— [5]
リソソーム染色試薬 Deep Red ●———— [11]
リソソーム pH 検出用色素 ●———— [14]
リソソーム pH 検出キット ●———— [15]
関連製品
アミノ酸取り込み検出キット ●———— [4]
シスチン取り込み検出キット ●———— [4]
グルコース取り込み検出キット ●———— [4]
リソソーム染色色素 Green ●———— [12]
エクソソーム精製キット・キット用フィルター ●———— [16]
エクソソーム染色キット ●———— [17]

お役立ち

- 製品取扱説明書案内カード終了 ●———— [8]
ご存じですか？ ●———— [8]
アプリケーションの紹介 ●———— [9]
学会展示のご案内 ●———— [16]
エクソソーム研究学術セミナー第2回 アーカイブ動画案内 ●———— [17]
第32回フォーラム・イン・ドージン開催後記 ●———— [18]



表紙：美里町
山里の影を求めて走っていると、な
つかしい光景に出会い日本の原風景
を表現してみた。

photo：永島俊介氏

ツイッター



小社製品の最新情報や使
用文献などをツイートし
ています。



フォロー
お願いします

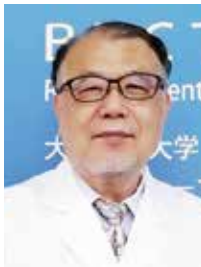
@dojindoinfo

ホウ素中性子捕捉療法（BNCT）に用いる腫瘍標的ホウ素アミノ酸 BPA の動態研究 Dynamics of BPA, a tumor targeted boron amino acid for boron neutron capture therapy (BNCT)



服部 能英

大阪公立大学
BNCT 研究センター



切畑 光統

大阪公立大学
BNCT 研究センター

Abstract

The boron amino acid *p*-borono-L-phenylalanine (BPA), which has selective tumor seeking activity, is used as an active ingredient of the boron drug Steboronine® in the insurance treatment of BNCT for head and neck cancer. Here, after discussing the requirements for boron compounds (boron carriers) based on the principle of BNCT, the mechanism of BPA uptake, intracellular microdistribution analysis, and dynamic analysis of BPA by PET probe [¹⁸F] FBPA will be described.

1. はじめに

低侵襲な次世代のがん治療として注目されているホウ素中性子捕捉療法（Boron Neutron Capture Therapy, BNCT）の保健医療は、我が国において 2020 年 6 月に開始された。世界に先駆けて始まった頭頸部がんを対象とする BNCT 医療では、中性子発生源の加速器と腫瘍に選択集積するホウ素薬剤が組み合わされて実施され、ホウ素薬剤には、*p*-borono-L-phenylalanine (BPA、図 2) を有効成分とするステボロニン® {一般名：ボロファラン (10B)} が使用されている。

BNCT は ¹⁰B- ホウ素と低エネルギーの熱（外）中性子間の核反応を基盤とするがん治療であり、腫瘍に選択集積するホウ素化合物（ホウ素担体）が BNCT の成否を左右する鍵要素と云われ、これまでに多くの候補となるホウ素化合物や DDS が報告されて来たが、本稿では、BNCT の原理と BNCT 用ホウ素化合物の要件、開発動向等について述べ、次いで実医療が達成された BPA とその関連化合物の動態解析を中心に解説する。

2. ホウ素中性子捕捉療法（BNCT）の原理とホウ素化合物

BNCT の原理と概念は、中性子発見から 4 年後の 1936 年に、G. L. Locher（米）によって提唱された¹⁾。これによれば ¹⁰B- ホウ素を取りこませたがん細胞に熱中性子（¹n_{th}）を照射してホウ素中性子捕捉反応（BNCR）を惹起させ、この時に発生したα粒子（⁴He）、リチウム反跳核（⁷Li）、即発γ線および熱エネルギーにより、反応場の DNA や細胞内小器官を損傷させて死滅に導くことを基本原理としている。BNCR 反応で生じるα粒子およびリチウム反跳核の飛程は、それぞれ 9 μm、4 μm と細胞径内に収まり、周囲の正常細胞等に与える影響は小さく、BNCT ががん細胞選択的治療と呼ばれる根拠となっている（図 1）。この原理から、がん細胞に選択的に集積する ¹⁰B- ホウ素（ホウ素化合物）が BNCT の鍵要素であることが理解される。

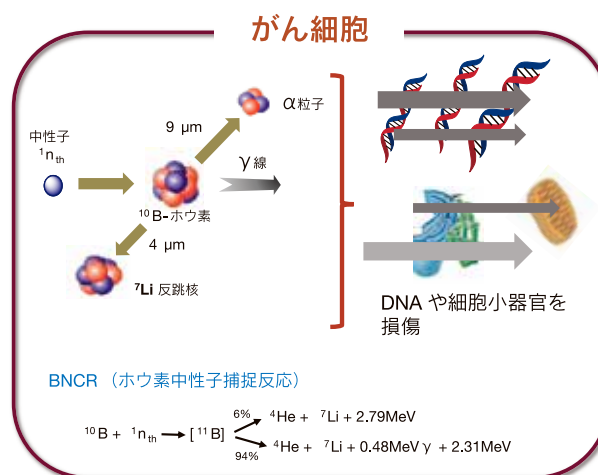


図 1 BNCT の原理

3. BNCT 用ホウ素化合物の要件と開発動向 分子標的ホウ素担体

ホウ素担体として BNCT 用ホウ素化合物に求められる要件や特性等は、総説等^{2), 3)}で報告されているが、ここでは我々がホウ素化合物開発の指標としている要件の一部を示した。

- ①腫瘍細胞に対する選択的集積性
 - ・腫瘍細胞／正常細胞の比率 (T/N 比) が3以上
 - ・20-40 ppm の腫瘍内ホウ素濃度
- ②がん細胞に高発現する受容体や輸送体などを標的分子として、ホウ素を選択的、かつ効率的に送達し得る“分子標的ホウ素担体”としての特性
- ③血中投与に耐える低毒性と安全性の保障
- ④PET や SPECT などによる動態のイメージング化が可能
- ⑤1分子あたりのホウ素占有率が高く中性領域で水溶性

これまでに BNCT のホウ素薬剤候補として多くのホウ素化合物や DDS が報告されているが、臨床実績を有するのはホウ素アミノ酸の BPA と籠型ホウ素クラスターの BSH の2つに止まっている (図2)。BPA は分子標的ホウ素担体として、腫瘍に特異的に高発現する中性アミノ酸輸送系 LAT1 を介して輸送・集積され、上記の多くの要件にも適合している。活発な細胞増殖を続けるがん細胞では、増殖に不可欠な糖やアミノ酸などに対する栄養要求性が旺盛で、ワールブルク効果に代表される特異なエネルギー獲得系や輸送系が報告されている。BPA や FBPA の輸送に関係する中性アミノ酸輸送系 LAT にはサブタイプが存在し、この内、LAT1 は多くのがん腫で、また LAT2 は正常細胞に発現することが知られている⁴⁾。このようながん細胞の特異な栄養要求性に基づく代謝や輸送系に着目した分子標的ホウ素担体は、高い T/N 比と集積性の要件を同時に達成し得る可能性があり、この領域における新規化合物の開発が期待されるところである。また、今後の分子標的ホウ素担体の開発研究においては、これまでの腫瘍内ホウ素濃度、T/N 比の要件に加え、集積機構、体内動態、イメージング化を重視した研究が主流になっていくと考えられる。

4. ホウ素化合物の組織・細胞内分布の可視化と BPA の分布解析

BNCT ではその原理から、ホウ素化合物 (ホウ素担体) は細胞膜上に存在するのではなく、細胞内に集積することが理想であると考えられている。このような観点から、ホウ素化合物の細胞内分布や集積機構の解析は、新規なホウ素化合物の研究開発におい

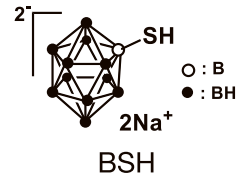
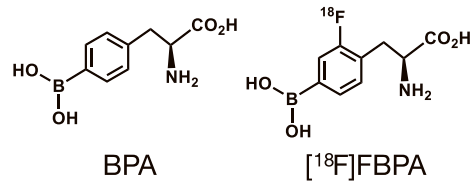


図2 BNCT に臨床実績のあるホウ素化合物

て非常に重要であると考えられる。

これまでに、ホウ素薬剤の組織・細胞内分布を可視化するための手法としてαオートラジオグラフィーや Nano-SIMS など、様々な方法が報告されている。筆者らは、BPA や BSH を特異的に認識するモノクローナル抗体や、ホウ酸基・ボロン酸基と錯体を形成して蛍光を発する「ホウ素センサー」⁵⁾を開発、腫瘍細胞内に取り込まれた種々のボロン酸誘導体を可視化することに成功し、BPA の腫瘍細胞内分布を可視化した。図3に示したように BPA は細胞核、細胞質を含む細胞全体に広く均一に分布しており、この画像は BPA-BNCT の高い奏効率を裏付けている。我々はまた、「ホウ素センサー」を用いて BPA、FBPA の取り込みをライブセルで可視化、画像化にも成功している⁶⁾。今後、進展が予想される新規な分子標的ホウ素担体の開発研究においては、可視化のための誘導体化やツール分子の開発と同時に、これらを用いる解析手法の確立が課題になると考えられる。

5. PET プローブ [18F]FBPA による BPA の動態解析

BPA とその [18F] フッ素標識体である [18F]FBPA (以下、¹⁸FBPA、図2) は、同じアミノ酸の母核を有し、両者は、LAT1 を介する腫瘍内選択輸送をはじめ、ほぼ同様の生物活性と動態を示すことが知られている⁷⁾。また、BPA-BNCT の臨床においては、¹⁸FBPA PET (陽電子断層撮影) 診断による、BPA の取り込み状況や T/N 比等を総合的に評価して BNCT 適応の可否が判断され、治療計画に活用されている。腫瘍に選択集積する ¹⁸FBPA

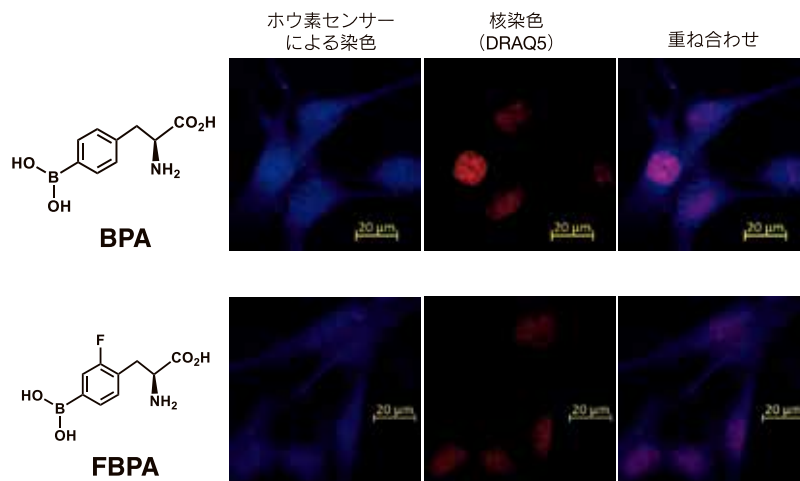


図3 BPA および FBPA の生細胞内分布

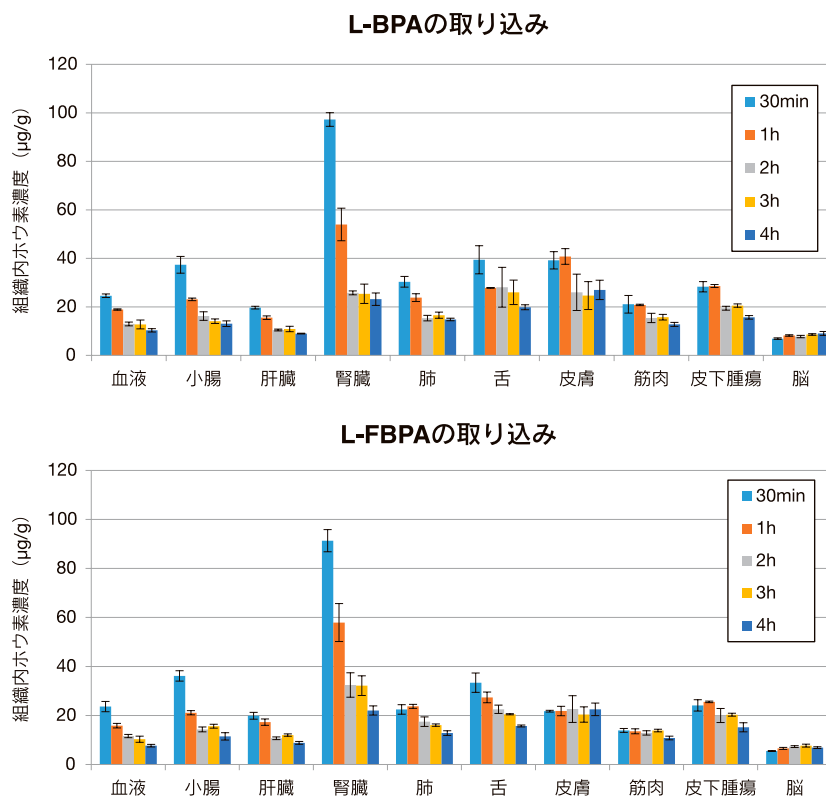


図4 SCC-VII細胞担持マウス中のホウ素薬剤の分布

は、BNCT 治療のみならず、PET がん検査・診断のプロープ分子としても有用で、適用研究が進んでいる。BPA は BNCT 治療に、また、その標識体 ^{18}F BPA は診断に有効であることから、BPA は広い意味でのセラノスティックス (theranostics) な化合物と考えられる。

我々はこのような ^{18}F BPA の幅広い有用性に着目し、従来の求電子的フッ素化 (エフプラス) 法に代わる求核的フッ素化 (エフマイナス) 法を考案し ^{18}F BPA の新規大量合成法を確立した⁸⁾。

6. おわりに

概念提唱から 86 年を経て、頭頸部がんを対象に 2020 年 6 月に始まった BPA-BNCT は悪性脳腫瘍、悪性黒色腫、血管肉腫などを対象として適応拡大が図られている。一方、BNCR による損傷と修復機構の分子や遺伝子レベルでの解明や新規ホウ素化合物の開発など、BNCT には残された課題も多い。BNCT は広範で多様な学術領域と要素技術を包含する集学的がん治療でありこれらの叡智を結集した学術基盤の確立とさらなる高度化が望まれる。

[参考文献]

- 1) G. L. Locher, *Am. J. Roentgenol. Radium Therapy*, **1936**, 36, 1.
- 2) A. H. Soloway, W. Tjarks, B. A. Barnum, F.-G. Rong, R. Barth, I. M. Codogni and J. G. Wilson, *Chem. Rev.*, **1998**, 98, 1515-1562.
- 3) H. Nakamura, M. Kiriha: Boron Compounds: New Candidates for Boron Carriers in BNCT, "Neutron Capture Therapy" ed by W. A. G. Sauerwein, A. Wittig, R. Moss and Y. Nakagawa, Springer, Heidelberg, **2012**, 99-116.
- 4) J. Miyabe, R. Ohgaki, K. Saito, L. Wei, L. Quan, C. Jin, X. Liu, S. Okuda, S. Nagamori, H. Ohki, K. Yoshino, H. Inohara and Y. Kanai, *Journal of Pharmacological Science*, **2019**, 139, 215-222.
- 5) Y. Hattori, M. Ishimura, Y. Ohta, H. Takenaka, T. Watanabe, H. Tanaka, K. Ono and M. Kiriha, *Organic & Biomolecular Chemistry*, **2015**, 3(25), 6927-6930.
- 6) Y. Hattori, M. Ishimura, Y. Ohta, H. Takenaka and M. Kiriha, *ACS Sens.*,

2016, 1(12), 1394-1397.

- 7) T. Watanabe, Y. Hattori, Y. Ohta, M. Ishimura, Y. Nakagawa, Y. Sanada, H. Tanaka, S. Fukutani, S.-I. Masunaga, M. Hiraoka, K. Ono, M. Suzuki and M. Kiriha, *BMC Cancer*, **2016**, 16(1), 859-859.
- 8) 切畑光統、革新的 PET プロープ分子 ^{18}F BPA の効率的合成法の開発とがん特異的集積能の検証評価、次世代がん医療創生研究事業成果報告書、日本医療研究開発機構、p. 59、2022 年 3 月。

[著者プロフィール]

氏名：服部 能英 (YOSHIHIDE Hattori)

所属：大阪公立大学 BNCT 研究センター

〒599-8531 堺市中区学園町 1-1

TEL 072-254-6424

FAX 072-254-6421

E-mail: YHattori@omu.ac.jp

出身学校：近畿大学大学院総合理工学研究科 理学専攻

学位：博士 (理学)

専門分野：生物有機化学、ケミカルバイオロジー

現在の研究テーマ：ホウ素薬剤の合成・評価・分布解析

氏名：切畑 光統 (MITSUNORI Kiriha)

所属：大阪公立大学 BNCT 研究センター

〒599-8531 堺市中区学園町 1-1

TEL 072-254-6424

FAX 072-254-6421

E-mail: kirihata@omu.ac.jp

出身学校：大阪府立大学大学院農学研究科農芸化学専攻

学位：農学博士

専門分野：生物有機化学、ケミカルバイオロジー、ホウ素薬剤化学

現在の研究テーマ：BNCT 用新規ホウ素薬剤の開発研究

関連製品

アミノ酸取り込み検出キット

Amino Acid Uptake Assay Kit

詳しい製品内容・実験例は

<特長>

- ・アミノ酸取り込み能力を簡便に検出できる
- ・蛍光顕微鏡、プレートリーダー、フローサイトメーターを用いて検出が可能

アミノ酸 同仁

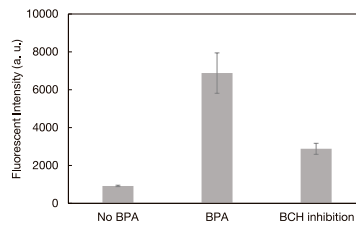
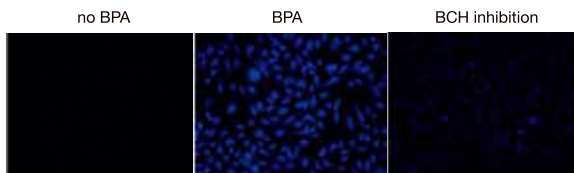
検索

本製品に採用されているホウ素アミノ酸 (boronphenylalanine; BPA) は、大型中性アミノ酸と同様に LAT を経由して細胞内に取り込まれます。取り込まれた BPA と特異的に結合し蛍光を発するプローブを用いることで、アミノ酸の取り込みを検出できます。

< LAT 阻害剤 BCH を用いたアミノ酸取り込み阻害実験 >

Amino Acid Uptake Assay Kit を用いて LAT 阻害剤 BCH によるアミノ酸取り込み阻害を確認した。

BCH : 2-aminobicyclo[2.2.1]heptane-2-carboxylic acid



細胞 : HeLa
前処理 : 0 or 1 mmol/l BCH / HBSS、37 °C、5 min
取込条件 : 0 or 1 mmol/l BCH / BPA / HBSS、37 °C、5 min
検出装置、測定波長 :
蛍光顕微鏡
DAPI (Ex = 340-380 nm, Em = 435-485 nm)
プレートリーダー
Ex = 360 nm Em = 460 nm

※本キットは大阪公立大学 切畑光統先生から技術指導、情報提供をいただき開発した製品です。

シスチン取り込み検出キット

Cystine Uptake Assay Kit

詳しい製品内容・実験例は

<特長>

- ・シスチン取り込み能力を簡便に検出できる
- ・プレートリーダーを用いて検出が可能

シスチン 同仁

検索

本製品に採用されている Selenocystine は、シスチンと同様に xCT を経由して細胞内に取り込まれます。取り込まれた Selenocystine と特異的に反応し蛍光を発するプローブ FODa を用いることで、シスチンの取り込みを測定できます。

グルコース取り込み検出キット

Glucose Uptake Assay Kit-Blue, -Green, -Red

詳しい製品内容・実験例は

<特長>

- ・既存法 (2-NBDG) よりも高感度
- ・簡便な操作と短時間での染色が可能
- ・染色後の色素の漏れ出しを軽減

グルコース 同仁

検索

本キットに含まれる Glucose Uptake Probes は、既存品 2-NBDG と同様の蛍光標識グルコースです。グルコース類似体であるこれらの試薬はグルコーストランスポーターを介して細胞内に取り込まれるため、蛍光顕微鏡などの蛍光測定法によって細胞のグルコース取り込み能力を測定することができます。

品名	容量	希望納入価格(¥)	メーカーコード
Amino Acid Uptake Assay Kit	20 tests	16,000	UP04
	100 tests	45,000	
Cystine Uptake Assay Kit	20 tests	18,000	UP05
	100 tests	50,000	
Glucose Uptake Assay Kit-Blue	1 set	40,000	UP01
Glucose Uptake Assay Kit-Green	1 set	38,000	UP02
Glucose Uptake Assay Kit-Red	1 set	40,000	UP03

新製品

脂肪酸取り込み検出キット

Fatty Acid Uptake Assay Kit

<特長>

- ・簡便な操作性
- ・蛍光イメージング、プレートリーダー、フローサイトメーターでの高感度測定が可能
- ・細胞の脂肪酸代謝の解析にも利用可能

脂肪酸は、生体がエネルギーを得るために重要な物質です。脂肪酸取り込み能は肥満や糖尿病などの疾患に関わるだけでなく、がん細胞における代謝指標の1つでもあります。細胞増殖が活発ながん細胞は多くの脂質を必要とするため、細胞内における脂肪酸合成や細胞外からの脂肪酸取り込みが活発に行われています。そのため、がん細胞の脂肪酸代謝経路をターゲットとした多くの薬剤が開発されています。

本キットに含まれる Fatty acid analog は脂肪酸トランスポーターを介して細胞内に取り込まれるため、蛍光顕微鏡やフローサイトメーター、プレートリーダーなどの蛍光測定法により、細胞の脂肪酸取り込み能力を測定することが可能です。

また、細胞内に取り込まれなかった Fatty acid analog の蛍光を消去する試薬も組み込まれているため、細胞の洗浄操作を行うことが難しい場合でも、簡便に測定することができます。

<測定原理>

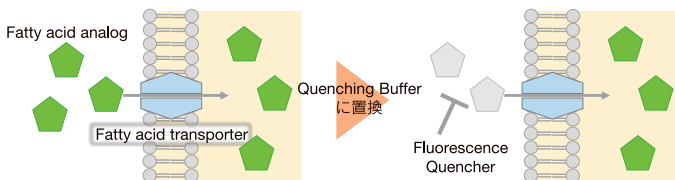


図 Fatty Acid Uptake Assay Kit の測定原理

<簡便な操作性>

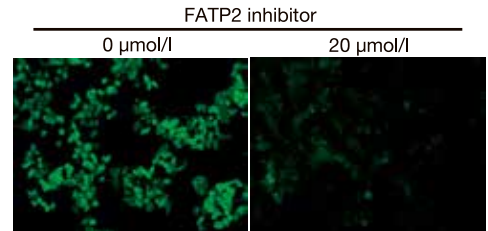
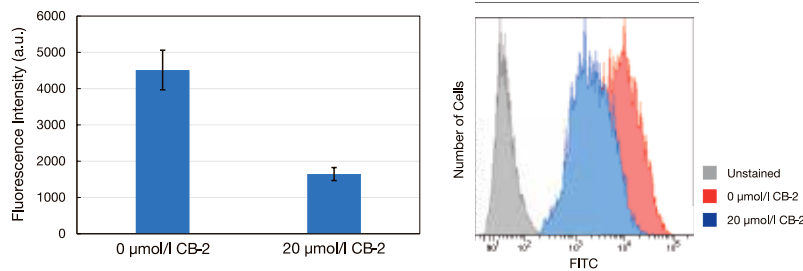


※測定系に合わせて選択いただけます。

Fatty acid analog は脂肪酸トランスポーターを介して細胞内に取り込まれます。細胞内に取り込まれなかった色素は、洗浄操作による除去あるいは、Quenching Buffer を添加することで蛍光を消去します。

<蛍光イメージングなどを用いた高感度測定が可能>

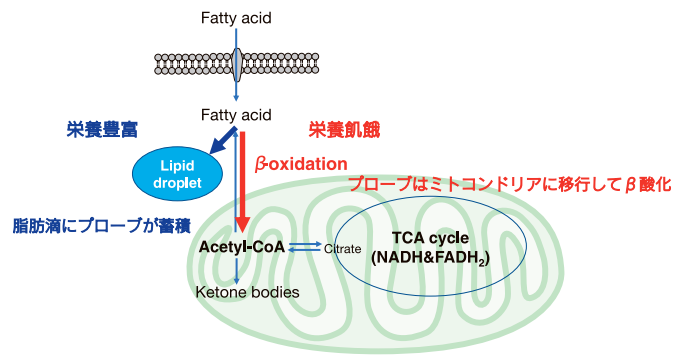
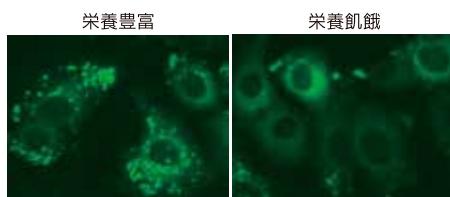
HepG2 細胞を用いて FATP2 阻害剤 (CB-2) による脂肪酸取り込み能の変化を測定しました。蛍光イメージング、プレートリーダー測定、フローサイトメーター測定において、CB-2 処理により HepG2 細胞の脂肪酸取り込み能の低下を高感度に測定できることを確認しました。



細胞: HepG2
 使用培地: DMEM (serum-free)
 刺激条件: 0 または 20 $\mu\text{mol/l}$ FATP2 / DMEM (serum-free)、37°C, 15 min
 染色条件: Fatty acid analog / DMEM (serum-free)、37°C, 15 min
 検出装置、測定波長:
 蛍光顕微鏡 GFP (Ex: 470/40 nm, Em: 525/50 nm)
 プレートリーダー Ex: 490 nm, Em: 530 nm
 フローサイトメーター Ex: 488 nm, Em: 530/30 nm

<細胞の脂肪酸代謝の解析にも利用可能>

Fatty acid analog の細胞内局在を観察することで、細胞内の脂肪酸代謝を見分けることが可能です。細胞が栄養豊富な状態にあるときは脂肪滴に蓄積し、栄養飢餓の状態にあるとミトコンドリアに集積します。



品名	容量	希望納入価格(¥)	メーカーコード
Fatty Acid Uptake Assay Kit	100 tests	32,000	UP07

Topics on Chemistry

分析化学と共に歩んだ 46 年間の軌跡

分析機器の開発の歴史と人的分析の在りし姿とは？

株式会社同仁化学研究所 日高 三男

1. はじめに

「分析化学」は、医薬品、食品、環境分析等様々な分野を支える技術であり、「分析機器」とは「物質の組成、性質、構造、状態等を定性的・定量的に測定する機械、器具又は装置」を指すいわゆる分析手段といえる。更に、これらと密接に関連しているのは「試薬」である。現在まで、多種多様な「試薬」が開発され、その数は百万品目ともいわれている。ちなみに小社で扱うのは、その内の 0.1% に過ぎないが、上市した製品（商品）は、大学や公的機関の研究分野や臨床検査試薬などに幅広く活用されている。ここでは入社以来 46 年の間に試薬の開発と密接に関連した分析装置（機器）の用途とその歴史、更には、試薬の品質を評価する公定法と分析（自動と手動）における問題点について述べたいと思う。表 1 に用途別分類を示す。

2. 分析機器・計測機器の年表

表 2 に分析機器・計測機器の年表を示す。

この年表はラボ用分析機器の電気化学的分析装置をはじめ、上市された分析機器等についてまとめたものである。ここでは、詳細については省略する。

3. 公定法による規格試験の種類

表 3 に公定法による規格試験の種類を示す。

化審法では、「試薬」とは「化学的方法による物質の検出もしくは定量、物質の合成の実験または物理的特性の測定のために使用される化学物質」と定義されているが、日本試薬協会では、「検査、試験、研究、実験など試験研究用途において、測定基準、物質の検出・確認、定量、分離、精製、合成、物性の測定等に用いられものであり、各々の使用目的に応じた品質が規格（JIS 規格や日本薬局方、試薬メーカー各社独自に定めた規格など）で保証され、少量使用に適した供給形態の化学薬品」と定義して工業薬品と明確に区別している。一方、臨床検査試薬は「体外診断用薬品」と称し、一般の試薬とは区別されている。

4. 機器分析（自動分析）と人（手技・手動分析）による分析のメリットとデメリット

例えば、生化学・免疫自動分析装置に望まれる特性を装置サイドと試薬サイドから見た場合、前者においては検体の微量化、迅速性、多項目測定が可能、自動キャリブレーション付帯、分析途中での試薬などの追加が可能、キャリーオーバーがない、液面センサー付き、ノズルつまり検知、操作が簡単で故障が少ない、メンテナンスが容易、小型化、安価であることなどがあげられる。更に、イムノアッセイ法が必要とする条件は、精密性、高感度、微量検体、コストパフォーマンス、測定原理、多項目同時測定、測定値の標準化などがあげられる。これらは、分析機器（装置）全般に共通する特長である。一方、後者は、高感度（検出感度）、測定域が広く再現性が良好、試薬の微量化、品質のロット間差がない、保管・管理が容易、安価であることなどがあげられる。

機器分析（自動分析）のメリットは、保守管理が実施され、正常な状態にある装置・機器を用いた時に、正しい結果が迅速に報告され、そのデータが保証されていることである。つまり精確度（正確で高精度）が良好で標準化された結果が報告されることにある。一方、手技・手動分析のメリットは、小回りが利くことであるが、デメリットは、時間を要する、多検体同時分析の制約、個々人の技量・技術にデータが依存する危険性があることである。そのためには、定期的クロスチェックの実施、使用する分析機器・装置の保守点検（定期点検、使用時点検）、測定原理の習得、使用する装置備品・実験器具の保守管理と得られたデータを分析する能力が必要となる。特に、得られたデータが正常値範囲なのか異常値であるかの判断能力とデータの解析能力が要求される。

表 1 用途別の分析装置一覧

ラボ用（実験・研究用）	①電気化学的分析装置	電位差分析装置、電量滴定装置、ポーラログラフ、導電率系、pH メーター等。
	②光分析装置	UV-VIS（紫外・可視分光光度計）、IR（赤外分光光度計・分散型、フーリエ変換型）、施光光度計、AA（原子吸光光度計）（フレイム式・電気加熱式）、ICP-AES（化学発光分析）、RF（分光蛍光光度計）、色差計、屈折率計等
	③電磁気分析装置	NMR（核磁気共鳴、フーリエ変換型核磁気共鳴）、ESR（電子スピン共鳴）、質量分析装置（GC/MS, LC/MS, ICP/MS）、電子顕微鏡（透過・走査・走査トンネル）等
	④分離・分析装置	HPLC（液体クロマトグラフ）、GC（ガスクロマトグラフ・キャピラリー、バックド）、IC（イオンクロマトグラフ）、TLC（薄層クロマトグラフ）、電気泳動装置等
	⑤熱分析装置	示差熱分析装置、示差走査熱量計（DSC）等
	⑥その他	カールフィッシャー K. Fischer 水分測定装置、粒度分布測定装置、融点測定装置、分析用天秤（上皿天秤、精密天秤）等
医学用（検査・検出装置）	自動分析装置	臨床化学自動分析装置、免疫血清検査装置、輸血血清検査装置、血液検査装置等
環境分析用	①ガス分析・計測装置	ガス検知器（可燃性、酸素、毒性ガス、複合ガス）、ガス分析計（排ガス、酸素、ガスクロマトグラフ）
	②臭気計	臭気計
	③水質・濃度・粘土計測装置	酸化還元電位計（ORP 計）、pH・溶存オゾン・残留塩素・溶存酸素計、透視度・濁度計、導電率計、自動全窒素・全りん測定装置、粘土計
	④騒音・振動計測装置	騒音・振動計測装置
	⑤大気分析・計測装置	大気分析・計測装置
食品分析用		UV-VIS、RF、AA、FT-IR、GC、HPLC、IC、GC-MS、LC-MS、ICP/ICP-MS 等

5. まとめ

今日、分析機器（付随する備品）の更なる開発により、迅速かつ微量サンプルでの高感度分析が可能となってきたが、分析手法は多種多様であり、どの分析機器や検出手法を採用しているかで、その性能に大きな影響を及ぼすために、そこから得られた結果は必ずしも一致しないということは多くの研究者が痛感していることと思う。機器分析は万能と思われがちだが、そこに一つ落とし穴があると考ええる。しかし多くの研究者、技術者のトライアンドエラーの努力があって上市され、それから更にリニューアルされ続けて今日の高感度分析が可能となっているのも事実である。

一方、試薬の用途は多岐にわたり、科学（医学、生化学、化学など）研究・実験、材料の開発、医薬品の開発、品質管理、環境分析、食品分析などに使用されており、機器分析と試薬とは密接に関係しているといえる。分析対象を高感度に、短時間で検出させるものが分析機器であり、分析対象（目的物）と反応して、色、光、熱等が発生させるものが「試薬」＝「色素」といえる。

検出手法により、分光、蛍光、発光分析などが用いられるが、機器分析を行う際には、必ず「人＝手技」が関わってくる。ただ単に、機器の操作をするだけで分析データは簡単に入手できる

時代となってきたが、生体成分や混合物の分離分析のみならず、単一物質の分析を行う場合においても、前処理工程（秤量、溶解、定量、分取、抽出、注入などの工程）が必ず発生する。また、分析機器の開発は、人（手技）による試薬の特性をいかに正確に入手できるかが最も重要となるファクターであり、ここでは今まで培われた人の知識と技術が必要不可欠となる。このように試薬と分析機器とは切っても切れない運命共同体といえる。現在、有機合成を専攻している若い研究者、技術者の知識・技能が新しい試薬（色素）を生み出し、これが今後の分析機器の発展に大きく絡んでくるので、自信をもって日々の研究に励んでいただきたいと思う。

【参考文献】

- 1) 試薬ガイドブック 改訂第3版 製品評価技術基盤機構／日本試薬協会
- 2) 分析機器一覧、医用分析機器（検査装置）(Japan Analytical Instruments Manufacturers Association, JAIMA)
- 3) 臨床検査 23巻7号（1979）(7)
- 4) 医科学 Vol. 80, No. 4 (2010) (11)「これからの自動分析装置」前川真人、濱田悦子

表2 分析機器・計測機器の年表

～1940年代	ポーラログラフ、pH計（ガラス電極式）（ベックマン・コールター）、電子顕微鏡（JEOL）、卓上ガラス電極 pH 計（電気化学計器）、ガス分析装置
1950年代	卓上ガラス電極 pH 計（東亜電波工業）、pH メータ（堀場製作所）、ガスクロマトグラフ（島津製作所）、GC 用熱伝導検出器（TCD）、GC 用水素炎イオン化検出器（FID）（島津製作所）
1960年代	アミノ酸自動分析装置（LC-1）（橋本製作所）、純水測定用導電率計（電気化学計器）、示差走査型熱分析装置、核磁気共鳴装置（NMR）（60MHz）（BRUKER）、分光光度測定記録装置（MAT-1）（自動光度測定）、自動サイクル滴定記録装置（CAT-1）（平沼産業）、電量滴定記録装置（FAT-1）（平沼産業）、卓上型溶液導電率計（CM-01）、カールフィッシャー水分測定装置（MK-SS）（京都電子工業）、電位差自動滴定装置（AT-05）（京都電子工業）
1970年代	カールフィッシャー水分測定装置（MK-A）（京都電子工業）、ガスクロマトグラフ（GC6A）（島津製作所）、カールフィッシャークロマトリー水分計（MK-H）（京都電子工業）、ゼーマン原子吸光度計（日立）、IR、精密天秤（ME215）（ザルトリウス）、旋光度計、原子吸光／フレイム分光光度計（AA-640）（島津製作所）、核磁気共鳴装置（NMR）（200MHz）（BRUKER）、ガスクロマトグラフ（GC7A）（島津製作所）、レポートングタイトレータ（COMTITE-7）（平沼産業）、フューズドシリカキャピラリーカラム、融点測定装置（MP-2）（ヤマト）
1980年代	フューズドシリカキャピラリーカラム（ガスクロ工業）、カールフィッシャー微量水分測定装置（CA-10）（三菱化成）、LC 用蛍光モニター（RF-530）、高速自動分光計（SEPA-200）（堀場製作所）、化学結合型フューズドシリカキャピラリーカラム（ガスクロ工業）、自動滴定装置（COMTITE-7）（平沼）、汎用型高速液体クロマトグラフ（LC6A）（島津製作所）、電子天秤（1475 型）（ザルトリウス）、蛍光分光光度計（日立）、ガスクロマトグラフ（GC8A）（島津製作所）、赤外分光光度計（HITACHI 270-30）、自動滴定装置（AUT-501）（東亜）、自動水分測定装置（KF-05）（三菱）、ダブルビーム分光光度計（U-2000）（日立製作所）、分取液体クロマトグラフ（島津製作所）、オートサンプラー付 pH メーター（HM-60V）、ターンテーブル（TTJ-1）（東亜）、自動滴定装置（COM-900）（平沼産業）、核磁気共鳴装置 NMR（AC-200）（BRUKER）
1990年代	電子顕微鏡：HAADF、EELS、EPMA、自動滴定用プローブ電極、自動電位差滴定装置（AT-410）（京都電子産業）、高速液体クロマトグラフ（LC10A）（島津製作所）、イオンクロマトグラフ（IC7000）（電気浸透型サブレッサー）（横河アナリティカルシステムズ）、電子スピン共鳴装置（ESR JES-FA100）（日本電子）、蛍光光度計（F-4500）（日立）、HPLC 用蛍光検出器（RF-530）、水素炎イオン化検出器（FID-17）（島津製作所）、分光光度計（UV-2200A）（島津）、プレートリーダー、HPLC 用蛍光検出器（10AXL）（島津）、カールフィッシャー水分計（容量式）（MKA-610）（京都電子）、微量水分計（CA-07）（三菱化成）、自記分光光度計（U3000）（日立製作所）、キャピラリーガスクロマトグラフ（GC17AAFw）（島津製作所）、自記分光光度計（U-3000）（日立）、自動滴定装置（平沼）、上皿天秤（PG-503 型）（メトラー）、オートサンプラー付き pH メーター（HM60V）、ターンテーブル（TTT-1）（東亜）、自動滴定用プローブ電極、示差走査熱量計（DSC6200）（セイコーインスツルメンツ）、自動滴定装置（AVT-501）（東亜）、電位差自動滴定装置（AT-510）（京都電子）、キャピラリーガスクロマトグラフ（GC1700）（島津製作所）
2000年代	キャピラリーガスクロマトグラフ（GC2010）（島津製作所）、核磁気共鳴装置 NMR（ECP-300）（日本電子）、液体クロマトグラフィー（LC-10Ai）（島津）、電子天秤（PR503）（メトラー）、導電率計（TOA CM-30G）、精密天秤（ME215S）（ザルトリウス）、カールフィッシャー水分計（容量式）（MKA-610）、（電量式）（MKC-610）（京都電子工業）、930MHz: FT-NMR、CV 測定装置電極交換（Cypress System）、赤外分光光度計（FT/IR-470Plus）（日本分光）、質量分析器 Q Advantage）（Termo electron corporation）、キャピラリーガスクロマトグラフ（GC2014）（島津製作所）、クライオ電子顕微鏡、アタゴ屈折率計（Type3）（ATAGO）、分光光度計（UV-2450）（島津）、融点測定装置（Opti Melt）（Automated Melting Point System）（SRS: Stanford Research Systems）、旋光度計（D-1020）（日本分光）、精密天秤（XP205）（メトラー）、プレートリーダー（TECAN）（ジェニオス）、示差熱量分析装置（DSC 220）（セイコー電子工業）、電子スピン共鳴装置更新（ESR JES-FA100）（日本電子）、蛍光分光光度計（FP-6300）（日本分光）、光度測定用自動滴定装置（京都電子）、フローサイトメーター（FACS Canto2（3 レーザー））（日本ベクトンデッキンソン）、分光光度計（UV-2450）（島津）、電量滴定カールフィッシャー水分計（MKC-610-DT）（京都電子工業）、ハイエンド電動倒立型顕微鏡（Axio Observer Zi）（カルツァイス）、落射型蛍光顕微鏡、電位差自動滴定装置（AT-610-S/2ND）（京都電子）、電気化学アナライザー（Cypress System）

表2 分析機器・計測機器の年表(続き)

2010 年代	分光光度計 (UV-2450)、プレートリーダー (M200PRO) (モノクロメーター、吸光度、蛍光、発光可) (TECAN、インフィニット)、電位差自動滴定装置 (AT-700) (京都電子)、多検体チェンジャー (CHA700)、世界初イオン液体塩橋搭載 pH ガラス複合電極 (堀場アドバンスドテクノ)、キャピラリーガスクロマトグラフ (GC-2014AFsc)、オートインジェクター (AOC-20i) (島津製作所)、電磁式ふるい振盪機 (AS200 コントロール (レッツェ)、EQCM (電気化学と QCM: 水晶振動子マイクロバランス同時測定) アナライザー (エー・エル・エス/ビー・エー・エス)、pH/ 導電率計 (pH、導電率、溶存酸素) (メトラー)、カールフィツシャー水分計 (容量タイプツインビュレット) (MKA610) (MKA-610-TT) (京都電子)、液中パーティクルカウンター (Syring Liquid Sampler) (SLS-1500) (Particle measuring Systems)、核磁気共鳴装置 NMR (AVANCE III 400N) (BRUKER)、マイクロ波硫酸灰化装置 (マイルストーンゼネラル)、電子天秤 (CPA623S) (ザルトリウス)、SECM 走査型電気化学顕微鏡、カールフィツシャー水分計 (容量法 MKV-710、電量法 MKC-710) (京都電子)、電位差自動滴定装置 (AT710)、多検体チェンジャー (CHA-600-12) (京都電子)、紫外・可視分光光度計 (ダブルモノクロメーター) (UV2700)、電子冷熱式恒温セルホルダー (TLC-100) (島津)、施光光度計 (P-1020 用光源 Hg ランプ交換) (日本分光)、融点測定装置 (MPA100 型) (カメラ機能、自動昇温) (スタンフォードリサーチ)、プレートリーダー (Infinite200Pro) (TECAN)、質量分析計 (MS) (SQD2) (ウォータース)、共焦点レーザー顕微鏡 (システムの増設)、紫外・可視分光光度計 (U3900H) (日立)、分光光度計 (UV-2600) (島津)、精密天秤 (XPE205) (メトラー)、蛍光分光光度計 (FP-8300) (日本分光)、電位差自動滴定装置及び多検体チェンジャー (AT-710M) (京都電子)、pH メーター用マイクロ電極、電気伝導率計低電気伝導率用セル (CT-57101C) (東亜 DKK)、光度滴定用自動滴定装置 (AT-710S)、多検体チェンジャー (CHA-700) (京都電子)、複合銀電極
2020 年代	赤外分光光度計 (FT/IR) (FT-4600) (日本分光)、分光光度計 (UV-2600i) (島津)、プレートリーダー (Synergy H1) (アジレント)

※メーカー名は発売当時のもの

表3 公定法による規格試験の種類

日本産業規格 (JIS)	(Japanese Industrial Standards の略) または JIS 規格と通称されており、1949 年以来日本工業規格と呼ばれていたが、法改正に伴い 2019 年 7 月 1 日改称された。日本の産業製品に関する規格及び測定法等が定められた日本の国家規格である。
日本薬局方	初版は明治 19 年 6 月に公布され、今日に至るまで医薬品の開発、試験技術の向上に伴って改訂が重ねられ現在では第十八改正日本薬局方が公示されている。
日本薬局方外医薬品規格	「日本薬局方外医薬品成分規格」から 1993 年に名称変更された規格。医薬品原料や医薬品添加物等の医薬品の成分規格をまとめたもの。
医薬品添加物規格	「日本薬局方外医薬品成分規格」から医薬品添加物が 1993 年に分けられた規格。当初の収載は 206 品目。
医薬部外品原料規格 (外原規)	平成 18 年 3 月 31 日、旧外原規 2006 から新外原規 2021 に改正されている。
薬機法	医薬品、医療機器の品質、有効性及び安全性の確保等に関する法律で、2014 年に薬事法が薬機法に改正されている。

製品取扱説明書案内カード終了

小社キット製品などに同梱しておりました製品取扱説明書案内カードを終了致します。

紙の使用量削減および環境配慮の取り組みにご理解を頂きますようよろしくお願い致します。

なお、取扱説明書はこれまで通り、小社 HP の各製品ページより入手できます。



製品取扱説明書の案内カード

ご存じですか？

小社が分析試薬のメーカーとして広く知られることになった EDTA ですが、4 月の新学期になると EDTA の使い方についての論文がよく検索されているようです。小社の前身である同仁薬化学研究所の社長であった上野景平は多くのキレート化学の書物を上梓しましたが、1959 年当時分析化学誌に投稿した論文¹⁾が、2022 年 4 月の月間アクセス数ランキングでは 1 位となっており、現在でもよく読まれているようです²⁾。なお、2 位の無機化学の分野で著明な研究者である柴田村治先生 (金沢大学) の金属錯体の論文もよく読まれています。執筆された教科書を使われた方も多いのではないのでしょうか。小社では引き続き論文で使用されている分析用指示薬など、分析化学を支える試薬を取り揃えてまいります。

- 1) 上野景平, “EDTA の使い方”, 分析化学, **1959**, 8(3), 207
<https://doi.org/10.2116/bunsekikagaku.8.207>
- 2) J-STAGE 分析化学誌月間アクセス数ランキング (毎月更新)
<https://www.jstage.jst.go.jp/browse/bunsekikagaku/-char/ja>



上野 景平 先生

九州帝国大学工学部応用化学科卒業。同仁薬化学研究所社長、九州大学工学部名誉教授、熊本工業大学工業化学科名誉教授などを歴任。

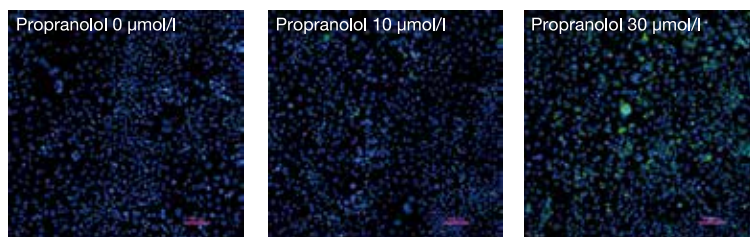
アプリケーションの紹介

ハイコンテンツイメージングによる薬物誘発性脂質症の肝毒性試験

薬物誘発性脂質症や非アルコール性脂肪性肝炎（NASH）は、脂肪滴が蓄積し炎症等を引き起こし病態へと進行します。ここでは、脂肪滴の変化を蛍光顕微鏡で観察を行い、取得した顕微鏡画像から脂肪滴の数・面積・蛍光強度を計測することで脂肪滴の蓄積を解析したアプリケーション例をご紹介します。

<脂肪滴のイメージング>

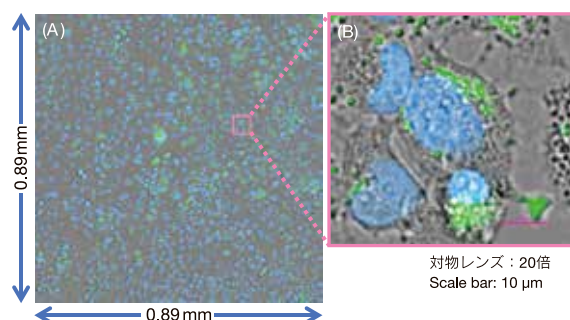
HepG2 細胞にプロプラノロール 0, 10, 30 $\mu\text{mol/l}$ を処理し、脂肪滴を Lipi-Green、核を Hoechst33342 で染色し蛍光顕微鏡（Ti2-E 倒立顕微鏡）を用いて観察しました。その結果、プロプラノロールの濃度依存的に脂肪滴が増加している様子が確認されました。



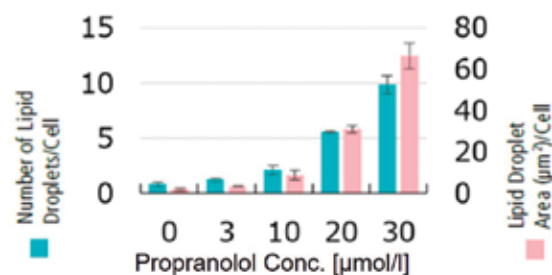
< Ti2-E 顕微鏡 撮影条件 >
核（青：Hoechst33342）：
Ex = 385 nm, Em = 460 nm
脂肪滴（緑：Lipi-Green）：
Ex = 475 nm, Em = 535 nm

<薬剤処理濃度に対する脂肪滴の蓄積を解析>

得られた蛍光画像より、核から細胞数を、脂肪滴から面積、数、蛍光強度を計測し、細胞あたりの脂肪滴の蓄積を解析しました。その結果、プロプラノロールの濃度依存的に脂肪滴の数と面積が増加し、20 $\mu\text{mol/l}$ 以上の濃度条件において、脂肪滴が顕著に形成される結果が得られました。撮影には、ワンショットで広範囲の細胞領域を捉えることができる DS-Qi2 カメラを使用し、解析にはすべての脂肪滴に焦点のあった画像を取得できる NIS-Elements ソフトウェアの EDF モジュールを使用することで、信頼性の高い統計データによる定量解析が可能となりました。



ワンショットの撮影範囲と拡大画像



プロプラノロールの各濃度における解析結果

品名	容量	希望納入価格(¥)	メーカーコード
Lipi-Blue	10 nmol	18,600	LD01
Lipi-Green	10 nmol	18,600	LD02
Lipi-Red	100 nmol	18,600	LD03

※ 35 mm dish : 10 ~ 50 枚分

製品の詳細はこちらから

脂肪滴 同仁

検索

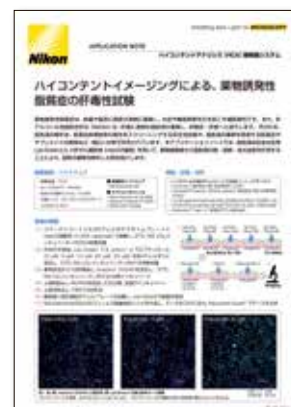
<撮影と解析に使用した機器>

Nikon ハイコンテンツアナリシス（HCA）顕微鏡システム
株式会社ニコン

https://www.microscope.healthcare.nikon.com/ja_JP/products/inverted-microscopes/eclipse-ti2-series

* 染色操作と解析法の詳細は、下記の株式会社ニコン様のページよりご覧いただけます。

https://www.microscope.healthcare.nikon.com/ja_JP/resources/application-notes/hepatotoxicity-test-of-drug-induced-lipidosis-using-high-content-imaging



細胞膜関連研究用試薬

エンドサイトーシスの可視化

ECGreen-Endocytosis Detection

- ・ 小胞輸送系のメカニズム解明 → p.13
- ・ 貪食(ファゴサイトーシス)の可視化
- ・ ウイルス感染経路の可視化 など

エクソソームの精製

ExoIsolator キット → p.16

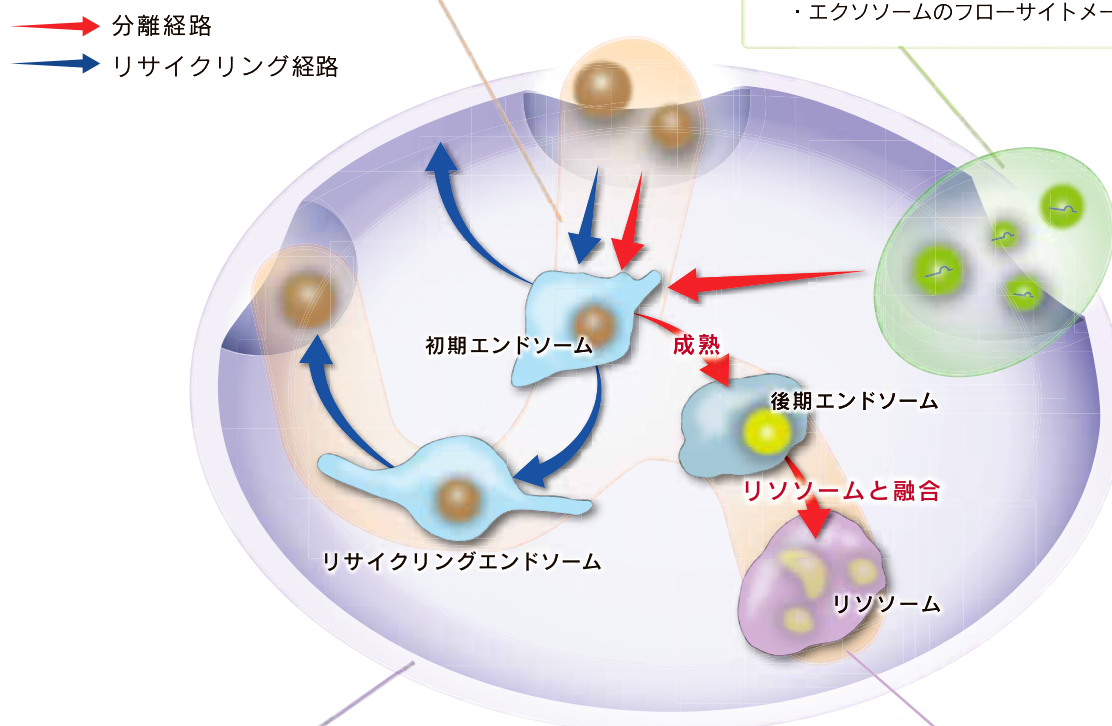
- ・ テクニック不要の簡便な精製キット

エクソソームの可視化

ExoSparkler シリーズ → p.17

(Green, Red, Deep Red)

- ・ 細胞へ取り込まれるエクソソームの可視化
- ・ エクソソームのフローサイトメーター解析 など



細胞膜の可視化

PlasMem Bright シリーズ

- ・ 神経細胞の形態を指標とした毒性評価
- ・ 貪食(ファゴサイトーシス)、エンドサイトーシスの可視化
- ・ 細胞境界面の明確化(細胞数、面積の数値化)
- ・ 脂質ラフトの動態解析 など

膜染色 同仁 検索

品名	容量	希望納入 価格(¥)	メーカー コード
PlasMem Bright Green	100 µl	25,000	P504
PlasMem Bright Red	100 µl	25,000	P505

※ 〈使用回数の目安〉 100 µl あたり、35 mm dish 10 枚、µ-Slide 8 well 10 枚

リソソームの可視化

リソソーム試薬シリーズ

- ・ リソソームの局在位置や機能(pH)の解析
- ・ リソソーム量の数値化・ノーマライズ
- ・ オートファジー・エンドサイトーシスの動態解析 など

リソソーム染色

LysoPrime シリーズ → p.11~13
(Green, Deep Red)

リソソーム pH 検出 → p.14

pHLys Red — Lysosomal Acidic pH Detection

リソソーム量 / pH 検出 → p.15

Lysosomal Acidic pH Detection Kit

新製品

リソソーム染色試薬 Deep Red

LysoPrime Deep Red - High Specificity and pH Resistance

<特長>

- ・リソソームへの特異性が高い
- ・リソソームの pH 変化の影響を受けにくい
- ・長期滞留性

リソソームは不要な物質を分解することで生体内恒常性の維持に寄与しています。リソソームの機能不全は神経変性疾患等の発症・進展に深く関与していることから、リソソームを詳細に解析することが病態の解明や治療薬の開発に有用であると考えられています。リソソームの生細胞解析では低分子蛍光色素を用いたライブイメージングが汎用されてきましたが、特異性や pH 変化による染色能の低下が課題として挙げられてきました。本製品はこれらの課題を解決した製品で、633 nm 励起できる蛍光色素で、多重染色も可能です。

<原理>

既存のリソソーム試薬は、リソソームの正確な局在を観察する際に課題がありました。LysoPrime Deep Red は高いリソソーム指向性を持ち、リソソームの pH 変動に影響されず蛍光強度を維持するため、正確なリソソームの位置や量を観察することができます。

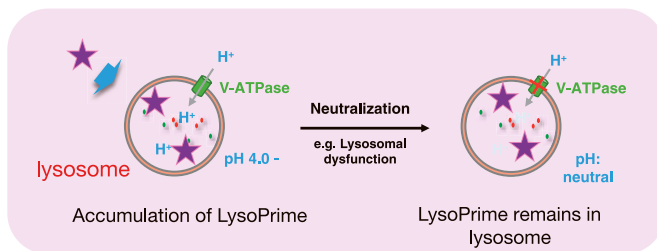


図1 pH 非依存性を持つ LysoPrime Deep Red

<リソソームへの高い特異性>

LysoPrime Deep Red と既存色素とのリソソーム局在性をリソソームマーカータンパク質 LAMP1 発現 HeLa 細胞を用いて比較しました。既存色素による染色ではリソソーム以外にも分散してバックグラウンドが高くなったのに対し、小社の LysoPrime Deep Red は既存色素より、バックグラウンド蛍光が抑えられました。

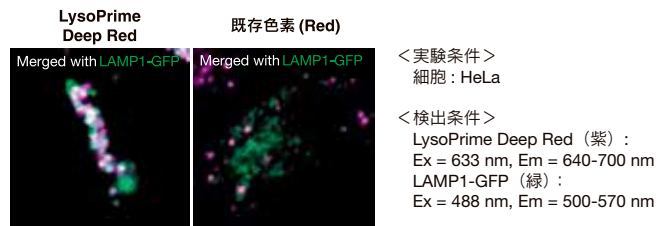


図2 リソソームマーカータンパク質 LAMP1 発現細胞での局在確認実験

<リソソームの pH 変化の影響を受けにくい>

LysoPrime Deep Red と既存色素は酸性状態にあるリソソームに集積する性質を有しますが、リソソーム酸性化阻害剤である Bafilomycin A1 (Baf. A1) で処理すると、既存色素はリソソームから遊離するため蛍光シグナルが著しく低下します。その一方で、小社の LysoPrime Deep Red はリソソームに保持されやすい構造を有するため蛍光シグナルの低下が抑えられました。

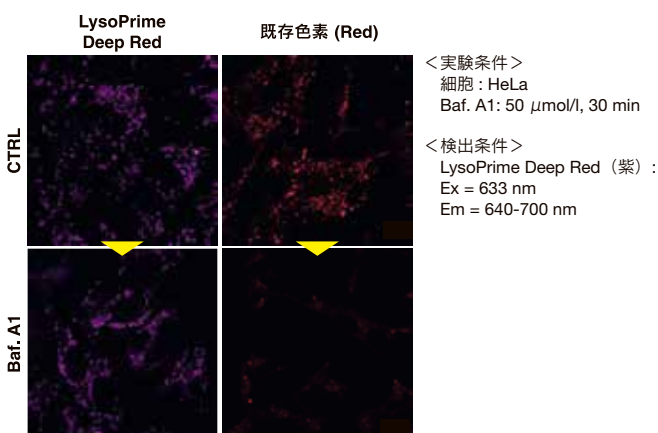


図3 リソソーム酸性阻害剤を用いた pH 依存性評価

<長期滞留性>

LysoPrime Deep Red と既存色素のリソソーム滞留性を HeLa 細胞を用いて比較しました。既存色素による染色では染色後 24 時間後には蛍光が低下したのに対し、小社の LysoPrime Deep Red は既存色素より蛍光輝度は維持され、滞留性が高い結果が得られました。

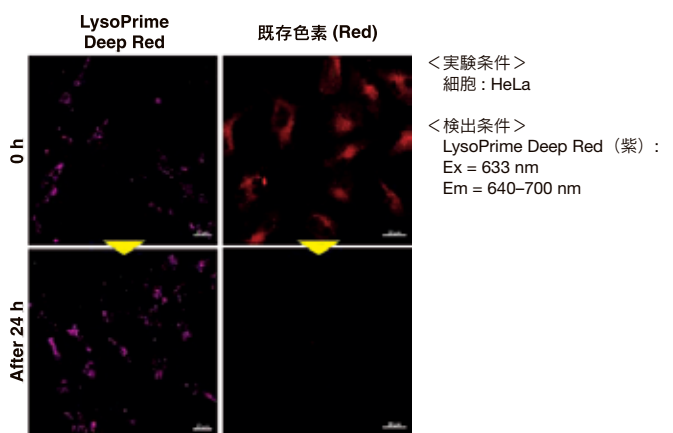


図4 染色直後と 24 時間後の染色像比較

品名	容量	希望納入価格(¥)	メーカーコード
LysoPrime Deep Red - High Specificity and pH Resistance	1 tube	15,000	L264
	3 tubes	30,000	

関連製品

リソソーム染色色素 Green

LysoPrime Green - High Specificity and pH Resistance

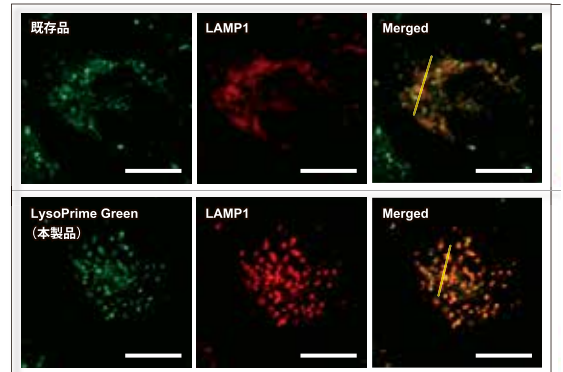
<特長>

- ・リソソームへの特異性が高い
- ・リソソームの pH 変化の影響を受けにくい

<実験例：リソソームへの特異性の高さ>

既存色素と LysoPrime Green（本製品）のリソソーム局在性を LAMP1-RFP 発現 HeLa 細胞を用いて比較しました。既存色素に比べ本製品ではバックグラウンドが抑えられる結果が得られました。（蛍光画像 Merged）

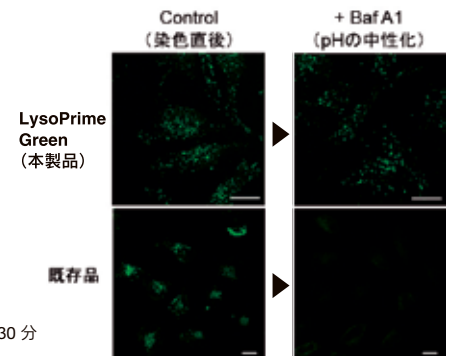
Green : Ex = 488 nm , Em = 500-570 nm
Red : Ex = 561 nm , Em = 560-620 nm
スケールバー : 20 μ m



<実験例：pH 非依存の確認実験>

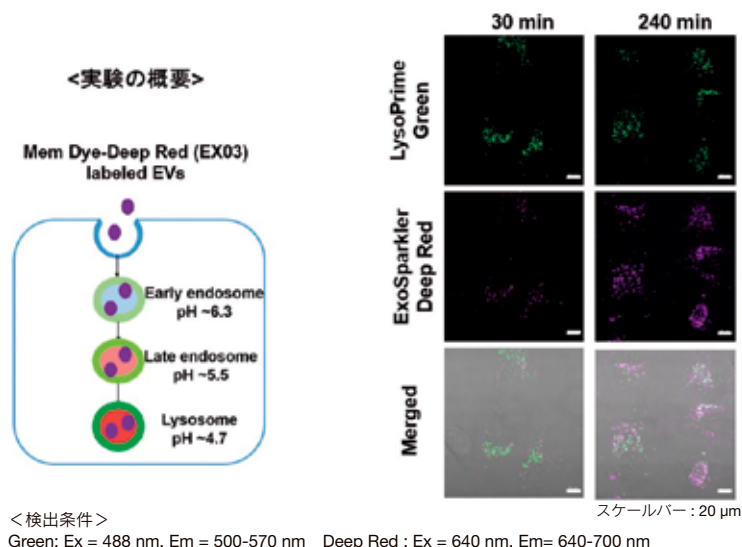
本製品および既存色素は酸性状態にあるリソソームに集積する性質を有しますが、リソソーム酸性阻害剤である Bafilomycin A1 (Baf. A1) で処理すると、既存色素は蛍光シグナルが著しく低下します。一方、本製品ではリソソームに保持されやすい構造を有するため蛍光シグナルの低下が抑えられました。

細胞 : HeLa
染色条件 :
LysoPrime Green working solution (2000 倍希釈)、37℃、30 分
Baf. A1 100 nmol/l、37℃、30 分

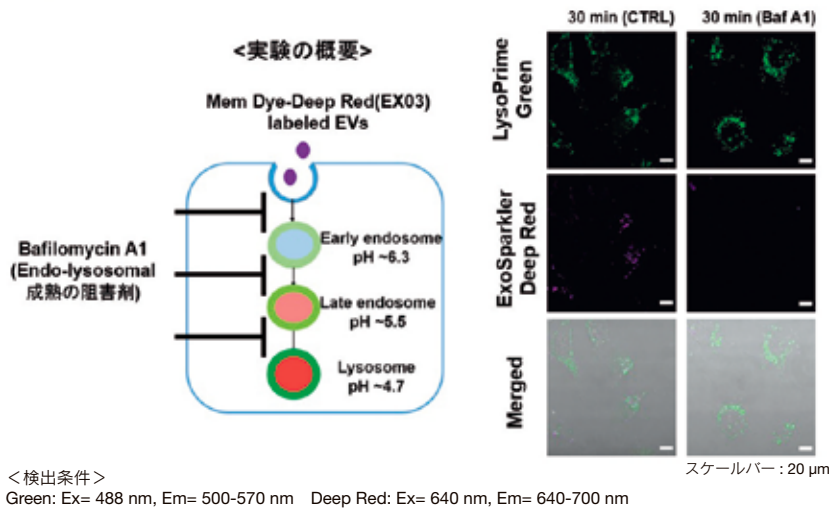


<エクソソーム染色試薬との併用実験例>

LysoPrime Green で染色した HeLa 細胞に、ExoSparkler Exosome Membrane Labeling Kit-Deep Red（メーカーコード：EX03、本誌 p.17）を用いて染色したエクソソームを添加して蛍光イメージングを行いました。LysoPrime Green の蛍光シグナルは低下せず経時的なリソソームの局在が確認されました。一方、ExoSparkler Deep Red の蛍光シグナルは増加し時間依存的なエクソソームの取り込み量の増加が確認されました。



また、エンドソームからリソソームへの成熟を阻害する薬剤である Baf. A1 を添加した細胞群と比較を行いました。LysoPrime Green の蛍光シグナルは低下せず経時的なリソソームの局在が確認されましたが、ExoSparkler Deep Red の蛍光シグナルは Baf. A1 添加群で確認されませんでした。このことより Baf. A1 によりエンドサイトーシスの成熟が阻害されていることがわかりました。このように、両方の試薬を組み合わせることによりエンドソームからリソソーム経路を詳細に解析することが可能になります。



品名	容量	希望納入価格(¥)	メーカーコード
LysoPrime Green - High Specificity and pH Resistance	10 μ l	13,000	L261
	10 μ l $\times$ 3	27,000	

エンドサイトーシス検出試薬

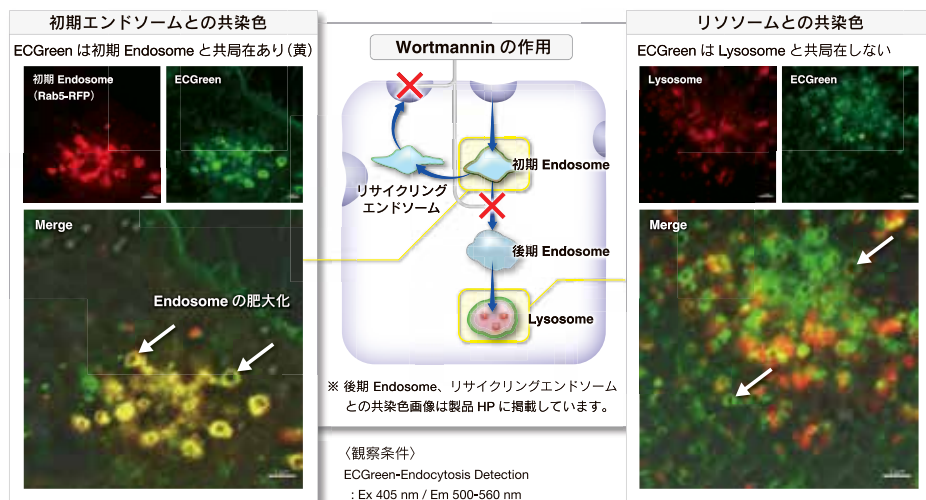
ECGreen-Endocytosis Detection

<特長>

- ・より正確にエンドサイトーシスを可視化できる
- ・生細胞でエンドサイトーシスを追跡できる
- ・pH 変化に対する応答性が高い

<実験例：細胞内小胞輸送系を鮮明に可視化>

Wortmannin はエンドソームのリサイクリングやリソソームへの移行を阻害し、エンドソームの肥大化を引き起こすことが知られています。Wortmannin によるこれらの変化を ECGreen と初期エンドソームマーカータンパク質 Rab5-RFP（蛍光タンパク質）との共染色、および ECGreen とリソソーム染色試薬との共染色で確認しました。その結果、Wortmannin 添加時には ECGreen は肥大化したエンドソーム (Rab5-RFP) と共局在 (左図: Merge) し、リソソームとは共局在しない (右図: Merge) ことが確認できました。これらの結果から、ECGreen は細胞内小胞輸送系の変化を可視化できることがわかりました。



品名	容量	希望納入価格(¥)	メーカーコード
ECGreen-Endocytosis Deteciton	40 μ l	45,000	E296

※<使用回数の目安> 40 μ l あたり、35 mm dish 20 枚、 μ -Slide 8 well 20 枚

新製品

リソソーム pH 検出用色素

pHLys Red - Lysosomal Acidic pH Detection

<特長>

- ・リソソームへの特異性が高い
- ・リソソームの pH 変化を高感度に検出する
- ・長期滞留性

リソソームは不要な物質を分解することで生体内恒常性の維持に寄与しています。リソソームの機能不全は神経変性疾患等の発症・進展に深く関与していることから、リソソームを詳細に解析することが病態の解明や治療薬の開発に有用であると考えられています。pHLys Red は細胞内の正常なリソソームに集積し、酸性環境下で蛍光が増強します。一方、リソソーム機能が下がり、リソソームの pH が上昇すると、リソソーム pH 依存的に蛍光強度が減少します。

<原理>

既存のリソソーム pH 検出試薬は、リソソームの正確な局在と感度に課題がありました。pHLys Red はリソソーム pH の変動に鋭敏に蛍光強度を変化させ、さらに高いリソソーム指向性から得られる蛍光輝度は正確なリソソーム pH を表すことができます。

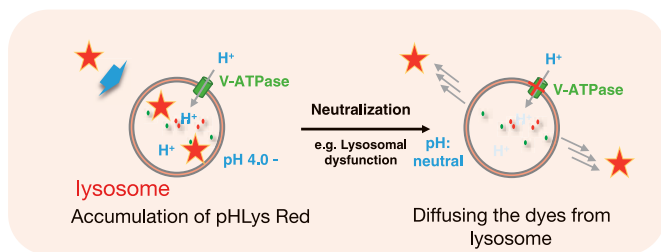


図1 pH 依存性を持つ pHLys Red

<リソソームへの高い特異性>

pHLys Red と既存色素とのリソソーム局在性をリソソームマーカータンパク質 LAMP1 発現 HeLa 細胞を用いて比較しました。既存色素による染色ではリソソーム以外にも分散してバックグラウンドが高くなったのに対し、小社の pHLys Red は既存色素より、バックグラウンドが抑えられました。

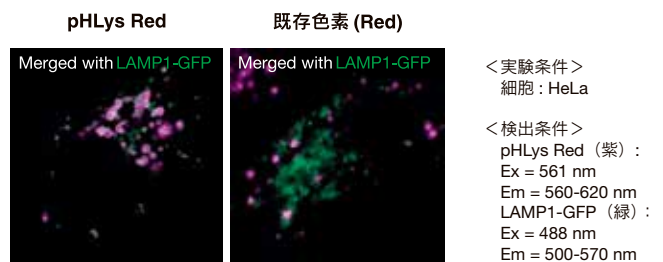


図2 リソソームマーカータンパク質 LAMP1 発現細胞での局在確認実験

<リソソームの pH 変化を高感度に検出する>

pHLys Red と既存色素 (pH センサー) のリソソーム pH の感受性を HeLa 細胞を用いて比較しました。リソソーム酸性化阻害剤である Bafilomycin A1 (Baf. A1) を低濃度加えると、既存色素は pH 変化を捉えられなかったのに対し、小社の pHLys Red は既存色素より鋭敏に蛍光強度を変化させ、pH 感受性が高い結果が得られました。

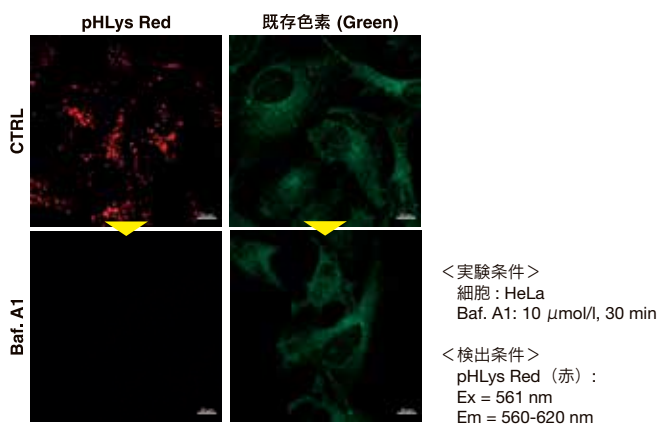


図3 リソソーム酸性阻害剤を用いた pH 感受性評価

<長期滞留性>

pHLys Red と既存色素のリソソーム滞留性を HeLa 細胞を用いて比較しました。既存色素による染色では染色後 24 時間後には蛍光が低下したのに対し、小社の pHLys Red は既存色素より蛍光輝度は維持され、滞留性が高い結果が得られました。

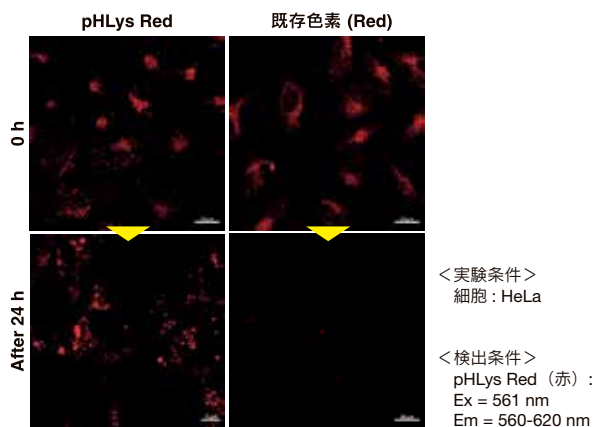


図4 染色直後と 24 時間後の染色像比較

品名	容量	希望納入価格(¥)	メーカーコード
pHLys Red - Lysosomal Acidic pH Detection	1 tube	28,000	L265
	3 tubes	48,000	

新製品

リソソーム pH 検出キット

Lysosomal Acidic pH Detection Kit

<特長>

- ・リソソームの pH 変化を正確に検出する
- ・初めて使用される方向け オールインワンキット

リソソームは不要な物質を分解することで生体内恒常性の維持に寄与しています。リソソームの機能不全は神経変性疾患等の発症・進展に深く関与していることから、リソソームを詳細に解析することが病態の解明や治療薬の開発に有用であると考えられています。既存の色素を使用し機能を解析した場合、単一の色素の蛍光輝度のみで議論するため、リソソームの量が増減したのか、機能 (pH) が変化したのかを判別することが困難でした。小社の Lysosomal Acidic pH Detection Kit は、リソソーム pH に依存的な蛍光の変動を示す pHlys Red と、抵抗性の LysoPrime Green で構成されています。これらを組み合わせてリソソーム pH と量を同時解析することで、リソソーム機能の詳細な解析が可能です。

<原理>

本キットは、リソソーム pH に依存的な pHlys Red と、抵抗性の LysoPrime Green で構成されています。pHlys Red は、リソソーム機能の低下によってリソソームの pH が中性化すると蛍光強度が減少します。一方、LysoPrime Green は、リソソームの pH 変化に抵抗性があるため、蛍光強度が変化しません。リソソームの pH に依存的なもしくは抵抗性で集積性を示す 2 種類の色素を組み合わせることで、リソソーム pH とリソソーム量を測定し、正確なリソソーム pH の変化を検出できます。

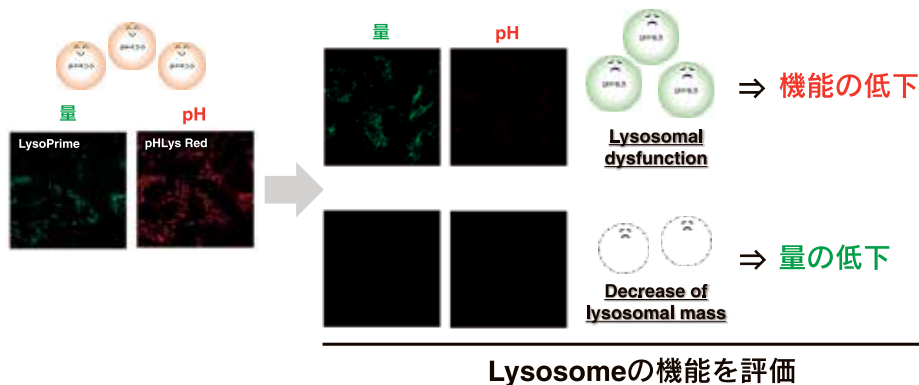
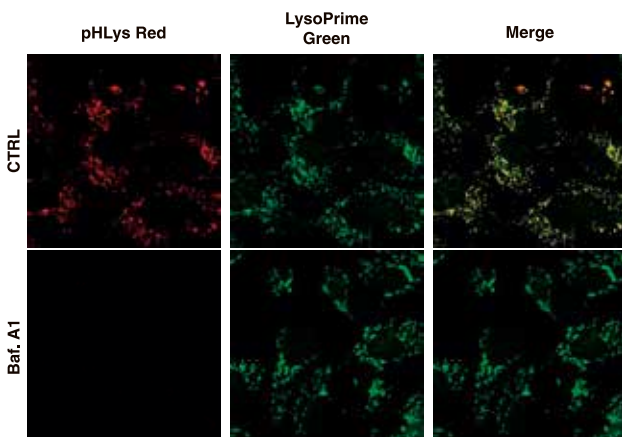


図1 リソソーム量と pH の同時測定による、リソソーム機能の詳細な解析

<リソソームの pH 変化を正確に検出する>

本キットを用いて、リソソーム酸性阻害剤 (Baf. A1) を用いたリソソームの量と pH 変化の検出を行いました。LysoPrime Green の蛍光は、Baf. A1 添加にかかわらず殆ど変化しませんが、pHlys Red は Baf. A1 添加に伴うリソソーム中性化により蛍光の低下が観察されました。リソソーム pH に依存的な pHlys Red と、抵抗性の LysoPrime Green を組み合わせて正確なリソソーム pH 変化を確認しました。



<初めて使用される方向けの> オールインワンキット

キットコンポーネント

- ・リソソーム量検出色素 LysoPrime Green
- ・リソソーム pH 検出色素 pHlys Red
- ・リソソーム pH 酸性化阻害剤 Bafilomycin A1

<実験条件>
細胞: HeLa

<検出条件>
pHlys Red (赤): Ex = 561 nm Em = 560-620 nm
LysoPrime Green (緑): Ex = 488 nm Em = 490-550 nm

図2 リソソーム酸性阻害剤 (Baf. A1) を用いたリソソームの pH 変化の検出

品名	容量	希望納入価格(¥)	メーカーコード
Lysosomal Acidic pH Detection Kit	1 set	38,000	L266

関連製品

エクソソーム精製キット・キット用フィルター

Exsolulator Exosome Isolation Kit

EX10 同仁

[検索](#)

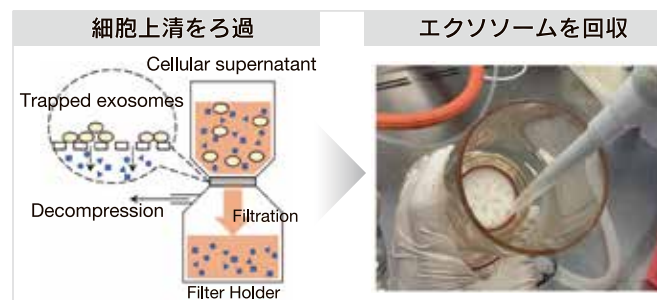
<特長>

- ・細胞培養上清のフィルトレーションだけでエクソソームを精製可能
- ・エクソソームの回収率は超遠心法と同等
- ・超遠心機等の高額な機器は不要

本製品の使い方動画やよくある質問をHPにて公開中です。

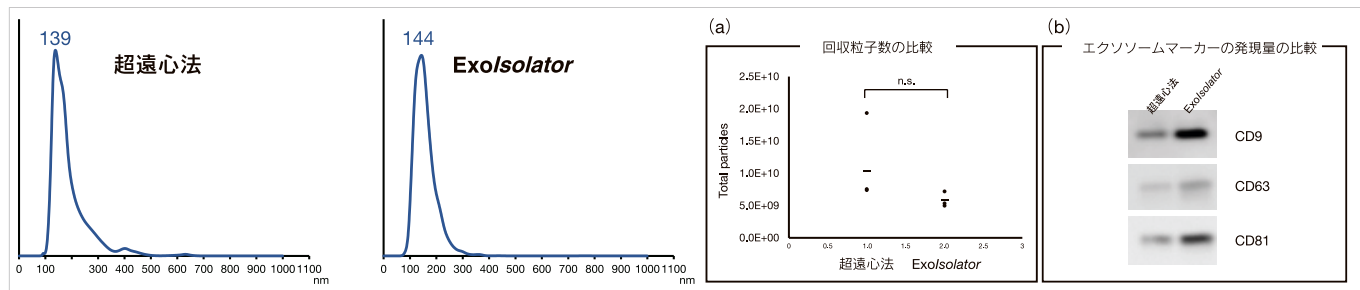
細胞が分泌する細胞外小胞 (Extracellular vesicle: EV) の一種であるエクソソームは、さまざまなタンパク質や核酸などを内包しており、エクソソームを介して内包物質が伝達されることで、受け手側の細胞にいろいろな影響を与えることが明らかとなっております。近年、特にがん研究分野では悪性化や転移に促進的に寄与することから注目を集めています。

Exsolulator Exosome Isolation Kit は、培養上清中に分泌されたエクソソームをフィルトレーションの操作だけで簡単に、短時間で回収することができるキットです。



<超遠心法と同等の回収実績>

エクソソーム回収法で最も良く使用される超遠心法と本キットのそれぞれを用いて、HEK293S 細胞の培養上清から回収したエクソソームの粒度分布 (下記左図)、粒子数 (下記右図 (a)) とエクソソームマーカーの発現量 (下記右図 (b)) を比較しました。結果、本キットで回収されたエクソソームは超遠心法と同等の粒度分布を示しており、回収できた粒子数も同等で、さらにエクソソームマーカーが多く発現していることがわかりました。



超遠心法と Exsolulator の比較 (左図: ナノ粒子トラッキング解析結果、右図: 回収粒子数とマーカータンパク発現量の結果)

品名	容量	希望納入価格(¥)	メーカーコード
Exsolulator Exosome Isolation Kit	3 tests	73,000	EX10
Exsolulator Isolation Filter	10 pieces	89,000	EX11

学会展示のご案内

● Iron, Reactive Oxygen Species & Ferroptosis in Life, Death & Disease

日程: 2022 年 10 月 10 日 (月) ~ 14 日 (金)
会場: 淡路夢舞台国際会議場 (兵庫)

●第 18 回 がんとハイポキシア研究会

日程: 2022 年 11 月 25 日 (金) ~ 26 日 (土)
会場: 桐生市市民文化会館 (群馬)

●第 45 回 分子生物学会 (日本生物物理学会 共催)

日程: 2022 年 11 月 30 日 (水) ~ 12 月 2 日 (金)
会場: 幕張メッセ (千葉)

●第 21 回 日本ミトコンドリア学会

日程: 2023 年 3 月 16 日 (木) ~ 18 日 (土)
会場: 帝京大学 (東京)

展示ブースにて小社担当者がお待ちしております。ぜひお立ち寄り下さい。



関連製品

エクソソーム染色キット

エクソソーム膜 蛍光染色キット

ExoSparkler Exosome Membrane Labeling Kit-Green, Red, Deep Red

エクソソームタンパク質 蛍光染色キット

ExoSparkler Exosome Protein Labeling Kit-Green, Red, Deep Red

<特長>

- ・細胞外で凝集しない
- ・キットだけで蛍光標識から精製まで可能
- ・エクソソームの性質にほとんど影響しない



ExoSparkler Exosome Membrane Labeling Kit-Deep Red 及び S 社製品 P (緑または赤) で染色したエクソソームを HeLa 細胞へ添加し、細胞内へ取り込まれるエクソソームを蛍光顕微鏡で確認した結果、ExoSparkler シリーズでは色素の凝集が見られなかったのに対し製品 P (緑または赤) で染色したエクソソームでは、色素の凝集が疑われる細胞外の蛍光輝点を確認されました。

<観察条件>

ExoSparkler Exosome Membrane Labeling Kit-Deep Red (紫) :
Ex 640 nm / Em 640-760 nm

S 社 製品 P (緑) :
Ex 488 nm / Em 490-540 nm

S 社 製品 P (赤) :
Ex 561 nm / Em 570-640 nm

品名	容量	希望納入 価格(¥)	メーカー コード
ExoSparkler Exosome Membrane Labeling Kit-Green	5 samples	25,000	EX01
ExoSparkler Exosome Membrane Labeling Kit-Red	5 samples	25,000	EX02
ExoSparkler Exosome Membrane Labeling Kit-Deep Red	5 samples	25,000	EX03
ExoSparkler Exosome Protein Labeling Kit-Green	5 samples	20,000	EX04
ExoSparkler Exosome Protein Labeling Kit-Red	5 samples	20,000	EX05
ExoSparkler Exosome Protein Labeling Kit-Deep Red	5 samples	20,000	EX06

※精製済エクソソーム（超遠心法）として、タンパク質：1-10 µg/sample、粒子数：10-100 × 10⁸ 個/sample

お役立ち

エクソソーム研究学術セミナー第2回 アーカイブ動画案内

大好評のエクソソームセミナー第1回に引き続き、第2回目のセミナーを去る2022年6月16日に開催致しました。今回も多数のご参加をいただきありがとうございました。講師には、最前線でご活躍されておられる東京医科大学 吉岡祐亮先生を再びお迎えし、エクソソーム研究における課題点と実験の進め方についてご講演をいただきました。先生のご協力のもと、本セミナーのアーカイブ動画配信を公開しました。エクソソーム研究やエクソソームに興味がある方必見の内容となっておりますので、是非ご視聴ください。また、本誌176号では総説もご執筆頂いておりますので、合わせてご参照ください。



吉岡 祐亮 先生
東京医科大学
医学総合研究所

動画視聴はこちら



エクソソームセミナー 同仁

検索

今後開催予定のセミナーやイベントなど、お役立ち情報をメール配信しています。

登録はこちら



開発者が語る試薬の使い方
フォーラム・イン・ドージン
...etc.

セミナー 同仁

検索



第32回フォーラム・イン・ドージン開催後記 「生命現象に関わる細胞外小胞の多彩な役割 ヴェールを脱ぐエクソソーム」

新型コロナウイルス感染拡大により今年もオンライン開催となったが、演者の先生方には熊本にお越しいただき、細胞外小胞研究の最新のご研究内容を熊本より発信していただいた。本フォーラム代表世話人の熊本大学富澤一仁先生から、「エクソソームは高い関心を持たれ、飛躍的に発展している分野である。診断・治療と高いポテンシャルを備えており、本日はこの分野をリードする落谷先生、そして若手の先生方をお迎えし、最新のご研究内容を発表していただく」と述べられ、午前のセッションがスタートした。

最初の演者である東京医科大学落谷孝広先生は、エクソソーム研究の始まりからエクソソームの新たな定義までの概要を説明された。最新の研究では、がん細胞や疾患細胞から分泌される EV によるリキッドバイオプシー、がん転移メカニズムの解明、EV を用いたドラッグデリバリーシステムの開発、さらには間葉系幹細胞が分泌する EV の再生医療への利用等、幅広い分野への応用が期待されることを説明された。併せて当社のエクソソーム精製キットをご紹介いただきながら、大量サンプルからの単離精製技術の確立の必要性を説かれた。今後の課題として当社も取り組んでいきたい。続いて東京医科大学吉岡祐亮先生は、エクソソームを用いたリキッドバイオプシーについてご講演された。吉岡先生はエクソソームを用いた膵臓がんのバイオマーカーを開発し、ステージⅠの膵臓がん患者でも従来の腫瘍マーカーである CA19-9 や CEA より精度よく診断できる可能性を示された。エクソソームは多種多様な細胞から分泌されることから、がん以外の疾患の診断への応用も期待されると締めくくられた。熊本大学押海裕之先生は、miR-192 が老化特異的な miRNA であることを発見され、老化した個体の血中 EV で上昇することを示された。老化マウスはインフルエンザ全粒子ワクチン接種後の抗体産生が低下するが、炎症性サイトカインの産生を抑制する miR-192 含有 EV を投与することで特異抗体価は若齢マウスと同程度まで回復することが観察され、miRNA を含む EV は、ワクチン効果の向上や免疫関連疾患治療の可能性を示された。

午後のセッションは早稲田大学西田奈央先生のご講演から始まった。西田先生は、EV を介したがん細胞の組織環境内での情報伝達についてご講演された。がん細胞の環境の変化および組織構造により、分泌される EV に多種多様な変化がみられる。がん組織内の EV 挙動を調べるために、がん組織および正常組織由来の組織スライスを作製し、原発腫瘍内や転移先臓器での EV の取り込みや受け渡しの観察結果を紹介された。東京医科大学ブエリト・ピラマルタ先生は、心筋細胞由来 EV による心筋繊維症治療および心筋再生への応用について講演された。心血管系疾患は、線維芽細胞の異常活性化による心筋の繊維化によって引き起こされる。Rock 阻害剤 Y-27632 処理により線維芽細胞活性化マーカーおよび細胞外マトリックスが低下すること、さらには高血圧モデル動物に EV 処理することで心筋の非繊維化効果がみられ、成体心筋細胞由来の EV の利用は、心筋繊維化の治療法として有望であることが示された。

コーヒブレイクの後の京都大学下田麻子先生は、レクチン糖鎖相互作用を利用したレクチンマイクロアレイ法を使うことで、回収してきた EV の高感度解析が可能であること、さらに EV 表面糖鎖をリモデリングすることで、培養細胞への取り込み効率やマウスでの各臓器への集積量の違いが観測されたことから、表面糖鎖のリモデリングによるドラッグデリバリーシステム (DDS) への有用性を示された。なお、蛍光染色には当社のエクソソーム膜染色色素が使われていた。東京医科大学梅津知宏先生は、キントラノオ科植物であるアセロラ由来エクソソーム様小胞が核酸医薬の DDS 単体として有用であることを示された。アセロラ由来エクソソーム様小胞と核酸の複合体が、単層培養した腸管上皮細胞および血管内皮細胞層を通過したことから、小腸上皮での取り込みが可能であることが示唆され新たな DDS としての可能性を示された。

世話人である熊本大学三隅将吾先生の閉会の挨拶では、「疾患は細胞内のコミュニケーション不足から生じていることを改めて実感した。EV は天然のデリバリーシステムとして細胞間のコミュニケーションに大きく関与している。今後 EV 研究は、診断・治療、さらには多くの応用研究に広がることを期待したい」と締めくくられた。

最後に昨年に引き続き今年のフォーラムでも、アンケートにご回答いただいた方に景品（商品券または同仁化学研究所の選りすぐりの製品）をご用意した。皆様のご意見を今後の製品開発に取り入れていくために、製品を手に入れられた方は、ご使用後の感想、ご意見等を当社マーケティング部までお寄せいただきたい。

<https://www.dojindo.co.jp/contact/>

(石山孝宗)



小社へのお問い合わせ等は下記 HP よりお願いします
URL : <https://www.dojindo.co.jp/>

次号テーマ

細胞外酸素