

NanoSight Pro

～ナノ粒子解析システム～



NanoSight

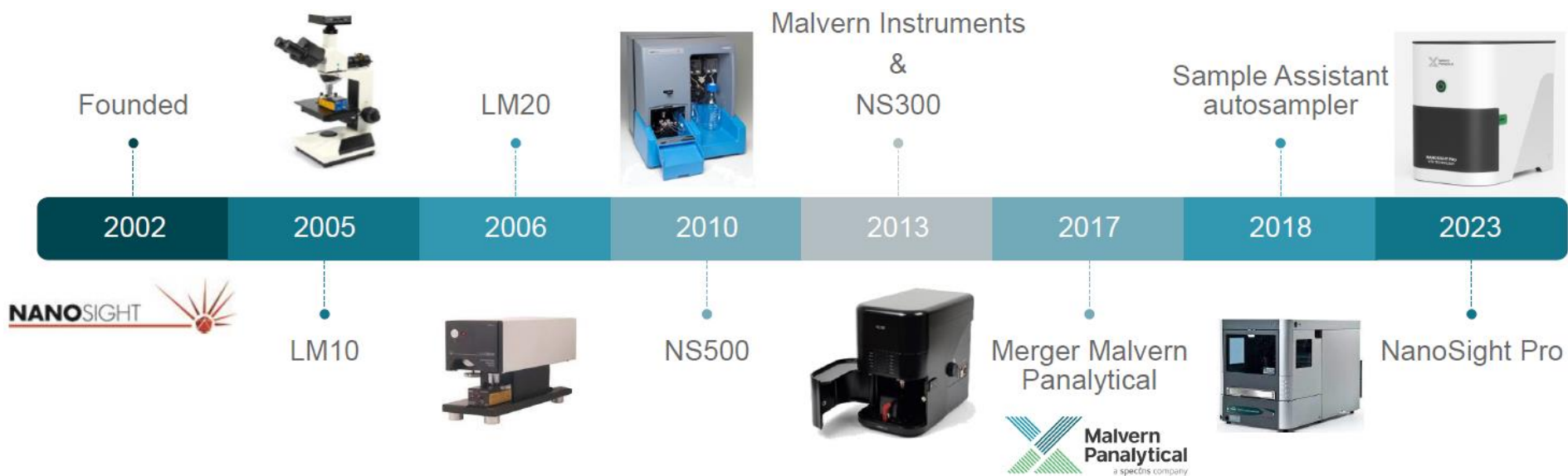
機器の歴史



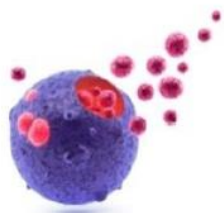
Quantum Design

JAPAN

Nanosight 機器の歴史



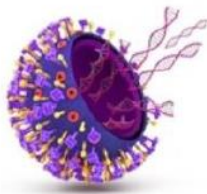
アプリケーション



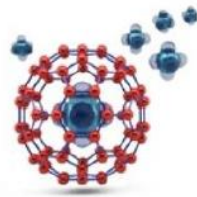
・エクソソーム
・マイクロベシクル



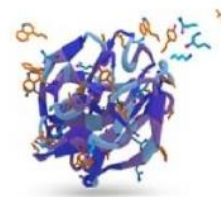
ドラッグデリバリー



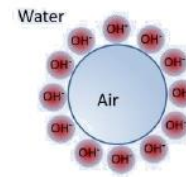
ウイルス
ワクチン



ナノマテリアル



蛋白質の凝集



バブル

NanoSight

ナノ粒子の計測方法



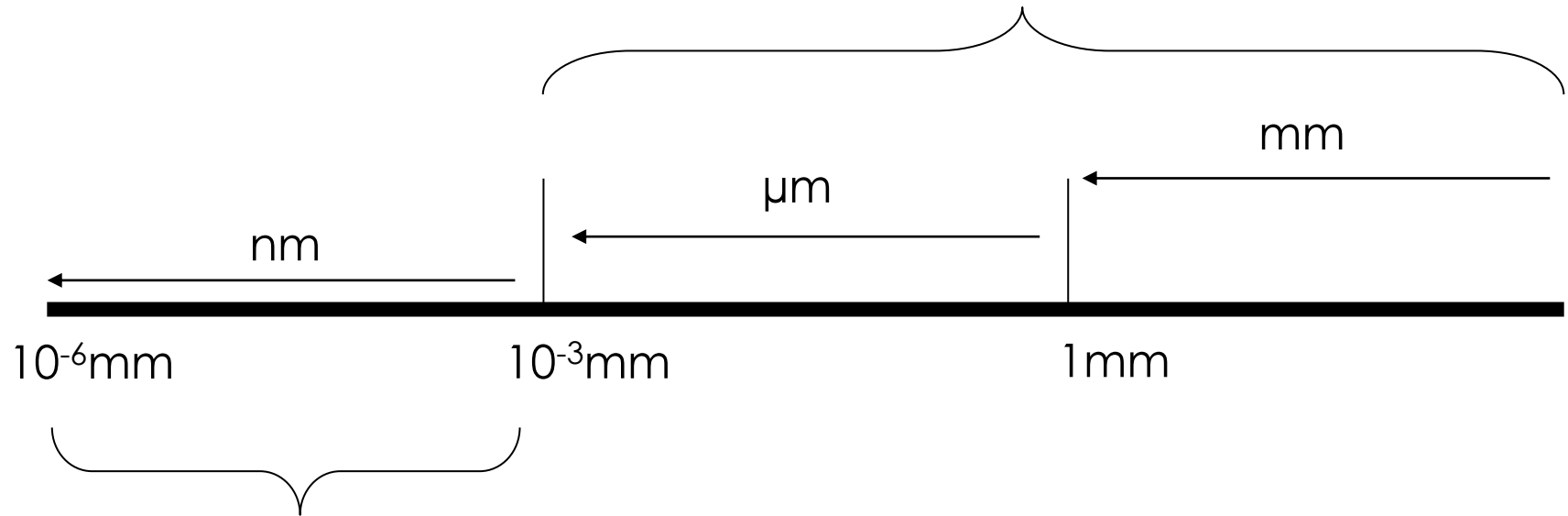
Quantum Design

JAPAN



粒子のサイズ (mm~nm)

画像解析、実体・光学顕微鏡などで計測



目では見えない！光学顕微鏡でも見えない！！

どうやって粒子のサイズを計測する？？？

電子顕微鏡 or その他

多くの測定技術が存在（原理が異なる）



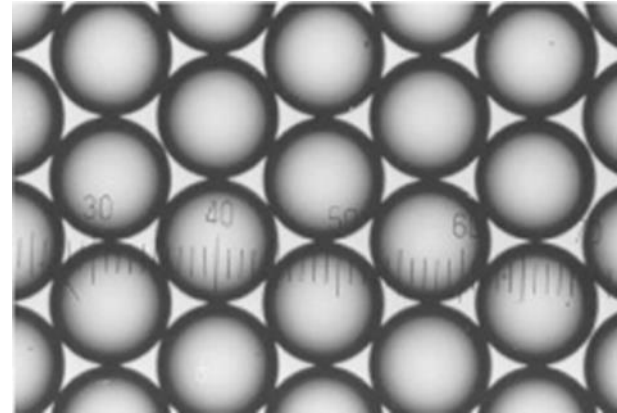


粒子のサイズを計測するには??

●電子顕微鏡

粒子を1個1個計測→ 正確

- 時間
- 液中分散粒子との互換性
- 計測数



●その他 液中分散ナノ粒子の技術

— レーザ一回折法 (Laser Diffraction Method)

粒子散乱光の回折パターンから、粒子径を算出

— 動的光散乱法 (Dynamic light scattering)

散乱光の強度やブラウン運動の情報を利用して粒子径を算出

← NanoSightの測定方法

— 電気的検知帯法 (コールター法)

電気抵抗を測定し、粒子径を算出

など。。





従来の測定方法

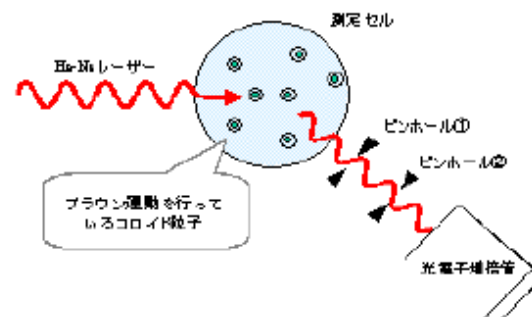


光子相関法(PCS; Photon correlation method)

単一粒子の測定方法として確立された技術(JIS)
散乱光の強度と揺らぎ

周波数解析法

散乱光の揺らぎを周波数に変換



サンプル全体からの情報

得意: 同じ粒子サイズの計測
欠点: わずかなサイズ差は算出できない
反射率などの、物性パラメータが結果に大きく影響



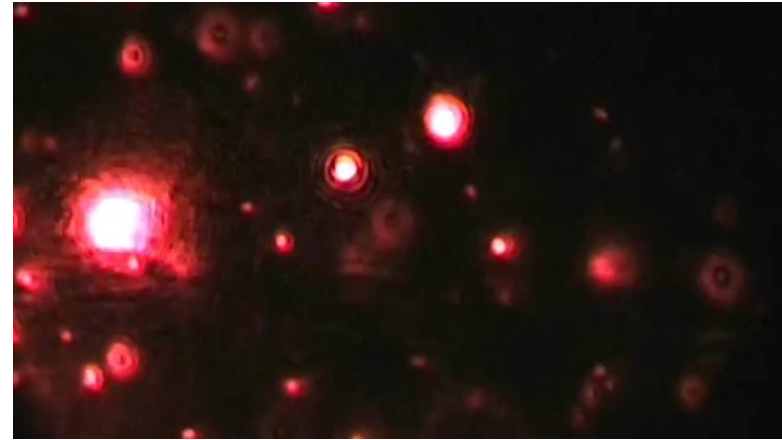


NanoSightの測定方法

ブラウン運動の原理

液中のナノ粒子が、水分子との衝突により絶えず
ランダム運動をする。

運動の大きさは粒子径に依存。
(小さな粒子は、大きな粒子より早く運動)



小さな粒子は大きな粒子より早い運動

→ 1つ1つの粒子の運動を追うことで、
各粒子サイズを知ることができる

トラッキング解析

粒子の平均二乗変位(mean square displacement)・拡散係数(Dt)

サンプル温度(T)、サンプル粘度(η)

個々粒子の流体力学的径(d_h)

$$\langle x, y \rangle^2 = D_t = \frac{K_B T}{3\pi\eta d_h}$$

Stokes-Einstein equation

K_B = Boltzmann Constant

T = temperature

t_s = sampling time

η = viscosity

d_h = hydrodynamic diameter



NanoSight

ナノサイトによる粒子計測



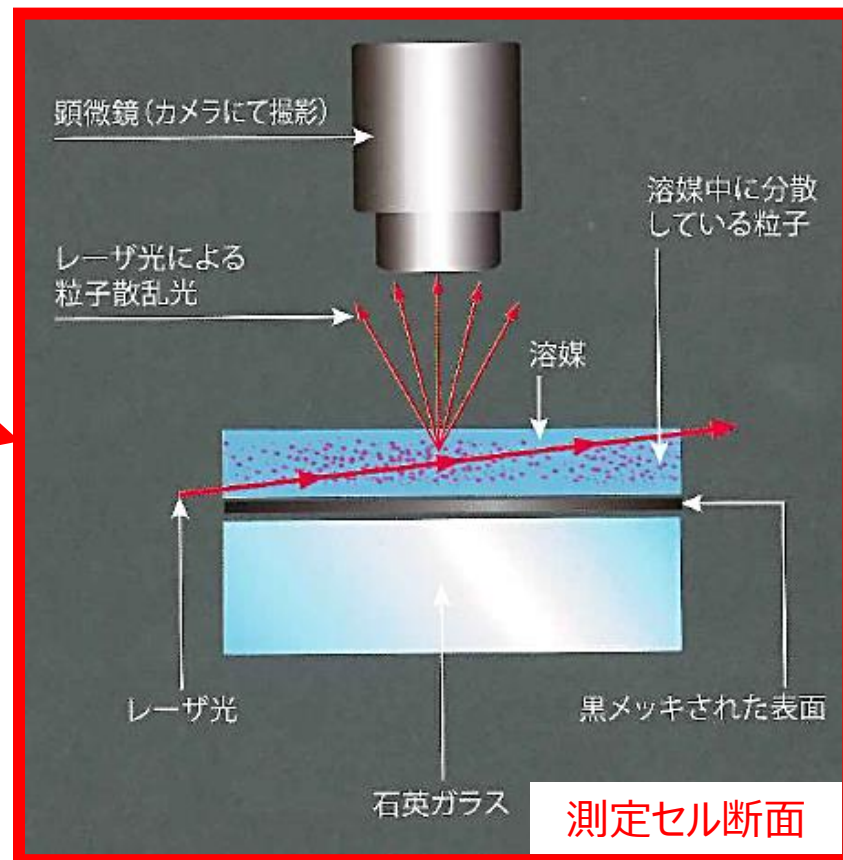
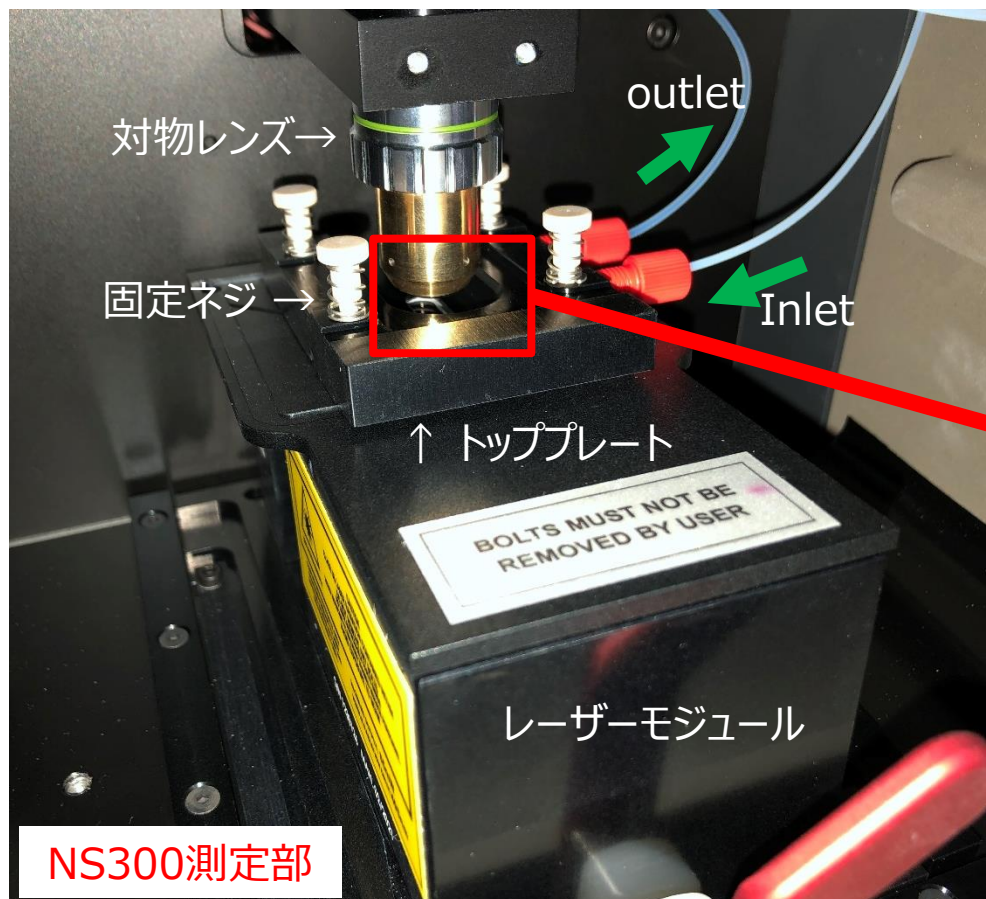
旧機種：ナノサイトNS300本体
sCMOSカメラ搭載



シリンジポンプ

NTAソフトウェアインストール済み
デスクトップPC

測定部



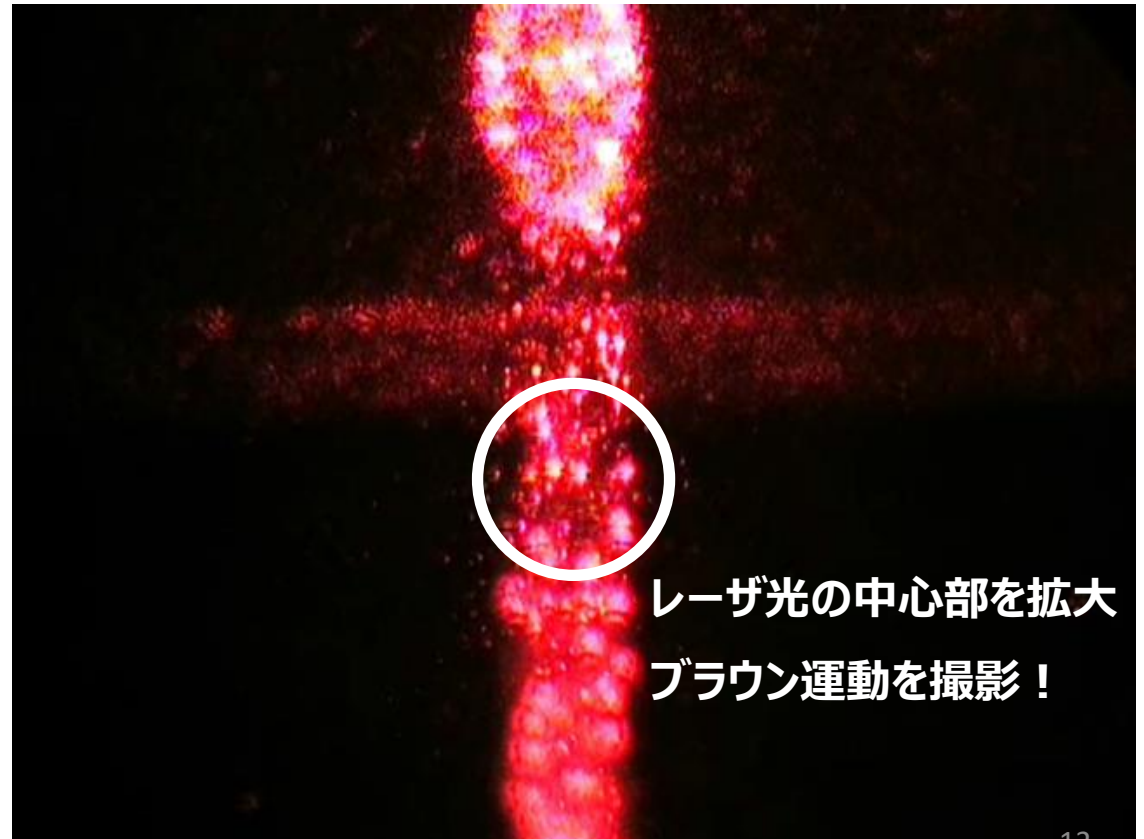
**粒子散乱光をレンズを通してsCMOSにて観測
高倍率(x400)で測定するため、
粒子濃度が薄いものでも測定可能**

ナノ粒子の可視化

サンプル液にレーザを照射



ナノ粒子からの散乱光を観察



レーザ光の中心部を拡大
ブラウン運動を撮影！

ナノ粒子の可視化

レーザー光中心部分の拡大写真
ナノ粒子1つ1つのブラウン運動を観察



※可視化されたのは、**散乱光**となり、“粒子そのもの”の形状ではありません 13

NanoSight

解析の流れ



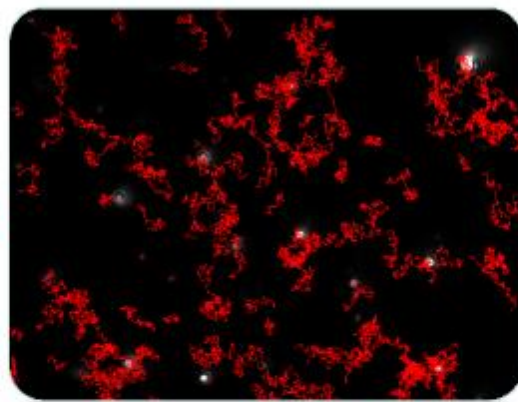
Quantum Design

JAPAN

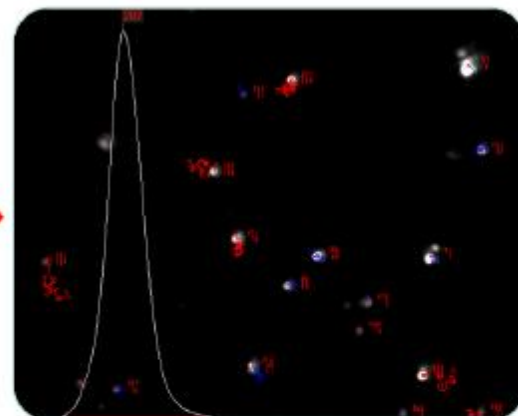
NanoSight 解析の流れ



画像の録画



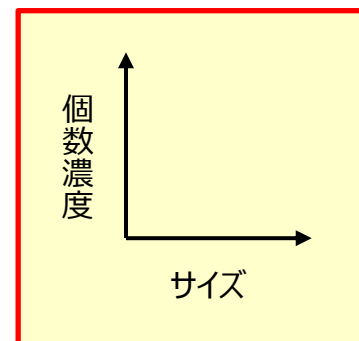
トラッキング解析



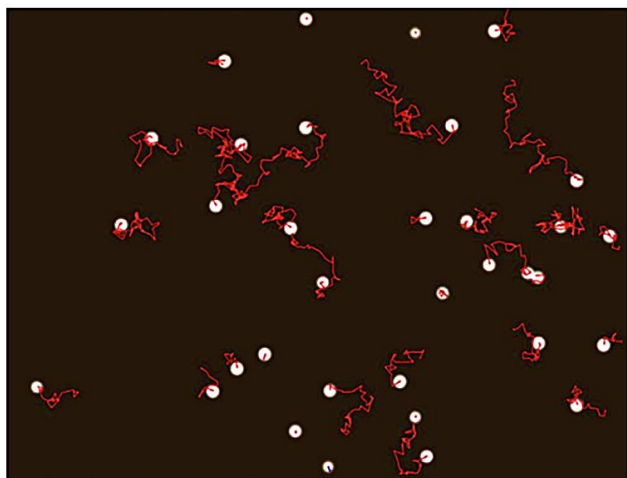
グラフ表示

1つ1つの粒子径を算出
運動の軌跡を表示

粒子径に対する個数分布図

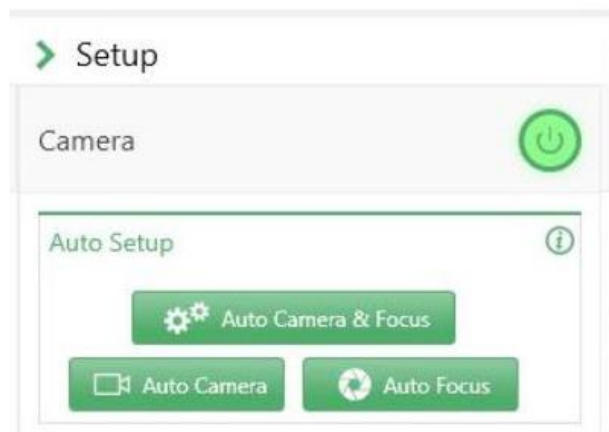


NanoSight Proの特徴



●高感度化

- ・解析ソフトの刷新
- ・フレームレートの向上
- ・微粒子や蛍光粒子の検出率向上



●測定の自動化による時短

- ・カメラレベルやスレッシュホールド等の調整が不要
- ・機械側で測定に対する最適値を選択
- ・測定者間のバラつきが減る事で測定の再現性が向上



取得できる粒度分布図

個数分布 (Number Distribution)

<参考>

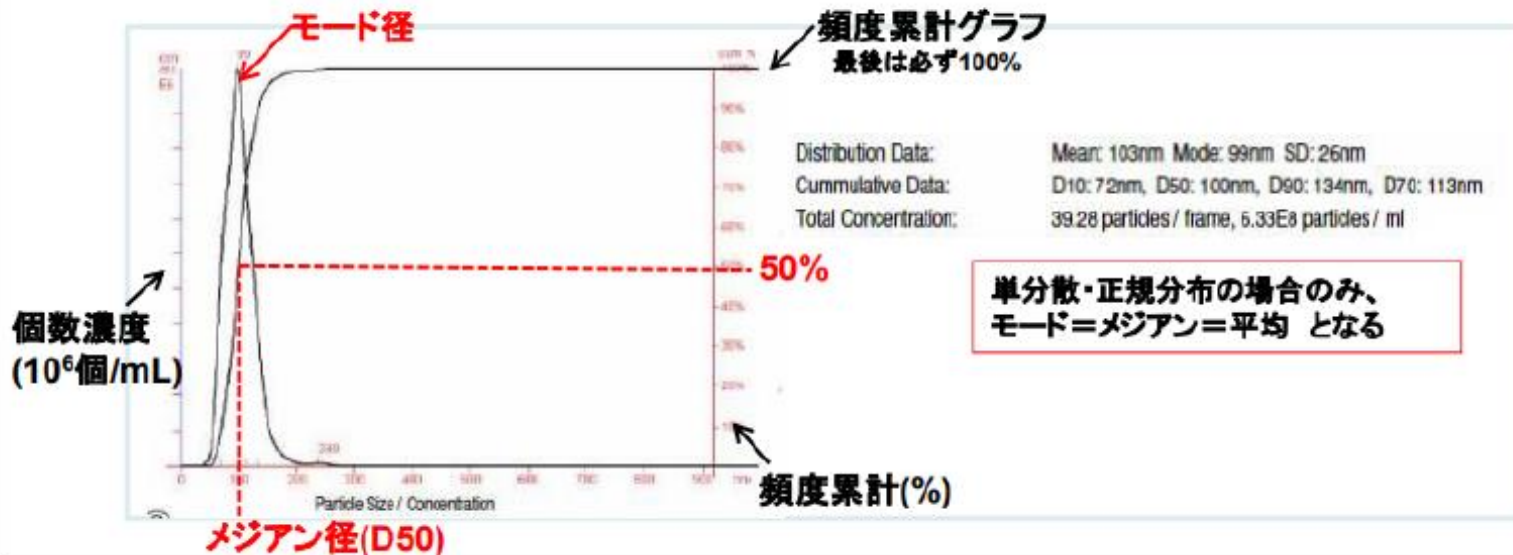
平均粒子径：全粒子の平均。(Mean)

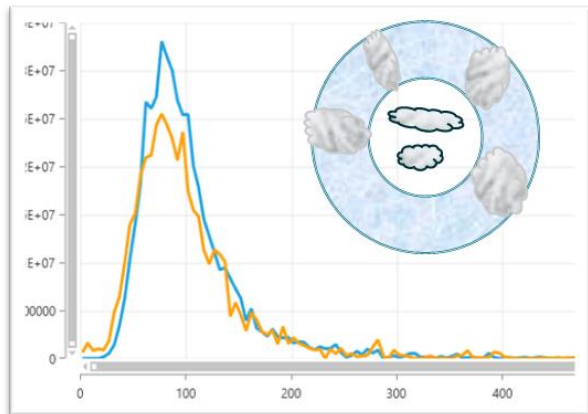
モード径：グラフ表示した際に、ピークが属する分布サイズ。(最頻度粒子径)(Mode)
※グラフ間隔を変えると値も変化する。

D^{**}値：粒子頻度を累計していった際、全体の**%になる粒子径
※小さい粒子から積算する場合(under size)、大きい粒子から積算する場合(over size)がある。

メジアン径：累計頻度が全体の50%になる粒子径(D50)

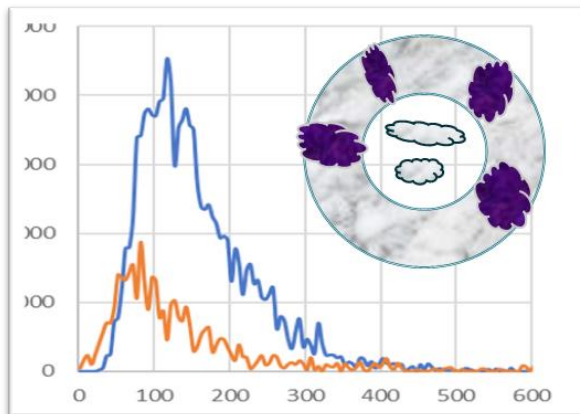
濃度 (Concentration)：1mlあたりの粒子数 以下の例では、6億3300万個/ml





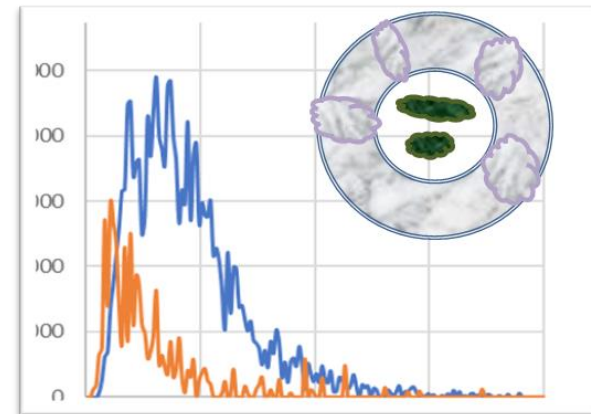
膜染色したエクソソーム

エクソソームの脂質膜を
蛍光染色し測定を行うこと
が可能です。



発現している抗体を 染色したエクソソーム

既存手法では抗体染色した
エクソソームは発現量が
多くないと測定できませんでした。
NanosightProでは検出感度が大
きく向上しております。



脂質膜内部を 染色したエクソソーム

検出感度の向上により
従来は測定が困難であった
サンプルも測定が可能です。

NanoSight

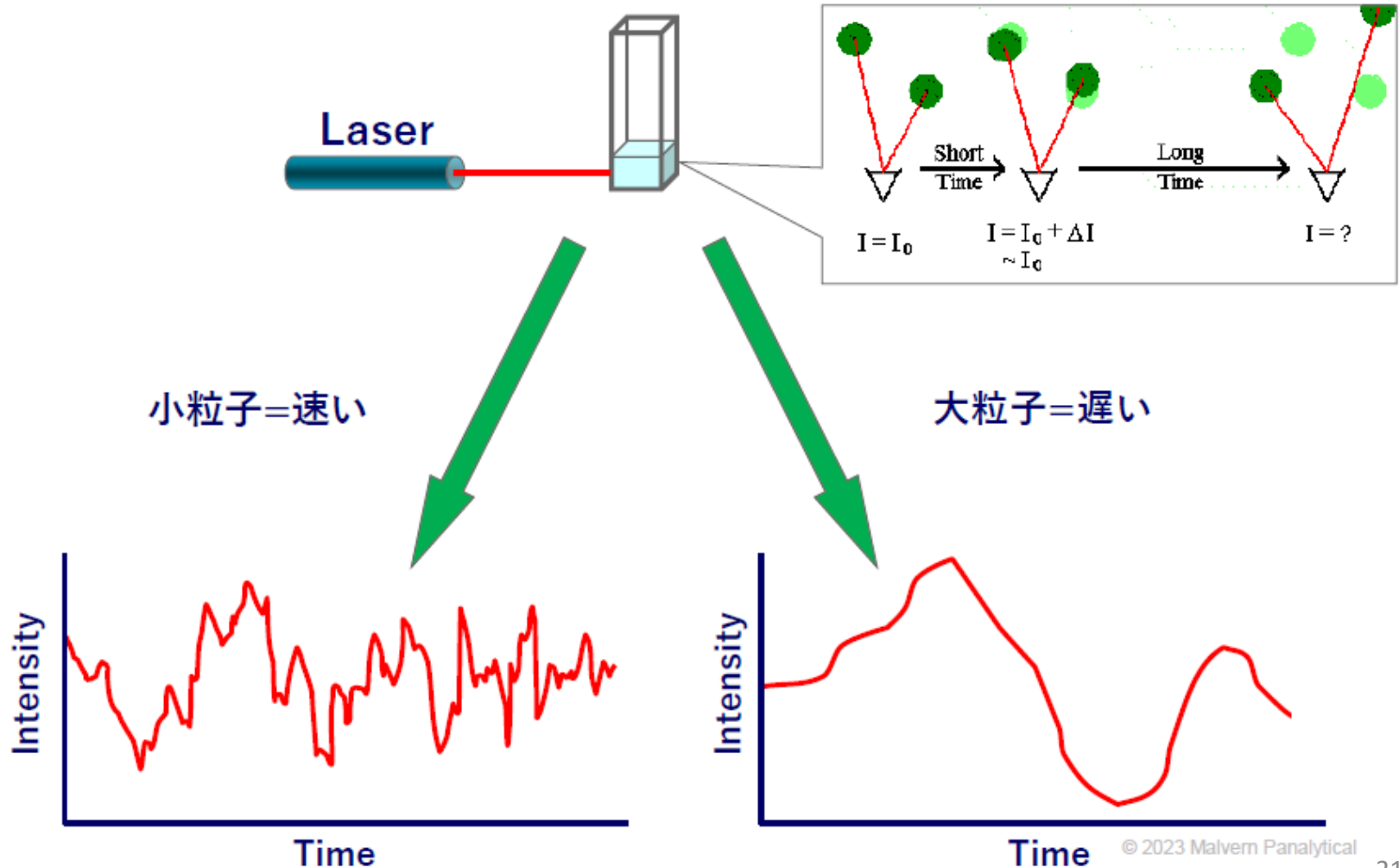
他手法との解析結果比較



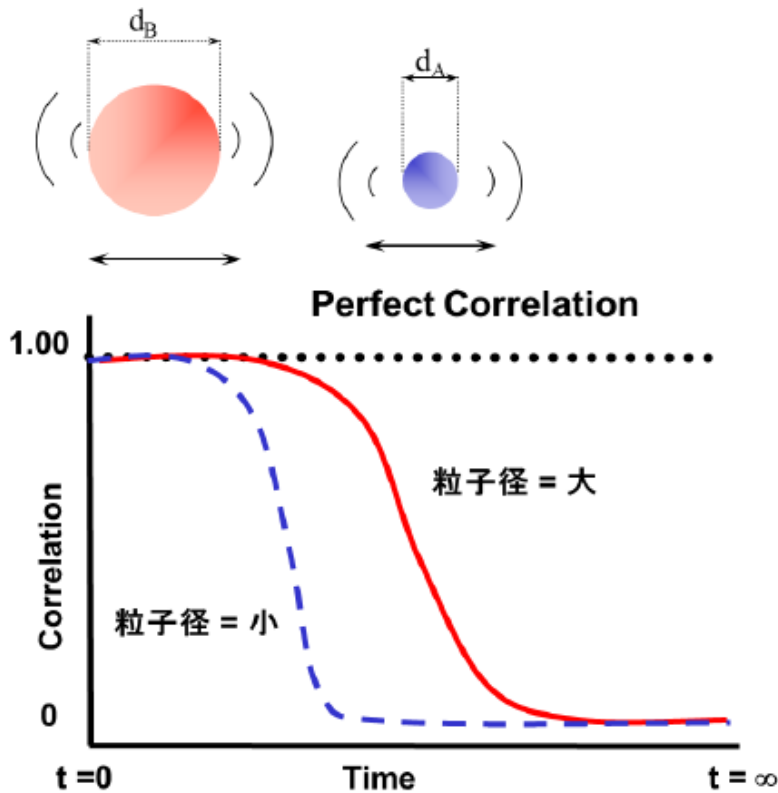
DLS

(動的光散乱)

DLS法 (動的光散乱)



DLS法 (動的光散乱)



• DLSの利点

- 実績がある
- 迅速、簡単に測定できる
- 大きな変化を捉えやすい
- 粗大粒子の検出に向く
- 高濃度測定可能
- 測定範囲が広い

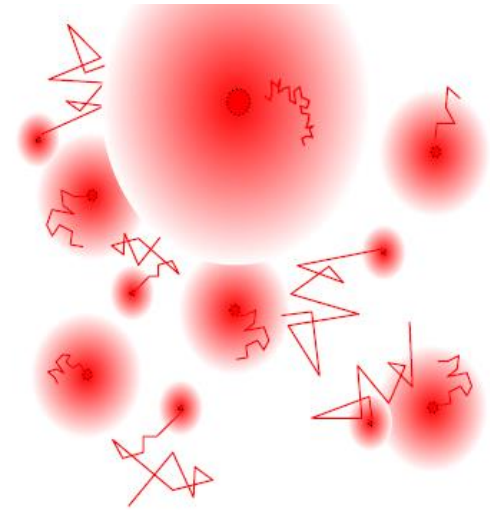
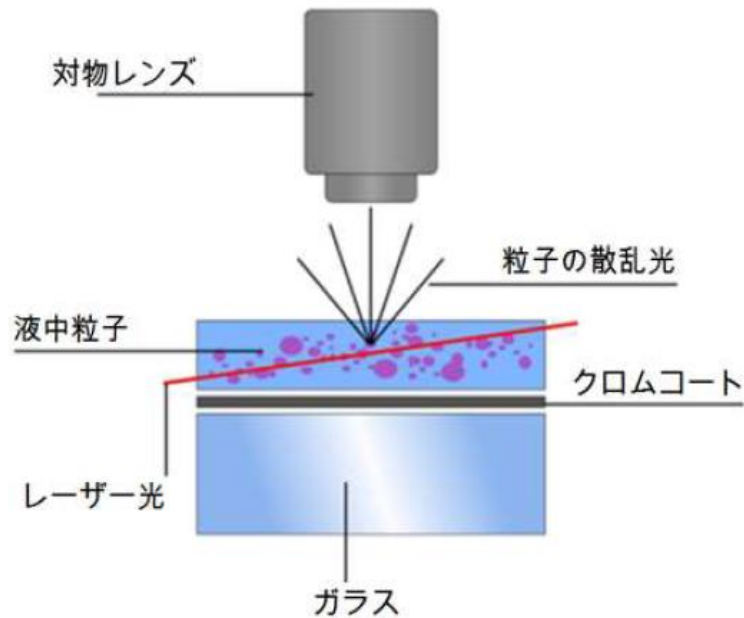
• DLSの課題

- 数値フィッティングを伴うので真度に課題が残る
- 濃度は測定しづらい

NTA
(ナノ トラッキング アナリシス)

NTA法 (ナノトラッキング アナリシス)

- レーザをサンプル中に照射して、散乱光を取得
- 散乱光の動画を作成
- ブラウン運動を個別に解析
- 流体力学径に置き換える

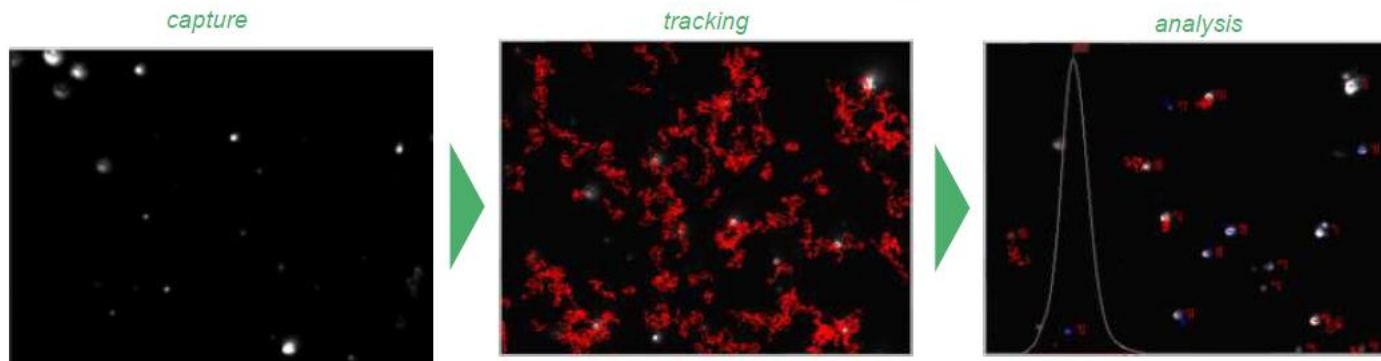


NTA法 (ナノトラッキング アナリシス)

- ブラウン運動している粒子を個々に追いかけて（トラッキング）する
- 粒子のブラウン運動の速度（拡散係数）より、ストークスアインシュタインの式を用いて粒子径を算出する

$$\frac{\overline{(x, y)^2}}{4} = Dt \iff Dt = \frac{TK_B}{3\pi\eta d}$$

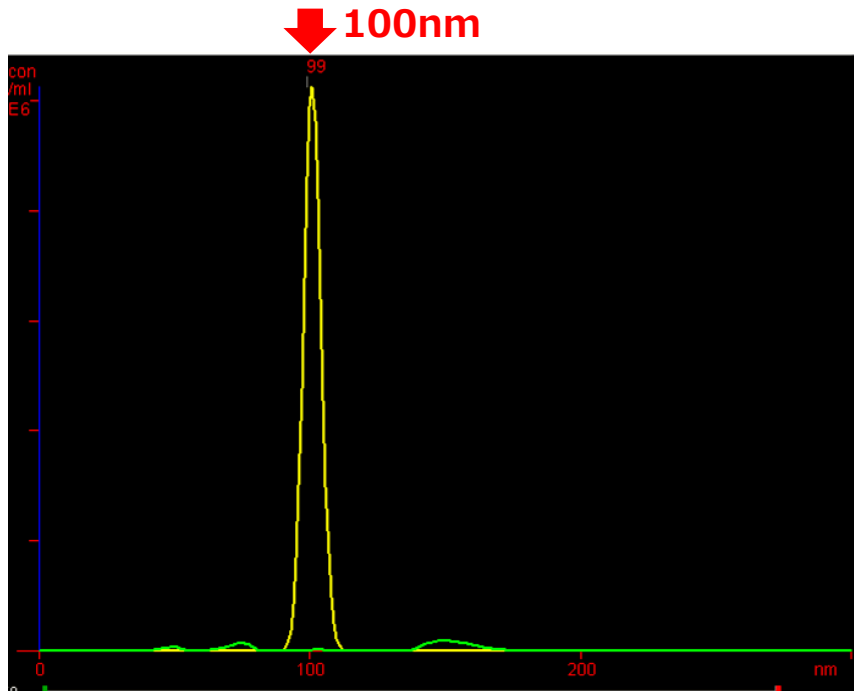
K_B = Boltzmann Constant
 η = viscosity
 T = Temperature



他手法との解析結果比較

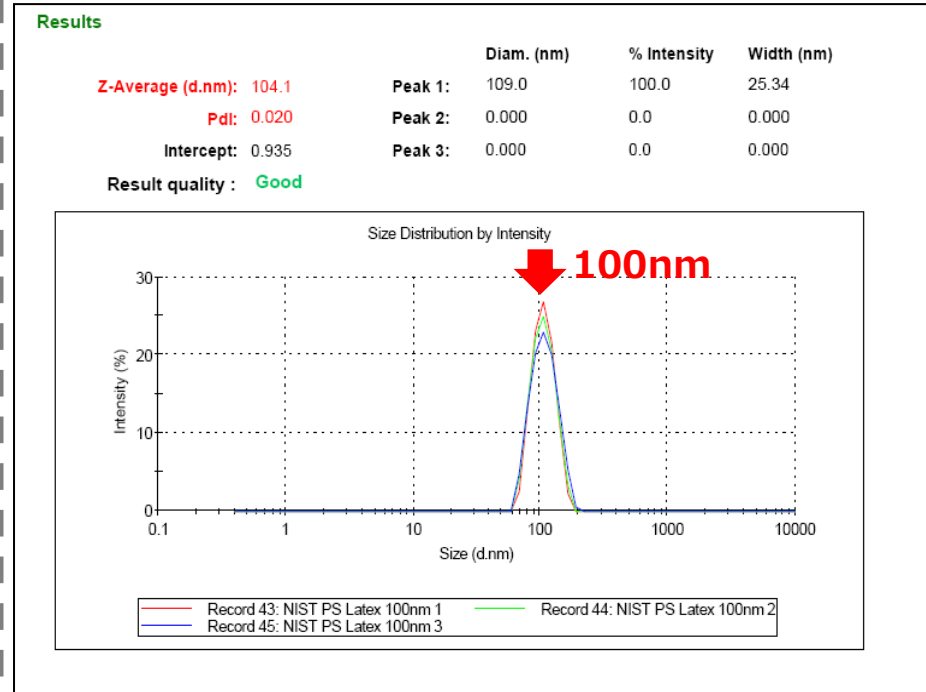
◆ 単分散での比較 サンプル溶液：100nm の粒子

NANOSIGHT解析結果



Note: NTA linear scale of 0-300nm compared to DLS 0.1-10000nm scale

DLS解析結果

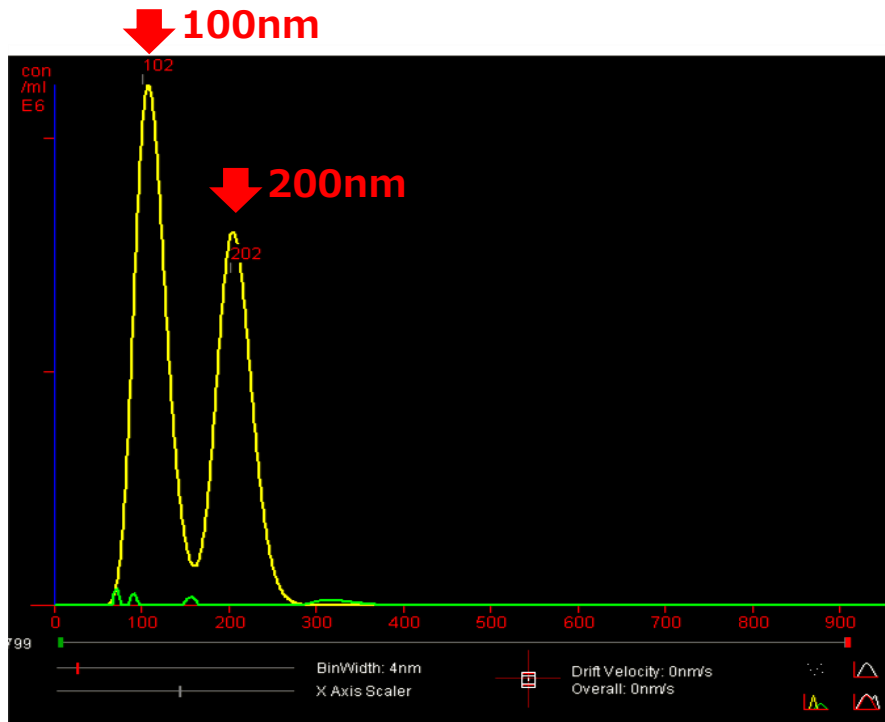


同様の結果

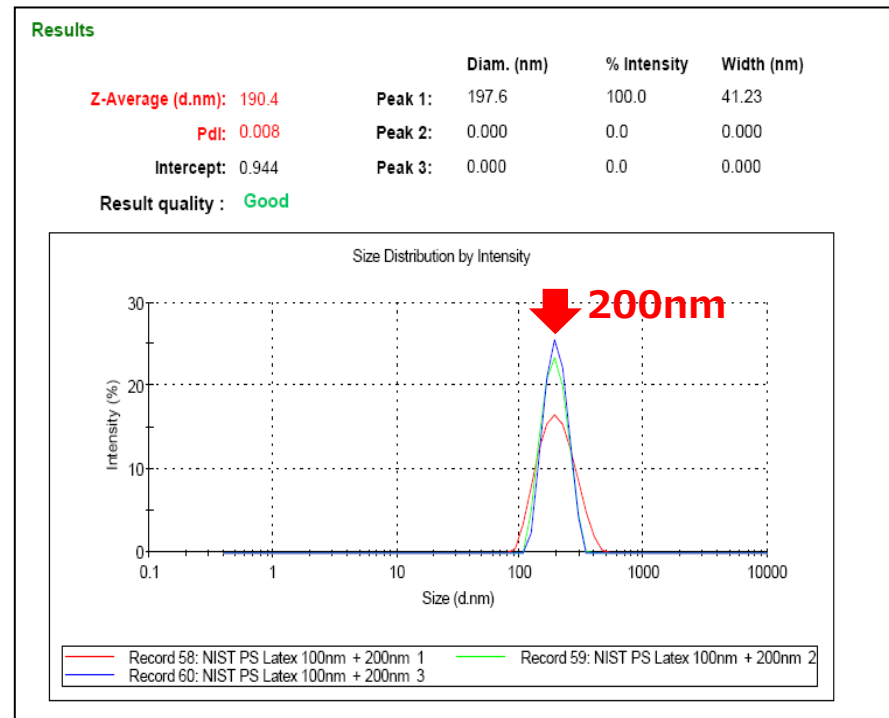
他手法との解析結果比較

◆多分散での比較 サンプル溶液：100nmと200nmの粒子

NANOSIGHT解析結果



DLS解析結果



NTA : 100nm, 200nmの両方のピーク

DLS : 200nmのみのピーク

NTAは多分散サンプルの解析に強い！

他手法との解析結果比較

■ 多分散のサンプル測定

条件：
 サンプル溶液中の
 2種類の粒子径の差が大きい場合

赤 NANOSIGHT
 青 DLS

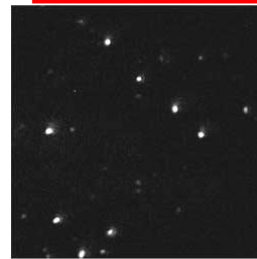
NTAは粒子1つ1つをトラッキング



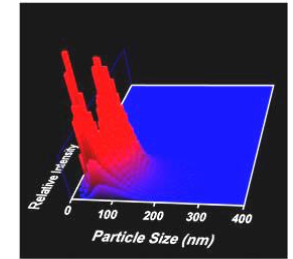
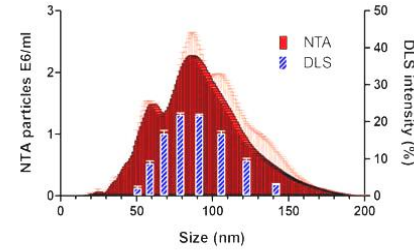
正しい粒子径とその分布測定が可能

Data reproduced from Filipe, Hawe and Jiskoot (2010) "Critical Evaluation of Nanoparticle Tracking Analysis (NTA) by NanoSight for the Measurement of Nanoparticles and Protein Aggregates", *Pharmaceutical Research*, DOI: 10.1007/s11095-010-0073-2

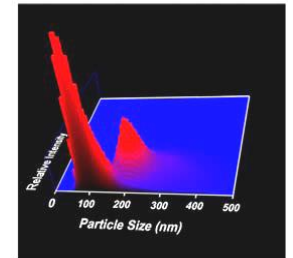
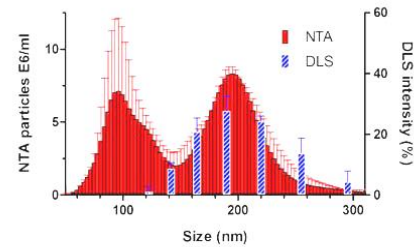
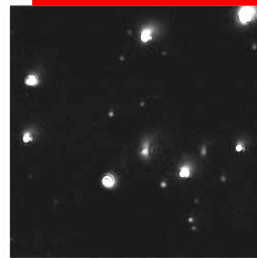
a) 60 and 100 nm beads



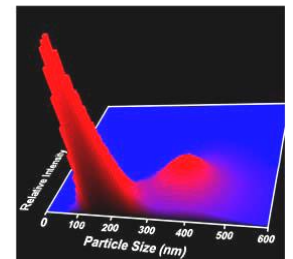
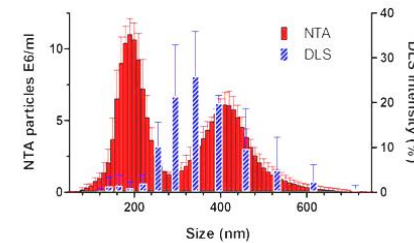
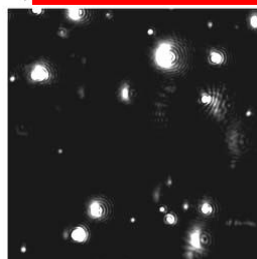
<比較結果>



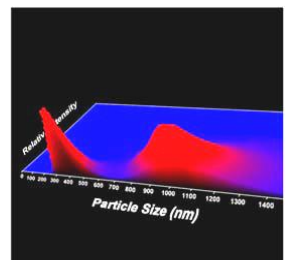
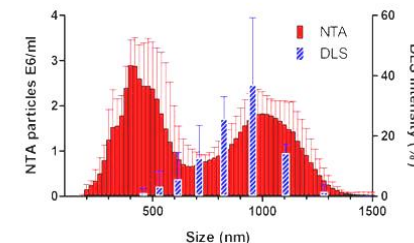
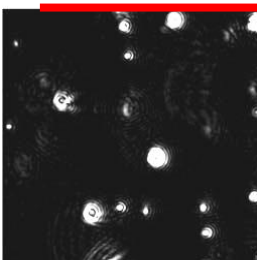
b) 100 and 200 nm beads



c) 200 and 400 nm beads



d) 400 and 1000 nm beads



他手法との解析結果比較

NTA法 と DLS法

多分散のサンプルでの比較まとめ

項目	DLS法	NTA法
基準	散乱強度基準	個数基準
測定	<u>全体をマクロ</u> に計測する	<u>粒子を個別</u> に計測する
特徴	<ul style="list-style-type: none"> 光照射された体積中の時間変化から、全体のブラウン運動を全体的に捕らえる 粒子からの散乱光は原理上のオーバーラップがおきやすい 	<ul style="list-style-type: none"> 粒子を個別でブラウン運動速度を計測する 粒子からの散乱光のオーバーラップは考えなくて良い

NTA法の位置づけと比較

項目	電子顕微鏡	DLS法	NTA法
粒子径の真度 (確からしさ)	もっとも高い (直接観察)	やや難がある (近似計算)	高い (粒子の動きが見える)
液中粒子測定	不可能	可能	可能
測定個数処理	～数100個程度まで	大量処理が可能 (散乱体積分)	～数万個
個数定量性	困難	困難	定量可能
分布測定範囲	狭い (個数がとれない)	広い (フィッティングに依 存)	やや広い (撮像視野・濃度に依 存)
高濃度測定	困難	数wt%まで可能 (試料に依存)	困難

電子顕微鏡 と DLS法の補完



NTA法

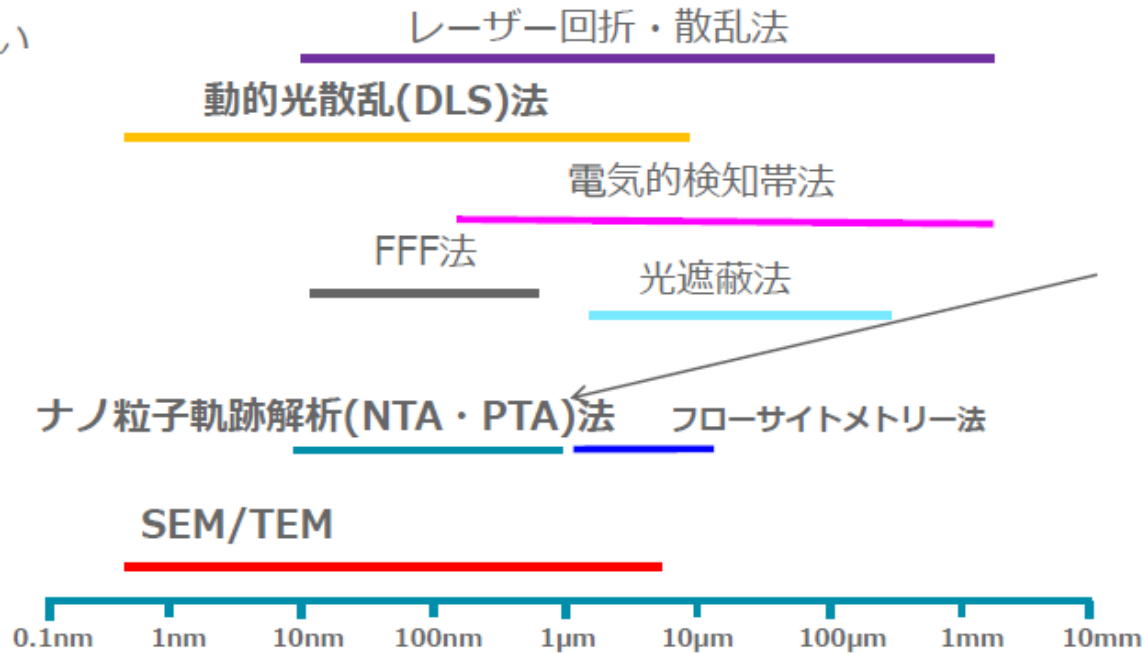
他手法との解析結果比較

NTA法の位置づけと比較

簡易的に行程を管理したい

正確な粒子径を把握したい

濃度も知りたい



ナノサイト

NanoSight

アプリケーション豊富



Quantum Design

JAPAN

エクソソーム

→細胞が分泌する細胞外小胞体。
内包RNAが関与する細胞間伝達物質。

●期待されている事

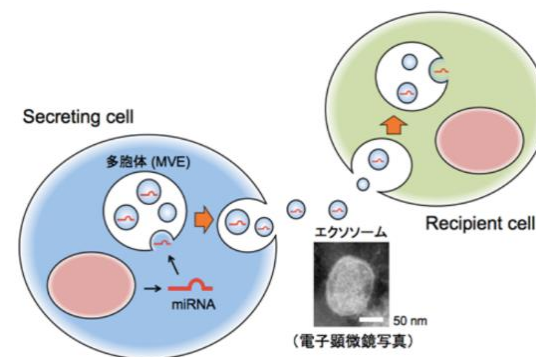
- ・疾患の原因解明。診断。治療。
- ・腫瘍マーカー(特定膜タンパク、RNA量)
- ・少量の血液・唾液・尿等で疾患の診断・状態確認が可能となる。

★NANOSIGHTの役割★

細胞から回収・精製したエクソソームのサイズ・
個数濃度の解析回収効率向上。
健常者・疾患者のエクソソーム量の比較。
各種疾患におけるエクソソーム量の確認、等々。

測定実績 No.1 !

学術論文におけるバックグラウンドとして
NanoSightでの測定データが有用



出典：東京医科大学 HPより

ウイルス研究とワクチン

→ウイルスやバクテリアファージ、それらの凝集体のサイズと個数を計測することは、ウイルス・ファージ治療法の開発と検証において重要。

●可視化・計測に成功

- ・アデノウイルス、単純ヘルペスウイルス、バキュロウイルス、MS2ファージ、M13ファージ、ラムダファージ、COVID-19 etc.

★NANOSIGHTの役割★

わずか数分で全ウイルス数濃度を計測することを可能とし、従来法である感染力価測定に取って代わっている。

分散性または凝集性の定量的測定は、リアルタイム観察により正しさを確認できる。

ウルトラファインバブル (ナノバブル)

●用途

- ・生活用水 (シャワー、洗濯etc.)
- ・化粧品、医療への応用 (DDS)

- ・半導体メーカーの基板の洗浄
- ・環境浄化、洗浄、脱色
- ・農業、養殖、食品
- ・美容

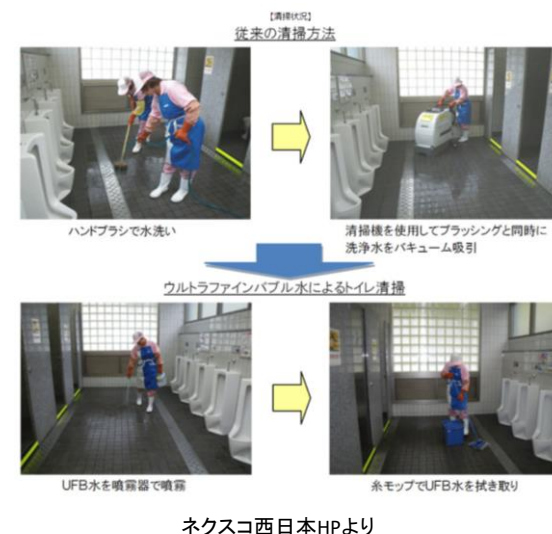


茨城県工業技術センター研究報告 第39号



図4 鹿島灘はまぐりの浮遊幼生用バブル発生装置

ナノバブル測定 業界標準機



★NANOSIGHTの役割

液中のウルトラファインバブルの
サイズ、個数測定が可能です。

タンパク質の凝集

→バイオ医薬品の製造（細胞培養、精製、製剤、包装および保存など）における多くの作業工程において、タンパク質の凝集が発生。

●期待されている事

- ・凝集の状態および経時変化を測定することは製品の安定性改善を可能とし、工程の最適化に大きく寄与。

★NANOSIGHTの役割★

タンパク質凝集体の、サイズと粒子数を測定。

薬物送達システム

→粒度分布データは目標とする薬物送達システムを実現するための中心的情報。

●期待されている事

- ・薬物投与量の低減
- ・遺伝子治療薬の送達に応用

★NANOSIGHTの役割★

リポソーム・ナノ高分子のような運搬手段に利用される粒子について、粒子個々の粒度分布データ・粒子数濃度の高分解能測定を可能にする。

