

PRESS RELEASE (2025/10/02)

細胞を破裂させて低・中分子薬の「入りやすさ」と「出やすさ」を評価

～がん細胞の薬剤取り込み量を簡便かつ直接計測可能に～

ポイント

- ① 薬を作る上で、病気の細胞の内部へどの程度薬が取り込まれて保持されるか評価が必要
- ② 浸透圧を利用して細胞を破裂させ、迅速に細胞内部（細胞質）の薬剤を回収
- ③ 特徴の異なる4種類の薬剤の浸透性と排出性を明確に解析することに成功

概要

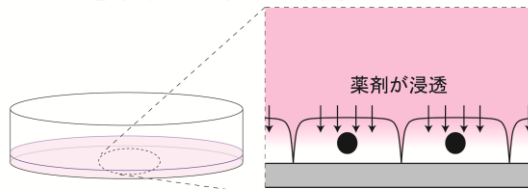
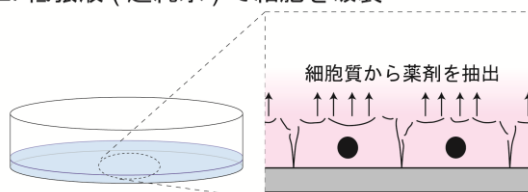
次世代医薬品として注目されている「中分子薬」は、がんや難病の治療などに大きな可能性を秘めています。これらの薬は低分子薬と同じように体内で「細胞」の中に入り、特定のターゲットと結びついて効果を発揮します。しかし、薬が細胞にどの程度入り、どの程度の時間とどまるのかを測定するには、これまで時間も手間もかかる複雑な方法しか存在しませんでした。また、薬剤の治療対象である病気の細胞を使って検証することもできませんでした。

九州大学大学院理学研究院の川井隆之准教授らの研究グループは今回、水の力（浸透圧）で細胞を一瞬で破裂させ、中の成分をすばやく取り出すという新しい方法「CyTOR（サイトル、※1）」を開発しました。この方法では簡単な操作だけでわずか5秒以内に細胞の中にある薬を取り出すことができ、液体クロマトグラフィー-質量分析（LC-MS、※2）という精密な分析装置で正確に測定できます。

この方法を使い、4種類の薬（うち1つは中分子薬）を細胞に与えたあと、どのように細胞に取り込まれ、どのくらいの速度で排出されるかを詳しく調べました。その結果、薬ごとに異なる「入りやすさ（浸透性）」や「出やすさ（排出性）」があることが明らかになり、これまでの研究結果とも一致しました。

この技術は、創薬（新しい薬をつくる）研究を効率的に進めるための新たな細胞膜透過性試験法として位置付けられます。将来的には、薬の候補物質を効率よく選び出すための標準的な方法として、広く医薬品開発の現場で活用されることが期待されます。

本研究成果は、米国化学会の国際科学誌「Analytical Chemistry」に2025年10月2日（木）午前8時（日本時間）に掲載されました。また本研究はAMED創薬基盤研究推進事業等の助成を受けたものです。

1. 細胞を薬剤入り培地で培養**2. 低張液（超純水）で細胞を破裂****図1. 開発したCyTOR法のコンセプト図****研究者からひとこと：**

細胞膜は細胞内外を隔てる壁ですが、細胞に都合の良い物質は通し、通常薬のような異物は通さない特性があります。薬が本当に病気の細胞に浸透するかを確認することは極めて重要です。本研究では、これまでずっと盲点となっていた浸透圧を使うことで、細胞を瞬時に破裂させて内部の薬を簡単に抽出する方法を開発しました。シンプルだからこそ誰にでも使える有用な手法ですので、是非色々な方に利用頂きたいと考えています。

（川井隆之）

【研究の背景と経緯】

医薬品は分子量により低分子（500 以下）・中分子（500～1 万）・高分子（1 万以上）に大別されます。低分子は膜透過性が高く化学合成が可能である点に優れており、高分子は標的分子への特異的結合性などで利点を持ちますが、中分子はこれらの特性を両方持つことから、細胞内の異常分子を標的とする次世代の治療薬として注目されています。細胞内部を標的とするためには、薬剤が細胞膜を透過して細胞内に保持されるかを確認しなければなりません。この膜透過性と細胞内保持の評価には、人工膜を用いる PAMPA 法（※3）や、腸管細胞シートを用いる Caco-2 アッセイ（※4）などが用いられてきましたが、これらは実際の疾患細胞の細胞膜の挙動を正確に反映しない場合があります。蛍光標識して顕微鏡で動きを観察する方法もありますが、化学的に標識するのが難しい場合があることや、標識によって薬剤の性質が変化してしまう懸念があります。従って、細胞内に薬剤をそのままの形で浸透させ、迅速に抽出して解析する手法が必要です。

これを解決するため、本研究グループは CyTOR（サイトル）法という新しい細胞質抽出法を開発しました。操作は非常にシンプルで、培養細胞に低張液（超純水）をふりかけるだけです。ふりかけた低張液と細胞内で浸透圧差（※5）が生まれるため、細胞は瞬時に（5 秒以内）に破裂し、細胞質を迅速に抽出することができます（図 1）。これまでも浸透圧差を用いて細胞質中のタンパク質を抽出する手法は開発されていましたが、界面活性剤を用いたり長時間の操作を必要とするため、細胞質以外に存在する薬剤（細胞膜など）も溶出してしまいます。CyTOR は 30 秒という迅速な抽出操作によって細胞質中の薬剤のみを選択的に抽出し、液体クロマトグラフィー-質量分析（LC-MS）と組み合わせることで高精度な細胞内薬剤濃度の測定を実現できます。本研究では、がん細胞である HeLa 細胞（※6）を用い、4 種類の代表的な薬剤を使って膜透過性と細胞内保持率を評価しました。

【研究の内容と成果】

まず CyTOR の原理として、破裂に利用する浸透圧差は、細胞内外の溶質の濃度差に比例するため、ほぼ溶質を含まない超純水を用いる際に最大になることが予想されました。そこで、まず超純水で細胞を破裂させて細胞質だけを回収できるかどうかを確認するため、細胞を calcein-AM と CellMask という 2 つの試薬で処理し、細胞質を緑に、細胞膜を赤に染色しました。続いて超純水を用いて細胞を破裂させたところ、超純水を添加後僅か 5 秒で細胞質マーカーが消えた一方で、細胞膜マーカーは 1 分経過してもほとんど変わりませんでした（図 2）。このことから、CyTOR によって細胞質を迅速かつ選択的に回収できることが示されました。

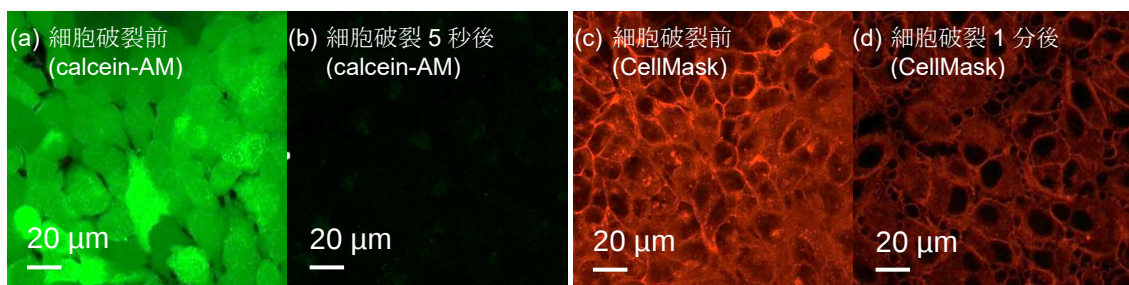


図 2. 低張液（超純水）添加後の細胞の様子

続いて、理論的な考察によって、薬剤を培地に添加してから細胞内の薬剤濃度がどのように経時変化するかを予想したところ、薬剤の浸透率（※7）を y とすると、 y は時間 t の関数として $y = a(1 - e^{-bt})$ で表されることが分かりました（ a 、 b は定数）。実際の実験データにこの形の関数をフィッティングして a 、 b を決定することで、最終的に薬剤の入りやすさ（細胞外から内部への膜浸透性）と出やすさ（細胞内部から外部への浸透性）を計算することができます。

薬剤の入りやすさと出やすさは以下の ABC の 3 パターンに分けられることが知られています。A：入

りやすく出やすい、B：入りにくく出やすい、C：入りにくく出にくい。本研究ではこの3つに対応する薬剤としてよく知られている3つの低分子、A：プロプラノロール、B：シメチジン、C：アテノロールと、中分子としてシクロスポリン A を含む培地で細胞を培養しました。いくつかの培養時間において、CyTOR で抽出した薬剤を LC-MS で解析し、添加した薬剤に対してどの程度の割合で細胞内に浸透したか（薬剤浸透率）を計算し、培養時間に対してプロットした結果を図 3 に示します。それぞれの薬剤の入りやすさ・出やすさは従来の報告と非常によく一致した傾向を示しており、がん細胞を用いて薬剤の浸透性を簡便に計測できることを示しました。

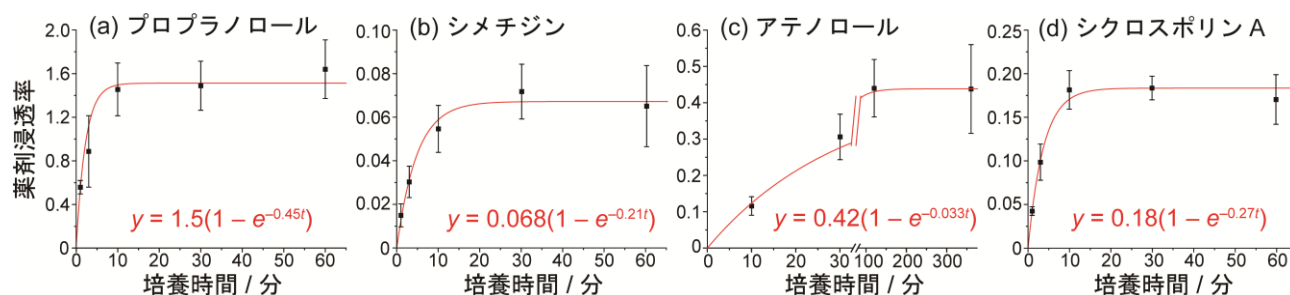


図 3. 1～360 分間薬剤で培養した HeLa 細胞の分析結果

【今後の展開】

CyTOR は、従来困難だった細胞内薬剤の迅速かつ高精度な定量を可能にした革新的技術です。今後は、細胞体積の自動計測技術や複数薬剤の同時解析アルゴリズムを導入することで、高スループット化や分析の自動化に向けた改良を進める予定です。また、CyTOR は薬剤だけでなく細胞内代謝物や化学プローブの解析にも応用できますので、生命科学研究全般における分子動態の理解にも繋げられる可能性があります。

【用語解説】

(※1) CyTOR (サイトル) 法

CyTOR (Cytoplasm exTraction by Osmotic cell RUpture) は、低張液で細胞膜を破裂させ、細胞質をわずか 30 秒で取り出す新技術です。薬が細胞内に取り込まれる速度や滞留性を迅速に測定でき、創薬研究に役立ちます。ちなみに「サイトル」という名前は、「サイトゾル（細胞質）」を「吸い取る」にかけた駄洒落から名付けました。

(※2) 液体クロマトグラフィー-質量分析 (LC-MS)

試料を分離しながら分子量を精密に測定する装置。極微量の化合物でも特定・定量でき、医薬品研究や代謝物解析に広く用いられます。

(※3) PAMPA 法

PAMPA (Parallel Artificial Membrane Permeability Assay) は、人工膜を使って薬が細胞膜を通過しやすいかを調べる試験法です。迅速に実施できますが、脂質を用いた人工膜のため、実際の細胞膜を正確に再現できない点が課題です。

(※4) Caco-2 アッセイ

大腸がん由来の Caco-2 細胞をシート状に培養し、このシートを透過して反対側に薬がどの程度浸透するかを計測することで、腸管上皮をどの程度通過するかを予想する試験。実際の腸管細胞を用いているので吸収の様子を模倣できますが、測定には時間と手間がかかります。また、がん細胞などの疾患細胞

の内部にどれだけ浸透するかを測定することはできません。

(※5) 浸透圧差

浸透圧差とは、細胞内外で溶質濃度が異なるときに生じる圧力差。水が濃度の低い方から高い方へ移動することで発生し、細胞膜の破裂や収縮を引き起こします。

(※6) HeLa 細胞

HeLa 細胞はヒト子宮頸がん由来の細胞株で、世界で最初に樹立された不死化細胞。培養が容易で研究に広く使われ、薬剤の細胞内挙動を調べる標準モデルとして用いられています。

(※7) 薬剤の浸透率

細胞培養の培地に添加した薬剤濃度に対して、細胞内の薬剤濃度がどの程度の割合なのかを計算した比率。たとえば浸透率が 0.5 の際、細胞内部の薬剤濃度は培地の薬剤濃度の半になります。

【謝辞】

本研究は JSPS 科研費（JP20K20458、JP21H05092、JP22K18950、JP23K27314）、AMED 委託研究課題（JP20gm6410005h9901、JP21ak0101180h0001、JP22ym0126816j0001）、JST 委託研究課題（JPMJMI21G6、JPMJST2281）などの助成を受けたものです。

【論文情報】

掲載誌：Analytica Chemistry

タイトル：Quantifying Cell Membrane Permeability of Small to Mid-Size Drugs Using Quick Osmotic Cytoplasm Extraction

著者名：Serena Igari、Daiki Sakai、Chenchen Liu、Kohei Torikai、Nobuaki Matsumori、Takayuki Kawai

DOI：10.1021/acs.analchem.5c01064

【お問合せ先】

<研究に関すること>

九州大学 大学院理学研究院 准教授 川井 隆之（カワイ タカユキ）

TEL：092-802-4114 FAX：092-802-4126

Mail：takayuki.kawai@chem.kyushu-univ.jp

<報道に関すること>

九州大学 広報課

TEL：092-802-2130 FAX：092-802-2139

Mail：koho@jimu.kyushu-u.ac.jp