2D17

イリジウム錯体を用いた生細胞のりん光寿命イメージングと酸素応答

（群馬大院・理工）吉原 利忠・増田 剛・畠山 泰典・藤倉 大地・飛田 成史

Phosphorescence Lifetime Imaging and Oxygen Response of Living Cells by Using Iridium Complexes

(Gunma Univ.) Toshitada Yoshihara, Tsuyoshi Masuda, Taisuke Hatakeyama, Daichi Fujikura, and Seiji Tobita

【序】酸素は好気性生物の代謝過程において必須の役割を果たしており、生命活動維持において欠かせない物質である。細胞内において90%以上の酸素は，呼吸鎖における電子伝達系の最終電子受容物質として使用される。一方，組織内における酸素濃度低下は，がん・脳卒中・心筋梗塞などで診られる共通した病態である。このため，細胞，組織などの微小領域内における酸素濃度計測法の開発は，細胞生物学だけでなく臨床医学においても重要である。組織内の酸素濃度計測法として微小電極を用いる方法がある。この方法は，測定中電極周辺の酸素消費を伴うだけでなく，組織に直接電極を挿入するため侵襲的である。また，細胞などμm スケールの微小領域測定は困難である。一方，発光法は高感度および低侵襲的測定が可能な方法として，近年，研究・開発が進められている。発光法を用いた測定では，強度を計測する方法と寿命を計測する方法がある。前者は簡便な測定法であるが，細胞など発光分子が不均一に分布している場合，得られる信号が発光分子の濃度に依存するため定性的な評価に止まる。これに対して寿命法を用いた場合，得られる信号が発光分子の濃度に依存しないため定量的な評価として利用できることが期待できる。本研究では，生細胞内の酸素濃度定量を目指し，細胞内に分布した発光分子からの発光寿命を計測するシステムを作製し，それを用いた寿命計測および寿命イメージングについて報告する。

【結果・考察】図 1 に開発した顕微寿命システムの概略図を示す。顕微鏡は倒立型蛍光顕微

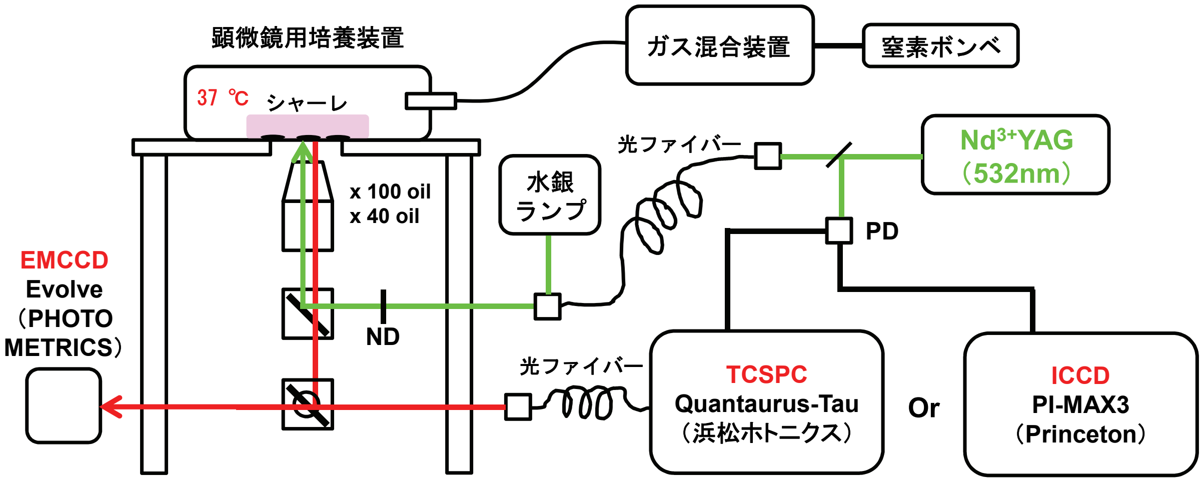

図１　顕微寿命システムの概略図

鏡（IX-71，OLYMPUS）を用い，細胞を長期間観察するために顕微鏡用培養装置を設置した。培養装置内の酸素濃度はガス混合装置によって任意に設定することができる。寿命計測のための励起光は Nd^{3+}YAG レーザー（波長：532 nm，パルス幅：1 ns，繰り返し：20 kHz）を用いた。細胞からの発光信号は光ファイバーを用いて時間相関単一光子計数法に基づく寿命計に導入した。また，イメージング画像の取得はゲート付き CCD（ICCD）カメラを用いた。

図 2 に発光プローブ分子（BTP-Mito, BTPDM1）の構造式を示す。BTP-Mito，BTPDM1 は中心金属としてイリジウム原子を有する金属錯体である。BTP-Mito および BTPDM1 は，芳香族配位子としてベンゾチエニルピリジナートを有する。

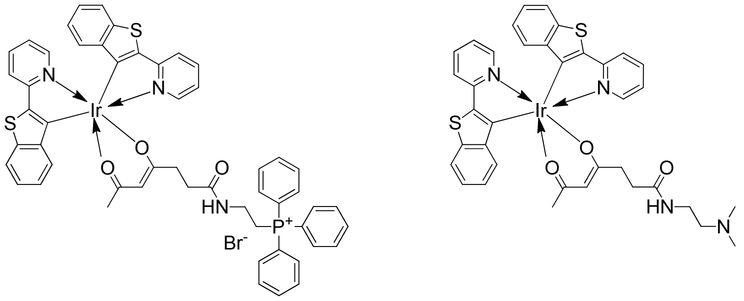

図２　酸素濃度測定試薬として用いたイリジウム錯体の構造式

また，BTP-Mito ではミトコンドリア集積性を示すトリフェニルホスホニウム基を含むアセチルアセトナート配位子，BTPDM1 ではジメチルアミノ基を含むアセチルアセトナート配位子を補助配位子として有する。BTP-Mito および BTPDM1 の吸収，りん光をテトラヒドロフラン（THF）中で測定したところ，480 nm 付近の可視光領域に ^{1}MLCT 遷移に由来する吸収，620 nm の赤色波長領域にりん光を示した。これら錯体の THF 中におけるりん光を空気飽和下および脱気下で測定したところ，脱気下と比較して空気飽和下では顕著な消光が観測された。

培養細胞の培地に BTP-Mito あるいは BTPDM1 を，最終濃度 5μM になるように添加し 2 時間後，蛍光顕微鏡で観察を行った。その結果，BTP-Mito は主にミトコンドリアに局在し，BTPDM1 はリソソームに局在することがわかった。これより BTP-Mito をプローブ分子として用いた場合，主にミトコンドリア近傍の酸素濃度が計測でき，BTPDM1 ではリソソーム近傍の酸素濃度計測が可能となる。図 3 に培養細胞中における BTP-Mito のりん光減衰曲線を示す。測定はシャーレ内の異なる 4 か所で行った。

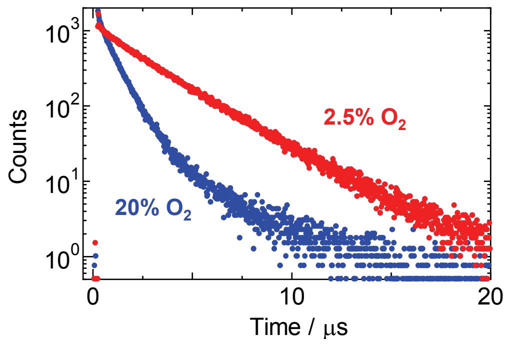

図３　培養細胞中におけるBTP-Mitoのりん光減衰曲線の酸素濃度依存性

減衰曲線は 2 成分で解析することができ，4 か所の平均寿命は 1.0 ± 0.05 µs であった。また，培養細胞中におけるプローブ分子の酸素応答を確認するために，培養器の酸素濃度を 2.5%にして同様にりん光減衰曲線の測定を行った。その結果，平均寿命は 2.6 ± 0.1 µs となり，低酸素細胞においてりん光寿命が約 2.6 倍長くなることが明らかとなった。次に，細胞内のイリジウム錯体からのりん光寿命イメージング画像を取得するために，顕微鏡に ICCD カメラを取り付けて撮影したところ，単一細胞の寿命イメージング画像が取得でき，また，低酸素培養下において寿命が増加することが寿命イメージングからも確認された。