ジピリナート類を配位子に有する長寿命イリジウム錯体を用いた細胞内酸素濃度計測

(群馬大院理工¹,群馬大院工²)○藤倉 大地¹・
小野寺 研一¹・増田 剛²・吉原 利忠¹・飛田 成史¹
Intracellular oxygen measurements based on long-lifetime phosphorescence of iridium complexes with dipyrrinato ligands
(Graduate School of Science and Technology¹, Gunma Univ.,
Graduate School of Engineering², Gunma Univ.)
○Daichi Fujikura, Kenichi Onodera, Tsuyoshi Masuda,
Toshitada Yoshihara, Sejji Tobita

【序】酸素は電子伝達系の最終段階での電子受容体として、生命維持に必要不可欠な物質である。また、がん組織は正常組織と比較して低酸素状態にあることが報告されており、酸素濃度測定法の開発が望まれている。本研究室では、酸素によって消光する Ir 錯体のりん光を利用して、細胞内の酸素濃度を定量する技術の開発を行っている。酸素濃度を定量する技術を確立するには、細胞の密度、酸素の拡散速度の影響について考慮する必要がある。そこで本研究では、細胞の密度や培養液の容積を変えてりん光寿命を測定し、細胞の酸素消費速度の効果について明らかにした。また、その結果に基づき、酸素濃度を定量するための calibration 法について検討した。

【実験】細胞のりん光寿命測定に基づく細胞内酸素濃度計測法として、 Nd^{3+} : YAG レーザーの第二高調波(532 nm、20 kHz)、またはレーザーダイオード(488 nm、18 kHz)を励起光とし、時間相関単一光子計数法(TCSPC)に基づく蛍光寿命計および蛍光顕微鏡を装置として用いた(Fig. 1)。incubator 内の温度、酸素分圧は自由に変えることができ、測定時のincubator 内の温度は、37℃とした。

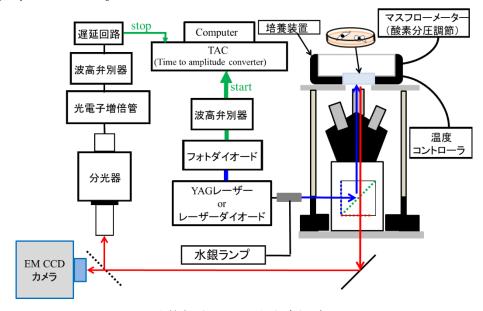


Fig. 1 培養細胞のりん光寿命測定システム

【結果・考察】本研究ではプローブとして、YAG レーザーの $532\,\mathrm{nm}$ の光を効率的に吸収する BTQSA(錯体 1)、近赤外発光を示し、りん光寿命が長く、酸素応答性が大きいという特徴を有し、 $488\,\mathrm{nm}$ のレーザーダイオードの光を効率的に吸収する PPZ4DMMD(錯体 2)および PPZ3DMMD(錯体 3)を用いた。Fig. 2 にそれらの構造式を示す。21% O $_2$ 条件下において、細胞の密度や培養液の容積を変えてりん光寿命を測定し、細胞の酸素消費速度の効果について明らかにするために錯体 1 を、また、細胞のりん光寿命を測定し、細胞内酸素濃度を定量するために錯体 2 および錯体 3 を用いた。

錯体 1 について、細胞の密度を変えてりん光寿命を測定したところ、細胞の密度が高いほどりん光寿命が長くなり、細胞呼吸の効果が見られた。細胞のりん光寿命は、単一指数関数的な減衰ではなく二成分減衰を示し、細胞の培養条件を $21\%O_2$ 条件下、 $2.5\%O_2$ 条件下と変化させるとりん光寿命が変化することが明らかになった。Fig. 3 に MCF-7 細胞中における錯体 2 および錯体 3 のりん光減衰を示す。細胞内酸素濃度を Stern-Volmer の式を用いて算出するためには、りん光の消光速度定数 $(k_q$ 値)をあらかじめ決定する必要がある。細胞内局在の評価により、大部分の 1r 錯体は細胞内のオルガネラ膜に局在すると考えられる。そこで、オルガネラ膜のモデル膜である DMPC 膜中での錯体 2 および錯体 3 の k_q 値を 1 in vitro で決定した。細胞中での錯体 2 および錯体 3 のりん光寿命、DMPC 膜中で求めた k_q 値を用いて細胞内酸素濃度を算出した結果、 $21\%O_2$ 条件下における MCF-7 細胞内の酸素濃度は、500~600 μ M となった。

Fig. 2 各 Ir 錯体の構造式

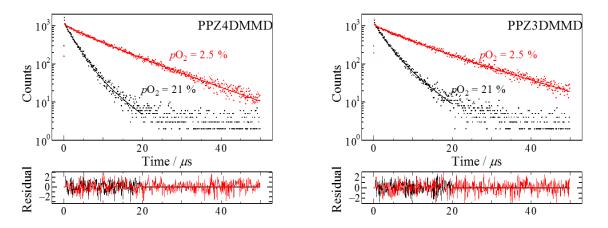


Fig. 3 MCF-7 細胞中におけるりん光減衰