

細胞内酸素濃度の 簡便かつリアルタイム計測法

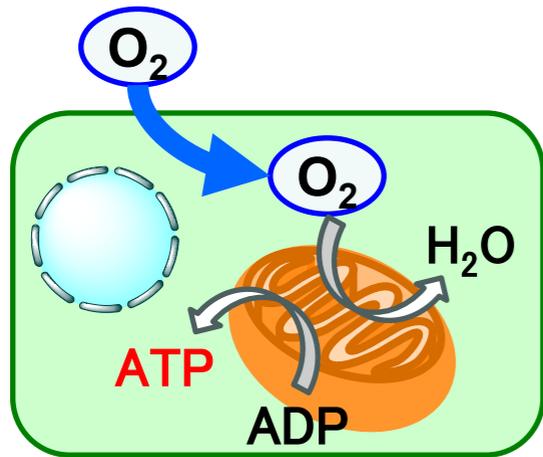
群馬大学 大学院理工学府
物質・環境部門（応用化学プログラム）
教授 吉原 利忠

2025年11月18日

生体内における酸素の重要性

酸素 (O_2): 好気性生物の生命活動において必要不可欠な物質

エネルギー産生

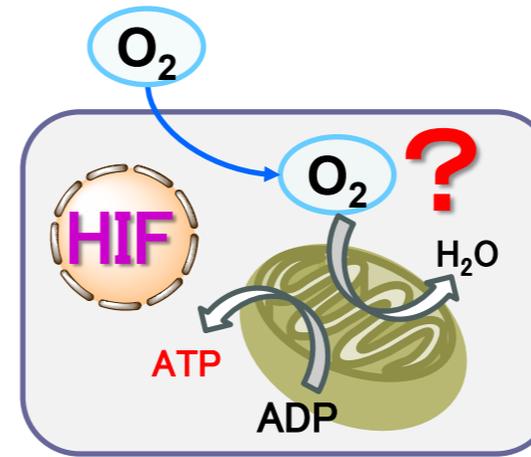


正常細胞

電子伝達系における
最終電子受容体

効率的なATP産生

シグナル



低酸素細胞

低酸素誘導因子 (HIF)

正常細胞とは異なる代謝

がん、虚血性疾患、慢性腎臓病、脂肪肝などで見られる。

細胞内酸素分圧は未知

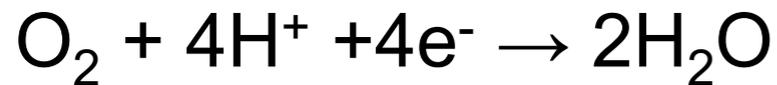
生体内の酸素分圧を測定することは、細胞生物学だけでなく、低酸素病態の発見・診断や治療薬の開発など医学・薬学分野の発展に大きく貢献する

生体内酸素の検出法

電気化学的方法

クラーク型酸素電極

O₂の還元電流を測定



- ✓ 安価で簡便な測定装置
- ✓ 酸素消費を伴う
- ✓ 細胞内測定は困難

光学的方法(吸収法)

パルスオキシメーター

O₂吸着ヘモグロビンと
非吸着ヘモグロビンの
光吸収係数の差を利用

- ✓ 安価で簡便な測定装置
- ✓ 非侵襲測定
- ✓ 細胞内測定は不可

磁気的方法

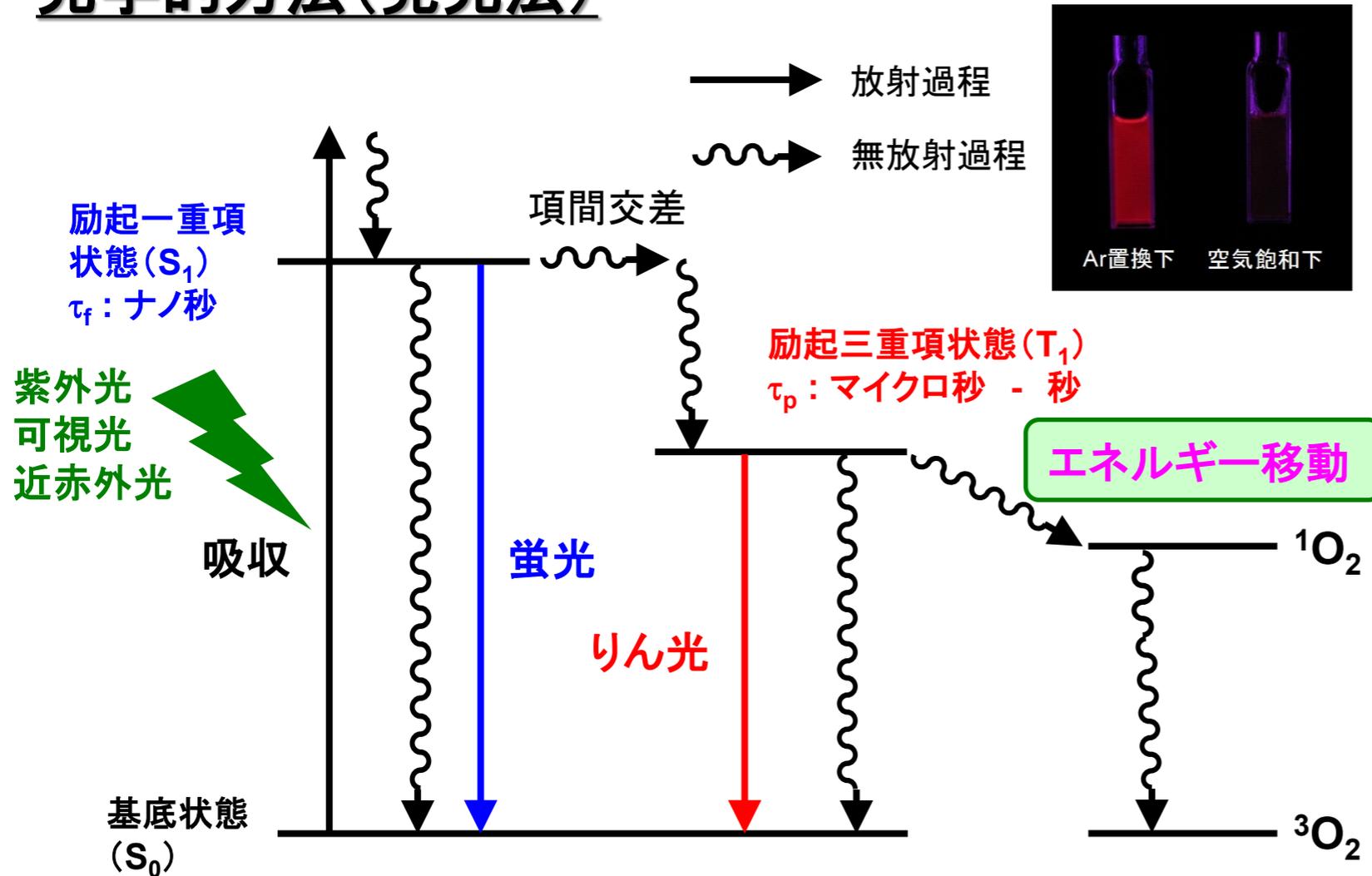
EPRオキシメトリー

O₂の常磁性を利用

- ✓ 低侵襲測定
- ✓ 複雑な測定装置
- ✓ 感度が低い

りん光を用いた生体内酸素の検出法

光学的方法(発光法)



Stern-Volmerの関係式

$$\frac{I_p^0}{I_p} = \frac{\tau_p^0}{\tau_p} = 1 + k_q \tau_p^0 pO_2$$

I : りん光強度、 τ : りん光寿命
 k_q : 消光速度定数

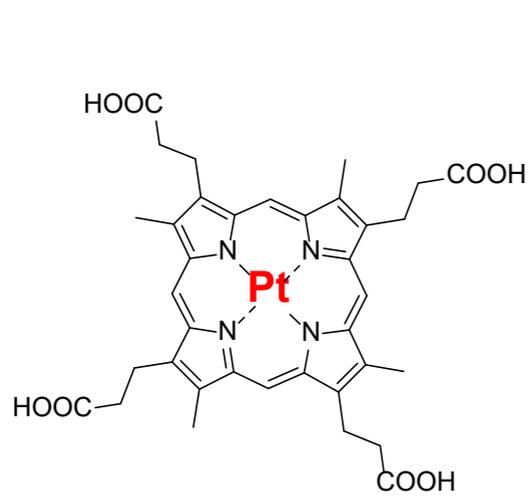
発光強度: プローブ分子の濃度や励起光強度などに依存する。

発光寿命: プローブ分子の濃度や励起光強度などに依存しない。

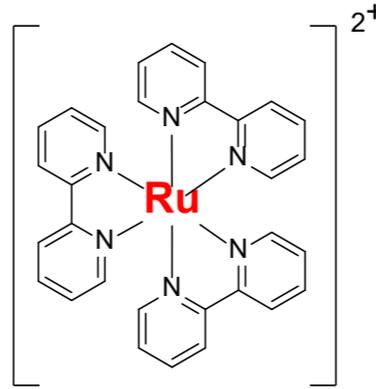
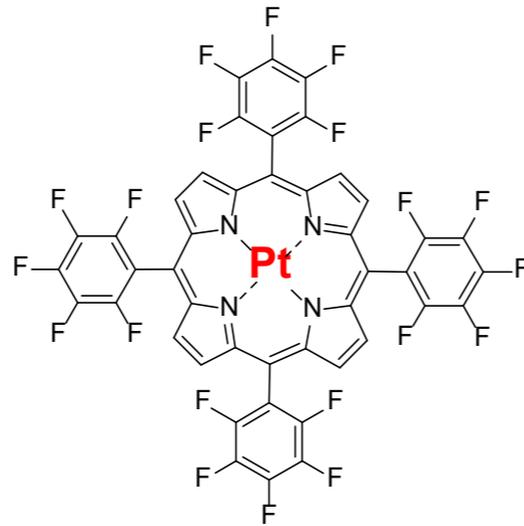
$$pO_2 = \frac{1}{k_q} \left(\frac{1}{\tau_p} - \frac{1}{\tau_p^0} \right)$$

励起三重項状態は酸素によって消光されやすい。

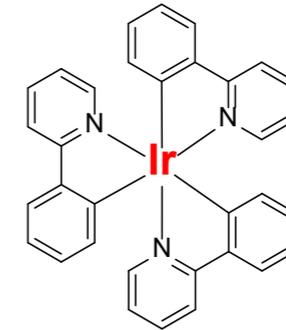
室温でりん光を示す分子(酸素プローブ)



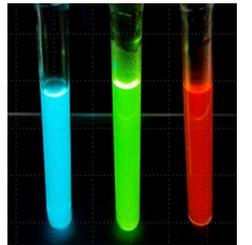
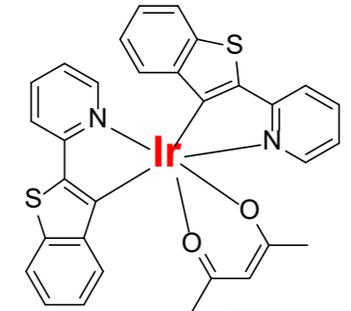
Pt(II)-ポルフィリン類



Ru(II)錯体



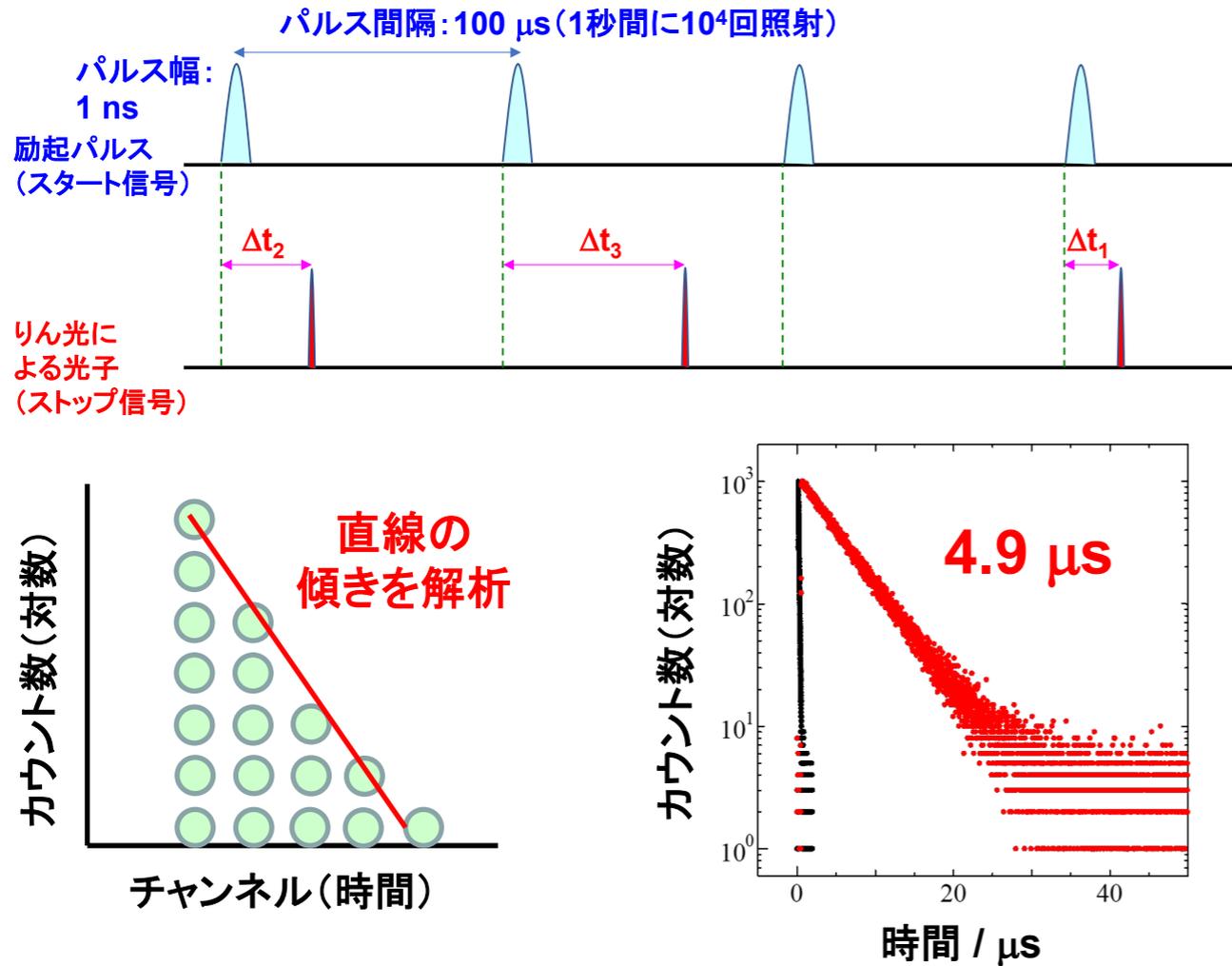
Ir(III)錯体



化合物	りん光寿命	りん光波長	吸収係数	細胞移行性	毒性
Pt, Pd錯体 (ポルフィリン)	30-500 μ s	赤-近赤外	$\sim 10^5 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (ソーレー帯)	低い	不明
Ru錯体	0.1-5 μ s	赤-近赤外	$\sim 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$	高い	高い
Ir錯体	1-10 μ s	青-近赤外	$\sim 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$	高い	低い

酸素プローブのりん光寿命計測

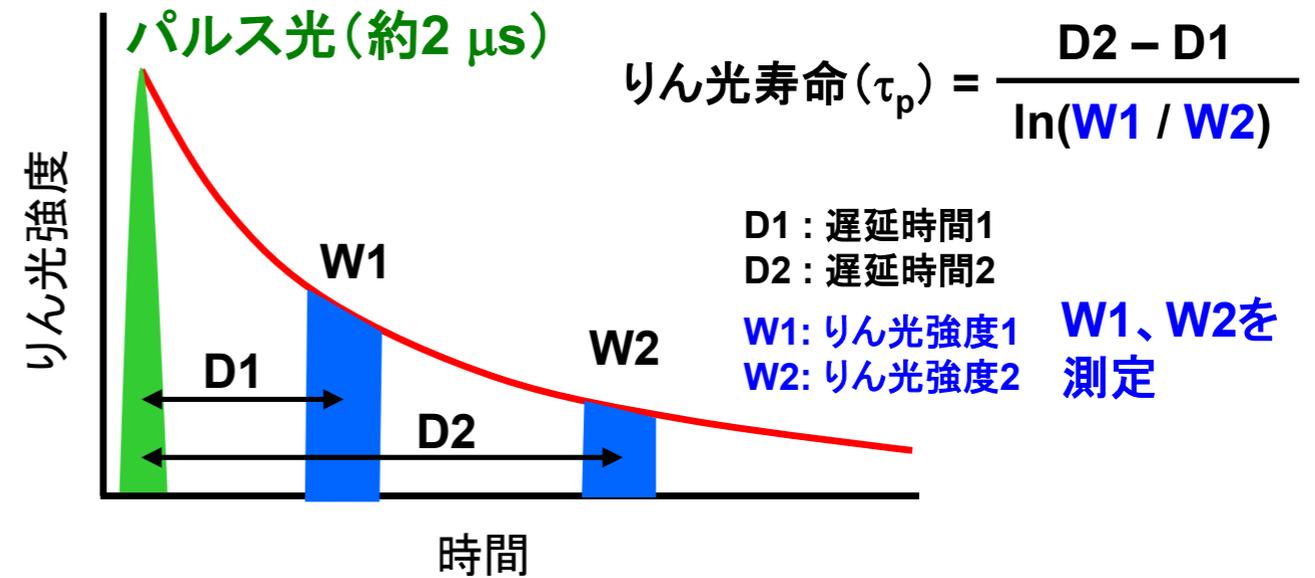
時間相関単一光子計測法



✓ 細胞を対象とした測定が困難

時間分解計測法

* マイクロプレートリーダーの時間分解計測機能を用いたりん光寿命計測



- ✓ 細胞を対象とした測定が可能
- ✓ 96ウェルプレートの使用により、一度に多くの種類の細胞や異なる代謝過程を追跡可能

従来技術とその問題点

既に実用化されているPt(II)-ポルフィリン類を酸素プローブとする細胞内酸素濃度測定では、

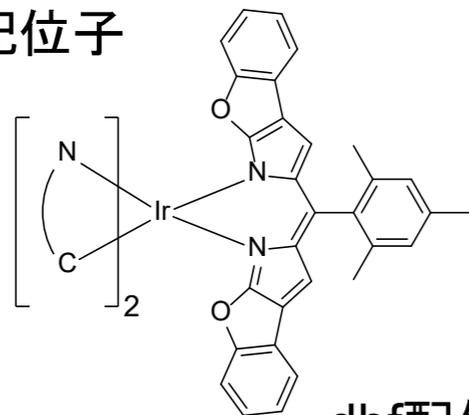
長時間培養(14時間以上)が必要

紫外光(380nm)を用いることによる光毒性

等の問題があり、広く利用されるまでには至っていない。

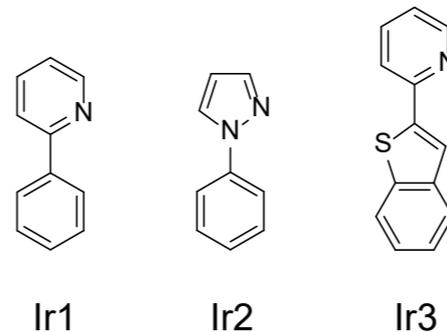
Ir(III)錯体を用いた酸素プローブの開発

C^N配位子



dbf配位子

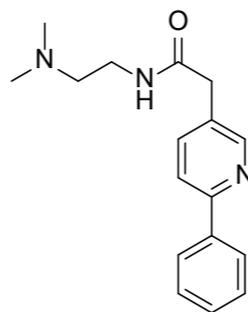
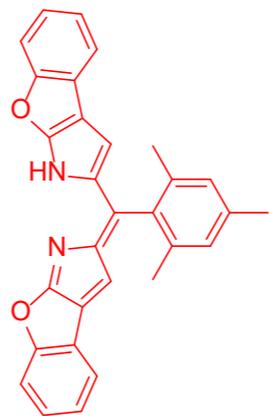
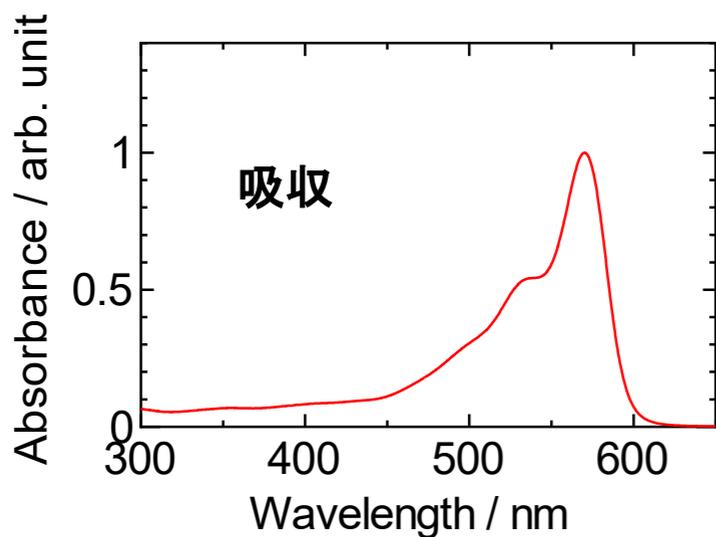
C^N配位子



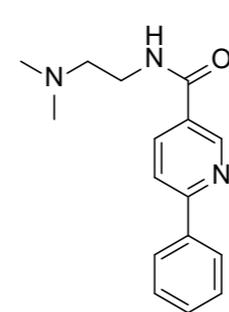
Ir1

Ir2

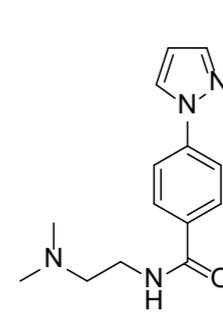
Ir3



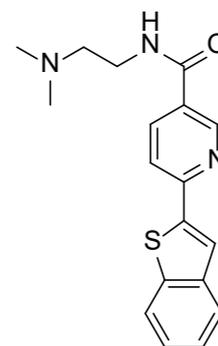
Ir4



Ir5



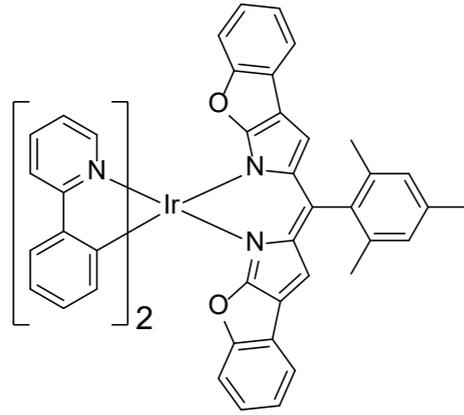
Ir6



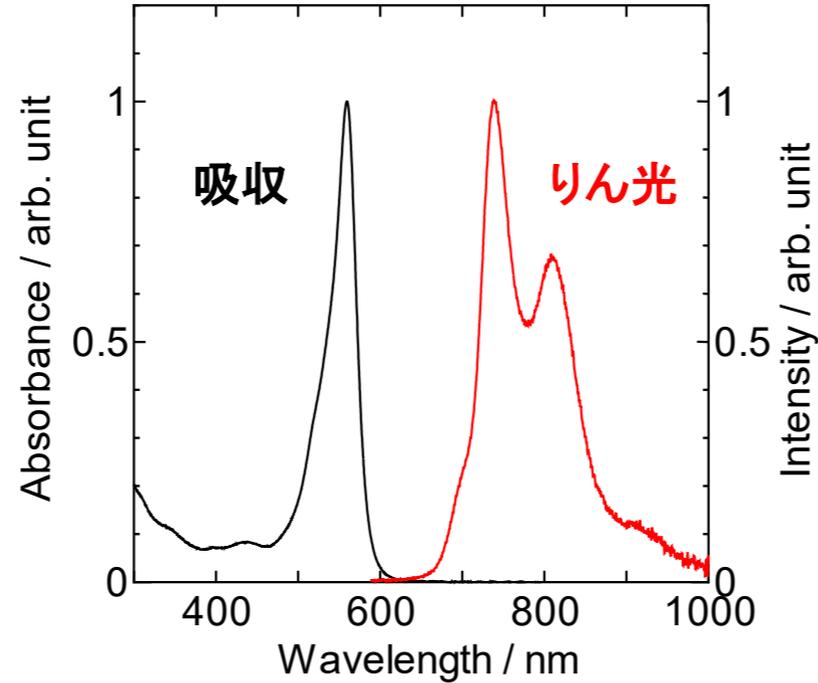
Ir7

- ✓ 可視光領域に吸収を示す配位子の利用
- ✓ 細胞移行性向上のために、ジメチルアミノ基を導入

開発したIr(III)錯体のスペクトルおよび光物理特性



Ir1



- ✓ 可視光領域に強い光吸収
- ✓ 近赤外光領域にりん光
- ✓ 長いりん光寿命

表 1 アセトニトリル中における Ir1-Ir7 の光物理特性

化合物	$\lambda_{\text{max}}^{\text{Abs}}$ / nm	$\lambda_{\text{max}}^{\text{Phos}}$ / nm	Φ_p	τ_p / μs
Ir1	559	739	0.076	66.1
Ir2	561	740	0.068	75.8
Ir3	559	738	0.090	88.1
Ir4	560	740	0.080	72.2
Ir5	559	737	0.052	71.6
Ir6	560	740	0.064	84.4
Ir7	560	735	0.084	138.1

開発したIr(III)錯体の細胞内移行性

96ウェル黒プレートに
培養細胞を播種
 5×10^4 cells/well



培養
HT-29: 2 days
HeLa: 1 day



プローブ添加
5 μ M

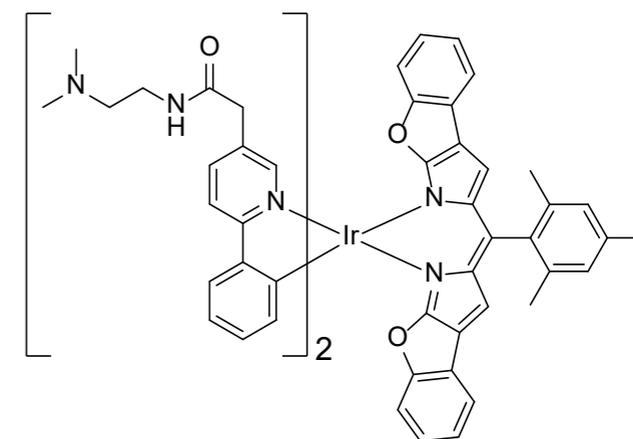
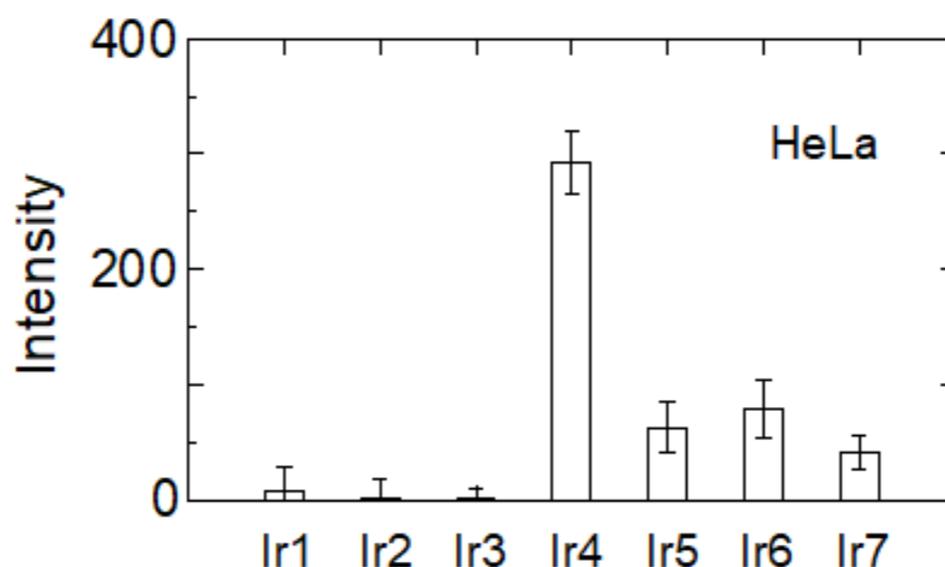
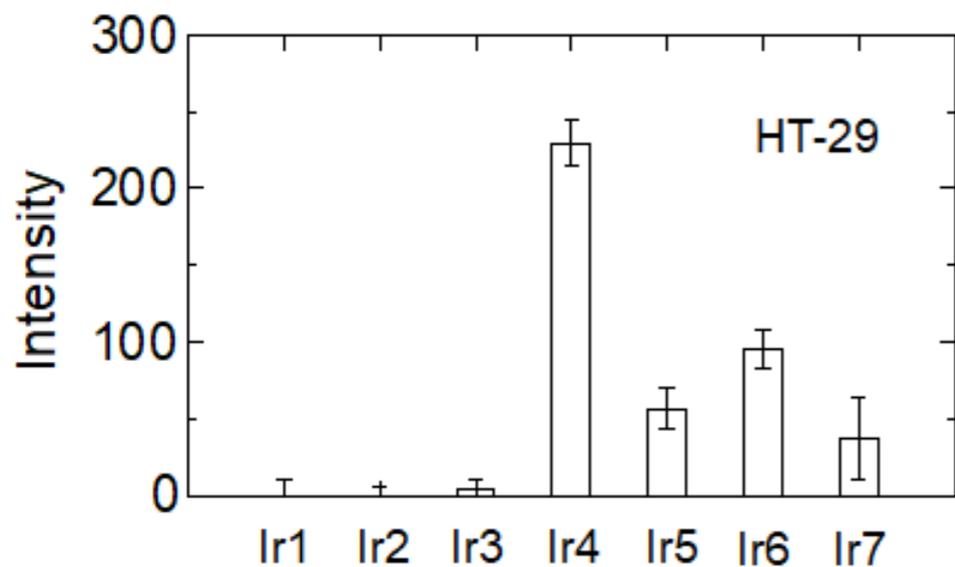


洗浄



マイクロプレート
リーダーを用いて
発光強度測定

$\lambda_{ex} = 560$ nm
 $\lambda_{em} = 740$ nm

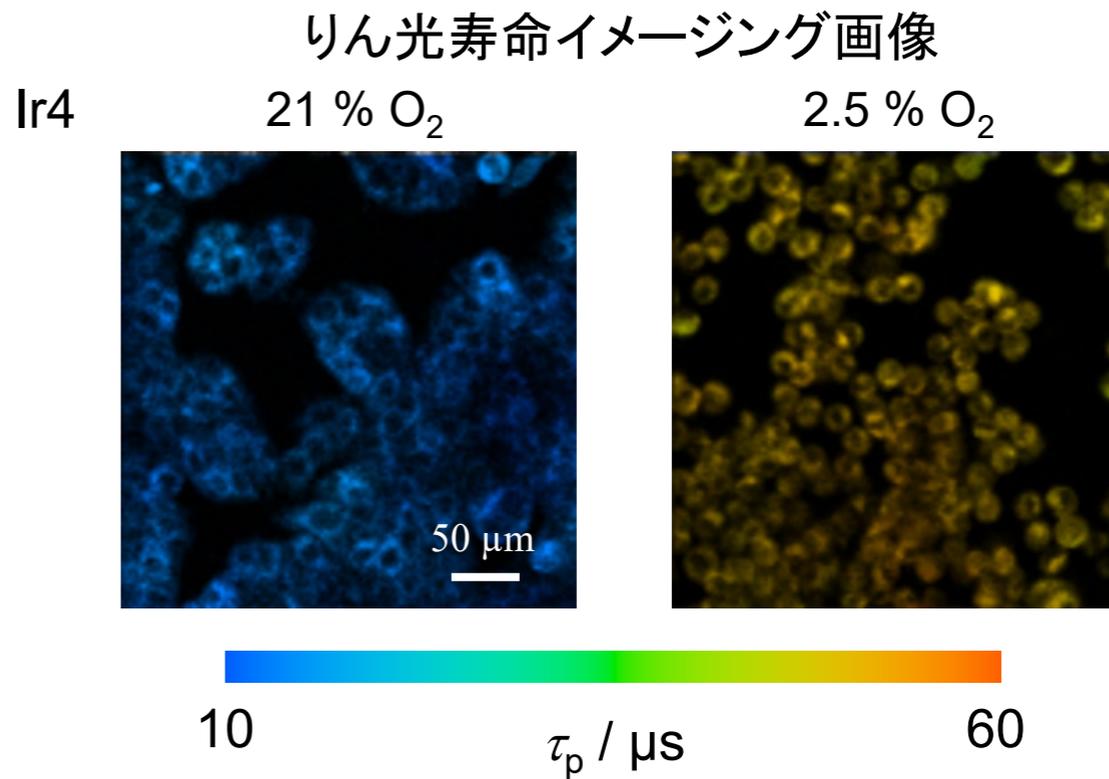
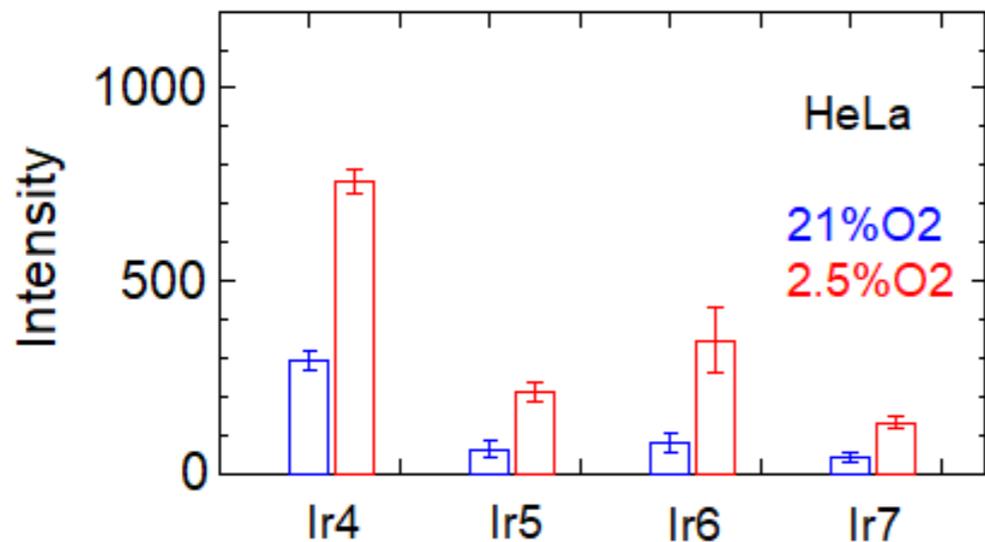
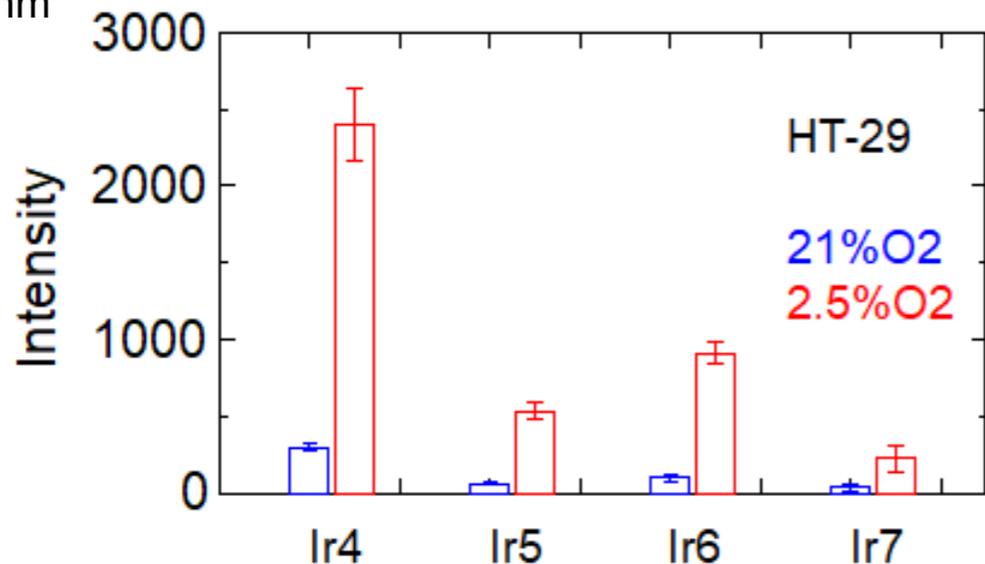


Ir4

✓ ジメチルアミノ基を導入したIr錯体の細胞移行性が向上し、
特にIr4がもっとも細胞移行性が高い

開発したIr(III)錯体の細胞内O₂応答性

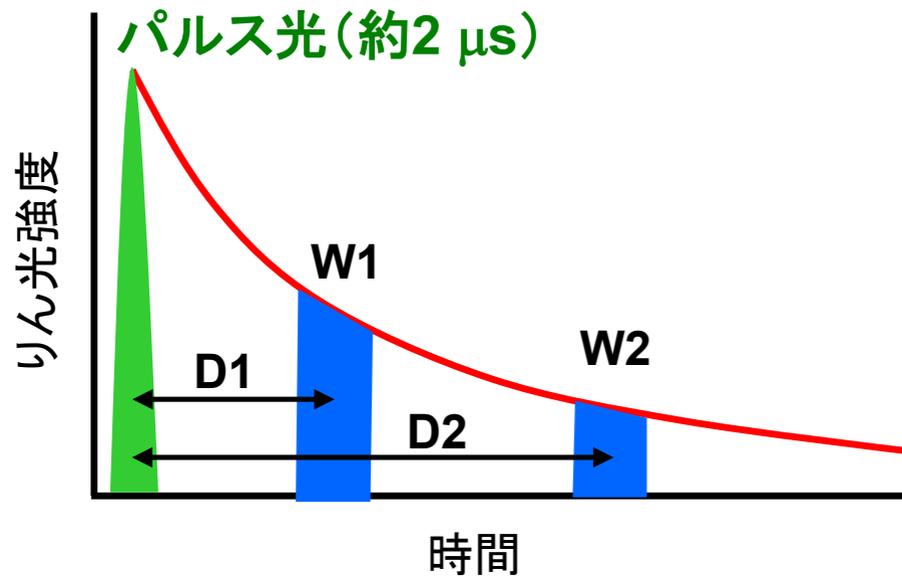
$\lambda_{\text{ex}} = 560 \text{ nm}$
 $\lambda_{\text{em}} = 740 \text{ nm}$



✓ プレートリーダーおよび顕微鏡画像から細胞内においても高い酸素応答性を確認

りん光寿命－酸素分圧変換パラメータの決定

マイクロプレートリーダー内の酸素分圧を変えてりん光寿命を測定



$$\text{りん光寿命} (\tau_p) = \frac{D2 - D1}{\ln(W1 / W2)}$$

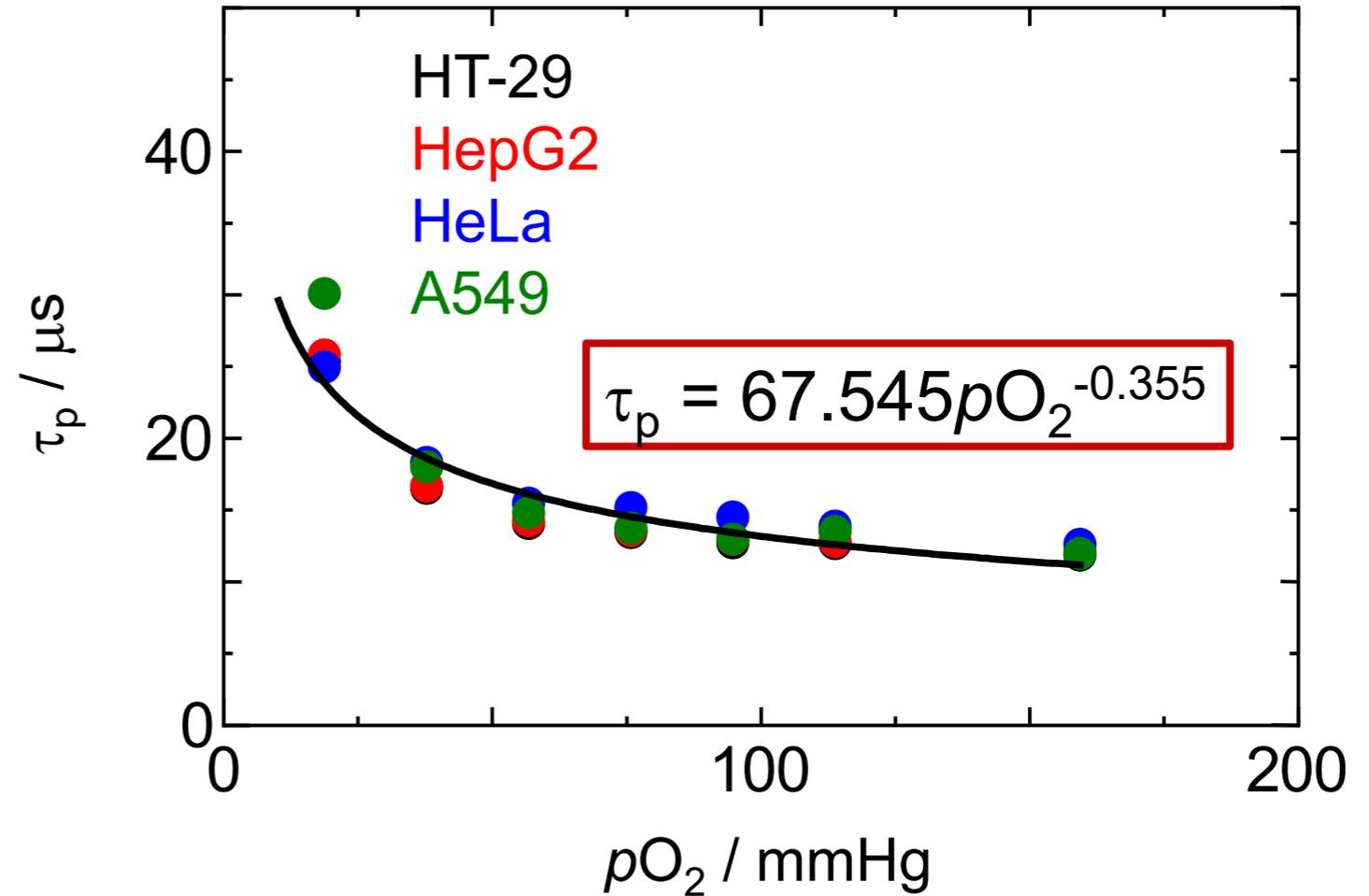
D1 : 遅延時間1 (10 μs)

D2 : 遅延時間2 (40 μs)

W1: りん光強度1

W2: りん光強度2

W1、W2を測定

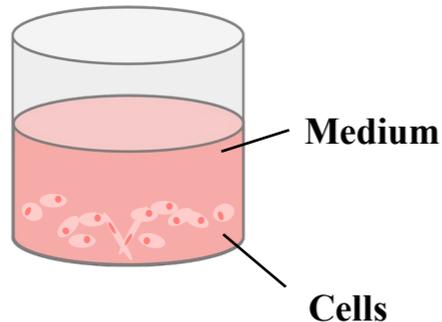


✓ りん光寿命を計測することで酸素分圧が決定できる。

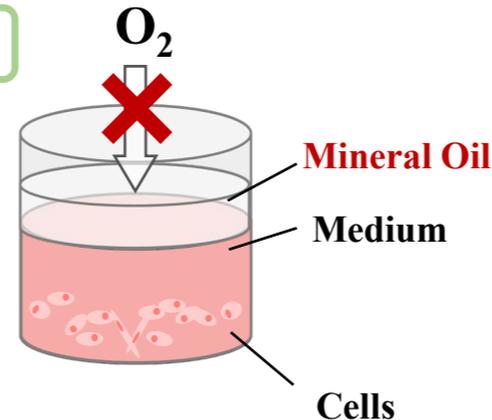
細胞内酸素分圧計測の実験手順



3 サイクル



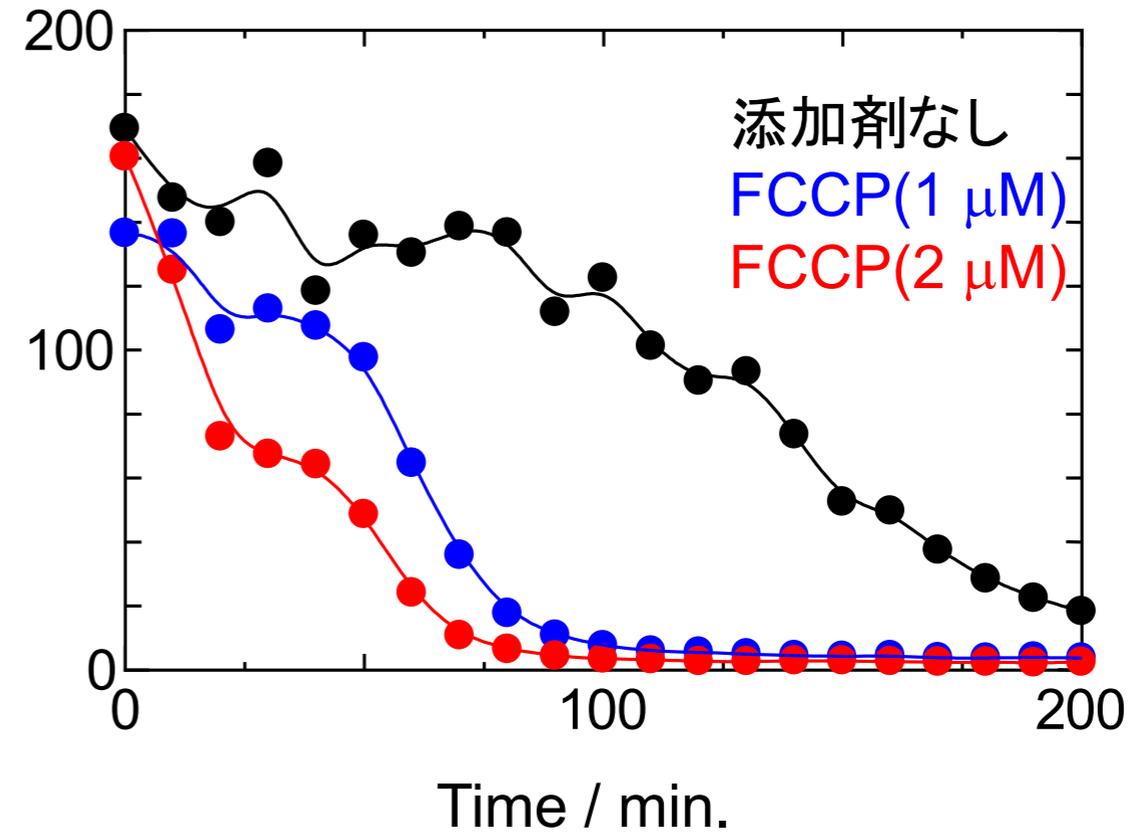
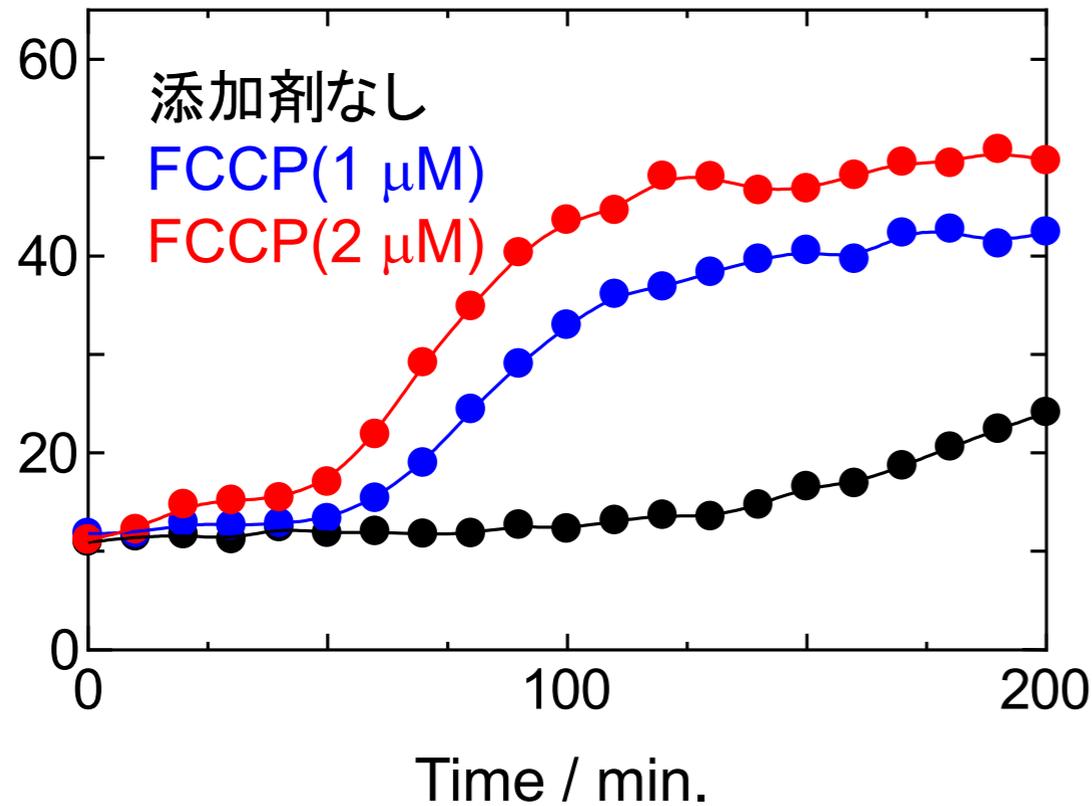
21 サイクル



酸素非透過性のミネラルオイルで各ウェルを封止

細胞内酸素分圧計測

HT-29



- ✓ マイクロプレートリーダーを用いて、HT-29細胞に取り込まれたIr4のりん光寿命が計測可能。
- ✓ FCCCPが添加された細胞では、無添加と比較してりん光寿命が顕著に増加した。
- ✓ りん光寿命－酸素分圧変換パラメータより、細胞内酸素分圧の絶対値を算出。

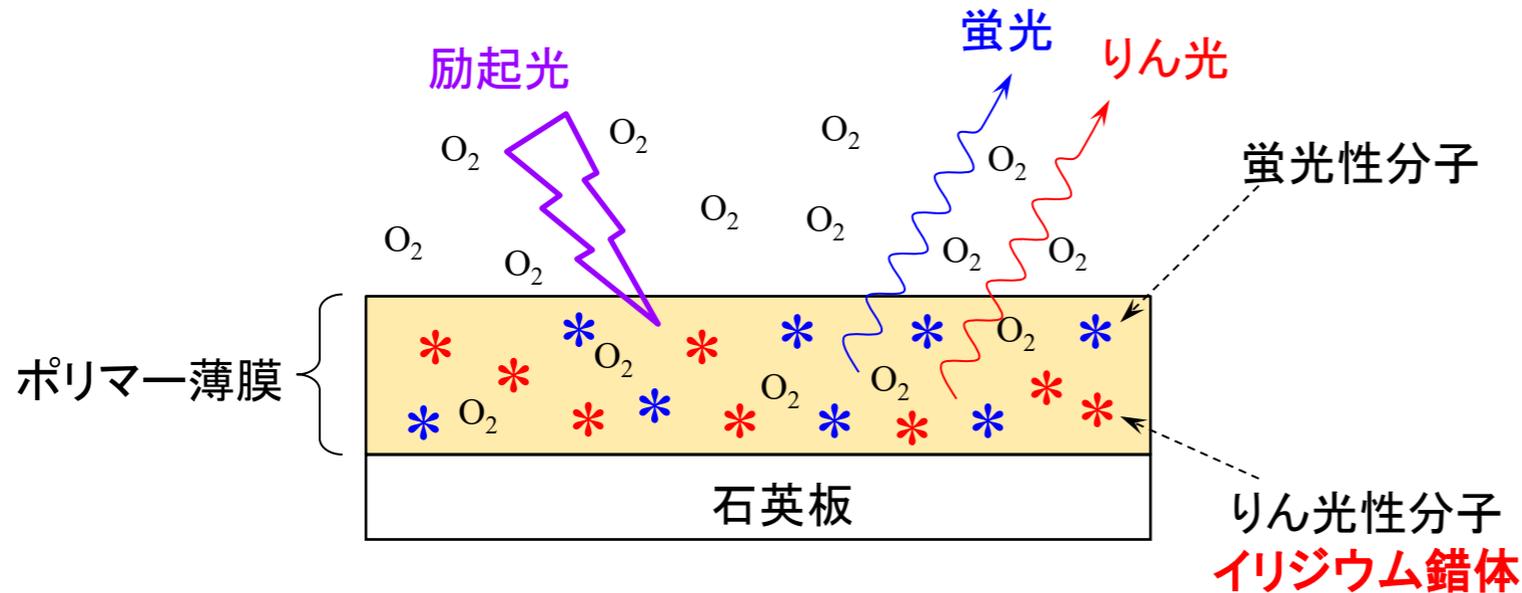
新技術の特徴・従来技術との比較

- 従来技術の問題点であった、**培養時間の大幅な短縮と可視光励起に成功**した。
- 従来は酸素プローブの添加時間が14時間以上であったが、細胞移行性を向上できたため、**短時間(プローブ添加時間：30分程度)の準備で酸素分圧を計測**することが可能となった。
- 本技術の適用により、様々な培養細胞の酸素分圧がリアルタイム計測できるため、**酸素が関与する代謝過程の解明や低酸素病態に関する診断法や治療薬の開発**が促進することが期待される。

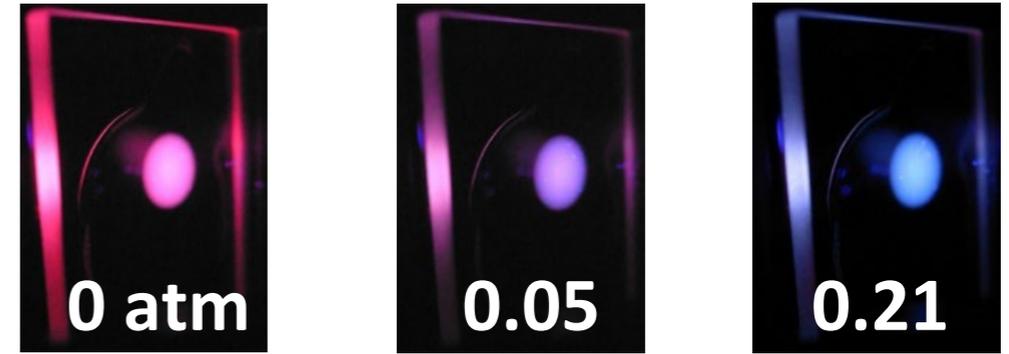
想定される用途

- 本技術の特徴を生かすためには、本試薬を様々な培養細胞(がん細胞)に適用することで、**低酸素病態の発生機構の解明、診断薬、治療薬開発のための支援ツールとしてのメリット**が大きいと考えられる。
- 上記以外に、**顕微鏡と組み合わせることで、酸素分圧イメージング画像が得られる**ことも期待される。
- また、達成された近赤外りん光や酸素応答性に着目すると、**食品包装材の酸素透過性評価**や**河川や湖底の酸素濃度計測**といった分野や用途に展開することも可能と思われる。

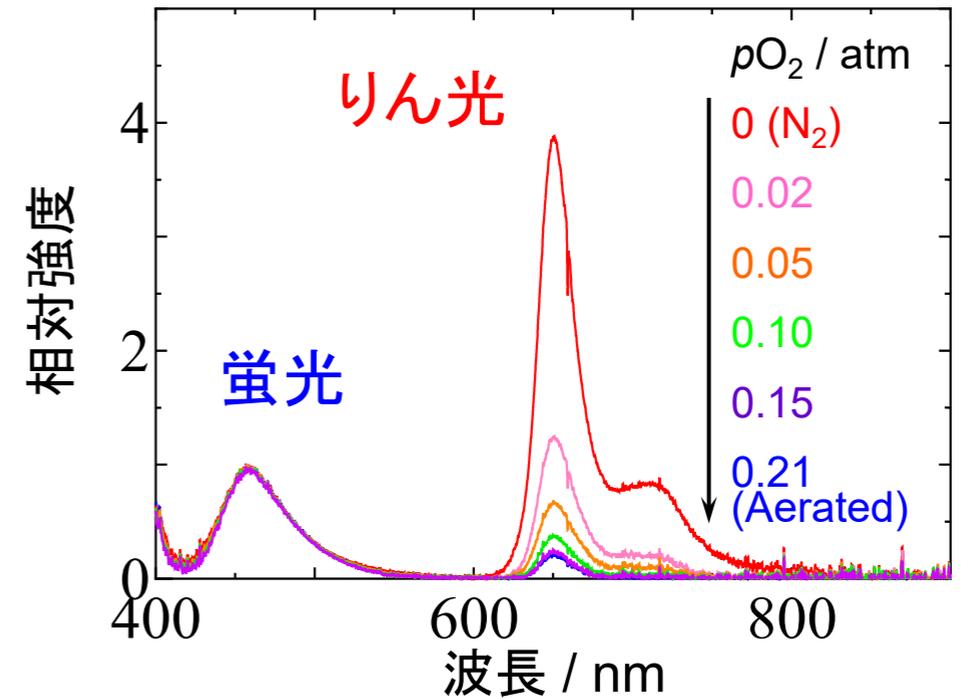
酸素センサーフィルム



酸素センサーフィルム



酸素センサーフィルムの発光色



- ✓ 蛍光強度を内標準とすることで、蛍光とりん光の強度比から酸素分圧が計測可能
- ✓ 酸素センサーフィルムを光ファイバーの先端に取り付けることで、ポータブル機器として利用可能

実用化に向けた課題

- 現在、**培養細胞について代謝過程に依存した酸素分圧測定が可能**なところまで開発済み。しかし、**スフェロイドやオルガノイドなど3次元細胞系への適用**が未解決である。
- 今後、**スフェロイドやオルガノイド**について実験データを取得し、**3次元細胞系**に適用していく場合の条件設定を行っていく。
- 実用化に向けて、**酸素分圧の測定精度を10%程度**まで向上できるように技術を確立する必要もあり。

社会実装への道筋

時期	取り組む課題や明らかにしたい原理等	社会実装へ取り組みについて記載
基礎研究	・酸素プローブの設計が完了（分子設計、合成スキーム）	
現在	・培養細胞内の酸素分圧測定が実現（複数のがん細胞種）	
1年後	・酸素プローブの進展 ・3次元細胞系に関する測定が実現（スフェロイド計測）	デモンストレーション実施 JSTの研究成果展開事業へ応募し研究資金獲得
2年後	・酸素プローブの主要特性の評価（性能、細胞毒性試験の実施） ・実験プロトコールの作成（培養条件の最適化を実現）	評価基礎データの提供 サンプル提供が実現
3年後	・酸素プローブの評価（安定性試験の実施）	試験サービスの実現

企業への期待

- 未解決の**3次元細胞系**については、**りん光寿命イメージング法**や**レシオ計測法の技術**により克服できると考えている。
- **創薬開発、バイオイメージング、試薬合成の技術**の技術を持つ、企業との共同研究を希望。
- また、**創薬、創薬支援ツール、バイオイメージング用試薬**を開発中の企業、**食品、環境分野への展開**を考えている企業には、本技術の導入が有効と思われる。

企業への貢献、PRポイント

- 本技術は**細胞内だけでなく、気体、液体、高分子内の酸素分圧測定が可能**なため、それぞれに合った酸素プローブを開発することでより企業に貢献できると考えている。
- 本技術の導入にあたり必要な追加実験を行うことで科学的な裏付けを行うことが可能。
- 本格導入にあたっての技術指導等

本技術に関する知的財産権

- 発明の名称 : 細胞および組織内酸素濃度測定試薬
- 出願番号 : PCT/JP2020/032028
- 出願人 : 群馬大学
- 発明者 : 吉原利忠、広瀬達也、飛田成史

産学連携の経歴

- 2021年 JST 研究成果展開事業
A-STEP トライアウトタイプに採択
- 2022年-2023年 JST 研究成果展開事業
A-STEP トライアウトに採択
- 2023年-2024年 JST 大学発新産業創出基金事業
可能性検証に採択
- 2023年- JST 研究成果展開事業
A-STEP産学共同(育成型)に採択

お問い合わせ先

群馬大学

産学連携・知的財産活用センター

T E L 0277-30-1171~1175

e-mail tlo@ml.gunma-u.ac.jp