

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 24 日現在

機関番号：12301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K12502

研究課題名(和文)眼底酸素濃度イメージングのための計測装置およびプローブ分子の開発

研究課題名(英文) Developments of a phosphorescence lifetime imaging microscopy and a probe molecule for oxygenation of retina

研究代表者

吉原 利忠 (YOSHIHARA, Toshitada)

群馬大学・大学院理工学府・准教授

研究者番号：10375561

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、眼底血管内および周辺細胞内の酸素濃度(分圧)を定量的に計測・イメージングするためのりん光プローブ分子および眼底顕微りん光寿命イメージング装置を開発した。りん光プローブ分子(DTTPH-PEG24)はイリジウム錯体を骨格とし、近赤外光りん光を示した。DTTPH-PEG24をウサギに投与し、開発したシステムで眼底部を観察したところ、吸気酸素分圧に依存してりん光寿命が変化した。よって、開発したプローブ分子および寿命イメージングシステムにより、小動物の眼底部の酸素化状態をイメージングできることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：We developed a phosphorescent probe and a phosphorescence lifetime imaging microscopy to clarify an oxygen level into a blood vessel and a tissue in retina of small animals. The synthesized phosphorescence probe (DTTPH-PEG24) based on iridium complex showed the near infrared emission. The phosphorescence lifetimes of DTTPH-PEG24 which was administered to the rabbit were dependent on the oxygen partial pressure. These results that our system can visualize an oxygenation of retina of small animals.

研究分野：光化学

キーワード：りん光 イリジウム錯体 酸素 寿命 顕微鏡 網膜

### 1. 研究開始当初の背景

眼底部位の血管が異常をきたすと網膜が低酸素状態となり失明にいたる。特に糖尿病網膜症は、我国成人の失明原因の第1位であり、糖尿病の3大合併症の1つである。糖尿病網膜症は病態がかなり進行するまで自覚症状がない場合が多く、病態の発見と治療を困難としている。研究代表者は、代表的な低酸素病態である‘がん’を光イメージングするために、低酸素環境下でのみ強いりん光を示すイリジウム錯体(Ir 錯体, BTP)を開発し、それらを用いて担がんマウス内の腫瘍の選択的蛍光イメージングに成功した(図1) [Cancer Res., 70, 4490-4498, 2010.]。本研究では、光が深部まで到達する組織として眼を対象とする。低酸素状態によって誘発される眼疾患は失明に直結するため、quality of life(QOL)の観点からも病態の早期発見は重要な課題である。

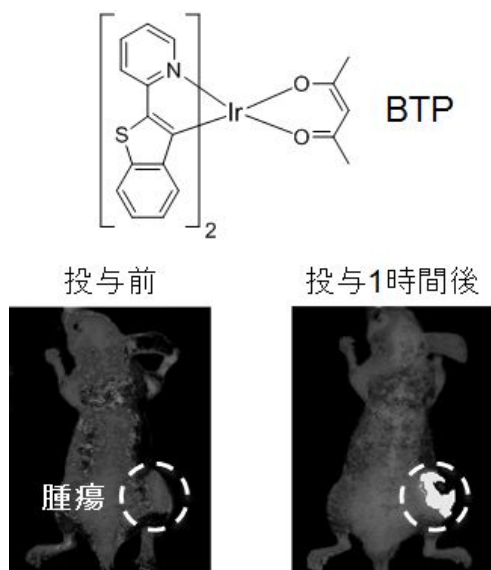


図1 BTPの構造式および腫瘍イメージング

本申請課題では、これまで研究代表者が開発してきた Ir 錯体のりん光の酸素応答性を利用して、眼底部位の酸素濃度計測・イメージングに挑戦する。そのために、マクロズーム顕微鏡と ICCD カメラを組み合わせた定量的計測装置および、眼底血管内または眼底細胞内に局在する新規 Ir 錯体を開発する。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、眼底虚血疾患における眼底血管内および周辺細胞内の酸素濃度(分圧)を定量的に計測・イメージングするための眼底顕微鏡りん光寿命イメージング装置およびりん光プローブ分子を開発することである。イメージング装置は、マクロズーム顕微鏡と時間分解画像を取得できるゲート付き CCD カメラ(ICCD カメラ)から構成される。これにより、眼底部全体の酸素濃度に加えて、ズームレンズを用いることで血管周辺細胞

の酸素濃度もイメージングできる。また、ICCD カメラによって寿命イメージング画像を構築するため、投与されたりん光プローブ分子の濃度に関係なく定量化が可能となる。りん光プローブ分子は、イリジウム錯体を基軸として血液中を循環する水溶性イリジウム錯体と細胞内に移行する細胞親和性の高いイリジウム錯体を開発する。

### 3. 研究の方法

(1)眼底部をイメージングする試薬として、一般にフルオレセインが用いられる。フルオレセインは緑色蛍光を示すため、眼底部の酸素レベルを検出するプローブ分子の発光は、フルオレセインとは異なる波長が望ましい。本研究では、図2に示すイリジウム錯体(DTTPH-PEG24)を合成した。

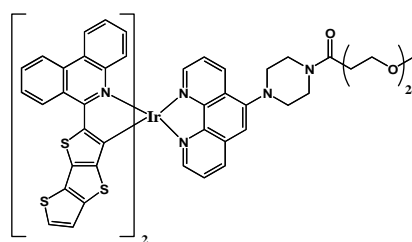


図2 DTTPH-PEG24の構造式

(2)小動物眼底部の毛細血管と組織を区別してイメージングするための眼底顕微鏡りん光寿命イメージングシステムを開発を行った(図3)。顕微鏡はマクロズーム顕微鏡(MVX-10, オリンパス), 寿命イメージング用カメラはゲート付き CCD カメラ(ICCD カメラ, PI-MAX3, Princeton), 励起光源(FDSS532-Q, CryLas)は, Nd:YAG レーザーの第二高調波(532nm)を用いた。小動物の眼底部に焦点を当てるために、マクロズームの対物レンズと小動物の間に前置レンズ(40D, Volk)を設置した。励起光源と ICCD はデジタルディレイパルスジェネレータ(DG645, Stanford Research Systems)を用いて時間制御を行った。

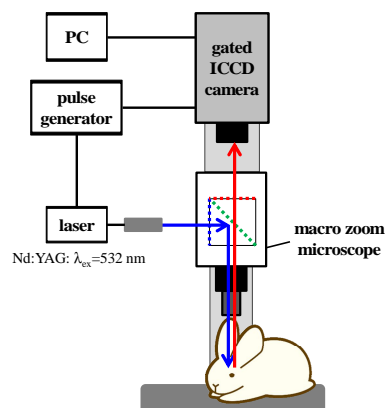


図3 眼底顕微鏡りん光寿命イメージングシステム

(3)開発した DTPH-PEG24 の光化学・光物理特性（吸収・りん光スペクトル，りん光量子収率，りん光寿命）を空気飽和および窒素置換した溶液中で測定を行った。

(4)フルオレセインおよび DTPH-PEG24 を用いたウサギ眼底イメージングは，群馬大学大学院医学系研究科秋山教授と行った。麻酔下にあるウサギの耳介静脈から生理食塩水/ジメチルスルホキシド（19：1）混合溶媒に溶かしたフルオレセイン（90 $\mu$ mol）および DTPH-PEG24（50 $\mu$ mol）を投与した。ウサギの吸気酸素分圧は，ガス混合装置（GM8000，TOKAI HIT）を用いて制御した。

#### 4. 研究成果

(1)図 4 に DTPH-PEG24 のテトラヒドロフラン（THF）中における吸収スペクトルおよび発光スペクトルを示す。DTPH-PEG24 は 600nm 付近から光を吸収し，520nm に第一吸収極大波長を示す。よって，Nd:YAG レーザーの第二高調波（532nm）で光励起することが可能である。発光スペクトルの極大波長は 708nm に観測され，近赤外光領域に発光を示す。窒素置換下における発光強度と比較して，空気飽和下の発光強度は著しく減少していることから，酸素消光を受けることがわかる。よって，得られた発光は，DTPH-PEG24 のりん光に帰属することができる。THF 中においてりん光寿命を測定したところ，窒素飽和下では 6.58 $\mu$ s，空気飽和下では 0.54 $\mu$ s であった。

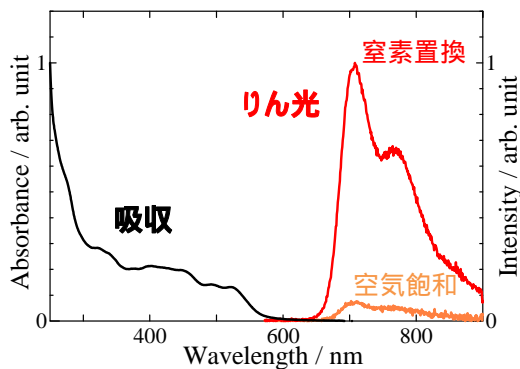


図 4 THF 中における DTPH-PEG24 の吸収・発光スペクトル

(2)図 5 にフルオレセインおよび DTPH-PEG24 の発光顕微画像を示す。フルオレセインにおいては，眼底血管部の発光強度が弱く，血管周辺の網膜の発光強度が強いことがわかる。これはフルオレセインが小分子であるため，投与後，短時間のうちに血管外に漏れ出たためである。一方，DTPH-PEG24 では，視神経乳頭付近の血管部位から強い発光が見られる。これは，DTPH-PEG24 が血中においてアルブミンに取り込まれ，その状態で血中に止まっていると考えられる。DTPH-PEG24 のアルブミンとの親和性を確認するために，牛血

清アルブミン（BSA）存在下および非存在下で，発光測定を行ったところ，存在下において発光強度が著しく増加した。図 4 の画像は，通常の CMOS カメラで撮影した画像であるため，プローブ分子の局在について知見が得られる。

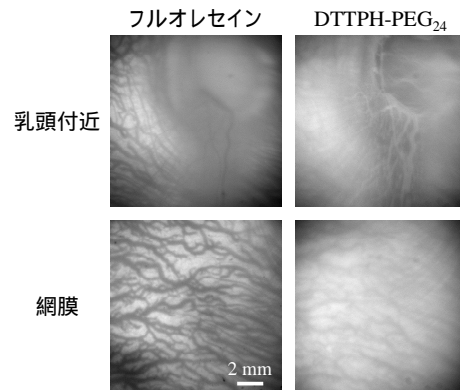


図 5 フルオレセインおよび DTPH-PEG24 投与後に撮影したウサギ眼底部の発光顕微画像

(3)ウサギ眼底部の酸素レベルを明らかにするために，ICCD カメラを用いて視神経乳頭付近の撮影を行った。図 6 に吸気酸素分圧 21% および 12.5% におけるりん光強度画像およびりん光寿命画像を示す。12.5% において眼底部のりん光寿命が増加していることから，吸気酸素分圧の減少に伴い，眼底部が低酸素状態に変化したことが分かる。また，血管領域と網膜領域の 10x10 ピクセルの各 4 領域（ROI）について，それぞれりん光寿命を計算した。その結果を図 7 に示す。両領域において，寿命の増加が観測され，また，再度 21% の酸素分圧に戻すと，寿命がほぼもとに戻ることが示された。これらの結果より，本研究で開発した DTPH-PEG24 および眼底顕微りん光寿命イメージングシステムを用いることにより，ウサギ眼底部の酸素化状態をイメージングできることが明らかとなった。

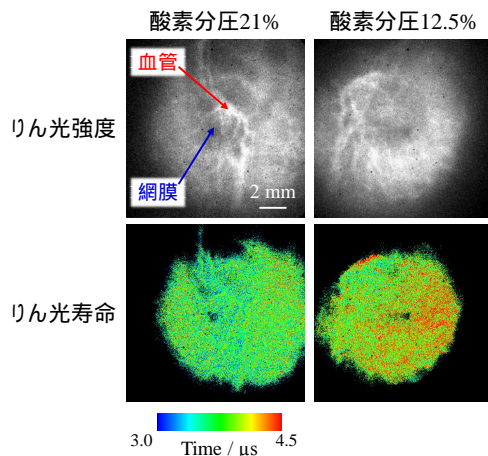


図 6 ウサギ眼底部のりん光強度およびりん光寿命イメージング画像

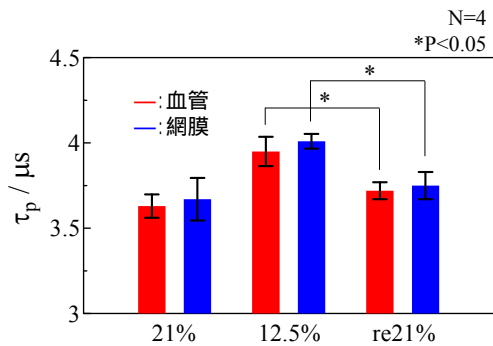


図 7 ウサギ眼底部の血管と網膜のりん光寿命の吸気酸素分圧依存性

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 2 件)

T. Yoshihara, H. Akiyama, H. Obinata, S. Rokudai and S. Tobita, Two Dimensional Intracellular and *in vivo* Oxygen Sensing by Using a Gated ICCD Camera, 3<sup>rd</sup> International Symposium of Gunma University Medical Innovation and 8<sup>th</sup> International Conference on Advanced Micro-Device Engineering, 2016 年 12 月 9 日, 桐生市市民文化会館 (群馬県, 桐生市)

T. Yoshihara, H. Obinata, H. Akiyama, and S. Tobita, Ratiometric Optical Probes for Intracellular Oxygen Sensing, 2<sup>nd</sup> International Symposium of Gunma University Medical Innovation, 2015 年 12 月 8 日, 群馬大学医学部 (群馬県, 前橋市)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：

種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等  
<http://tobita-lab.chem-bio.st.gunma-u.ac.jp/>

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

吉原 利志 (YOSHIHARA, Toshitada)  
群馬大学大学院理工学府・准教授  
研究者番号：10375561

##### (2) 研究分担者

秋山 英雄 (AKIYAMA, Hideo)  
群馬大学大学院医学系研究科・教授  
研究者番号：60359586

##### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：

##### (4) 研究協力者

( )