



## 無染色で単一細胞内の水素イオン濃度を可視化する 蛍光寿命イメージング測定に成功

### 研究成果のポイント

- ・細胞自身が持つ蛍光物質の蛍光寿命を用いて、細胞の中の水素イオン濃度の測定に成功。
- ・細胞を染色する必要がなく、測定時間の短縮化と試料本来の状態を維持しながらの測定が可能。
- ・細胞のがん診断などへの応用が期待される。

### 研究成果の概要

細胞の中の水素イオン濃度 (pH) を、無染色で可視化することに成功しました。今までのように細胞を色素物質で染める必要がないため、測定時間を大幅に短縮することができます。また、色素物質のような異物を導入することがないために、細胞本来の状態を維持しながら測定を行うことができます。この方法では、細胞自身が発する微弱蛍光が水素イオン濃度に応じて変化することを利用して、さらに、蛍光の強さではなく、蛍光の寿命を画像化する方法を用いることによって、微弱蛍光を用いた pH 測定が可能になりました。細胞のがん診断などへの応用が期待されます。

### 論文発表の概要

研究論文名：Intracellular pH Sensing Using Autofluorescence Lifetime Microscopy (自家蛍光の蛍光寿命顕微分光法を用いた細胞内 pH センシング)  
著者：氏名 (所属) Shinya Ogikubo<sup>1</sup>, Takakazu Nakabayashi<sup>2</sup>, Takashi Adachi<sup>1</sup>, Md. Serajul Islam<sup>2</sup>, Tomokazu Yoshizawa<sup>2</sup>, Masataka Kinjo<sup>2</sup>, and Nobuhiro Ohta<sup>2</sup> ( <sup>1</sup>富士フイルム株式会社, <sup>2</sup>北海道大学)  
公表雑誌：The Journal of Physical Chemistry B (アメリカ化学会(American Chemical Society (ACS))の学術誌)  
公表日：米国東部時間 2011 年 7 月 21 日 (ホームページ上に掲載)

### 研究成果の概要

#### (背景)

酸性やアルカリ性の度合いを示す水素イオン濃度 (pH) は、人間の体にとって極めて重要です。人間の体の中では、この pH が一定になるように調整機能が働いていますが、バランスが崩れると、嘔吐や呼吸困難を引き起こします。また、ガン化した細胞では、細胞の中の pH が増加することも報告されています。

水溶液の pH は、リトマス紙などを用いて簡単に調べることができますが、細胞や生体組織の中ではリトマス紙を使うことができません。そのため、細胞を蛍光物質で染色し、その物質から発する蛍光の強さ (強度) から細胞内の水素イオン濃度が求められてきました。しかし、染色による方法では蛍光物質という異物を細胞内に導入するために、細胞本来の状態を変化させることになってしまいま

す。その上、染色に時間を要するために、手術などにおいて迅速な判断を行うことができないなどの問題点があります。蛍光物質が持つ毒性も検討しなければならない課題となります。

#### (研究手法)

北海道大学電子科学研究所の太田信廣教授、中林孝和准教授は富士フイルム株式会社との共同研究として、細胞や生体組織の中の水素イオン濃度を、細胞の“あるがままの状態”で、その場で測定する蛍光寿命(用語解説1)イメージング法の開発に着手し、培養細胞を用いて無染色での水素イオン濃度の測定に成功しました。蛍光寿命イメージング法は、非常に短いパルス幅を持つレーザーを用いて、細胞の各位置における蛍光の寿命(蛍光寿命)を用いて画像化する方法です。蛍光寿命の値は、蛍光強度の揺らぎや色素物質の濃度などに依存しません。また、入射光の強度や波長にも依存しませんので、蛍光強度測定に比べて、より高感度、より精密な測定を行うことができます。光によって蛍光物質が壊れて蛍光強度が減少する光退色と呼ばれる現象があり、蛍光強度測定では大きな問題になりますが、蛍光寿命の値はこの光退色にも依存しませんので、より詳しい議論を行うことができます。

#### (研究成果)

太田教授らが開発した方法では、細胞内に含まれるニコチンアミドアデニンジヌクレオチド(NADH)と呼ばれる物質からの蛍光の寿命が、水素イオン濃度に敏感に応答することを用いています(図1参照)。この観測されるNADHからの発光は、細胞自身からの発光ということで自家蛍光と呼ばれています。太田教授らは、細胞内の水素イオン濃度の減少(pHの増加)に応じて、NADHの蛍光寿命が短くなることを見出し、蛍光寿命イメージング測定により、培養細胞中の水素イオン濃度が、NADHの蛍光寿命を用いて得られることを示しました(図2参照)。

また、核とミトコンドリアにおいて水素イオン濃度による蛍光寿命の変化が異なることも明らかにし、細胞内の各器官において水素イオン濃度を選択的に検出できることを示しました。水素イオン濃度による蛍光寿命の変化は、細胞内のNADHと周囲のタンパク質との相互作用が水素イオン濃度に応じて変化することが原因の一つであると考えられています。

#### (今後への期待)

NADHは補酵素(用語解説2)の働きを示す化合物になり、ほぼすべての細胞に存在することが知られています。そのため、非常に多くの細胞へ応用を行うことができる一般的な手法になることが可能です。細胞内に本来備わっている発光物質を用いているために、細胞を染色することなく細胞中の水素イオン濃度をその場で求めることができ、迅速な判断が可能になり、疾病の早期検出やガン診断などへの応用が期待されます。また、蛍光寿命イメージング法は内視鏡と組み合わせることができ、細胞や組織を採取することなく、人体内部の水素イオン濃度をそのまま観察することもできます。

### お問い合わせ先

所属・職・氏名：北海道大学電子科学研究所 教授 太田 信廣(おた のぶひろ)

TEL: 011-706-9410 FAX: 011-706-9406 E-mail: nohta@es.hokudai.ac.jp

ホームページ：http://www31.atwiki.jp/nohta/pub/phonon/

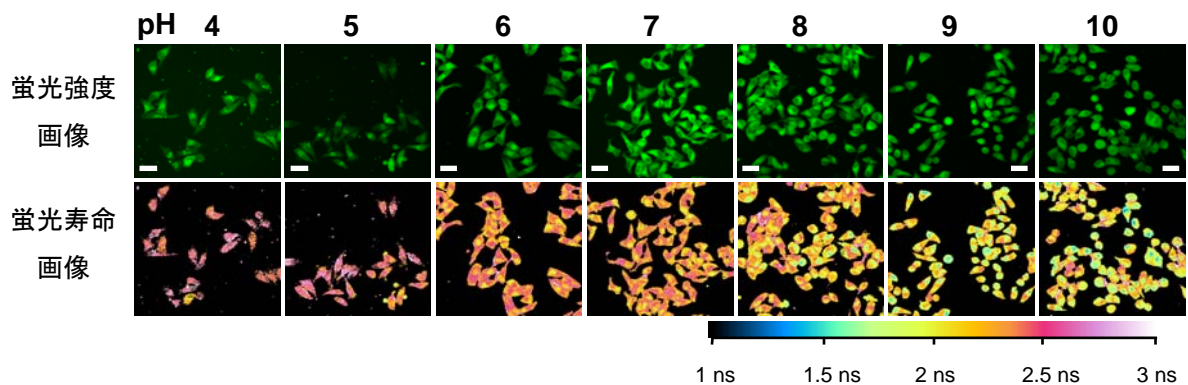
### 【用語解説】

1) **蛍光寿命**：物質が光を吸収して高エネルギー状態が生成し、その高エネルギー状態から蛍光を発して元に戻るまでの平均時間。十分に短いパルス幅を持ったパルス状の光で物質を励起したときに、発する蛍光の強度が  $1/e$  になるまでの時間として一般的には定義される。

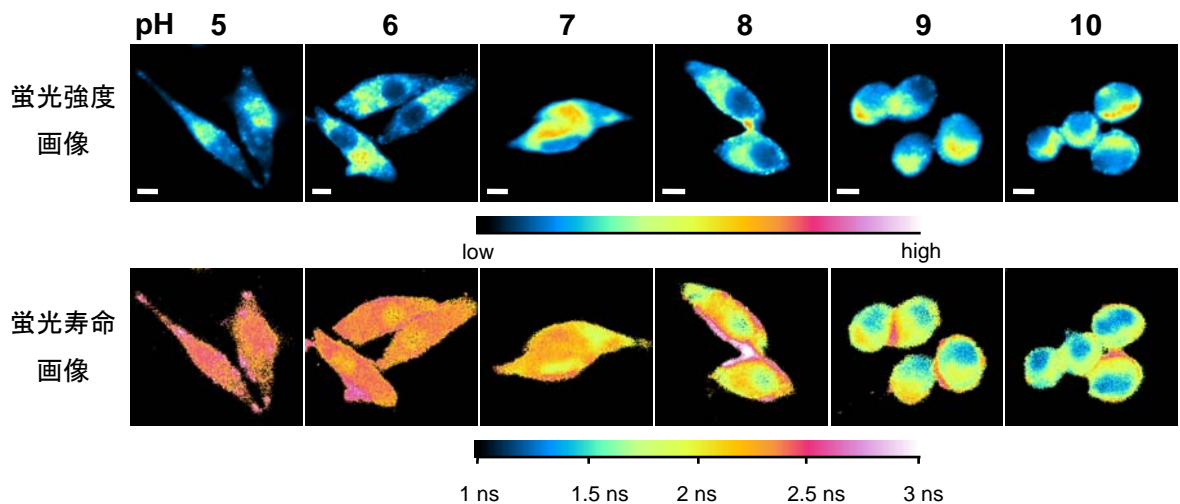
2) **補酵素**：生体内の化学反応（酵素反応）において、酵素と結合して反応を促進させる化学物質。NADH は代表的な補酵素である。

### 【参考図】 図 1

#### 低分解能画像（多数の細胞を観測）



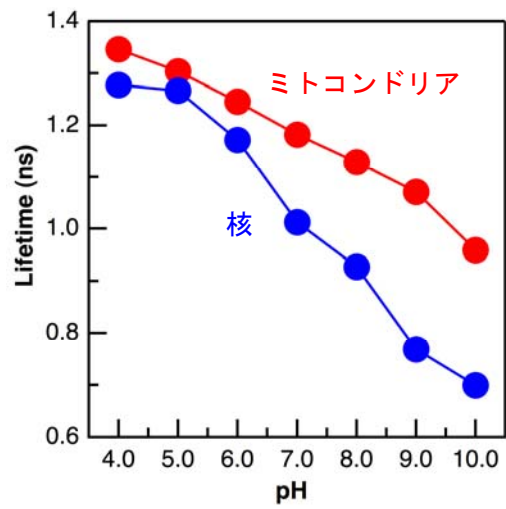
#### 高分解能（細胞内での分布を観測）



HeLa（ヒーラ）細胞内の NADH の蛍光強度画像と対応する蛍光寿命画像の細胞内水素イオン濃度（pH）依存性。水素イオン濃度は蛍光強度画像の上段に示してあります。上は低分解能による測定で、多数の細胞を観測することができます。下は高分解能の測定結果です。水素イオン濃度によって、蛍光寿命を示す色が変わっており、水素イオン濃度が減少する（pH が大きくなる）につれて蛍光寿命の値が短くなるのがわかります。

注) **HeLa 細胞**：ヒト由来の細胞株。子宮頸ガンから分離され、培養細胞として広く用いられています。

図 2



NADH の蛍光寿命の細胞内位置依存性。細胞内の核●，及びミトコンドリア●に存在する NADH から発する蛍光について，各々の蛍光寿命が細胞内の pH の変化とともにどう変わるかを調べた結果です。pH が大きくなるにつれて，すなわち水素イオン濃度が減少するにつれて蛍光寿命の値が短くなり，その変化量の大きさはミトコンドリアよりも核の方が大きいことがわかります。