

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第4923298号
(P4923298)

(45) 発行日 平成24年4月25日 (2012. 4. 25)

(24) 登録日 平成24年2月17日 (2012. 2. 17)

(51) Int. Cl.

F I

GO 1 N 33/84 (2006. 01)
C 1 2 Q 1/02 (2006. 01)GO 1 N 33/84 Z
C 1 2 Q 1/02

請求項の数 5 (全 28 頁)

(21) 出願番号 特願2009-531326 (P2009-531326)
(86) (22) 出願日 平成20年1月21日 (2008. 1. 21)
(65) 公表番号 特表2009-541779 (P2009-541779A)
(43) 公表日 平成21年11月26日 (2009. 11. 26)
(86) 国際出願番号 PCT/KR2008/000352
(87) 国際公開番号 W02009/031734
(87) 国際公開日 平成21年3月12日 (2009. 3. 12)
審査請求日 平成20年4月22日 (2008. 4. 22)
(31) 優先権主張番号 10-2007-0090726
(32) 優先日 平成19年9月7日 (2007. 9. 7)
(33) 優先権主張国 韓国 (KR)

(73) 特許権者 505176556
コリア ユニバーシティ インダストリアル
アンド アカデミック コラボレイシ
ョン ファウンデーション
大韓民国, ソウル 136-701, ソン
ブーク, アナムードン, 5-カ, 1, コ
リア ユニバーシティ内
(74) 代理人 100077805
弁理士 佐藤 辰彦
(74) 代理人 100081477
弁理士 堀 進
(74) 代理人 100099690
弁理士 鷲 健志
(74) 代理人 100109232
弁理士 本間 賢一

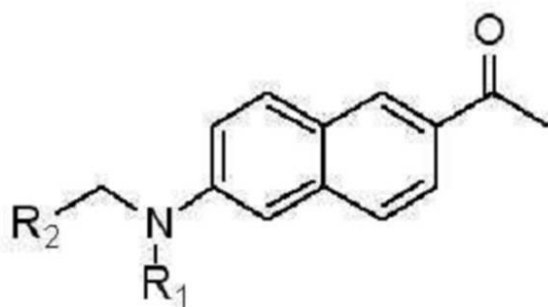
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 細胞内カルシウムのリアルタイムモニタリング用二光子プローブ

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

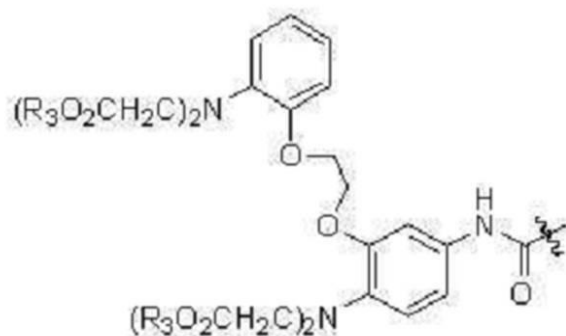
下記式 (1) で表わされることを特徴とする、細胞内カルシウムのリアルタイムモニタ
リング用二光子プローブ。



(1)

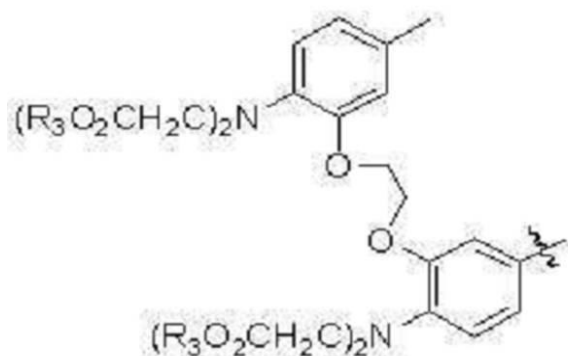
10

(式中、 R_1 は、 CH_3 またはHであり、 R_2 は、



20

または



30

であり、 R_3 は、Hまたは $CH_2OC(=O)CH_3$ である。)

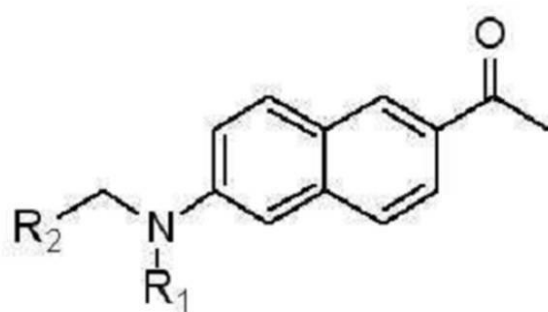
【請求項2】

前記 R_3 は、 $CH_2OC(=O)CH_3$ であることを特徴とする請求項1記載の細胞内カルシウムのリアルタイムモニタリング用二光子プローブ。

【請求項3】

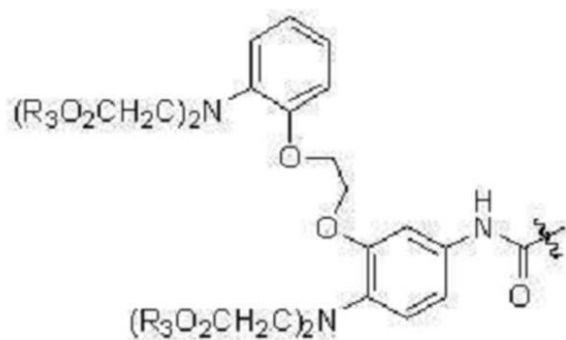
下記式(1)で表わされる細胞内カルシウムのリアルタイムモニタリング用二光子プローブの製造方法であって、下記式(2)の化合物と下記式(3)の化合物とが反応する段階を含むことを特徴とする二光子プローブの製造方法。

40

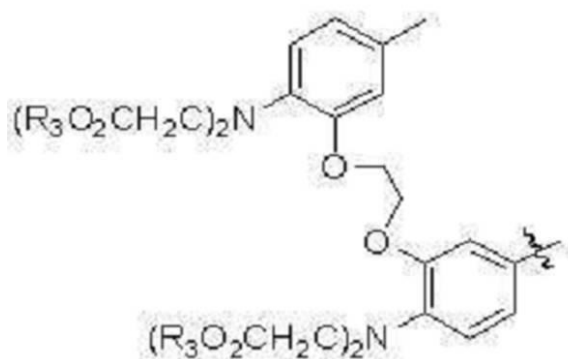


(1)

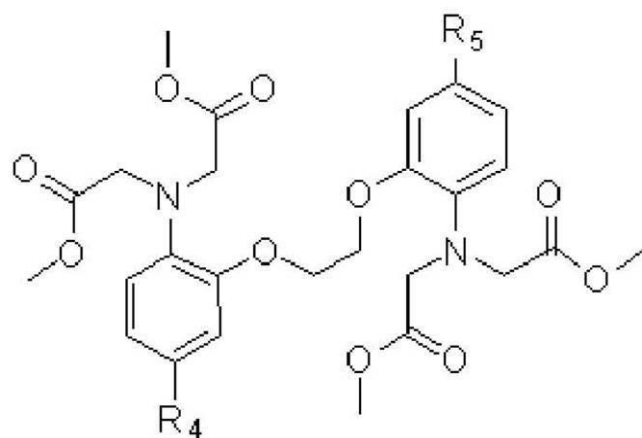
(式中、 R_1 は、 CH_3 または H であり、 R_2 は、



または



であり、 R_3 は、 H または $CH_2OC(=O)CH_3$ である。)



(2)

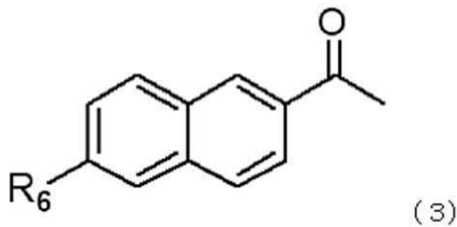
(式中、 R_4 は、 NH_2 または CHO であり、 R_5 は、 H または CH_3 である。)

10

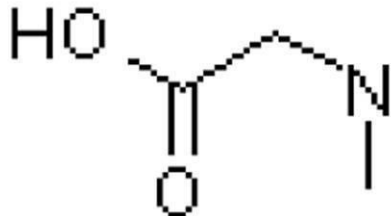
20

30

40



(式中、 R_6 は、 NH_2 または



10

である。)

【請求項 4】

請求項 1 または請求項 2 記載の二光子プローブを観察対象とする細胞内に注入した後、放出される二光子励起蛍光イメージを得る段階を含むことを特徴とする細胞内カルシウムのリアルタイムモニタリング方法。

20

【請求項 5】

前記二光子励起蛍光イメージは、 $500 \sim 620 \text{ nm}$ の範囲の波長を使って得ることを特徴とする請求項 4 記載の細胞内カルシウムのリアルタイムモニタリング方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、細胞内カルシウムのリアルタイムモニタリング用の二光子プローブ、その製造方法及び前記二光子プローブを利用した細胞内カルシウムのリアルタイムモニタリング方法に関するものである。より詳細には、二光子吸収効率が大きく、細胞膜とカルシウムイオンとを選択的に認識することができ、高い光安定性を有して細胞内カルシウムイオンのリアルタイムモニタリングに適した細胞内カルシウムのリアルタイムモニタリング用二光子プローブ、その製造方法及び該二光子プローブを利用した細胞内カルシウムのリアルタイムモニタリング方法に関する。

30

【背景技術】

【0002】

カルシウムイオン (Ca^{2+}) は、多様な細胞機能を調節する様々な細胞内の信号伝達物質である。 Ca^{2+} -シグナル伝達系は、広い動的範囲にかけて機能する多様な細胞過程を調節するために多くの異なる方法で作動する。これにより、カルシウムは数マイクロ秒以内に開口分泌 (exocytosis) を誘発し、数分～数時間以内に遺伝子転写及び増殖を引き起こす。

40

【0003】

このような生体内カルシウムの機能を理解するために、Oregon Green 488 BAPTA-1 (OG1) 及び fura-2 のような蛍光プローブで蛍光イメージを得る方法が最も広く使われて来た。しかし、このようなプローブを一光子顕微鏡に使うためには、短波長光 (約 $350 \sim 500 \text{ nm}$) で励起させなければならない、このために透過深度が非常に浅く ($< 100 \mu\text{m}$)、光退色 (photobleaching)、光損傷 (photodamage) 及び細胞自己蛍光 (cellular auto-fluorescence) などの問題点を有しているため、生体組織をイメージ化するのには限界がある。

【0004】

二光子顕微鏡 (two-photon microscopy、TPM) は、このような短所を克服すること

50

ができる。一光子顕微鏡 (one-photon microscopy、O P M) は、励起のために高エネルギーを有する一つの光子を使うが、T P M は、励起された蛍光物質を得るために、より低いエネルギーを有する 2 個の近赤外線光子が用いられる。T P M は O P M に比べ、局部的に励起可能であること、透過深度の増加 ($> 500 \mu\text{m}$)、細胞自己蛍光及び自己吸収の低下、そして、光損傷及び光退色を減少させることができるという長所を有する。従って、T P M は、組織切片内部に $70 \mu\text{m}$ 以上延びることもある表面処理の結果による干渉なしに長期間組織内部の深い所をイメージ化することができる。

【 0 0 0 5 】

しかし、現在、T P M に使われる大部分の蛍光物質プローブは、蛍光物質として低値の T P 作用断面 (T P action cross section) ($\Phi\delta$) を有するために、高いプローブ濃度、または高いレーザー電力が要求される。さらに、蛍光量収率が細胞質内より膜の方が高くなるため、膜結合プローブからの蛍光信号が標的ミス (mistargeting) のような重要な誤りを引き起こすことがある。

【 0 0 0 6 】

知る限りにおいて、いまだカルシウムを選択的にリアルタイムに映像化させることができる二光子染料は報告されていない。そのため、光退色または標的ミスの問題なしに、生体組織内部の深い所でカルシウム波を可視化することができる効果的な T P プローブを開発する必要性がある。

【非特許文献 1】R.Pethig, M.Kuhn, R.Payne, E.Adler, T.-H.Chen, L.F.Jaffe, Cell Calcium 1989, 10491- 498

【非特許文献 2】H.M.Kim, C.Jung, B.R.Kim, S.-Y.Jung, J.H.Hong, Y.-G.Ko, K.J.Lee, B.R.Cho, Angew.Chem.Int.Ed.2007, 46, 3460-3463

【非特許文献 3】J.N.Demas, G.A.Crosby, J.Phys.Chem.1971, 75991-1024

【非特許文献 4】C.Reichardt, Chem.Rev.1994, 94, 2319-2358

【非特許文献 5】R.Rudolf, M.Mongillo, R.Rizzuto, T.Pozzan, Nat.Rev.Mol.Cell Biol.2003, 4579-586

【非特許文献 6】K.A.Connors, Binding Constants; JohnWiley & Sons, Inc.:New York, 1987

【非特許文献 7】J.R.Long, R.S.Drago, J.Chem.Ed.1982, 59, 1037

【非特許文献 8】K.Hirose, J.Incl.Phenom.Macrocycl.Chem.2001, 39193

【非特許文献 9】J.R.Long, R.S.Drago, J.Chem.Educ.1982, 59, 1037-1039

【非特許文献 10】A Guide to Fluorescent Probes and Labeling Technologies, 10th ed., (Ed.:R.P.Haugland), Molecular Probes, Eugene, OR, 2005

【非特許文献 11】S.K.Lee, W.J.Yang, J.J.Choi, C.H.Kim, S.-J.Jeon, B.R.Cho, Org.Lett.2005, 7323-326

【非特許文献 12】H.R.Parri, T.M.Gould, V.Crunelli, Nat.Neurosci.2001, 4803-812

【非特許文献 13】C.M.Matias, N.C.Matos, M.Arif, J.C.Dionisio, M.E.Quinta-Ferreira, Biol.Res.2006, 39521-530

【非特許文献 14】M.E.Quinta-Ferreira, C.M.Matias, Brain Res.2004, 1004, 52-60

【非特許文献 15】J.Y.Koh, S.W.Suh, B.J.Gwag, Y.Y.He, C.Y.Hsu, D.W.Choi, Science 1996, 272, 1013-1016

【非特許文献 16】H.R.Parri, T.M.Gould, V.Crunelli, Nat.Neurosci.2001, 4803-812

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【 0 0 0 7 】

本発明の第 1 の目的は、低プローブ濃度でも鮮明な T P M イメージを得るための高い T P 断面と、 Ca^{2+} イオンに対する高い選択性と、環境の極性により生じる発光スペクトルに差があるため細胞質内プローブと膜結合プローブとの識別が可能であることと、高い光安定性を備えることで、細胞内カルシウムイオンのリアルタイムモニタリングに適した二光子プローブ (T P プローブ) を提供することである。

【 0 0 0 8 】

本発明の第 2 の目的は、前記二光子プローブの製造方法を提供することである。

【 0 0 0 9 】

また、本発明の第 3 の目的は、前記二光子プローブを利用した細胞内カルシウムのリアルタイムモニタリング方法を提供することである。

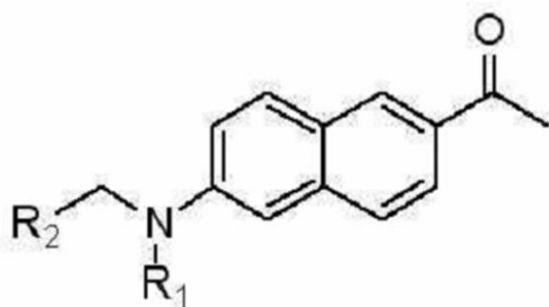
【課題を解決するための手段】

【 0 0 1 0 】

本発明は、前記第 1 の目的を達成するため、下記式 (1) で表わされることを特徴とする、細胞内カルシウムのリアルタイムモニタリング用二光子プローブを提供する。

【 0 0 1 1 】

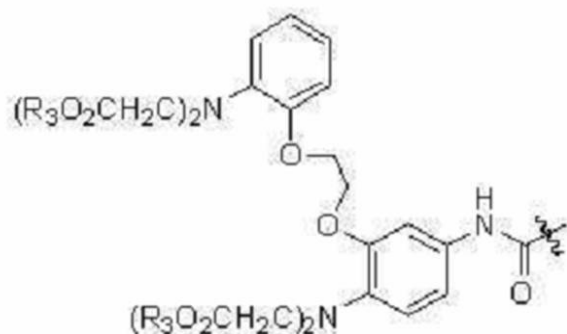
10



(1)

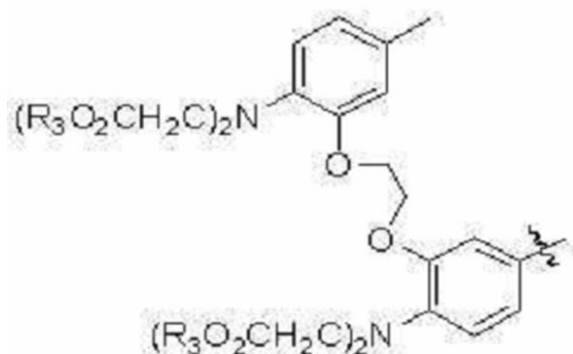
20

(式中、 R_1 は、 CH_3 またはHであり、 R_2 は、



30

または



40

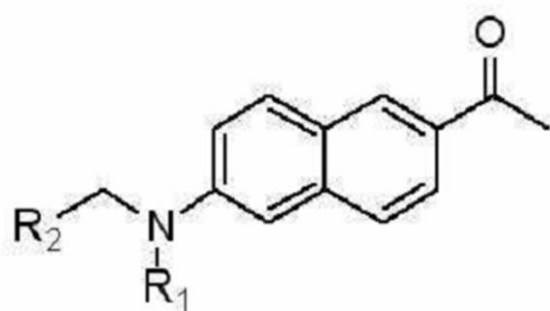
であり、 R_3 は、Hまたは $CH_2OC(=O)CH_3$ である。)

【 0 0 1 2 】

本発明は、前記第 2 の目的を達成するため、下記式 (1) で表わされる細胞内カルシウムのリアルタイムモニタリング用二光子プローブの製造方法であって、下記式 (2) の化合物と下記 (3) の化合物とが反応する段階を含むことを特徴とする二光子プローブの製造方法を提供する。

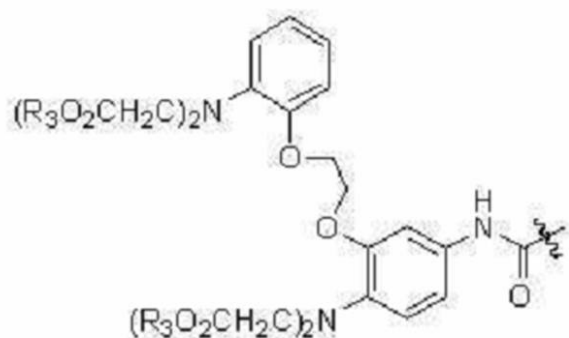
50

【 0 0 1 3 】



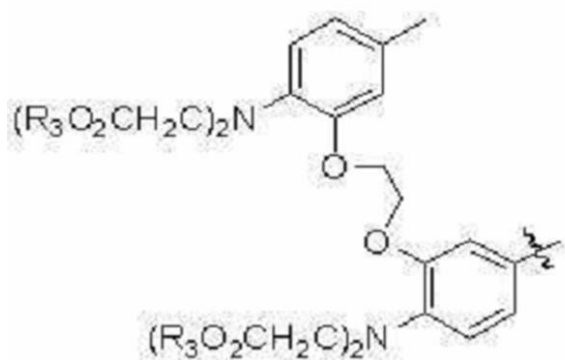
(1)

(式中、 R_1 は、 CH_3 または H であり、 R_2 は、



【 0 0 1 4 】

または



であり、 R_3 は、 H または $\text{CH}_2\text{OCOCH}_3$ である。)

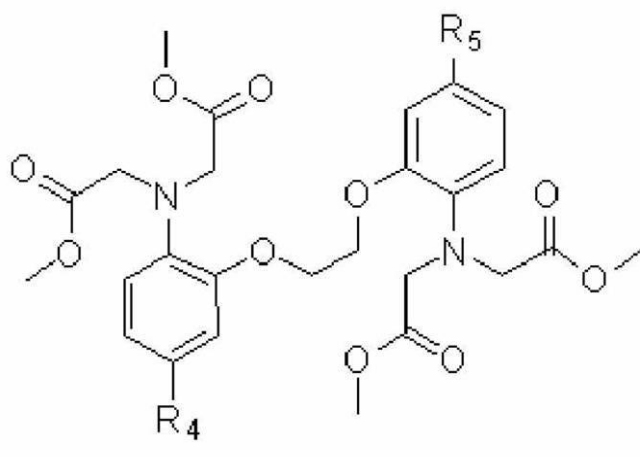
【 0 0 1 5 】

10

20

30

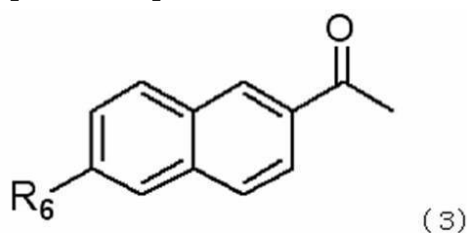
40



10

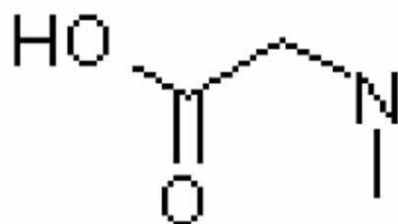
(式中、 R_4 は、 NH_2 または CHO であり、 R_5 は、 H または CH_3 である。)

【 0 0 1 6 】



20

(式中、 R_6 は、 NH_2 または



30

である。)

【 0 0 1 7 】

本発明は、前記第3の目的を達成するため、前記二光子プローブを観察対象とする細胞内に注入した後、放出される二光子励起蛍光イメージを得る段階を含む細胞内カルシウムのリアルタイムモニタリング方法を提供する。

【 0 0 2 0 】

本発明の二光子プローブは、低プローブ濃度でも鮮明なTPMイメージを得ることができるよう高いTP断面を有し、 Ca^{2+} イオンに対して高い選択性を示し、例えば、親水性環境、疎水性環境などの環境の極性度によって発光スペクトルが変わるため、細胞質内プローブと膜結合プローブとの識別が可能であり、そして、高い光安定性を有していることから、細胞内カルシウムイオンのリアルタイムモニタリングに適するという特性を有する。

40

【 0 0 2 1 】

本発明による二光子プローブは、TP発色団として、2-アセチル-6-(ジメチルアミノ)ナフタレンを使い、 Ca^{2+} イオンキレートとして、O,O'-ビス(2-アミノフェニル)エチレングリコール-N,N,N',N'-テトラ酢酸(BAPTA)を使う。

50

【 0 0 2 2 】

本発明による二光子プローブは、高いTP断面を有し、溶媒極性によって大きいスペクトル移動性を示すので、膜結合プローブの蛍光とは区別して、本発明による二光子プローブ - Ca^{2+} 複合体に対する二光子励起蛍光 (TPEF) を探知することができる。これとともに、本発明による二光子プローブは、生体細胞及び生体組織内でカルシウム波を $100\text{ }\mu\text{m}$ 以上の深度で、長時間にわたり、標的ミス及び光退色なしに探知することができる。

【 0 0 2 4 】

本発明によるリアルタイムモニタリング方法では、後述するように、 $500\sim620\text{ nm}$ の範囲の波長を使って二光子励起蛍光イメージを得ることができ、細胞膜に結合された二光子プローブによる発光寄与度を最小化しながら、細胞内に遊離状態で存在する Ca^{2+} イオンのみを選択的に測定することもできる。

10

【 0 0 2 5 】

また、従来技術とは異なり、本発明による細胞内カルシウムのリアルタイムモニタリング方法は、細胞内カルシウムの定性的分析だけではなく、定量的な測定もすることができる。

【発明の効果】

【 0 0 2 6 】

本発明による二光子プローブは、細胞内カルシウムイオンのリアルタイムイメージングに非常に適しており、 Ca^{2+} に対して44倍のTPEF強化効果を表わし、 $0.25\pm0.03\text{ }\mu\text{M}$ の解離定数値 (K_d^{TP}) を有し、 Ca^{2+} と複合体を形成する場合、オレゴングリーン 488 BAPTA-1 より5倍強いTPEFを発光する。また、既存のプローブとは異なり、生体細胞及び生体組織内の細胞内遊離 Ca^{2+} に対する動的水準を、他の金属イオン及び細胞膜結合プローブからの干渉なしに、選択的に探知することができる。さらに、本発明による二光子プローブは、光退色による影響なしにTPMを使って 1100 s 以上、 $100\sim300\text{ }\mu\text{m}$ の深度のカルシウム波を観察することができる。

20

【発明を実施するための最良の形態】

【 0 0 2 7 】

以下、本発明を、実施例を通じてより詳細に説明するが、下記実施例は、本発明の範囲を制限するためのものではなく、本発明の理解を助けるためのものである。

30

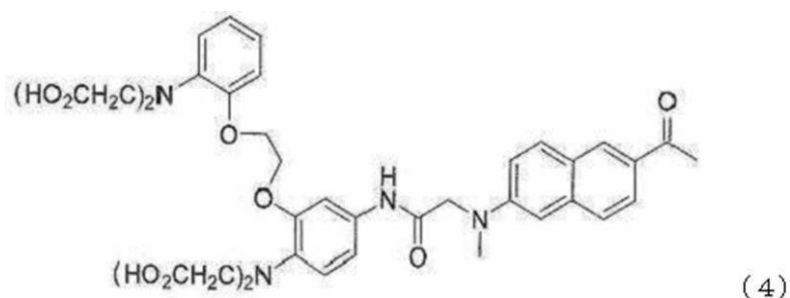
【 0 0 2 8 】

[実施例]

[製造例 1] 本発明による二光子プローブの製造

本実施例では、下記の手順によって、下記式 (4) の化合物を合成した。

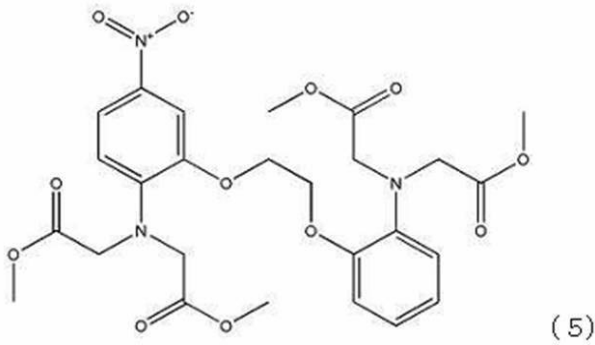
【 0 0 2 9 】



40

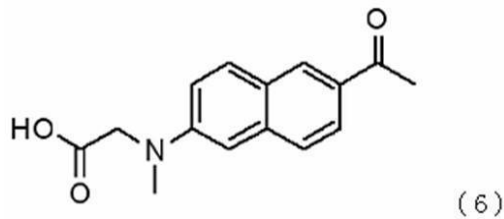
【 0 0 3 0 】

[製造例 1 . 1] 5 - ニトロ - BAPTA - テトラメチルエステル (式 (5)) 及び 6 - アセチル - 2 - [N - メチル - N - (カルボキシメチル) アミノ] ナフタレン (式 (6)) の製造



10

【 0 0 3 1 】



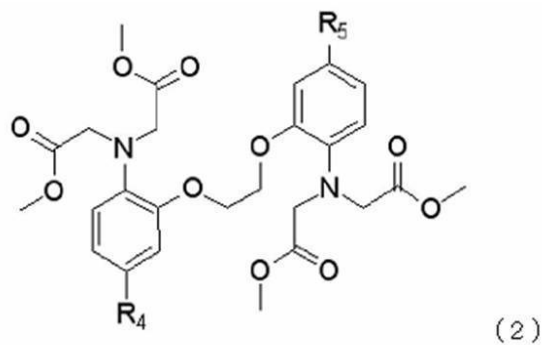
【 0 0 3 2 】

前記化合物は、それぞれ公知の文献に記載の方法に従って製造した（非特許文献 1、非特許文献 2 参照）。

20

【 0 0 3 3 】

〔製造例 1 . 2 〕 5 - アミノ - B A P T A - テトラメチルエステル（式（2））の製造



30

（式中、 R_4 は、 NH_2 であり、 R_5 は、 H である。）

【 0 0 3 4 】

前記製造例 1 . 1 で製造した式（5）の化合物（2 . 2 g、3 . 8 mmol）及びカーボン上の 5 % Pd（90 mg）をエタノールに入れて、水素雰囲気下で 5 時間攪拌した。この反応混合物を濾過して、熱エタノールで洗浄した後、減圧して溶媒を除去した。得られた産物をカラムエチルアセテート / ヘキサン（2 : 1）を溶離液として使うカラムクロマトグラフィーによって精製した。

40

【 0 0 3 5 】

収率：1 . 1 g（53 %）；mp 121 I R（KBr）：3438、3346、1753 cm^{-1} ； 1H NMR（300 MHz、 $CDCl_3$ ）： δ 6 . 87（m、4 H）、6 . 77（d、1 H、 $J = 9$ Hz）、6 . 28（d、1 H、 $J = 3 . 0$ Hz）、6 . 22（dd、1 H、 $J = 9$ 、 $J = 3$ Hz）、4 . 26（m、4 H）、4 . 15（s、4 H）、4 . 06（s、4 H）、3 . 59（s、6 H）、3 . 56（s、6 H）、3 . 51（br s、2 H）； ^{13}C NMR（100 MHz、 $CDCl_3$ ）： δ = 172 . 4、172 . 3、152 . 2、150 . 6、142 . 7、139 . 4、131 . 5、122 . 5、

50

121.6、119.2、113.3、113.2、107.8、101.8、67.3、67.2、53.9、53.5、51.9、51.7 ppm; Anal. Calcd for $C_{26}H_{33}N_3O_{10}$: C, 57.03; H, 6.07; N, 7.67. Found: C, 57.11; H, 6.05; N, 7.60.

【0036】

[製造例1.3] 式(4)の化合物の製造

DMF (5 mL) 中の前記製造例1.1で製造した式(6)の化合物 (0.38 g、1.48 mmol) 及び1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)-カルボジイミド・HCl (0.34 g、1.80 mmol) の混合物を、20分間攪拌した。前記混合物に、製造例1.2で製造した式(2)の化合物 (0.90 g、1.64 mmol) 及び4-ジメチルアミノピリジン (26 mg、0.22 mmol) を添加し、 N_2 雰囲気下で12時間攪拌した。得られた産物をクロロホルムで抽出し、 $MgSO_4$ 上で乾燥させた後、減圧して溶媒を除去した。引き続き、産物をヘキサン/エチルアセテート (2:3) を溶離液として使うカラムクロマトグラフィーによって精製し、エタノールによる再結晶でさらに精製した。

【0037】

収率: 0.62 g (53%); mp 148 IR (KBr): 3260、1755、1662 cm^{-1} ; 1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ 8.35 (d, 1H, $J = 2$ Hz)、8.18 (s, 1H)、7.98 (dd, 1H, $J = 9$, $J = 2$ Hz)、7.87 (d, 1H, $J = 9$ Hz)、7.70 (d, 1H, $J = 9$ Hz)、7.27 (d, 1H, $J = 2$ Hz)、7.16 (dd, 1H, $J = 9$, $J = 2$ Hz)、7.06 (d, 1H, $J = 2.0$ Hz)、6.88 (m, 6H)、4.25 (s, 4H)、4.12 (s, 4H)、4.10 (s, 6H)、3.56 (s, 6H)、3.53 (s, 6H)、3.24 (s, 3H)、2.68 (s, 3H); ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ = 198.0、172.2、172.0、168.0、150.8、150.5、149.3、139.4、137.3、136.4、132.3、132.2、131.6、130.4、127.0、126.6、125.2、122.5、121.7、119.4、119.2、116.7、113.3、112.9、107.7、106.1、77.4、67.5、67.1、59.5、53.6、51.9、51.8、40.4、26.8 ppm; Anal. Calcd for $C_{41}H_{46}N_4O_{12}$: C, 62.59; H, 5.89; N, 7.12. Found: C, 62.52; H, 5.93; N, 7.07.

【0038】

製造されたエステル (0.50 g、0.64 mmol) を前述した方法によって加水分解した。生じた沈殿物を収集し、蒸留水で洗浄し、 $MeOH/CHCl_3$ - ペトリウムエーテルにより結晶化することで精製した。

【0039】

収率: 0.27 g (58%); mp 145 IR (KBr): 3250、2910、1745、1660 cm^{-1} ; 1H NMR (400 MHz, CD_3OD): δ 8.39 (d, 1H, $J = 2$ Hz)、7.86 (d, 1H, $J = 9$ Hz)、7.85 (dd, 1H, $J = 9$, $J = 2$ Hz)、7.65 (d, 1H, $J = 9$ Hz)、7.46 (d, 1H, $J = 2$ Hz)、7.24 (dd, 1H, $J = 9$, $J = 2$ Hz)、6.96 (m, 7H)、4.31 (s, 4H)、4.30 (s, 2H)、3.91 (s, 8H)、3.24 (s, 3H)、2.63 (s, 3H); ^{13}C NMR (100 MHz, CD_3OD): δ = 199.2、173.9、173.8、170.0、150.6、150.5、149.9、149.8、138.7、138.0、137.9、135.3、134.2、130.8、130.7、126.3、126.2、125.8、124.1、123.6、121.3、118.7、118.4、116.2、113.0、112.5、105.8、66.8、66.5、56.3、54.5、39.2、25.3 ppm; Anal. Calcd for $C_{37}H_{38}N_4O_{12}$: C, 60.82; H, 5.24; N, 7.6

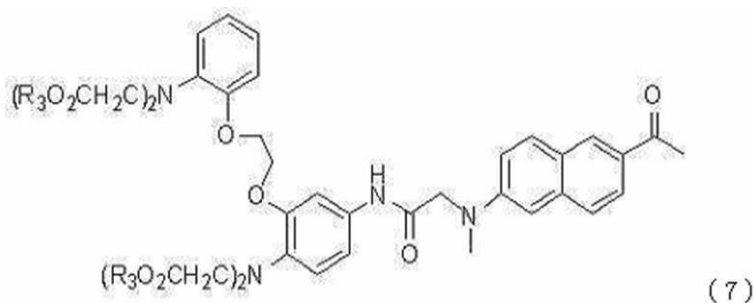
7. Found: C, 60.72; H, 5.34; N, 7.59.

【0040】

〔製造例2〕 本発明による二光子プローブの製造

本実施例では、下記製造例によって、本発明による二光子プローブである下記式(7)の化合物を合成した。

【0041】



(式中、 R_3 は、 $\text{CH}_2\text{OCOCCH}_3$ である。)

【0042】

CHCl_3 (5 mL) 中の前記製造例1で製造された式(4)の化合物 (0.11 g、0.15 mmol)、ブロモメチルアセテート (0.24 g、1.55 mmol)、及び Et_3N (0.14 g、1.05 mmol) の混合物を、 N_2 雰囲気下で24時間撹拌した。その後、減圧して溶媒を除去し、粗生成物をエチルアセテート/ヘキサン (3:1) を溶離液として使うカラムクロマトグラフィーによって精製した。メタノールによる再結晶によって産物をさらに精製して薄い黄色の固体を得た。

【0043】

収率: 85 mg (56%); mp 137 °C IR (KBr): 1759, 1710, 1665 cm^{-1} ; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 8.36 (d, 1H, $J = 2$ Hz), 8.22 (s, 1H), 7.98 (dd, 1H, $J = 9$, $J = 2$ Hz), 7.88 (d, 1H, $J = 9$ Hz), 7.71 (d, 1H, $J = 9$ Hz), 7.31 (d, 1H, $J = 2$ Hz), 7.17 (dd, 1H, $J = 9$, $J = 2$ Hz), 7.07 (d, 1H, $J = 2$ Hz), 6.88 (m, 6H), 5.62 (s, 4H), 5.60 (s, 4H), 4.29 (s, 4H), 4.18 (s, 4H), 4.15 (s, 4H), 4.12 (s, 2H), 3.25 (s, 3H), 2.69 (s, 3H), 2.05 (s, 6H), 2.04 (s, 6H); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3): δ = 198.0, 170.4, 170.2, 169.7, 168.1, 151.0, 150.6, 149.3, 138.8, 137.3, 135.7, 132.9, 132.3, 131.5, 130.3, 127.0, 126.6, 125.2, 123.2, 121.9, 120.4, 120.0, 116.7, 113.8, 113.1, 107.7, 106.5, 79.5, 79.4, 77.5, 77.4, 77.1, 67.5, 67.2, 59.5, 53.5, 40.4, 26.7, 20.9 ppm; Anal. Calcd for $\text{C}_{49}\text{H}_{54}\text{N}_4\text{O}_{20}$: C, 57.76; H, 5.34; N, 5.50. Found: C, 57.70; H, 5.31; N, 5.52.

【0044】

〔実施例1〕 吸収スペクトル及び発光スペクトル測定

前記式(7)の化合物に対する吸収スペクトルは、Hewlett-Packard 8453 ダイオードアレイスペクトロメータで記録し、該化合物の蛍光スペクトルは、1 cm 標準石英セルを備えた Amico-Bowman シリーズ2 蛍光スペクトロメータを使って得た。公知文献に記載の方法で、Coumarin 307 を使って蛍光量子収率を測定した (非特許文献3 参照)。図1には、それぞれ1, 4-ジオキサン、DMF、エタノール及び H_2O 中の前記化合物の吸収スペクトル(a) 及び発光スペクトル(b)

を示す。下記表 1 には、多様な溶媒中での式 (7) の化合物に対する最大吸収値及び最大発光値を示す。

【 0 0 4 5 】

【表 1】

化合物	溶媒 ($E_T^{N(1)}$)	$\lambda_{max}^{(1)}$ nm	λ_{max}^{fl} nm
化学式 7	1, 4-ジオキサン (0. 164)	344	413
	DMF (0. 386)	356	441
	エタノール (0. 654)	359	473
	H ₂ O (1. 000)	363	495

【 0 0 4 6 】

1) カッコ内の数値は、溶媒極性に対する正規化された実験的パラメータである (非特許文献 4 参照) 。

【 0 0 4 7 】

前記式 (7) の化合物に対する吸収スペクトル及び発光スペクトルから分かるように、1, 4-ジオキサン < DMF < エタノール < H₂O の順に溶媒極性に応じて、徐々に赤色移動を示す。このような効果は、吸収スペクトルの場合 (17 nm) より、発光スペクトルの場合 (82 nm) でより顕著であり、従って、式 (7) の化合物を極性プローブとして使うのに適するということが分かる。これに加えて、DMF 中の式 (7) の化合物の λ_{max}^{fl} は、膜結合プローブの数値と類似し、(図 4 (b))、このような事実から式 (7) の化合物が、膜結合プローブに対するモデルとして使われうるということが示唆される。

【 0 0 4 8 】

図 2 は、多様な濃度の遊離カルシウムイオン (0 ~ 39 μ M) 存在下での式 (4) の化合物 1 μ M (30 mM MOPS、100 mM KCl、10 mM EGTA、pH 7.2) に対する一光子発光スペクトル (a) 及び吸収スペクトル (b) である。また、図 3 は、多様な濃度の遊離カルシウムイオン (0 ~ 39 μ M) 存在下での式 (4) の化合物 (●) 及び OG 1 (○) に対する二光子励起スペクトルであり、図 4 は、多様な濃度の遊離カルシウムイオン (0 ~ 39 μ M) 存在下での式 (4) の化合物 1 μ M (30 mM MOPS、100 mM KCl、10 mM EGTA、pH 7.2) に対する二光子発光スペクトルである。

【 0 0 4 9 】

MOPS 緩衝溶液 (30 mM、pH 7.2) 中の式 (4) の化合物にカルシウムイオンを添加する場合には、吸収スペクトルに影響を与えずに、蛍光強度が金属イオン濃度に比例して急激に増加し (図 2)、これは金属イオンとの複合体形成による光誘導電子輸送 (photo-induced electron transfer、PET) の遮断のためであると推測される。

【 0 0 5 0 】

これによく似た結果が、二光子過程でも観察された (図 3 及び図 4)。式 (4) の化合物に対する蛍光強化因子 [(F - F_{min}) / F_{min}] は、39 μ M Ca²⁺ の存在下で 40 であり、これは OG 1 に対して既に報告されている数値である 14 より、3 倍近く大きい数値である (非特許文献 5 参照)。さらに、図 5 から分かるように、傾き 1.0 を有する Ca²⁺ 結合に対して測定された線形 Hill プロットは、プローブと陽イオンとの間で 1 : 1 複合体を形成することを示す (非特許文献 6 参照)。

【 0 0 5 1 】

〔実施例 2〕 解離定数 (K_d) の決定

多様な濃度の $[Ca^{2+}]$ を含有する一連の校正溶液を、2 種類の溶液 ($10\text{ mM } K_2EGTA$ を含む溶液 A 及び $10\text{ mM } CaEGTA$ を含む溶液 B) を多様な比率で混合することで製造した。溶液 A 及び溶液 B は、すべて、 $1\text{ }\mu\text{M}$ の式 (4) の化合物、 $100\text{ mM } KCl$ 、 $30\text{ mM } MOPS$ を含み、 $pH 7.2$ に調整されている。

【 0 0 5 2 】

式 (4) の化合物 - Ca^{2+} に対する K_d を決定するために、蛍光スペクトルを 20 で 2.0 mL の溶液 A ($0\text{ }\mu\text{M}$ 遊離 Ca^{2+}) で記録した。引き続き、前記溶液 $203\text{ }\mu\text{L}$ を廃棄し、これを $203\text{ }\mu\text{L}$ の溶液 B で置換した後 ($39\text{ }\mu\text{M}$ 遊離 Ca^{2+})、スペクトルを記録した。このような作業によって、プローブまたは総 $EGTA$ の濃度変化なしに、 $CaEGTA$ 濃度を 1.00 mM で、 $[Ca^{2+}]_{\text{遊離}}$ の濃度を約 $0.017\text{ }\mu\text{M}$ で調節することができた。前記 $[Ca^{2+}]_{\text{遊離}}$ は、下記数式 2 を使って Ca^{2+} (150.5 nM) に対する $EGTA$ の K_d から計算された。

$$[Ca^{2+}]_{\text{遊離}} = K_d^{EGTA} \times \frac{[CaEGTA]}{[K_2EGTA]} \dots (\text{数式 2})$$

【 0 0 5 3 】

また、 $223\text{ }\mu\text{L}$ 、 $251\text{ }\mu\text{L}$ 、 $285\text{ }\mu\text{L}$ 、 $327\text{ }\mu\text{L}$ 、 $421\text{ }\mu\text{L}$ 、 $479\text{ }\mu\text{L}$ 、 $667\text{ }\mu\text{L}$ 、 $420\text{ }\mu\text{L}$ 、 $350\text{ }\mu\text{L}$ 、 $412\text{ }\mu\text{L}$ 、 $905\text{ }\mu\text{L}$ 、 $1028\text{ }\mu\text{L}$ 、 $926\text{ }\mu\text{L}$ 、 $992\text{ }\mu\text{L}$ の溶液 A を連続的に廃棄し、それぞれを同一の量の溶液 B に置換することによって、 $0.038\text{ }\mu\text{M}$ 、 $0.065\text{ }\mu\text{M}$ 、 $0.101\text{ }\mu\text{M}$ 、 $0.150\text{ }\mu\text{M}$ 、 $0.230\text{ }\mu\text{M}$ 、 $0.350\text{ }\mu\text{M}$ 、 $0.601\text{ }\mu\text{M}$ 、 $0.800\text{ }\mu\text{M}$ 、 $1.00\text{ }\mu\text{M}$ 、 $1.30\text{ }\mu\text{M}$ 、 $2.50\text{ }\mu\text{M}$ 、 $5.30\text{ }\mu\text{M}$ 、 $10.0\text{ }\mu\text{M}$ 、 $20.0\text{ }\mu\text{M}$ の遊離 Ca^{2+} 溶液を得た。

【 0 0 5 4 】

もし、式 (4) の化合物と Ca^{2+} イオンとの間に $1:1$ 金属 - リガンド複合体が形成される場合、その平衡状態は下記数式 3 のように表現することができる。

【 0 0 5 5 】

$$[LM]^2 - ([L]_0 + [M]_0 + K_d)[LM] + [L]_0[M]_0 = 0 \dots (\text{数式 3})$$

【 0 0 5 6 】

(数式中、 L 及び M は、それぞれ式 (4) の化合物と Ca^{2+} イオンとを表わす。)

総プローブ及び金属イオン濃度は、それぞれ $[L]_0 = [L] + [LM]$ 及び $[M]_0 = [M] + [LM]$ と定義され、 $[L]_0$ 及び $[M]_0$ の値が与えられる場合に、 K_d は下記数式 4 または数式 5 で表わされる。

【 0 0 5 7 】

$$[LM] = \frac{([L]_0 + [M]_0 + K_d) - \sqrt{([L]_0 + [M]_0 + K_d)^2 - 4[L]_0[M]_0}}{2} \dots (\text{数式 4})$$

【 0 0 5 8 】

$$(F - F_{\min}) = \left(\frac{([L]_0 + [M]_0 + K_d) - \sqrt{([L]_0 + [M]_0 + K_d)^2 - 4[L]_0[M]_0}}{2[L]_0} \right) (F_{\max} - F_{\min}) \quad \dots \text{(数式5)}$$

【0059】

(数式中、 F は、測定された蛍光強度であり、 $F_{\min}$ は、最小蛍光強度であり、 $F_{\max}$ は、最大蛍光強度である。数式5による適正曲線(図6)に最もよく適合する K_d 数値を、商用エクセルプログラムを使って計算した(非特許文献7, 非特許文献8参照)。

また、二光子過程に対する K_d^{TP} を決定するため、780nmの波長及び1230mWの出力に設定し(焦点平面から略10mWの平均出力に相当)、設定が固定されたチタン・サファイアレーザー光源(Coherent Chameleon、90MHz、200fs)によって励起されるDMIRE2 Microscope(Leica)を使ってTPEFスペクトルを得た。これによりTPEF滴定曲線(図6)を得て、これを数式3に適合(fitting)させた。

10

【0060】

解離定数(K_d^{OP})は、公知の文献に記載された方法で、図6の蛍光滴定曲線から計算した(非特許文献9参照)。

【0061】

多様な濃度の遊離マグネシウムイオン(0~30mM)存在下での式(4)の化合物(30mM MOPS、100mM KCl、10mM EGTA、pH7.2)に対する一光子発光スペクトル、線形Hillプロット及び一光子蛍光滴定曲線を得た。これらをそれぞれ図7~図9に示す。

20

【0062】

式(4)の化合物の Ca^{2+} 及び Mg^{2+} に対する一光子解離定数(K_d^{OP})は、それぞれ $0.27 \pm 0.01 \mu M$ 及び $6.8 \pm 0.7 mM$ であり、類似した数値が二光子過程でも測定された[$K_d^{TP}(Ca^{2+}) = 0.25 \pm 0.03 \mu M$]。式(4)の化合物は、 Zn^{2+} 及び Mn^{2+} に対しては中間程度の反応を示し、 Mg^{2+} 、 Fe^{2+} 及び Co^{2+} に対してはさらに弱い反応を表わし、 Cu^{2+} に対しては全く反応を示さなかった(図10)。

【0063】

細胞内遊離 Mn^{2+} の濃度は無視できるほどであり、キレート化が可能な Zn^{2+} は海馬CA3領域のような特殊な領域を除いてはほとんど存在しないために、本発明によるプローブは、他の金属イオンからの干渉を最小化しながら、細胞内 Ca^{2+} 濃度($[Ca^{2+}]_i$)を選択的に探知することができる。さらに、式(4)の化合物は、生物学的に関連性あるpH範囲内では、pHに敏感ではない(図11)。

30

【0064】

[実施例3] 二光子励起スペクトルの観察

緩衝溶液のうち Ca^{2+} イオンの式(4)との複合体及びOG1との複合体に対する二光子励起スペクトルは、式(4)の化合物- Ca^{2+} の $\Phi\delta$ に対して780nmで110GMを示し、これはOG1- Ca^{2+} の場合よりさらに5倍大きい値である。従って、式(4)の化合物で染色された試料に対するTPMイメージは、通常的なプローブで染色されたものなどより遥かに明るい。これに加えて、二光子適正曲線から計算された二光子蛍光強化因子(TPEF)は44であり、これはTPMで Ca^{2+} を探知することができるということを意味する(表2)。

40

【0065】

【表 2】

化合物 [a]	$\lambda_{\text{max}}^{(1)}$ [b]	$\lambda_{\text{max}}^{\text{a}}$ [b]	Φ [c]	$K_{\text{d}}^{\text{OP}}/K_{\text{d}}^{\text{TP}}$ [d]	$FEF^{\text{OP}}/FEF^{\text{TP}}$ [e]	$\lambda_{\text{max}}^{(1)}$ [f]	δ [g]	$\Phi\delta$ [h]
化学式 7	362	495	0.060 ^[i]			nd ^[j]	nd ^[j]	nd ^[j]
化学式 4	365	498	0.012			nd ^[j]	nd ^[j]	nd ^[j]
化学式 4+Ca ²⁺	365	498	0.49	0.27 ^[k] /0.25	40/44	780	230	110
OG1+Ca ²⁺	494	523	0.66	0.17 ^[l] /nd	14 ^[l] /nd	800	37	24

【0066】

[a] すべてのデータは、遊離 Ca²⁺ (39 μ M) の存在下または不存在下で共に、30 mM MOPS、100 mM KCl、10 mM EGTA、pH 7.2 の条件で測定された。

[b] 一光子吸収及び発光スペクトルの λ_{max} は、nm 単位である。

[c] 蛍光量子収率、 $\pm 10\%$

[d] 一光子 (K_{d}^{OP}) 及び二光子 (K_{d}^{TP}) 過程によって μ M 単位で測定された Ca²⁺ に対する解離定数、 $\pm 12\%$

[e] 一光子 (FEF^{OP}) 過程及び二光子 (FEF^{TP}) 過程によって測定された蛍光強化因子 ($F - F_{\text{min}}$) / F_{min}

[f] nm 単位の二光子励起スペクトルに対する λ_{max}

[g] $10^{-5} \text{ cm}^4 \text{ s} / \text{光子 (GM)}$ 単位のピーク TP 断面、 $\pm 15\%$

[h] 二光子励起断面

[i] DMF 中から $\Phi = 0.27 \pm 0.02$ (式 (4)) 及び 0.22 ± 0.02 (式 (7))

[j] 二光子励起蛍光強度は、断面を正確に測定するには余りにも弱かった。

[k] Mg²⁺ に対する式 (4) の化合物の K_{d}^{OP} 数値は、 $6.8 \pm 0.7 \text{ mM}$ であった。

[l] 公知文献を参照して行った (非特許文献 10 参照)。

TP 断面 (δ) の測定は、フェムト秒 (fs) 蛍光測定技法 (非特許文献 11 参照) を使って行った。

【0067】

[実施例 4] 本発明による二光子プローブを使った細胞観察

生後 1 日齢のラット (Sprague-Dawley, SD) の大脳皮質から得られた星状細胞を 3 U/ml のパパイン (Worthington Biochemical Corporation 社製、NJ、米国) を含有する Hank's balanced 塩溶液 (HBSS; Gibco BRL, Gaithersburg, MD、米国) を入れた 75 mm フラスコにプレーティングした。精製した星状細胞を培養するために、フラスコを撹拌機上で 37 に 6 時間撹拌した後、培地内の浮遊細胞を除去した。星状細胞を 5 分間 0.25% トリプシンで処理し、50 ~ 100 細胞/mm² となるようにポリ-D-リシンコーティングされたガラスカバースリップ上に再びプレーティングした後、ペニシリン/ストレプトマイシン及び 10% 牛胎児血清が添加された Dulbecco's modified Eagle's 培地 (DMEM; Gibco 社製) を使って、37 の CO₂ 培養器内で保持した。7 ~ 15 日間にインビトロで保持した後、星状細胞は無血清培地で 3 回洗浄し、無血清培地中の 2 μ M 濃度の式 (7) の化合物とともに 37 で 20 分間培養した。細胞をリン酸緩衝溶液 (PBS; Gibco 社製) で 3 回洗浄した後、15 分間無色の無血清培地中でさらに培養した後に観察した。

【0068】

2 μ M の式 (7) の化合物で標識されて培養された星状細胞に対する擬似彩色 (pseudo colored) TPF イメージは、強い点及び均一な領域を示した (図 12)。前記イメージは、細胞内 Ca²⁺ と式 (4) の化合物との複合体及び膜結合プローブから発光された TPF であると推定されるが、これは MOPS 緩衝溶液中の式 (4) の化合物 - Ca²⁺

10

20

30

40

50

に対する蛍光量子収率及びDMF中の式(7)の化合物(0.27)に対する蛍光量子収率が、MOPS緩衝溶液中の式(4)の化合物(0.012)及び式(7)の化合物(0.060)の蛍光量子収率より遥かに大きいためである(表2)。従って、DMF中の式(7)の化合物は、 λ_{max}^{f1} におけるその類似性のために膜結合プローブに対する立派なモデルになるものと推測される。

【0069】

図12で、強い点及び均一な領域に対するTPEFスペクトルは、445nm(図12(b)の1の曲線)及び494nm(図12(b)の2の曲線)で最大発光度を示す。さらに、前記1の曲線の発光バンドは非対称的であり、445及び488nmで最大発光度を有する2個のガウス関数に適合させることができた(図12(b)の3及び4の曲線)。一方、前記2の曲線の発光バンドは、500nmで最大発光度を有する単一ガウス関数に適合させることができた(図12(b)の5の曲線)。MOPS緩衝溶液中で測定された発光スペクトル(図2(a))と比べて、分離されたスペクトルの短波長バンドは顕著に青色移動を示したが、長波長バンドは類似して保持された。このようなスペクトル移動は、プローブが極性の異なる2つの領域に位置することができるということを意味する。

【0070】

このような環境の極性を分析するために、下記のように式(7)の化合物で標識された星状細胞に対する寿命イメージ(lifetime image)を得た。

【0071】

10%FBSを含有するDMEM中で、カバースリップ上に星状細胞を成長させた。細胞をPBS中で軽く洗浄した後、2 μ Mの式(7)の化合物を使って37℃で20分間培養した。細胞をPBSで3回洗浄し、ホルムアルデヒド(3.7% PBS)で10分間固定した後、PBSで3回洗浄し、封入溶液を使って封入した。蛍光消滅は、Leica TSC-SP2-AOBS共焦点顕微鏡で同期されたSPC830 acquisition board(Becker & Hickl社製、独国)を使って、時間相関単一光子計数法(TCSPC)によって解読した。結果を図13に示す。

【0072】

図13を参照すると、強い点は1.8nsの励起状態寿命を表わし、これは中心から0.8nsでの寿命分布曲線の最上端より2倍以上長いものである。これは、本発明によるプローブが2個の互いに区別される環境下に存在することを反映するものであって、そのうちの1つは親水性の細胞質環境で短寿命である赤色光を放出し、他の1つは疎水性の細胞膜結合環境で長寿命である青色光を放出するものである。

【0073】

細胞内 Ca^{2+} は、膜結合プローブによる誤差を最小限にして検出されることができる。分離されたガウス関数の短波長バンド(図12(b)の3の曲線)に対するスペクトルは、 ~ 500 nmで基底線まで減少し、これは膜結合プローブから発光されたTPEFが $\lambda > 500$ nmでは無視できる程度の干渉現象であるということを意味する。類似して、DMF中の式(7)の化合物を膜結合プローブに対するモデルとして考慮する場合には、 $\lambda > 500$ nmでの蛍光は総発光バンドの約5%のみを占める(図1(b))。従って、500 $\sim$ 620nmで得られたTPEFイメージは強い点がなく均一であるが(図14(b)、360 $\sim$ 460nmで得られたTPEFイメージはこのような強い点が表われた(図14(a))。従って、500 $\sim$ 620nmの検出ウインドウを使う場合には、細胞内 Ca^{2+} を選択することができる。

【0074】

本発明によるプローブの有用性を立証するために、生体細胞及び組織内での $[Ca^{2+}]_i$ 波を観察した。2 μ Mの式(7)の化合物で標識された培養星状細胞に対するTPMイメージは星状細胞過程(1)から体細胞(2)に、再び末端(3)への自発的 Ca^{2+} 信号伝達が $7.5 \pm 2.2 \mu m/s$ ($n = 5$ 星状細胞)の速度で発生することを示す(図15(a)及び図15(c))。また、 $[Ca^{2+}]_i$ の自発的な増加も星状細胞の間で発生し、これは隣接星状細胞での遅延された活性によって観察された(図15(b)及び

10

20

30

40

50

図15(d))。

【0075】

自発的に発生する波動の伝播速度は、 $1.8 \pm 1.1 \mu\text{m/s}$ ($n = 7$ 、星状細胞)であり、この結果は報告されているデータと一致した(非特許文献12参照)。従って、式(4)の化合物は、TPMを使って培養された星状細胞の細胞内及び細胞間のカルシウム波を可視化することができるということが明らかである。

【0076】

〔実施例5〕 新生児ラットの視床下部切片の観察

切片は、2日齢のラット(Sprague-Dawley、SD)の海馬及び視床下部から得た。冠状切片(coronal slices)を、人工脳脊髄流体(ACSF; 138.6mM NaCl、3.5mM KCl、21mM NaHCO₃、0.6mM NaH₂PO₄、9.9mM D-glucose、1mM CaCl₂、及び3mM MgCl₂)中の振動刃ミクロトームを使って400 μm の厚さに切り出した。切片をACSF中の10 μM の式(7)の化合物で、37 $^{\circ}\text{C}$ で95% O₂及び5% CO₂で30分間気泡を吹き込みながら培養した。引き続き、切片をACSFで3回洗浄し、ガラスボトムディッシュ(MatTek社製)に移した後、スペクトル共焦点多重光子顕微鏡で観察した。

【0077】

キレート化によって毒性を生じさせることなく、Zn²⁺を除去することができる膜透過性Zn²⁺キレータ(非特許文献13参照)であるN,N,N',N'-テトラキス(2-ピリジル)エチレンジアミン(TPEN)20 μM の存在下、CA1領域のTPMイメージを得るために、TPENの20mMストック溶液を8.5mgのTPENを1.0mLのエタノールに溶解させて製造した(非特許文献14参照)。前記製造された溶液1.0 μL を1.0mLのACSFに添加し、ACSF中にTPENが20 μM となるようにした。式(7)の化合物で標識された海馬切片に対するTPMイメージを得た後、ガラスボトムディッシュ内のACSF溶液をマイクロピペットで除去し、ACSF中に20 μM のTPENを1mL添加した後、TPMイメージを得た。

【0078】

図16は、10 μM の式(7)の化合物で染色されたモルモット視床下部微細切片に対する類似彩色されたTPMイメージであり(図16(a)は195s経過後、図16(b)は214s経過後)、図17には、図16(a)及び図16(b)の体細胞(1)、星状細胞過程(2)及び隣接細胞(3)で記録された自発的Ca²⁺輸送を示すグラフである。

【0079】

図17を参照すれば、体細胞での自発的なCa²⁺波は、約16mHzの周波数で明確に可視化することができ($n = 4$)、明らかな減少現象なしに1100s以上保持された。さらに、星状細胞過程でのスパイクは体細胞でのスパイクの若干前に現れる。これは信号が星状細胞過程から体細胞に漸進的に伝播されるという従来公知の事実を裏付けるものである(非特許文献15参照)。

【0080】

同様の結果が、fura-2で染色されたTTX処理された視床切片に対して報告されたことがあるが(非特許文献16参照)、前記報告でのイメージは、組織表面で細胞が損傷しており、そして、本発明でのTPMイメージに比べて鮮明度が落ちるものであった。また、TTX蛍光強度は、500s以後になると顕著に減少する。

【0081】

本発明で改善されたTPMイメージは、本発明のプロープが組織の深い深度まで観察できるだけでなく、高い光安定性及び低い光毒性を有するため、170 μm の深度での観察を、より長時間行うことを可能にした。

【0082】

最後に、星状細胞過程でのスパイクは、700s以後には非常に弱くなったが、これは

10

20

30

40

50

顕微鏡下の接触地点から遠くなったためであると思われる。また、図 17 の隣接細胞に対するデータから分かるように、類似したカルシウム波が隣接細胞から観察された。

【図面の簡単な説明】

【0083】

【図 1】本発明による式 (7) の化合物が、それぞれ 1, 4 - ジオキサン、DMF、エタノール及び H_2O 中に存在する場合の吸収スペクトル (a)、及び蛍光スペクトル (b) を示すグラフ。

【図 2】多様な濃度の遊離カルシウムイオン存在下での本発明による式 (4) の化合物に対する一光子蛍光スペクトル (a) 及び吸収スペクトル (b) を示すグラフ。

【図 3】多様な濃度の遊離カルシウムイオン存在下での本発明による式 (4) の化合物に対する二光子励起スペクトル (●) 及び O G 1 に対する二光子励起スペクトル (○) を示すグラフ。

【図 4】多様な濃度の遊離カルシウムイオン存在下での本発明による式 (4) の化合物に対する二光子蛍光スペクトルを示すグラフ。

【図 5】式 (4) の化合物と Ca^{2+} との複合体に対して測定された線形 Hill プロット。

【図 6】数式 5 により適合させた、式 (4) の化合物の滴定曲線を示すグラフ。

【図 7】多様な濃度の遊離マグネシウムイオン存在下での式 (4) の化合物に対する一光子蛍光スペクトル。

【図 8】多様な濃度の遊離マグネシウムイオン存在下での式 (4) の化合物に対する線形 Hill プロット。

【図 9】多様な濃度の遊離マグネシウムイオン存在下での式 (4) の化合物に対する一光子蛍光滴定曲線を示すグラフ。

【図 10】式 (4) の化合物の多様な金属イオンに対する反応性を示すグラフ。

【図 11】式 (4) の化合物の pH に対する反応性を示すグラフ。

【図 12】式 (7) の化合物で標識された培養星状細胞の疑似彩色 T P M イメージ (a)、及び星状細胞の疎水性及び親水性領域の二光子励起蛍光スペクトル (b)。

【図 13】式 (7) の化合物で標識された星状細胞の一光子蛍光強度イメージ (a) 及び疑似彩色寿命イメージ、星状細胞の寿命分布 (c)、並びに図 13 (a) において白色矢印で示す領域に対する一点分析の結果 (d)。

【図 14】360 ~ 460 nm の範囲の波長 (a) 及び 500 ~ 620 nm の範囲の波長 (b) で採取された、式 (7) の化合物で標識された星状細胞の疑似彩色 T P M イメージ。

【図 15】式 (7) の化合物で標識された星状細胞の 110 s (a) 及び 220 s (b) 経過後に撮影された疑似彩色 T P M イメージ、及び該星状細胞の異なる位置におけるカルシウム波の揭示変化を示すグラフ。

【図 16】式 (7) の化合物で染色された新生児モルモットの視床下部切片の、195 s (a) 及び 214 s (b) 経過後の疑似彩色 T P M イメージ。

【図 17】体細胞 (1)、星状細胞過程 (2) 及び隣接細胞 (3) で記録された自発的 Ca^{2+} 輸送を示すグラフ。

10

20

30

40

【図 1】

FIG.1 (a)

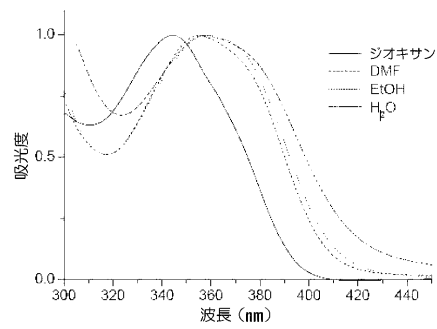
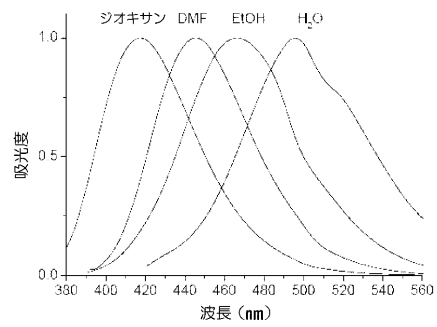


FIG.1 (b)



【図 2】

FIG.2 (a)

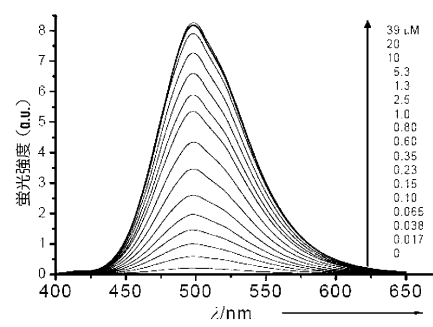
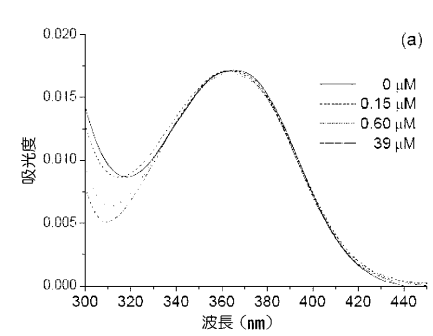
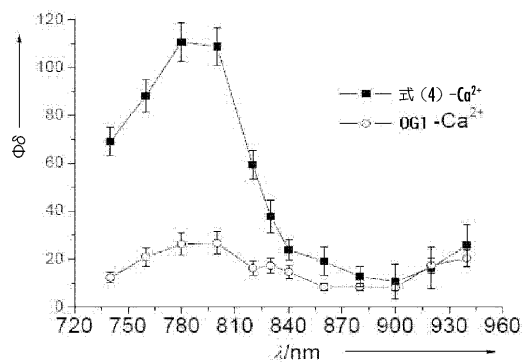


FIG.2 (b)



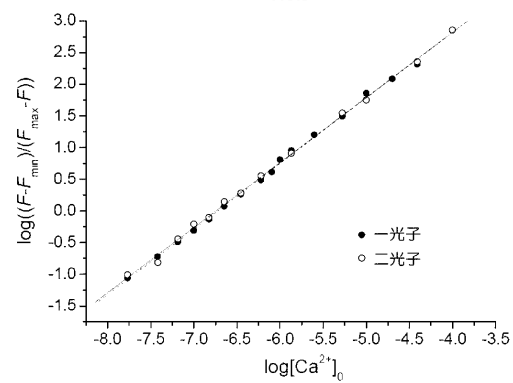
【図 3】

FIG.3



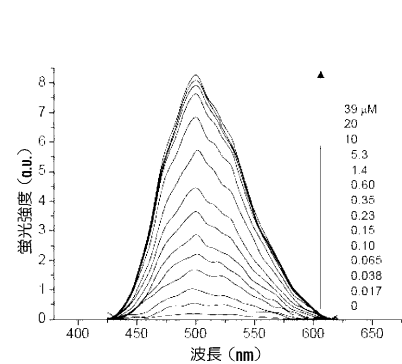
【図 5】

FIG.5



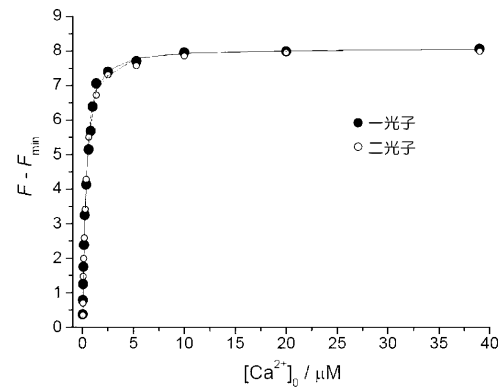
【図 4】

FIG.4



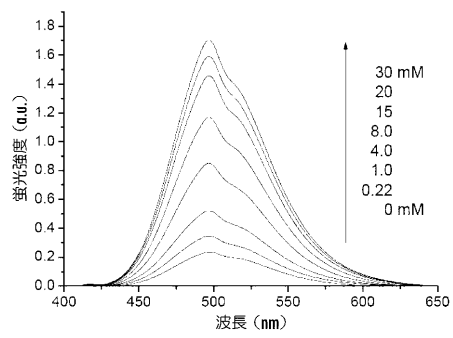
【図 6】

FIG.6



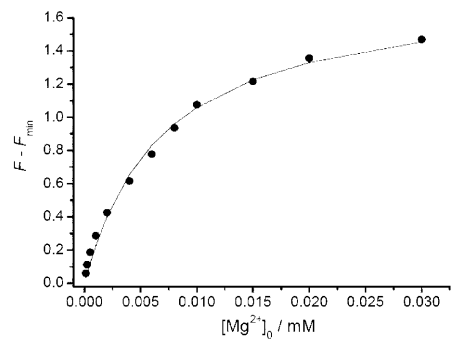
【図 7】

FIG.7



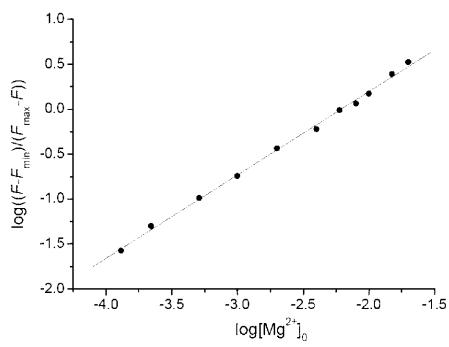
【図 9】

FIG.9



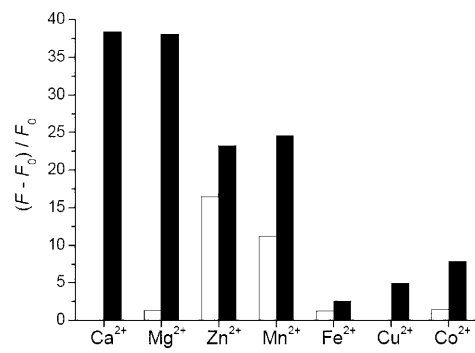
【図 8】

FIG.8



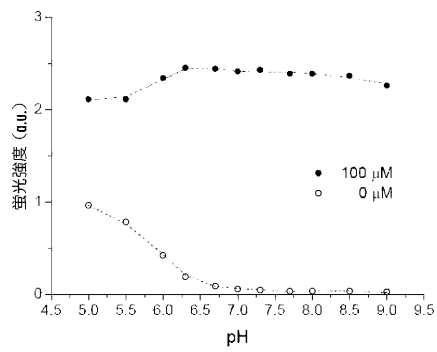
【図 10】

FIG.10



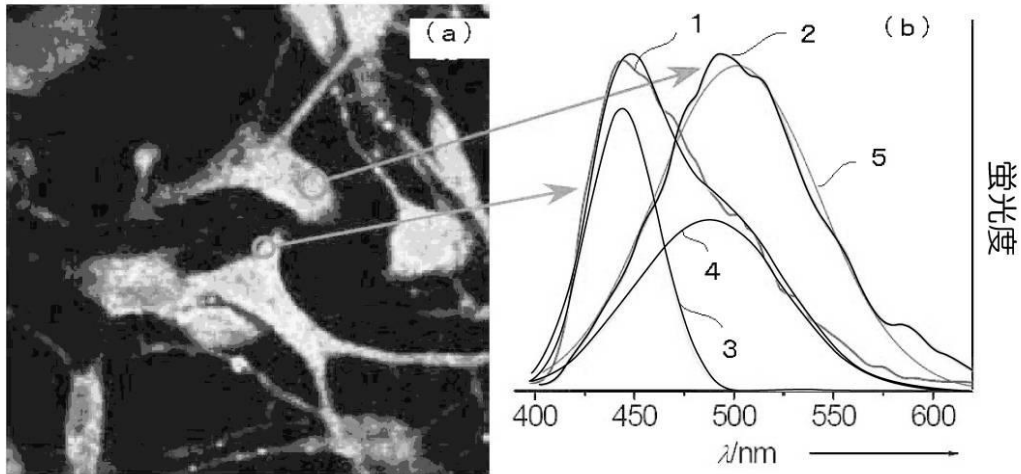
【図 11】

FIG.11



【図 12】

FIG.12



【図 13】

FIG.13 (a)

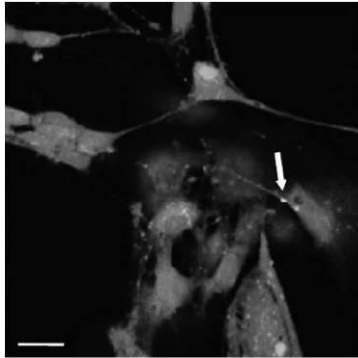


FIG.13 (b)

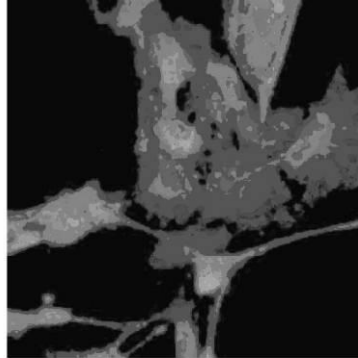


FIG.13 (c)

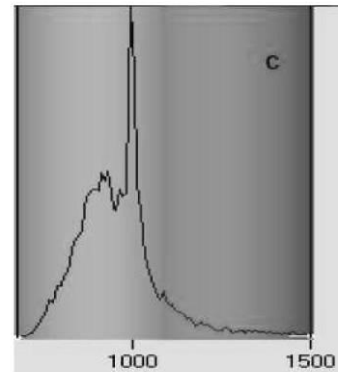
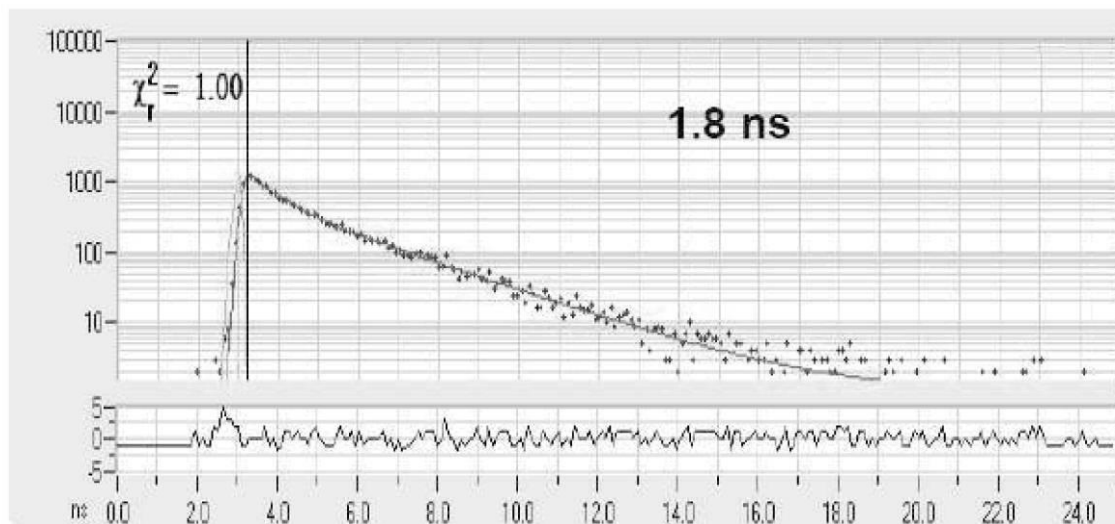


FIG.13 (d)



【図 14】

FIG.14 (a)

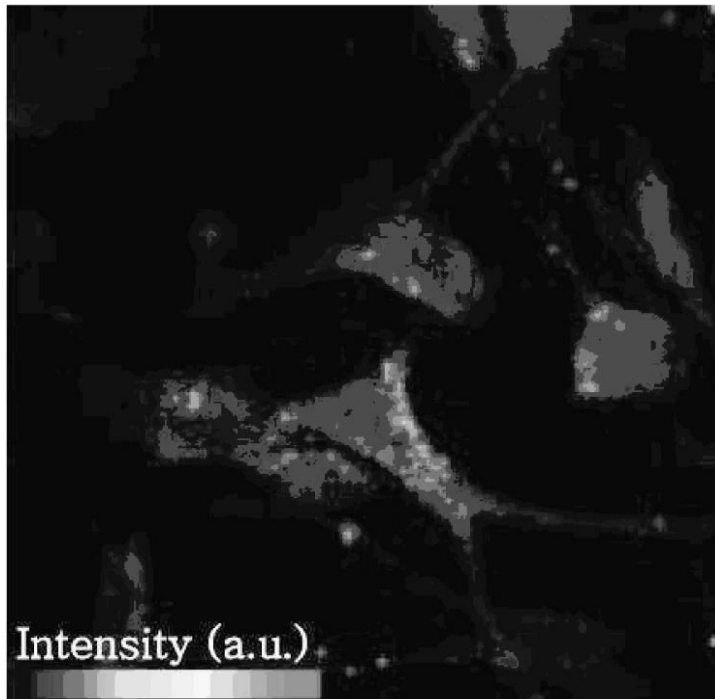
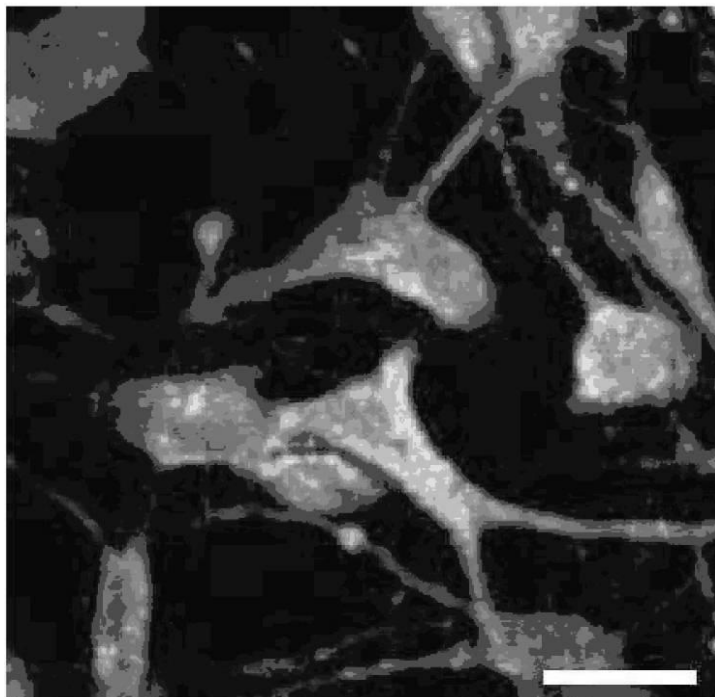


FIG.14 (b)



【図 15】

FIG.15 (a)

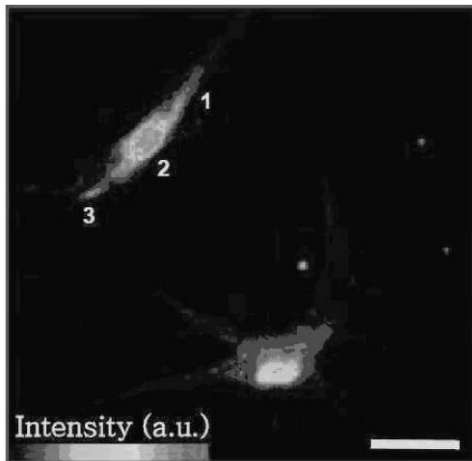


FIG.15 (b)

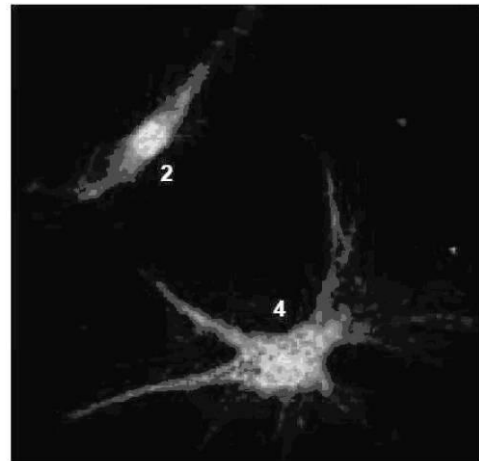


FIG.15 (c)

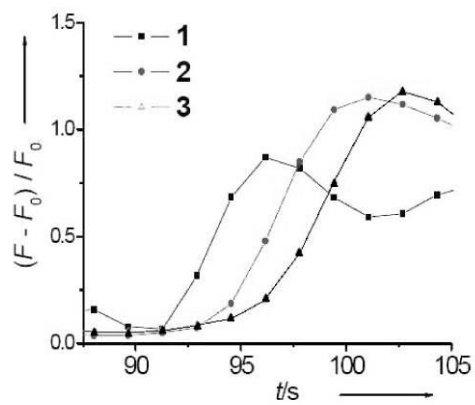
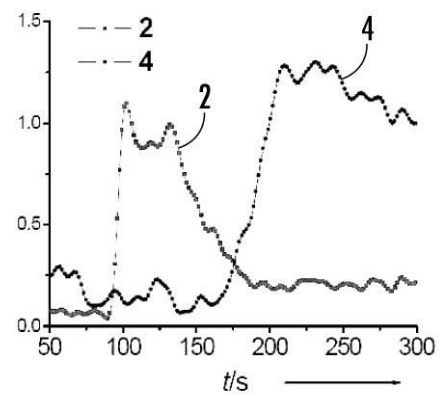


FIG.15 (d)



【図 16】

FIG.16 (a)

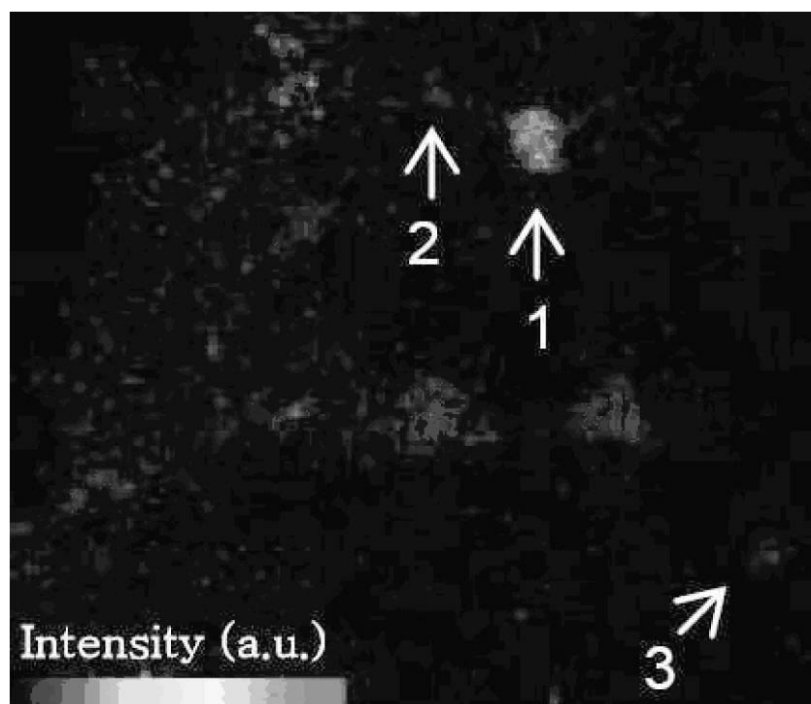
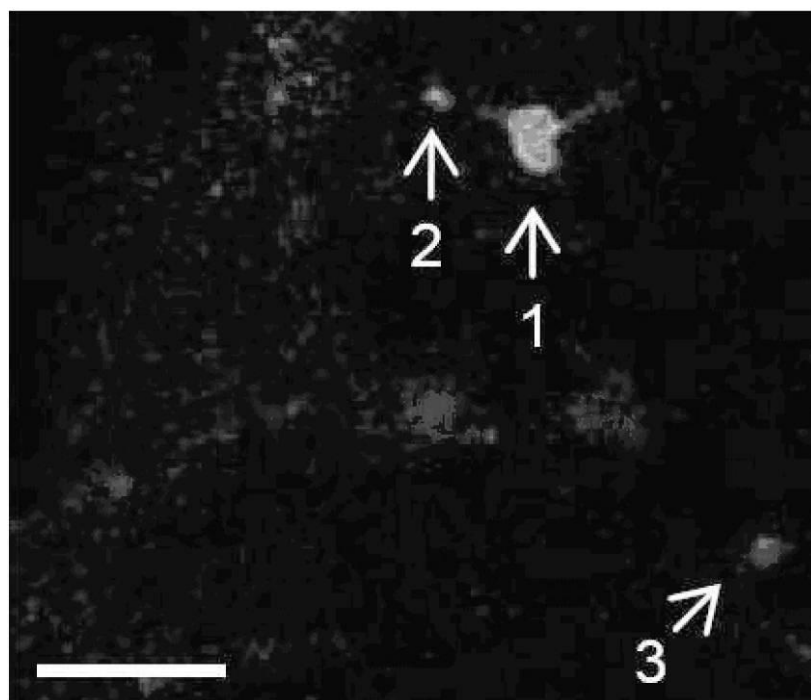
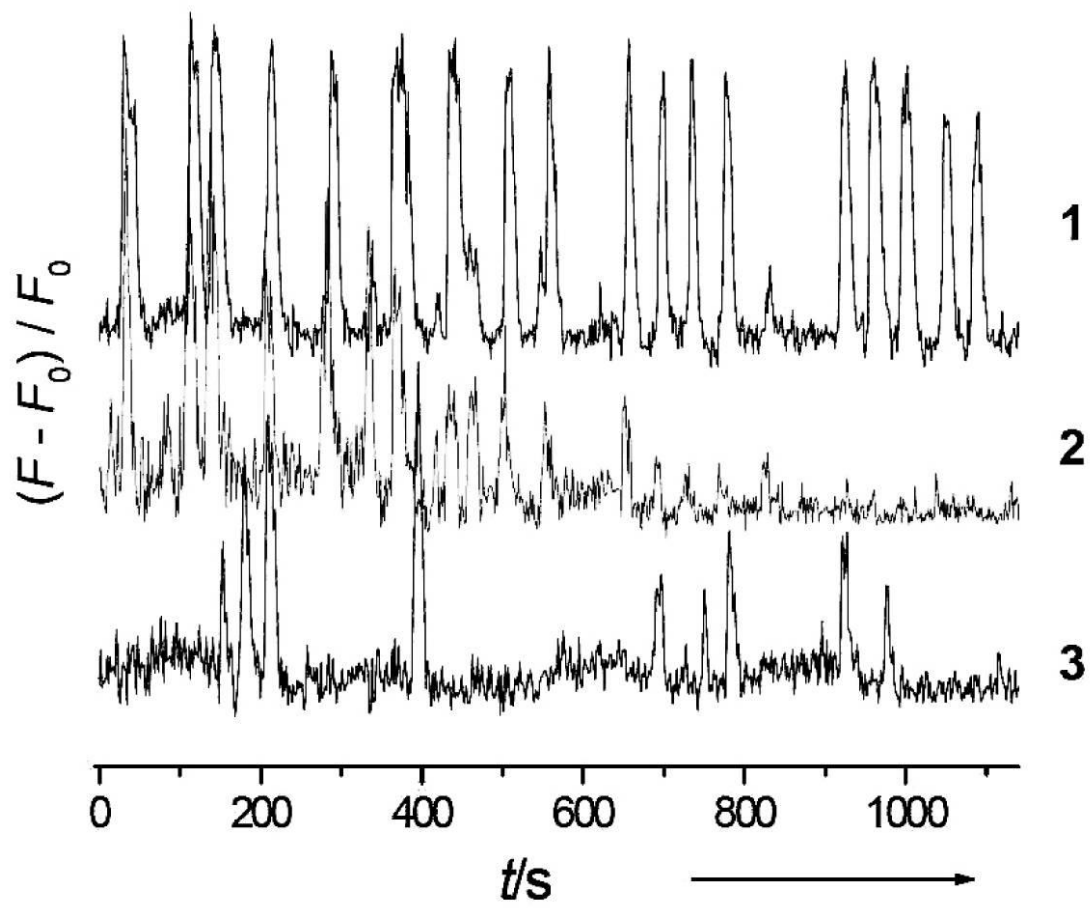


FIG.16 (b)



【図 17】

FIG.17



フロントページの続き

特許法第30条第1項適用 <http://www3.interscience.wiley.com/cgi-bin/abstract/114801052/ABSTRACT>、2007年8月6日掲載、「A Two-Photon Fluorescent Probe for Calcium Waves in Living Tissue」、Angew.Chem.Int.Ed.(2007)Vol.46

(74)代理人 100125210

弁理士 加賀谷 剛

(72)発明者 チョ・ボンレ

大韓民国 138-170 ソウル ソンパグ ソンパドン ハンヤンアパート #23-207

審査官 浅野 美奈

(56)参考文献 特開昭61-100599(JP,A)

特開2008-292453(JP,A)

Stephane Gaillard, et al., Synthesis and Characterization of a New Red-Emitting Ca²⁺ Indicator, Calcium Ruby, Organic Letters, 米国, 2007年, Vol. 9, No. 14, 2629-2632

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

G01N 33/84

C12Q 1/02

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)

CA/REGISTRY(STN)