

## イリジウム錯体の室温りん光を用いた癌細胞イメージング

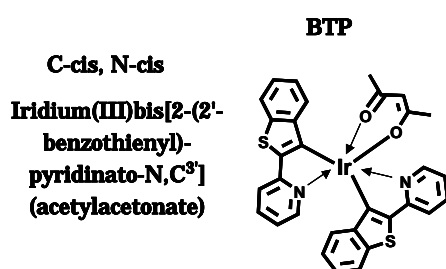
(群馬大院・工\*, 群馬大生体調節研究所\*\*) 唐澤 靖幸\*, 吉原 利忠\*, 根岸 一也\*, 小林 敦\*, 穂坂 正博\*\*, 竹内 利行\*\*, 飛田 成史\*

【序】一般に癌細胞は正常細胞より低酸素状態にあることが知られている。この低酸素領域を高感度、非侵襲的にプローブするためには酸素によって消光するりん光が適している。さらに低酸素プローブに必要な特性としては(1)皮膚への光の透過性を良くするために吸収、発光がより長波長であること。(2)酸素濃度に敏感に反応させるために発光寿命が長いことが挙げられる。そこで、室温で強い赤色りん光を示す化合物として知られ、これらの特性を持つイリジウム錯体 Iridium(III)bis[2-(2'-benzothienyl)-pyridinato-N,C3'](acetylacetonate) (BTP, Scheme 1)に着目した[1]。BTP はジクロロエタン中で吸収極大波長を 485nm、りん光極大波長を 615nm に示し、また、りん光寿命は 5.5 $\mu$ s と通常の Ir 錯体よりも長く低酸素領域をプローブするのに適している。本研究では BTP のりん光の強度と寿命が周囲の酸素濃度に鋭敏に依存することを用いて、脂質二分子膜中における酸素挙動を明らかにし、さらに正常細胞に比べて低酸素状態にある癌細胞及び癌組織を選択的に可視化することを試みた。

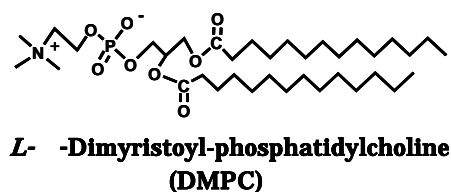
### 【実験】

#### ・試料

本研究で用いたイリジウム錯体(BTP)とリン脂質の構造式を Scheme 1 及び Scheme 2 に示す。



Scheme 1



Scheme 2

#### ・試料調製

リポソーム単層膜 (unilamellar vesicles : ULV) はエタノールインジェクション法を用いて作成した。BTP の最終溶液濃度を Tris-HCl 緩衝液:EtOH:DMSO(95:3:2 v/v)中で BTP 濃度  $1 \times 10^{-5}$ M および脂質 濃度  $1 \times 10^{-3}$ M となるように調製した。また、今回用いた DMPC 膜は相転移温度(23 )より高い温度では液晶状態、低い温度ではゲル状態を取る。本実験では 35 の液晶状態と、15 のゲル状態で測定を行った。

## 【結果と考察】

Fig. 1 に Ar 置換、空気飽和下、1atm 酸素飽和条件下における DMPC 膜中のりん光スペクトルを示す。Ar 置換におけるりん光強度は空気、酸素飽和下でのりん光強度に比べ大幅な増加を示している。また、同じ条件下で測定した BTP のりん光減衰曲線を Fig. 2 に示す。りん光寿命( $\tau_p$ )は Ar 置換では 5.25  $\mu$ s、空気飽和下では 470ns、酸素飽和下では 94.7ns であり酸素存在下において著しく短くなる。これらのことから BTP は酸素による消光を大きく受けることがわかる。

Fig. 3 にりん光寿命を Stern-Volmer の式

$$\frac{\tau_p^0}{\tau_p} = 1 + k_q \tau_p^0 [O_2] \quad (1)$$

に従ってプロットした図を示す。ここで、 $\tau_p^0$  は酸素が存在しないときのりん光寿命を示す。この図からりん光強度は酸素分圧に依存していることがわかり、得られた直線の傾きからりん光消光速度定数( $k_q$ )は 35 で  $1.0 \times 10^7 \text{ atm}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 、15 で  $0.3 \times 10^7 \text{ atm}^{-1} \text{ s}^{-1}$  と決定した。これらの結果から、りん光寿命を測ることによって細胞内の局所酸素分圧を見積もることができる。

Fig. 4 に人の癌細胞である HeLa 細胞に BTP を添加して得られたりん光顕微画像を示す。低酸素濃度(5%)で培養した HeLa 細胞と通常酸素濃度(20%)で培養した HeLa 細胞では 30 分後、2 時間後、共に低酸素濃度で培養した HeLa 細胞の方が強く発光している。

Fig. 5 に RAMOS 細胞(リンパ腫)を移植したヌードマウスのりん光画像を示す。BTP 投与後 5 分において腫瘍部だけに BTP の赤色りん光が観測され、また、2 時間後においてもりん光が観測された。癌細胞は正常細胞に比べて低酸素状態にあるため、酸素による消光を受けにくく、より強い発光が現れている。このことから腫瘍部を選択的に可視化することができる。

以上の結果から BTP を投与しりん光を測定することにより、低酸素状態にある癌組織を高感度、非侵襲的に可視化できることが明らかになった。

### ・参考文献

[1] K. A. King *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, **1985**, *107*, 1431-1432.

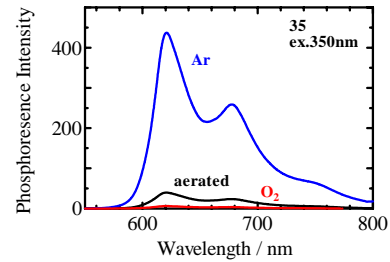


Fig.1 Ar 置換(青線)、空気飽和(黒線)、1atm 酸素飽和(赤線)条件下における DMPC 膜中の BTP のりん光スペクトル。

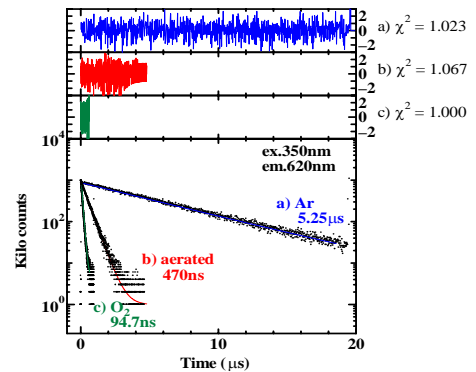


Fig.2 35 での(a) Ar 置換、(b) 空気飽和、(c) 1atm 酸素飽和条件下における DMPC 膜中の BTP のりん光減衰曲線。

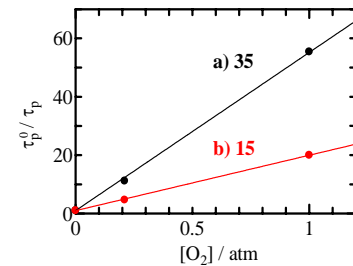


Fig.3 DMPC 膜における BTP のりん光寿命の溶存酸素による消光に対する Stern-Volmer プロット。

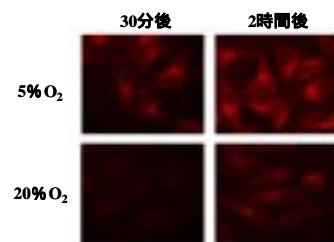


Fig.4 HeLa 細胞に取り込まれた BTP のりん光顕微画像。

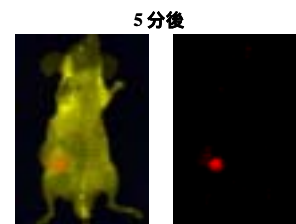


Fig.5 RAMOS 細胞(リンパ腫)を移植したヌードマウスのりん光画像。