

イリジウム錯体のりん光寿命測定による in vivo 酸素濃度計測

(群馬大学 ATEC*, 群大院・工**, 秋田県立大学***, 群馬大学****) ○小林 敦*, 吉原 利忠**, 穂坂 正博***, 竹内 利行****, 飛田 成史**

【序】イリジウム錯体は、室温において強いりん光を与える。しかし、りん光は酸素によって顕著な消光を受ける。我々は、この酸素消光現象を利用して、イリジウム錯体のりん光を用いて生体中の癌などの低酸素組織を可視化する方法を開発した[1]。これまでに BTP を用いて、担癌マウス中のりん光寿命測定により酸素濃度の定量を行った。

しかし、BTP は吸収・りん光波長が短く、組織内部までは光が到達し難い。また、生体膜に対する親和性が低いため、投与量を多くする必要がある。本研究では BTP の配位子を改変し、吸収・りん光の長波長化、および生体膜親和性を向上させたイリジウム錯体である BTPDM および BTQSA (Fig. 1)を開発し、in vivo 酸素濃度計測を行った。

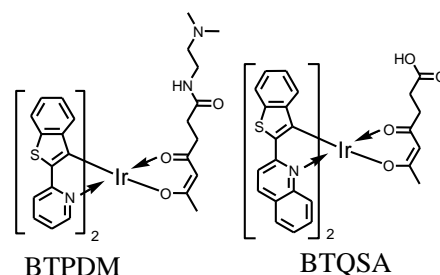


Fig. 1 BTPDM と BTQSA の構造

【実験】吸収スペクトル測定には、分光光度計(Jasco V-550)を用いた。りん光スペクトル測定には、蛍光分光光度計(日立 F-7000)を用いた。りん光顕微画像は、倒立型リサーチ顕微鏡 IX71(OLYMPUS), Evolve 512 (PHOTOMETRICS)で観察を行った。HeLa 細胞の培養液に各イリジウム錯体を添加(最終濃度: BTP, BTPDM ; 5 μ M, BTQSA ; 2 μ M)してから 2 時間後、りん光顕微画像の観察を行った。in vivo 発光寿命測定には Fig. 2 に示す装置を用いた。二分岐ファイバを用いることにより、マウスの体の任意の点について発光寿命を測定することができる。励起光には Nd³⁺:YAG laser の第 2 高調波(532 nm, 15kHz)を用いて、時間相関単一光子計数法に基づいて発光減衰を測定した。担癌マウスの尾静脈からイリジウム錯体 250 nmol (Dimethylsulfoxide : 生理食塩水 = 1:9) 溶液 100 μ l を投与し、3 時間後に癌組織と正常組織の発光寿命測定を行った。

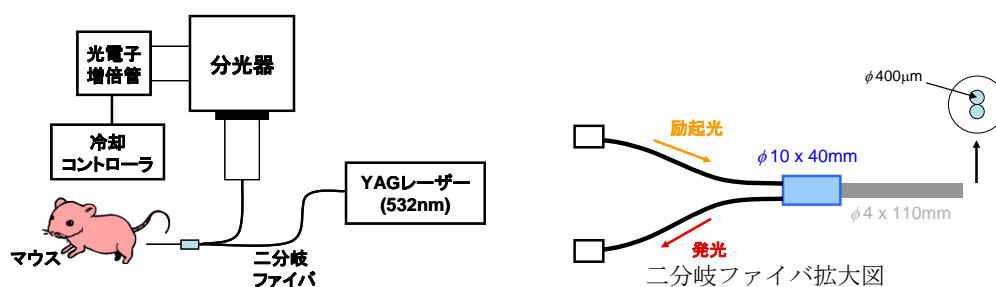


Fig. 2 in vivo 発光寿命測定装置

【結果と考察】Fig. 3 に BTP, BTPDM, BTQSA の吸収・りん光スペクトルを示す。BTP と BTPDM はほぼ同様のスペクトルを示し、BTQSA は BTP と比較し吸収・りん光ともに長波長化した。Fig. 4 に BTP, BTPDM, BTQSA 添加 2 時間後の HeLa 細胞のりん光顕微画像を示す。BTP と比較して BTPDM は著しく発光強度が高いことから、BTPDM は BTP よりも細胞中に取り込まれやすいことが分かる。

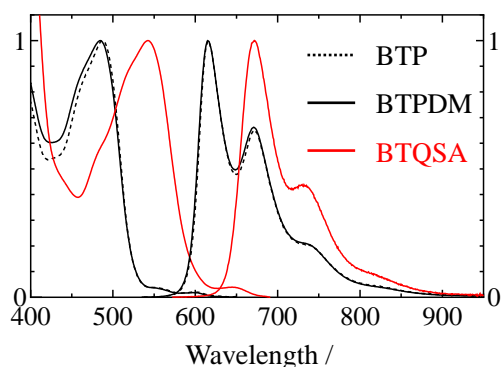


Fig. 3 BTP, BTPDM, BTQSA の吸収・りん光スペクトル

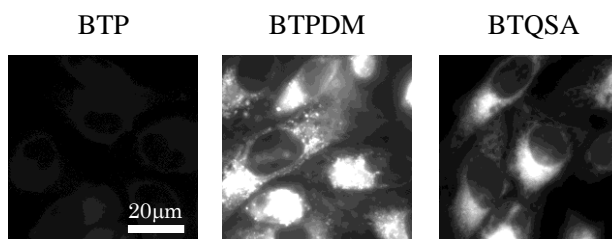


Fig. 4 BTP, BTPDM, BTQSA 添加 2 時間後のりん光顕微画像

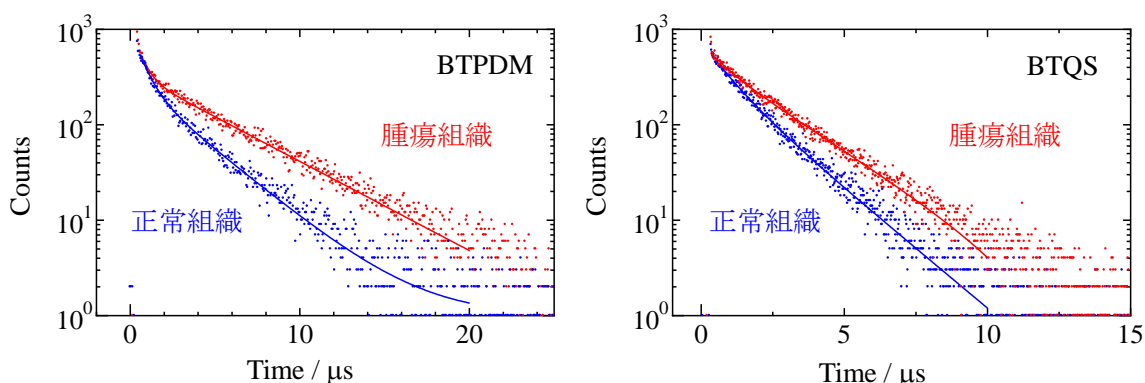


Fig. 5 マウスの腫瘍組織および正常組織における発光減衰曲線

Fig. 5 に BTPDM, BTQSA を投与した担癌マウスの腫瘍組織, 正常組織の発光減衰曲線を示す。BTPDM, BTQSA いずれも正常組織に比べ腫瘍組織中においてりん光寿命が長くなった。以下に示す Stern-Volmer の式より組織中の酸素分圧を求めた。

$$\frac{\tau_p^0}{\tau_p} = 1 + k_q \tau_p^0 pO_2 \quad (1) \quad pO_2 = \frac{1}{k_q} \left(\frac{1}{\tau_p} - \frac{1}{\tau_p^0} \right) \quad (2)$$

ここで pO_2 は酸素分圧, τ_p^0 は脱気下におけるりん光寿命, τ_p は酸素分圧 pO_2 でのりん光寿命, k_q は消光速度定数である。BTPDM, BTQSA の k_q はニードル型光学酸素センサーを用いて測定したマウス体内の酸素濃度から求めた。得られた k_q をもとに組織中酸素分圧を求めたところ, 一般的に知られている腫瘍組織, 正常組織中の酸素分圧とほぼ一致した。

Table 1 イリジウム錯体のりん光寿命測定から見積もった担癌マウスの組織中の酸素分圧

Probe	Tissue	τ_p^0 (μ s)	τ_p (μ s)	k_q (10^3 mmHg $^{-1}$ s $^{-1}$)	pO_2 (mmHg)
BTPDM	tumor	5.6	4.6	2.57	25
	normal	5.6	3.0	2.57	58
BTQSA	tumor	3.1	2.3	4.25	26
	normal	3.1	1.8	4.25	58