

生体イメージングを目指した近赤外蛍光プローブの開発研究

小島 宏建

Development of Near-infrared Fluorescent Probes for *In vivo* Imaging

Hirotatsu KOJIMA

Chemical Biology Research Initiative, The University of Tokyo, Faculty of Pharmaceutical Science
Main Building, 7-3-1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-0033, Japan

(Received July 10, 2008)

The number of reports on new techniques in molecular imaging has been recently increasing because of their usefulness in biological, medical, and clinical research. Fluorescence imaging methods are generally superior in terms of sensitivity, selectivity and ease of use. Cyanine dyes have been employed as fluorescent labels in fluorescence imaging studies of biological mechanisms. In particular, tricarboyanines have the advantage that light at their emission and absorption maxima in the near-infrared (NIR) region around 650–900 nm is relatively poorly absorbed by biomolecules, and so can penetrate deeply into tissues. There is also less autofluorescence in this region. In addition to cyanine dyes for straightforward fluorescence labeling, we successfully developed cyanine dyes whose fluorescence intensity changes upon specific reaction with nitric oxide, which is an important signaling molecule involved in the regulation of a wide range of physiological and pathophysiological mechanisms, and many disorders. Then, we synthesized dipicolylcyanine (DIPCY), consisting of tricarboyanine as a fluorophore and dipicolylethylenediamine as a heavy metal chelator, and investigated its response to various heavy metal ions. Upon addition of zinc ion, a red shift of the absorbance maximum was observed. Namely, DIPCY can work as a ratiometric fluorescent sensor for zinc ion in the NIR region. Moreover, we have recently developed several pH probes based on the amine-substituted tricarboyanine fluorophore. We could measure pH with these fluorescent probes by a ratiometric monitoring method.

Key words—imaging; fluorescent probe; near-infrared; cyanine

1. はじめに

人は自然現象を自らの目でみることで、微小な世界から広大な宇宙で起こっている現象を理解してきている。すなわち、観察はサイエンスの基本であり、好奇心旺盛な科学者は理解したい現象がみえない場合、まず可視化する手段を開発してから解明することを行ってきている。分子イメージング技術は生細胞や生体内で目にみえない標的分子を捉える方法で、生命現象を解き明かす強力な証拠を得る手段となる。従来の画像化法はレントゲンなどに代表されるように主として形態観察であったが、分子イメージング技術は状態の可視化観察、すなわち重要な生理機能を担っている生理活性種・酵素・受容体

を作用しているまさにその場、そのときにおける状況、あるいは時々刻々の変化を捉えるものである。本技術にはハードウェアである可視化装置とともにソフトウェアである標的分子特異的な分子プローブが通常必要であるため、新技術開発には分子プローブ創製が要となる。筆者らは有機化学に基づいたプローブの分子設計を行えること、生体への負担が小さい「光」を利用した場所を選ばない簡便な測定ができること、高感度測定法であることを要件として踏まえ、蛍光法を原理とする分子プローブ（蛍光プローブ）創製が望ましいと考えた。ここで述べる蛍光プローブはいわゆる蛍光ラベル化試薬ではなく、蛍光強度や波長がその状態によって変化するように精密な化学分子設計が施された機能性色素である。

本稿では筆者らが行ってきた一酸化窒素感受性蛍光プローブの開発と生体のより深部の状態を探ることができる近赤外蛍光プローブ群の開発研究について紹介する。

東京大学生物機能制御化合物ライブラリー機構(〒113-0033 東京都文京区本郷 7-3-1 薬学部本館)

e-mail: kojima@mol.f.u-tokyo.ac.jp

本総説は、平成20年度日本薬学会奨励賞受賞を記念して記述したものである。

2. 一酸化窒素蛍光プローブの開発

筆者らは蛍光プローブの標的分子として、血管内皮細胞由来弛緩因子として発見され、神経系や免疫系でも多彩な機能が報告されてきた重要な生理活性分子でありながら、短寿命・低濃度であるために測定が困難であったフリーラジカルの一酸化窒素 (NO) を選んだ。NO は生理的条件においては寿命が数秒とされているラジカル種であり、低濃度での生成のために、生理的に機能している NO を直接捉えることは難しかった。元々筆者らは超高感度測定法である化学発光法に基づいた方法を開発してきたが、¹⁾ NO 特異性をさらに向上すべく、蛍光プローブ開発に転向した経緯がある。

従来より用いられてきた NO 測定法としては、当時 Griess 法が間接的測定法の代表例として用いられていた。NO の安定酸化生成物である NO₂ を測定する。この方法は *N*-1-ナフチルエチレンジアミンとスルファニルアミドを酸性下 NO₂ と反応させ、ジアゾカップリングさせることで、543 nm の吸光度を測定するものである。また、さらに高次の酸化体である NO₃ もカドミウムなどで NO₂ に還元することにより測定できる。この方法の利点は安価な試薬で、手軽に測定できるということであるが、吸光法に基づくため、検出限界は 1 μM 程度と感度が低い。ただし、HPLC と組み合わせることで高感度化することも可能である。²⁾ また、RI 法もよく使われてきている。これは、1 分子の NO が 1 分子の L-アルギニンから NO 合成酵素によって生成される際、1 分子の L-シトルリンを副生することを利用したものである。³⁾ H や ¹⁴C ラベルした L-アルギニンを用い、NO 生成後、L-アルギニンと L-シトルリンをイオン交換カラムによって分離して、L-シトルリン生成量を放射活性を基に測定し、それを NO 生成量に換算するものである。³⁾ NO 合成酵素から生成する NO のアッセイには、高感度である点から必須の方法である。実際、NO 合成酵素のクローニングが成功したのも本方法を開発できたからである。問題点としては RI を用いる煩雑さとリアルタイム測定への応用を行い難いことである。高感度測定法である化学発光法としてオゾン法もよく知られ、NO が血管内皮細胞由来弛緩因子であることの証明に用いられたのも本方法である。⁴⁾ NO はオゾンと反応すると励起状態の NO₂ を生成し、基底

状態に戻る際に発光する。この反応は気相中でのみ起こり、当時は大気中の公害ガスである NO_x 測定に用いられていた。したがって、生体サンプル中の NO を測定するには、気相中に NO を追い出す必要がある。さらに、ESR を用いるスピントラップ法もよく研究されている。NO は本来フリーラジカルであるので、ESR シグナルを観測することは可能であるが、NO 自身不安定な上、そのシグナルを得るには低温等特殊な条件が必要である。したがって、ESR を用いて NO 自身のシグナルを捉える方法を生体における機能解明に応用することができないので、スピントラップ剤と反応させて安定なラジカル種に変換してから ESR で測定されてきた。スピントラップ剤は様々なものが報告されているが、感度、空間分解能等克服すべき問題がある。

本研究に取り組んだ十数年前当時、蛍光プローブとして最もよく知られていたのが、Tsien 博士らにより開発された Fura-2⁵⁾ や Fluo-3⁶⁾ などのカルシウムイオン蛍光プローブである。これらはカルシウムイオンと結合・解離をすることで、蛍光団 (fluorophore, 蛍光を発するコアとなる化学構造) に付いた配位結合に関与する窒素原子の電子状態が変わり、蛍光の波長や強度が変化する興味深い分子であった。Fura-2 を利用し、様々な細胞内カルシウムイオンに関連する現象が蛍光画像として観察され、飛躍的に解明されてきたことから、本手法の有効性が如実に示されており、NO についても同等のことを行いたいと考えたのである。

そのためには NO 蛍光プローブが必要であり、開発する蛍光プローブの要件として、1) 常温、常圧で反応すること、2) 中性の水中で反応すること、3) 特異性が高く、高収率であること、4) プローブが反応前後で不安定でないこと、5) 蛍光特性変化があること、6) 細胞へのダメージや自家蛍光を防ぐため長波長励起であること、7) 細胞に局在化する



小島宏建

東京大学生物機能制御化合物ライブラリー機構・特任准教授、博士 (薬学)、1995 年東京大学薬学部卒業、2000 年東京大学大学院薬学系研究科博士課程修了、2000 年日本学術振興会海外特別研究員 (米国カリフォルニア大学サンディエゴ校博士研究員)、2002 年東京大学大学院薬学系研究科助手、2007 年より現職。

ることが挙げられる。蛍光プローブとして考えれば、当たり前の条件ではあるが、有機化学的には高度な要求である。そこで、筆者らはまず NO の反応性を精査した。NO は生体内では不安定であると考えられていると上述したが、それ自身は酸素や遷移金属イオンがない純水中では少なくとも数日間はその溶液を実験に供せられるほど安定である。ただし、好氣的な水中環境では直ちに酸化を受け、水やアミン、チオールなどと反応することが知られている。筆者が研究を開始するまでに、所属研究室において好気下でのアニリンと NO との反応により窒素原子が3つつながった 1,3-ジフェニルtriazen を生成することを見い出していた。⁷⁾したがって、芳香族隣接ジアミンと NO との反応では triazole 環を生成すると予想し、イメージングが行われる生体内環境下でも利用できることを期待し、検証することにした。期待通り、芳香族隣接ジアミンを有する化合物が中性の水中、常温というマイルドな生理的な条件下で NO と特異的に反応して、環状の triazole 体を生成することを見い出し、2,3-ジアミノナフタレン (DAN, Fig. 1) を用いた測定法を開発した。⁸⁾ DAN 溶液に NO を添加するとナフトリアゾールに変化し、375 nm 励起-425 nm 蛍光の測光強度が上昇する。DAN は脂溶性が高く、細胞への出入りが比較的自由であるため、イメージングには適さないと考え、細胞内に留まるようエステル基を導入した DAN-1 EE (Fig. 1) を開発した。リポ多糖とサイトカインで刺激を行い、NO 合成酵素を誘導したラット大動脈平滑筋細胞のバイオイメーキングを本プローブを用いて行った。

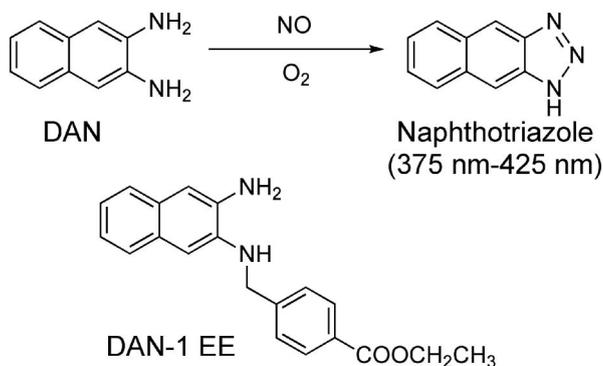


Fig. 1. Reaction of 2,3-Diaminonaphthalene (DAN) with Nitric Oxide (NO), and an Ester Derivative of DAN (DAN-1 EE)

刺激を行った細胞内で蛍光強度の上昇が観察され、世界で初めて蛍光法による NO イメージングに成功した。しかし、DAN 誘導体は無細胞系での測定には有用であったものの、この波長領域は細胞自身が有する物質に由来する自家蛍光と重なってしまい、バックグラウンドの蛍光強度が強いため、イメージングには望ましくないことが判明した。

そこで、波長を替えるべく、蛍光団をフルオレセイン (正確にはキサントレン) にしたプローブ、ジアミノフルオレセイン (DAF, Fig. 2) を合成した。⁹⁾ 本プローブは NO と反応前は弱蛍光性であり、反応後に強蛍光性となる。この原理は光誘起電子移動による。蛍光とは励起光によって、電子が励起され、元のエネルギー準位に戻る際にエネルギーが光

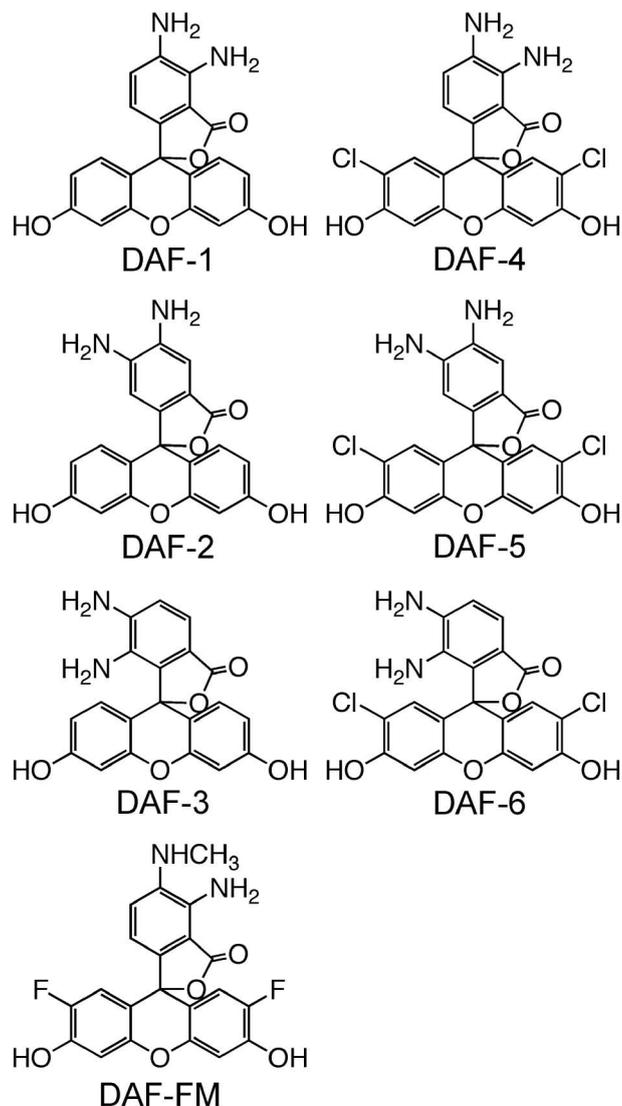


Fig. 2. Diaminofluoresceins (DAFs)

として放出された場合に観測されるものである。DAFの場合、励起光によってキサンテン蛍光団が励起状態となり、ジアミノベンゼンの高いエネルギー準位の軌道にある電子が励起キサンテン蛍光団の低い準位の軌道に移動し、励起蛍光団の高いエネルギー準位の軌道にある電子が元に戻れなくなり、蛍光を発することができなくなったと説明できる。このような原理が明らかになれば、計算機により軌道計算することで蛍光性予測もある程度可能となり、分子設計が行い易くなる。¹⁰⁾

複数の異性体 DAF-1 から DAF-6 まで無水フタル酸誘導体とレゾルシノール又はクロロレゾルシノールとを縮合することによって合成した。塩素原子を導入したのは、フェノール性水酸基の pK_a を下げ、中性付近で完全にアニオン型になることを期待して設計した。それぞれ NO 水溶液との反応を水中で試みたところ、495 nm の励起光を当てると微弱な蛍光強度（量子収率 0.005）の溶液が、515 nm 付近の非常に強い蛍光（量子収率 0.92）を発する溶液へと変化した。蛍光光度計で定量的に検討したところ、DAF-2 が最も感度等で優れており、検出限界が 5 nM と高感度で自家蛍光の影響をかなり小さくできることが判明した。塩素原子を導入した DAF-4 も蛍光強度変化割合が大きかったが、フェノール性水酸基の pK_a が下がったため、反応後に生成されるトリアゾール環上で中性から弱アルカリ環境で起こる脱プロトン化による蛍光強度への影響がかえって顕著になり、pH 変化するサンプルには適さないことが判明した。そこで、塩素原子を水酸

基のオルト位にそれぞれ導入した DAF のアミノ基の片方をメチル化し、再度、感度比較を行った。その際、フッ素原子を導入したフルオレセインが光褪色色に対しやや強いという報告¹¹⁾を基に塩素原子の代わりにフッ素原子を導入した DAF も合成した。最終的に pH 6 以上で蛍光強度が安定するため、pH 変化に影響を受け難く、感度が最もよい DAF-FM を開発した。¹²⁾

DAF シリーズは細胞内外それぞれの NO 測定に用いることができる。まず細胞外応用として、NO 生成する細胞の培養液に加え、生成する NO 量を上清の蛍光強度を指標に測定することができる。筆者らはマイクロプレートを用いた NO 合成酵素阻害剤の cell based アッセイ法を報告した。¹³⁾

次に DAF シリーズの細胞内測定への応用であるが、フェノール性水酸基にアセチル基を導入したエステルタイプの色素を使うことで細胞内に色素を容易に非侵襲的負荷ができるため、生細胞や組織を用いた NO イメージングが行い易くなった。この色素負荷の原理は脂溶性が高く細胞膜透過性のエステル誘導体が細胞内のエステラーゼによって加水分解され、フェノール性水酸基が負電荷を帯び、細胞内から漏出し難くなることを利用している (Fig. 3)。このプローブを用い、筆者らは LPS とサイトカインで NO 合成酵素を誘導したラット大動脈平滑筋細胞から刻々と生成する NO 測定,⁹⁾ ブラジキニンや ATP 刺激時にウシ大動脈内皮細胞から生成する NO 測定,¹²⁾ 同一細胞における Fura-Red などの波長帯の異なる蛍光プローブを用いた細胞内カルシウ

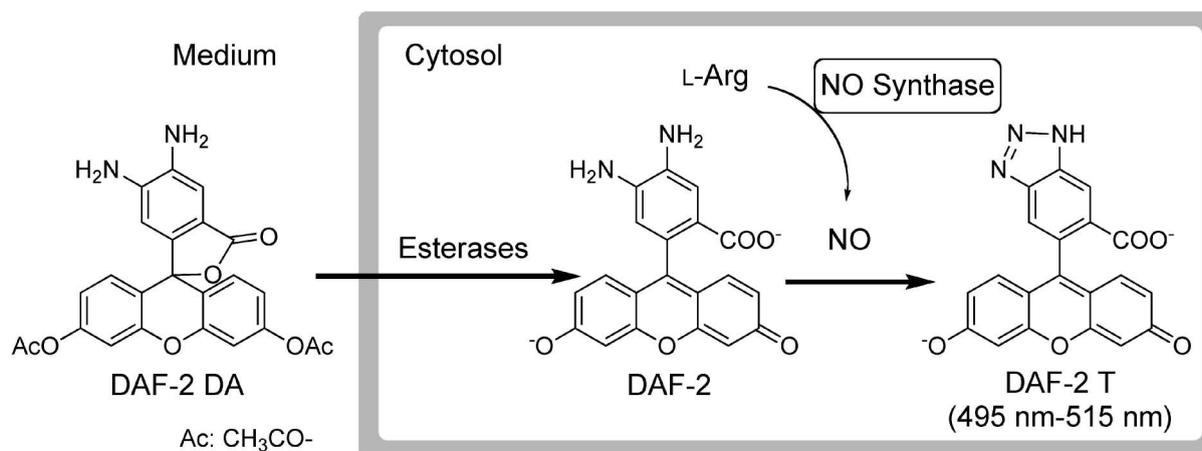


Fig. 3. Intracellular Behavior of a Fluorescent NO Probe, DAF-2

ムイオンと NO の同時測定, *N*-メチル-D-アスパラギン酸 (NMDA) 刺激や虚血刺激時におけるラット大脳スライスの海馬 CA1 領域から生成する NO 測定,^{14,15} 小脳スライスでの NMDA と α -アミノ-3-ヒドロキシ-5-メソオキサゾール-4-プロピオン酸 (AMPA) 刺激時における NO 生成様式の違いが分かるイメージングに成功している。¹⁶

また, 本プローブが光やカルシウムイオンあるいはマグネシウムイオンの共存下では NO シグナルを増幅するというプローブの命とも言える特異性に係わる報告があったため, 筆者らにおいても追試を行った。しかし, 光や二価イオンによってその報告に用いられた NO 放出剤からの NO 生成速度が上昇するためであり, プローブの特性によるものではないことが判明した。¹⁷

さらにフルオレセインより長波長の 560 nm で励起するローダミンタイプのジアミノローダミン (DAR, Fig. 4) も開発した。¹⁸ これにより, 二重染色による測定やさらなる自家蛍光の低減, 細胞内 pH が pH 6 以下に低下する場合などに対応できる。また, ローダミンは量子収率に関しては 0.4 程度と, フルオレセインより劣るものの, フルオレセインに比して光褪色に強く, 自家蛍光強度減少のため, 結果的にはより高感度な測定が可能となる場合があった。ただし, ローダミンは細胞内の膜構造 (特にミトコンドリア) に局在し易いため, 目的にあった色素の選択が必要であることも分かった。

現在, これらプローブは積水メディカル(株), 米国 Sigma 社, Calbiochem 社, Molecular Probe 社, 欧州 Alexis 社などより市販され, 多くの方々にお使い頂いており, 筆者らでは思いも付かないようなアプリケーションも数多く報告されている。

3. 近赤外蛍光プローブ群の開発

生物への応用実験を進めるにつれ, 画像として得られる結果の信憑性が一見高いために培養細胞で観察したすべての現象が生体内で現実に行っているものと錯覚する危険性を覚えるようになった。やはりできることならば, より直接的に, 真の生命現象を観察できるよう, 生きている状態で生体内イメージング法を行いたいと考えた。また, 開発に成功すれば, 蛍光法に基づく全く新しい画像診断法として発展する可能性も秘めている。画像診断法は X 線撮影のみの時代から, 近年の医療技術進歩は目覚ましく, PET や MRI が出現し, それらの威力が発揮されている。電磁波計測法のうち, X 線などの短波長領域と MRI に用いる長波長のラジオ波領域が実用化され, この間の化学や物理で最も広く用いられ, 実生活でも非常に馴染みがある紫外-可視-近赤外-赤外領域の光は生体組織を透過し難いため, ほとんど利用されてこなかった。しかし, 最近のレーザー技術発達による光強度改善や, コンピューターを利用する画像解析技術・装置の急速な発展により, 光を用いる高感度測定が可能になってきた。有害な放射線を使用しない安全性と, 高い時空間分解能, 検出対象分子の選択性を付与するための化学的修飾が可能な点などの将来性・発展性の観点から注目されている。既に米国では NIH 主導で, 国策的に Molecular Imaging 研究が推進されており, 最近わが国においても追随され, 特に PET 技術開発に注力されている。米国においては, 中でも 650 nm から 900 nm の波長帯の近赤外光を用いる測定法は, ヘムやメラニン色素, 水などの生体構成物質による吸収が少ないため組織透過性がよく, かつ生体の放つ自家蛍光がない領域で, ノイズの原因となるバックグラウンド蛍光が無視できるため, 比較的深

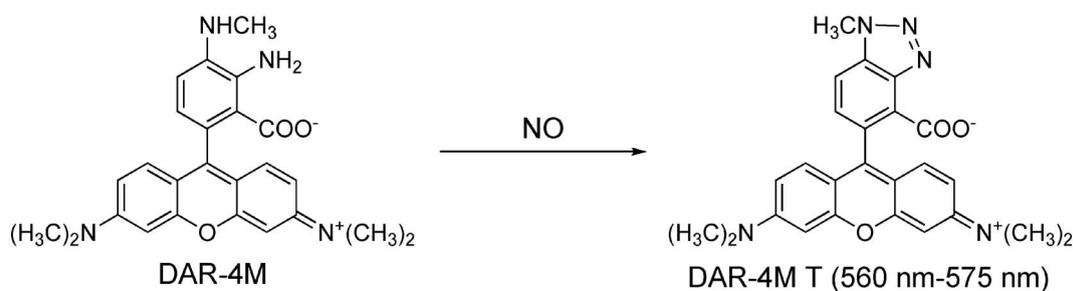


Fig. 4. A Fluorescent NO Probe Based on Rhodamine Chromophore

部の状態を探ることができ、注目されつつある。他方、フルオレセインやローダミン色素などの測光波長が属する可視光領域とはヒトが視覚で感知できる波長帯という意味なので、生体物質で吸収され易く組織透過性が低い、つまり表面に近い部分しか通常は観察できない波長帯と換言できる。そのような背景から、近赤外領域の蛍光を発するプローブ群の開発に取り組むことにした。しかし、近赤外領域で機能する蛍光色素の種類としては数少なく、フィルム開発の分野で感光色素として発展してきたシアニン(cyanine)がバイオイメージングでほとんどの場合用いられてきた。共役メチンの数によってシアニンは分類でき、メチンが5つのものはジカルボシアニン、7つのものはトリカルボシアニンと呼ばれる。既にシアニンは Indocyanine green という名称で眼底検査薬や肝機能検査薬として用いられている実績があり、色素骨格自身の毒性は見い出されていないようである。Weissleder らは、主としてがんの *in vivo* 蛍光検出を目指して、葉酸受容体,¹⁹⁾ matrix metalloproteinase,²⁰⁾ cathepsin D,²¹⁾ lysosomal protease,²²⁾ thrombin²³⁾ をターゲットとしたプローブを立て続けに報告している。また、Licha, Wiedemann らは somatostatin 受容体をターゲットとしたプローブ,²⁴⁾ Frangioni らは、hydroxyapatite に特異的に結合するプローブ,²⁵⁾ Zheng らは低密度リポタンパク受容体に結合するプローブの開発を報告している。²⁶⁾ 以上に挙げたプローブは、いずれもシアニン色素の近赤外蛍光を検出原理とするもので、*in vivo* イメージングを指向するものである。しかし従来より、蛍光色素は主にラベル化剤として用いられることがほとんどで、放射性同位元素のラベルによる PET 等で代替可能である。蛍光色素の利用は

適切な分子設計により、蛍光特性の制御ができ、生体分子を高感度センシングできる点が最大の利点であると筆者は考えており、生体成分のダイナミックな量変動を *in vivo* で非侵襲的に画像として捉えることができる機能性近赤外蛍光プローブの創製を目指している。例えば Akkaya らにより開発されたシアニンにカルシウムイオンキレーターを結合したカルシウムイオン応答性プローブがあるが、これもカルシウムイオンとの反応による蛍光強度の上昇は高々4倍程度であり、残念ながら実際の生物応用には至っていない。²⁷⁾

筆者らはまず、当時までに行ってきた NO プローブの近赤外タイプ的设计に取り掛かった。NO の捕捉部位である芳香族ジアミンを市販のトリカルボシアニンである IR-780 や IR-783 のハロゲンを脱離基とする置換反応によってエーテル結合を介して導入し、蛍光 off/on のスイッチが制御されるように分子設計した近赤外 NO 蛍光プローブ Diaminocyanine (DAC, Fig. 5) の合成を行った。

DAC のリン酸緩衝水溶液に NO 水溶液を添加したところ、期待通り 750 nm の励起光により 780 nm における蛍光強度が濃度依存的に上昇する結果が得られた。反応前の蛍光量子収率は 0.003 から生成物であるトリアゾール体の量子収率は 0.04 程度に上昇する。量子収率はフルオレセイン等に比較して小さいものの、モル吸光係数が約 $1.5 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ と大きく、自家蛍光の影響がほとんどない波長帯であるために生物試料での使用には有効であると判断した。

ラット摘出腎臓内部での NO 生成を腎臓外部から観察可能かどうか試みた。ペントバルビタール麻酔下の Wistar ラット (8 週齢) を開腹し、右腎動

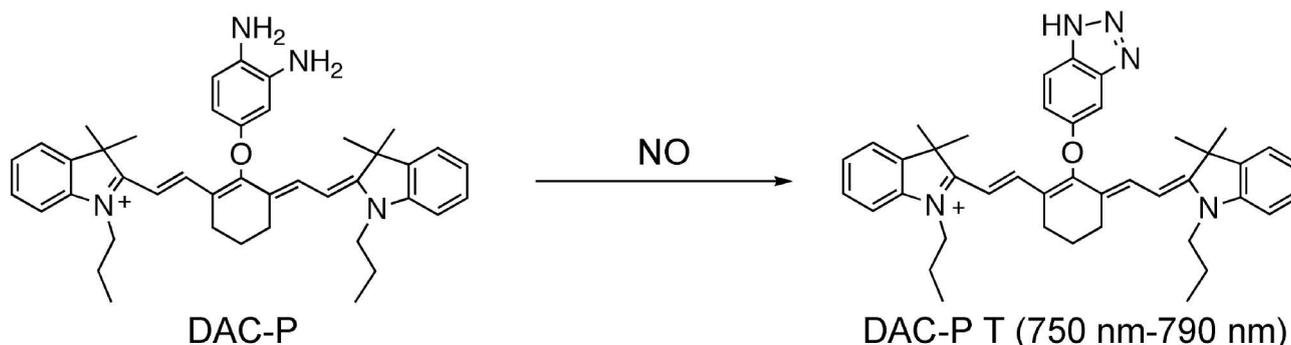


Fig. 5. A Near-infrared Fluorescent NO Probe Based on Cyanine Chromophore

て用いられてきているが、先述の NO プローブのように生体分子を捉えるなど特定時に蛍光特性が変化する機能性プローブはほとんど創製されていない。そこで、生体イメージングに用いるシアニン色素の分子設計に利用可能な新原理を見い出すべく、さらに検討を重ねた。その結果、窒素原子がシアニンの共役メチン鎖に導入されたシアニンはその窒素原子に結合する置換基の違いにより、その光学特性が大きく変わることを見出した (Table 1)。そのことを利用し、含窒素金属キレーターを導入した近赤外亜鉛イオン蛍光プローブ Dipycolylcyanine (DIPCY, Fig. 8) 類を合成した。²⁹⁾ 亜鉛イオンと結合すると DIPCY の窒素原子の電子密度が減少して励起波長や蛍光波長が変化することを期待した。亜鉛イオンは生体内では通常タンパク質等によりキレートされ、遊離イオンの濃度は低濃度に抑えられているが、海馬や扁桃体に存在するニューロンには mM レベルの高濃度で局在している小胞が存在することが知られ、記憶形成などで重要な機能を担っている可能性があり、注目されつつある。^{30,31)} 蛍光測定を行ったところ、亜鉛イオンがない状態では 627 nm 励起極大、758 nm 蛍光極大であるのに対し、亜鉛イオンを加えると、671 nm 励起極大、765 nm 蛍光極大となり、励起極大波長が約 50 nm 長波長シフトする (Fig. 9)。したがって、本プローブは二波長励起、一波長測光タイプのレシオ蛍光強度測定が可能な色素である。一波長励起一波長測光タイプの DAC を用いたイメージングでは蛍光強度変化が小さい場合、プローブの濃度分布が経時的に変化

したのか、本当のシグナルなのかの区別が難しかった。しかしレシオ測定できれば、プローブ濃度の不均一分布を補正することができるため、生体試料での測定には望ましい。金属イオンの選択性に関しては、亜鉛イオンに対して大きく応答するのに加え、コバルトイオンに対しても中程度の応答があった。しかし、亜鉛イオンの方が生体内では多く存在すると考えられていることから、亜鉛イオン選択的なプローブであると言って差し支えない。また、他のアルカリ金属イオン、アルカリ土類金属イオン、鉄イオン、マンガンイオン、カドミウムイオンが共存しても亜鉛との相互作用に影響はほとんどなかった。

亜鉛イオンプローブ DIPCY に関しては蛍光色素の構造の核をなす蛍光団にアミノ基が導入されており、このアミノ基の電子供与性の大小により蛍光強度や励起・蛍光波長が変化することが分かってきた

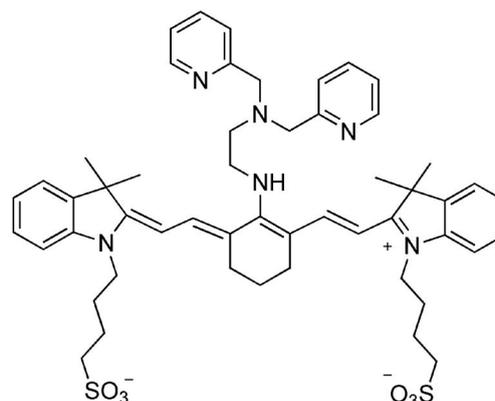
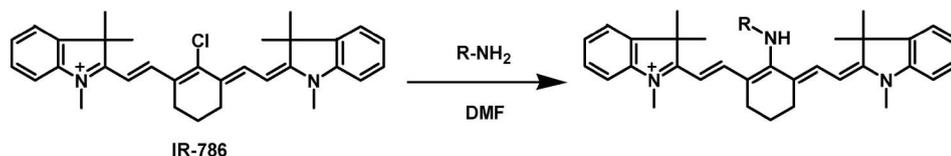


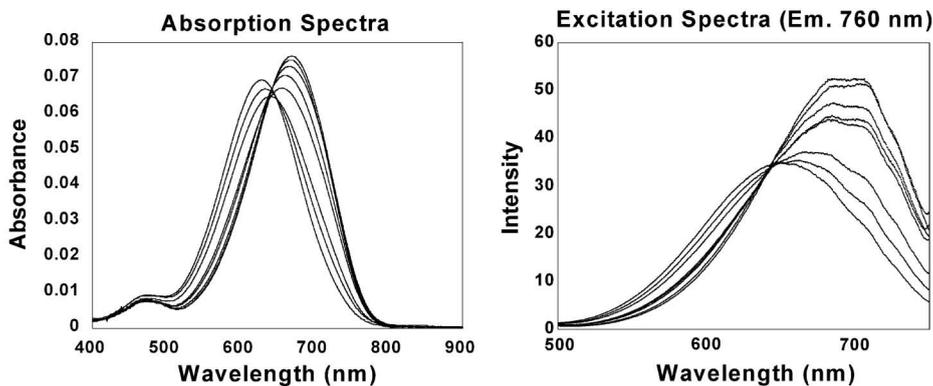
Fig. 8. A Near-infrared Fluorescent Zn^{2+} Probe, Dipycolylcyanine (DIPCY)

Table 1. Correlation between the pK_a Values of Substituted Amines and Photochemical Properties



R	pK_a	Abs _{max} (nm)	Em _{max} (nm)	Φ_{fl}
IR-786	—	774	789	0.04
Hexyl	10.6	626	745	0.06
Propyl	10.6	627	748	0.07
Allyl	9.7	633	747	0.07
Methoxyethyl	9.5	635	748	0.07
Benzyl	9.4	647	744	0.07

All samples were measured in methanol.



DIPCY: 1 μM ; Zn^{2+} : 0, 0.01, 0.1, 0.8, 1.0, 2.0, 4.0, 10 μM in 100 mM HEPES buffer, pH = 7.4, $I = 0.1$ (NaNO_3)

Fig. 9. Spectra of DIPCY at Various Zn^{2+} Concentrations

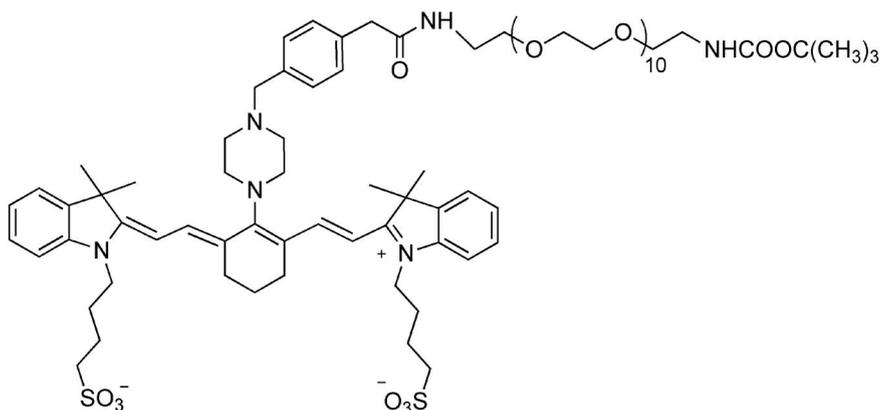


Fig. 10. A Near-infrared Fluorescent pH Probe

ため、このアミノ基やアミノ基から延長した脂肪鎖の先端部に付したアミノ基のプロトン化、脱プロトン化による電子供与性変化の利用を検討し、波長変化型 pH プローブの開発を行った (Fig. 10). 本プローブは脱プロトン化状態では 680 nm 付近の吸収、プロトン化状態では 760 nm 付近の吸収波長に変化する。つまり、760 nm の吸収波長にて励起し、蛍光をモニタリングすれば、低 pH 環境では強い蛍光強度が観測される。一波長における蛍光強度変化を測定すると色素の濃度が影響するのだが、二波長での強度測定による比を算出すれば、その影響が軽減できるため、pH 測定により有用な色素となると考えている。アミノ基の側鎖の種類を変化させるとアミノ基の pK_a が変化するため、測定したい pH 領域に適するプローブを作製することができる。マウスに経口投与し、消化管内の pH 観察を試みたが、水溶性が乏しい色素を用いると分布がよく

ないため、ポリエチレングリコール (PEG) をその側鎖に接続することで、水溶性を上げることにした。その結果、水溶性の高い色素が投与後比較的均一に分散し易く消化管内 pH イメージングには相応しいことが分かった。胃内の pH は低く酸性であるため、胃内は 700 nm 台の励起光を用いたときに強い蛍光を発生し、逆に腸内では 600 nm 台の励起光を用いたときに蛍光が強くなる。プローブを投与後に炭酸水素ナトリウム水溶液を経口投与したところ、胃内は中和され、700 nm 台励起の蛍光強度が著しく減弱した。

さらに、650 nm 前後の吸収及び蛍光波長を有し、pH 変化により特性が変わらないジカルボシアニンと 650 nm 付近の吸収、750 nm 付近の蛍光波長を有するアミノ基を導入したトリカルボシアニンを結合させ、蛍光共鳴エネルギー移動 (Fluorescence resonance energy transfer) を利用したプローブも

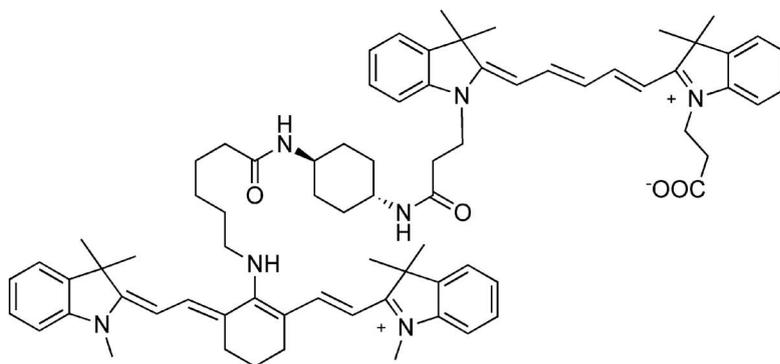


Fig. 11. A Near-infrared Fluorescent pH Probe Based on Fluorescence Resonance Energy Transfer

作製した (Fig. 11). 観測すべき値は, 630 nm 励起したときの 660 nm と 750 nm における蛍光強度比変化である. 酸性環境下でプロトン化すると, トリカルボシアニンの 650 nm 付近の吸収が減少するため, エネルギー移動効率が悪くなって, 750 nm の蛍光強度が減少する. 本プローブは重なり積分値と言われるスペクトルの重なりの変化を近赤外 pH プローブの検出原理とした初めての例である.

4. おわりに

「百聞は一見に如かず」というように, 化学を基盤とした光イメージング新技術がヴェールで覆われている「生命現象」にスポットライトを当てる強力な手段であることは疑いない. その反面, イメージングデータを鵜呑みにしない慎重な姿勢も重要であることもこれまでの経験から感じている.

有用なプローブの創製は現在盛んなケミカルバイオロジー研究分野の発展にも貢献でき, 万人の関心事であるヒトの生命・健康に直結するものとなり, さらには臨床診断薬開発につながれば社会的意義も大きいことから, 今後とも化学に基づいて生命を垣間みる研究を推進したい.

謝辞 本研究は東京大学大学院薬学系研究科薬品代謝化学教室にて行ったものであり, 終始ご指導下さいました長野哲雄教授に深謝いたします. また, 薬学部学生時よりご指導ご鞭撻頂いております東京大学名誉教授廣部雅昭先生にも厚く御礼申し上げます. また, 様々なご指導, ご助言頂いた現大阪大学教授菊地和也先生, 東京大学大学院薬学系研究科准教授浦野泰照先生を始めとするスタッフの先生方, 大学院生, 特に佐々木栄太修士, 清瀬一貴修士, 藍澤早希子修士の皆様感謝いたします. さ

に, 東京大学医学部附属病院平田恭信先生をはじめとする多くの共同研究者の先生方, 製品化にご尽力頂いた積水メディカル株式会社 [旧第一化学薬品株式会社] の深作 昇様をはじめとする方々にも御礼申し上げます.

REFERENCES

- 1) Kojima H., Kikuchi K., Hirobe M., Nagano T., *Neurosci. Lett.*, **233**, 157-159 (1997).
- 2) Muscara M., Nucci G., *J. Chromatogr. B: Biomed. Appl.*, **686**, 157-164 (1996).
- 3) Snyder S., Brecht D., *Sci. Am.*, **266**, 68-71, 74-77 (1992).
- 4) Palmer R., Ferrige A., Moncada S., *Nature*, **327**, 524-526 (1987).
- 5) Grynkiewicz G., Poenie M., Tsien R., *J. Biol. Chem.*, **260**, 3440-3450 (1985).
- 6) Minta A., Kao J., Tsien R., *J. Biol. Chem.*, **264**, 8171-8178 (1989).
- 7) Nagano T., Takizawa H., Hirobe M., *Tetrahedron Lett.*, **36**, 8239-8242 (1995).
- 8) Nakatsubo N., Kojima H., Sakurai K., Kikuchi K., Nagoshi H., Hirata Y., Akaike T., Maeda H., Urano Y., Higuchi T., Nagano T., *Biol. Pharm. Bull.*, **21**, 1247-1250 (1998).
- 9) Kojima H., Nakatsubo N., Kikuchi K., Kawahara S., Kirino Y., Nagoshi H., Hirata Y., Nagano T., *Anal. Chem.*, **70**, 2446-2453 (1998).
- 10) Urano Y., Nagano T., *Gendai Kagaku.*, **381**, 44-50 (2002).
- 11) Sun W.-C., Gee K. R., Klaubert D. H., Haugland R. P., *J. Org. Chem.*, **62**, 6469-6475 (1997).
- 12) Kojima H., Urano Y., Kikuchi K., Higuchi T., Hirata Y., Nagano T., *Angew. Chem. Int.*

- Ed.*, **38**, 3209–3212 (1999).
- 13) Nakatsubo N., Kojima H., Kikuchi K., Nagoshi H., Hirata Y., Maeda D., Imai Y., Irimura T., Nagano T., *FEBS Lett.*, **427**, 263–266 (1998).
 - 14) Kojima H., Nakatsubo N., Kikuchi K., Urano Y., Higuchi T., Tanaka J., Kudo Y., Nagano T., *Neuroreport*, **9**, 3345–3348 (1998).
 - 15) Kojima H., Hirata M., Kudo Y., Kikuchi K., Nagano T., *J. Neurochem.*, **76**, 1404–1410 (2001).
 - 16) Okada D., Yap C.C., Kojima H., Kikuchi K., Nagano T., *Neuroscience*, **125**, 461–472 (2004).
 - 17) Suzuki N., Kojima H., Urano Y., Kikuchi K., Hirata Y., Nagano T., *J. Biol. Chem.*, **277**, 47–49 (2002).
 - 18) Kojima H., Hirotsu M., Nakatsubo N., Kikuchi K., Urano Y., Higuchi T., Hirata Y., Nagano T., *Anal. Chem.*, **73**, 1967–1973 (2001).
 - 19) Tung C.-H., Lin Y., Moon W.K., Weissleder R., *ChemBiochem*, **3**, 784–786 (2002).
 - 20) Bremer C., Tung C.-H., Weissleder R., *Nat. Med.*, **7**, 743–748 (2001).
 - 21) Tung C.-H., Bredow S., Mahmood U., Weissleder R., *Bioconjug. Chem.*, **10**, 892–896 (1999).
 - 22) Weissleder R., Tung C.-H., Mahmood U., Bogdanov A., *Nat. Biotechnol.*, **17**, 375–378 (1999).
 - 23) Tung C.-H., Gerszten R. E., Jaffer F. A., Weissleder R., *ChemBiochem*, **3**, 207–211 (2002).
 - 24) Becker A., Hassenius C., Licha K., Ebert B., Sukowski U., Semmler W., Wiedenmann B., Grötzinger C., *Nat. Biotechnol.*, **19**, 327–331 (2001).
 - 25) Zaheer A., Lenkinski R. E., Mahmood A., Jones A. G., Cangle L. C., Frangioni J. V., *Nat. Biotechnol.*, **19**, 1148–1154 (2001).
 - 26) Zheng G., Li H., Yang K., Blessington D., Licha K., Lund-Katz S., Chance B., Glickson J. D., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **12**, 1485–1488 (2002).
 - 27) Ozmen B., Akkaya E. U., *Tetrahedron Lett.*, **41**, 9185–9188 (2000).
 - 28) Sasaki E., Kojima H., Nishimatsu H., Urano Y., Kikuchi K., Hirata Y., Nagano T., *J. Am. Chem. Soc.*, **127**, 3684–3685 (2005).
 - 29) Kiyose K., Kojima H., Urano Y., Nagano T., *J. Am. Chem. Soc.*, **128**, 6548–6549 (2006).
 - 30) Frederickson C. J., Suh S. W., Silva D., Frederickson C. J., Thompson R. B., *J. Nutr.*, **130**, 1471S–1483S (2000).
 - 31) Zalewski P. D., Millard S. H., Forbes I. J., Kapaniris O., Slavotinek A., Betts W. H., Ward A. D., Lincoln S. F., Mahadevan I., *J. Histochem. Cytochem.*, **42**, 877–884 (1994).