

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4930943号
(P4930943)

(45) 発行日 平成24年5月16日(2012.5.16)

(24) 登録日 平成24年2月24日(2012.2.24)

(51) Int.Cl.		F I		
GO 1 N 31/00	(2006.01)	GO 1 N 31/00		L
GO 1 N 31/22	(2006.01)	GO 1 N 31/22	1 2 2	
GO 1 N 21/78	(2006.01)	GO 1 N 21/78		C

請求項の数 3 (全 12 頁)

(21) 出願番号 特願2007-126518 (P2007-126518)
 (22) 出願日 平成19年5月11日(2007.5.11)
 (65) 公開番号 特開2008-281467 (P2008-281467A)
 (43) 公開日 平成20年11月20日(2008.11.20)
 審査請求日 平成22年5月6日(2010.5.6)

(73) 特許権者 504145364
 国立大学法人群馬大学
 群馬県前橋市荒牧町四丁目2番地
 (74) 代理人 100100549
 弁理士 川口 嘉之
 (74) 代理人 100090516
 弁理士 松倉 秀実
 (74) 代理人 100089244
 弁理士 遠山 勉
 (74) 代理人 100126505
 弁理士 佐貫 伸一
 (72) 発明者 飛田 成史
 群馬県桐生市天神町一丁目5番1号 国立
 大学法人群馬大学内

最終頁に続く

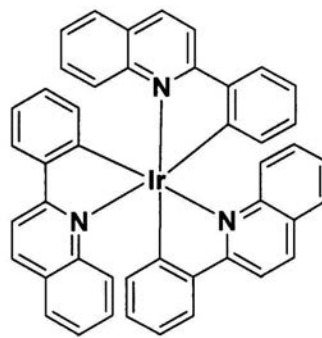
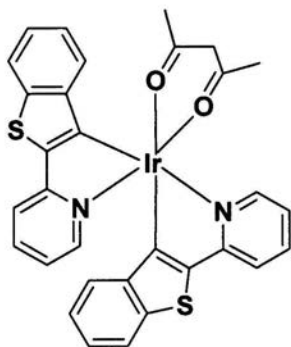
(54) 【発明の名称】 酸素濃度測定試薬および酸素濃度測定方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

下記(1)または(2)のいずれかの錯体を含む、酸素濃度測定試薬。

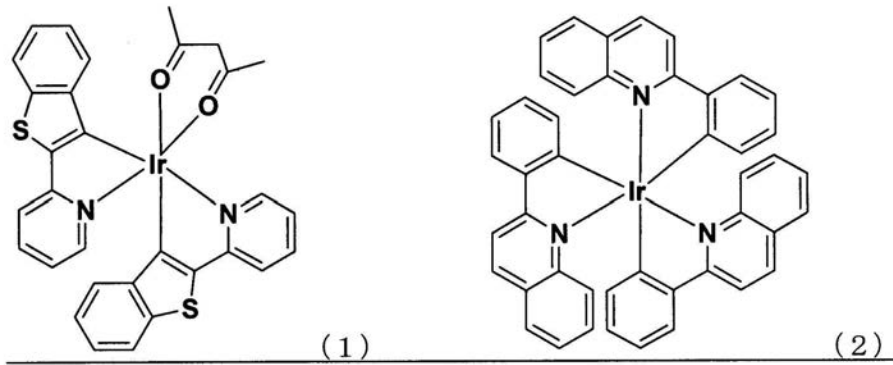
【化 1】



【請求項 2】

下記(1)または(2)のいずれかの錯体を含む、癌の診断薬。

【化2】

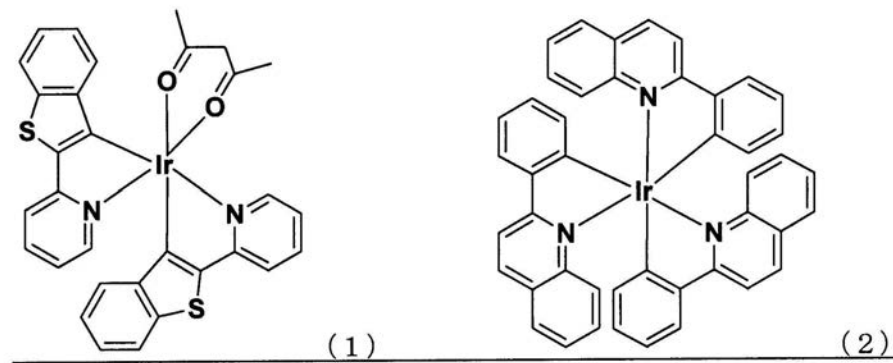


10

【請求項3】

下記(1)または(2)のいずれかの錯体を細胞に添加し、同錯体のりん光を測定することを特徴とする、細胞の酸素濃度の測定方法。

【化3】



20

【発明の詳細な説明】

30

【技術分野】

【0001】

本発明は細胞や組織中の酸素濃度をリアルタイムで可視化し定量することのできる試薬および方法に関する。

【背景技術】

【0002】

生体組織あるいは細胞中の酸素濃度を非侵襲的にリアルタイムで検出する方法の開発は、細胞生物学や医療の分野において重要な課題となっている。生体組織中の酸素濃度を定量するための従来法としては、(1)微小電極を組織に挿入して測定する方法、(2)常磁性プローブ分子のESR信号幅が周辺の酸素濃度に依存して変化することを利用する方法、(3)ニトロイミダゾール系低酸素組織診断薬剤を使う方法、(4)水溶性ポルフィリン誘導体、ルテニウム錯体等の発光測定に基づく酸素濃度測定法、などが知られている。(1)の微小電極を用いる方法は、電極近傍の一点における酸素分圧しか測定できない。また、侵襲性であるという欠点を持つ。(2)のESR信号に基づく方法では、リアルタイムでの酸素濃度計測はできない、(3)のニトロイミダゾール系薬剤を用いる方法は、低酸素細胞内でニトロイミダゾールが還元されて細胞内タンパク質に結合しトラップされることを利用する。この方法では、薬剤の代謝に時間を要するため、薬剤投与後数時間経過しないとデータが得られない、という欠点をもつ。(4)の方法は、水溶性ポルフィリン誘導体やルテニウム錯体のりん光寿命が血中酸素濃度に依存して変化(消光を受ける)ことを利用して酸素濃度を定量する方法である。この方法は、非侵襲で組織における酸

40

50

素分圧を可視化できるという大きな利点を有するが、試薬が水溶性であるため、得られるデータは血中酸素濃度に限られる。

【0003】

イリジウム(III)錯体(非特許文献1~4)はりん光を発することが知られており、有機ELディスプレイなどへの応用が期待されている。しかしながら、イリジウム(III)錯体のりん光に基づいて酸素濃度を測定することや、癌の診断への応用は知られていない。

【非特許文献1】S. Lamansky, P. Djurovich, D. Murphy, F. Abdel-Razzaq, H. Lee, C. Adachi, P. E. Burrows, S. R. Forrest, and M. E. Thompson, J. Am. Chem. Soc., 123, 4303 (2001).

【非特許文献2】H. Konno, Chem. Times, 199, 13 (2006).

【非特許文献3】M. Nonoyama, Bull. Chem. Soc. Jpn., 47, 767 (1974).

【非特許文献4】S. Sprouse, K. A. King, P. J. Spellane, and R. J. Watts, J. Am. Chem. Soc., 106, 6647 (1984).

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0004】

本発明は、新規な酸素濃度測定試薬および酸素濃度測定方法を提供することを課題とする。

【課題を解決するための手段】

【0005】

本発明者は上記課題を解決すべく鋭意検討を行った。その結果、Ir(III)を中心金属とし、芳香族系分子を配位子とする錯体を細胞や組織中に存在させ、そのりん光を検出することで細胞や組織内の酸素濃度が測定できることを見出した。また、同錯体を生体に投与したときに、そのりん光に基づいて癌組織を特異的に検出できることを見出し、本発明を完成するに至った。

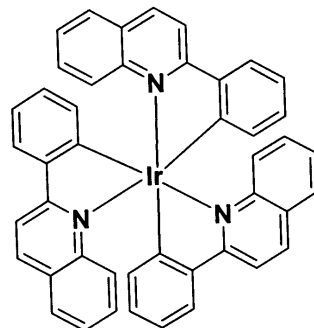
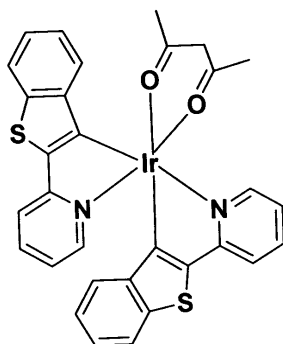
【0006】

すなわち、本発明は以下の通りである。

(1) Ir(III)を中心金属とし、芳香族系分子を配位子とする錯体を含む、酸素濃度測定試薬。

(2) 前記錯体が下記のいずれかの錯体である、(1)の酸素濃度測定試薬。

【化1】



(3) Ir(III)を中心金属とし、芳香族系分子を配位子とする錯体を含む、癌の診断薬。

(4) Ir(III)を中心金属とし、芳香族系分子を配位子とする錯体を細胞に添加し、同錯体のりん光を測定することを特徴とする、細胞の酸素濃度の測定方法。

【発明の効果】

【0007】

本発明によれば、細胞や組織中の低酸素領域を可視化することができ、さらにりん光寿命の値から酸素濃度を定量することができる。また、癌組織を特異的に検出することがで

10

20

30

40

50

きるため、癌の診断に使用することもできる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0008】

以下に本発明を詳しく説明する。

本発明の酸素濃度測定試薬は、Ir(III)を中心金属とし、芳香族系分子を配位子とする金属錯体（以下、イリジウム錯体と呼ぶ）を含む。

イリジウム錯体としては、例えば、文献1～4に開示されたようなものが例示される。配位子の芳香族系分子としては、当該配位子を含むイリジウム錯体がりん光を発するものであれば特に制限されないが、窒素原子、酸素原子、硫黄原子などのヘテロ原子を含む芳香族系配位子が好ましい。

1) S. Lamansky, P. Djurovich, D. Murphy, F. Abdel-Razzaq, H. Lee, C. Adachi, P. E. Burrows, S. R. Forrest, and M. E. Thompson, J. Am. Chem. Soc., 123, 4303 (2001).

2) H. Konno, Chem. Times, 199, 13 (2006).

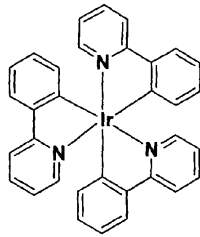
3) M. Nonoyama, Bull. Chem. Soc. Jpn., 47, 767 (1974).

4) S. Sprouse, K. A. King, P. J. Spellane, and R. J. Watts, J. Am. Chem. Soc., 106, 6647 (1984)

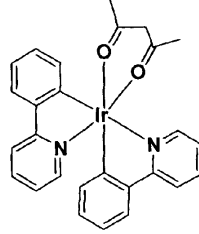
【0009】

室温溶液中でりん光を発するイリジウム錯体が好ましく、その具体例を下記に示す。

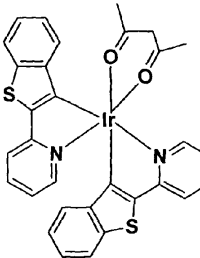
【化2】



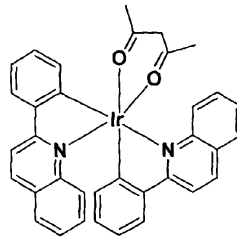
Ir(ppy)_3
fac
tris(2-phenylpyridine)iridium
緑色発光



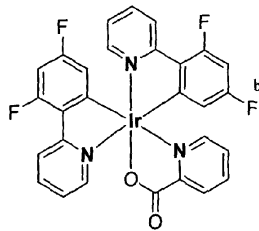
$(\text{ppy})_2\text{Ir(acac)}$
C-cis, N-cis
bis(2-phenylpyridinato-N,C^{2'})
iridium(acetylacetonate)
緑色発光



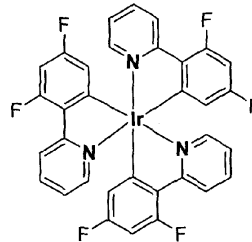
$(\text{btp})_2\text{Ir(acac)}$
C-cis, N-cis
bis[2-(2'-benzothienyl)pyridinato-N,C^{3'}]
iridium(acetylacetonate)
赤色発光



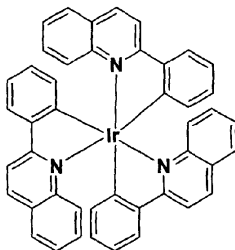
$(\text{pq})_2\text{Ir(acac)}$
C-cis, N-cis
bis(2-phenylquinolinato-N,C^{2'})
iridium(acetylacetonate)
赤色発光



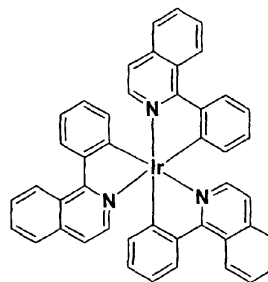
FIrpic
fac
bis[2-(4,6-difluorophenyl)pyridinato-
N,C^{2'}] iridium picolinate
青色発光



Ir(Fppy)_3
fac
tris[2-(2,4-difluorophenyl)
pyridine]iridium
青色発光



Ir(pq)_3
fac
tris(2-phenylquinolinato)
iridium
赤色発光



Ir(piq)_3
fac
tris(1-henylisoquinolinato)
iridium
赤色発光

これらのイリジウム錯体は、上記文献3,4に記載されたような公知の方法に従って合成することができる。これらのイリジウム錯体は、芳香族系配位子を3つ有する3配位体と、芳香族系配位子の他に補助配位子(acac配位子など)を有する2配位子の2つのタイプに分類できる。そして、配位子の種類を変えたりん光スペクトルが変化し、青、緑、赤と様々な色の発光が得られる。

なお、生体組織の酸素濃度を可視化するためには、組織の透過性が高い長波長の発光の方が好ましい。すなわち、赤色のりん光を与える化合物がより好ましい。そして、りん光寿命が長く、りん光量子収率の高い化合物が望ましい。

【0010】

特に好ましい化合物として、下記の化合物が挙げられる。

$\text{BTP}_2\text{Ir(acac)}$: bis[2-(2'-benzothienyl)pyridinato-N,C^{3'}]iridium(acetylacetonate)

PQ_3Ir : tris(2-phenylquinolinato)iridium

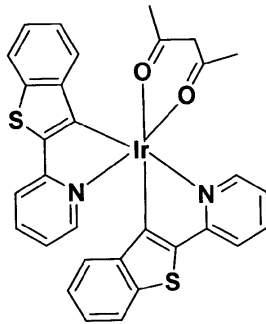
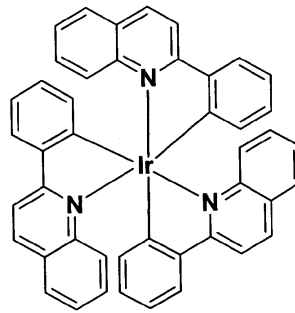
10

20

30

40

【化3】

BTP₂Ir(acac)PQ₃Ir

10

【0011】

上記のようなイリジウム錯体は、細胞や組織、特に、それらの生体膜に集積し、酸素濃度が低いときにより強いりん光を発する。したがって、りん光の強度に基づいて細胞や組織の酸素濃度を測定することができる。すなわち、りん光が強いときに酸素濃度が低いというような判定ができる。また、あらかじめ酸素濃度とりん光強度の関係を求めておくことにより、酸素濃度を定量的に測定することも可能である。

【0012】

測定対象としての細胞の種類は特に制限されず、株化培養細胞や初代培養細胞などが例示される。

20

また、マウスやラットなどの実験動物にイリジウム錯体を投与し、酸素濃度が低下している部位の検出などを行うこともできる。

細胞や組織にイリジウム錯体を添加する場合、イリジウム錯体を適当な溶媒に溶解して添加すればよく、添加濃度は使用するイリジウム錯体の種類にもよるが、5~500 μMが好ましく、25~75 μMが特に好ましい。

イリジウム錯体を添加してインキュベートした後、イリジウム錯体を励起してりん光を観察できるような蛍光顕微鏡、蛍光測定装置、蛍光イメージング装置などを用いてりん光を観察することができる。

励起波長、検出波長は使用するイリジウム錯体の種類に応じて選択すればよい。

【0013】

30

また、イリジウム錯体は、生体に投与したときに、癌組織を特異的に染色できるため、癌の検出に使用できる。これは、癌組織では酸素供給が不足しているのでイリジウム錯体のりん光が癌組織で特異的に観察できることによると考えられる。

したがって、上記イリジウム錯体は癌の診断薬として使用することもできる。

例えば、イリジウム錯体を検体に投与し、検体に生体外から可視光を照射することでりん光を観察することができる。これにより、癌組織を非侵襲的かつ高感度・選択的に可視化できる。また、りん光は画像化できるため、癌検出用のイメージング試薬としても使用できる。

また、イリジウム錯体は、実験動物を用いた癌の研究や癌治療薬の評価などにも使用することができる。

40

【実施例】

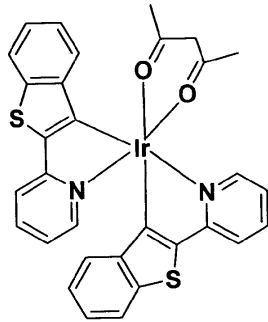
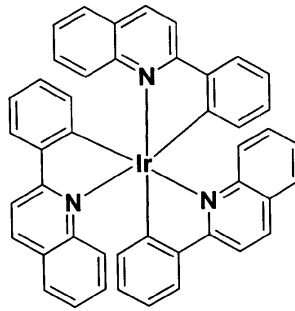
【0014】

以下に実施例を示し、本発明をさらに具体的に説明する。もっとも、本発明は下記実施例に限定されるものではない。

【0015】

イリジウム錯体としては、(btp)₂Ir(acac)、Ir(pq)₃を用いた。

【化4】

BTP₂Ir(acac)PQ₃Ir

(btp)₂Ir(acac)、Ir(pq)₃の合成は、上記文献3,4に従って行った。

【0016】

1 DMPC膜における酸素濃度測定

1-1 DMPC膜の調製

細胞膜のモデルとしてリン脂質DMPC (dimyristoyl-phosphatidylcholine) でできた単層ベシクル (ULV; unilamellar vesicle) を用いた。DMPC単層膜はエタノールインジェクション法を用いて作成した。DMPC膜は温度23 で相転移し、23 以下ではゲル状態、23 以上では液晶状態を取る。実験は、ゲル状態を取る15 と液晶状態を取る35 で行った。

【0017】

(btp)₂Ir(acac)は室温溶液中でりん光寿命が5.5 μsとこれらの化合物の中で最も長く、しかも赤色りん光を与える。りん光量子収率は0.32と他の化合物に比べてやや小さいが、生体組織をプローブするには適していると予想される。そこで、(btp)₂Ir(acac)をプローブ分子としてDMPC膜中における酸素濃度測定を行った。

図1に室温、ジクロロエタン溶液中で測定した(btp)₂Ir(acac)の吸収、りん光スペクトルを示す。(btp)₂Ir(acac)は、485nm付近に基底状態から配位子、*励起一重項状態への遷移による吸収帯を有する。485nmでのモル吸光係数は7500 dm³mol⁻¹cm⁻¹であり、可視部での励起が可能である。りん光は610nmをピークにして、それよりも長波長部に広がっており、皮膚等の生体組織を透過するには青や緑の発光に比べて有利である。

【0018】

1-2 (btp)₂Ir(acac)のDMPC膜中への取り込み

図2に(btp)₂Ir(acac)をTris-HCl:EtOH (95:5, v/v) 溶液に溶かして、励起波長350nmで得られたりん光スペクトル (Ar置換下) と、DMPC膜存在下で得られた(btp)₂Ir(acac)のりん光スペクトル (Ar置換下) を示す。DMPC存在下での試料溶液の溶媒はTris-HCl:EtOH:DM SO(2.85:0.1:0.05, v/v) で、DMPC濃度 1.0 x 10⁻³M, (btp)₂Ir(acac)濃度 1.0 x 10⁻⁵Mである。

図2より、DMPCが存在しないTris-HCl:EtOH溶液中では、(btp)₂Ir(acac)のりん光強度は非常に弱く、りん光寿命も35 で96nsと極めて短い。一方、DMPC膜存在下ではりん光強度が著しく増大し、620nmにピークをもつ強い赤色発光を与えた。DMPC膜存在下では、りん光寿命も著しく増大し、5.25 μs (35)、5.55 μs (15)となった。

DMPC膜存在下では、Tris-HCl:EtOH溶液中のような短寿命のりん光成分が見られないことから、(btp)₂Ir(acac)は効率良くDMPC膜中の疎水性部位に取り込まれていることが確かめられた。

【0019】

1-3 (btp)₂Ir(acac)のりん光強度に対する溶存酸素の効果

図3に図2のDMPC膜存在下と同様のりん光スペクトルをAr置換溶液、空気飽和溶液、1atm酸素飽和溶液で測定した結果を比較して示す。

Ar置換溶液に比べて溶存酸素存在下では(btp)₂Ir(acac)のりん光強度が著しく減少し、酸素による消光を大きく受けていることが分かる。35 でのこれらの溶液中におけるりん光強度比は、11:1:0.2、15 では5.8:1:0.2であった。

10

20

30

40

50

これらの溶液にブラックライト (365nm) の光を照射したときに得られた発光画像を図 4 に示す。酸素が溶解していない条件下では赤色りん光がはっきり目視できるが、酸素存在下では発光強度が著しく低下している。

【 0 0 2 0 】

1-4 (btp)₂Ir(acac) のりん光寿命に対する溶存酸素の効果

酸素によるりん光消光を定量的に解析するため、(btp)₂Ir(acac) のりん光減衰をAr置換溶液、空気飽和溶液、1atm酸素飽和溶液で測定した。

図 5 にりん光寿命をStern-Volmerの式

【数 1】

$$\frac{\tau_p^0}{\tau_p} = 1 + k_q \tau_p^0 [O_2] \quad (1) \quad 10$$

に従ってプロットした結果を示す。ここで、 τ_p^0 、 τ_p はそれぞれ酸素が存在しないときのりん光寿命、酸素濃度が $[O_2]$ のときのりん光寿命を示す。また、 k_q は酸素によるりん光消光速度定数である。

図 5 のStern-Volmer plotの傾きから35、15における k_q 値はそれぞれ $1.03 \times 10^7 \text{ atm}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 、 $0.34 \times 10^7 \text{ atm}^{-1} \text{ s}^{-1}$ と得られた。

(1)式から

【数 2】

$$[O_2] = \frac{1}{k_q} \left(\frac{1}{\tau_p} - \frac{1}{\tau_p^0} \right) \quad (2) \quad 20$$

の関係が得られるので、りん光寿命 τ_p を測定することにより、(btp)₂Ir(acac)の周囲のミクロ環境の酸素濃度(分圧)を定量することができる。

【 0 0 2 1 】

2 癌細胞中における酸素濃度の可視化

癌細胞 (CHO (Chinese Hamster Ovary)細胞、HeLa細胞、ヒトグリオーマ細胞) を低酸素 (5%O₂) の状態と、通常の状態 (20%O₂) で培養し、(btp)₂Ir(acac) 50 μM (5% DMSO) を取り込ませてから、けい光顕微鏡でりん光を観測した。それぞれの細胞についてのりん光測定結果を図 6 ~ 図 8 に示す。

いずれの癌細胞においても、低酸素状態では通常の状態に比べてより強く明瞭な赤色りん光が観測された。(btp)₂Ir(acac)投与後、4時間でも明瞭な赤色りん光が見られることから、(btp)₂Ir(acac)の細胞に対する毒性は低く、細胞内での安定性も高いことが分かる。

【 0 0 2 2 】

同様の測定を3配位体のIr(pq)₃50 μM (5% DMSO)を用いてCHO細胞、HeLa細胞について行った結果を図 9、図 10 に示す。

(btp)₂Ir(acac)と同様に低酸素で培養した癌細胞において、より強いりん光が見られる

。以上より、(btp)₂Ir(acac)に代表されるイリジウム錯体のりん光を測定することにより、低酸素細胞 (hypoxia) を可視化することができ、さらにFLIM (Fluorescence Lifetime Imaging) 法等の技術を用いてりん光寿命を測定することにより、細胞内や組織の酸素濃度を非侵襲的に定量することができることが示された。

【 0 0 2 3 】

3 癌組織の可視化

図 11 にRAMOS細胞 (リンパ腫) を移植したマウスの尻尾の静脈から(btp)₂Ir(acac) 5% DMSOを50-100 μM投与し、in vivo イメージングシステムMaestro (Krabo社) を用いて発光の経時変化を観測した結果を示す。励起波長は445-490nm、検出波長は580nmである。

投与後5分で円内の腫瘍部のみに $(btp)_2Ir(acac)$ による赤色りん光が観測され、120分後においても観測できた。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。また、60分後からはマウスの膀胱部分でもりん光が確認できたことから、 $(btp)_2Ir(acac)$ は生体内で代謝され、排出されると考えられる。120分後にマウスを解剖しりん光を調べたところ、腫瘍部に加えて肺、肝臓など多数の臓器でりん光が観測された。これは血流停止により各臓器が低酸素状態になったためと考えられる。なお、 $(btp)_2Ir(acac)$ を投与していないコントロールマウスの各臓器では、胃、腸の一部を除き上記環境下ではりん光、けい光は観測できなかった。胃、腸のけい光は餌によるものである。

以上の実験結果が示すように、 $(btp)_2Ir(acac)$ を投与しその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非侵襲的かつ高感度・選択的に可視化できる。

10

【産業上の利用可能性】

【0024】

本発明の酸素濃度検出試薬によれば、生きた細胞や組織中の酸素濃度を非侵襲的に高感度リアルタイムで定量することができ、細胞内酸素濃度定量試薬、低酸素細胞画像化薬などとして有用である。また、癌組織が低酸素状態にあることを利用した癌組織の診断にも利用でき、低酸素腫瘍診断試薬などとしても有用である。

【図面の簡単な説明】

【0025】

【図1】ジクロロエタン中の $(btp)_2Ir(acac)$ の吸収、りん光スペクトル。

20

【図2】DMPC存在下、非存在下の $BTP_2Ir(acac)$ のりん光スペクトル。

【図3】Ar置換溶液、空気飽和溶液、1atm酸素飽和溶液中の $(btp)_2Ir(acac)$ のりん光スペクトル。

【図4】Ar置換溶液(Ar)、空気飽和溶液(aerated)、1atm酸素飽和溶液(O_2)中の $(btp)_2Ir(acac)$ のりん光発光画像(写真)。

【図5】 $(btp)_2Ir(acac)$ のりん光の溶存酸素による消光に対するStern-Volmer plot。

【図6】CHO細胞に取り込まれた $(btp)_2Ir(acac)$ のりん光画像(写真)。

【図7】HeLa細胞に取り込まれた $(btp)_2Ir(acac)$ のりん光画像(写真)。

【図8】ヒトグリオーマ(U-251)細胞に取り込まれた $(btp)_2Ir(acac)$ のりん光画像(写真)。

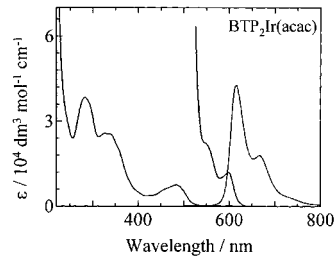
30

【図9】CHO細胞に取り込まれた $Ir(pq)_3$ のりん光画像(写真)。

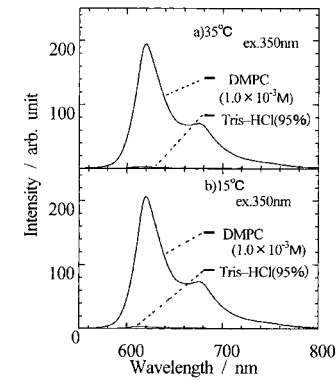
【図10】HeLa細胞に取り込まれた $Ir(pq)_3$ のりん光画像(写真)。

【図11】RAMOS細胞(リンパ腫)を移植したマウスのりん光画像(写真)。上段はネズミの自家蛍光(黄色)とプローブのりん光(赤色)を示し、プローブがリンパ腫に濃縮している様子が観察できる。下段はプローブのりん光のみを示している。左から、コントロール、プローブ投与5分、10分、30分、1時間、2時間。

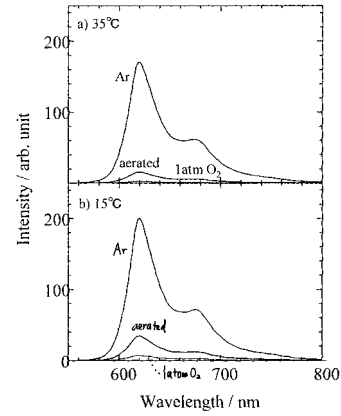
【 図 1 】



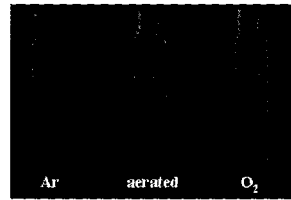
【 図 2 】



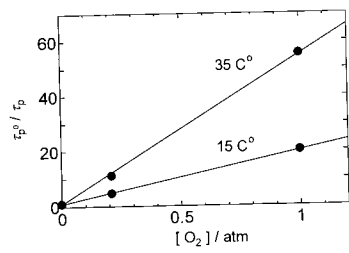
【 図 3 】



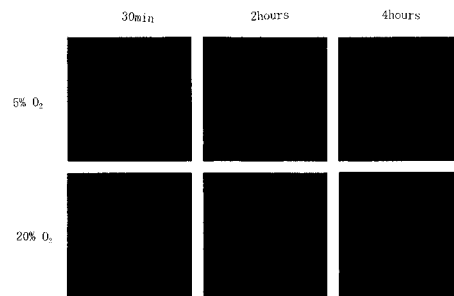
【 図 4 】



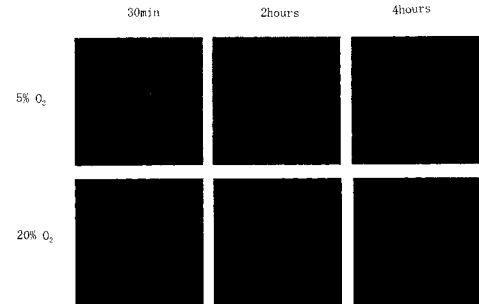
【 図 5 】



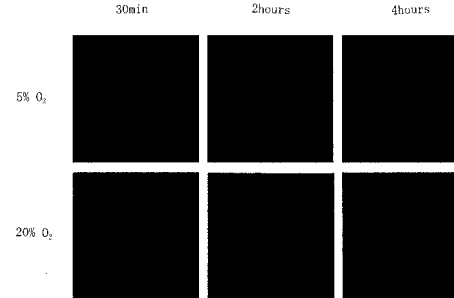
【 図 7 】



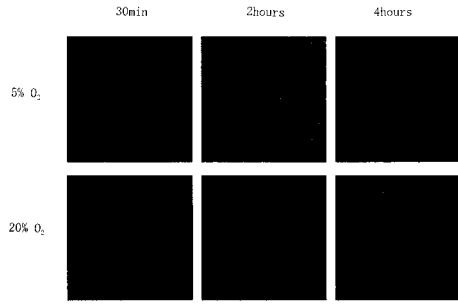
【 図 6 】



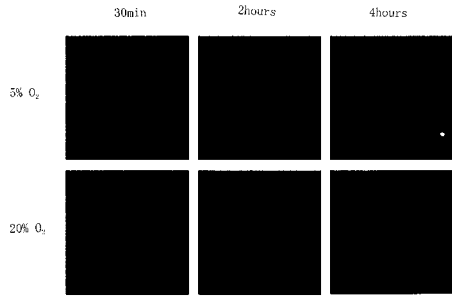
【 図 8 】



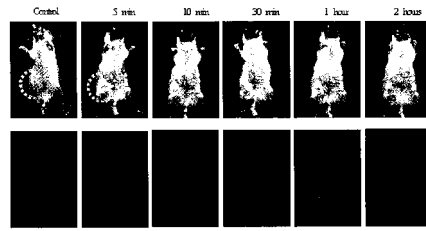
【 9】



【 10】



【 11】



フロントページの続き

- (72)発明者 吉原 利忠
群馬県桐生市天神町一丁目5番1号 国立大学法人群馬大学内
- (72)発明者 竹内 利行
群馬県前橋市昭和町三丁目39番15号 国立大学法人群馬大学内
- (72)発明者 穂坂 正博
群馬県前橋市昭和町三丁目39番15号 国立大学法人群馬大学内

審査官 草川 貴史

- (56)参考文献 特開昭59-170748(JP,A)
特開2002-236118(JP,A)
特開昭62-190445(JP,A)
特表2001-514624(JP,A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

G01N 31/00-31/22
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)
CAplus/REGISTRY/MEDLINE(STN)
PubMed