

## 高分子ミセルを用いたアップコンバージョンによる バイオイメージング技術の開発

### [1] 組織

代表者：川井 秀記

(静岡大学大学院総合科学技術研究所)

対応者：早川 泰弘

(静岡大学電子工学研究所)

分担者：宮地 秀和 (岐阜大学工学部)

### [2] 研究経過

近年、生体中の特定の細胞や組織を、顕微鏡下または目視において高感度に検出するバイオイメージング技術が望まれている。これは、蛍光性色素や緑色蛍光タンパク質 (GFP) といったものを用いて、紫外光や青色といった波長の短い光で励起を行い、緑～黄色などの蛍光を生じるものである。しかしながら、このような励起光は、蛍光分子だけでなく、生体内に多く存在するコラーゲンやアデノシン三リン酸 (ATP) といったものも励起してしまい、蛍光 (自家蛍光) を生じて背景信号となり、区別しにくいという欠点がある。また、生体中には血液成分のヘモグロビンやその他の物質によって、励起光を吸収、散乱させてしまうため、深部における観測は困難である。それに対して、650～900 nm の波長域は、水の吸収もほとんどなく、「生体の窓」といわれ注目されている。この波長域に適したものとして、現在、インドシアニングリーン色素 (ICG) を用いた乳がんセンチネタルリンパ節の生検が行われている。これは、785 nm の光で ICG を励起し、845 nm の近赤外蛍光を生じるものであるが、肉眼では検出できず、特殊なカメラを持ちなければならないという問題点がある。

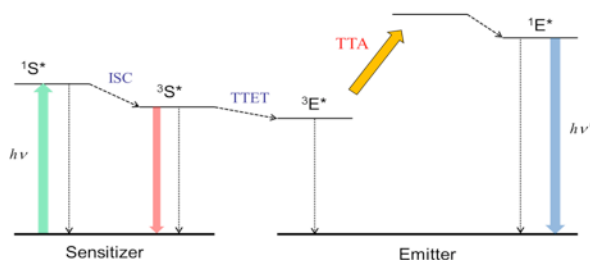


Fig.1 Diagram of the upconversion based triplet-triplet annihilation.

本研究は、これまでの短い波長で励起して長波長の蛍光を生じるイメージングとは全く逆の、生体透過性の高い波長の長い近赤外光で励起し、肉眼で観測できる可視光を生じるという波長変換 (アップコンバージョン) を原理とするものである。その原理を Fig. 1 に示す。まず光増感色素 (Sensitizer : S) が励起され項間交差を経て励起三重項状態 ( $^3S^*$ ) になり、発光色素 (Emitter : E) への三重項-三重項エネルギー移動 (triplet-triplet energy transfer : TTET) によって励起三重項状態の発光色素 ( $^3E^*$ ) が生成する。そして、励起三重項状態の発光色素 ( $^3E^*$ ) が二分子で衝突することにより三重項-三重項消滅 (triplet-triplet annihilation : TTA) を生じ、一方がエネルギーを受け取り励起一重項状態 ( $^1E^*$ ) が生成し発光を生じる。そのために入射光より波長の短い発光を生じさせることが可能である。

また、ドラッグデリバリーシステム (DSS) において、高分子ミセルはその粒径サイズによってがん細胞に蓄積しやすいという EPR 効果 (enhanced permeability and retention effect) が知られている。高分子ミセル中に前述の増感剤と発光剤を導入し、この原理をアップコンバージョンに応用できれば、がん細胞のイメージングが可能になると思われる。

本研究では、これまでにアップコンバージョンが達成できている増感剤、発光剤を用い、高分子ミセルを作製し、アップコンバージョンの発現について検討を行った。

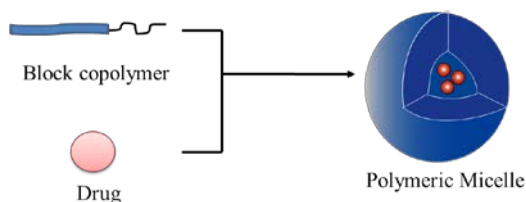


Fig. 2 Dyes doped polymeric micelles.

### [3] 成果

#### (3-1) 研究成果

増感剤としてパラジウムを配位したオクタエチルポルフィリン (PdOEP)、発光剤として 9,10-ジフェニルアントラセン (DPA)、高分子にポリエチレン-ポリ

エチレングリコール共重合体(PE-PEG)を用いた。高分子ミセルは、真空乾燥法と加熱攪拌法を用いて作製した。真空乾燥法は、PE-PEG に有機溶媒に溶解した PdOEP と DPA を加え、真空乾燥によって溶媒を完全に留去した後、精製水を加えて混合し高分子ミセルを作製した。加熱攪拌法は、PdOEP と DPA をクロロホルム溶液とともに溶解させ精製水と混合させた後、超音波処理し懸濁溶液を加熱攪拌し、クロロホルムを蒸発させることにより色素を含む高分子ミセルを作製した。調整した試料を凍結真空脱気により溶存酸素を取り除き、Nd:YAG レーザー (532 nm, CW) で励起し、マルチチャンネル分光器を用いて発光スペクトルを測定した。

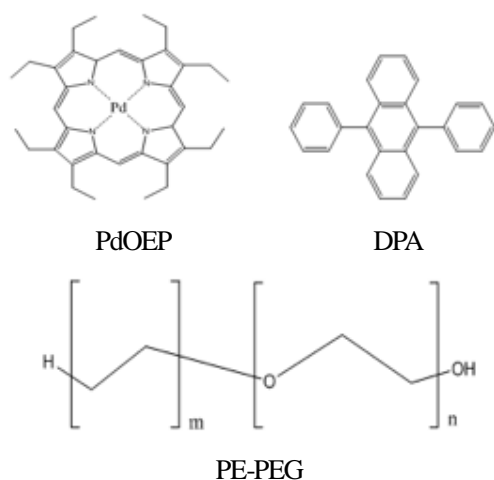


Fig. 3 Chemical structures

真空乾燥法で調整した試料の吸収スペクトルを測定したところ、有機溶媒中に比べて吸収が長波長化（レッドシフト）したことから、高分子ミセル内の疎水部に取り込まれていると考えられる。この試料に 532 nm のレーザーで励起したときの発光スペクトルを、Fig. 4 に示す。670 nm 付近に PdOEP 由来のリン光が観測された。また、DPA を添加すると PdOEP のリン光が減少し、励起光より短波長である 430 nm 付近に DPA 由来の蛍光が生じた。このことから高分子ミセルに取り込まれた PdOEP と DPA 間で TTET と TTA が起こり、アップコンバージョンが生じたことを示している。しかしながら、その発光強度は非常に弱いものであった。

一方、加熱攪拌法で調整した試料での発光スペクトルを、Fig. 5 に示す。Fig. 4 と同様に、670 nm 付近に PdOEP のリン光が観測されるが、430 nm 付近の DPA の蛍光は著しく強くなり、肉眼でも観測できるようになった。この溶液の吸収スペクトルを測定すると、クロロホルム溶液中とほぼ同じピークを生じたことから、高分子ミセル中に溶媒が取り込まれて、

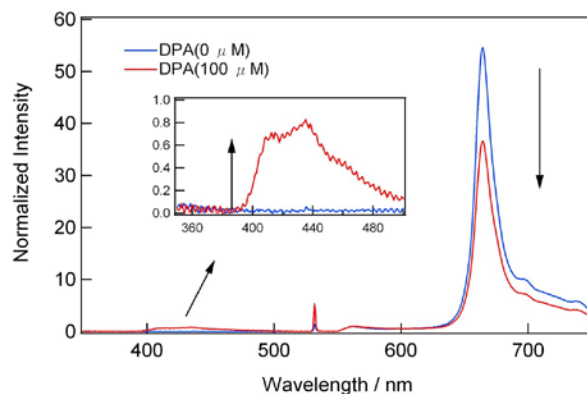


Fig. 4 Emission spectra of PdOEP (10  $\mu$ M) / DPA (100  $\mu$ M) in aqueous solution containing PE-PEG(5 mg/5 ml) excited at 532 nm.

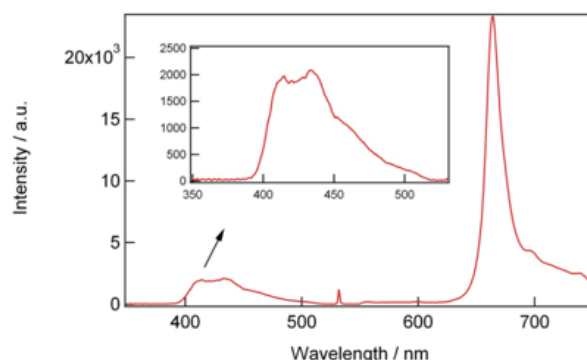


Fig. 5 Emission spectrum of PdOEP (10  $\mu$ M) / DPA (100  $\mu$ M) in aqueous solution containing PE-PEG(5 mg/5 ml) excited at 532 nm.

いると考えられる。そのためミセル内での拡散が生じやすく、結果としてアップコンバージョンが起こったものと考えられる。

### (3-2) 波及効果と発展性など

本研究は、これまでのバイオイメージング技術において、1)自家蛍光を生じさせない、2)「生体の窓」の波長域を利用する、3)目視出来る、といった点を兼ね備えており、これまでとは全く異なった技術である。これが実現できれば、新しいバイオイメージングの技術というだけでなく、がん細胞の *in vivo* 測定などの新しい展開をもたらすものと期待される。

### [4] 成果資料

(1) S. Harada, H. Kawai “Evaluation of up-conversion based on triplet-triplet annihilation in polymeric micelles” The 96th CSJ Annual Meeting, Kyoto (2016, 3, 26)