

平成30年度

博士論文

ビタミンC検出用蛍光プローブの開発：
TEMPOラジカル結合型フタロシアニン

平成30年12月

指導教員 石井和之 教授

東京大学大学院工学系研究科応用化学専攻

石井研究室 147123 横井孝紀

目次

省略名一覧	11
第1章 序論	
1-1 はじめに	14
1-2 ビタミンCの機能	14
1-3 高濃度ビタミンC療法	17
1-4 ビタミンC検出	20
1-5 ビタミンC検出用蛍光プローブ R2c	23
1-6 アルブミンの機能と形成	26
1-7 牛血清アルブミンの構造	26
1-8 本研究の目的	27
参考文献	29
第2章 理論	
2-1 光物理過程	35
2-2 励起子相互作用	36
2-3 円偏光二色性	38
2-4 磁気円偏光二色性	39
2-5 ポルフィリンとフタロシアニンの電子状態	41
2-6 FN プローブの蛍光消光作用	44
2-7 R2c の蛍光消光作用	44

2-8 反応速度論	47
2-8-1 二次反応	47
2-8-1-1 同一分子の反応による二次反応	47
2-8-1-2 異なる分子の反応による二次反応	49
2-8-2 零次反応、一次反応、二次反応の比較	51
2-8-3 擬一次反応	52
2-8-4 逐次反応	53
2-8-4-1 逐次反応 ($k_1 \neq k_2$ の場合)	53
2-8-4-2 逐次反応 ($k_1 = k_2$ の場合)	56
参考文献	59

第3章 親水性置換基を導入した R2c

3-1 緒言	62
3-2 結果と考察	63
3-2-1 R2c について	63
3-2-1-1 R2c の合成	63
3-2-1-2 R2c の光化学的性質	65
3-2-1-3 R2c の電子構造	66
3-2-1-4 R2c の蛍光強度時間変化	68
3-2-1-5 R2c の蛍光強度時間変化の温度依存性	69
3-2-2 リポソーマル R2c について	70
3-2-2-1 リポソーマル R2c の合成	70
3-2-2-2 リポソーマル R2c の粒度分布	71
3-2-2-3 リポソーマル R2c のゼータ電位	72

3-2-2-4	リポソーマル R2c の光化学的性質	73
3-2-2-5	リポソーマル R2c の蛍光強度時間変化	74
3-2-3	R2cS ₁ について	75
3-2-3-1	R2cS ₁ の合成	75
3-2-3-2	R2cS ₁ の同定	76
3-2-3-3	R2cS ₁ の電子吸収スペクトル	77
3-2-3-4	R2cS ₁ の MCD スペクトル	78
3-2-4	リポソーマル R2cS ₁ について	79
3-2-4-1	リポソーマル R2cS ₁ の合成	79
3-2-4-2	リポソーマル R2cS ₁ の蛍光強度時間変化	80
3-3	実験	
3-3-1	電子吸収スペクトルの測定	82
3-3-2	蛍光スペクトルの測定	82
3-3-3	蛍光強度時間変化の測定	82
3-3-4	イソインドリンの合成	82
3-3-5	SiPc の合成	83
3-3-6	R2c の合成	83
3-3-7	リポソーマル R2c の合成	83
3-3-8	SiPcS ₁ の合成	83
3-3-9	R2cS ₁ の合成	84
3-3-10	リポソーマル R2cS ₁ の合成	84
3-3-11	ビタミン C の純度の確認	84
3-4	付録	
3-4-1	スルホ基置換体 SiPcS _n について	85

3-4-2	SiPcS ₁ の質量分析	86
3-4-3	R2cS ₁ の質量分析	88
3-4-4	SiPc の分子軌道	90
3-4-5	SiPcS ₁ の分子軌道	91
	参考文献	92
第4章 R2c と牛血清アルブミン (Bovine serum albumin、BSA) の複合化		
4-1	緒言	94
4-2	結果と考察	94
4-2-1	R2c と BSA の複合体合成	94
4-2-2	R2c と BSA の複合体同定	96
4-2-2-1	複合体のサイズ排除クロマトグラフィー	96
4-2-2-2	複合体の円偏光二色性	99
4-2-2-3	複合体の ESR	100
4-2-2-4	複合体の蛍光測定	101
4-2-3	R2c と BSA の複合体の測定	102
4-2-3-1	複合体の粒経分布	102
4-2-3-2	複合体の電気泳動	103
4-2-4	R2c@(BSA) ₂ のビタミン C 蛍光検出	104
4-2-5	R2c@(BSA) ₂ のビタミン C 検出の最適条件の検討	105
4-2-5-1	R2c@(BSA) ₂ の pH 依存性	105
4-2-5-2	R2c@(BSA) ₂ のイオン強度依存性	107
4-2-5-3	R2c@(BSA) ₂ の温度依存性	108
4-2-6	R2c@(BSA) ₂ の濃度依存性	109

4-2-7	R2c@(BSA) ₂ のビタミン C 蛍光検出の解析	110
4-2-8	Runge-Kutta 法による蛍光強度時間変化の解析	124
4-2-9	蛍光プローブの反応メカニズム解析	126
4-2-10	BSA モノマーとダイマーの疎水性空間の計算	127
4-2-11	BSA ダイマーの R2c 取り込み量	129
4-2-12	R2c@(BSA) ₂ の安定性	132
4-2-13	R2c@(BSA) ₂ のビタミン C 選択性	133
4-2-14	牛血清中ビタミン C 蛍光検出	134
4-2-15	マウス中ビタミン C 蛍光バイオイメージング	135
4-2-15-1	R2c@(BSA) ₂ のマウス中ビタミン C 蛍光バイオイメージング	136
4-2-15-2	R2c@(BSA) ₂ のマウス中ビタミン C 蛍光バイオイメージングの解析	137
4-2-15-3	リポソーマル R2c のマウス中ビタミン C 蛍光バイオイメージング	143
4-2-16	蛍光プローブの生体内での安定性	144
4-2-16-1	R2c@(BSA) ₂ の生体内での安定性	144
4-2-16-2	R2c@(BSA) ₂ へビタミン C 投与後の 生体内での安定性 (1 日目)	145
4-2-16-3	R2c@(BSA) ₂ へビタミン C 投与後の 生体内での安定性 (2 日目)	146
4-2-16-4	リポソーマル R2c の生体内での安定性	147
4-2-16-5	リポソーマル R2c へビタミン C 投与後の 生体内での安定性 (1 日目)	148

4-2-16-6	リポソーマル R2c へビタミン C 投与後の 生体内での安定性 (2 日目)	149
4-2-17	マウス中に静脈投与したビタミン C の定量	150
4-2-18	R2c@(BSA) ₂ のヒトへの応用について	151
4-2-19	R2c@(BSA) ₂ の毒性について	152
4-2-20	R2c@(BSA) ₂ のマウスによる排泄について	152
4-3	実験	
4-3-1	R2c と BSA の複合体 R2c@(BSA) ₂ の合成	153
4-3-2	R2c@(BSA) ₂ のサイズ排除クロマトグラフィー	153
4-3-3	R2c@(BSA) ₂ 、R2c@TX、リポソーマル R2c の水溶液中 ビタミン C 蛍光検出の比較	153
4-3-4	R2c@(BSA) ₂ の水溶液中ビタミン C 蛍光検出	153
4-3-5	R2c@(BSA) ₂ の血清中ビタミン C 蛍光検出	153
4-3-6	マウスについて	154
4-3-7	蛍光バイオイメージング用 R2c@(BSA) ₂ 水溶液の調整	154
4-3-8	R2c@(BSA) ₂ を用いたマウス中蛍光バイオイメージング	154
4-3-9	蛍光バイオイメージング用リポソーマル R2c 水溶液の調整	155
4-3-10	リポソーマル R2c を用いたマウス中蛍光イメージング	155
4-3-11	マウス中に投与されたビタミン C の定量	155
4-3-12	ビタミン C の純度の確認	155
4-4	付録	
4-4-1	R2c@(BSA) ₂ を用いた蛍光強度時間変化の解析	156
4-4-1-1	R2c@(BSA) ₂ を用いた蛍光強度時間変化の フィッティング R2c ₀ の関数	157

4-4-1-2	速度定数 $k_1 \neq k_2$ の時の関数	158
4-4-1-3	速度定数 $k_1 = k_2$ の時の関数	159
4-4-2	酸性条件下 (pH 3) での R2c@(BSA) ₂ の安定性	160
4-4-3	水溶液中と牛血清中でのビタミン C 蛍光検出の比較	161
4-4-4	HeLa 細胞のビタミン C 取り込み	162
4-4-5	マウス中蛍光バイオイメージング	163
4-4-5-1	R2c@(BSA) ₂ のマウス中蛍光バイオイメージング (ビタミン C 投与)	163
4-4-5-2	R2c@(BSA) ₂ のマウス中蛍光バイオイメージング (ビタミン C 投与なし)	164
4-4-5-3	R2c@(BSA) ₂ のマウス中蛍光バイオイメージング (ビタミン C 投与、背面)	165
4-4-5-4	R2c@(BSA) ₂ のマウス中蛍光バイオイメージング (ビタミン C 投与なし、背面)	166
4-4-5-5	リポソーマル R2c のマウス中蛍光イメージング (ビタミン C 投与)	167
4-4-5-6	リポソーマル R2c のマウス中蛍光イメージング (ビタミン C 投与なし)	168
4-4-2-7	リポソーマル R2c のマウス中蛍光イメージング (ビタミン C 投与、背面)	169
4-4-2-8	リポソーマル R2c のマウス中蛍光イメージング (ビタミン C 投与なし、背面)	170
4-4-2-9.	R2c@(BSA) ₂ を用いた解剖したマウス臓器の 蛍光イメージング (ビタミン C 投与)	171

4-4-2-10	R2c@(BSA) ₂ を用いた解剖したマウス臓器の 蛍光イメージング (ビタミン C 投与なし)	172
4-4-2-11	リポソーマル R2c を用いた解剖したマウス臓器の 蛍光イメージング (ビタミン C 投与)	173
4-4-2-12	リポソーマル R2c を用いた解剖したマウス臓器の 蛍光イメージング (ビタミン C 投与なし)	174
4-4-3	蛍光プローブの生体内での安定性	175
4-4-3-1	R2c@(BSA) ₂ の生体内での安定性	175
4-4-3-2	R2c@(BSA) ₂ へビタミン C 投与後の生体内安定性 (1 日目)	176
4-4-3-3	R2c@(BSA) ₂ へビタミン C 投与後の生体内安定性 (2 日目)	177
4-4-3-4	リポソーマル R2c の生体内での安定性	178
4-4-3-5	リポソーマル R2c へビタミン C 投与後の生体内の 安定性 (1 日目)	179
4-4-3-6	リポソーマル R2c へビタミン C 投与後の生体内の 安定性 (2 日目)	180
	参考文献	181
第五章 フタロシアニン誘導体と BSA の複合化の解析		
5-1	緒言	185
5-2	結果と考察	185
5-2-1	ZnPc と BSA の複合体合成	185
5-2-2	複合体のサイズ排除クロマトグラフィー	187

5-2-3	(ZnPc) _n @(BSA) ₂ の光物性	190
5-2-4	(ZnPc) _n @(BSA) ₂ と (ZnPc-PPh ₃) _n @(BSA) ₂ の CD スペクトル	195
5-2-5	BSA のプローブへの応用	195
5-3	実験	
5-3-1	ZnPc と BSA 複合体 (ZnPc) _n @(BSA) ₂ の合成	198
5-3-2	ZnPc-PPh ₃ と BSA 複合体 (ZnPc-PPh ₃) _n @(BSA) ₂ の合成	198
5-3-3	PtTPP と BSA 複合体 PtTPP@(BSA) ₂ の合成	198
5-3-4	電子吸収スペクトルの測定	198
5-3-5	蛍光スペクトル測定	198
5-3-6	CD スペクトルの測定	198
5-3-7.	Sephadex G-100 のサイズ排除クロマトグラフィー	199
5-3-7.	Superdex 200 のサイズ排除クロマトグラフィー	199
5-4	付録	
5-4-1	ZnPc と BSA オリゴマー複合体のサイズ排除 クロマトグラフィー (Sephadex G-100)	200
5-4-2	ZnPc と BSA オリゴマー複合体のサイズ排除 クロマトグラフィー (Superdex 200)	202
	参考文献	205
	第六章 総括	207
	化合物一覧	210
	研究業績	216
	謝辞	218

省略名一覽

Abs	Absorbance
BSA	Bovine serum albumin
CD	Circular dichroism
DDS	Drug delivery system
DFT	Density functional theory
DPPC	Dipalmitoylphosphatidylcholine
EPR	Enhanced permeation and retention effect
ESI-MS	Electrospray ionization- mass spectrometry
ESR	Electron spin resonance
FN	Fluorophore- nitroxide radical
ISC	Intersystem crossing
MCD	Magnetic circular dichroism
NMR	Nuclear magnetic resonance
PBS	Phosphate buffered saline
Pc	Phthalocyanine
PDT	Photodynamic therapy
Por	Porphyrin
PPh ₃	Triphenylphosphine
PTT	Photothermal therapy
PtTPP	Platinum tetraphenylporphyrin
R1c	SiPc-TEMPO
R2c	SiPc-(TEMPO) ₂

R2c ₀	Two-electron reduced form of R2c
R2c ₁	One-electron reduced form of R2c
R2cS ₁	Sulfonated R2c
RP-TLC	Reversed phase-thin-layer chromatography
SiPc	Silicon phthalocyanine
SiPcS ₁	Sulfonated silicon phthalocyanine
SiPcS ₂	2-Sulfonated silicon phthalocyanine
SiPcS ₃	3-Sulfonated silicon phthalocyanine
SiPcS ₄	4-Sulfonated silicon phthalocyanine
TD-DFT	Time-Dependent-density functional theory
TEMPO	2,2,6,6-tetramethylpiperidine 1-oxyl
TEMPOL	4-hydroxy-2,2,6,6-tetramethylpiperidine 1-oxyl
THF	Tetrahydrofuran
TLC	Thin-layer chromatography
VC	Vitamin C
ZnPc	Zinc phthalocyanine

第 1 章

序論

第1章 序論

1-1. はじめに

必須栄養素の一つであるビタミン C は、生体内で多様な機能を示す。例えば、抗酸化作用、アミノ酸合成、免疫システムの活性化等である。また最近では、高濃度のビタミン C を点滴で投与するガン治療法（高濃度ビタミン C 療法）が報告され、非常に注目を集めている。しかし、投与されたビタミン C が、“どの臓器に分布しやすく、高い抗ガン作用が得られるか”については未解明である。このため、効果的なガン治療を行うためこの解明が強く望まれている。そこで、本研究では、高感度なビタミン C 検出用蛍光プローブの開発を行い、生体内に投与されたビタミン C の分布解明を目的とした。

第1章では、ビタミン C の生体内機能、及び高濃度ビタミン C 療法のメカニズム等の説明を行い、ビタミン C 検出の有効な候補とされるニトロキシドラジカルと蛍光色素を組み合わせた FN プローブについて概観を述べる。特に、①励起光・蛍光の波長が生体組織透過性が高い 650 nm 以上であること、②ニトロキシドラジカルは様々な酸化還元物質との反応から保護されながらもビタミン C とは効率良く反応すること、これらの条件を唯一満たす蛍光プローブ R2c に焦点を当てている。

1-2. ビタミン C の機能^{1,2}

ビタミンと呼ばれる物質は 13 種類存在するが、ビタミン様物質と呼ばれるビタミンと類似の機能を有する分子が存在する。ビタミンとビタミン様物質は以下の条件で分類されている。

- (1) ヒトの体内で合成できない
- (2) 必要量は微量でも、生体機能を維持する上で重要
- (3) 不足すると欠乏症が生じる

ビタミン様物質は、ビタミン P (フラボノイド)、ビタミン Q (コエンザイム Q10)、ビタミン U (キャベジン) 等がよく知られており、抗酸化作用を有するものが存在するため化粧品などでよく目にする。

また、ビタミンは水溶性と脂溶性の分子が存在する¹。水溶性のビタミンにはビタミン B₁、B₂、B₆、B₁₂、及びビタミン C 等が含まれ、脂溶性のビタミンにはビタミン A、D、E、K 等が含まれる。水溶性のビタミンの余剰分は尿として排泄されるが、脂溶性のビタミンは体内で蓄積することができる。

ビタミンの中でも最初に化学構造が決定され(図 1-1)、合成に成功した分子がビタミン C (アスコルビン酸) である。ビタミン C は不斉炭素原子を持つため、光学異性体を有しているが、生体内で機能を発現するビタミン C は L 体 (L-アスコルビン酸) のみである。

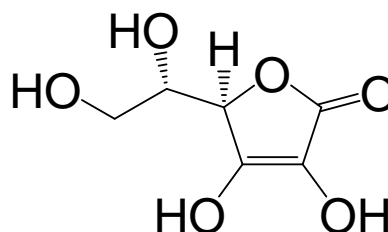


図 1-1、ビタミン C の構造

水溶液中でビタミン C は、エンジオール基の 3 位の炭素の水酸基からプロトンを放出して、アスコルビン酸モノアニオンを形成する ($pK_1=4.25$)。また、3 位だけでなく 2 位のプロトンも放出したアスコルビン酸ジアニオンとしても存在する ($pK_2=11.34$) (図 1-2)。このため、生体内のような pH が中性の条件下では、ほとんどのビタミン C はアスコルビン酸モノアニオンの形で存在する²。

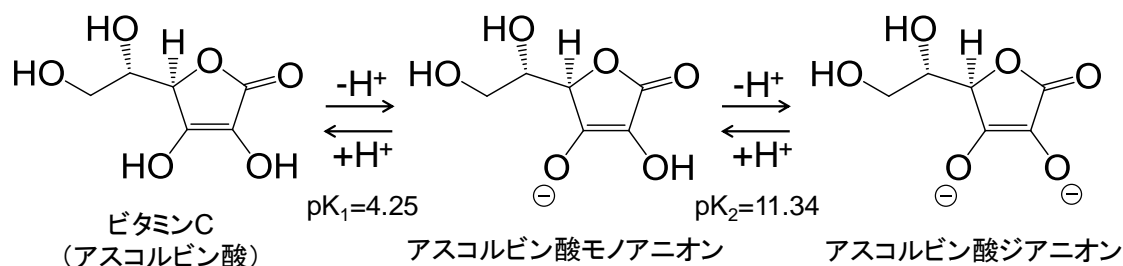


図 1-2、水溶液中ビタミン C

ビタミン C は多様な生体内機能を有しており、抗酸化作用、アミノ酸合成、カルニチン合成、免疫システムの活性化が知られている。特に、抗酸化作用は生体内の酸化ストレス低減に働くため非常に重要である。酸化ストレスは、活性酸素やフリーラジカルと抗酸化物質のバランスで構成されるもので、酸化ストレスが高い活性酸素種優勢の状態は、様々な疾病発症の原因になると言われている。活性酸素種は、三重項状態をとる酸素 (3O_2) が励起状態となった一重項酸素 (1O_2)、還元分子種のスーパーオキシド ($O_2^{\cdot-}$)、過酸化水素 (H_2O_2)、ヒドロキシルラジカル ($HO\cdot$) が含まれる。通常的环境下では、ヒトが呼吸することで酸素から生成される活性酸素は 1% 以下である³。しかし、このわずかな活性酸素が細胞や DNA を酸化し、様々な疾病の原因となる。一方、フリーラジカルは不対電子をもつ常磁性の分子である。通常分子は全ての電子が対になった反磁性を示し、安定に存在しているが、フリーラジカルは不対電子をもつことで反応性が高く不安定である⁴。活性酸素の中でも、不対電子を持つスーパーオキシド、ヒドロキシルラジカルもフリーラジカル的一种である。また、一酸化窒素 (NO) や、脂質ペルオキシド ($LOO\cdot$) などもフリーラジカルに含まれる。これらから生体を守り、健康を維持するのが抗酸化物質で、ビタミン C、ビタミン E (α -トコフェロール)、ビタミン Q (コエンザイム Q10、ユビキノン) がよく知られている。ビタミン C は水溶性で細胞質や細胞外液に存在し、細胞膜外で発生した活性酸素やフリーラジカルに作用する。一方、ビタミン E は脂溶性で、細胞膜中で発生した活性酸素やフリーラジカルに作用する。細胞膜内の酸化ストレスを低減させる場合、水溶性のビタミン C が作用することは困難だが、脂溶性のビタミン E を活性化することでフリーラジカル等を消去できる (図 1-3)⁵。

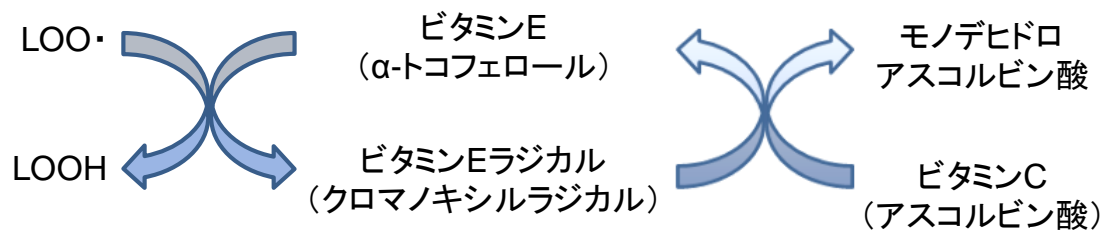


図 1-3、ビタミン C によるビタミン E の活性化

ビタミン C は生体内で特に高い抗酸化作用を示す分子である。血液中に存在するフリーラジカルに対し、ビタミン C の反応速度は最も早く、続いてチオール基 (-SH) ビリルビン、尿酸、 α -トコフェロールの順であることが報告されている⁶。このため、酸化ストレスからの生体防御において、ビタミン C は非常に重要な分子である。

ビタミン C は、高い還元力を有しており、二段階で電子を放出する二電子還元を行う分子である (図 1-4)²。ビタミン C がフリーラジカル等と反応するとモノデヒドロアスコルビン酸ラジカルを生じ、すぐにモノデヒドロアスコルビン酸を形成する。これらは不対電子を持つ常磁性の分子である。ラジカルを持つ状態は非常に不安定で、安定化するため二分子のモノデヒドロアスコルビン酸が不均化反応を起こすことで、デヒドロアスコルビン酸とアスコルビン酸モノアニオンを生じる。このため、実際にはモノデヒドロアスコルビン酸の状態ではほとんど存在できないため、モノデヒドロアスコルビン

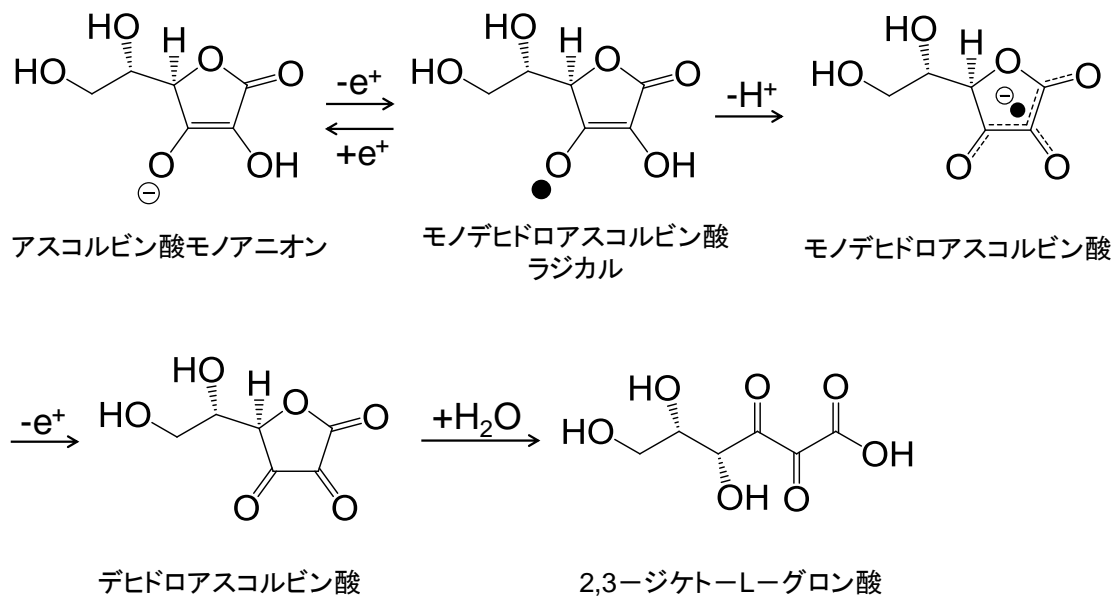
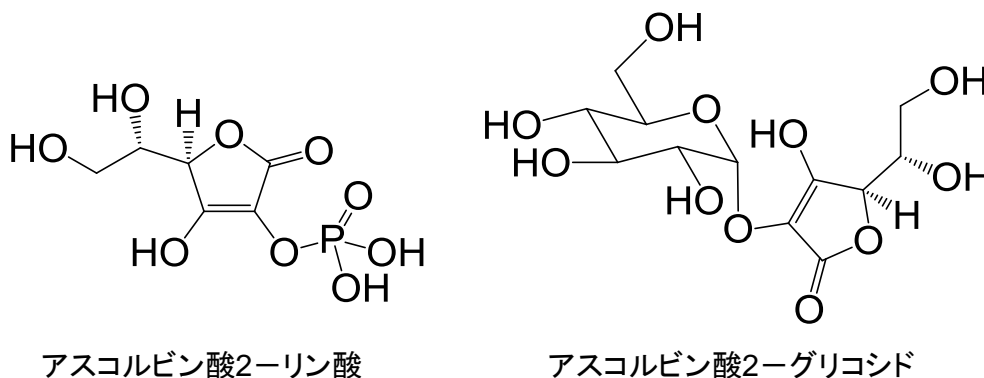


図 1-4、ビタミン C の反応

酸から生じたアスコルビン酸モノアニオンが一電子還元を行い、デヒドロアスコルビン酸を生じる。さらに、デヒドロアスコルビン酸は加水分解を生じてラクトン環を開いた2,3-ジケト-L-グルロン酸を生じる²。デヒドロアスコルビン酸は生体内で還元反応により、ビタミンCに再生することができるが、2,3-ジケト-L-グルロン酸はデヒドロアスコルビン酸へ再生することはできない。ビタミンCはこのような還元反応を生体内で行い、その結果として抗酸化作用が生じる。

この抗酸化作用はアンチエイジングや食品の保全にも有効であるため、サプリメントや化粧品、食品添加物等によく用いられている。しかし、ビタミンCは高い反応性を持つ一方で、安定性が低く、長期保存に向いていない。化粧品等に利用する際、これを改善したより安定な各種ビタミンC誘導体が合成されている。例えば、2位の炭素に水酸基にリン酸を結合させたアスコルビン酸2-リン酸や、グルコースを結合させたアスコルビン酸2-グリコシド等である(図1-5)²。これらのビタミンC誘導体は、反応性の高い水酸基に置換基を付加することで、そのままではほとんど反応せず、ビタミンCの還元性を発現しないが、体内で加水分解されることでビタミンC由来の還元作用を示す。これらのようなビタミンC誘導体は、付加する置換基により、水溶性、脂溶性の特性も付加することができる。このため、ビタミンC誘導体は目的に応じ、水溶性ビタミンC誘導体、脂溶性ビタミンC誘導体、水溶性と脂溶性を併せ持つビタミンC誘導体が開発されている。



アスコルビン酸2-リン酸

アスコルビン酸2-グリコシド

図1-5、ビタミンC誘導体

1-3. 高濃度ビタミンC療法²

ビタミンCは、抗酸化作用などの機能が良く知られているが、最近ではガン治療にも有効であることが報告され非常に注目を集めている⁷⁻¹¹。この抗ガン作用は、二度ノーベル賞を受賞し、量子化学や生化学の分野で著名なアメリカ合衆国のライナス・カール・ポーリング博士によって提唱された。ポーリング博士はスコットランドの外科医ユアン・キャメロン医師とビタミンCを用いたガン治療の臨床研究を行っていた。ポーリング博士らは、ガン患者の血液中ビタミンC濃度が低下していることに着目し、ビタミンC低下がガンに対する抵抗力を低下させていると考えた。そこで、低下したビ

ビタミン C を補完することでガンに対する抵抗力を改善できると予想した。これを検証するため、ポーリング博士らは末期のガン患者に対し、ビタミン C を点滴と経口の両方で投与する臨床研究を行った。1976年に報告された研究では、100人のガン患者に対し、初めの10日間ビタミン C を毎日10g点滴で投与し、その後はビタミン C を毎日10g経口で投与した⁹。ビタミン C を投与していない1000人の末期のガン患者と比較したところ、投与していないガン患者の平均生存に数が50日であったのに対し、投与したガン患者は平均生存日数が210日と生存期間が4.2倍に向上した。さらに、1978年にもポーリング博士らは100人の末期のガン患者に同様にビタミン C を投与し、1000人の一般的なガン治療を行ったガン患者と比較した¹⁰。この結果、ビタミン C を投与したガン患者は平均生存日数が6倍程度まで向上したことが報告されている。

しかし、この臨床研究の結果は、アメリカのメイヨークリニックのチャールズ・メーテル博士らによって否定された。メーテル博士らは、ビタミン C を経口のみから投与する臨床試験、プラセボ対照試験等を行ったが、ビタミン C による抗ガン作用は観測できなかった。この結果をまとめたビタミン C による抗ガン作用を否定する論文が1979年と1985年に報告されている^{12,13}。これらの報告により、ビタミン C による抗ガン作用は評判を大きく落としてしまった。

2005年、アメリカ合衆国の国立衛生研究所 (NIH)、国立がんセンター (NCI)、食品医薬品局 (FDA) の研究者によって高濃度のビタミン C が選択的にガン細胞を破壊することが見出され、高濃度のビタミン C の点滴がガン治療に有用であることを示唆する論文を報告した¹⁴。これによりビタミン C の抗ガン作用が再認識されるようになった。その後の研究で、経口投与では血液中のビタミン C 濃度が0.2 mM程度までしか上昇せず、過剰量は排泄されてしまうのに対し、静脈投与することで血液中のビタミン C 濃度が10 mM以上にまで上昇することが明らかとなった¹⁵⁻¹⁹。

NIHにより、高濃度のビタミン C を投与することで、正常細胞には無害でありながら、ガン細胞を選択的に破壊できることが報告された (図1-6)。このガン治療法を高濃度ビタミン C 療法と言い、薬理的濃度 (0.3~10 mM) のビタミン C を点滴投与することでほとんど副作用も生じないため、新しい有用なガン治療法として広がりつつある。

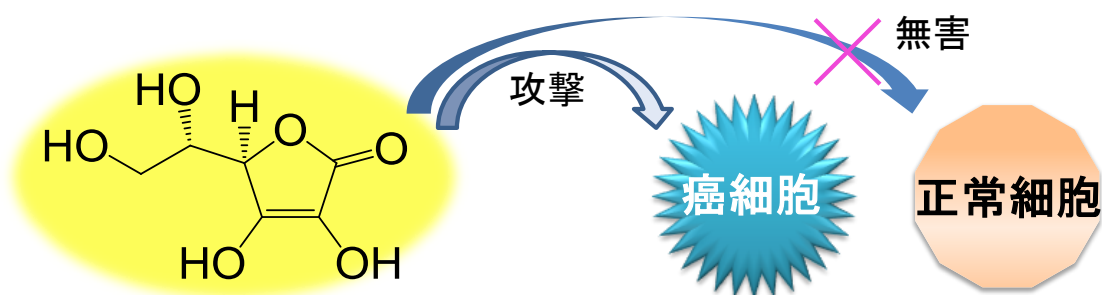


図1-6、ビタミン C の抗ガン作用

高濃度ビタミン C 療法はアメリカの国際人間機能改善センター (The center for the Improvement of human functioning international) では既に 3 万件以上の実施例があり、肺ガン、膵臓ガン、悪性リンパ腫等に施行した臨床研究が多数報告されている。この治療法では副作用による死亡例もないとされ非常に有用である。また、投与されたビタミン C により得られる効果は、抗ガン作用だけではなく、ガン患者の痛みの緩和、倦怠感の改善、食欲向上、不眠の改善にも効果があり、免疫システムの活性化にも作用されている²⁰⁻²²。高濃度ビタミン C 療法は、化学療法でありながら免疫力も高めることができるこれまでにない治療法として提案され、研究が行われている¹⁴⁻²²。

ビタミン C による選択的なガン細胞への攻撃は過酸化水素の発生によるものと報告されている¹⁴⁻¹⁷。ビタミン C を投与することで、過酸化水素 (H_2O_2) が発生するが、ガン細胞は正常細胞に比べ、この過酸化水素を分解するのに必要なカタラーゼやグルタチオンペルオキシダーゼなどの量が少ないことが知られている^{23,24}。このため、高濃度のビタミン C 投与で発生した過酸化水素を正常細胞は無害化できるが、ガン細胞は無害化しきれず破壊される。以下に、生体内でビタミン C によって過酸化水素が生成するメカニズムを詳細に示す (図 1-7)¹⁴⁻¹⁷。静脈から投与されたビタミン C は、生体内の中性条件下において、主にモノデヒドロアスコルビン酸アニオンの状態をとっている。

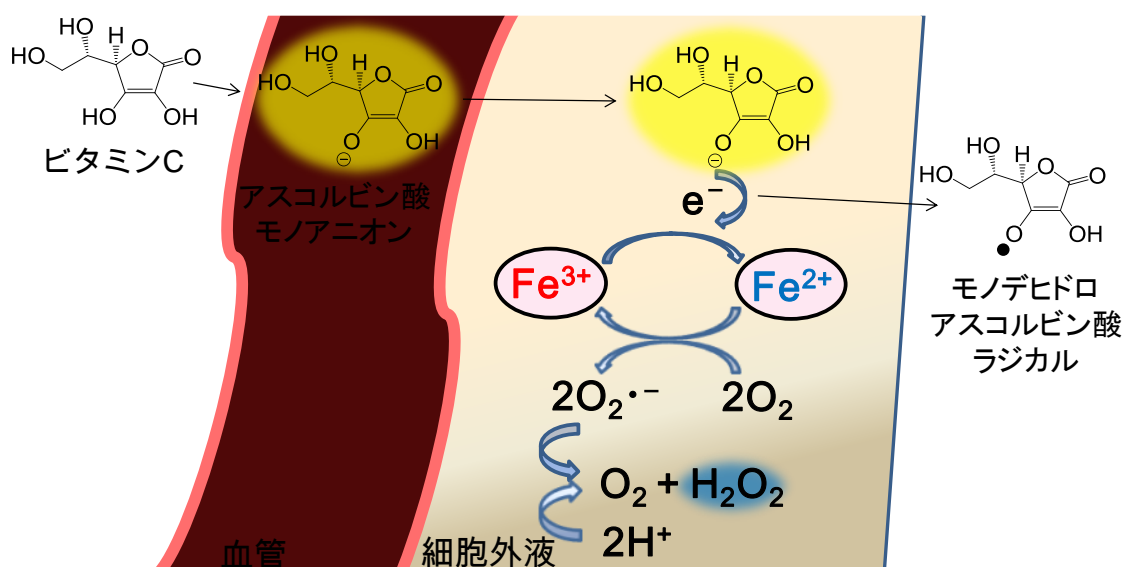


図 1-7、高濃度ビタミン C 療法メカニズム

これが血液中または細胞外液に侵入し、モノデヒドロアスコルビン酸が微量に存在する Fe^{3+} を一電子還元し、モノデヒドロアスコルビン酸ラジカルと Fe^{2+} を生成する。この Fe^{2+} が電子供与体として機能し、溶存酸素からスーパーオキシドラジカル ($O_2^{\cdot-}$) はスーパーオキシドジスムターゼ (SOD) により不均化反応を生じ、過酸化水素と酸素が生成す

る。ここで、生じた過酸化水素が、カタラーゼやグルタチオンペルオキシダーゼなどが少ないガン細胞では分解しきれず、最終的にガン細胞が破壊される。

近年では高濃度ビタミン C 療法単体だけでなく、他のガン治療法と併用して用いられることもある。

1-4. ビタミン C 検出

高濃度ビタミン C 療法は非常に有用であるが、生体内に投与されたビタミン C の挙動は明らかにされていない。このため、効果的なガン治療を行うためその解明が強く望まれている。

ビタミン C の検出、及び定量に関してこれまで様々な研究が行われている。例えば、HPLC-電気化学検出法 (ECD) がよく利用されている²⁵⁻²⁸。その他には、HPLC-UV、ヒドラジン法、インドフェノール法、酵素法、電気化学測定法などが用いられている²⁹⁻³¹。また、ビタミン C により還元されるプルシアンブルーの吸光度の減少をモニターする方法等も報告されている³²。しかし、これらの方法には、前処理や、測定に時間がかかる、感度が低いなどの課題がある。

蛍光バイオイメージングは、リアルタイム・高感度・高解像度・非侵襲的に生体内の物質を検出することができる有用な手段である。例えば、蛍光消光作用を持つニトロキシドラジカルと色素を結合させた分子系 (FN プローブ) は、ビタミン C 検出用蛍光プローブの有力な候補と考えられている。図 1-8 に示されるような、ニトロキシドラジカルを有する TEMPO ラジカルがビタミン C と反応し、ラジカルを消失することで消光作用を失い蛍光強度が増大する。一般的に、この蛍光消光作用は光誘起電子移動により生じると言われている。

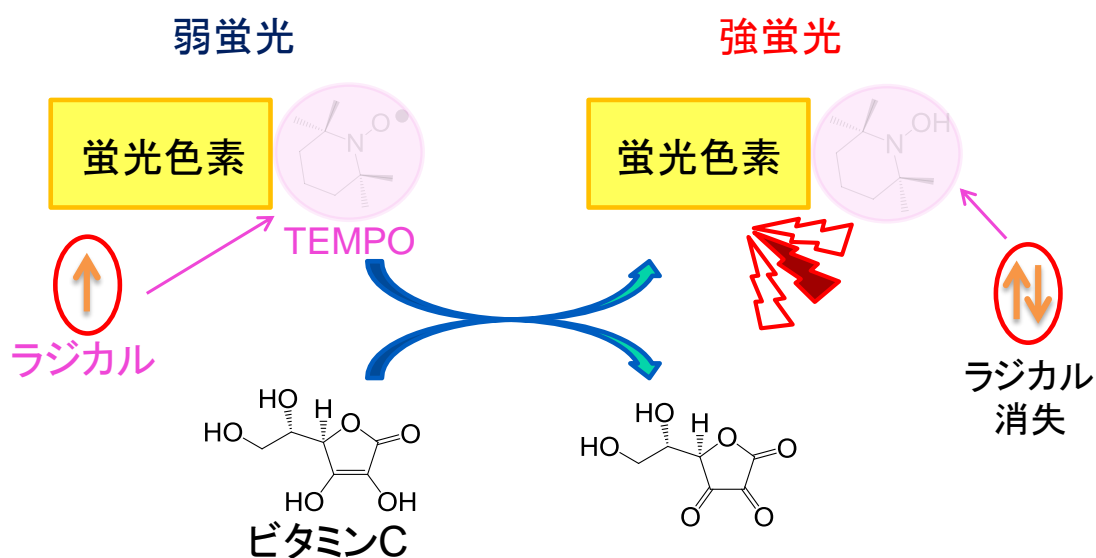


図 1-8、FN プローブとビタミン C の反応

投与したビタミン C の生体内分布を観測するには、初めに蛍光プローブを投与し、続いてビタミン C を投与、最後に蛍光画像を測定するという手順を取る必要がある。先にビタミン C を投与してしまうと、生体内に存在する活性酸素種とビタミン C の反応等が生じ、投与したビタミン C の生体内分布を反映したイメージングではなく、ビタミン C で変化した生体内のレドックス状態のイメージングを行うことになってしまう。また、ビタミン C の蛍光イメージングを行う際、①励起光・蛍光の波長が生体組織透過性が高い 650 nm 以上であること、②ニトロキシドラジカルは様々な酸化還元物質との反応から保護されながらもビタミン C とは効率良く反応すること等の条件を満たす必要がある。

これまでに、様々な FN プローブが報告されており、水溶液中だけでなく生体内でのビタミン C の検出及び定量を目的に多様な研究が行われている³³⁻⁴⁵。しかし、これまで報告されたほとんどの分子がビタミン C の蛍光イメージングに必要な上記二つの条件を満たしていない。例えば、図 1-9 の FN プローブは水溶性で、二つの条件を満たしていないため、水溶液中の

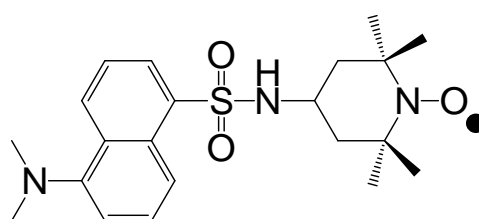


図 1-9、水溶液中のビタミン C 濃度決定に用いられた FN プローブ

ビタミン C の濃度決定に関して研究が行われているが、イメージングへの応用が達成されていない³³⁻³⁵。この他にも、蛍光色素に BODIPY³⁶⁻³⁸、ローダミン^{39,40}、クマリン⁴¹など⁴²⁻⁴⁵を利用した FN プローブが報告されているが、励起光が 560 nm 以下であり、生体組織深部へのイメージングに適していないため、イメージングの研究は行われていない。同様に、ビタミン C 検出を目的としたナノ材料が報告されているが⁴⁶⁻⁴⁸、励起光・発光の波長が 530 nm 以下であるため、同様にイメージングに成功していない。

唯一、図 1-10 に示した FN プローブが励起光・蛍光波長が~ 640 nm で、波長の条件のみ満たしている⁴⁵。この FN プローブは蛍光色素部位とラジカル部位を重合したポリマーで、生体深部へのイメージングが可能であるが、ラジカル保護が行われていない。このため、生体内のビタミン C の選択的なイメージングには成功しておらず、レドックス状態のイメージングをするにとどまっている。また、このイメージングでは、肝臓と腎臓付近に強い蛍光が観測されている。マウスの肝臓と腎臓がビタミン C を合成する機能を有しており、特にビタミン C 合成量の多い肝臓において強い蛍光が観測されている。この結果は、レドックス状態とビタミン C を生産している臓器の影響を反映している。FN プローブ以外にもビタミン C 検出の候補となるナノ材料等が報告されているが、いずれも波長・保護の条件を満たしていない⁴⁶⁻⁴⁸。

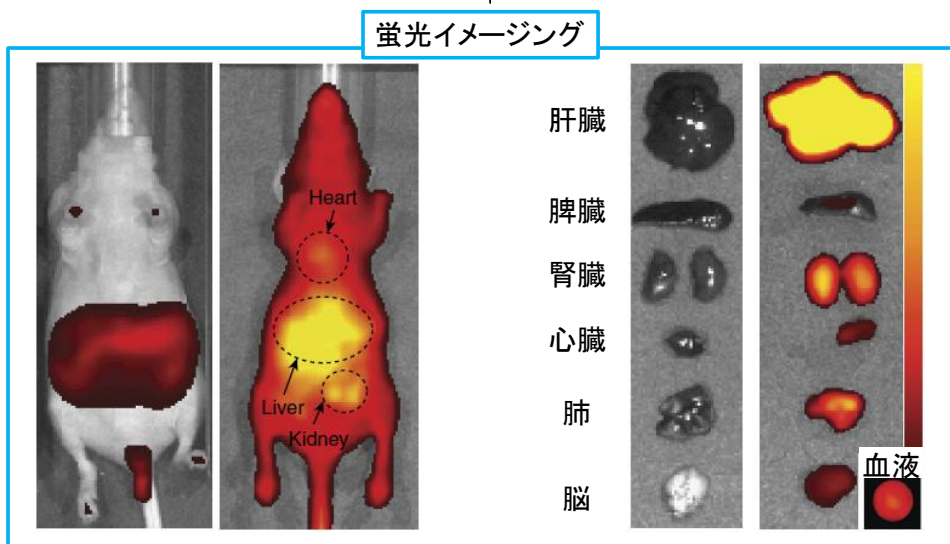
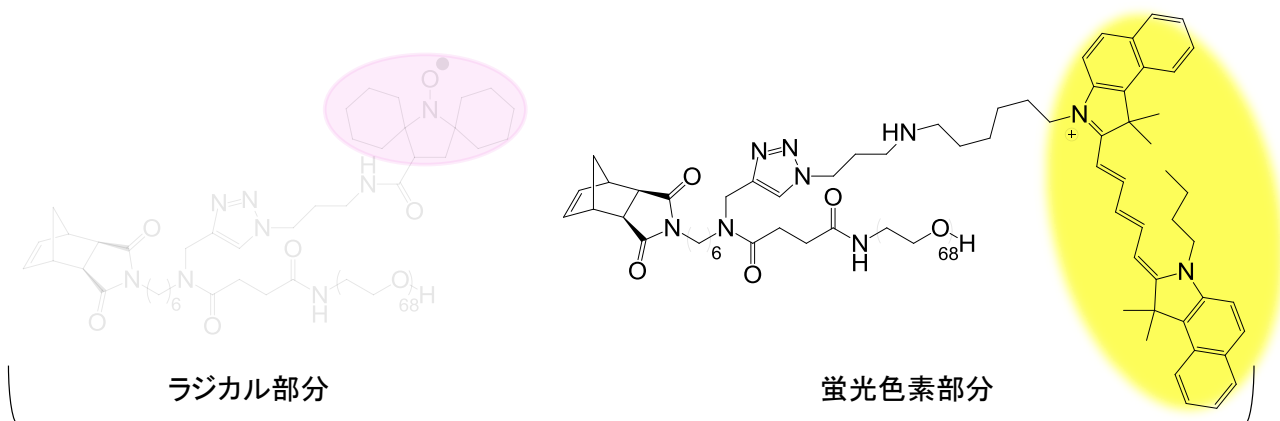


図 1-10、ポリマーFN プローブと蛍光イメージング

現段階で、ビタミンC 蛍光バイオイメージングに必要な励起光・蛍光の波長が 650 nm 以上であることと、ニトロキシドラジカルの保護という二つの条件を満たしている唯一の蛍光プローブとして、当研究室で開発した R2c が挙げられる⁴⁹。次から、R2c の持つ特性の概要について説明する。

1-5. ビタミン C 検出用蛍光プローブ R2c

R2c はケイ素フタロシアンニン (SiPc) と TEMPO ラジカルから構成されている (図 1-11)。フタロシアンニンは励起光と蛍光が生体組織透過性が高い 650 nm 以上の赤色光である。このため、フタロシアンニンを基盤とした蛍光プローブは、生体深部に対するイメージングに適している。一方、TEMPO ラジカルは、SiPc の蛍光を効率よく消光する作用を有する。この TEMPO ラジカルはビタミン C と反応し、ラジカルスピンを失うことで

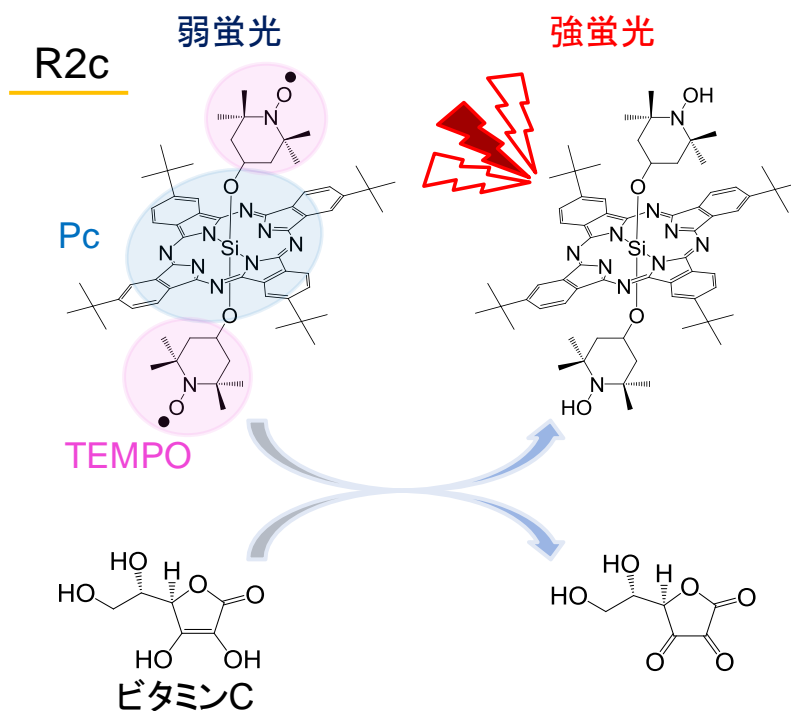


図 1-11、R2c とビタミン C の反応

消光作用を失う。このため、R2c の蛍光強度の増大は、R2c とビタミン C 間の反応を反映する。R2c は、一般的な FN プローブとは異なるユニークな蛍光消光作用を有している。通常、FN プローブは光誘起電子移動による蛍光消光が生じるのに対して、R2c はスピン交換により蛍光が消光される⁴⁹⁻⁵⁴。この消光メカニズムは、第二章で詳細に説明する。

R2c は疎水性の分子であるため、そのままでは水溶液中で蛍光プローブとして使用することはできない。そこで当研究室では、R2c をリポソームに取り込ませることで、水溶液中での利用を可能にした。加えて、リポソームは様々な生体内レドックス物質と R2c のニトロキシドラジカルの反応を抑えることにも機能している。このため、R2c をリポソームに取り込ませた蛍光プローブのリポソーマル R2c は、ビタミン C の蛍光バイオイメージングに必要な励起光・蛍光の波長が生体組織を透過しやすい 650 nm であることと、ニトロキシドラジカルの保護という二つの条件を満たしている。このリポソーマル R2c を用いることで、ガン細胞中のビタミン C のバイオイメージングに初めて成功した (図 1-12)。

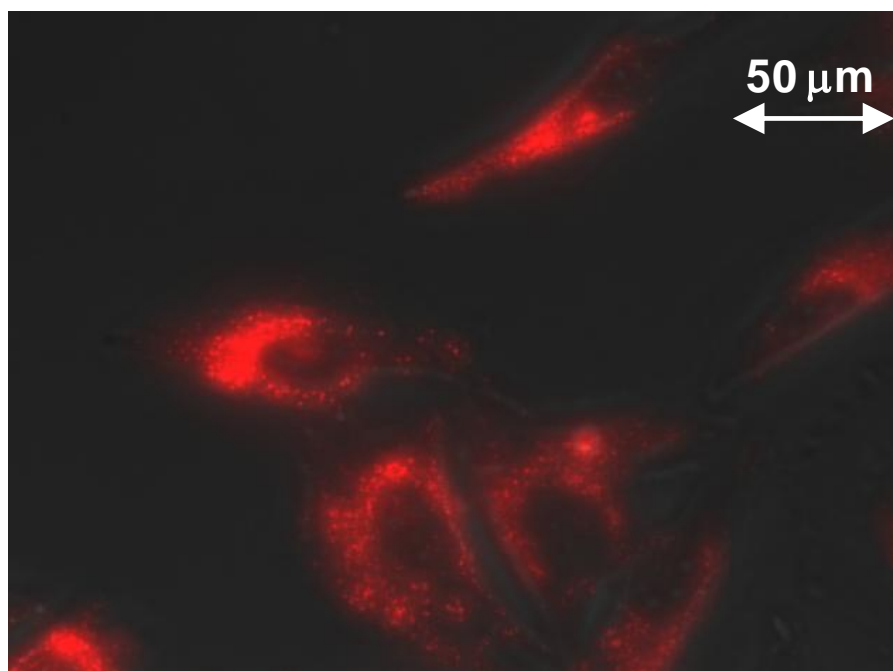


図 1-12、ガン細胞中ビタミン C バイオイメーキング

TEMPO ラジカルは、還元力の弱い分子でも高い反応性を示すわけではない。TEMPO ラジカルは、安定な有機ラジカルであるため、強い還元力を有するビタミン C 等とは反応し易いが、還元力が低い分子に対しては反応性が低くなる。このため、TEMPO ラジカル自体が、ある程度のビタミン C に対する選択性を有しているが、さらに疎水性の SiPc と結合させた R2c を形成させることで、水溶性の様々なレドックス物質との反応性を抑えることができる。加えて、リポソームに R2c を取り込ませることで様々な生体内レドックス物質との反応を抑えることができ、ビタミン C に対する選択性を向上させている。本研究では、ニトロキシドラジカルの保護に関する方法として、タンパク質のアルブミンを用いる方法も検討している。

1-6. アルブミンの機能と形成

生体を構成するタンパク質は、細胞内で合成され、ケラチンやエラスチン、コラーゲンといった多様な種類のもが存在している。中でも、血清アルブミンは、血液中に最も豊富に存在するタンパク質であり、容易に精製できることから広く研究されてきた。特に、牛由来のタンパク質の牛血清アルブミンは、一般的な研究でタンパク質が必要な時に用いるモデルタンパク質として利用されている。

牛血清アルブミン (Bovine serum albumin, BSA) の構造は、分子量が約 66,000 で血清タンパク質の中では分子量は小さいが、存在量が多いため血液中の浸透圧調整に関わっている⁵⁵。アルブミンが関わる浸透圧を膠質浸透圧と言ひ、塩化ナトリウムなどによって生じる晶質浸透圧とは区別される。晶質浸透圧は、液体中に溶質が溶解した状態であるのに対し、膠質はコロイドを意味し、直径が 100 Å 程度の粒子が液体中に分散した状態のものとなる。

このアルブミンは、初めに肝臓でプレプロアルブミンとして合成される (図 1-13)。その後、シグナルペプチドが除去されて得られるプロアルブミンは、新しい N 末端から 6 残基のプロペプチドの除去が行われアルブミンとなる。このようにして形成されたアルブミンは 19 日間の半減期を有し、生体内を循環していく⁵⁶。

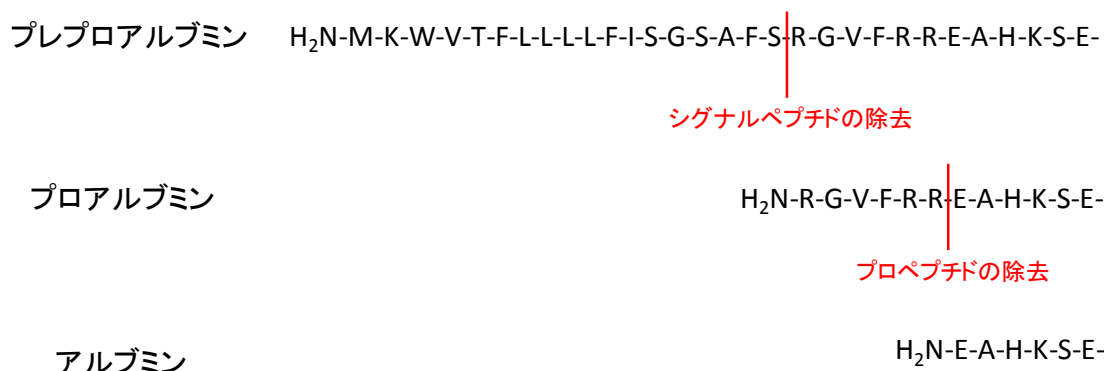


図 1-13、プレプロアルブミンからのアルブミン形成

このアルブミンは、生体内の浸透圧を維持するだけでなく、抗酸化作用や pH の緩衝作用、血液中の物質の運搬にも関わっており、生体内になくってはならないタンパク質である⁵⁷。

1-7. 牛血清アルブミンの構造

牛血清アルブミンは折り重なった 3 つ相同領域 (ドメイン) から形成されており、ドメイン I、ドメイン II、ドメイン III がそれぞれサブドメイン A、サブドメイン B を有している。各サブドメインは以下の領域で表わされる。

ドメイン IA (6-104 残基)、
ドメイン IB-IIA (118-291 残基)、
ドメイン IIB-III A (304-489 残基)、
ドメイン IIIB (502-583 残基) に
対応する (図 1-14)⁵⁸。サブドメイン IIA
の領域にはサイト I と呼ばれる部位が
あり、サブドメイン III A の領域にはサ
イト II と呼ばれる部位があり、これら
は様々な物質と相互作用する結合部位
として知られている。また、金属との
結合サイトは N 末端付近に存在してい
る。

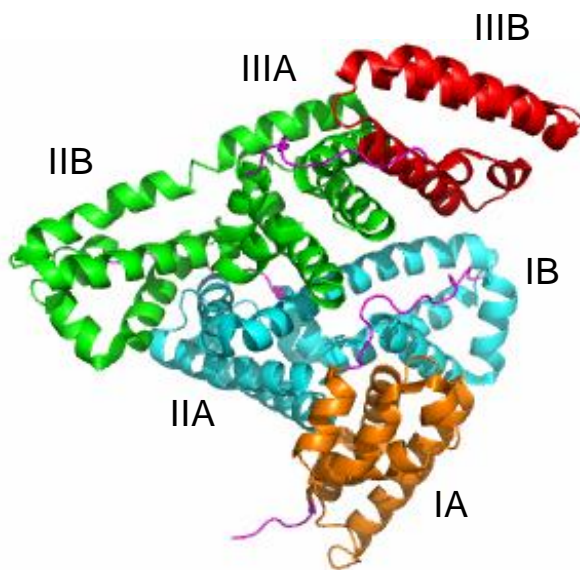


図 1-14、アルブミンの構造 (PDB: 4F5S)

アルブミンの中には、17 対のジスル
フィド結合 (S-S 結合) があり、N 末
端から 34 番目のシステイン残基 (Cys34) のみ遊離チオール基 (SH 基) の形を取っ
ている。

この遊離したチオール基がフリーの状態のものを還元型アルブミンと呼び、チオール
基同士でジスルフィド結合を形成したものを酸化型アルブミンと呼ぶ。アルブミン内の
還元型と酸化型の比率は環境によって変化し、腎疾患、肝疾患や、加齢によって酸化型
が増える傾向にある⁵⁸。

また、アルブミンの構造は、pH が低下するほどモルテングロビュール構造が進行し、
折り畳み構造がより緩んだ構造へと変化していくことが知られている⁵⁹。最近、Yeh ら
により、pH に依存したより詳しいモルテングロビュール構造が報告された (図 1-14)
⁶⁰。この構造変化は、アルブミン自体の機能に影響を与えることが予想され、アルブミ
ンを用いた研究では注意深く観測する必要がある。

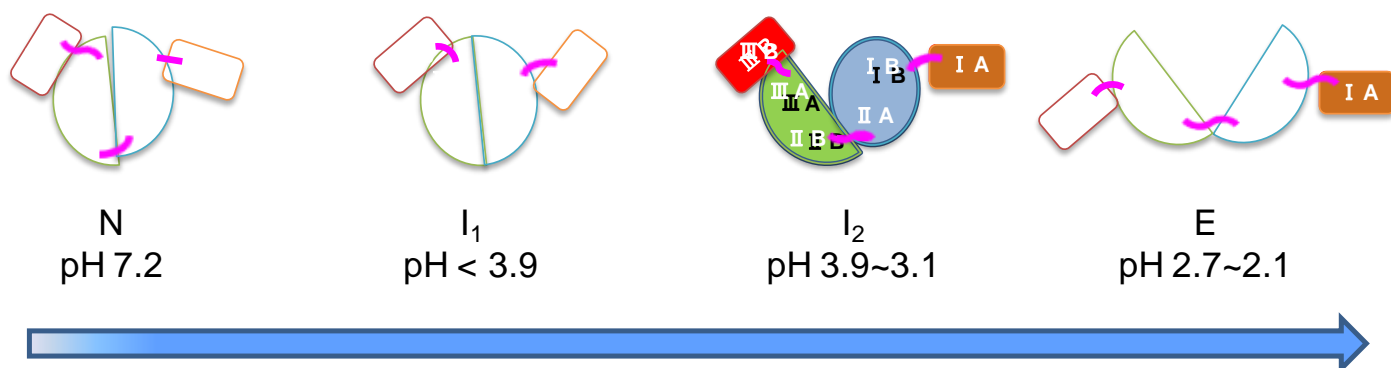


図 1-15、アルブミン構造の pH 依存性モデル^{60,61}

1-8. 本研究の目的

R2c は SiPc 由来の励起光・蛍光とリポソームによるラジカル保護により、ガン細胞中でのビタミン C の蛍光イメージングに初めて成功している。しかし、リポソームによる過度なラジカル保護が R2c のビタミン C 検出の感度・反応速度の低下を招いてしまうため改善が必要であった。

そこで本研究では、R2c を基盤とする高感度な蛍光プローブの開発を行い、ビタミン C の生体内分布を解明することを目的とした。具体的には、①R2c への親水性置換基の導入、②R2c と牛血清アルブミン (Bovine serum albumin、BSA) の複合化、これらの方法で反応性の向上を達成し、投与されたビタミン C の生体内分布を解明することに成功した⁶²。

ここで、高感度化のコンセプトを示す (図 1-16)。

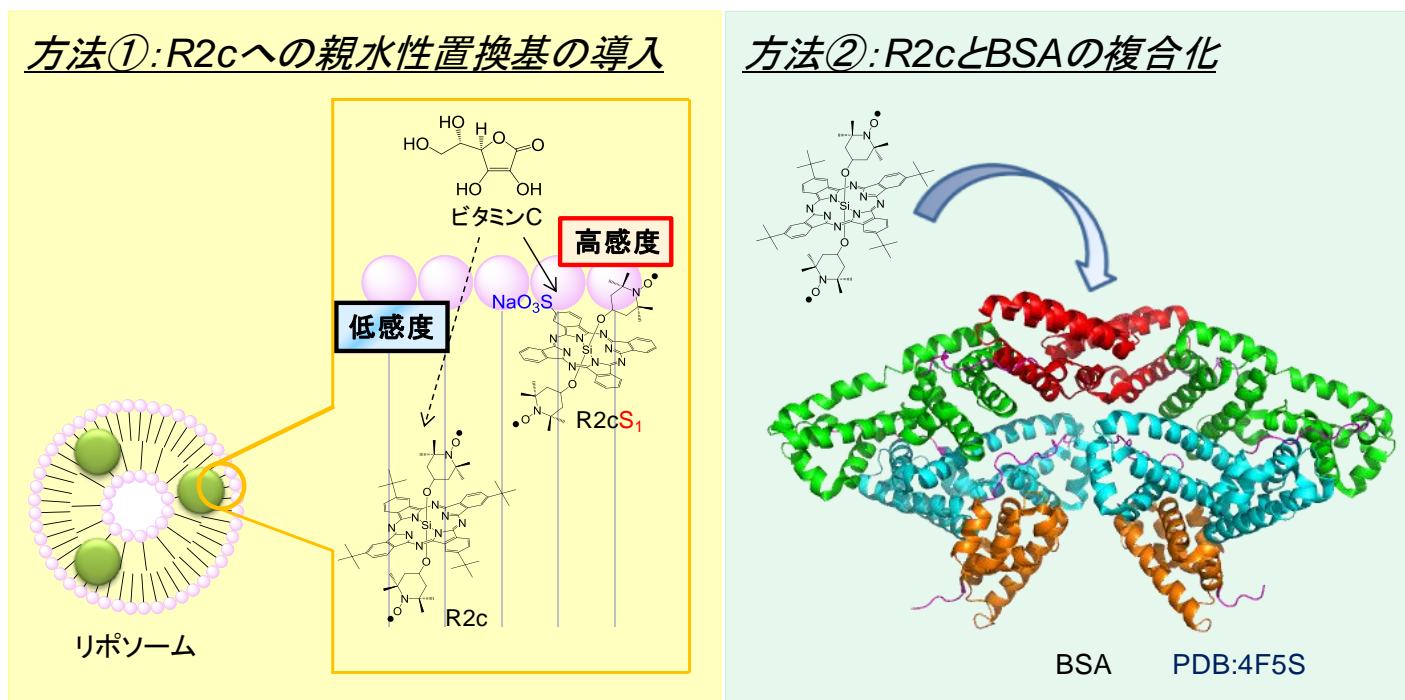


図 1-16、R2c の高感度化のコンセプト

方法①: R2c への親水性置換基の導入 (第3章)

リポソームに疎水性の R2c を取り込ませた場合、R2c はリポソーム内側の疎水性領域に分布する。このため、リポソームの疎水性領域まで侵入したビタミン C としか R2c が反応できないため、感度と反応速度に課題を有する。そこで、R2c に親水性置換基を導入し、リポソーム外側の親水性領域付近に蛍光プローブを分布させることができれば、

感度・反応速度が改善できると考えた。本研究では、①フタロシアニンへのスルホ基導入が光線力学的ガン治療法の研究において実績があること、②TEMPO ラジカルの導入反応においてトルエン溶媒の利用が望ましいこと等の観点から 1 つのスルホ基を導入した R2cS₁ を合成し、ビタミン C との反応を調べた。

方法②：R2c と BSA の複合化（第 4 章）

リポソームは、R2c のラジカルを様々なレドックス物質から過度に保護するため、R2c のビタミン C 検出の感度も低下させてしまう。そこで、適度な保護と高感度を両立させるため、リポソームではなく、水溶性のタンパク質で R2c を包むことで、疎水性の R2c を水溶液中での利用を可能にし、さらに適度なラジカル保護と感度を両立できないかと考えた。本研究では、血液中の物質運搬に関わるタンパク質 BSA と R2c を複合化させた新規蛍光プローブを開発し、ビタミン C との反応性を評価した。

参考文献

1. 五十嵐脩、江指隆年 編、ビタミン・ミネラルの科学、朝倉書店 (2011).
2. 石神昭人、ビタミン C の事典、東京堂出版 (2011).
3. 吉川敏一、フリーラジカルの科学、講談社サイエンティフィク (1997).
4. 東郷秀雄、有機フリーラジカルの化学、講談社 (2001).
5. 理系総合のための生命科学 分子・細胞・個体から知る“生命”のしくみ 編 東京大学生命科学教科書編集委員会 羊土社 (2010).
6. Frei, B., England, L. & Ames, B. N. Ascorbate is an outstanding antioxidant in human blood plasma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**, 6377-6381 (1989).
7. Cameron, E. & Campbell, A. The orthomolecular treatment of cancer II. Clinical trial of high-dose ascorbic acid supplements in advance human cancer. *Chem.-Biol. Interact.* **9**, 285-315 (1974).
8. Cameron, E., Campbell, A. & Jack, T. The orthomolecular treatment of cancer III. Reticulum cellsarcoma: double complete regression induced by high-dose ascorbic acid therapy. *Chem.-Biol. Interact.* **11**, 387-393 (1975).
9. Cameron, E., & Pauling, L. Supplemental ascorbate in the supportive treatment of cancer: Prolongation of survival times in terminal human cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **73**, 3685 (1976).
10. Cameron, E., & Pauling, L. Supplemental ascorbate in the supportive treatment of cancer: Reevaluation of prolongation of survival times in terminal human cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **75**, 4538-4542 (1978).
11. Cameron, E., Pauling, L. & Leibovitz, B. Ascorbic acid and cancer: a review. *Cancer Res.* **39**, 663-681 (1979).
12. Creagan, E. T. *et al.* Failure of high-dose vitamin C (ascorbic acid) therapy to benefit patient with advanced cancer. A controlled trial. *New Engl. J. Med.* **301**, 687-690 (1979).
13. Moertel, C. G. *et al.* High-dose vitamin C versus placebo in the treatment of patients with advanced cancer who had no prior chemotherapy. A randomized double-blind conmarison. *New Engl. J. Med.* **312**, 137-141 (1985).
14. Chen, Q. *et al.* Pharmacologic ascorbic acid concentrations selectively kill cancer cells: action as a pro-drug to deliver hydrogen peroxide to tissues. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102**, 13604-13609 (2005).
15. Padayatty, S. J. *et al.* Intravenously administered vitamin C as cancer therapy: three cases. *CMAJ.* **174**, 937-942 (2006).
16. Chen, Q. *et al.* Pharmacologic concentrations selectively generates ascorbate radical and hydrogen peroxide in extracellular fluid *in vivo*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **104**, 8749-8754 (2007).

17. Chen, Q. *et al.* Pharmacologic doses of ascorbate act as a prooxidant and decrease growth of aggressive tumor xenografts in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **105**, 11105-11109 (2008).
18. Monti, D. A. *et al.* Phase I evaluation of intravenous ascorbic acid in combination with gefitinib and erlotinib in patients with metastatic pancreatic cancer. *PLoS One* **7**, e29794 (2012).
19. Mikirova, N., Casciari, J., Riordan, N. & Hunninghake, R. Clinical experience with intravenous administration of ascorbic acid: achievable levels in blood for different states of inflammation and disease in cancer patients. *J. Transl. Med.* **11**, 191 (2013).
20. Yeom, C. H., Jung, G. C. & Song, K. J. Changes of terminal cancer patients' health-related quality of life after high dose Vitamin C administration. *J Korean Med Sci.* **22**, 7-11 (2007)
21. Vollbracht, C. *et al.* Intravenous vitamin C administration improves quality of life in breast cancer patients during chemo-/radiotherapy and aftercare: results of a retrospective, multicentre, epidemiological cohort study in Germany. *In Vivo* **25**, 983-990 (2011).
22. Takahashi, H., Mizuno, H. & Yanagisawa, A. High-dose intravenous vitamin C improves quality of life in cancer patients. *Personalized Medicine Universe* **1**, 49-53, (2012).
23. Ahmad, I. M. *et al.* Mitochondrial O₂⁻ and H₂O₂ mediate glucose deprivation-induced cytotoxicity and oxidative stress in human cancer cells. *J. Biol. Chem.* **280**, 4254-4263 (2005).
24. Peskin, A. V., Koen, Y. M., Zbarsky, I. B. & Konstantinov, A. A. Superoxide dismutase and glutathione peroxidase activities in tumors. *FEBS Lett.* **78**, 41-45 (1977).
25. Margolis, S. A. & Davis, T. P. Stabilization of ascorbic acid in human plasma, and its liquid-chromatographic measurement. *Clin Chem.* **34**, 2217-2223 (1988).
26. Washko, P. W., Hartzell, W. O. & Levine, M. Ascorbic acid analysis using high-performance liquid chromatography with coulometric electrochemical detection. *Anal. Biochem.* **181**, 276-282 (1989).
27. Margolis, S. A., Paule, R. C. & Ziegler, R. G. Ascorbic and dehydroascorbic acids measured in plasma preserved with dithiothreitol or metaphosphoric acid. *Clin Chem.* **36**, 1750-1755 (1990).
28. Li, X. & Franke, A. A. Fast HPLC-ECD analysis of ascorbic acid, dehydroascorbic acid and uric acid. *J. Chromatogr B* **877**, 853-856 (2009).
29. Kmetec, V. Simultaneous determination of acetylsalicylic, salicylic, ascorbic and dehydroascorbic acid by HPLC. *J Pharm Biomed Anal.* **10**, 1073-1076 (1992).
30. Ghafoor, S. *et al.* Determination of ascorbic acid content of some capsicum cultivars by cyclic voltammetry performed at G.C.E. by external standard series calibration method. *Int. J. Electrochem. Sci.*, **9**, 5751-5762 (2014).
31. Goldenberg, H. *et al.* Quantitation of dehydroascorbic acid by the kinetic measurement of a

- derivatization reaction. **66**, 1086-1089 (1994).
32. Koncki, R., Lenarczuk, T. & Głab, S. Disposable integrated cuvette test for quantitative determination of vitamin C in pharmaceutical products. *Analytica Chimica Acta* **379**, 69-74 (1999).
 33. Lozinsky, E. *et al.* Dual fluorophore–nitroxide probes for analysis of vitamin C in biological liquids. *J. Biochem. Biophys. Methods* **38**, 29-42 (1999).
 34. Lozinsky, E. *et al.* Effect of ionic strength on the binding of ascorbate to albumin. *Biochim. Biophys. Acta* **1571**, 239-244 (2002).
 35. Lozinsky, E. *et al.* Effect of albumin on the kinetics of ascorbate oxidation. *Biochim. Biophys. Acta* **1526**, 53-60 (2001).
 36. Liu, Y., Liu, S. & Wang, Yanguang. TEMPO-based redox-sensitive fluorescent probes and their applications to evaluating intracellular redox status in living cells. *Chem. Lett.* **38**, 588-589 (2009).
 37. Li, P. *et al.* A new highly selective assay for fluorescence imaging of OH in living cells: effectively avoiding the interference of peroxynitrite. *Chem. Eur. J.* **16**, 1834-1840 (2010).
 38. Liu, Y., Zhu, M., Xu, J., Zhang, H. & Tian, M. Using a TEMPO-based fluorescent probe for monitoring oxidative stress in living cells. *Analyst* **136**, 4316-4320 (2011).
 39. Morrow, B. J., Keddle, D. J., Gueven, N., Lavin, M. F. & Bottle, S. E. A novel profluorescent nitroxide as a sensitive probe for the cellular redox environment. *Free radical Biol. Med.* **49**, 67-76 (2010).
 40. Cao, L., Wu, Q., Li, Q., Shao, S. & Guo, Y. Visualizing the changes in the cellular redox environment using a novel profluorescent rhodamine nitroxide probe. *New J. Chem* **37**, 2991-2994 (2013).
 41. Hirosawa, S., Arai, S. & Takeoka, S. A TEMPO-conjugated fluorescent probe for monitoring mitochondrial redox reactions. *Chem. Commun.* **48**, 4845-4847 (2012).
 42. Yang, T. *et al.* A sensitive and selective chemosensor for ascorbic acid based on a fluorescent nitroxide switch. *Talanta* **132**, 191-196 (2015).
 43. Wang, J., Ni, Y. & Shao, S. A reversible fluorescence probe for detection of ClO⁻/AA redox cycle in aqueous solution and in living cells. *Talanta* **147**, 468-472 (2016).
 44. Song, B. *et al.* Background-free in-vivo imaging of vitamin C using time-gateable responsive probe. *Scientific reports* **5**, 14194 (2015). DOI: 10.1038/srep14194
 45. Sowers, M. A. *et al.* Redox-responsive branched- bottlebrush polymers for *in vivo* MRI and fluorescence imaging. *Nat. Commun.* **5**, 5460 (2014).
 46. Li, N. *et al.* A highly selective and instantaneous nanoprobe for detection and imaging of ascorbic acid in living cells and *in vivo*. *Anal. Chem.* **86**, 3924-3930 (2014).
 47. Zhao, P. *et al.* Near-infrared dual-emission quantum dots–gold nanoclusters nanohybrid via

- co-template synthesis for ratiometric fluorescent detection and bioimaging of ascorbic acid in vitro and in vivo. *Anal. Chem.* **87**, 9998-10005 (2015).
48. Meng, H. M. *et al.* Efficient two-photon fluorescence nanoprobe for turn-on detection and imaging of ascorbic acid in living cells and tissues. *Anal. Chem.* **88**, 6057-6063 (2016).
 49. Ishii, K., Kubo, K., Sakurada, T., Komori, K. & Sakai, Y. Pthalocyanine-based fluorescence probes for detecting ascorbic acid: phthalocyaninatosilicon covalently linked to TEMPO radicals. *Chem. Commun.* **47**, 4932-4934 (2011).
 50. Ishii, K., Hirose, Y., Fujitsuka, H., Ito, O. & Kobayashi, N. Time-resolved EPR, fluorescence, and transient absorption studies on phthalocyaninatosilicon covalently linked to one or two TEMPO radicals. *J. Am. Chem. Soc.* **123**, 702-708 (2001).
 51. Ishii, K. *et al.* *In vitro* photodynamic effects of phthalocyaninatosilicon covalently linked to 2,2,6,6-tetramethyl-1-piperidinyloxy radicals on cancer cells. *Free radical Biol. Med.* **38**, 920-927 (2005).
 52. Ishii, K., Hirose, Y. & Kobayashi, N. Selective population from the excited multiplet states to the triplet states to the triplet ground state in a phthalocyanine: a new concept for controlling magnetic properties by photoexcitation. *J. Am. Chem. Soc.* **120**, 10551-10552 (1998).
 53. Ishii, K., Hirose, Y. & Kobayashi, N. Electron spin polarizations of phthalocyaninatosilicon covalently linked to one TEMPO radical in the excited quartet and doublet ground states. *J. Phys. Chem. A* **103**, 1986-1990 (1999).
 54. Ishii, K., Takeuchi, S., Shimizu, S. & Kobayashi, N. A concept for controlling singlet oxygen ($^1\Delta_g$) yields using nitroxide radicals: phthalocyaninatosilicon covalently linked to nitroxide radicals. *J. Am. Chem. Soc.* **126**, 2082-2088 (2004).
 55. Carter, D. C. & Ho, J. X. Structure of Serum Albumin. *Adv. Protein Chem.* **45**, 153-203 (1994).
 56. Waldmann, T. A. In: Albumin structure, function and uses. (Eds. Rosenoer, V. M., Oratz, M. & Rothschild, M. A.) Pergamon, Oxford 255-273 (1977).
 57. Figge, J., Rossing, T. H. & Fencl, V. The Role of serum-proteins in acid-base equilibria. *J. Lab. Clin. Med.* **117** 453-467 (1991).
 58. 国立研究開発法人 国立長寿医療研究センター Nutrition support team、血清アルブミンについて、長寿 NST ニュースレター、6 (2011).
 59. Barbosa, L. R., Ortore, M. G., Spinozzi, F., Mariani, P., Bernstorff, S. & Itri, R. The importance of protein-protein interactions on the pH-induced conformational changes of bovine serum albumin: a small-angle X-ray scattering study. *Biophys J.* **98**(1), 147-157 (2010).
 60. Yeh, Y. Q., Liao, K. F., Shih, O., Shiu, Y. J., Wu, W. R., Su, C. J., Lin, P. C. & Jeng, U. S.

- Probing the acid-induced packing structure changes of the molten globule domains of a protein near equilibrium unfolding. *J. Phys. Chem. Lett.*, **8**(2) 470-477 (2017).
61. Yokoi, T. & Ishii, K. Dependence of phthalocyanine-based fluorescence on albumin structure: A fluorescent probe for ascorbic acid. *J. Photochem. Photobiol. A* **364** 1-5 (2018).
 62. Yokoi, T., Otani, T. & Ishii, K. *In vivo* fluorescence bioimaging of ascorbic acid in mice: Development of an efficient probe consisting of phthalocyanine, TEMPO, and albumin. *Scientific Reports*, **8**, 1560 (2018).

第 2 章

理論

第2章 理論

2-1. 光物理過程^{1,2}

初めに、分子の光物理過程について説明する（図 2-1）。これは分子の分光学的解析をする上で基礎となる。

通常の分子は、全ての電子が対になった反磁性の形態をとる。この分子が光を吸収する前の基底状態では、スピン多重度が1の基底一重項状態（ S_0 ）をとる。この分子が光を吸収すると、スピン多重度が1の励起一重項状態をとる。この時、最もエネルギーの低い最低励起一重項状態より高いエネルギーを持つ励起一重項状態（ S_n ）が生じた場合でも、すぐに内部転換により分子振動等のエネルギーに変換されて最低励起一重項状態（ S_1 ）に遷移する。ここで、スピン多重度の変化がない S_1 から S_0 への発光を伴う遷移過程を蛍光と言ひ、熱などにより光を伴わない遷移過程を内部転換と言う。

また、 S_1 とはスピン多重度が異なり、電子スピンの反転を伴うことでスピン多重度が3となる遷移も生じる。この遷移を項間交差と言う。 S_1 より最低励起三重項（ T_1 ）はエネルギーが低いいため、 T_1 よりエネルギーの高い励起三重項状態（ T_n ）に項間交差した後、内部転換することで T_1 を形成する。この T_1 からはスピン多重度の異なる S_0 への発光を伴う遷移過程をりん光と言ひ、熱などによる遷移を項間交差と言う。

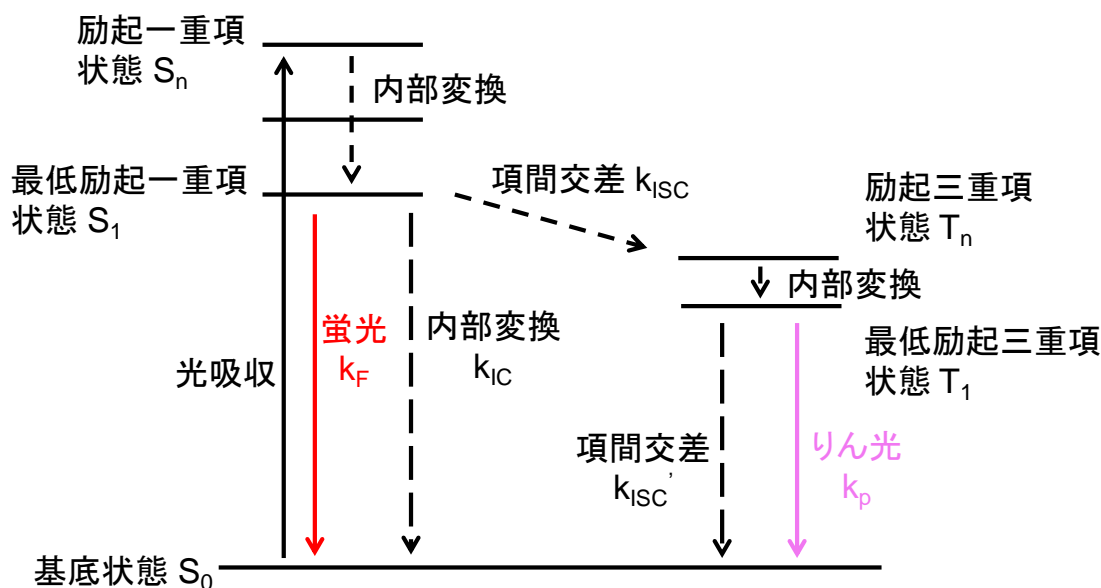


図 2-1、光物理過程

一般的に、分子の光反応や発光は最低励起状態の S_1 、 T_1 から生じ、これを Kasha 則という。このため、照射された光が吸収できる波長であれば、どの波長で吸収しても基本的には同じ蛍光スペクトル、りん光スペクトルを示す。これらのスペクトルを基に、

S_1 、 T_1 のエネルギーを知ることができる。

また、分子が吸収した光子数に対する放出した光子数の割合を示すものを量子収率とい、どれだけ分子が光るのか、また、消光されているのかを示す指標となる。量子収率には、蛍光量子収率 (Φ_F)、りん光量子収率 (Φ_P)、三重項量子収率 (Φ_T) というものがあり、以下のように表わされる³。

$$\Phi_F = \frac{k_F}{k_F + k_{IC} + k_{ISC}} \quad (2-1)$$

$$\Phi_T = \frac{k_{ISC}}{k_F + k_{IC} + k_{ISC}} \quad (2-2)$$

$$\Phi_P = \Phi_T \times \frac{k_P}{k_P + k_{ISC}} \quad (2-3)$$

また、 S_1 、 T_1 の寿命 τ_F 、 τ_P は以下のように表わされる。

$$\tau_F = \frac{1}{k_F + k_{IC} + k_{ISC}} \quad (2-4)$$

$$\tau_P = \frac{1}{k_P + k_{ISC}} \quad (2-5)$$

ここで用いられた k_F 、 k_P はそれぞれ蛍光、りん光の輻射速度定数である。また、 k_{IC} は内部転換速度定数であり、 k_{ISC} 、 k_{ISC}' は項間交差速度定数を示す。

2-2. 励起子相互作用^{1,3}

次に、会合体が生じた場合の励起状態がどのように変化し、電子吸収スペクトルが変化するか理解するため、会合体の最も小さい単位であるダイマーに関して励起子相互作用から説明する。ダイマーが形成されると一般的には分子間の相互作用によりエネルギーの安定化が生じ、その後、クーロン力や、遷移双極子モーメントから遷移許容であるかを考える。

励起子相互作用を考えると、大きく分けて3種類のモデルを考える。一つは、Face to face 型ダイマーである (図 2-2a)。ここでは、励起子が積層し、面を合わせた配置のモデルを考える。励起子が互い違いとなる反平行に並んだ場合、クーロン引力によりエネルギー準位が安定化する。しかし、遷移双極子モーメントが打ち消し合うため禁制になる。一方、励起子が同じ方向を向いた場合、クーロン反発によりエネルギー準位が不安定化する。この時、遷移双極子モーメントは打ち消し合わず、値をもつため遷移許容

となる。これより、光吸収が行われる際、**Face to face** 型ダイマーはモノマーに比べて高エネルギーの準位へ遷移する。このため、電子吸収スペクトルでは短波長側へ吸収がシフトした **H** 会合体の性質を示す。

二つ目は、**Head to tail** 型ダイマーである (図 2-2b)。分子が一行に並んだ配置のモデルを考える。励起子が同じ向きに並んだ場合、クーロン引力によりエネルギー準位が安定化する。この時、遷移双極子モーメントは打ち消し合わず、値をもつため遷移許容となる。一方、励起子が向かい合って並んだ場合、クーロン反発によりエネルギー準位が不安定化する。この時、遷移双極子モーメントは打ち消し合うため禁制になる。これより、光吸収が行われる際、**Head to tail** 型ダイマーはモノマーに比べて低エネルギーの準位へ遷移する。このため、電子吸収スペクトルでは長波長側へ吸収がシフトした **J** 会合体の性質を示す。

三つ目は、**Gable** 型ダイマーである (図 2-2c)。分子が斜めにずれた配置のモデルを考える。励起子が異なる向きに並んだ場合、励起子が同じ向きに並んだ場合、クーロン引力によりエネルギー準位が安定化する。一方、励起子が向かい合って並んだ場合、クーロン反発によりエネルギー準位が不安定化する。この時、どちらの方向に並んだダイマーであっても遷移双極子モーメントは値を持つことが出来るため、どちらの遷移もある程度許容になる。これより、光吸収が行われる際、**Gable** 型ダイマーは低エネルギーの準位、高エネルギーの準位両方へ遷移する。このため、電子吸収スペクトルでは短波長側、長波長側両方へ吸収がシフトし、吸収帯の分裂が観測される。

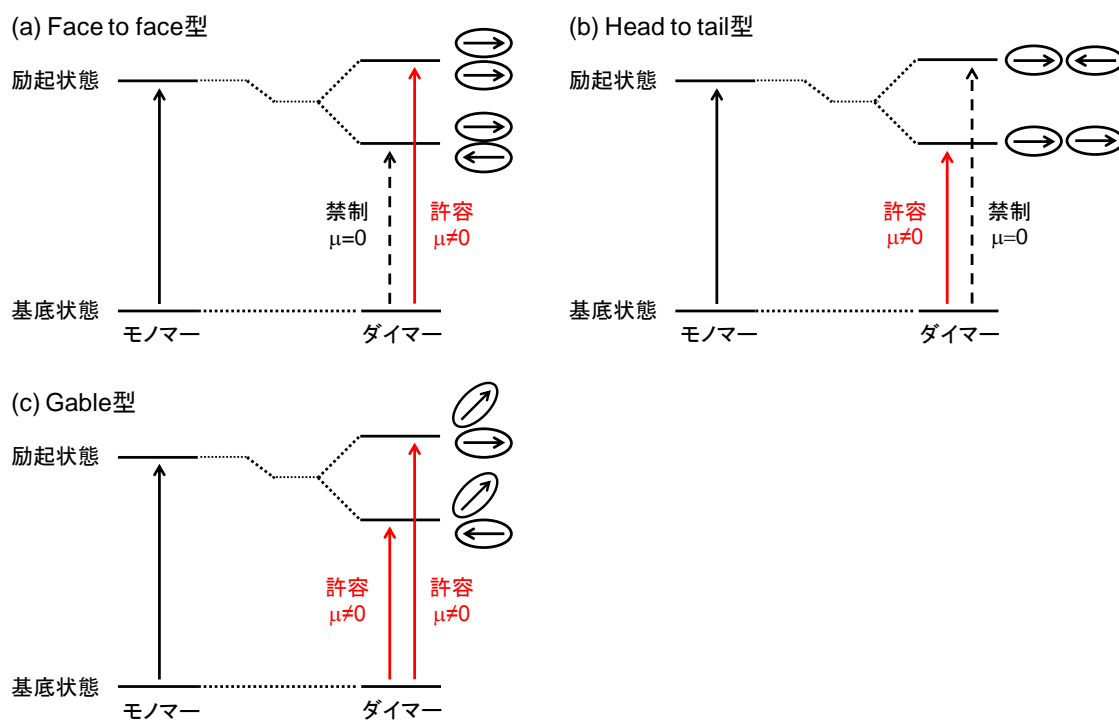


図 2-2、励起子相互作用 ((a) Face to face 型、(b) Head to tail 型、(c) Gable 型)

2-3. 円偏光二色性^{4,5}

円偏光二色性 (Circular Dichroism, CD) は、構造にキラリティーを有し、不斉炭素原子を持つことで鏡像異性体を持つ、または、構造的に軸上のねじれなどによりキラリティーを持つ分子に対し、右円偏光と左円偏光を照射することで、吸光度に差が生じ、CD 信号が生じる現象である (図 2-3)。例えば、アミノ酸の L 体、D 体も鏡像異性体であり、L-アミノ酸から構成される牛血清アルブミン (Bovine Serum Albumin, BSA) は、CD 信号を生じる。このため、本研究では BSA と同一波長で吸光度を有し、キラリティーを持たない界面活性剤 Triton X-100 を区別して検出するために CD を利用している。

CD における吸光度 ΔA は左円偏光の吸光度 A_L と右円偏光の吸光度 A_R の差で以下のように表わす。

$$\Delta A = A_L - A_R \quad (2-6)$$

また、CD における吸光度も Lambert-Beer の法則に従うため、モル円二色性を

$$\Delta \epsilon = (\epsilon_L - \epsilon_R) \quad (2-7)$$

とすると下記の式が成り立つ。

$$\Delta A = \Delta \epsilon c l \quad (2-8)$$

実際の CD 測定系では、吸収の差を楕円率に変換されて示される。

$$[\theta] = \frac{18000}{4\pi \log_{10} e} \Delta \epsilon \approx 3300 \Delta \epsilon \quad (2-9)$$

CD を測定することで、キラリティーを検出できるだけでなく、分子の構造決定に関する情報の取得にも役立つ。例えば、二つの発色団を有する分子の場合、二つの発色団由来の遷移電気双極子モーメントが相互作用することで、発色団間の距離が近くなるほど大きく安定化した励起状態と大きく不安定化した励起状態が形成される。この時、手前の遷移電気双極子に対し、奥の双極子が左にねじれている

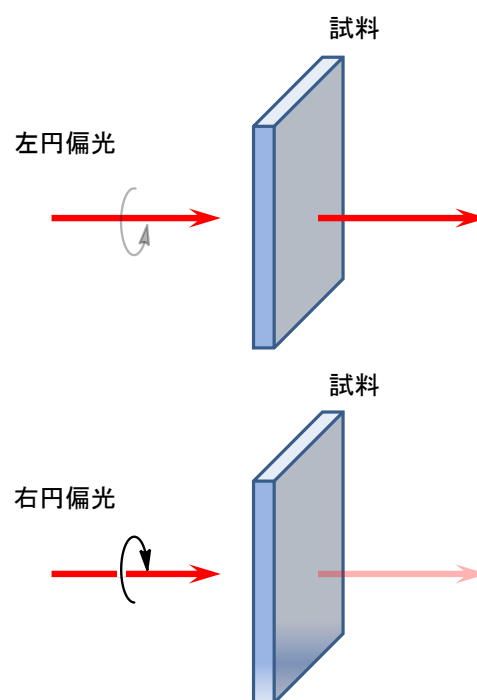


図 2-3、円偏光二色性のモデル

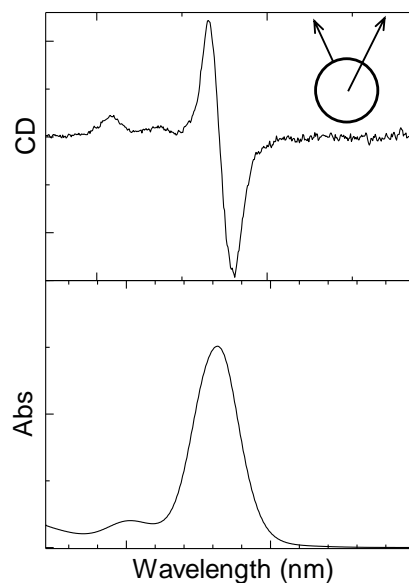


図 2-4、遷移電気双極子モーメントと CD スペクトルの関係

場合、CD スペクトルにおいて長波長側から順に負正の値を取る CD 信号が得られ、右にねじれている場合は正負の値を取る CD 信号が得られる (図 2-4)。この時、CD 信号の強度 R は二つの発色団の遷移電気双極子モーメントを μ 、 m とすると以下の式で表わされる。

$$R = \text{Im}(\mu \cdot m) \quad (2-10)$$

2-4. 磁気円偏光二色性^{5,6}

磁気円偏光二色性 (Magnetic Circular Dichroism, MCD) は、CD の測定系に磁石を組み込み、磁場を光と平行に印加しながら測定する方法である (図 2-5)。

MCD 信号は CD とは異なり、光学活性がなくても検出される。これは、CD が分子のキラリティーに基づく信号であるのに対し、MCD は磁場を印加することで生じる分子の軌道各運動量のゼーマン分裂に基づく信号であることによる。このため、MCD からは主に励起状態の電子構造に関する情報が得られる。実際の MCD 測定系では、吸収の差を楕円率 $\Delta\eta$ に変換して示す。この時、 c を濃度、 l を光路長、 N_0 を基底状態の分子数、 B_z を磁場強度、 \hbar をプランク定数、 ω を角周波数、 ω_n を励起状態エネルギーの角周波数とする。

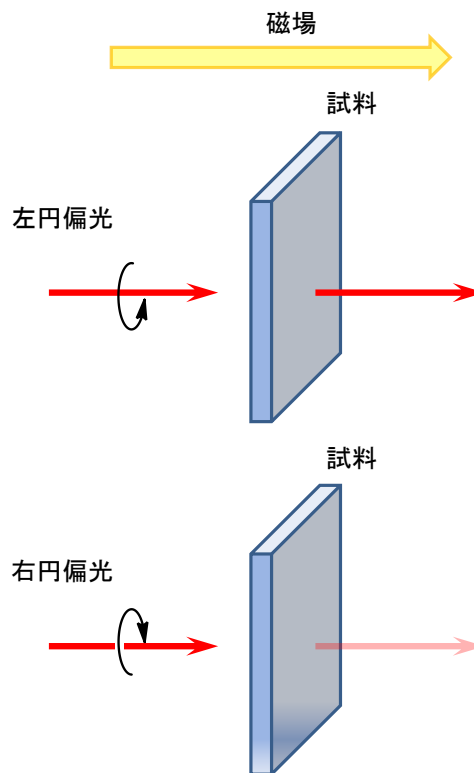


図 2-5、磁気円偏光二色性のモデル

$$\Delta\eta = \frac{\mu_0 c l N_0 B_z}{3\hbar} \left\{ \frac{4\omega_n \omega^2}{\hbar} (fg)A + \omega^2 g \left(B + \frac{C}{kT} \right) \right\} \quad (2-11)$$

また、 f 、 g はそれぞれ分散型のスペクトル関数、積分型のスペクトル関数であり以下のように表わされる。

$$f = \frac{\omega_n^2 - \omega^2}{(\omega_n^2 - \omega^2) + \omega^2 \Gamma_n^2} \quad (2-12)$$

$$g = \frac{\omega_n \Gamma_n}{(\omega_n^2 - \omega^2)^2 + \omega^2 \Gamma_n^2} \quad (2-13)$$

MCD のスペクトルの形状は、Faraday A 項、Faraday B 項、Faraday C 項と呼ばれるものがある。これらは、式の A、B、C の寄与に由来している。Faraday A 項は、励起状態

が縮重しているとき、吸収スペクトルのピークを中心にして分散型のスペクトルが観測される (図 2-6a)。これは、磁場の印加により、ゼーマン分裂が生じることで励起状態の縮重が解けることに起因する。この時の分裂幅 ΔE は、 g_L をランダウの g 因子、 μ_B をボーア磁子、 M_J を全磁気量子数、 B を磁場強度として、以下のように表わされる。

$$\Delta E = 2g_L\mu_B M_J B \quad (2-14)$$

光と平行に磁場を印加した場合、左円偏光はゼーマン分裂により高エネルギー側にシフトした励起状態へ、右円偏光はゼーマン分裂で低エネルギー側にシフトした励起状態へ遷移する。また、光と反平行に磁場を印加した場合、ゼーマン効果が反転するため、左円偏光は低エネルギー側にシフトした励起状態へ、右円偏光は高エネルギー側にシフトした励起状態へ遷移する。

Faraday B 項は磁場を印加した時に、二つの励起状態のエネルギーが近く、相互作用したときに生じる。この時、吸収スペクトルのそれぞれのピークに近い波長で正負の積分型のスペクトルが観測される (図 2-6b)。

また、Faraday C 項は基底状態が縮重しているときに生じる。この時、吸収スペクトルのピークとほぼ同じ波長で、正または負の積分型のスペクトルが観測される (図 2-6c)。これは、磁場の印加により、ゼーマン分裂が生じることで基底状態の縮重が解けることに起因する。温度を下げると、分裂した基底状態の低エネルギー側に分布が偏り、温度の逆数に比例して強度が増大する。逆に、温度を上げると、ゼーマン分裂した基底状態の低エネルギー側と高エネルギー側の分布の偏りが小さくなり信号強度が低下する。それぞれの基底状態の存在確率はボルツマン因子に依存する。

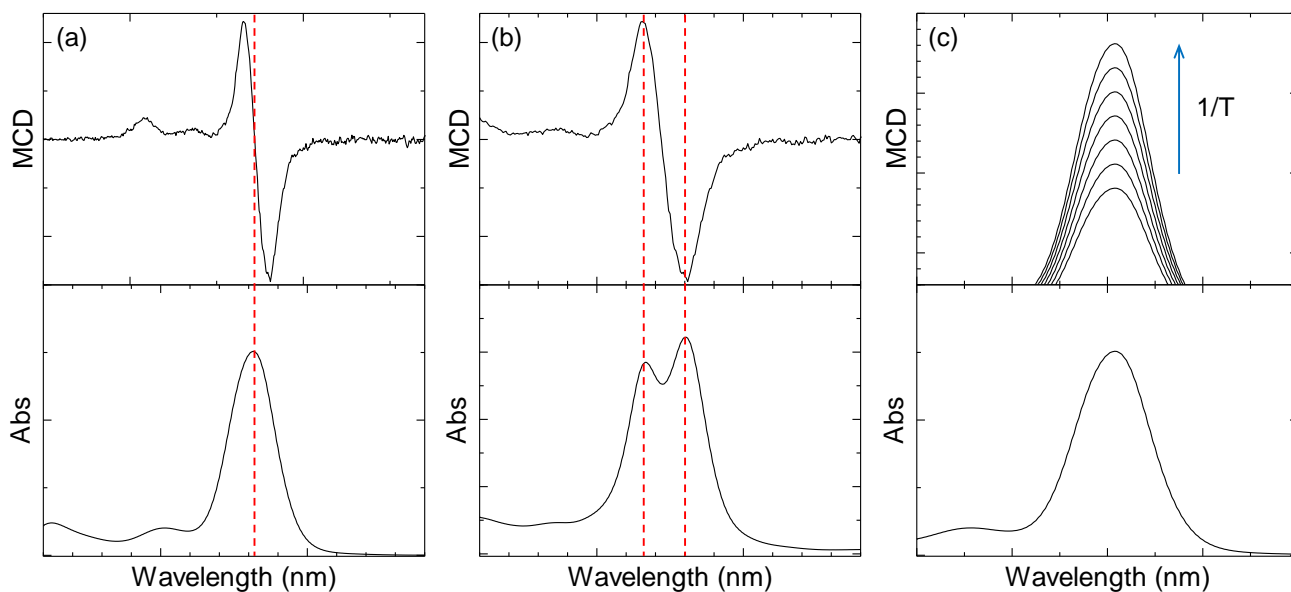


図 2-6、MCD スペクトルにおける Faraday A 項(a)、Faraday B 項(b)、Faraday C 項(c)と吸収スペクトルの関係

2-5. ポルフィリンとフタロシアニンの電子状態^{1,6}

本研究では、フタロシアニン誘導体の光化学的性質の解析および、バイオイメージングへの応用を行っており、その電子状態を理解することは重要である。初めに、フタロシアニンの基本骨格となるポルフィリンの電子状態から Gouterman の Four Orbital Model を用いて説明する (図 2-7)。

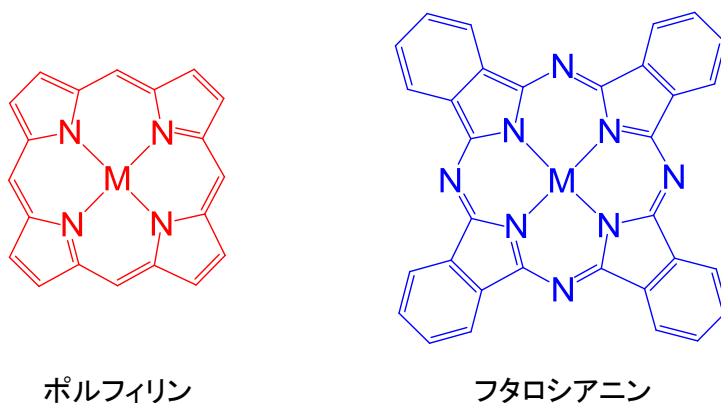


図 2-7、ポルフィリンとフタロシアニンの基本構造

ポルフィリンの分子軌道は HOMO が a_{1u} と a_{2u} 、LUMO が e_{gx} と e_{gy} に対応する。ポルフィリンの電子吸収スペクトルはこの 4 つの軌道を考えることで説明できる (図 2-8)。ここで、励起した電子配置を考える。例えば、 a_{1u} から e_{gx} へ電子が励起した場合、電子配置を $(a_{1u} e_{gx})$ と表記する。HOMO と LUMO はそれぞれ縮重しており、励起電子配置は $(a_{1u} e_{gx})$ を含めて、 $(a_{1u} e_{gy})$ 、 $(a_{2u} e_{gx})$ 、 $(a_{2u} e_{gy})$ という 4 つの状態が存在する。これら 4 つの励起電子配置が配置間相互作用する時、同じ基約表現同士で配置間相互作用する。 D_{4h} の対称性を持つポルフィリンは $(a_{1u} e_{gx})$ と $(a_{2u} e_{gy})$ 、 $(a_{1u} e_{gy})$ と $(a_{2u} e_{gx})$ という組み合わせで配置間相互作用する。ここから $(a_{1u} e_{gx})$ と $(a_{2u} e_{gy})$ の電子状態について議論する。この配置間相互作用により、励起一重項状態 S_1 、 S_2 は $(a_{1u} e_{gx})$ と $(a_{2u} e_{gy})$ の電子配置の線形結合で表わされる。

$$(a_{1u} e_{gx}) = \left\{ a_{2u} \overline{a_{2u} a_{1u} e_{gx}} - \left| a_{2u} \overline{a_{2u} a_{1u} e_{gx}} \right| \right\} / \sqrt{2} \quad (2-15)$$

$$(a_{2u} e_{gy}) = \left\{ a_{2u} \overline{e_{gy} a_{1u} a_{1u}} - \left| a_{2u} \overline{e_{gy} a_{1u} a_{1u}} \right| \right\} / \sqrt{2} \quad (2-16)$$

$$|S_1\rangle = \alpha |a_{2u} e_{gy}\rangle - \beta |a_{1u} e_{gx}\rangle \quad (2-17)$$

$$|S_2\rangle = \beta |a_{2u} e_{gy}\rangle - \alpha |a_{1u} e_{gx}\rangle \quad (2-18)$$

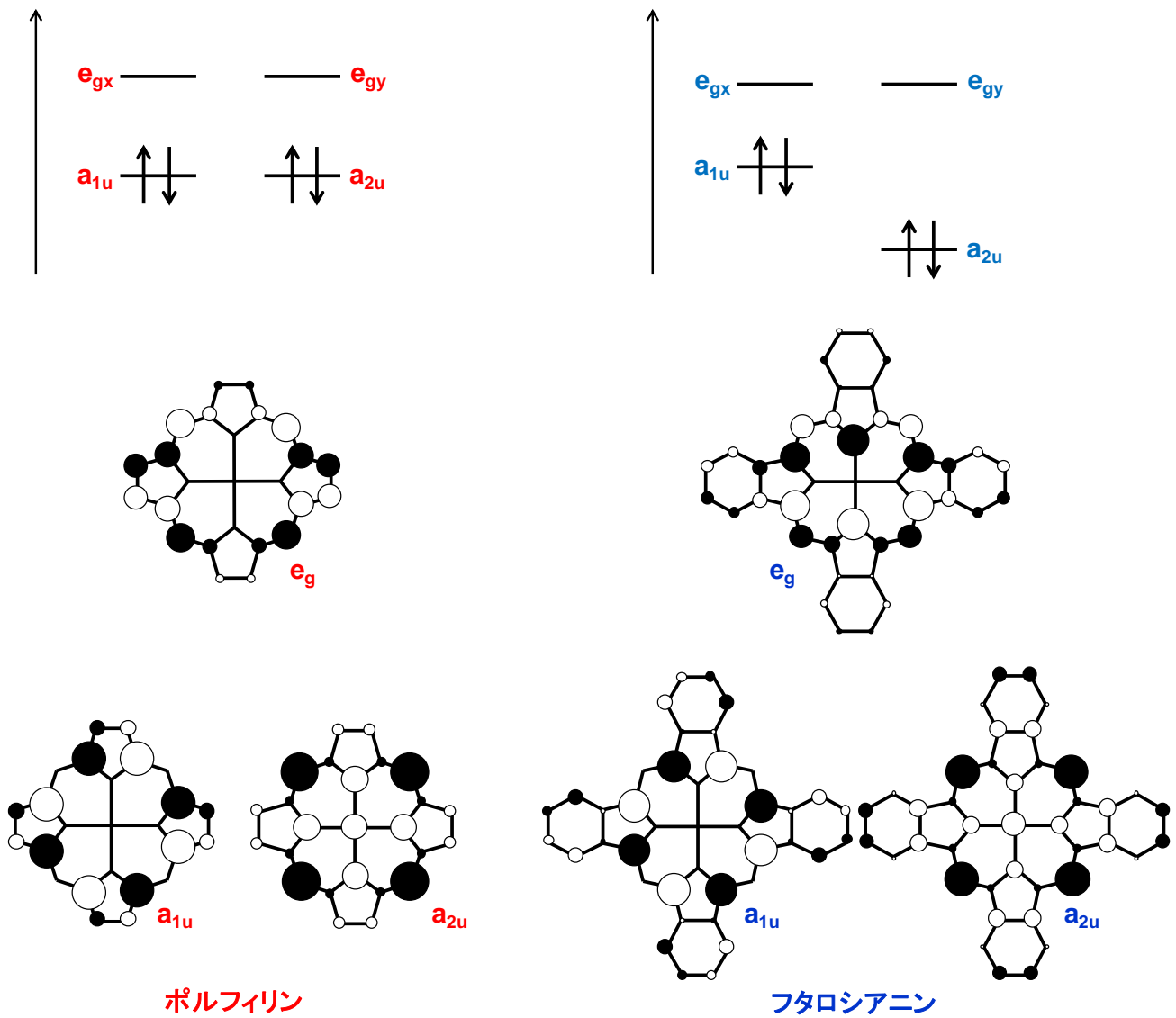


図 2-8、ポルフィリンとフタロシアニンの分子軌道とエネルギーダイアグラム

この励起一重項状態 S_1 、 S_2 はポルフィリンの電子吸収帯で Q 帯と Soret 帯にそれぞれ対応する。これらの吸収帯の吸光度を解析する場合、遷移双極子モーメントを考える必要がある。

$$\left| \langle S_1 | \mathbf{er} | S_0 \rangle \right|^2 = \left| \alpha \langle (a_{2u} \mathbf{e}_{gy}) | \mathbf{er} | S_0 \rangle - \beta \langle (a_{1u} \mathbf{e}_{gx}) | \mathbf{er} | S_0 \rangle \right|^2 \quad (2-19)$$

$$\left| \langle S_2 | \mathbf{er} | S_0 \rangle \right|^2 = \left| \beta \langle (a_{2u} \mathbf{e}_{gy}) | \mathbf{er} | S_0 \rangle + \alpha \langle (a_{1u} \mathbf{e}_{gx}) | \mathbf{er} | S_0 \rangle \right|^2 \quad (2-20)$$

配置換相互作用は、混ざり合う軌道のエネルギーが近いほど強く相互作用するため、ほぼ縮重した励起電子配置 ($a_{1u} \mathbf{e}_{gx}$) と ($a_{2u} \mathbf{e}_{gy}$) は強く配置換相互作用する。これにより、 $\alpha \sim \beta$ となることで、遷移双極子モーメントの差で表わされる Q 帯の吸光度は小さくなる。一方、和で表わされる Soret 帯の吸光度は大きくなる (図 2-9)。

フタロシアニンの場合、LUMO だけでなく、HOMO と HOMO-1 も偶然縮重しているポルフィリンとは異なり、 a_{2u} が大きく安定化して HOMO の縮重が解けている (図 2-8)。これは、電子密度の大きい a_{2u} のメソ位に電気陰性度の大きい窒素原子が導入されることで、 a_{2u} が安定化することに起因する。また、 a_{2u} 程ではないが、大きな電子密度をメソ位にもつ e_g もメソ位に窒素原子が導入されることでわずかに安定化する。また、フタロシアニンは、ポルフィリンのピロール環の β 位に電子密度を持つ a_{1u} にベンゾ環が反結合的に導入されているため、 a_{1u} はわずかに不安定化する。これらの結果、フタロシアニンの分子軌道のエネルギー準位は図 2-8 のようになる。ここで、フタロシアニンの電子吸収スペクトルを考える。フタロシアニンは、 a_{1u} の安定化により式 (2-19) において、($a_{1u} \mathbf{e}_{gx}$) の寄与が大きくなり S_1 に対応する Q 帯の吸光度が強くなる。また、式 (2-20) において、 S_2 は ($a_{2u} \mathbf{e}_{gy}$) の寄与が大きくなる。これらにより、フタロシアニンは Q 帯、Soret 帯共に高い吸光度を持つ (図 2-9)。

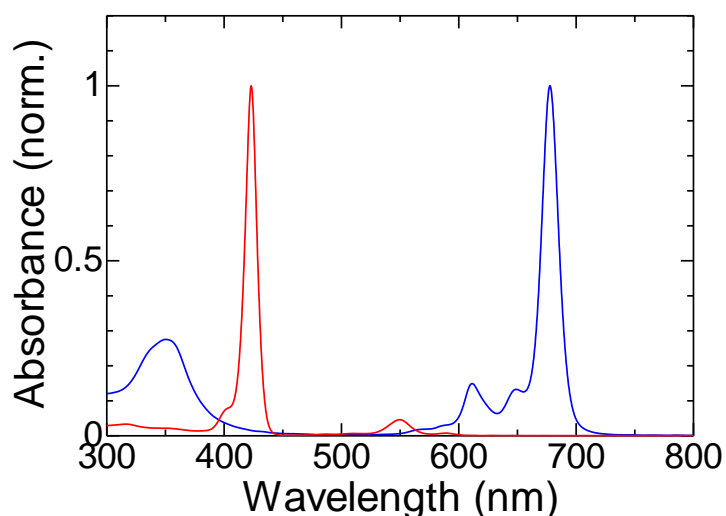


図 2-9、ポルフィリン (赤) とフタロシアニン (青) の電子吸収スペクトル

2-6. FN プローブの蛍光消光作用⁷⁻¹⁹

蛍光色素 (Fluorophore) と蛍光消光作用を有するニトロキシドラジカル (Nitroxide radical) を組み合わせた蛍光プローブ (FN プローブ) はビタミン C 検出の有力な候補とされている。特に、TEMPO ラジカルと蛍光色素を結合させた FN プローブが盛んに研究されている。そこで、一般的な FN プローブで生じる蛍光消光のメカニズムを説明する。

FN プローブは、基本的には光誘起電子移動により蛍光が消光されると言われている (図 2-10)。蛍光色素—TEMPO (FN プローブ) は光を吸収すると、蛍光色素部分が励起状態になる。この励起電子が TEMPO に電子移動することで蛍光色素が消光される。しかし、この蛍光消光メカニズムの場合、生体組織透過性が高い赤色光を消光することが困難という課題があった。光誘起電子移動が生じる場合、電子を放出する分子と受け取る分子のエネルギー準位が近い必要がある。TEMPO ラジカルの $n\pi^*$ に由来する吸収帯が 450 nm 付近であるため、イメージングに有効な 650 nm 以上の波長領域に吸収、発光する蛍光分子を消光することは困難であった。

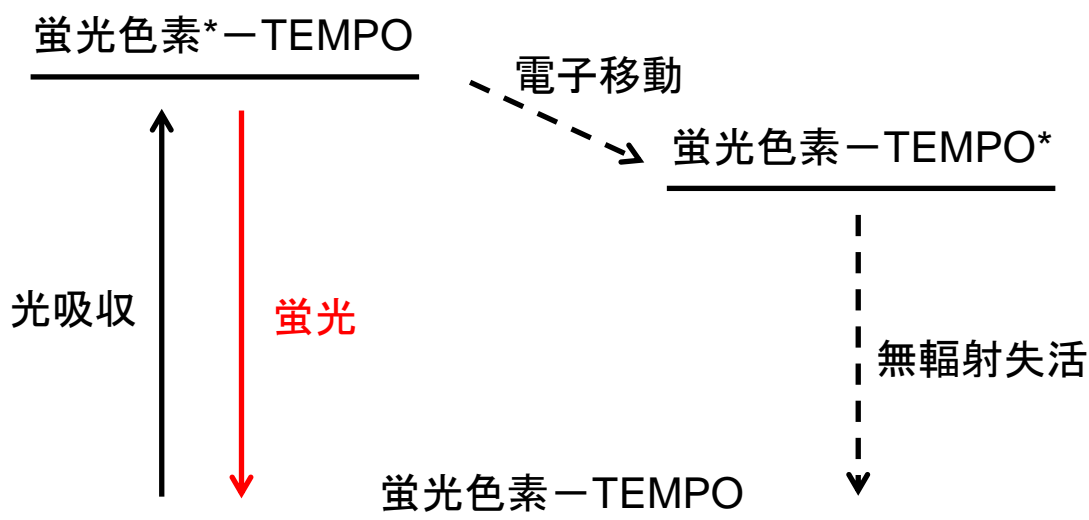


図 2-10、一般的な FN プローブの蛍光消光メカニズム

2-7. R2c の蛍光消光作用²⁰⁻²⁵

本研究で使用している蛍光プローブ R2c はユニークな蛍光消光作用を有している。これは光励起多重項状態形成に基づいたスピン交換に起因する。この消光作用により、R2c は SiPc 由来の 690 nm 付近の蛍光を効率よく消光し、ガン細胞中蛍光イメージングに成功している。

R2c の蛍光メカニズムを説明するため、初めに SiPc の光物理過程を説明する。続いて SiPc に TEMPO ラジカルを 1 分子導入した R1c の蛍光消光メカニズムを説明し、最後に TEMPO ラジカルを 2 分子導入した R2c の蛍光消光メカニズムについて説明する。

SiPc は、電子が全て対になった反磁性の分子である。この分子は、 S_1 、 T_1 のエネルギーが $\sim 14500\text{ cm}^{-1}$ 、 $\sim 9000\text{ cm}^{-1}$ であり、それぞれ $^1(a_{1u}e_g)$ と $^3(a_{1u}e_g)$ の励起電子配置をとる。 $S_1 \rightarrow T_1$ の遷移はスピン禁制であるため、項間交差の速度は遅く、蛍光量子収率 $\Phi_F=0.57$ と高い値を示す。このとき、三重項量子収率 $\Phi_{TPc}=0.34$ となる (図 2-11)。

R1c の場合、SiPc が基底一重項状態 S_0 ($^1\text{SiPc}$) のとき TEMPO ラジカルが導入されることで基底二重項状態 D_0 が形成される (図 2-10)。また、SiPc が光吸収により励起一重項状態 S_1 ($^1\text{SiPc}^*$) をとる場合、TEMPO ラジカルが導入されることにより励起二重項状態 (D_n) を形成する。一方、最低励起二重項状態 D_1 と最低励起四重項状態 QA_1 は、SiPc の三重項状態 T_1 ($^3\text{SiPc}^*$) と $^2\text{TEMPO}$ の相互作用により形成される。このため、スピン多重度の等しい遷移の $D_n \rightarrow D_1$ が生じることで $^1\text{SiPc}^* \rightarrow ^3\text{SiPc}^*$ への項間交差が促進される。これにより、 $\Phi_{TPc}=0.59$ となり、SiPc の蛍光が消光されて $\Phi_F=0.21$ に減少する (図 2-11)。

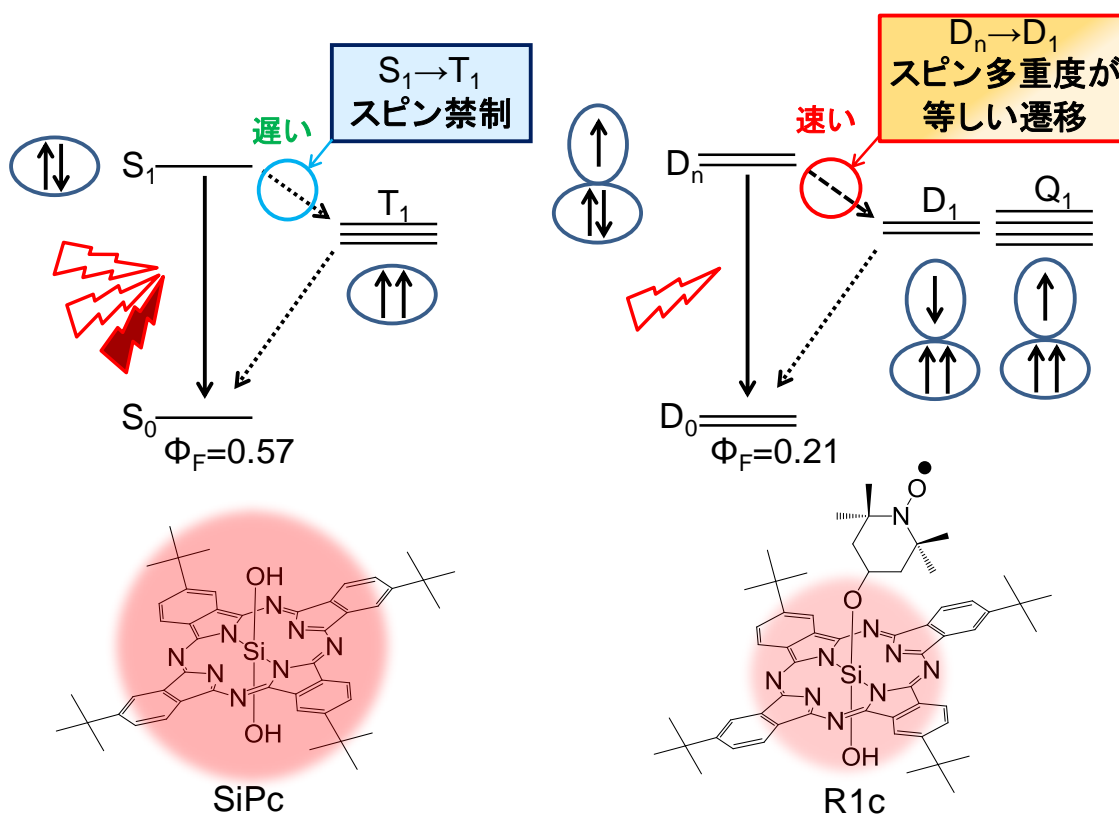


図 2-11、R1c の蛍光消光作用

R2c の場合、基底一重項状態 S_0 ($^1\text{SiPc}$) の SiPc に対し、2 分子の $^2\text{TEMPO}$ 間の相互作用により、基底一重項状態 S_0' と基底三重項状態 T_0' が形成される (図 2-12)。また、 SiPc が光吸収により励起一重項状態 S_1 ($^1\text{SiPc}^*$) をとる場合、2 分子の $^2\text{TEMPO}$ 間の相互作用により、励起一重項状態 S_n' と励起三重項状態 T_n' を形成する。一方、 SiPc の三重項状態 T_1 ($^3\text{SiPc}^*$) と $^2\text{TEMPO}$ の相互作用により、最低励起一重項状態 S_1' 、最低励起三重項状態 T_1' と最低励起五重項状態 Q_1' が形成され、励起三重項状態 T_2' も形成される。この時、2 分子の $^2\text{TEMPO}$ は T_1' 状態と T_2' 状態でそれぞれ三重項、一重項の性質を示す。これより、スピン多重度の等しい遷移の $S_n' \rightarrow S_1'$ 、 $T_n' \rightarrow T_1'$ 、 $T_n' \rightarrow T_2'$ が生じることで $^1\text{SiPc}^* \rightarrow ^3\text{SiPc}^*$ への項間交差がより促進される。これより $\Phi_{\text{TPc}}=0.67$ となり、蛍光が強く消光されて $\Phi_F=0.012$ に大きく減少する。

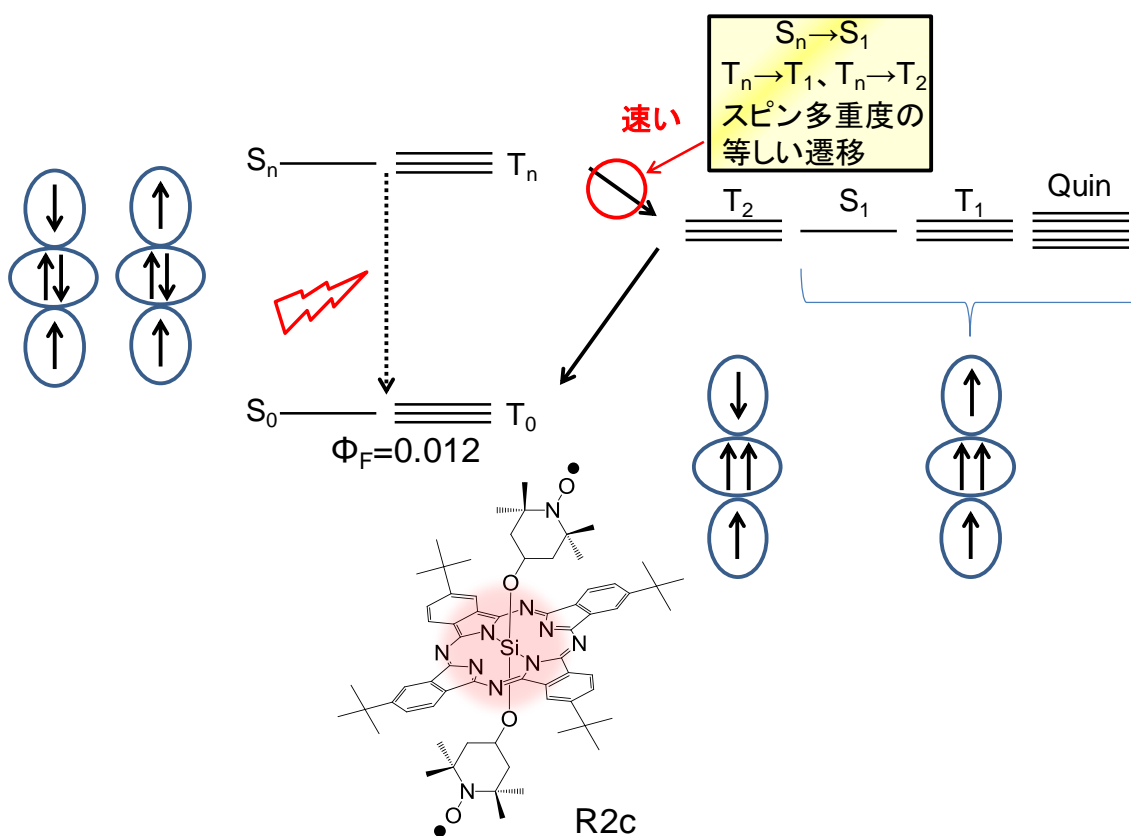


図 2-12、R2c の蛍光消光作用

2-8. 反応速度論²⁶

実験結果の速度論に基づく解析は、その物質の特性や反応等のメカニズム解析において重要な手掛かりとなる。本研究では、蛍光強度の時間変化を反応速度論による解析を行うことで、その発光挙動や反応メカニズムの解析を行う。初めに、基本的な二次反応、擬一次反応から記述し、本研究で用いた蛍光プローブの反応メカニズム解析に使用した逐次反応について述べる。

2-8-1. 二次反応

二次反応は、二分子が反応して新しい分子が形成される反応である。初めに、同一の分子が反応する二次反応について述べ、続いて異なる二分子が反応する二次反応について記述する。

2-8-1-1. 同一分子の反応による二次反応



$$\frac{d[A]}{dt} = -k[A]^2 \quad (2-22)$$

$$\frac{d[A]}{[A]^2} = -k dt$$

ここで、初期値 $t=0$ において、A の濃度を $[A]_0$ とする

$$\int_{[A]_0}^{[A]} \frac{d[A]}{[A]^2} = -k \int_0^t dt \quad (2-23)$$

$$\left[-[A]^{-1} \right]_{[A]_0}^{[A]} = -k[t]_0^t$$

$$-\left(\frac{1}{[A]} - \frac{1}{[A]_0} \right) = -kt$$

$$\frac{1}{[A]} = kt + \frac{1}{[A]_0} \quad (2-24)$$

$$\frac{1}{[A]} = \frac{1 + kt[A]_0}{[A]_0}$$

$$[A] = \frac{[A]_0}{1 + kt[A]_0} \quad (2-25)$$

$[A]$ について求めた関数を用いて $[B]$ についても考える。

[B]の増大は[A]の減少の半分であるため

$$[A]_0 = [A] + 2[B] \quad (2-26)$$

$$2[B] = [A]_0 - [A]$$

$$2[B] = [A]_0 - \frac{[A]_0}{1 + kt[A]_0}$$

$$2[B] = \frac{[A]_0 + kt[A]_0^2 - [A]_0}{1 + kt[A]_0}$$

$$[B] = \frac{kt[A]_0^2}{2(1 + kt[A]_0)} \quad (2-27)$$

[A]、[B]の関数のシミュレーションを以下に示す（図 2-13）。

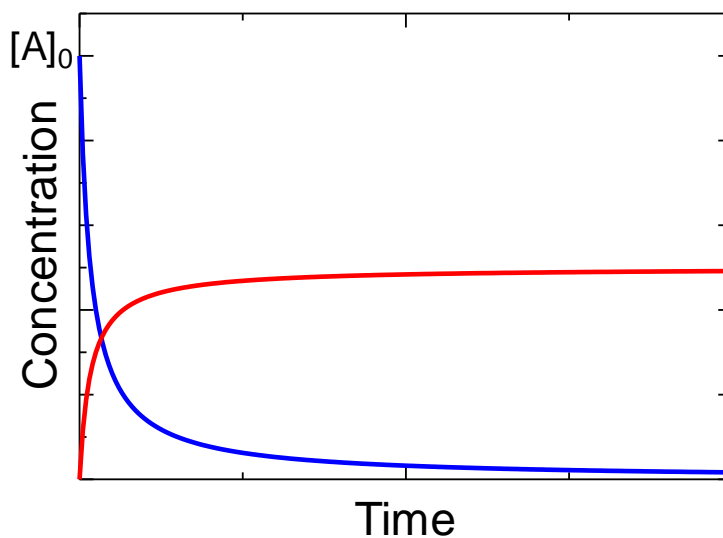


図 2-13、同一分子の反応の二次反応による時間と濃度の関係

また、ここから半減期 (τ) を求める。

$$\frac{1}{[A]} = kt + \frac{1}{[A]_0} \quad (2-28)$$

について

$$\begin{aligned}
[A] &= \frac{[A]_0}{2} \text{ のとき、} t=\tau \text{ とする} \\
\frac{1}{([A]_0)/2} &= k\tau + \frac{1}{[A]_0} \\
k\tau &= \frac{2}{[A]_0} - \frac{1}{[A]_0} \\
\tau &= \frac{1}{k[A]_0} \tag{2-29}
\end{aligned}$$

一次反応の半減期が $[A]_0$ によらず一定であるのに対し、二次反応の半減期は $[A]_0$ に依存する。

2-8-1-2. 異なる分子の反応による二次反応



$$\frac{d[A]}{dt} = \frac{d[B]}{dt} = -k[A][B] \tag{2-31}$$

$$= -\frac{d[C]}{dt} \tag{2-32}$$

$$\frac{d[C]}{dt} = k[A][B] \tag{2-33}$$

ここで、初期値 $t=0$ において、A の濃度を $[A]_0$ 、B の濃度を $[B]_0$ とする

$$[A] = [A]_0 - [C], \quad [B] = [B]_0 - [C] \tag{2-34}$$

$$\frac{d[C]}{dt} = k([A]_0 - [C])([B]_0 - [C])$$

$$\frac{d[C]}{([A]_0 - [C])([B]_0 - [C])} = k dt$$

$$\int_0^{[C]} \frac{1}{[B]_0 - [A]_0} \left(\frac{1}{[A]_0 - [C]} - \frac{1}{[B]_0 - [C]} \right) d[C] = k \int_0^t dt \tag{2-35}$$

$$\frac{1}{[B]_0 - [A]_0} [-\ln([A]_0 - [C]) + \ln([B]_0 - [C])]_0^{[C]} = kt$$

$$\frac{1}{[B]_0 - [A]_0} \{-\ln([A]_0 - [C]) + \ln([B]_0 - [C]) + \ln[A]_0 - [B]_0\} = kt$$

$$[A] = [A]_0 - [C], \quad [B] = [B]_0 - [C] \text{ より、}$$

$$\frac{1}{[B]_0 - [A]_0} \{-\ln[A] + \ln[B] + \ln[A]_0 - \ln[B]_0\} = kt$$

$$\frac{1}{[B]_0 - [A]_0} \ln\left(\frac{[A]_0}{[A]} * \frac{[B]}{[B]_0}\right) = kt$$

$$\ln\left(\frac{[B]/[B]_0}{[A]/[A]_0}\right) = ([B]_0 - [A]_0)kt \quad (2-36)$$

$$[A]_0 - [A] = [B]_0 - [B] \text{ より、 } [B] = [B]_0 - [A]_0 + [A]$$

$$\ln\left(\frac{([B]_0 - [A]_0 + [A])/[B]_0}{[A]/[A]_0}\right) = ([B]_0 - [A]_0)kt$$

$$\frac{([B]_0 - [A]_0 + [A])/[B]_0}{[A]/[A]_0} = e^{([B]_0 - [A]_0)kt}$$

$$\frac{([B]_0 - [A]_0 + [A])}{[B]_0} = \frac{[A]}{[A]_0} e^{([B]_0 - [A]_0)kt}$$

$$\frac{[A]}{[B]_0} - \frac{[A]}{[A]_0} e^{([B]_0 - [A]_0)kt} = \frac{[A]_0 - [B]_0}{[B]_0}$$

$$\frac{[A]([A]_0 - [B]_0 e^{([B]_0 - [A]_0)kt})}{[A]_0[B]_0} = \frac{[A]_0 - [B]_0}{[B]_0}$$

$$[A] = \frac{[A]_0 - [B]_0}{[B]_0} * \frac{[A]_0[B]_0}{[A]_0 - [B]_0 e^{([B]_0 - [A]_0)kt}}$$

$$[A] = \frac{[A]_0^2 - [A]_0[B]_0}{[A]_0 - [B]_0 e^{([B]_0 - [A]_0)kt}} \quad (2-37)$$

または

$$[A] = \frac{([A]_0[B]_0 - [A]_0^2)e^{-([B]_0 - [A]_0)kt}}{[B]_0 - [A]_0 e^{-([B]_0 - [A]_0)kt}} \quad (2-38)$$

上記のように二次反応の関数はまとめられる

[A]の関数のシミュレーションを以下に示す (図 2-14)。

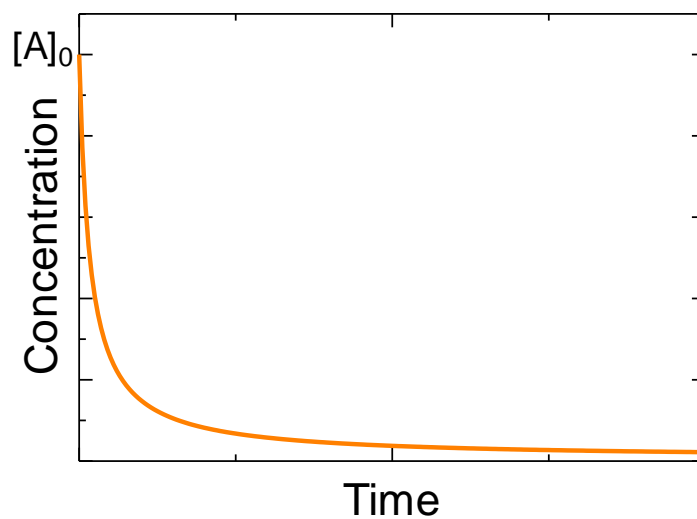


図 2-14、異なる分子の反応の二次反応による時間と濃度の関係

2-8-2. 零次反応、一次反応、二次反応の比較

零次反応、一次反応、二次反応の時間変化の比較を行う。図 2-15 より、零次反応、一次反応、二次反応となるにつれて、反応開始付近の濃度変化が大きいことが観測された。一方、開始当初の反応の進行が早い二次反応は、他の反応に比べ、急激な濃度変化の後にはより緩やかに濃度に変化する。

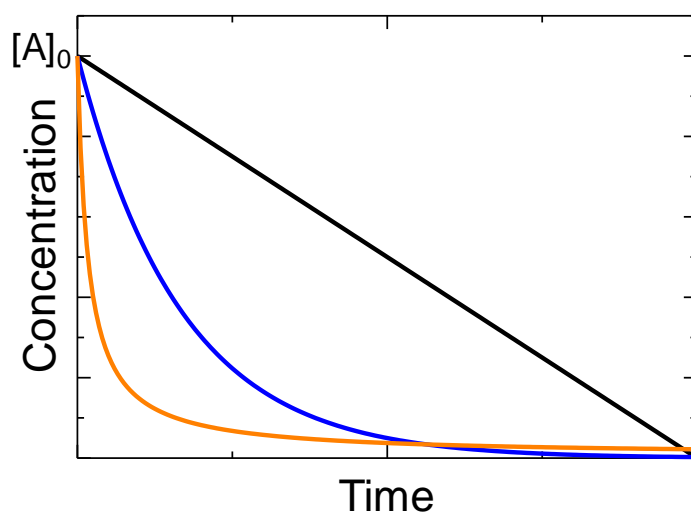


図 2-15、零次反応（黒）、一次反応（青）、二次反応（橙）の比較

2-8-3. 擬一次反応

反応が進行しても、分子が過剰に存在することで、分子濃度が一定に保たれる場合がある。この時、一次反応や二次反応は、それぞれ零次反応、一次反応様の挙動を示す場合がある。これらは擬零次反応と擬一次反応と呼ばれ、計算や解析を簡便にすることができる。

二次反応において、一方の分子の濃度がもう一方の分子の濃度より過剰量存在するとき、過剰量の分子は反応が進行してもほとんど濃度変化が生じないため、定数とみなして計算できる。そのような反応は、一次反応様の挙動を示すことから擬一次反応と呼ばれ、二次反応よりも簡便な式で解析できるため実験値の解析によく用いられている。本研究でも、ビタミン C の濃度が蛍光プローブに対し過剰量存在するという条件下で反応が行われるため、擬一次反応を用いた解析を使用している。



$$\frac{d[A]}{dt} = \frac{d[B]}{dt} = -k[A][B] \quad (2-40)$$

$$= -\frac{d[C]}{dt} \quad (2-41)$$

ここで、 $[A] \ll [B]$ となる場合、 $[B]$ を定数とみなす

$$\text{この時、} \frac{d[B]}{dt} = 0 \text{ より、}$$

$$k[B] = k' \text{ とおくと}$$



$$\frac{d[A]}{dt} = -k'[A] \quad (2-43)$$

このように、一次反応と同様の式になる

$$\frac{d[A]}{[A]} = -k' dt$$

ここで、初期値 $t=0$ において、A の濃度を $[A]_0$ とする

$$\int_{[A]_0}^{[A]} \frac{d[A]}{[A]} = -k' \int_0^t dt \quad (2-44)$$

$$[\ln[A]]_{[A]_0}^{[A]} = -k'[t]_0^t$$

$$\ln\left(\frac{[A]}{[A]_0}\right) = -k't$$

$$\frac{[A]}{[A]_0} = e^{-k't}$$

$$[A] = [A]_0 e^{-k't} \quad (2-45)$$

A について求めた関数を用いて C について考える

$$[A]_0 = [A] + [C] \quad (2-46)$$

$$[C] = [A]_0 - [A]$$

$$[C] = [A]_0 - [A]_0 e^{-k't}$$

$$[C] = [A]_0 (1 - e^{-k't}) \quad (2-47)$$

本研究では、ここで述べた擬一次反応の関数を用いることで、当研究室で開発した従来の蛍光プローブリポソーマル R2c の蛍光強度時間変化の解析を行った。

2-8-4. 逐次反応

これまでに述べた反応とは異なり、中間体を経て二段階で進行する反応がある。このような時に逐次反応が生じる。本研究で使用した R2c は SiPc に反応部位となる TEMPO ラジカルが二つ結合した分子である。このため、TEMPO ラジカル一つが還元された分子を経由して、TEMPO ラジカル二つが還元された分子となり、逐次反応が生じる。

2-8-4-1. 逐次反応 ($k_1 \neq k_2$ の場合)

初めに、逐次反応の中でもそれぞれの速度定数が独立で $k_1 \neq k_2$ の場合について考え、続いて、 $k_1 = k_2$ となる場合を考える。



$$\frac{d[A]}{dt} = -k_1[A] \quad (2-49)$$

$$\frac{d[B]}{dt} = k_1[A] - k_2[B] \quad (2-50)$$

$$\frac{d[C]}{dt} = k_2[B] \quad (2-51)$$

上記の連立微分方程式を解くことで逐次反応の関数を得る

[A]について

$$\frac{d[A]}{dt} = -k_1[A] \quad (2-52)$$

$$\frac{d[A]}{[A]} = -k_1 dt$$

ここで、初期値 $t=0$ において、A の濃度を $[A]_0$ とする

$$\int_{[A]_0}^{[A]} \frac{d[A]}{[A]} = -k_1 \int_0^t dt \quad (2-53)$$

$$[\ln[A]]_{[A]_0}^{[A]} = -k_1 [t]_0^t$$

$$\ln\left(\frac{[A]}{[A]_0}\right) = -k_1 t$$

$$\frac{[A]}{[A]_0} = e^{-k_1 t}$$

$$[A] = [A]_0 e^{-k_1 t} \quad (2-54)$$

[B]について

$$\frac{d[B]}{dt} = k_1[A] - k_2[B]$$

[A]を代入する

$$\frac{d[B]}{dt} = k_1[A]_0 e^{-k_1 t} - k_2[B]$$

$$\frac{d[B]}{dt} + k_2[B] = k_1[A]_0 e^{-k_1 t} \quad (2-55)$$

ここで定数変化法を用いると、微分方程式を下記のように変形できる

$$\frac{dy}{dx} + yf(x) = g(x) \quad (2-56)$$

$$e^{\int f(x)dx} y = \int e^{\int f(x)dx} g(x)dx + C \quad (2-57)$$

これより、

$$e^{\int_0^t k_2 dt} [B] = \int_0^t e^{\int_0^t k_2 dt} k_1 [A]_0 e^{-k_1 t} dt \quad (2-58)$$

$$e^{k_2 t} [B] = \int_0^t e^{k_2 t} k_1 [A]_0 e^{-k_1 t} dt$$

$$e^{k_2 t} [B] = k_1 [A]_0 \int_0^t e^{(k_2 - k_1)t} dt \quad (2-59)$$

ここで、 $k_1 \neq k_2$ という条件を考える

$$e^{k_2 t} [B] = k_1 [A]_0 \left[\frac{1}{k_2 - k_1} e^{(k_2 - k_1)t} \right]_0^t \quad (2-60)$$

$$e^{k_2 t} [B] = k_1 [A]_0 \left\{ \frac{1}{k_2 - k_1} e^{(k_2 - k_1)t} - \frac{1}{k_2 - k_1} \right\}$$

$$e^{k_2 t} [B] = \frac{k_1 [A]_0}{k_2 - k_1} \{ e^{(k_2 - k_1)t} - 1 \}$$

$$[B] = \frac{k_1 [A]_0}{k_2 - k_1} (e^{-k_1 t} - e^{-k_2 t}) \quad (2-61)$$

[C]について

$$[A]_0 = [A] + [B] + [C] \quad (2-62)$$

$$[C] = [A]_0 - [A] - [B]$$

[A]と[B]を代入する

$$[C] = [A]_0 - [A]_0 e^{-k_1 t} - \frac{k_1 [A]_0}{k_2 - k_1} (e^{-k_1 t} - e^{-k_2 t})$$

$$[C] = [A]_0 \left\{ 1 - e^{-k_1 t} - \frac{k_1 [A]_0}{k_2 - k_1} (e^{-k_1 t} - e^{-k_2 t}) \right\}$$

$$[C] = [A]_0 \left\{ 1 + \frac{k_1}{k_1 - k_2} \left(-\frac{k_1 - k_2}{k_1} e^{-k_1 t} + e^{-k_1 t} - e^{-k_2 t} \right) \right\}$$

$$[C] = [A]_0 \left\{ 1 + \frac{1}{k_1 - k_2} (k_2 e^{-k_1 t} - k_1 e^{-k_2 t}) \right\} \quad (2-63)$$

[A]、[B]、[C]の関数のシミュレーションを以下に示す（図 2-16）。

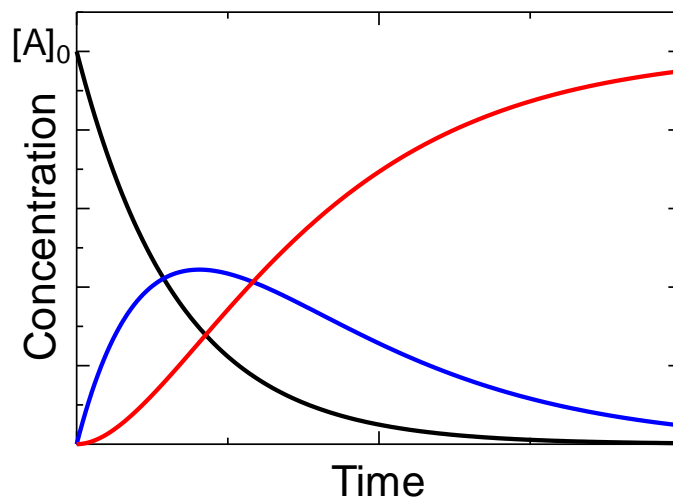


図 2-16、逐次反応 $k_1 \neq k_2$ の場合による時間と濃度の関係（A：黒、B：青、C：赤）

2-8-4-2. 逐次反応 ($k_1 = k_2$ の場合)

一段階目の反応と、二段階目の反応性が等しい $k_1 = k_2$ の場合について考える。



$$\frac{d[A]}{dt} = -k_1[A] \quad (2-65)$$

$$\frac{d[B]}{dt} = k_1[A] - k_1[B] \quad (2-66)$$

$$\frac{d[C]}{dt} = k_2[B] \quad (2-67)$$

上記の連立微分方程式を解くことで逐次反応の関数を得る

[A]について

$$\frac{d[A]}{dt} = -k_1[A]$$

$$\frac{d[A]}{[A]} = -k_1 dt$$

ここで、初期値 $t=0$ において、A の濃度を $[A]_0$ とする

$$\int_{[A]_0}^{[A]} \frac{d[A]}{[A]} = -k_1 \int_0^t dt \quad (2-68)$$

$$[\ln[A]]_{[A]_0}^{[A]} = -k_1 [t]_0^t$$

$$\ln\left(\frac{[A]}{[A]_0}\right) = -k_1 t$$

$$\frac{[A]}{[A]_0} = e^{-k_1 t}$$

$$[A] = [A]_0 e^{-k_1 t} \quad (2-69)$$

[B]について

$$\frac{d[B]}{dt} = k_1[A] - k_1[B]$$

[A]を代入する

$$\frac{d[B]}{dt} = k_1[A]_0 e^{-k_1 t} - k_1[B]$$

$$\frac{d[B]}{dt} + k_1[B] = k_1[A]_0 e^{-k_1 t} \quad (2-70)$$

ここで定数変化法を用いると、微分方程式を下記のように変形できる

$$\frac{dy}{dx} + yf(x) = g(x) \quad (2-71)$$

$$e^{\int f(x)dx} y = \int e^{\int f(x)dx} g(x)dx + C \quad (2-72)$$

これより、

$$e^{\int_0^t k_1 dt} [B] = \int_0^t e^{\int_0^t k_1 dt} k_1 [A]_0 e^{-k_1 t} dt \quad (2-73)$$

$$e^{k_1 t} [B] = \int_0^t e^{k_1 t} k_1 [A]_0 e^{-k_1 t} dt$$

$$e^{k_1 t} [B] = k_1 [A]_0 \int_0^t e^{(k_1 - k_1)t} dt$$

$$e^{k_1 t} [B] = k_1 [A]_0 \int_0^t e^0 dt$$

$$e^{k_1 t} [B] = k_1 [A]_0 [t]_0^t$$

$$e^{k_1 t} [B] = k_1 t [A]_0$$

$$[B] = k_1 t [A]_0 e^{-k_1 t} \quad (2-74)$$

[C]について

$$[A]_0 = [A] + [B] + [C] \quad (2-75)$$

$$[C] = [A]_0 - [A] - [B]$$

[A]と[B]を代入する

$$[C] = [A]_0 - [A]_0 e^{-k_1 t} - k_1 t [A]_0 e^{-k_1 t}$$

$$[C] = [A]_0 (1 - e^{-k_1 t} - k_1 t e^{-k_1 t}) \quad (2-76)$$

[A]、[B]、[C]の関数のシミュレーションを以下に示す (図 2-17)。

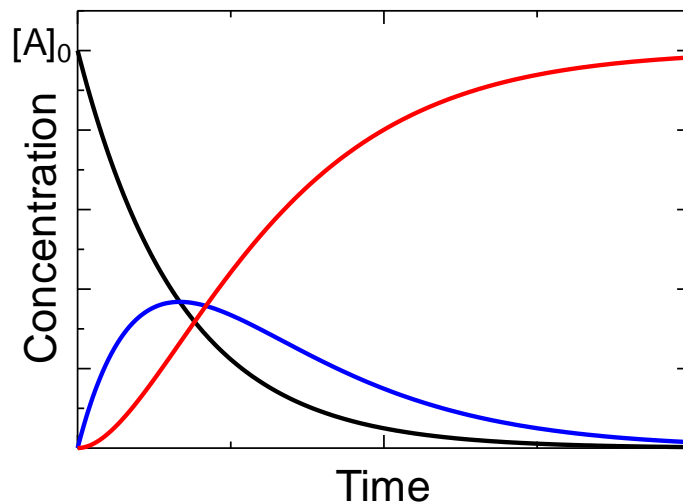


図 2-17、逐次反応 $k_1=k_2$ の場合による時間と濃度の関係 (A : 黒、B : 青、C : 赤)

逐次反応において、 $k_1=k_2$ 及び $k_1 \neq k_2$ 場合について微分方程式を解くことで関数を得た。それらの関数はほぼ同様の曲線を示した。また、 $k_1 \neq k_2$ の場合でも[C]がシグモイド曲線を示すことが確認された。

参考文献

1. 佐々木陽一、石谷治、金属錯体の光化学、三共出版 (2007).
2. 山内清語、野崎浩一、配位化合物の電子状態と光物理 (2010).
3. 水口仁、顔料結晶における励起子相互作用と J 会合体との関連性について、日本写真学会誌、**70**、268-277 (2007).
4. 原田宣之、中西香爾、円二色性スペクトルー有機立体化学への応用一、東京化学同人 (1982).
5. 小林長夫、村中厚哉、円偏光二色性および磁気円偏光二色性を用いた有機分子の幾何構造・電子構造の高精度解析、有機合成化学協会誌 (2006).
6. 廣橋亮、坂本恵一、奥村映子、機能性色素としてのフタロシアニン、アイピーシー (2004).
7. Lozinsky, E. *et al.* Dual fluorophore–nitroxide probes for analysis of vitamin C in biological liquids. *J. Biochem. Biophys. Methods* **38**, 29-42 (1999).
8. Lozinsky, E. *et al.* Effect of ionic strength on the binding of ascorbate to albumin. *Biochim. Biophys. Acta* **1571**, 239-244 (2002).
9. Lozinsky, E. *et al.* Effect of albumin on the kinetics of ascorbate oxidation. *Biochim. Biophys. Acta* **1526**, 53-60 (2001).
10. Liu, Y., Liu, S. & Wang, Y. TEMPO-based redox-sensitive fluorescent probes and their applications to evaluating intracellular redox status in living cells. *Chem. Lett.* **38**, 588-589 (2009).
11. Li, P. *et al.* A new highly selective assay for fluorescence imaging of OH in living cells: effectively avoiding the interference of peroxynitrite. *Chem. Eur. J.* **16**, 1834-1840 (2010).
12. Liu, Y., Zhu, M., Xu, J., Zhang, H. & Tian, M. Using a TEMPO-based fluorescent probe for monitoring oxidative stress in living cells. *Analyst* **136**, 4316-4320 (2011).
13. Morrow, B. J., Keddle, D. J., Gueven, N., Lavin, M. F. & Bottle, S. E. A novel profluorescent nitroxide as a sensitive probe for the cellular redox environment. *Free radical Biol. Med.* **49**, 67-76 (2010).
14. Cao, L., Wu, Q., Li, Q., Shao, S. & Guo, Y. Visualizing the changes in the cellular redox environment using a novel profluorescent rhodamine nitroxide probe. *New J. Chem* **37**, 2991-2994 (2013).
15. Hirosawa, S., Arai, S. & Takeoka, S. A TEMPO-conjugated fluorescent probe for monitoring mitochondrial redox reactions. *Chem. Commun.* **48**, 4845-4847 (2012).
16. Yang, T. *et al.* A sensitive and selective chemosensor for ascorbic acid based on a fluorescent nitroxide switch. *Talanta* **132**, 191-196 (2015).
17. Wang, J., Ni, Y. & Shao, S. A reversible fluorescence probe for detection of ClO⁻/AA redox cycle in aqueous solution and in living cells. *Talanta* **147**, 468-472 (2016).

18. Song, B. *et al.* Background-free in-vivo imaging of vitamin C using time-gateable responsive probe. *Scientific reports* **5**, 14194 (2015). DOI: 10.1038/srep14194
19. Sowers, M. A. *et al.* Redox-responsive branched- bottlebrush polymers for *in vivo* MRI and fluorescence imaging. *Nat. Commun.* **5**, 5460 (2014).
20. Ishii, K., Kubo, K., Sakurada, T., Komori, K. & Sakai, Y. Pthalocyanine-based fluorescence probes for detecting ascorbic acid: phthalocyaninatosilicon covalently linked to TEMPO radicals. *Chem. Commun.* **47**, 4932-4934 (2011).
21. Ishii, K., Hirose, Y., Fujitsuka, H., Ito, O. & Kobayashi, N. Time-resolved EPR, fluorescence, and transient absorption studies on phthalocyaninatosilicon covalently linked to one or two TEMPO radicals. *J. Am. Chem. Soc.* **123**, 702-708 (2001).
22. Ishii, K. *et al.* *In vitro* photodynamic effects of phthalocyaninatosilicon covalently linked to 2,2,6,6-tetramethyl-1-piperidinyloxy radicals on cancer cells. *Free radical Biol. Med.* **38**, 920-927 (2005).
23. Ishii, K., Hirose, Y. & Kobayashi, N. Selective population from the excited multiplet states to the triplet states to the triplet ground state in a phthalocyanine: a new concept for controlling magnetic properties by photoexcitation. *J. Am. Chem. Soc.* **120**, 10551-10552 (1998).
24. Ishii, K., Hirose, Y. & Kobayashi, N. Electron spin polarizations of phthalocyaninatosilicon covalently linked to one TEMPO radical in the excited quartet and doublet ground states. *J. Phys. Chem. A* **103**, 1986-1990 (1999).
25. Ishii, K., Takeuchi, S., Shimizu, S. & Kobayashi, N. A concept for controlling singlet oxygen ($^1\Delta_g$) yields using nitroxide radicals: phtalocyaninatosilicon covalently linked to nitroxide radicals. *J. Am. Chem. Soc.* **126**, 2082-2088 (2004).
26. 白浜啓四郎、杉原剛介、井上亨、柴田攻、山口武夫、生物物理化学の基礎－生体现象理解のために－、三共出版 (2003).

第 3 章

親水性置換基を導入した R2c

第3章 親水性置換基を導入した R2c

3-1. 緒言

当研究室では、疎水性 R2c をリポソームに取り込ませることで、ガン細胞中でのビタミン C バイオイメージングに初めて成功している¹。しかし、リポソームによりラジカルが過度に保護されているため、感度・反応速度の観点から改善が必要であった。そこで本研究では、R2c を基盤とする高反応性の蛍光プローブの開発を行った。

リポソームに疎水性 R2c を取り込んだ場合、R2c はリポソーム内側の疎水性領域に分布する (図 3-1)。このため、疎水性領域まで入り込んだビタミン C とのみ R2c は反応するため、感度と反応速度には改善が必要である。R2c に親水性置換基を導入することで、リポソーム外側の親水性領域付近に蛍光プローブを分布させることができれば、反応性が改善できると考えた (図 3-1)。本研究では、①フタロシアニンへのスルホ基導入が光線力学的ガン治療研究において実績があること、②TEMPO の導入反応においてトルエン溶媒の利用が望ましいこと等の観点から^{1,2}、1つのスルホ基を導入した R2cS₁ を合成し、ビタミン C との反応を調べた。

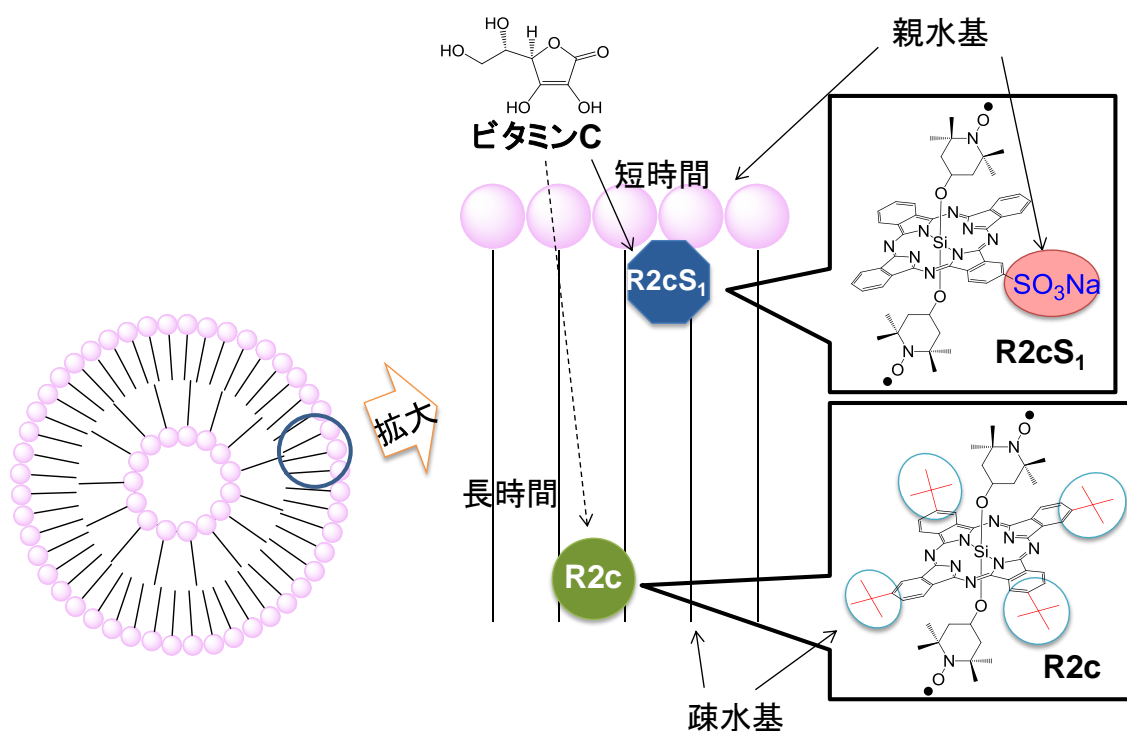


図 3-1、リポソーム中における R2c と R2cS₁ のビタミン C との反応

3-2. 結果と考察

3-2-1. R2c について

R2cS₁ 合成の参考にした R2c の合成とその光化学的性質について初めに述べる。SiPc は電子スピンの全てが対になった反磁性の分子であるのに対し、R2c は電子スピンの対になっていないラジカルを持つ常磁性の分子を組み合わせた分子である。この分子は第二章で示したスピン交換による蛍光消光作用が生じ、ユニークな物性を示す¹⁻⁷。当研究室では、R2c を利用することでガン細胞中のビタミン C 検出に初めて成功している³。

3-2-1-1. R2c の合成^{1,2,8}

R2c 合成は、初めに、フタロニトリルにアンモニアガスを加えて反応させることで、イソインドリンを形成させる (図 3-2)。そのイソインドリンに SiCl₄ を加えてキノリン中で還流することでケイ素フタロシアニン (SiPc) を合成した。SiPc への TEMPO ラジカル導入には、反応中にラジカルが消失しない可能な限り温和な条件が求められた。その際、トルエン中での脱水反応がラジカルを消失させず効率よく TEMPO ラジカルを導入することに有効であった^{1,2,8}。反応により TEMPO ラジカルの一置換体 R1c と TEMPO ラジカル二置換体 R2c が合成されるが、クロマトグラフィーを行い、R2c を単離して使用した。

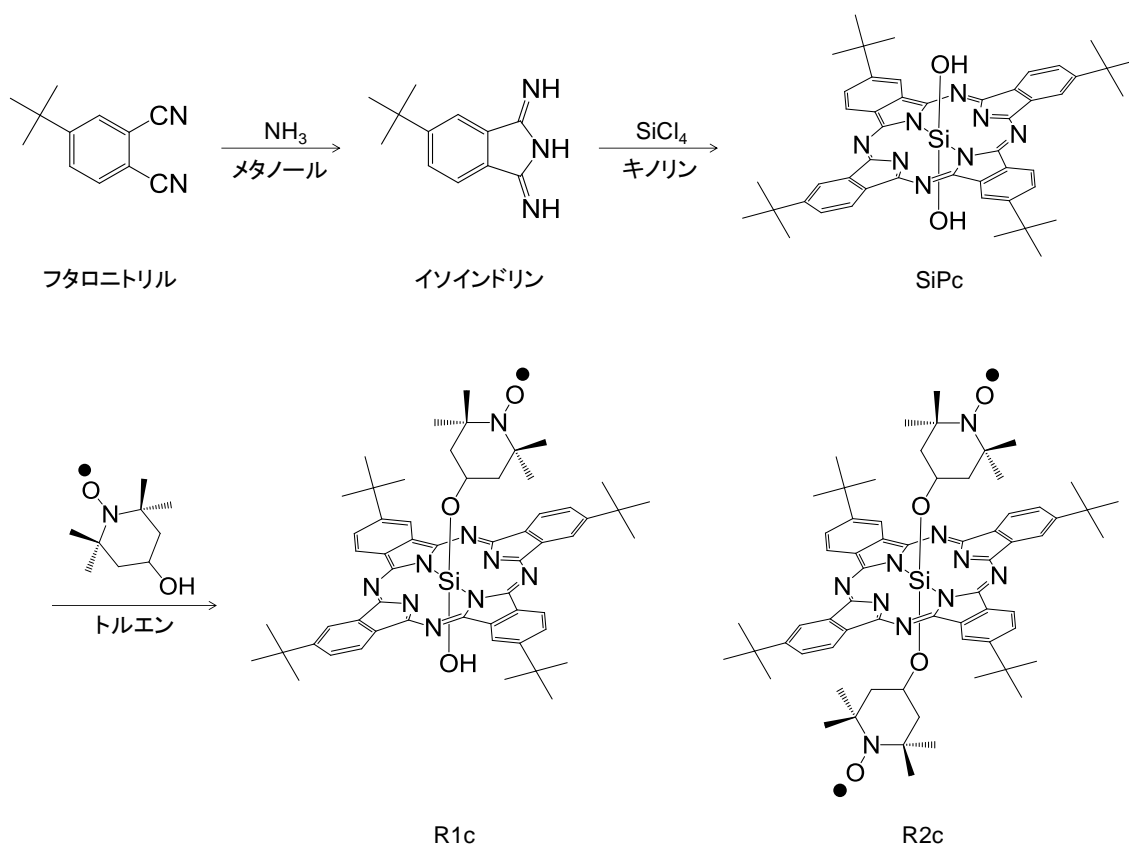


図 3-2、R2c の合成

ESR の測定により、二つのラジカルが存在していることを示すスピン相関ラジカル対の確認を行っている (図 3-3)。R2c は、二つの TEMPO ラジカルを有することで、TEMPO ラジカルを一つだけ有する R1c より強く消光されており、ビタミン C の添加により顕著な蛍光強度の増大が見込める。また、R2c は軸配位に嵩高い TEMPO ラジカルを二つ有することで、分子間での会合を抑制し、より強い蛍光を示す状態を維持することにも寄与している。

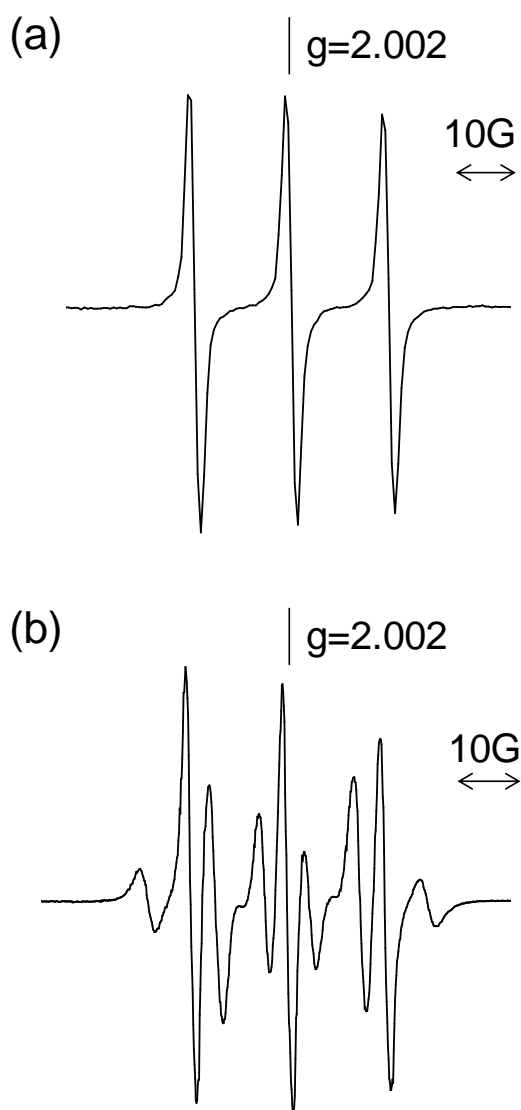


図 3-3、TEMPO (a) と R2c (b) の ESR スペクトル

3-2-1-2. R2c の光化学的性質

トルエン中 R2c の電子吸収スペクトルの測定を行った (図 3-4a)。R2c の吸収は、SiPc の Q 帯由来の強い吸収が 680 nm 付近に観測され、バンド幅は 18 nm であった。また、Soret 帯由来の吸収が 350 nm 付近に観測され、バンド幅は 45 nm であった。また、600 nm 付近と 650 nm 付近では、振電バンドに由来する弱い吸収が観測されている。上記のように、シャープな Q 吸収帯とその振電バンドの観測から、R2c の会合がほとんど生じていないことが確認できる。一方、TEMPO ラジカルの $n\pi^*$ 由来の吸収が 450 nm 付近に存在するが、吸光係数が非常に小さいため、R2c の吸収スペクトルからはほとんど観測できない。これより、R2c の電子吸収スペクトルは、ほぼ SiPc に由来する吸収スペクトルであることが確認された。

続いて、R2c の蛍光スペクトルの測定を行った (図 3-4b)。ダイオードレーザー (650 nm) を励起光源として測定した。ここでは、R2c がビタミン C の添加により蛍光強度が増大するため、ビタミン C 添加前後での蛍光スペクトルを示している。この際、トルエンより R2c に対する溶解性が低い、ビタミン C も溶解させることができるメタノールを溶媒として利用している。メタノール中 R2c へのビタミン C 添加前後 (最終濃度 10 mM) の蛍光スペクトルの比較を行ったところ、顕著な蛍光強度の増大が観測された。ビタミン C 添加後、約 30 分で蛍光強度が 50 倍程度に増大している。複数回の実験で、この蛍光強度の増大は 50-60 倍程度増大する様子が観測されている。これは、SiPc の Φ_F が 0.57 で、R2c の Φ_F が 0.012 であるため、その比 47.5 におおよそ対応している。R2c の蛍光スペクトルのバンド幅は 22 nm で、Q 帯の吸収スペクトルのバンド幅と同程度であった。

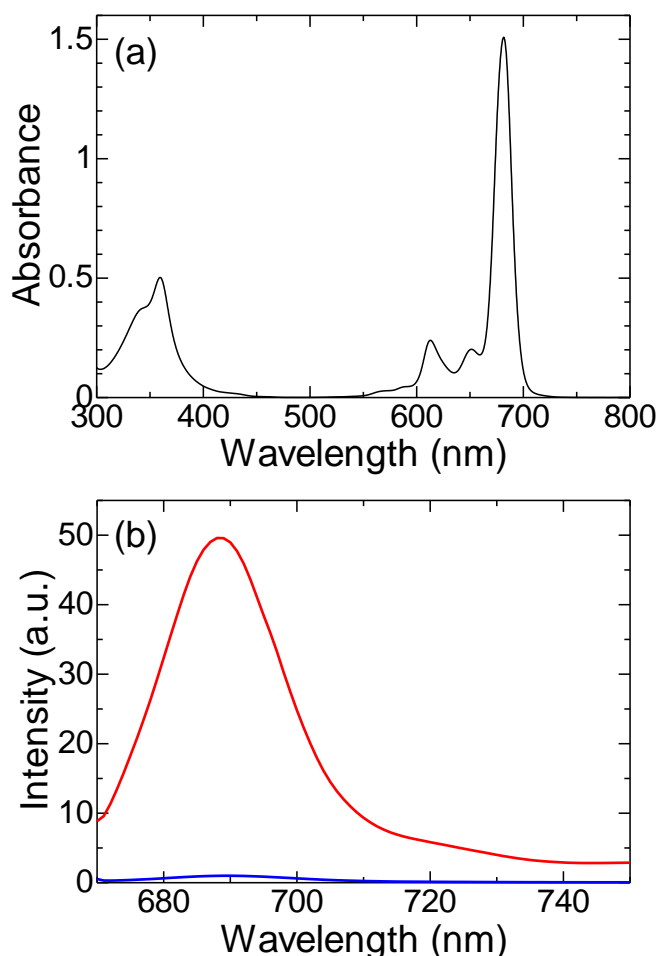
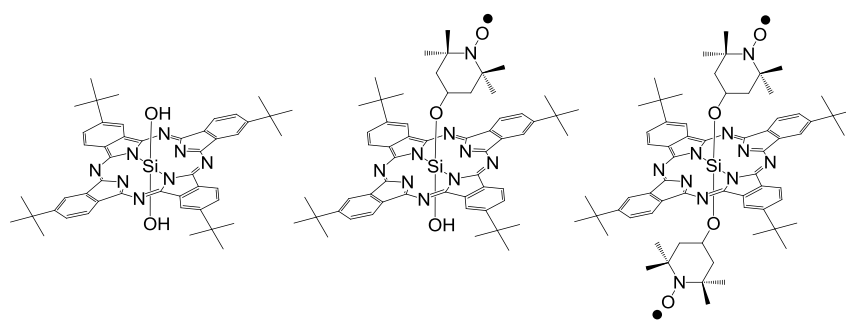


図 3-4、R2c の電子吸収スペクトル (a) とビタミン C 添加前後の蛍光スペクトル (b、投与前：青、投与後：赤)



	SiPc	R1c	R2c
蛍光量子収率	0.57	0.21	0.012
項間交差量子収率	0.34	0.59	0.67
一重項酸素量子収率	0.31	0.46	0.61
励起一重項状態寿命	6.8±0.4 ns	42±4 ps (~75%) 4.7±0.3 ns (~25%)	<30 ps (~90%) 4.7±0.3 ns (~10%)
励起三重項状態寿命	500±30 μs	7.6±0.3 μs	3.7±0.4 μs

図 3-5、TEMPO ラジカル結合型 SiPc の光化学的性質

SiPc に結合した TEMPO ラジカルの数に応じて蛍光強度が顕著に消光される様子が蛍光量子収率の観点から確認できる (図 3-5) ²⁻⁶。この消光作用は、第二章で述べたスピン交換によるものである。これより、TEMPO ラジカルの結合数が増えるほど、SiPc 部分の磁氣的性質が変化する遷移に対して、許容な遷移が増え、項間交差及び一重項酸素発生量子収率が増大し、励起寿命が短くなる。

3-2-1-3. R2c の電子構造

R2c の分子軌道及びそのエネルギーを求めるため、量子化学計算を行った (図 3-6)。本研究では、半経験的な手法の一つである PM3 (Parameterized Model number 3) 法を用いて、R2c の構造最適化を行っている。この方法は、積分近似 (Neglect of Diatomic Differential Overlap、NDDO) を基にしており、原子間の軌道の微分重なりを無視した近似計算である。

PM3 法により最適化した R2c の構造を基に、半経験的な分子軌道の計算手法である ZINDO/S (Zerner Intermediate Neglect of Differential Overlap for Spectroscopy) を用いて、その電子構造を計算した。これは、Zerner 教授が提案した INDO 法で、計算に使用される原子のパラメーターはほとんど Zerner 教授によって報告されたデータを基にしている。INDO/S 法は、電子間反発積分の微分重なりの一部を無視することで計算しており、同一原子内の電子間反発を示す一中心電子間反発積分を評価している。この計算方法は、

電子間反発積分の微分重なりを全て無視する CNDO/S (Complete Neglect of Differential Overlap) 法に比べて精度が高いとされている。R2c の HOMO-1、HOMO、LUMO、LUMO+1 の電子構造では、SiPc の電子構造を反映しており、TEMPO は独立で存在していることが確認された。また、それぞれの軌道でのエネルギーを求めたところ、LUMO、LUMO+1 のエネルギーは近く、ほぼ縮重していることが確認された。これは、R2c の電子吸収スペクトルにおいて、Q 吸収帯の e_{gx} と e_{gy} 軌道が縮重することで強い吸収を示すことと一致している。

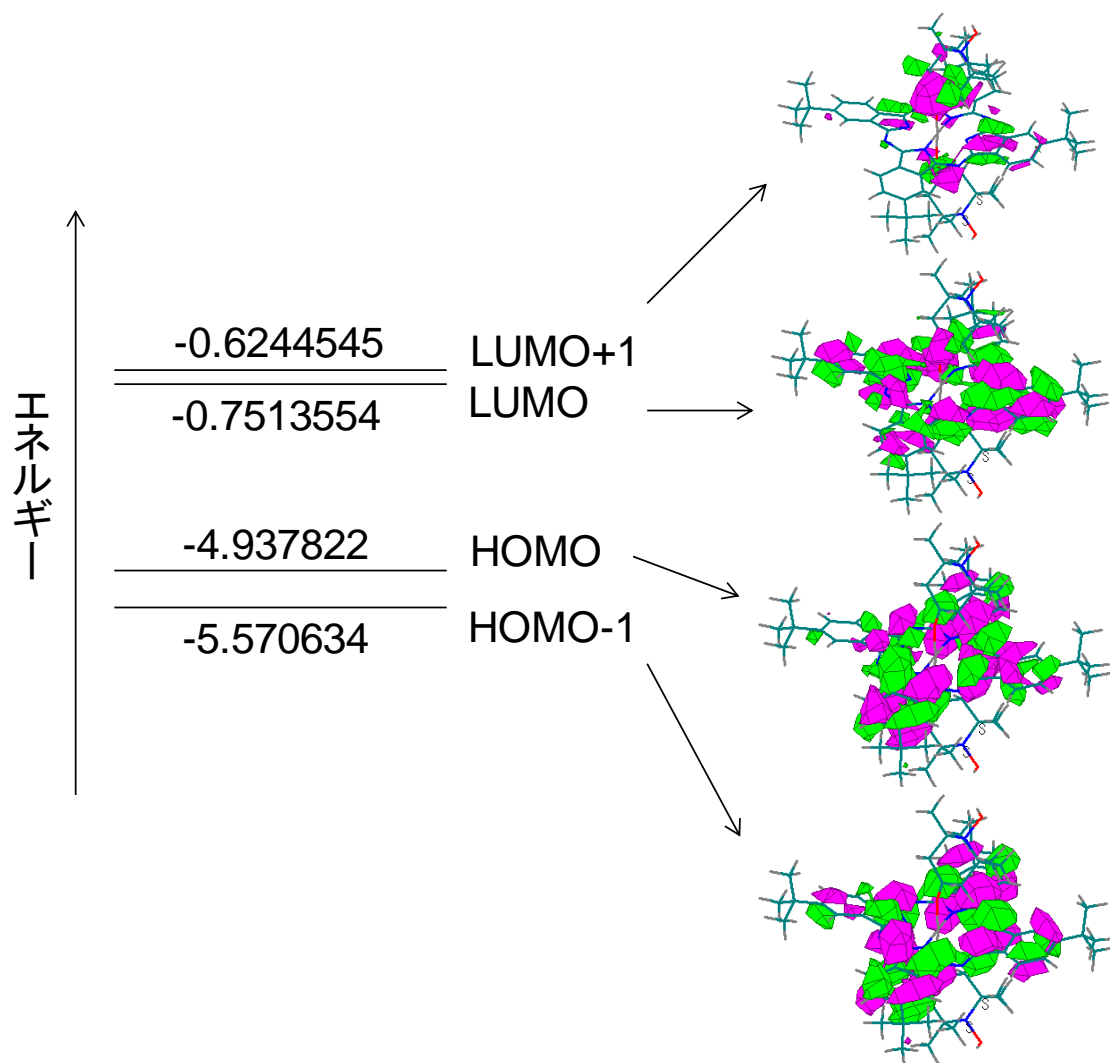


図 3-6、R2c の分子軌道と分子軌道エネルギーダイアグラム

3-2-1-4. R2c の蛍光強度時間変化

メタノール中の R2c のビタミン C 添加後の蛍光強度時間変化を測定した (図 3-7)。これにより、ビタミン C の添加で蛍光強度の増大が観測された。ビタミン C 添加直後から蛍光強度の増大が観測されるものの、序盤は緩やかに増大し、その後急激に蛍光強度が増大している。この蛍光強度時間変化は、一次反応や、二次反応に見られる指数関数的な増大が観測されるのではなく、S 字のシグモイド曲線を示していた。R2c とビタミン C の反応では、反応部位となる TEMPO ラジカルが二つ存在する

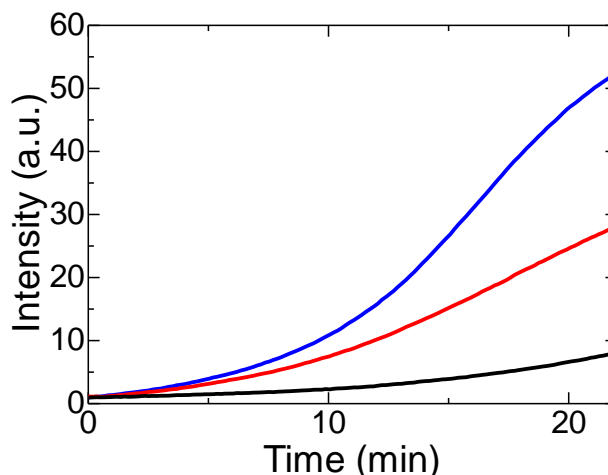


図 3-7、R2c のビタミン C 添加後 (最終濃度 1 mM (黒)、5 mM (赤)、10 mM (青)) の蛍光強度時間変化

ことで、それぞれの反応部位とビタミン C が逐次反応が生じると予想される (図 3-8)。ここで、TEMPO ラジカルが一つ還元された分子を R2c₁、二つ還元された分子を R2c₀ と名付けた。また、R2c の蛍光強度の増大は添加したビタミン C 濃度に依存して増大する様子が観測された。

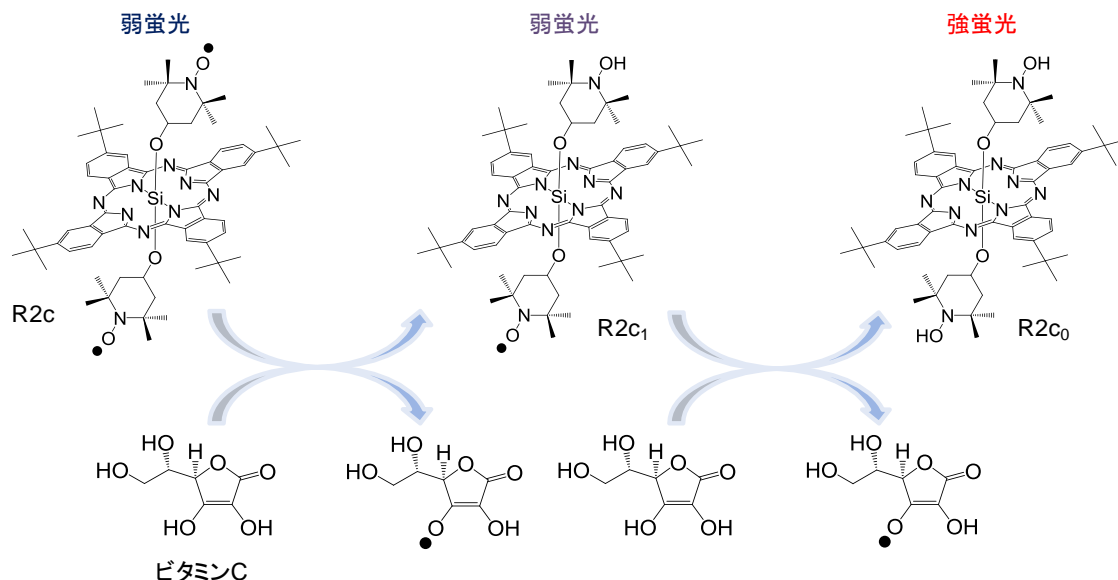


図 3-8、R2c とビタミン C の反応スキーム

3-2-1-5. R2c の蛍光強度時間変化の温度依存性

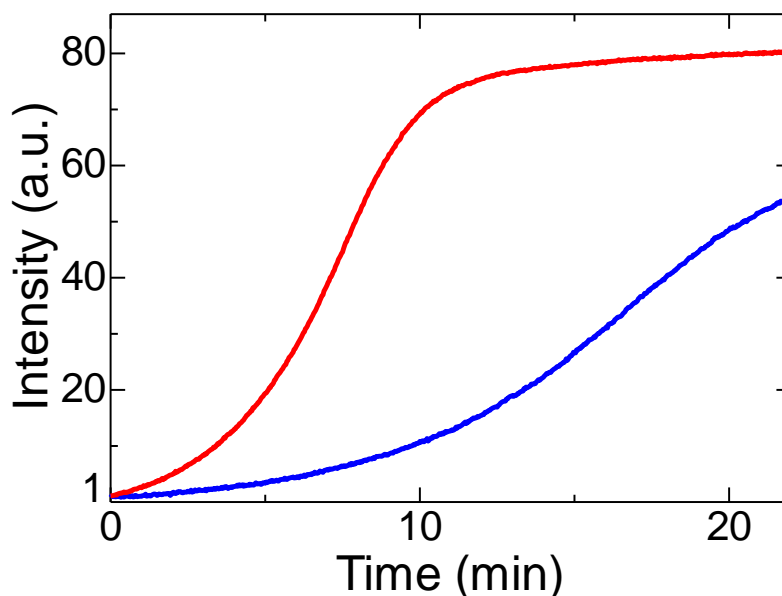


図 3-9、R2c の蛍光強度時間変化の温度依存性 (25°C : 青、35°C : 赤)

通常の化学反応は温度の上昇に依存して反応速度が向上する。これは、分子の熱運動が大きくなるため、反応速度定数はアレニウスの式に従う。

$$k = A \exp\left(-\frac{E_a}{RT}\right)$$

A は温度に依存しない頻度因子、 E_a は活性化エネルギー、R は気体定数、T は絶対温度を示す。ここで、R2c に関して温度の上昇により、蛍光強度の増大が加速される様子を確認した。これは、第四章における高感度化したビタミン C 検出用蛍光プローブ R2c@(BSA)₂ との比較実験である。第四章において、R2c をタンパク質 BSA と複合化させた R2c@(BSA)₂ は、25~45°C の範囲内において、温度が低い方が蛍光強度の増大が早く大きいことが観測されている。本実験では、室温 25°C と 35°C での蛍光強度時間変化の比較を行った。この結果、R2c@(BSA)₂ のビタミン C 添加後の蛍光強度時間変化とは異なり、R2c とビタミン C の蛍光強度の増大は温度が高いほど早くなることが確認された (図 3-9)。これより、R2c とビタミン C 間の反応だけなら、通常の反応と同様に温度の上昇で、分子の熱運動が大きくなり、分子間の衝突頻度が増大することで反応がより進行しやすくなることが確認された。

3-2-2. リポソーマル R2c について

疎水性の R2c は水溶液中での利用を可能にするため、ジパルミトイルホスファチジルコリン (Dipalmitoylphosphatidylcholine、DPPC) を基にしたリポソームに取り込ませて利用する。リポソームは脂質二重膜を形成し、その内部に分子を取り込ませることができる。これにより、疎水性の R2c を細胞中、及び生体内に存在する様々な酸化還元物質との反応を抑えながらもビタミン C とは反応できる蛍光プローブのリポソーマル R2c の作成に成功した (図 3-10) ³。

3-2-2-1. リポソーマル R2c の合成

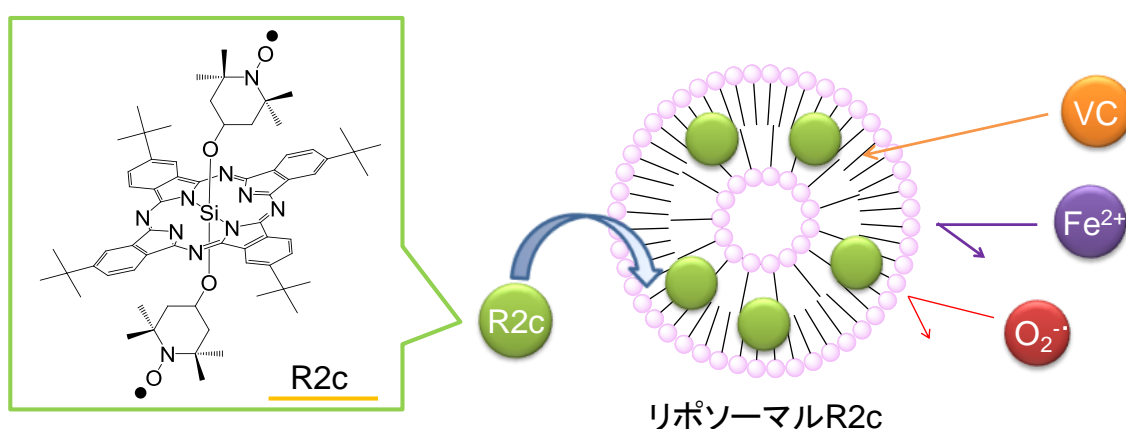


図 3-10、リポソーマル R2c の調整とラジカル保護

リポソーム中に R2c を取り込ませるため、初めに、R2c をテトラヒドロフラン (tetrahydrofuran、THF) に溶解させ、クロロホルムに溶解させた DPPC を加えて混合させた後、減圧留去する。これに純水とガラスビーズを加えてボルテックスミキサーで攪拌することでフィルム状に乾固した R2c を剥がし取った。その R2c を水中に溶解させるため、超音波処理を行った。最後に、遠心分離することで青色の沈殿と淡青色の上澄みに分かれるので、淡青色の上澄みのみ取り出しリポソームに取り込まれた R2c (リポソーマル R2c) を得ている (図 3-10)。

調整したリポソーマル R2c について、リポソームへの R2c の取り込み量を調べるため、N,N-ジメチルホルムアミド (N,N-dimethylformamide、DMF) で希釈して電子吸収スペクトルを測定している。DMF による希釈を行うことで、リポソームが壊れて、DMF に溶解した R2c の吸収スペクトルを得ることができる。この吸収スペクトルを基に希釈する前のリポソームに取り込まれた R2c の取り込み量を概算した。リポソーマル R2c の調整を複数回行ったところ、リポソームへの取り込み量は $3.0\sim 6.5\times 10^{-5}$ M 程度 (特に $5.0\sim 6.5\times 10^{-5}$ M であることが多い) となった。このリポソームは、数日程度では、

溶液や吸収スペクトルに大きな違いは見られないが、1週間程度経過すると沈殿が観測される。このため、リポソーマル R2c は調整した当日から翌日にかけて使用することになっている。

3-2-2-2. リポソーマル R2c の粒度分布

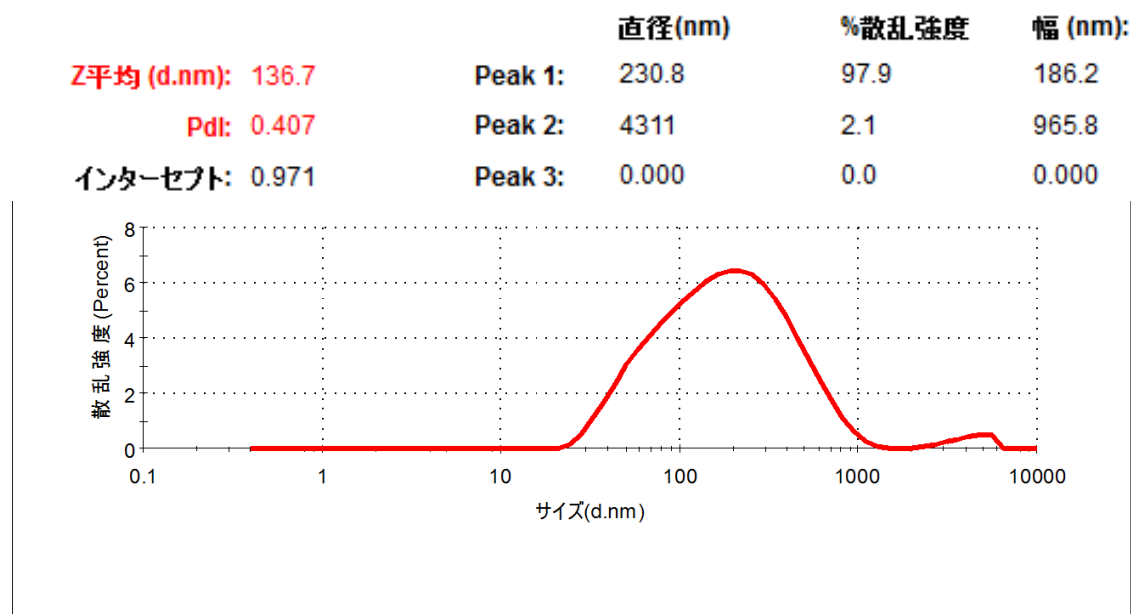


図 3-11、リポソーマル R2c の散乱強度別粒経分布

リポソーマル R2c の粒経分布を調べるため、動的光散乱法 (Dynamic light scattering、DLS) を用いた粒経分布を測定した (図 3-11)。この結果、Peak1 よりリポソーマル R2c のサイズが 230 nm 付近にピークを持ち、40 nm から 1000 nm 程度の広範囲にわたるサイズ分布を持つことが明らかとなった。これは、本研究の条件で調整されるリポソームのサイズ分布が広いことを示している。また、リポソーム一つの大きさにばらつきがあるだけでなく、リポソーム同士の凝集が生じていることで一つのリポソームの 10 倍以上の大きさになっているものが検出されたと考えられる。この凝集に関しては、次のゼータ電位の測定結果と一致している。

また、Peak 2 は、4000 nm を超えており、幅も 965.8 nm と非常に大きな粒経分布を示している。これは、リポソームに取り込まれず、凝集した R2c が遠心分離した上澄みにわずかに残っていたためと考えられる。または、埃等の不純物が測定の際に混入してしまったためと考えられる。

3-2-2-3. リポソーマル R2c のゼータ電位

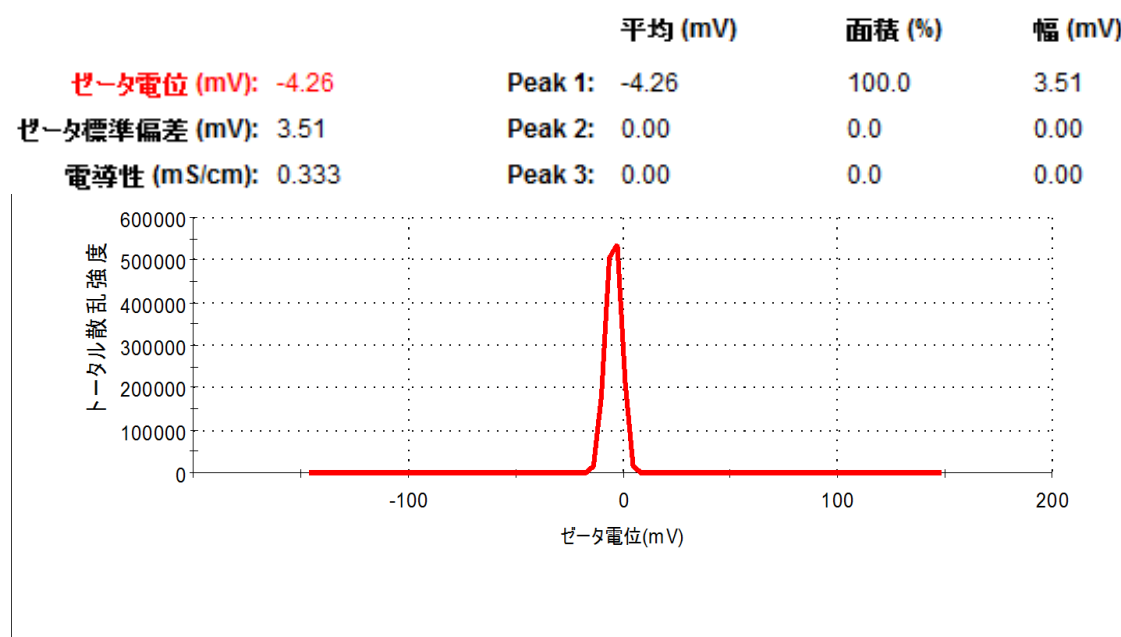


図 3-12、リポソーマル R2c のゼータ電位分布

リポソーマル R2c の粒子の安定性を調べるため、ゼータ電位分布の測定を行った (図 3-12)。溶液中に存在する粒子の多くは電荷を帯びており、その溶液中の粒子の安定性は電荷の状態に依存する。この安定性の指標となるのがゼータ電位である。溶液中では、粒子そのものの電荷で存在しているのではなく、電荷を持つ粒子に対し、それとは反対の電荷を持つイオン等が覆い、電気二重層を形成する。この層により、粒子イオンの反発力が生じる。その更に外側には、粒子と逆の電荷のイオンが粒子から離れるにつれて減少し、粒子と同じ電荷を持つイオンは粒子から離れるにつれて増大する。この粒子の周りにイオンを伴った状態で粒子が溶液中を移動すると、粒子近傍のイオンは粒子と共に移動するが、粒子から離れたイオンは粒子の移動から外れる。この境界は滑り面と呼ばれ、滑り面と粒子から十分に離れた領域の電位との差をゼータ電位としている。

ゼータ電位を測定するために、電場を印加することで、その電荷に応じて粒子が泳動するため、泳動させた状態で光を照射してその散乱光を検出することで粒子のゼータ電位を測定することができる。

ゼータ電位の絶対値が高いほど、粒子間に働く反発力が大きくなり、それぞれの粒子が独立して存在できるため粒子としての安定性は高くなる。一方、ゼータ電位の絶対値が小さいと、粒子間の反発力は小さくなり粒子同士が凝集しやすくなるため粒子としての安定性は低くなる。

リポソーマル R2c に対してゼータ電位を測定したところ、 -4.26 mV で散乱光を検出した。また、その電位幅 3.51 mV と小さかった。これより、リポソーマル R2c はほとんど帯電していないことが確認された。ゼータ電位が低かったことから、リポソーマル R2c が独立して存在するには安定性が低く、リポソームが凝集した状態を取っていることが示唆される。これは、図 3-11 の粒径分布測定において、リポソーマル R2c の分布範囲が広いことと一致している。

3-2-2-4. リポソーマル R2c の光化学的性質

水中のリポソーマル R2c の電子吸収スペクトルの測定を行った (図 3-13a)。リポソーマル R2c の吸収は、R2c の Q 帯由来の強い吸収が 680 nm 付近に観測され、バンド幅は 24 nm であった。また、Soret 帯由来の吸収が 350 nm 付近に観測された。 600 nm 付近と 650 nm 付近では、振電バンドに由来する弱い吸収が観測されている。上記のように、R2c はリポソーム中においてもシャープな Q 吸収帯とその振電バンドが観測されたことから、R2c の会合がほとんど生じていないことが確認できる。これは、R2c が嵩高い軸配位子に TEMPO ラジカルを有するため会合が抑制されているためと考えられる。一方、TEMPO ラジカルの $n\pi^*$ 由来の吸収が 450 nm 付近に存在するが、吸光係数が非常に小さいため、リポソーマル R2c においても、R2c 吸収スペクトルと同様に吸収を観測できなかった。また、リポソーマル R2c では、 600 nm 以下の領域にブロードな吸収が観測されている。これは、リポソーム由来の吸収が影響しており、紫外領域にピークを持つリポソームの吸収帯が R2c の吸収に被っているためと考えられる。

これより、リポソーマル R2c の電子吸収スペクトルは、紫外領域に向けて大きくなる

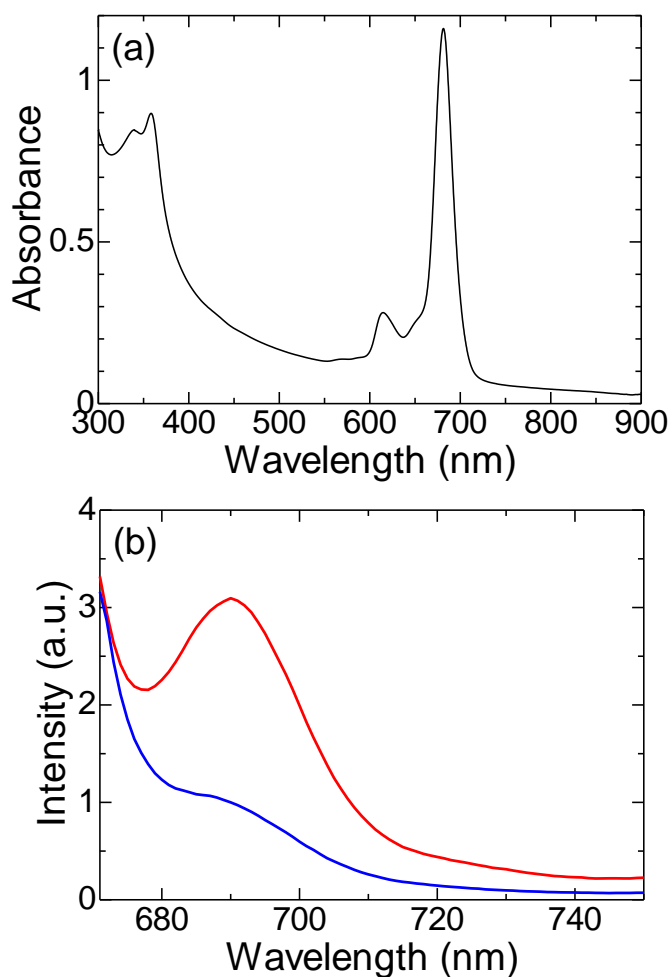


図 3-13、リポソーマル R2c の電子吸収スペクトル (a) とビタミン C 添加前後の蛍光スペクトル (b、投与前：青、投与後：赤)

リポソーム由来のブロードな吸収に R2c に由来する吸収スペクトルが混ざった吸収を示すことが確認された。

続いて、リポソーマル R2c の蛍光スペクトルの測定を行った (図 3-13b)。励起光源としてダイオードレーザー (650 nm) を用いて測定した。リポソーマル R2c も R2c 同様にビタミン C の添加により蛍光強度が増大するため、ビタミン C 添加前後での蛍光スペクトルを示している。この際、リポソーマル R2c、ビタミン C 共に溶媒には純水を用いている。リポソーマル R2c へのビタミン C 添加前後 (最終濃度 10 mM) の蛍光スペクトルの比較を行ったところ、添加後約 30 分で蛍光強度が 3 倍程度に増大する様子が観測された。SiPc の Φ_F が 0.57 で、R2c の Φ_F が 0.012 であるため、その比 47.5 を基に考えると、リポソーム中の R2c のビタミン C との反応効率は 1 割程度であることが示唆された。これは、リポソームによる過度な保護が R2c のビタミン C との衝突頻度を低下させたためと考えられる。また、リポソーマル R2c の蛍光スペクトルのバンド幅を概算すると 25 nm 程度であり、Q 帯の吸収スペクトルのバンド幅と同程度であった。

3-2-2-5. リポソーマル R2c の蛍光強度時間変化

リポソーマル R2c を含む水溶液にビタミン C を添加したところ蛍光強度の増大が観測された (図 3-14)。この蛍光強度の増大は添加したビタミン C 濃度に依存して増大する様子が観測されている。図 3-7 より、メタノール中 R2c の場合、ビタミン C の添加後、シグモイド曲線を示したのに対し、リポソーマル R2c の蛍光強度時間変化は、指数関数的な増大を示している。R2c は反応部位となる TEMPO ラジカルを二つ持つため、二つの反応部位がビタミン C と逐次反応を生じると考えられる。しかし、リポソーマル R2c の蛍光強度時間変化はシグモイド曲線を示さなかった。これは、ビタミン C のリポソームへの侵入が R2c とビタミン C 間の反応よりも有意に遅く、律速段階になっているためと説明できる。また、この反応ではリポソーム中へのビタミン C の侵入過程を含むため、R2c とビタミン C の衝突頻度が低下してしまうことが蛍光強度の増大が小さい原因と考えられる。このため、ビタミン C との反応性に改善点を有しており、1 mM のビタミン C に対して蛍光の増大は非常に小さく、ビタミン C の検出限界は mM オーダー程度であった。

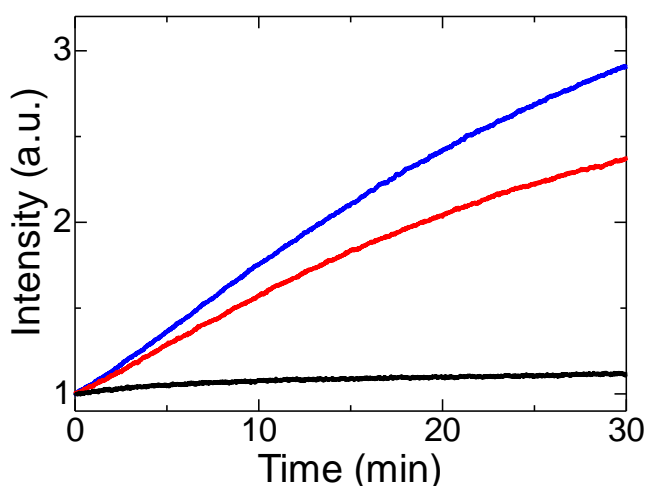


図 3-14、リポソーマル R2c のビタミン C 添加後 (最終濃度 1 mM (黒)、5 mM (赤)、10 mM (青)) の蛍光強度時間変化

3-2-3. R2cS₁について

リポソーム外側の親水性領域付近に R2c を分布させた高反応性の新規蛍光プローブ開発のため、①フタロシアニンへのスルホ基導入が光線力学的ガン治療法の研究において実績があること、②TEMPO の導入反応においてトルエン溶媒の利用が望ましいこと等の観点から、スルホ基を1つ導入した R2cS₁ を合成し、その物性を評価した。

3-2-3-1. R2cS₁ の合成^{1,2}

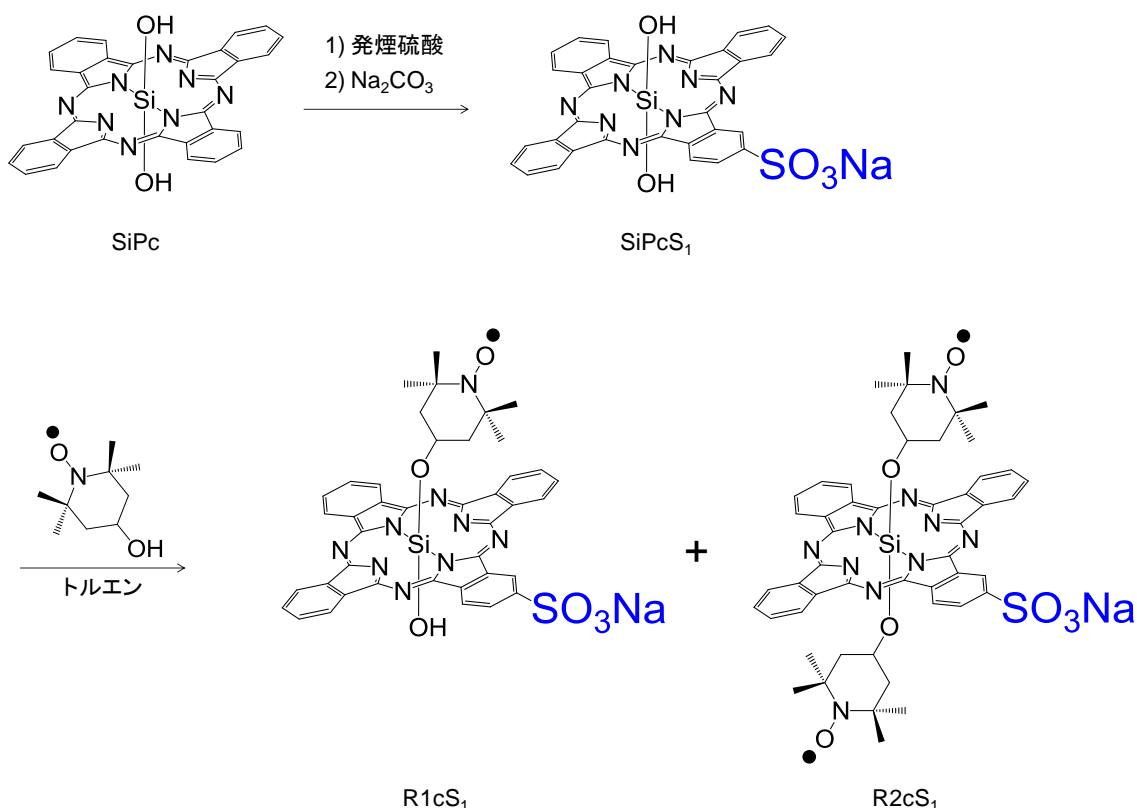


図 3-15、R2cS₁ の合成スキーム

SiPc に発煙硫酸を反応させることでスルホ化を行った (図 3-15)。この時、スルホ基一置換体 (SiPcS₁) から四置換体 (SiPcS₄) まで反応が進行する。中でもスルホ基二置換体 (SiPcS₂) から四置換体 (SiPcS₄) (付録 3-1) はそれぞれ複数の構造異性体が存在する。理論上はスルホ基結合型 SiPc 誘導体が 17 種類合成され、原料の SiPc も含めると、反応系中に 18 種類の SiPc 誘導体が存在することになる。実際に、TLC 上では 10 以上にスポットが観測された。従来の R2c 合成の際、SiPc への TEMPO ラジカルを導入はトルエン中での脱水反応が TEMPO ラジカルを消失させず、効率よく反応させるのに有効であったため、トルエンへの溶解性が期待されるスルホ基の最も少ない一置換体 SiPcS₁ の利用を考えた。

R2cS₁ 合成のため、SiPcS₁ をトルエンに溶解させた。SiPcS₁ のトルエンへの溶解性はそれほど高くなかったため、R2c 合成時よりトルエン中 SiPcS₁ の濃度が低い条件下で TEMPOL を加えて還流した。反応を追跡したところ、二日間でほぼ反応系に変化が見られなくなった。溶媒を減圧留去したのち、アルミナでカラムクロマトグラフィーを行い目的の R2cS₁ を得た (図 3-15)。

3-2-3-2. R2cS₁ の同定

R2cS₁ を ESI-MS ([M-Na]⁺=961) で同定した。また、R2cS₁ の ESR スペクトルにおいては、二つの TEMPO ラジカルが存在を示すスピン相関ラジカル対のスペクトルパターンが観測された (図 3-16)。

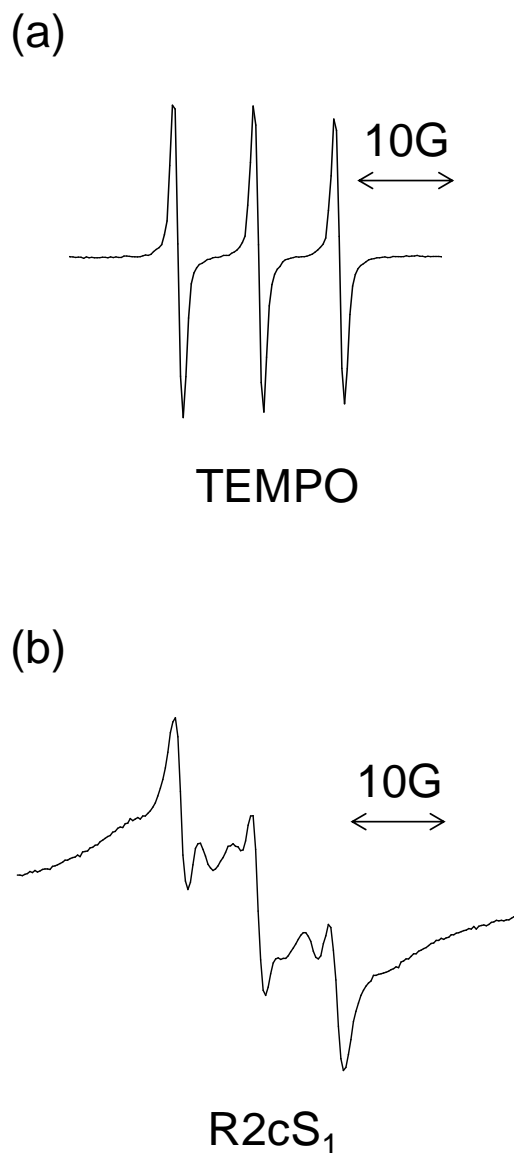


図 3-16、TEMPO と R2cS₁ の ESR スペクトル

3-2-3-3. R2cS₁の電子吸収スペクトル

R2cS₁のトルエン中電子吸収スペクトルを測定した。これにより、R2cS₁はR2cに比べてわずかにブロードな吸収スペクトルを示すことが確認された(図3-17)。これは、R2cS₁がスルホ基を有することで会合しやすくなっていることを反映している。またR2cの場合、Q吸収帯に由来する680 nm付近の吸収に注目すると、シャープな強い吸収が観測される。一方、R2cS₁の場合、Q吸収帯に由来する680 nm付近の吸収が二つに分裂していることが確認された。一般的な金属フタロシアニンの電子吸収スペクトルでは、R2cのQ吸収帯に見られるようなシャープな一本の吸収が生じる。ここで、R2cとR2cS₁それぞれの分子軌道のエネルギーについて考察すると、R2cの場合、LUMOが縮重しているためシャープな強い吸収が観測される。これに対してR2cS₁の場合、電子吸引性のスルホ基を導入しているため、LUMOが不安定化して縮重が解けることで二つのピークに分裂したと考えられる。

R2cS₁のQ吸収帯の分裂が、スルホ基を導入したことによるLUMOの不安定化に由来するものであるか確認するため、次に磁気円二色性スペクトル(Magnetic Circular Dichroism、MCD)の測定を行い、そのメカニズム解明を試みた。

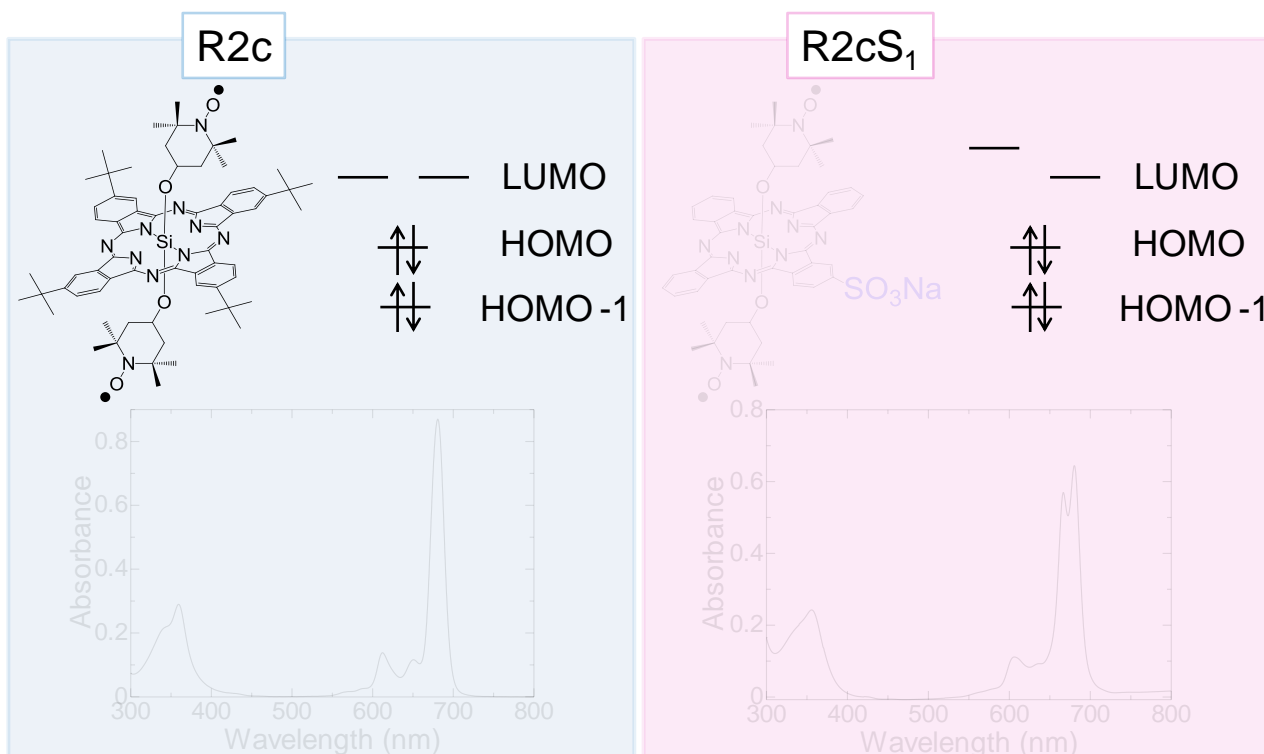


図3-17、R2cとR2cS₁の電子吸収スペクトルの比較

3-2-3-4. R2cS₁ の MCD スペクトル

R2cS₁ の Q 吸収帯の分裂が LUMO の不安定化に由来するものであるか確認するため、MCD スペクトルの測定を行った (図 3-18)。これにより、R2cS₁ の Q 吸収帯において積分型の Faraday B 項が観測され、縮重が解けてそれぞれのバンドが独立に存在することで吸収が分裂していることが明らかとなった。

二つのピークが、それぞれ別のフタロシアニンの Q 吸収帯であった場合も予想されたが、その場合は 667 nm と 680 nm どちらのピークからも微分型の Faraday A 項が観測され、二つのピークが隣接していることから二つの Faraday A 項の混じり合った MCD スペクトルが観測される。本測定で観測されたスペクトルは Faraday B 項であり、縮重が解けていることが確認された。

続いて、密度汎関数法 (density functional theory、DFT、B3LYP/6-31G*Gaussian 03) によって SiPcS₁ の電子吸収スペクトルの計算を行った (図 3-18)。これにより、Q 吸収帯の分裂に由来する二つの吸収ピークが観測され、実測値と同様に、長波長側のピークの方が強いことが観測された。また、実測値の吸収の分裂が 15 nm であるのに対し、計算により得られた吸収帯の分裂が 15 nm であり、その分裂を再現することに成功した。これより、測定値だけでなく理論的にも SiPc にスルホ基を導入することで Q 吸収帯の分裂が生じることが確認された。

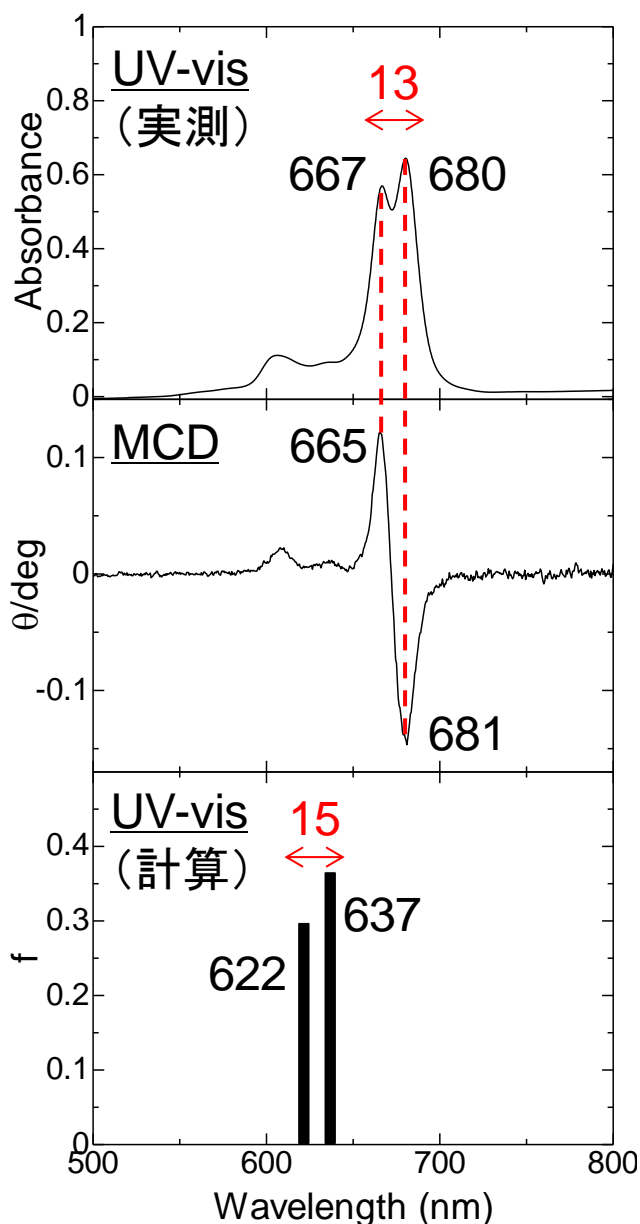


図 3-18、R2cS₁ の電子吸収スペクトル、MCD スペクトル、及び SiPcS₁ の電子吸収スペクトルの計算

により得られた吸収帯の分裂が 15 nm であり、その分裂を再現することに成功した。これより、測定値だけでなく理論的にも SiPc にスルホ基を導入することで Q 吸収帯の分裂が生じることが確認された。

3-2-4. リポソーマル R2cS₁ について

R2cS₁ をリポソーマル R2c 調整と同様の方法で DPPC を基にしたリポソームに取り込ませて利用する。リポソームは脂質二重膜を形成し、その内部に分子を取り込ませることができる。この時、親水性置換基を導入した R2cS₁ は R2c に比べ、リポソーム外側の親水性領域付近に分布することでビタミン C との衝突頻度が増大し、感度が向上すると考えた。

3-2-4-1. リポソーマル R2cS₁ の合成

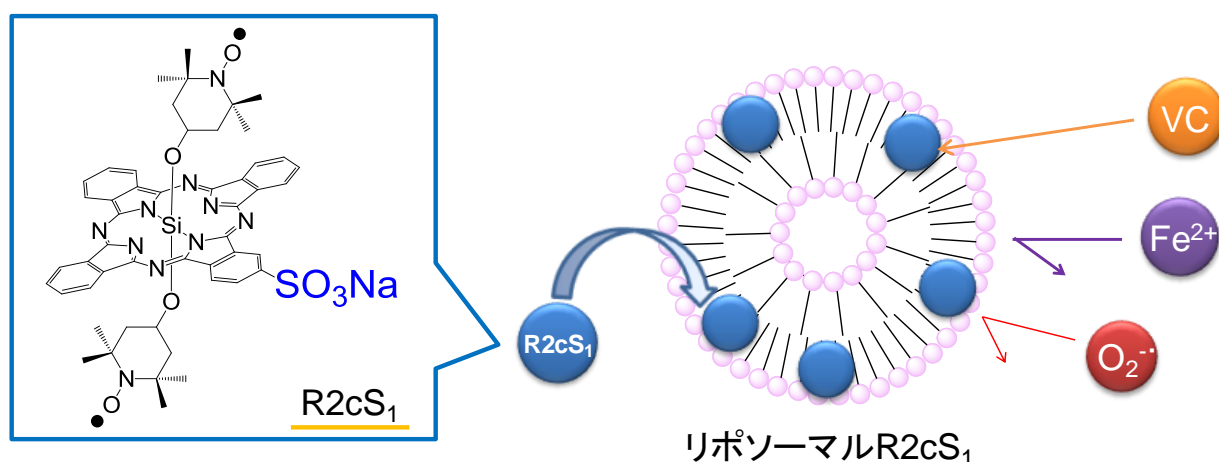


図 3-19、リポソーマル R2cS₁ の調整

リポソーム中に R2cS₁ を取り込ませるため、初めに、R2cS₁ を THF に溶解させ、クロロホルムに溶解させた DPPC を加えて混合させた後、減圧留去した。これに純水とガラスビーズを加えてボルテックスミキサーで攪拌することでフィルム状に乾固した R2c を剥がし取った。その R2c を水中に溶解させるため、超音波処理を 50°C で 1 時間行った。最後に、遠心分離することで青色の沈殿と淡青色の上澄みに分かれるので、淡青色の上澄みのみ取り出しリポソームに取り込まれた R2cS₁ (リポソーマル R2cS₁) を得ている (図 3-19)。

調整したリポソーマル R2cS₁ について、リポソームへの R2cS₁ の取り込み量を調べるため、DMF で希釈して電子吸収スペクトルを測定した。DMF による希釈を行うことで、リポソームが壊れて、DMF に溶解した R2cS₁ の吸収スペクトルを得ることができる。この吸収スペクトルを基に希釈する前のリポソームに取り込まれた R2cS₁ の取り込み量を概算した。リポソーマル R2cS₁ の調整を複数回行ったところ、リポソームへの取り込み量はリポソーマル R2c と同様に 3.0~6.5 × 10⁻⁵ M 程度 (特に 5.0~6.5 × 10⁻⁵ M であることが多い) となった。このリポソームは、数日程度では、溶液や吸収スペクトルに

大きな違いは見られないが、1週間程度経過すると沈殿が観測される。このため、リポソーマル R2cS₁ は調整した当日から翌日にかけて使用した。

3-2-4-2. リポソーマル R2cS₁ の蛍光強度時間変化

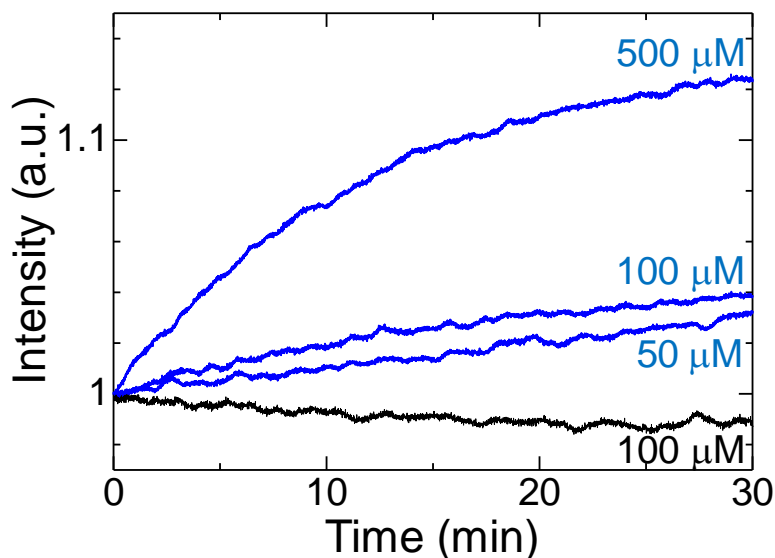


図 3-20、リポソーマル R2cS₁ (青) とリポソーマル R2c (黒) のビタミン C 添加による蛍光強度時間変化

R2cS₁ と R2c をそれぞれリポソームに取り込ませ、リポソーマル R2cS₁ とリポソーマル R2c を調整し、ビタミン C 添加による蛍光強度時間変化の比較を行った。この結果、リポソーマル R2c のビタミン C 検出の限界濃度が mM オーダーで 100 μM のビタミン C 検出ができていないのに対し、リポソーマル R2cS₁ はそれよりさらに低濃度の 50 μM のビタミン C 検出にも成功した (図 3-20)。これより、R2c への親水性置換基の導入で、R2c の感度を 10 倍以上向上させることに成功した。これは親水性置換基の導入で R2c がリポソーム外側の親水性領域付近に分布し、ビタミン C との衝突頻度が増大したことで説明できる (図 3-21)。

生体内において、例えば、血液中ではビタミン C 濃度は 50 μM 程度であることが知られている。本研究で高感度化したビタミン C 検出用蛍光プローブ R2cS₁ は、このビタミン C を検出できる感度を有している。近年、血液中のビタミン C の濃度が低下することが脳卒中のリスクを高くすると報告されている。このため、生体内のビタミン C 検出用蛍光プローブとしての利用が期待できる。

また、本測定において、リポソーマル R2c の蛍光強度は 30 分で 1%程度減少している。この原因は、蛍光強度時間変化を測定している間、ダイオードレーザーによる光励

起を受け続けた状態となっているため、R2cによりリポソーム内に存在する酸素から一重項酸素が発生し、R2cが酸化されて壊れてしまったためと考えられる。

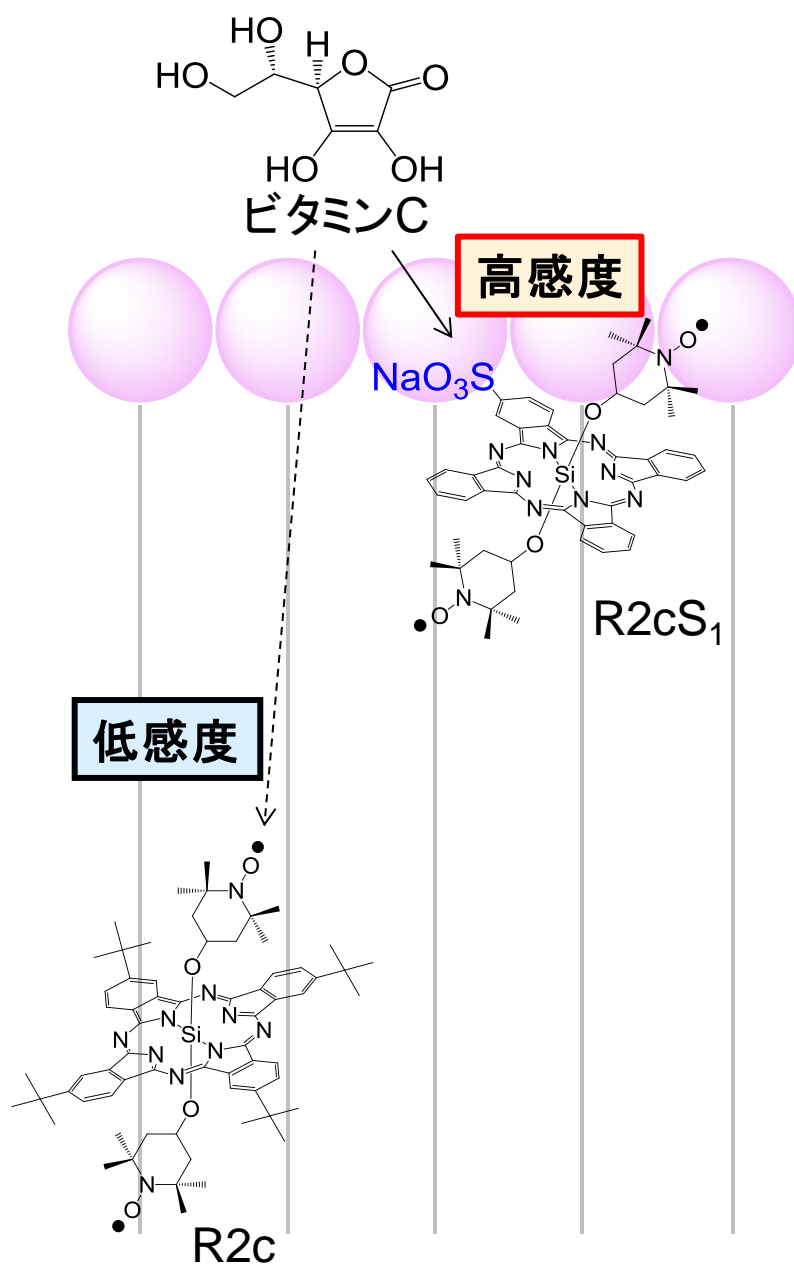


図 3-21、リポソーム中 R2cS₁ と R2c のビタミン C との反応

3-3. 実験

3-3-1. 電子吸収スペクトルの測定

電子吸収スペクトルを光路長 1 cm の石英セルを用いて、JASCO 社製 V-570 紫外可視分光光度計で測定した。

3-3-2. 蛍光スペクトル測定

蛍光測定は光路長 1 cm の蛍光セルを用いて測定した。ビタミン C 添加時はマイクロ攪拌子で溶液を攪拌しながら測定を行った。光源には、ダイオードレーザー (650 nm) を用いた。照射された励起光はチョッパー (40 Hz) を通過させ、試料に集光させた。試料からの蛍光は、光ファイバーを通して浜松ホトニクス社製 R928 光電子増倍管で検出、増幅した。これを Stanford Research Systems 社製 SR400 Photon Counter により、蛍光スペクトルを得た。

3-3-3. 蛍光強度時間変化の測定

蛍光測定は光路長 1 cm の蛍光セルを用いて、マイクロ攪拌子で溶液を攪拌しながら行った。光源にダイオードレーザー (650 nm) を利用した。照射された励起光はチョッパー (40 Hz) を通過させ、試料に集光させた。試料からの蛍光は、光ファイバーを通して浜松ホトニクス社製 R928 光電子増倍管で増幅した(図 3-22)。これを Stanford Research Systems 社製 SR400 Photon Counter により信号をオシロスコープへ取り込ませることで蛍光強度時間変化を測定した。

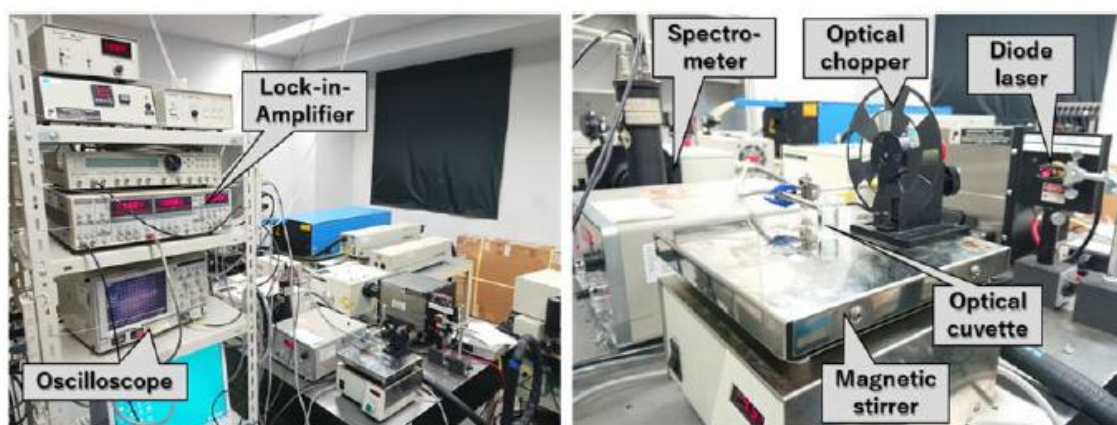


図 3-22、水溶液中ビタミン C の蛍光検出用測定システム

3-3-4. イソインドリンの合成

モレキュラーシーブ 3A で一晩脱水したメタノール (100 mL) にナトリウム (0.99 g、

4.31×10^{-2} mol) を加えて攪拌し、ナトリウムを溶解させた。その後、フタロニトリル (5.03 g、 2.73×10^{-2} mol) を加えて、アンモニアガスを溶液に通気しながら窒素雰囲気下 70°C で 4 時間還流した。反応終了後減圧留去し、ろ過した固体をメタノールで洗浄することで黄緑色の固体を得 (3.73 g、 1.86×10^{-2} mol、68%) た⁸。

3-3-5. SiPc の合成

イソインドリン (500.9 mg、 2.49×10^{-3} mol) に 3A モレキュラーシーブで一晩脱水したキノリン (6 mL) と四塩化ケイ素 (1 mL) を加え、窒素雰囲気下 180°C で 6 時間還流した。得られた青色固体にクロロホルムを加え、酢酸で 3 回、水で 4 回分液操作を行った。溶液をろ過した後、減圧留去することで青色固体 (151.8 mg、 1.90×10^{-4} mol、31%) を得た⁸。

3-3-6. R2c の合成

R2c を得るため、既報を参考に合成した^{1,2}。SiPc (11.3 mg、 1.41×10^{-5} mol) をトルエンに溶解して、4-hydroxy-2,2,6,6-tetramethylpiperidinyloxy (TEMPOL、243mg、 1.41×10^{-3} mol) 125°C 、窒素雰囲気化で 2 日間還流した。反応終了後、溶媒を減圧留去し、順相クロマトグラフィー (アルミナ、クロロホルム) で精製して青色固体を得た (2.34 mg、 2.12×10^{-6} mol、15%)。

3-3-7. リポソーマル R2c の合成

R2c (0.175 mg、 1.58×10^{-7} mol) をテトラヒドロフラン (180 μL) に溶かし、これに DPPC (dipalmitoyl-phosphatidylcholine、21.0 mg、 2.86×10^{-5} mol) を溶かしたクロロホルム (3.6 mL) を加えた。この溶液を減圧留去により、溶媒を完全に除去することでナスフラスコの表面にフィルムを形成させた。ガラスビーズ (500 mg)、PBS (Phosphate-Buffered Saline、2 mL) を加えた後、ボルテックスミキサーで攪拌し、 50°C で約 1 時間超音波処理を行った。自然冷却後、遠心分離 (3,500 r.p.m、10 min) を行い、青色の上澄みリポソーマル R2c 溶液を得た。

3-3-8. SiPcS₁ の合成

SiPc (1.00 mg、 1.74×10^{-6} mol) に発煙硫酸 1 mL を加え、室温で攪拌した。逆相 TLC (シリカゲル、水/メタノール=1:1) で反応を追跡した。そこへ純水 1 mL を加え、炭酸ナトリウムで中和した。炭酸ナトリウムは気泡が出なくなるまで加え、pH 試験紙で中和されていることを確認した。得られた溶液をろ過した後、純水で洗浄することで青色固体を得た。続いて、逆相クロマトグラフィー (シリカゲル、メタノール) により精製した。その後、溶媒を減圧留去し、青色固体 SiPcS₁ (0.271 mg、 4.01×10^{-7} mol、23%) を得た。

3-3-9. R2cS₁ の合成

R2cS₁ を得るため、既報を参考に合成した^{1,2}。SiPcS₁ (0.271 mg、 4.01×10^{-7} mol) をトルエンに溶解して、4-hydroxy-2,2,6,6-tetramethylpiperidinyloxy (TEMPOL、243mg、 1.41×10^{-3} mol) 125°C、窒素雰囲気化で2日間還流した。反応終了後、溶媒を減圧留去し、順相クロマトグラフィー (アルミナ、クロロホルム) で精製して青色固体を得た (2.76×10^{-2} mg、 2.80×10^{-8} mol、7%)。

3-3-10. リポソーマル R2cS₁ の合成

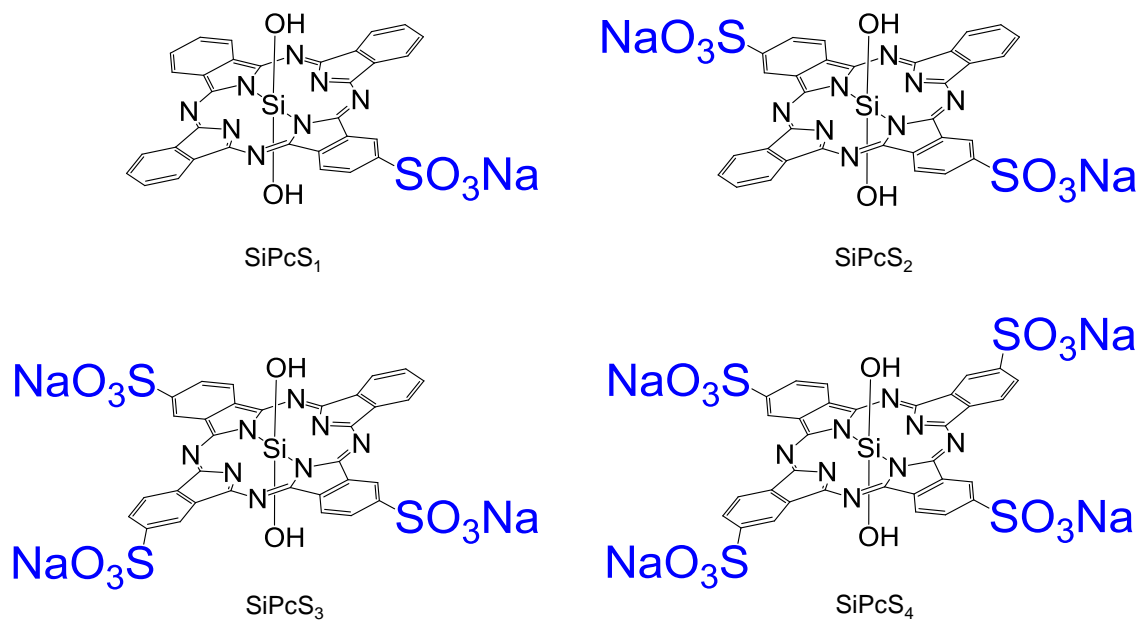
R2c S₁ (0.175 mg、 1.58×10^{-7} mol) をテトラヒドロフラン (180 μ L) に溶かし、これに DPPC (dipalmitoyl-phosphatidylcholine、21.0 mg、 2.86×10^{-5} mol) を溶かしたクロロホルム (3.6 mL) を加えた。この溶液を減圧留去により、溶媒を完全に除去することでナスフラスコの表面にフィルムを形成させた。グラスビーズ (500 mg)、PBS (Phosphate-Buffered Saline、2 mL) を加えた後、ボルテックスミキサーで攪拌し、50°C で約1時間超音波処理を行った。自然冷却後、遠心分離 (3,500 r.p.m、10 min) を行い、青色の上澄みリポソーマル R2cS₁ 溶液を得た。

3-3-11. ビタミン C の純度の確認

ビタミン C は HPLC による検査 (Kanto Chemical Co.) で、純度 98% 以上のものを購入している。さらに、ビタミン C は酸素で容易に酸化され得るため、ビタミン C を使用する前に NMR と ESR を用いてビタミン C の純度を確認している。NMR 測定からは、ビタミン C が二電子酸化されて生じるデヒドロアスコルビン酸が 0.5% 以下であることを確認している。また、X-バンド ESR 測定からは、ビタミン C が一電子酸化されたビタミン C ラジカルが検出されないことを確認している。加えて、実験に使用するために調整したビタミン C 溶液は、244 nm の電子吸収スペクトルの追跡で減衰量を確認している。実験の範囲内 (蛍光測定に用いるビタミン C 溶液が調整されてから測定終了までの時間) では、ビタミン C の吸収の減衰量が 5% 以下であることを確認している。このような確認を行うことで、本研究で使用しているビタミン C 及びビタミン C 溶液の純度は測定に十分と判断して使用した。

3-4. 付録

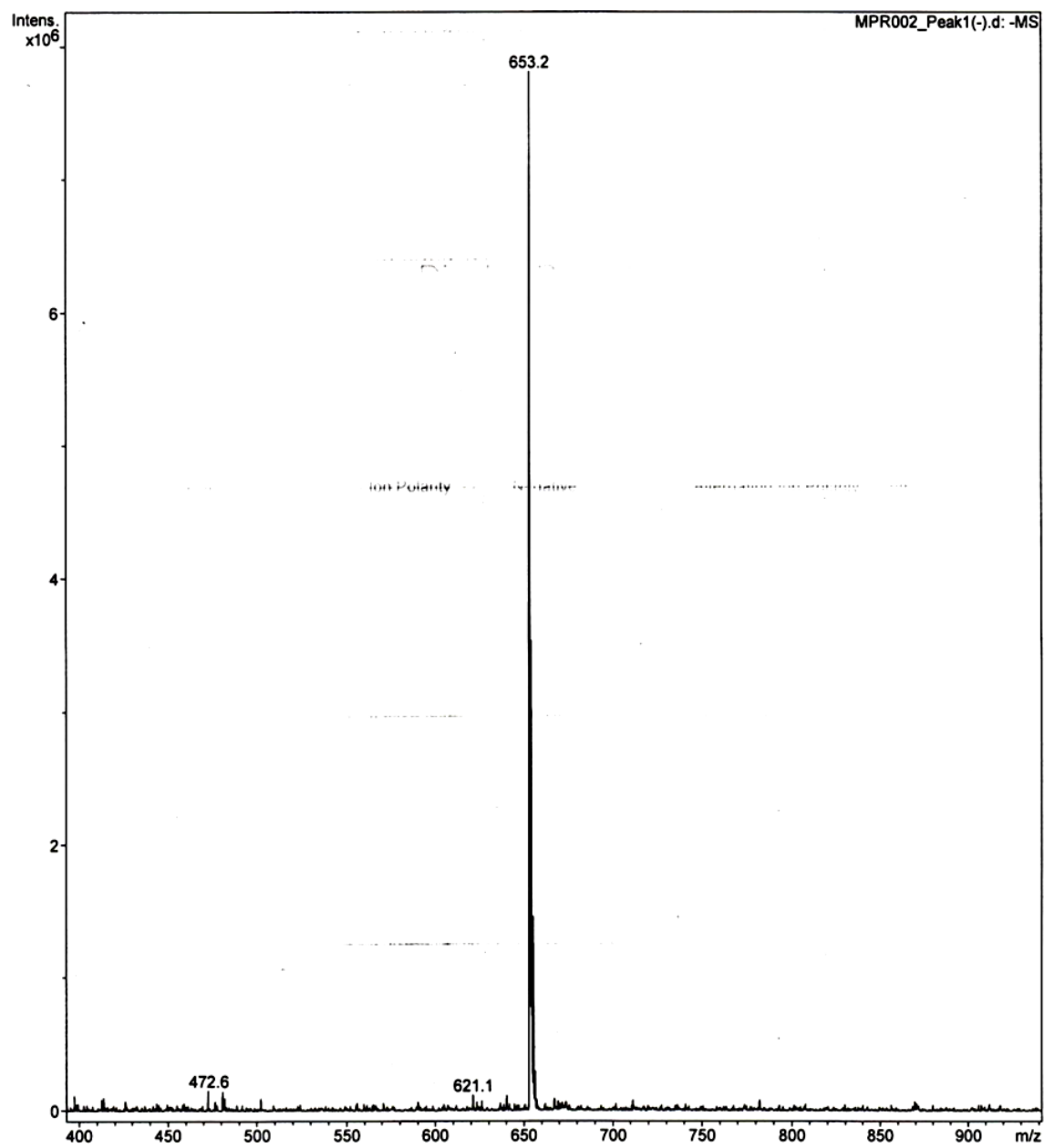
3-4-1. スルホ基置換体 SiPcS_n について



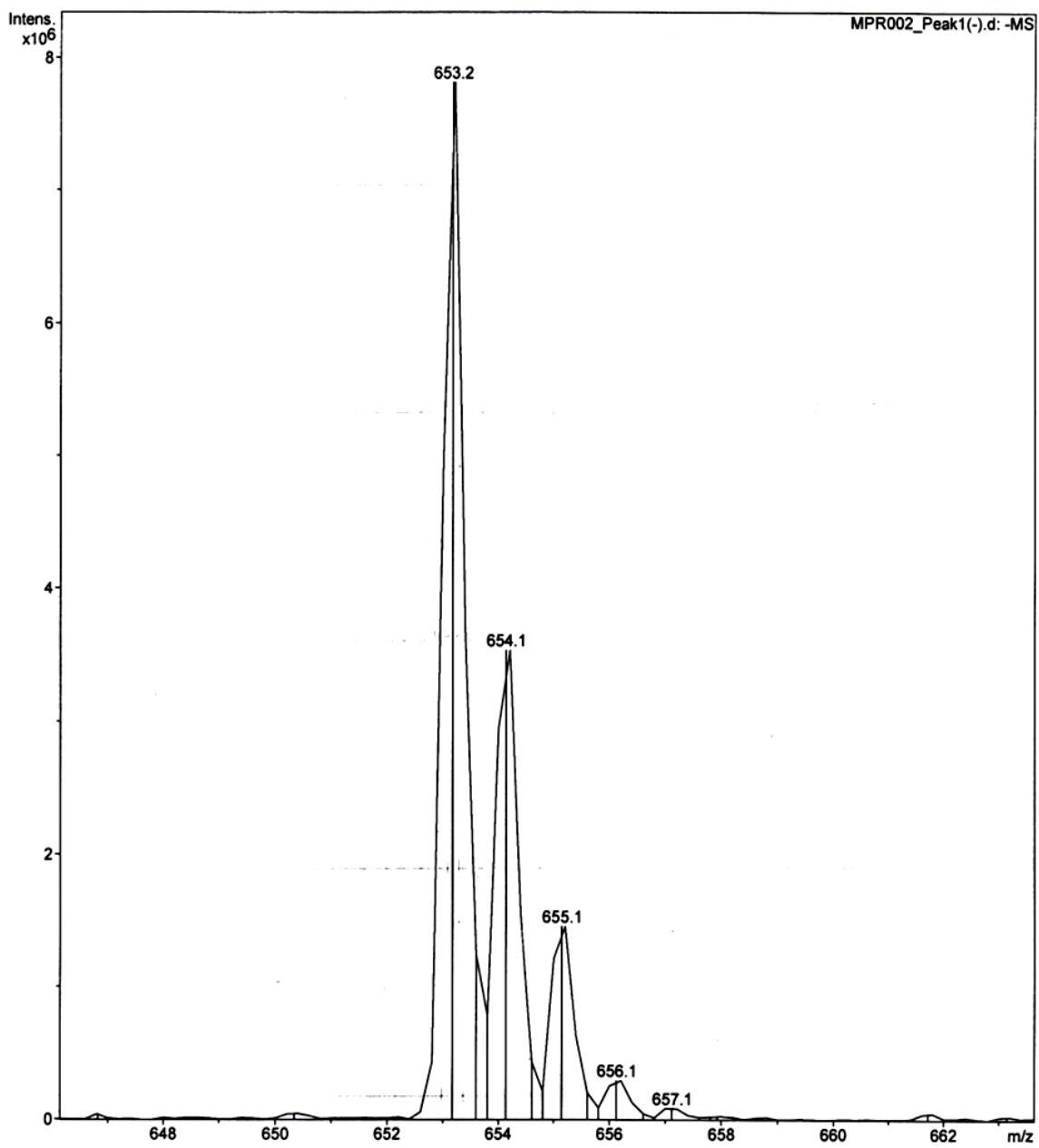
付録 3-1、スルホ基結合型 SiPc 誘導体の構造

SiPc にスルホ基を導入することで、上記の様なスルホ基一置換体 (SiPcS₁) からスルホ基四置換体 (SiPcS₄) が合成される。SiPcS₂、SiPcS₃、SiPcS₄ はそれぞれ構造異性体を多数有し、SiPcS₁ も含めると、スルホ基置換体が 17 種類合成される。

3-4-2. SiPcS₁ の質量分析

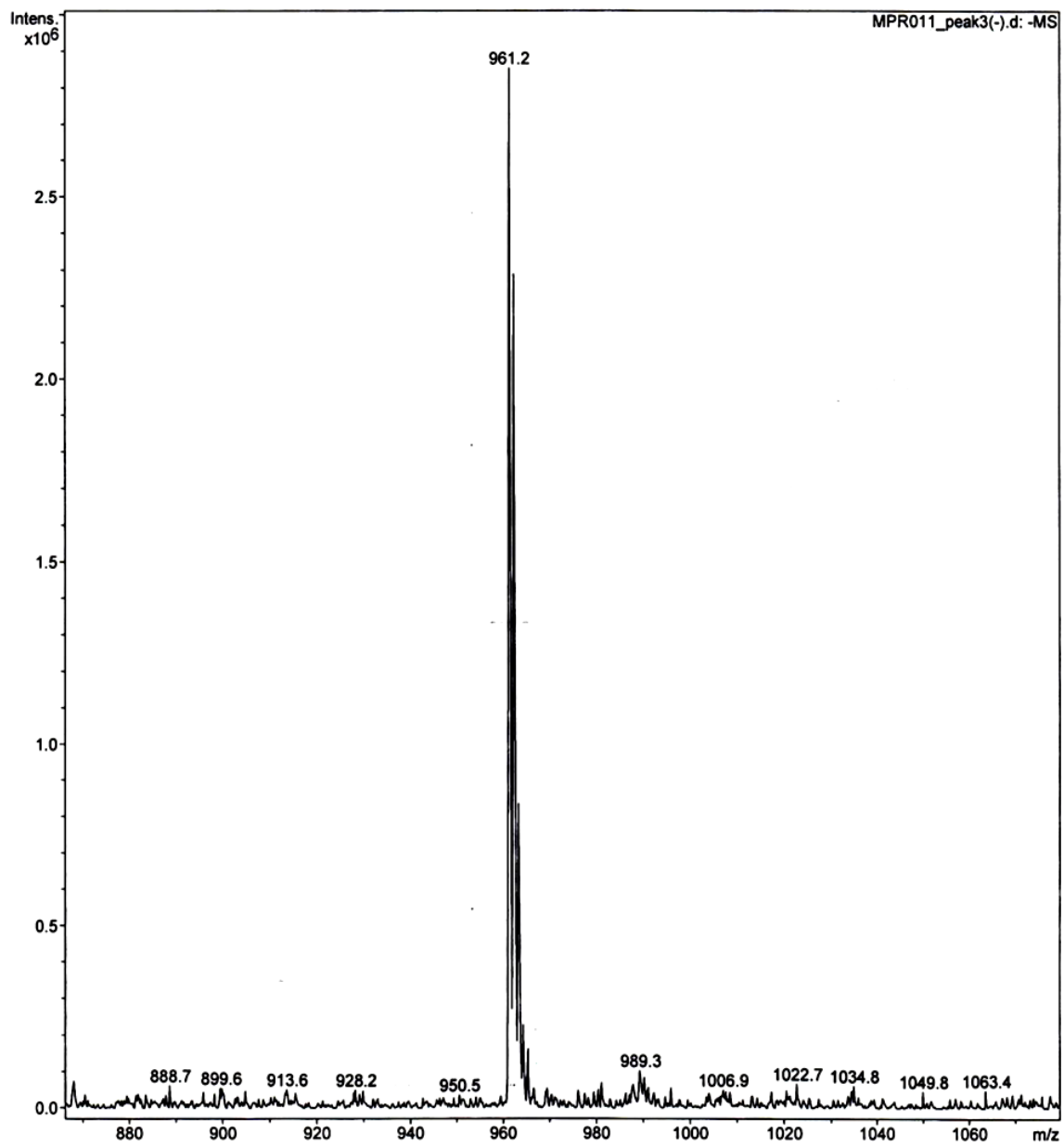


付録 3-2、SiPcS₁ の ESI-MS①

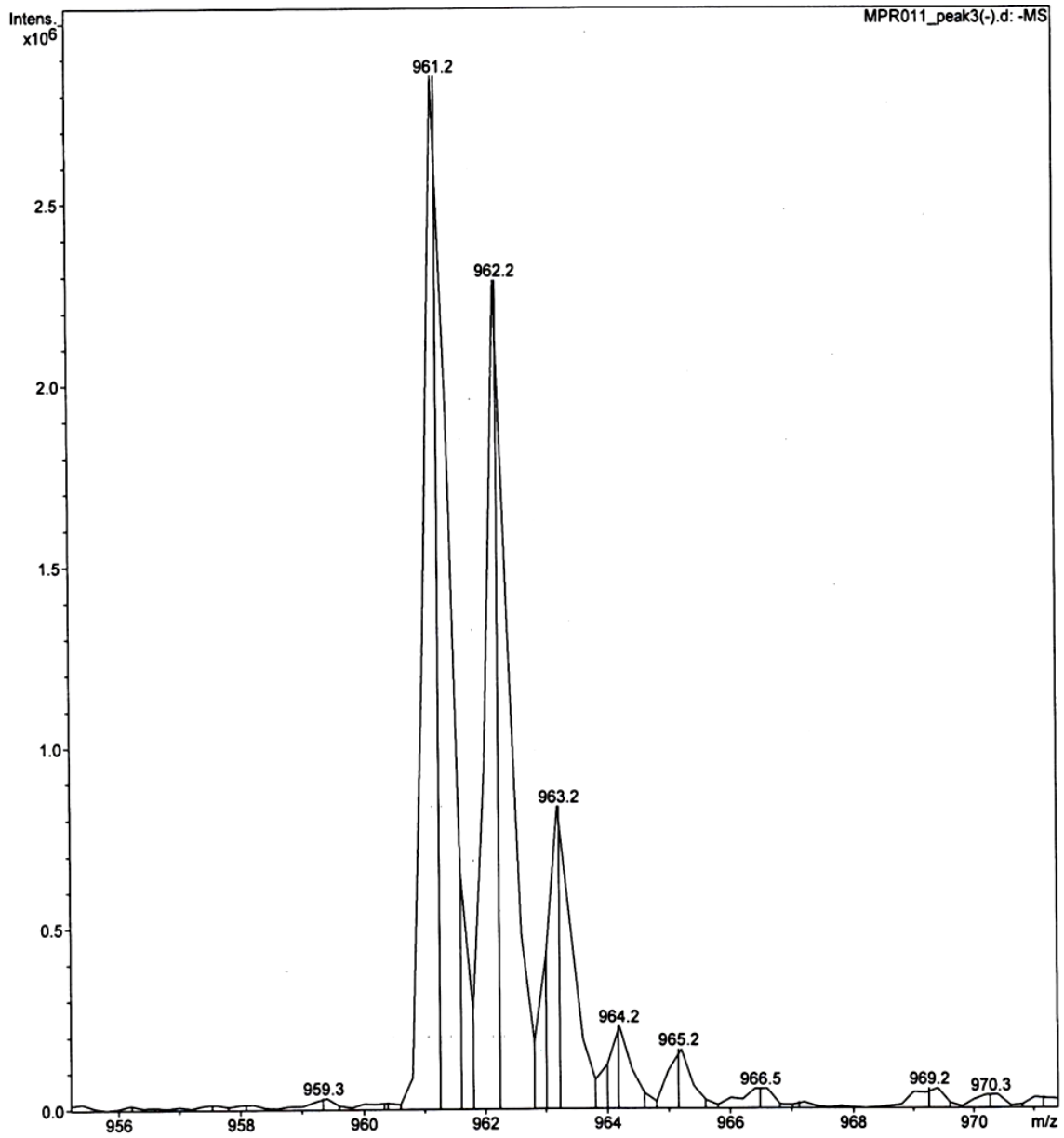


付録 3-3、SiPcS₁ の ESI-MS②

3-4-3. R2cS₁ の質量分析

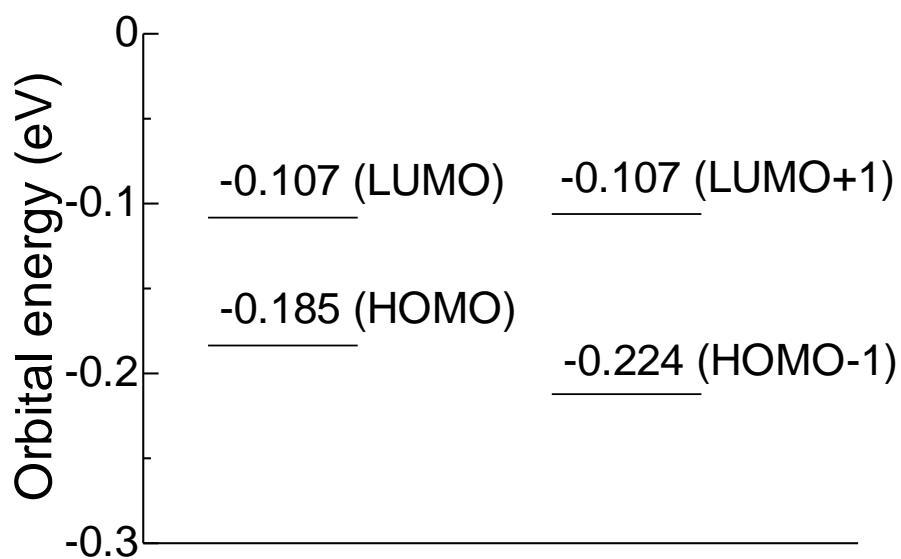
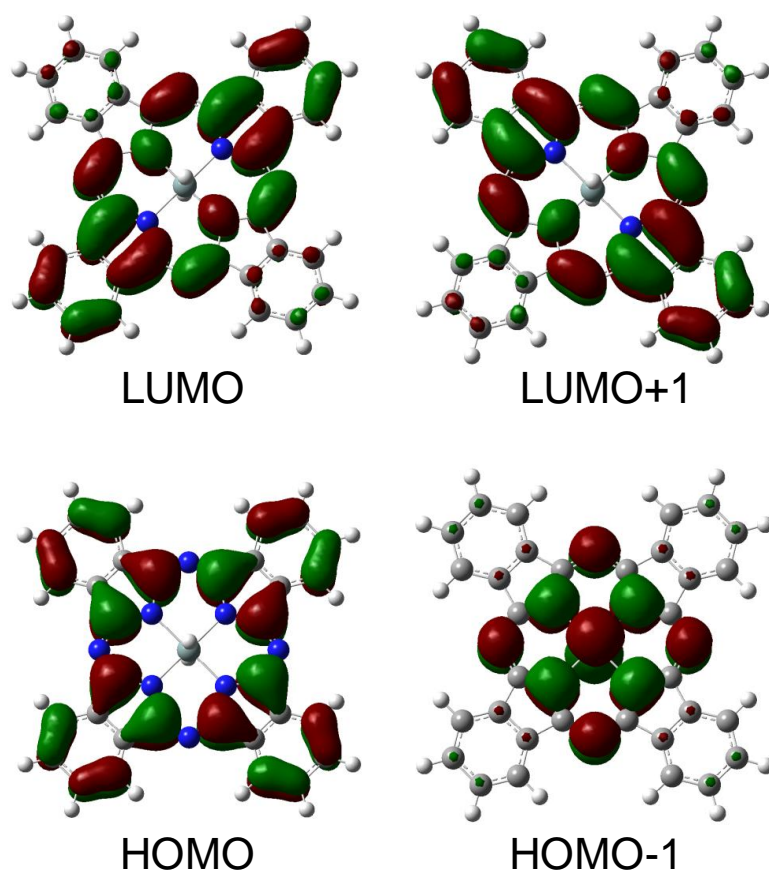


付録 3-4、R2cS₁ の ESI-MS①



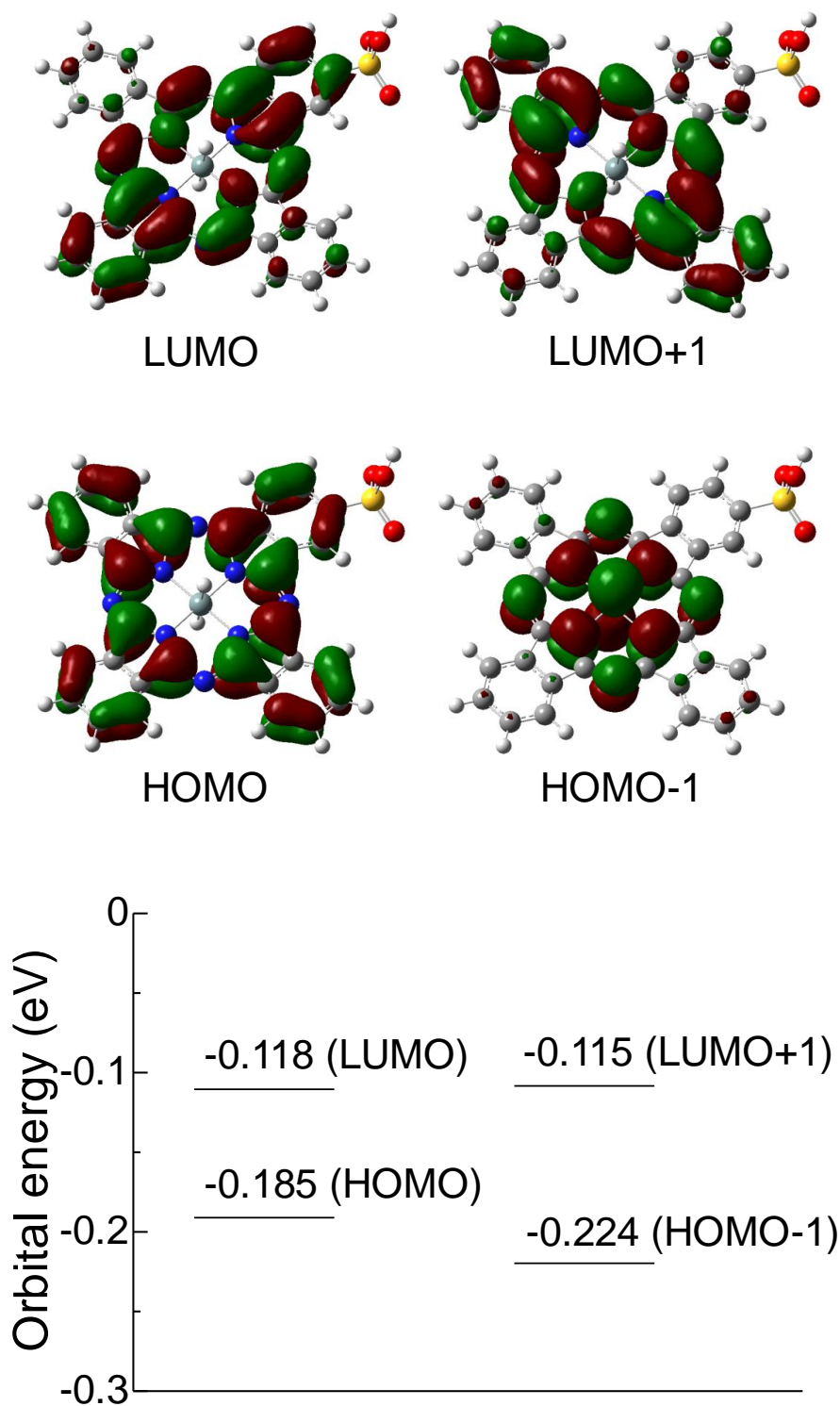
付録 3-5、R2cS₁ の ESI-MS②

3-4-4. SiPc の分子軌道



付録 3-6、DFT 法 (B3LYP/6-31G*Gaussian 03) による SiPc の分子軌道計算と分子軌道エネルギーダイアグラム

3-4-5. SiPcS₁ の分子軌道



付録 3-7、DFT 法 (B3LYP/6-31G*Gaussian 03) による SiPcS₁ の分子軌道計算と分子軌道エネルギーダイアグラム

参考文献

1. Ishii, K., Hirose, Y. & Kobayashi, N. Selective population from the excited multiplet states to the triplet states to the triplet ground state in a phthalocyanine: a new concept for controlling magnetic properties by photoexcitation. *J. Am. Chem. Soc.* **120**, 10551-10552 (1998).
2. Ishii, K., Hirose, Y. & Kobayashi, N. Electronic Absorption, MCD and Fluorescence Studies on Phthalocyaninatosilicon Covalently Linked to One or Two TEMPO Radicals. *J. Porphyrins Phthalocyanines*, **3**, 439-443 (1999).
3. Ishii, K., Kubo, K., Sakurada, T., Komori, K. & Sakai, Y. Phthalocyanine-based fluorescence probes for detecting ascorbic acid: phthalocyaninatosilicon covalently linked to TEMPO radicals. *Chem. Commun.* **47**, 4932-4934 (2011).
4. Ishii, K., Hirose, Y., Fujitsuka, H., Ito, O. & Kobayashi, N. Time-resolved EPR, fluorescence, and transient absorption studies on phthalocyaninatosilicon covalently linked to one or two TEMPO radicals. *J. Am. Chem. Soc.* **123**, 702-708 (2001).
5. Ishii, K. *et al.* *In vitro* photodynamic effects of phthalocyaninatosilicon covalently linked to 2,2,6,6-tetramethyl-1-piperidinyloxy radicals on cancer cells. *Free radical Biol. Med.* **38**, 920-927 (2005).
6. Ishii, K., Takeuchi, S., Shimizu, S. & Kobayashi, N. A concept for controlling singlet oxygen ($^1\Delta_g$) yields using nitroxide radicals: phthalocyaninatosilicon covalently linked to nitroxide radicals. *J. Am. Chem. Soc.* **126**, 2082-2088 (2004).
7. Ishii, K., Hirose, Y. & Kobayashi, N. Electron spin polarizations of phthalocyaninatosilicon covalently linked to one TEMPO radical in the excited quartet and doublet ground states. *J. Phys. Chem. A* **103**, 1986-1990 (1999).
8. 白井汪芳、小林長夫、フタロシアニン—化学と機能—、アイピーシー (1997).
9. Martin Priessner, Development of improved fluorescence probe for detecting ascorbic acid: Phthalocyaninatosilicon covalently linked to TEMPO radicals, Master thesis, Vienna University of Technology (2015).

第 4 章

R2c と牛血清アルブミン (BSA) の複合化

第4章 R2c と牛血清アルブミン (Bovine serum albumin、BSA) の複合化

4-1. 緒言

リポソームは、R2c のラジカルを様々な酸化還元物質から過度に保護するため、R2c のビタミン C 検出の感度も低下させてしまう。そこで、本研究では適度な保護と高感度を両立させるため、血液中の物質運搬に関わるタンパク質 BSA と R2c を複合化させた新規蛍光プローブを開発した^{1,2}。

4-2. 結果と考察

4-2-1. R2c と BSA の複合体合成

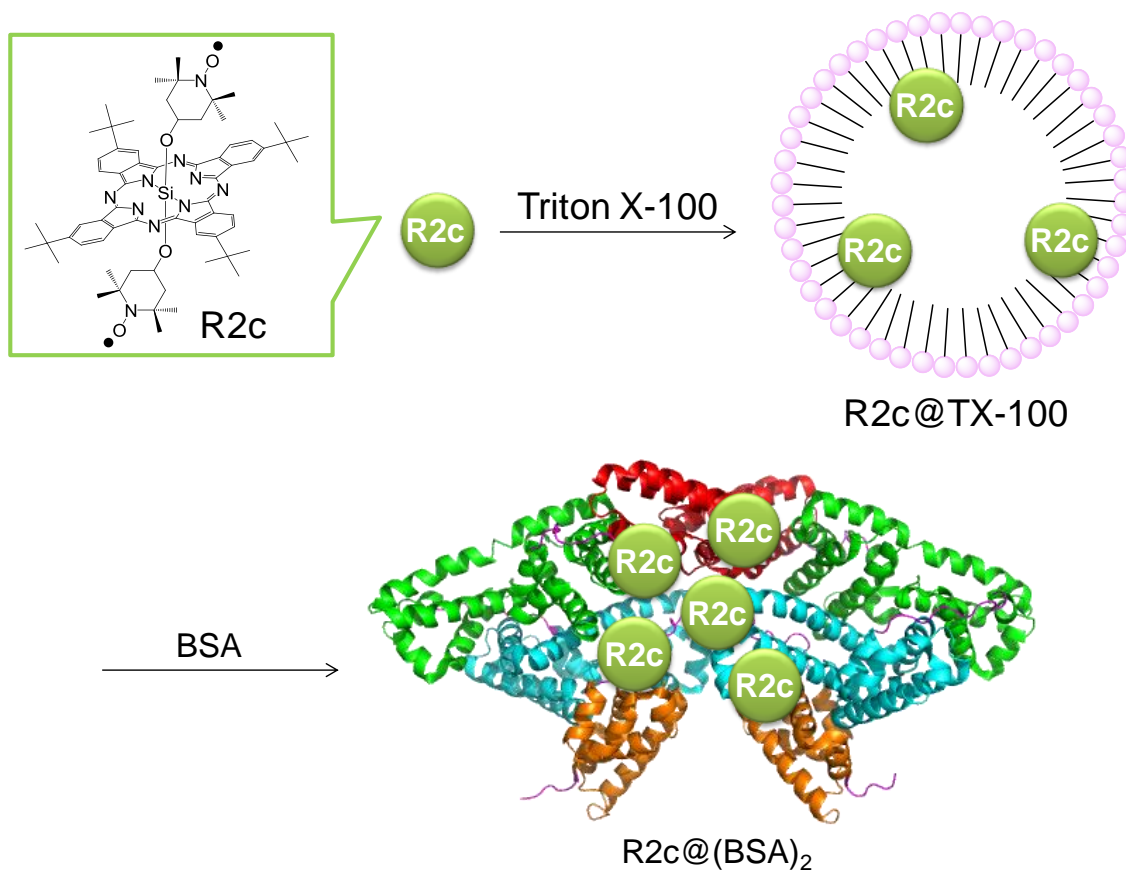


図 4-1、R2c と BSA の複合化

R2c は疎水性分子のため、水溶液に溶かすことはできない。そこで、界面活性剤 Triton X-100 を含む水溶液とガラスビーズを加えて超音波処理を行うことで R2c を溶解させた (R2c@TX-100)。その溶液へ BSA を加えて室温で 3 時間攪拌した。攪拌後、10,000 MWCO フィルターを用いた限外濾過を行い精製した。精製した溶液をメンブレンフィルターでろ過し、R2c と BSA の複合体を含む青色溶液を得た (図 4-1、4-2)。

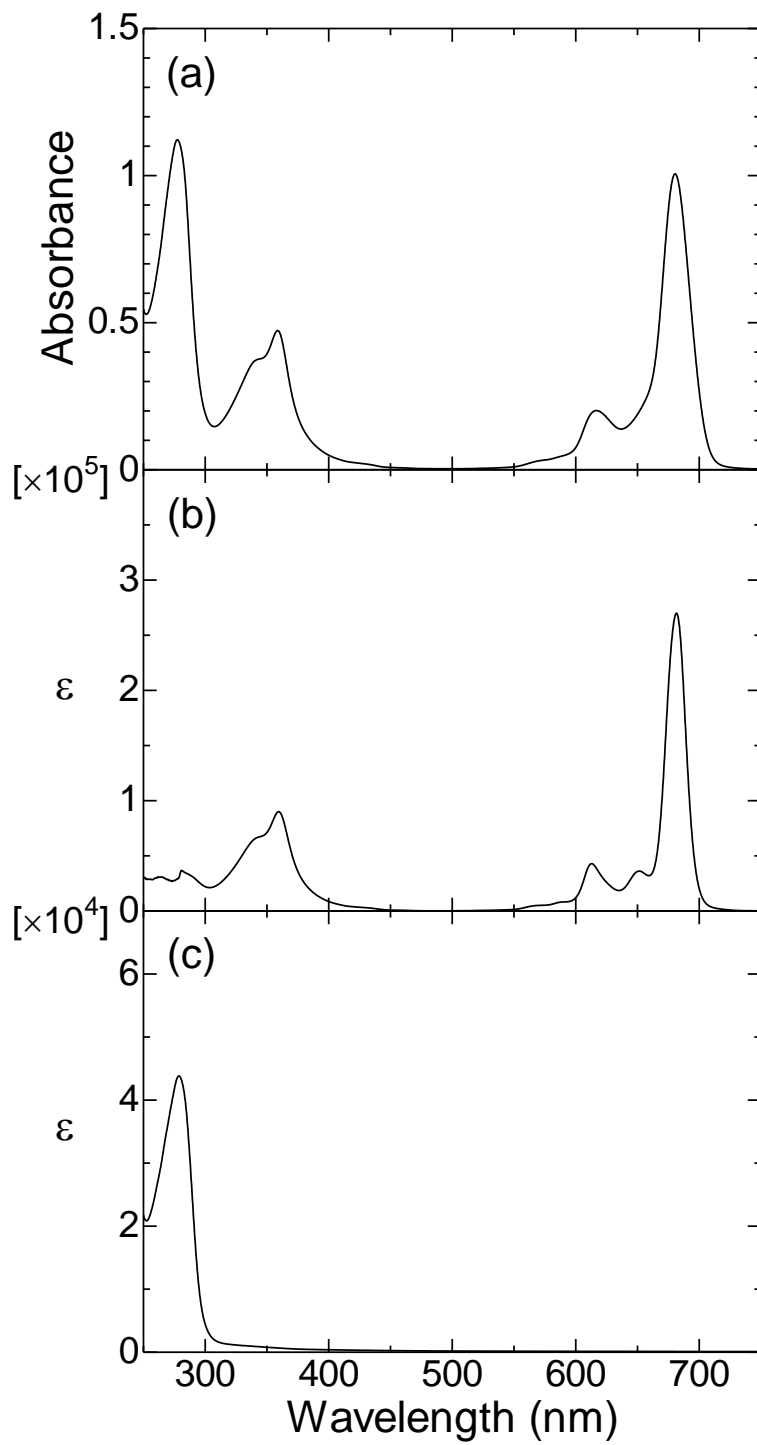


図 4-2、R2c と BSA の複合体 (a) の電子吸収スペクトルと R2c (b) と BSA (c) の吸光係数

4-2-2. R2c と BSA の複合体同定

複合体は、サイズ排除クロマトグラフィー、円偏光二色性 (CD)、電子スピン共鳴 (ESR)、蛍光測定により調べた。それぞれ、分子サイズ、BSA、ビタミン C 検出部位 (TEMPO ラジカル)、発色団 (Pc) に関する情報を得ている (図 4-3)。

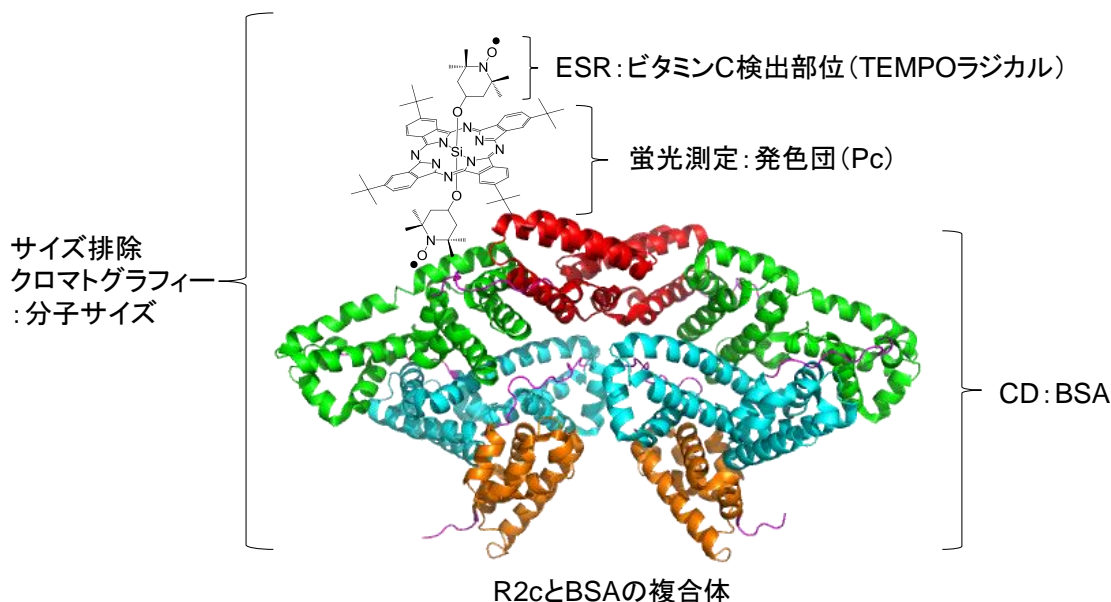


図 4-3、各測定 of 標的部位

4-2-2-1. 複合体のサイズ排除クロマトグラフィー

複合化を確認するために、複数回 Sephadex G-100 を用いたサイズ排除クロマトグラフィーを行った。その中でも典型的なサイズ排除クロマトグラフを示す (図 4-4b)。BSA 由来の吸収帯である約 280 nm で観測すると、溶出量 43 mL にピークを持つ第 1 フラクシオンと、63 mL にピークを持つ第 2 フラクシオンが観測された。この二つのピークは BSA のみでサイズ排除クロマトグラフィーを行った結果と相関があり (図 4-4a)、それぞれ BSA ダイマー、BSA モノマーに帰属された。BSA モノマーと BSA ダイマーの溶出量の比は既報の値 1.3~1.5 と一致している^{3,4}。一方、R2c の Q 吸収帯約 680 nm で検出した場合、43 mL にピークを持つフラクシオンのみが観測された。このフラクシオンは BSA ダイマーのフラクシオンと一致している (R2c@(BSA)₂)。

この比較のため、複合体の原料となる R2c@TX-100 に対しても Sephadex G-100 を用いたサイズ排除クロマトグラフィーを行った (図 4-4c)。Triton X-100 由来の吸収ピークである約 280 nm で観測すると、溶出量 41 mL にピークを持つフラクシオンが観測された。R2c 由来の吸収帯約 680 nm で検出した場合も溶出量 43 mL にピークを持つフラクシオンのみが観測された。サイズ排除クロマトグラフより、R2c と BSA の複合体のフラクシオンとは形状が異なり、ピークの位置が少し早い位置に生じることが確認された。

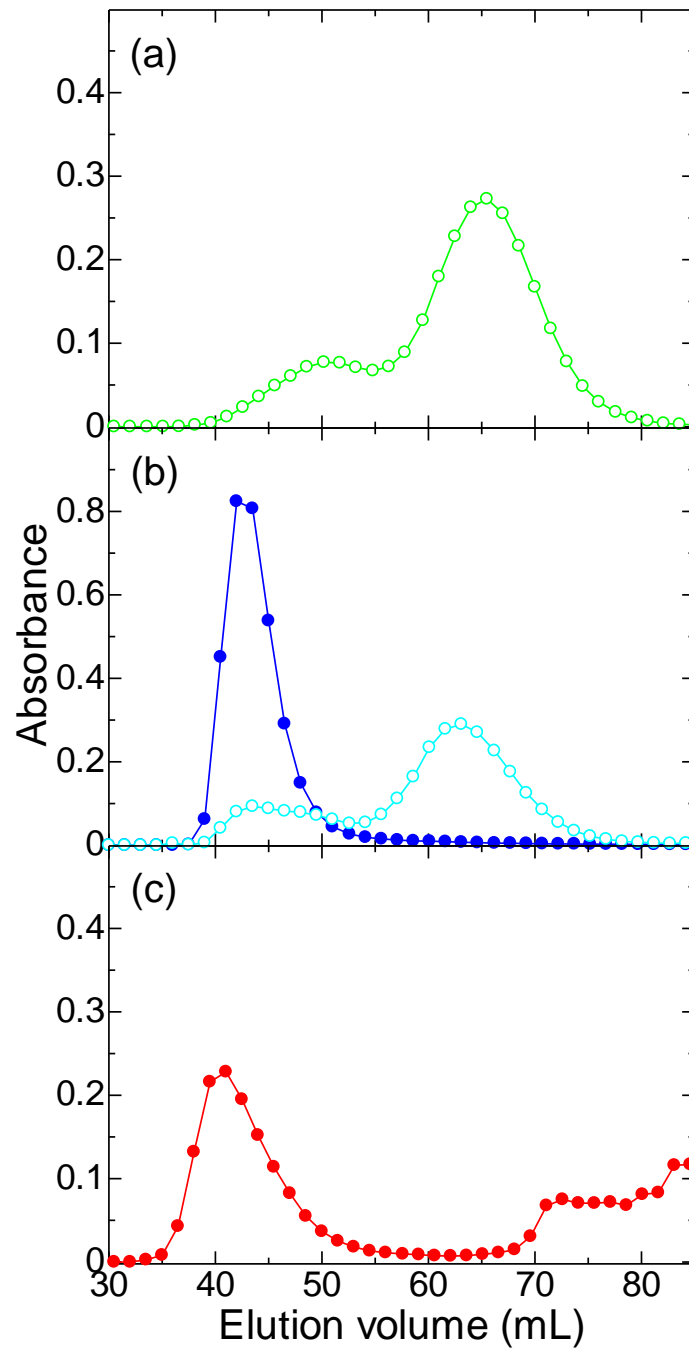


図 4-4、サイズ排除クロマトグラフ ((a) BSA、緑：～280 nm、(b) R2c@(BSA)₂、青：～680 nm、水色：280 nm、(c) R2c@TX、赤：～700 nm)

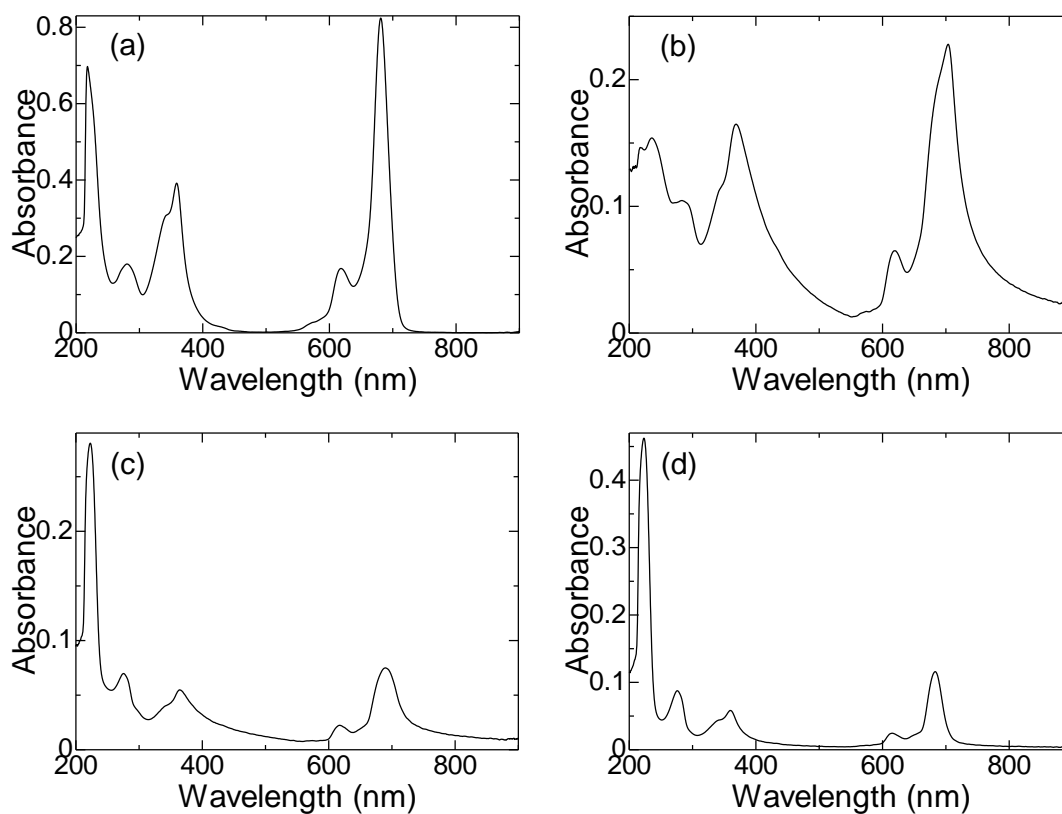


図 4-5、溶出された R2c@BSA₂ (42.0 mL : (a)) と R2c@TX-100 (41.0 mL : (b)、72.6 mL : (c)、83.1 mL : (d)) の電子吸収スペクトル

また、R2c@TX-100 は、溶出された領域により異なる電子吸収スペクトルを示している。これは、R2c を取り込んだ TX-100 ミセルの大きさが異なるため生じたと考えられる (図 4-5b-d)。

これより、R2c は TX-100 ミセルから、BSA ダイマーに移ることで複合体を形成していることが明らかとなった。

R2c@BSA₂ の電子吸収スペクトルにおいて、R2c の Q 帯由来のシャープで強い吸収が 680 nm で観測された (図 4-5a)。これは R2c が軸配位子に嵩高い二つの TEMPO ラジカルを持つことで会合が抑制されることに起因する。会合体の形成は、蛍光消光に寄与するため蛍光プローブとしての機能が低下してしまう。このため、TEMPO ラジカルのような嵩高い軸配位子を持ち、会合体形成が抑制されることは蛍光プローブとして利用する際に有用である。

R2c@TX-100 では、R2c の Q 帯由来のブロードな吸収が観測されている (図 4-5b-d)。これは、TX-100 中で R2c の会合体が形成されていることを反映している。特に、最も早く溶出された図 4-5b において、その傾向が顕著に観測された。この電子吸収スペク

トルを観測してみると、図 4-5a と比べて長波長側がブロードになっていることが確認できる。これは、R2c が嵩高い軸配位子の TEMPO ラジカルを有しているため、Face to face 型の H 会合体の形成が抑制され、Head to tail 型の J 会合体を形成させていることに起因する。また、図 4-5b に比べ、図 4-5c、図 4-5d と後から溶出されてくるフラクションの方が、R2c 由来の吸収がシャープになる傾向にある。これは、早く溶出されるほど、TX-100 ミセル中に取り込まれる R2c が多いことを反映している。これは、図 4-5b-d それぞれの電子吸収スペクトルにおいて、TX-100 に由来する吸収に対する R2c の吸収の強度が大きいことから確認できる。

4-2-2-2. 複合体の円偏光二色性

BSA と TX-100 は共に 280 nm 付近に吸収を持つ。このため、吸収スペクトルのみで BSA と TX-100 を区別するのは困難である。本研究では、既報を参考にした溶出量の比率の観点から、R2c が BSA ダイマーと複合化していることを確認しているが、より直接的な根拠を得るために CD 信号の確認も行った (図 4-6)。CD 信号は分子内に不斉炭素を持つ、または、構造的にキラルを持つ分子の右円偏光と左円偏光の吸収に差が生じる現象である。TX-100 にはキラルが存在しないため CD 信号が観測されないが、BSA からは CD 信号が観測される。そこで、Sephadex G-100 を用いた R2c@(BSA)₂ の溶出液の CD を測定した。BSA モノマーと BSA ダイマーを含むフラクションに対し、それぞれ測定を行ったところ、どちらのフラクションでも、222 nm において BSA 特有の CD 信号が観測された。これより、溶出された二つのフラクションに BSA が含まれていることが確認された。これは、R2c@(BSA)₂ が形成していることを支持する。

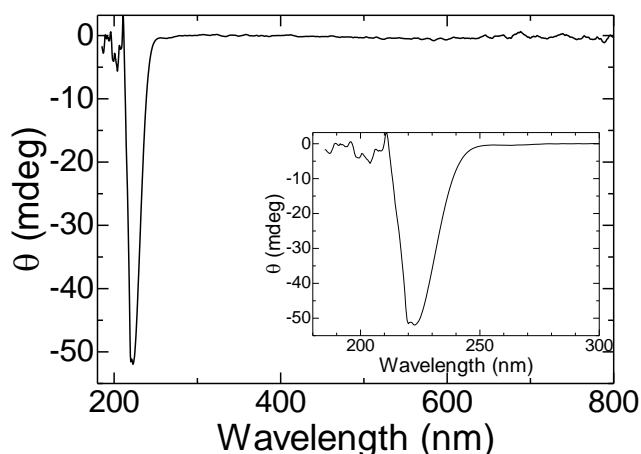


図 4-6、R2c@(BSA)₂ の CD スペクトル

4-2-2-3. 複合体の ESR

本研究で利用している分子 R2c はラジカルを有しているため、その情報を得るため ESR 測定を行うことは、分子同定に有効な手段である (図 4-7)。

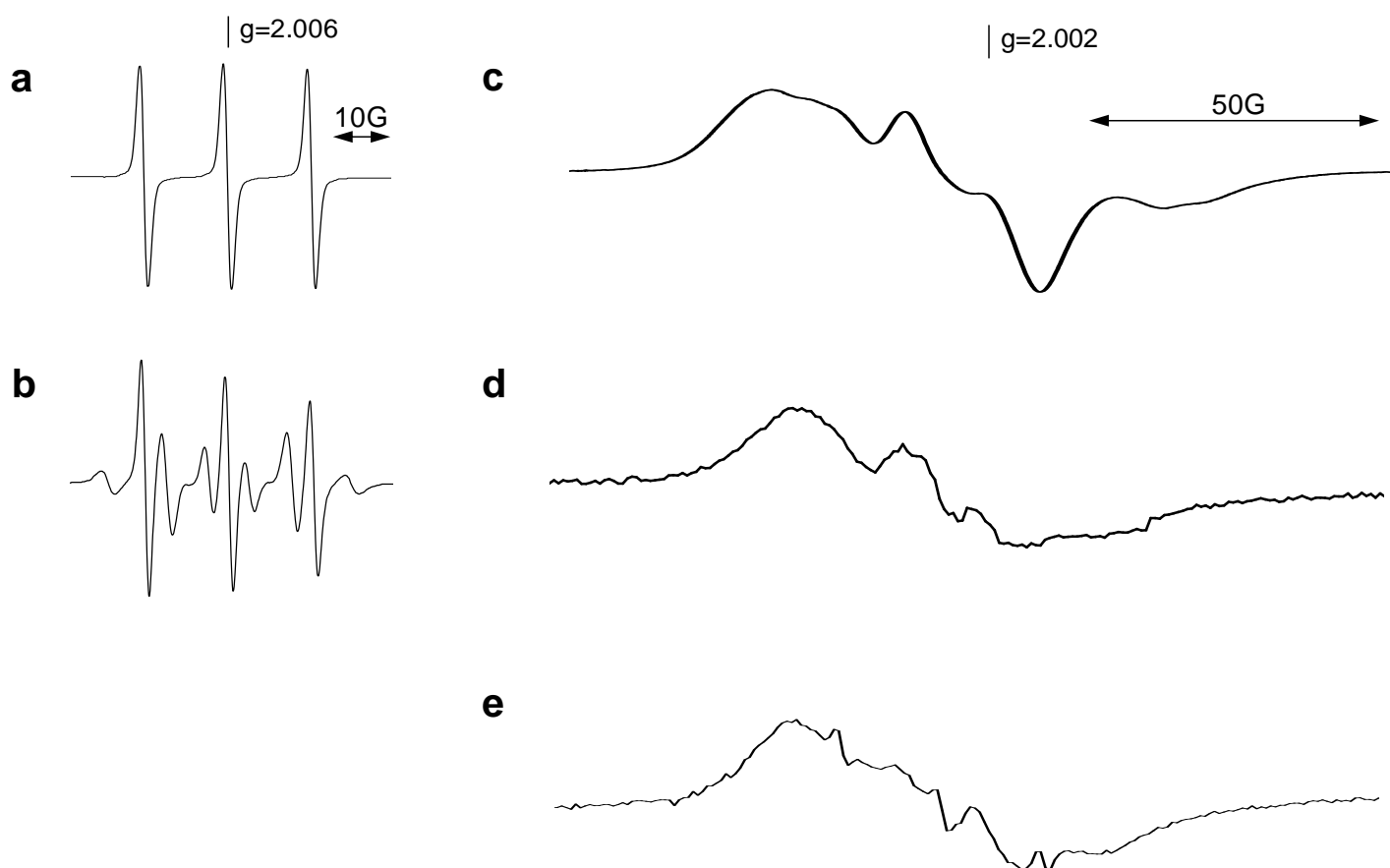


図 4-7、ESR スペクトル (トルエン中 TEMPO (a)、トルエン中 R2c (b)、氷結トルエン中 R2c (c)、R2c@(BSA)₂ (d)、R2c@TX-100 (e))

R2c@(BSA)₂の ESR スペクトルは、トルエン中 R2c の ESR スペクトルよりもブロードで、氷結トルエン中 R2c と類似したスペクトルであった。これは、異方性が十分に平均化されていないことに由来し、ラジカルを取り込む高分子自体の大きさが大きく再配向に時間がかかることと、R2c の運動が BSA ダイマーと複合化することで束縛されたことに由来する。また、生成物 R2c@(BSA)₂ と原料の R2c@TX-100 では、そのスペクトルパターンが異なることが確認されている。これは、生成物の R2c が BSA ダイマーと複合化していることを支持する。

4-2-2-4. 複合体の蛍光測定

R2c@(BSA)₂ と R2c@TX-100 を用いて、ビタミン C 添加後の蛍光強度時間変化の比較を行った (図 4-8)。この時、R2c@(BSA)₂ において短時間で 100 倍以上の蛍光強度の増大が観測された。一方、R2c@TX-100 の場合、ビタミン C 添加により、生成物 R2c@(BSA)₂ と原料の R2c@TX-100 では、ビタミン C 添加後の蛍光強度時間変化の挙動が明らかに異なる様子が観測された。R2c@TX-100 は、R2c がミセルで覆われており、そのミセルへのビタミン C の侵入が困難であったことが、ビタミン C 添加による蛍光強度の増大が小さいことの原因と考えられる。

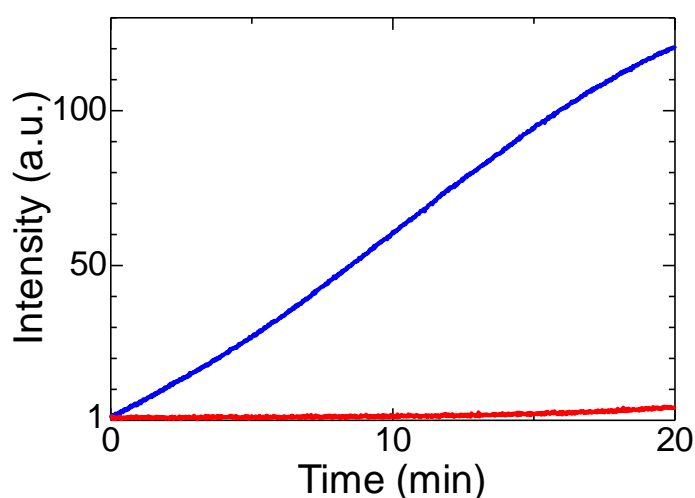


図 4-8、R2c@(BSA)₂ (青線) と R2c@TX-100 (赤線) のビタミン C 添加後の蛍光強度時間変化

これより、サイズ排除クロマトグラフィー、ESR、蛍光測定の結果から、R2c は BSA ダイマーと複合化していることが確認された。

4-2-3. R2c と BSA 複合体の測定

複合体は、上記測定により同定された。直接的な複合体同定には至らなかったが、複合体形成を支持する動的光散乱法 (Dynamic light scattering、DLS) と電気泳動の結果についても示す。

4-2-3-1. 複合体の粒経分布

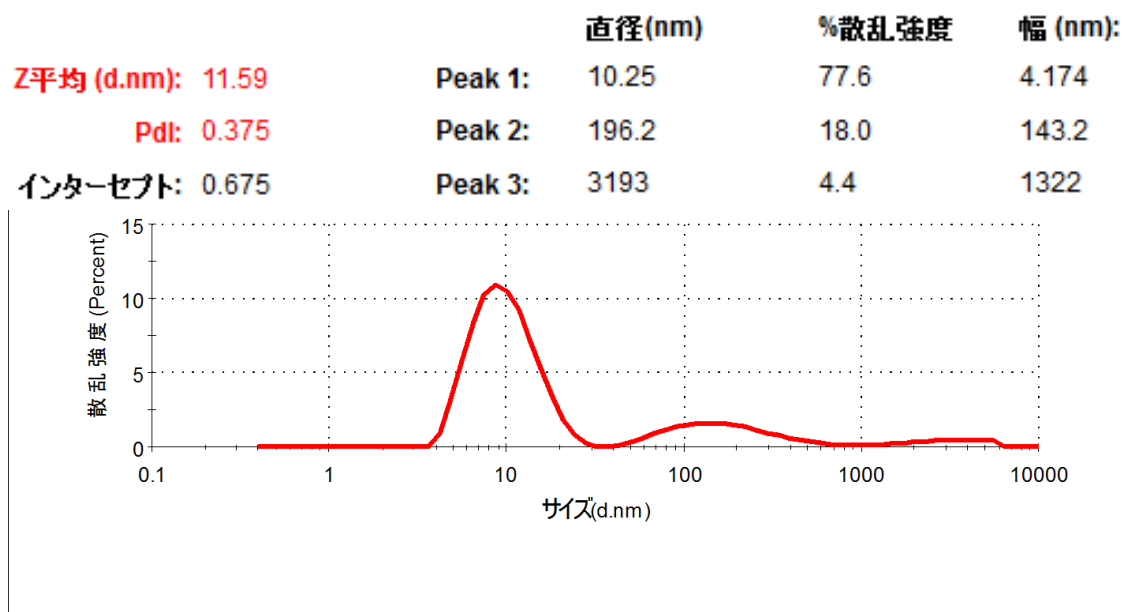


図 4-9、R2c@(BSA)₂ の散乱強度別粒経分布

R2c@(BSA)₂ の粒経分布を調べるため、DLS を用いた粒経分布を測定した (図 4-9)。溶液中での BSA の形状は、楕円体で分子サイズは 4.0 nm × 4.0 nm × 14.0 nm である。ここで、DLS の文献値の直径が 7 nm であるのに対し、本研究の Peak 1 は、10 nm で幅は 4 nm である^{5,6}。これは、BSA がダイマーを形成していることで 7 nm (BSA モノマー) < 実験値 (10 nm) < 7 × 2 nm (BSA モノマー × 2) となっていることが示唆される。

また、Peak 2 は Peak 1 より明らかに粒経が大きいことが確認された。このピークは、幅も 143 nm と大きいことが示された。これは、限外濾過で除ききれなかった TX-100 であると考えられる。ミセルの粒経分布の範囲は含まれる R2c の数等に影響を受けて広範囲に及ぶことが予想される。実際に、DLS の結果もこれを支持しており、TX-100 由来の粒経分布は数十から数百にも及んでいる。

Peak 3 は、3000 nm を超えており、幅も 1300 nm と非常に大きな粒経分布を示している。これは、BSA と R2c とともに帰属できないサイズであるが、予想されるのは TX-100 に取り込まれず凝集した R2c または、埃等の不純物である。

4-2-3-2. 複合体の電気泳動

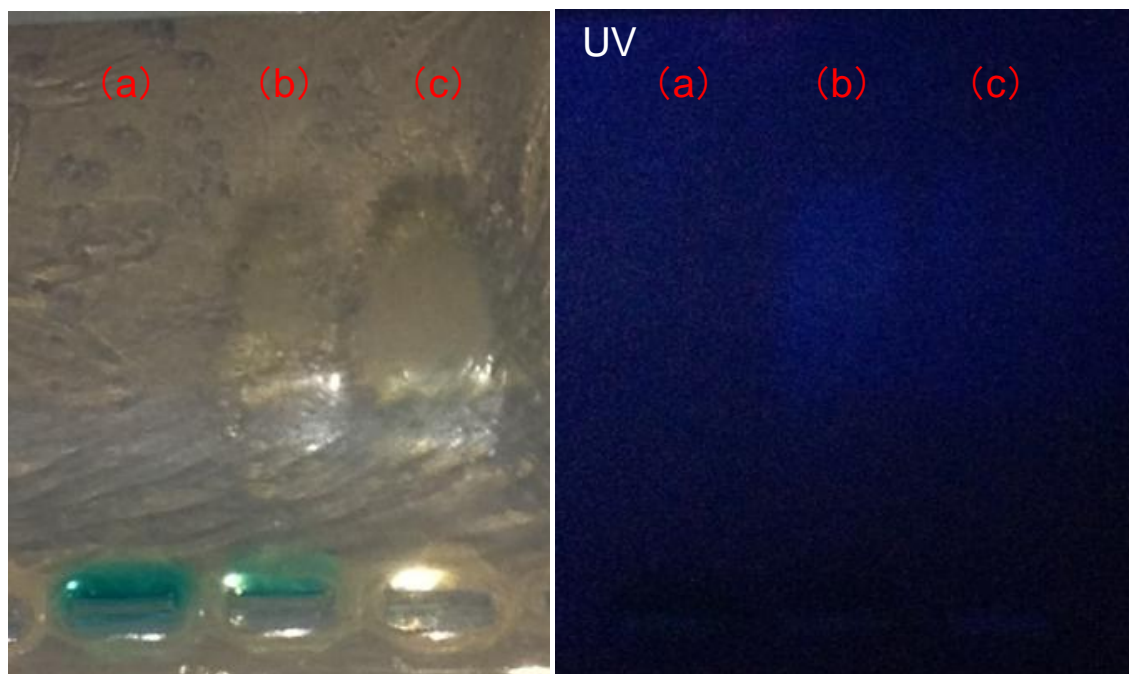


図 4-10、電気泳動 ($R2c@TX-100$ (a)、 $R2c@(BSA)_2$ (b)、 BSA (c))

アガロースゲルを用いて電気泳動を行った。 BSA は等電点を有しており、電気泳動により、等電点に応じてゲル内を移動する。本実験では、生成物 $R2c@(BSA)_2$ とその原料となる $R2c@TX-100$ 、及び、 BSA の比較を行った (図 4-10)。電気泳動は 50 V で 1 時間行っている。

電気泳動で $R2c@(BSA)_2$ は、 BSA のみと同じ泳動距離に無色のバンドが観測された。この領域では、 BSA のみと同様に UV の照射で BSA 由来の弱い発光が観測された。一方、 $R2c$ に由来する青色のバンドを含む領域は原点付近でのみ観測されている。このバンドは、わずかに移動していることが観測されるが。これは、 $R2c$ が BSA モノマーではなく BSA ダイマーと複合化したことが原因と考えられる。

一方、 BSA を含まない $R2c@TX$ では、泳動が全く観測されなかった。これは、形成される $TX-100$ ミセルが電荷をもたないことに起因する。これより、わずかに泳動している生成物 $R2c@(BSA)_2$ と原料 $R2c@TX$ では異なる複合体が形成していることが示唆される。

また、電気泳動を行うことで $R2c$ を含む $R2c@(BSA)_2$ と $R2c@TX-100$ どちらのバンドも観測される $R2c$ 由来の青色が明らかに薄くなっていた。これは、電気泳動中にかけて電位により、 $R2c$ が酸化されてしまったためと考えられる。

4-2-4. R2c@(BSA)₂ のビタミン C 蛍光検出

R2c@(BSA)₂ のビタミン C に対する蛍光挙動及び、R2c@(BSA)₂、R2c@TX-100、リポソーマル R2c のビタミン C 添加後の蛍光強度時間変化の比較を行った (図 4-11)。この蛍光強度時間変化の比較は、生体内でのビタミン C 検出のモデル実験として pH 7.4 で行っている。また、添加するビタミン C は反応系が高濃度ビタミン C 療法で用いられるビタミン C と同程度の 10 mM (最終濃度 10 mM) となるようビタミン C を添加した。

R2c@(BSA)₂ にビタミン C を添加したところ、20 分程度で蛍光強度が 100 倍以上に増大した。一方、R2c@TX-100、及びリポソーマル R2c の蛍光強度時間変化は 20 分経過しても数倍しか増大しなかった。これより、R2c@(BSA)₂ が非常に高感度な蛍光プローブであることが確認された。リポソームと TX-100 は、ほぼ完全に R2c を覆ってしまうため、ビタミン C と反応するためには、リポソームとミセル共に最も外側に

存在する親水性部分を通過し、さらに、内側の疎水性部分を移動して R2c と反応する必要がある。このため、ビタミン C と R2c の衝突頻度が小さくなり、感度が小さいことが予想される。一方、R2c@(BSA)₂ は疎水性の空間に R2c が取り込まれており、完全に覆ってしまうリポソームやミセルよりビタミン C が侵入しやすい環境にあると予想される。このため、R2c とビタミン C の衝突頻度が大きくなり蛍光強度が顕著に増大したと説明できる。

また、R2c@(BSA)₂ は指数関数的に蛍光強度が増大するリポソーマル R2c とは異なり、メタノール中に溶解させた R2c にビタミン C を添加した蛍光強度時間変化と同じ S 字

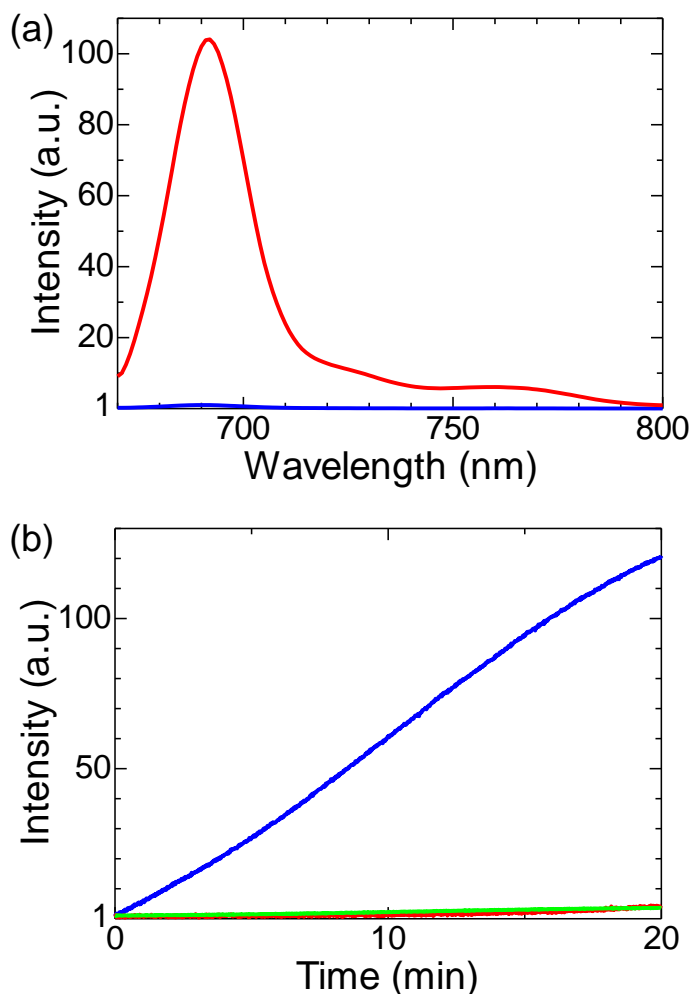


図 4-11、R2c@(BSA)₂ のビタミン C 添加前 (青) と後 (赤) の蛍光スペクトル (a) とビタミン C 添加後 (R2c@(BSA)₂: 青線、R2c@TX-100: 赤線、リポソーマル R2c: 緑線) の蛍光強度時間変化 (b)

型のシグモイド曲線を示す。この蛍光強度時間変化の挙動の違いは 4-2-9 で詳細に議論する。

4-2-5. R2c@(BSA)₂ のビタミン C 検出の最適条件の検討

生体内と同程度の pH 7.4 において、R2c@(BSA)₂ は従来のリポソーマル R2c より高い反応性を示している (図 4-11b)。この R2c@(BSA)₂ を用いて、より高感度なビタミン C 蛍光検出を行うための測定条件の検討を行った。

BSA は pH や温度に依存してその構造を変化させることが知られている。このため、R2c@(BSA)₂ は、pH や温度を変化させることで、ビタミン C の BSA 疎水性空間への侵入し易さが変化し、ビタミン C と R2c の衝突頻度が変化することが予想される。また、R2c の周囲の環境が異なることで蛍光挙動に変化が生じる可能性もある。このため、R2c@(BSA)₂ へのビタミン C 添加後の蛍光強度時間変化に関して、pH と温度の依存性を評価し、最適条件の検討を行った。

4-2-5-1. R2c@(BSA)₂ の pH 依存性

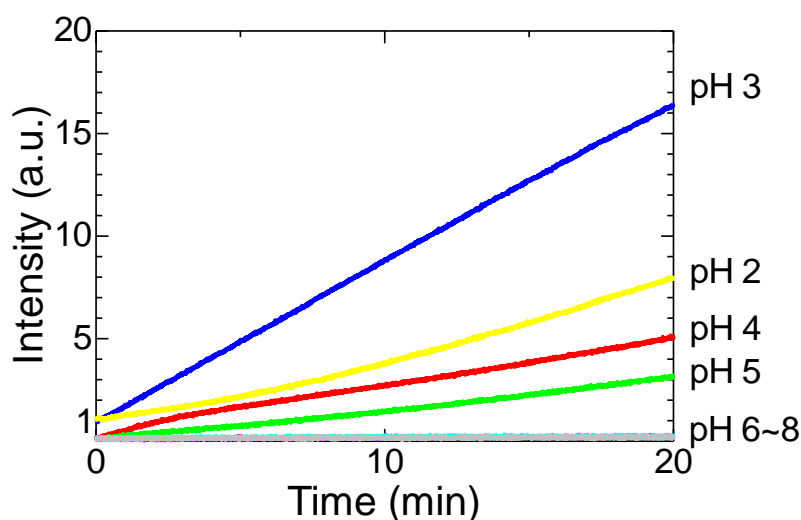


図 4-12、R2c@(BSA)₂ のビタミン C 蛍光検出 pH 依存性 (黄 : pH 2、青 : pH 3、赤 : pH 4、緑 : pH 5、水色 : pH 6、紫 : pH 7、灰色 : pH 8) ※pH6-8 の蛍光強度は同程度

R2c@(BSA)₂ のビタミン C 蛍光検出の pH 依存性を測定した (図 4-12)。この時、5 mM のビタミン C を添加して蛍光強度時間変化を測定している。ビタミン C は酸の一種であるため、ビタミン C を添加した際の pH の変動を抑えるため、pH 2~8 の測定は全てイオン強度を 100 mM のリン酸バッファー中で測定した。(1 mM のイオン強度中では R2c@(BSA)₂ は白濁する)

R2c@(BSA)₂の蛍光強度時間変化は酸性条件下で強い蛍光を示す傾向にあった。特にpH 3において短時間で強い蛍光が観測された。pH 3のビタミンC添加前の蛍光強度を基準にして、他のpHでの蛍光強度時間変化も図4-12に示す。pH 3及び2はビタミンC添加前後でpH 4~8よりも蛍光強度が強いことが確認された。既報より、BSAの構造はpH 3~4の間で大きく変化することが示されている⁷。この構造の変化がR2cとビタミンCの衝突頻度の増大に対して大きく寄与していることが示唆される。

最近の研究で、BSAのpHに依存した構造についてより詳細に解析された。Yehらの報告によると、BSAモノマーの構造は酸性条件下になるにつれて、図4-13のようにモルテングロビュール構造が進行し、折り畳み構造からより広がった構造へと変化する⁸。このため、酸性条件下ではビタミンCがBSAの内部に侵入しやすくなり、反応性が向上したと考えられる。

BSAダイマーでもモルテングロビュール構造を形成することを考え、PyMOLを用いてBSAダイマーの相互作用部分の解析を行った(図4-14)。これにより、BSAダイマーはIIIB間で相互作用を形成していることが明らかとなった。この相互作用領域を基にBSAダイマーのモルテングロビュール構造のモデルを作成した(図4-13)²。

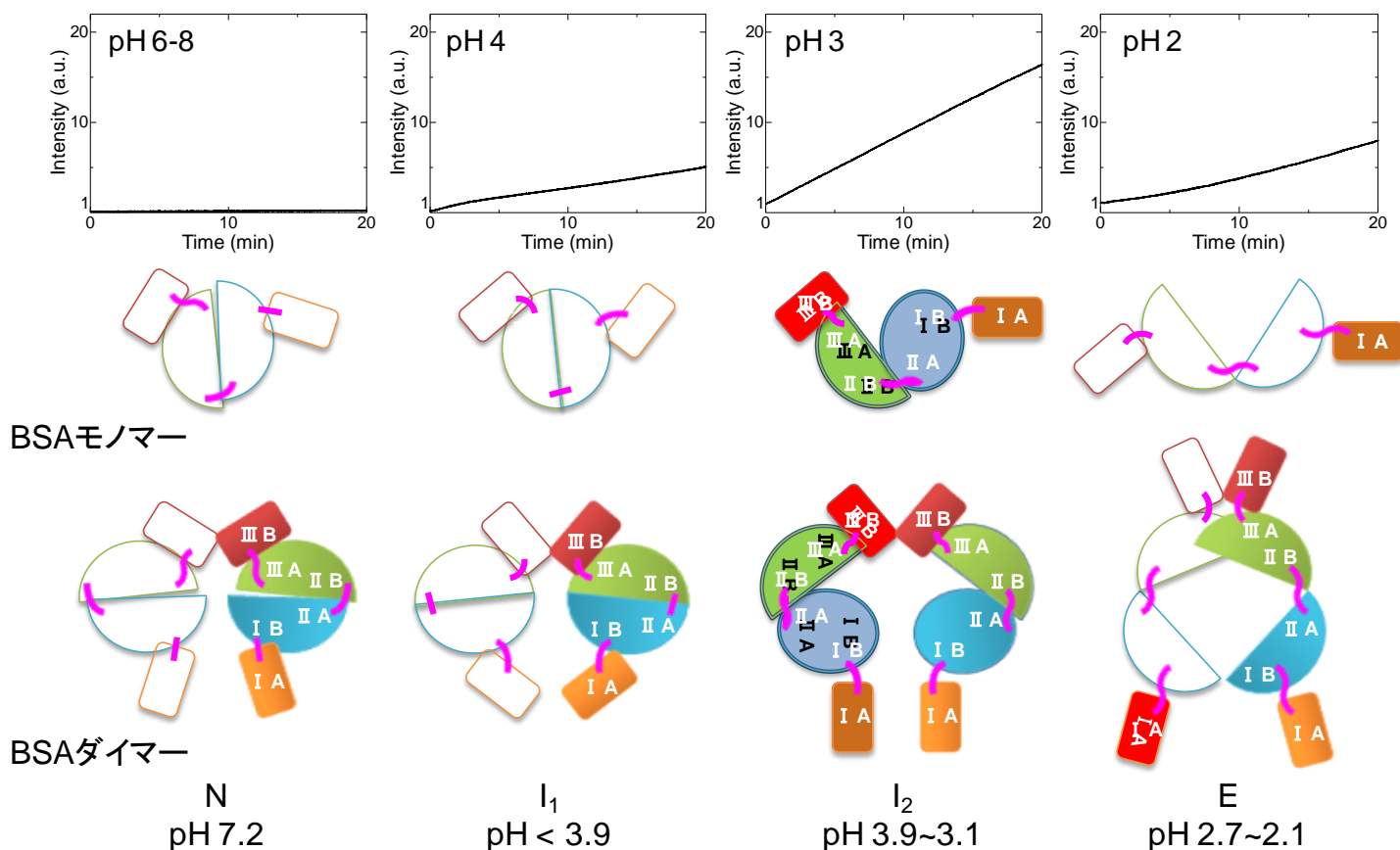


図4-13、R2c@(BSA)₂の蛍光強度時間変化及びBSAモノマーとBSAダイマーのpH依存性

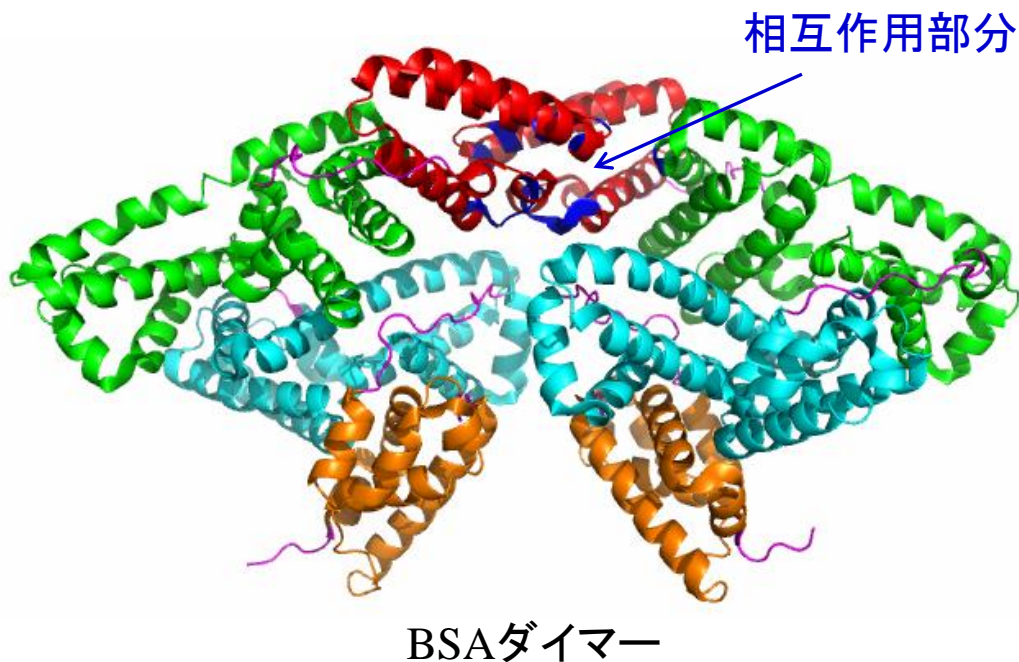


図 4-14、BSA ダイマーの相互作用領域の解析 (PDB:4F5S)

また、pH 2 において pH 3 より蛍光強度の増大が小さくなったのは既報より、pH 4 から pH 2 へ低下する際、BSA の体積と断熱圧縮率が低下するため、ビタミン C が侵入し難くなるためと考えられる⁹⁾。

本測定により、R2c@(BSA)₂ は pH 3 で最も効率よくビタミン C と反応することが確認された。以降の水溶液中での反応でも効率よくビタミン C と反応させられる pH 3 でビタミン C 添加による蛍光強度の時間変化を測定した。

4-2-5-2. R2c@(BSA)₂ のイオン強度依存性

R2c@(BSA)₂ のビタミン C 蛍光検出のイオン強度依存性を測定した (図 4-15)。実験により、リン酸バッファー 10 mM において蛍光強度の増大が大きく、イオン強度が最も高い 100 mM で蛍光強度時間変化が小さいことが確認された。イオン強度 100 mM で蛍光強度の増大が小さいのは、溶存するバッファーの濃度が濃すぎるため、R2c とビタミン C 間の反応を阻害、または、ビタミン C の BSA ダイマーへの侵入が阻害されたためと考えられる。さらにリン酸バッファーを高濃度の 1 M とした際、R2c@(BSA)₂ を含む水溶液は白濁するため、測定には不適當である。一方、イオン強度が最も低い 1 mM の条件下では、蛍光強度の増大がイオン強度 10 mM より小さかった。これは、ビタミン C の添加により pH 3 より低くなってしまったためと考えられる。

上記より、反応系の pH を出来るだけ一定にしつつも、R2c とビタミン C 間の反応を

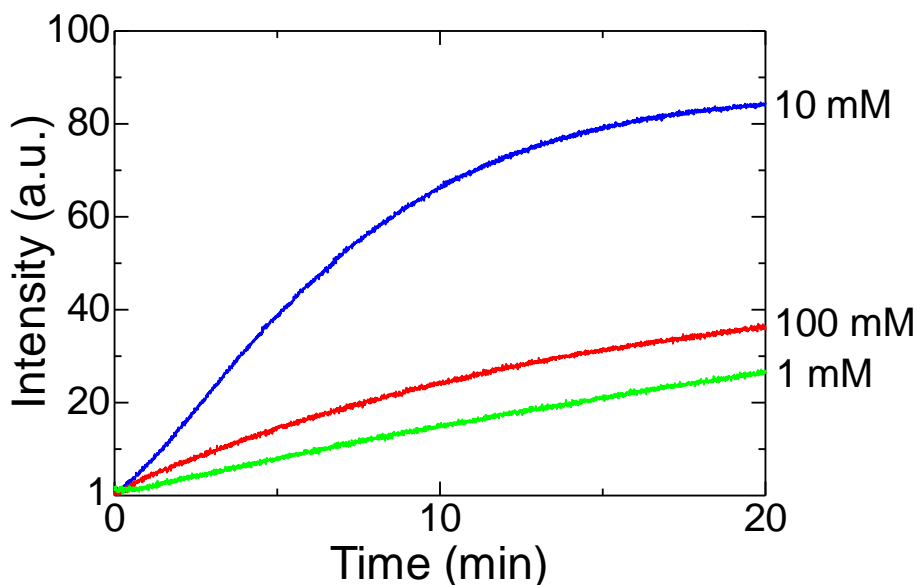


図 4-15、R2c@(BSA)₂ のビタミン C 蛍光検出イオン強度と温度の影響

阻害しないイオン強度 10 mM が本研究でビタミン C を検出する際有用な条件であることが確認された。

また、本実験では本来温度の増大により、分子間の衝突頻度増大に由来した蛍光強度の増大が観測されると予想していたが、温度が高い条件下の方が蛍光強度の増大が小さいことが確認された。この現象を確認するため、次の実験により最適な pH 3、イオン強度 10 mM での温度を変化させた蛍光強度時間変化を測定した。

4-2-5-3. R2c@(BSA)₂ の温度依存性

R2c@(BSA)₂ のビタミン C 蛍光検出の温度依存性を測定した (図 4-16)。この結果、温度が低い 25°C で最も蛍光強度の増大が大きく、反対に温度が高い 45°C で最も蛍光強度の増大が小さかった。通常、分子間の反応は、温度が高いほど反応速度が増大する傾向にある。第 3 章では、メタノール中の R2c の蛍光強度時間変化は温度が大きいほど短時間で強い蛍光が観測されている (図 3-9)。しかし、本測定の蛍光強度の時間変化は温度が低いほど強い蛍光が観測され、より反応が進行していることを示した。これは R2c@(BSA)₂ とビタミン C 間の反応が、温度による蛍光強度の増大より BSA の構造変化の影響が大きいためと考えられる。この構造変化は加熱により、 α ヘリックスから結合距離の短い β シートの比率が増大して BSA の疎水性空間中へビタミン C が侵入し難くなったためと考えている¹⁰⁻¹³。さらに温度を下げた 15°C の測定では、25°C よりも蛍光強度の増大が大きかったが、セル表面に霜が生じやすく、測定の精度の低下を招いてしまうため、測定の再現性も考慮し、25°C での測定を R2c@(BSA)₂ によるビタミン C 蛍光検出に適した条件とした。

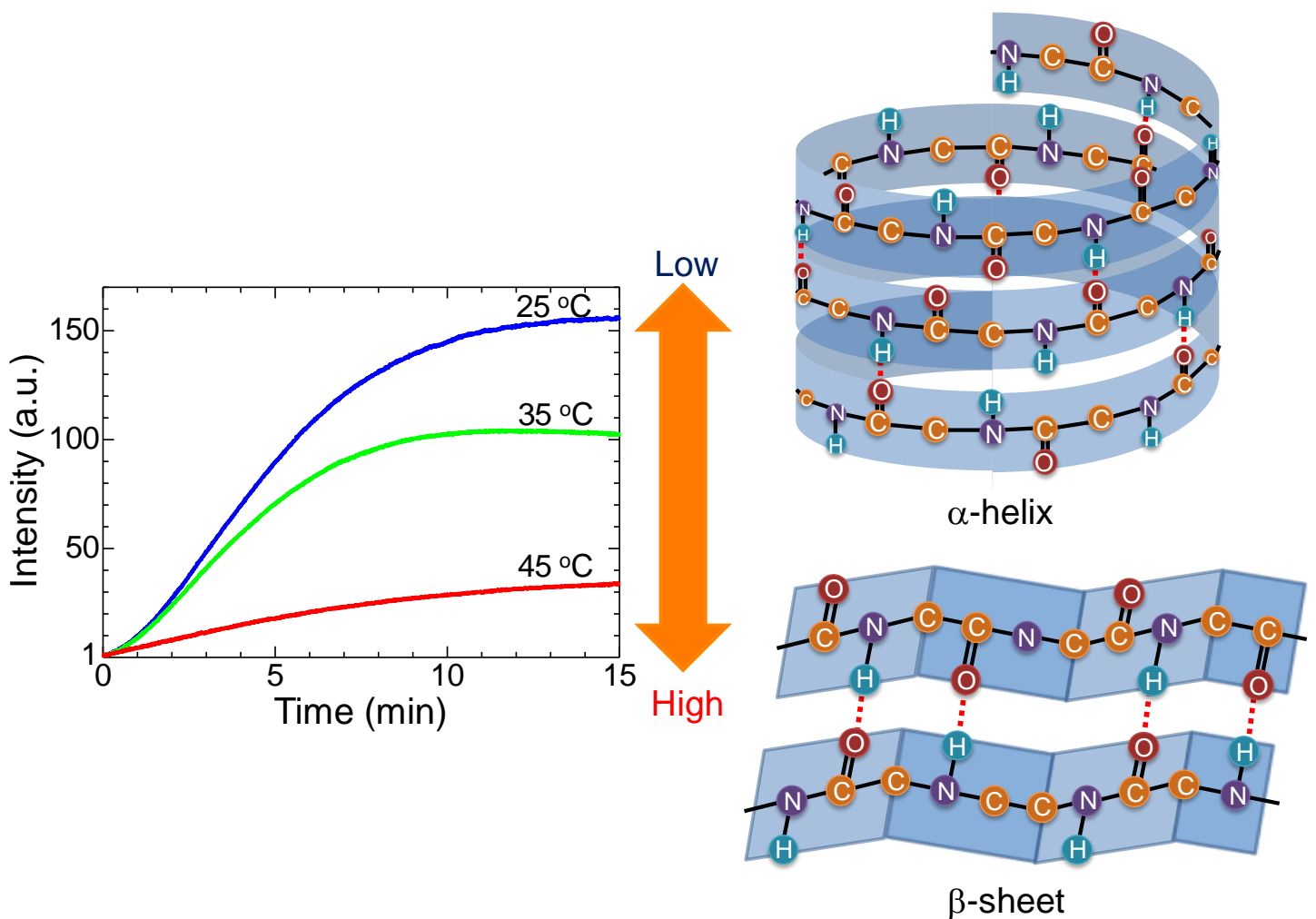


図 4-16、R2c@(BSA)₂ のビタミン C 添加後の蛍光強度時間変化の温度依存性 (青: 25°C、赤: 35°C、緑: 45°C)

4-2-6. R2c@(BSA)₂ の濃度依存性

本実験より、反応性と測定精度から検討した R2c@(BSA)₂ のビタミン C 蛍光検出の最適条件 (pH 3、バッファのイオン強度 10 mM、温度 20°C) でビタミン C 添加後の蛍光強度時間変化を測定している。R2c@(BSA)₂ を用いた蛍光強度の時間変化の濃度依存性を測定した (図 4-17)。この時、蛍光強度時間変化は S 字型のシグモイド曲線を示していた。ここで、ビタミン C を含まない pH 3 のリン酸バッファのみを R2c@(BSA)₂ を含む水溶液に添加した 0 μ M での測定に注目してみると、ビタミン C が含まれていないが、徐々に蛍光強度の増大が観測された (図 4-17b)。これは、酸性条件下となることで、加水分解が生じて TEMPO ラジカルが SiPc から脱離してしまったためと考えられる。しかし、1 μ M のビタミン C 添加後の蛍光検出の実験結果と比較すると、0 μ M との

蛍光強度の時間変化に対して有意な蛍光強度の増大が観測された。これより、 $R2c@(BSA)_2$ を用いたビタミン C の蛍光検出が μM オーダーまで可能であることが明らかとなった。

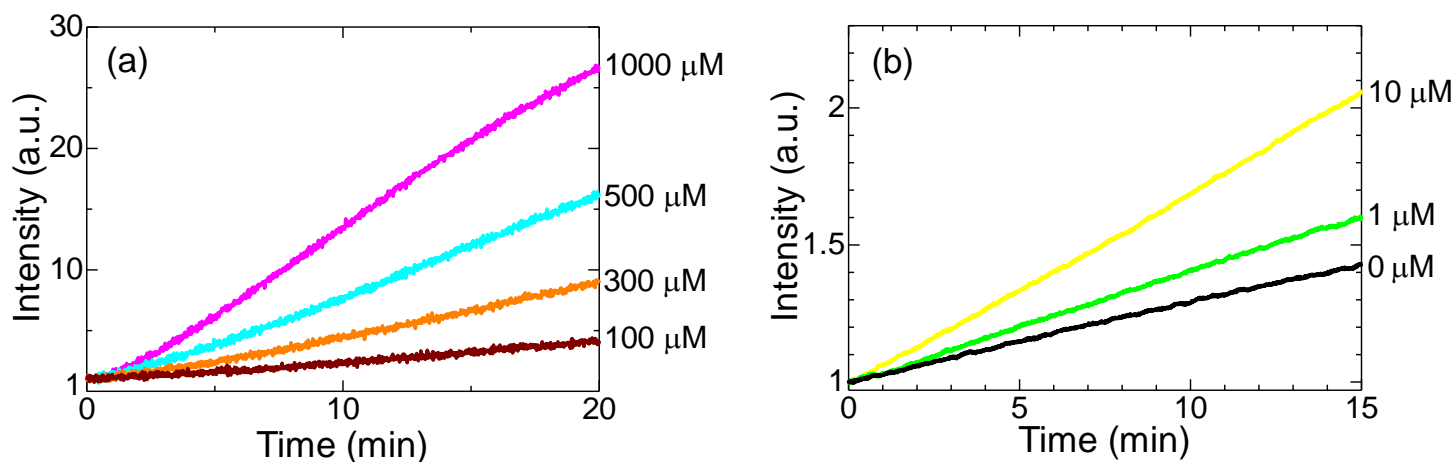


図 4-17、 $R2c@(BSA)_2$ のビタミン C 蛍光検出濃度依存性

リポソーマル $R2c$ のビタミン C の検出限界が mM オーダーであるのに対し、 $R2c@(BSA)_2$ は $1 \mu\text{M}$ のビタミン C 検出にも成功した (図 4-17b)。これより、 $R2c$ を BSA ダイマーと複合化することで 100 倍以上の反応性の向上を達成した。また、第三章の $R2c$ を高感度化したリポソーマル $R2cS_1$ は $50 \mu\text{M}$ 程度のビタミン C 検出まで成功しているが、 $R2c@(BSA)_2$ は $1 \mu\text{M}$ のビタミン C 検出まで成功し、さらに反応性を向上することに成功した。

4-2-7. $R2c@(BSA)_2$ のビタミン C 蛍光検出の解析

図 4-11b より、 $R2c@(BSA)_2$ はリポソーマル $R2c$ と比べて非常に高い反応性を示した。この反応性の違いを解析するため、それぞれの蛍光プローブのビタミン C 添加後の蛍光強度時間変化の解析を行った。

初めに、リポソーマル $R2c$ の蛍光強度時間変化の解析を行った。リポソーマル $R2c$ のビタミン C 添加後の蛍光強度時間変化は指数関数的に増大している。ここで、 $R2c$ とビタミン C に関する二次関数の微分方程式を考えた。 $R2c$ の一電子還元体 $R2c_1$ と、二電子還元体 $R2c_0$ とおいて、ビタミン C が二電子還元することを考慮して計算を行った (図 4-18)。

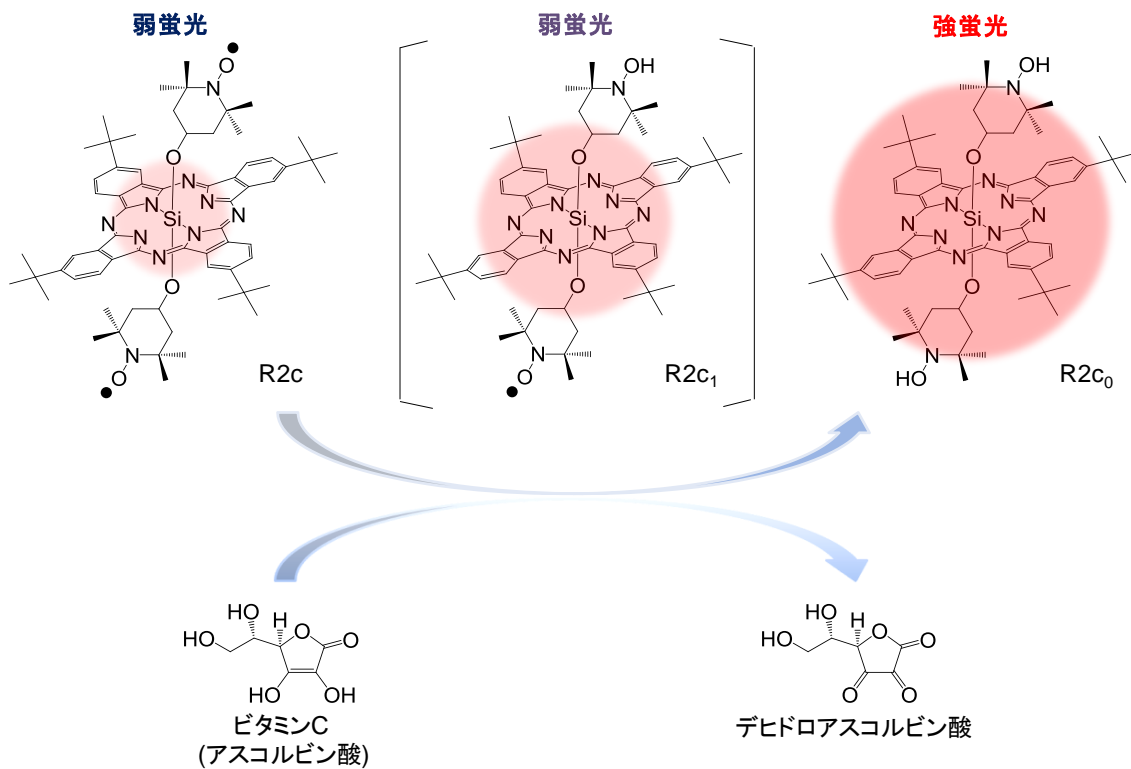


図 4-18、R2c とビタミン C の反応



$$\frac{d[R2c]}{dt} = \frac{d[VC]}{dt} = -k[R2c][VC] \quad (4-2)$$

$$= -\frac{d[R2c_0]}{dt} \quad (4-3)$$

ここで、 $[R2c] \ll [VC]$ となるため、 $[VC]$ を定数とみなす

このため、二次反応から擬一次反応とみなして微分方程式の計算を行った。

この時、 $\frac{d[VC]}{dt} = 0$ より、

$$k[VC] = k' \text{ とおくと}$$



$$\frac{d[R2c]}{dt} = -k'[R2c] \quad (4-5)$$

$$\frac{d[R2c]}{[R2c]} = -k' dt$$

ここで、初期値 $t=0$ において、R2c の濃度を $[R2c]_0$ とする

$$\int_{[R2c]_0}^{[R2c]} \frac{d[R2c]}{[R2c]} = -k' \int_0^t dt \quad (4-6)$$

$$[\ln[R2c]]_{[R2c]_0}^{[R2c]} = -k'[t]_0^t$$

$$\ln\left(\frac{[R2c]}{[R2c]_0}\right) = -k't$$

$$\frac{[R2c]}{[R2c]_0} = e^{-k't}$$

$$[R2c] = [R2c]_0 e^{-k't} \quad (4-7)$$

R2c について求めた関数を用いて R2c₀ について求める

$$[R2c]_0 = [R2c] + [R2c_0] \quad (4-8)$$

$$[R2c_0] = [R2c]_0 - [R2c]$$

$$[R2c_0] = [R2c]_0 - [R2c]_0 e^{-k't}$$

$$[R2c_0] = [R2c]_0 (1 - e^{-k't}) \quad (4-9)$$

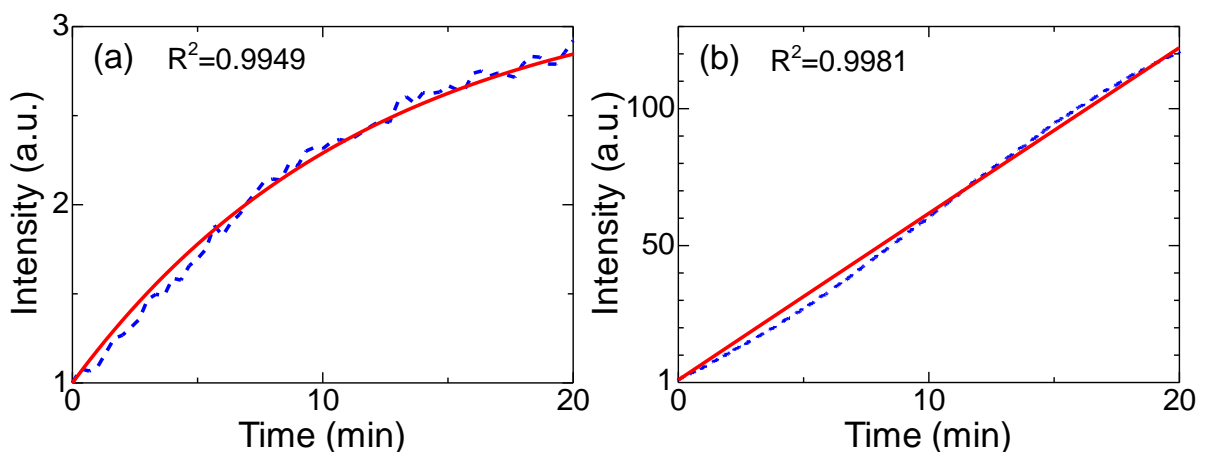


図 4-19、リポソーマル R2c (a) と R2c@(BSA)₂ の (b) ビタミン C 添加後の蛍光強度時間変化

擬一次反応の微分方程式を解くことで得られた関数を用いたところ、pH 7.4 のリン酸バッファー中リポソーマル R2c の蛍光強度時間変化をよく再現した (図 4-19a)。擬一次反応の関数を用いることで実験値がよく再現される原因は、律速段階がビタミン C のリポソームへの侵入となるためである。当研究室では、R1c と R2c をリポソームにそれぞれ取り込ませた蛍光プローブのリポソーマル R1c とリポソーマル R2c の反応速度定数がどちらも $24 \text{ min}^{-1}\text{M}^{-1}$ であることを報告している (図 4-20) ¹⁴。リポソーマル R1c とリポソーマル R2c では、反応部位の TEMPO ラジカルの数に関係なく同じ速度定数を示していることが、リポソームへのビタミン C の侵入が反応の律速段階であることの根拠である。

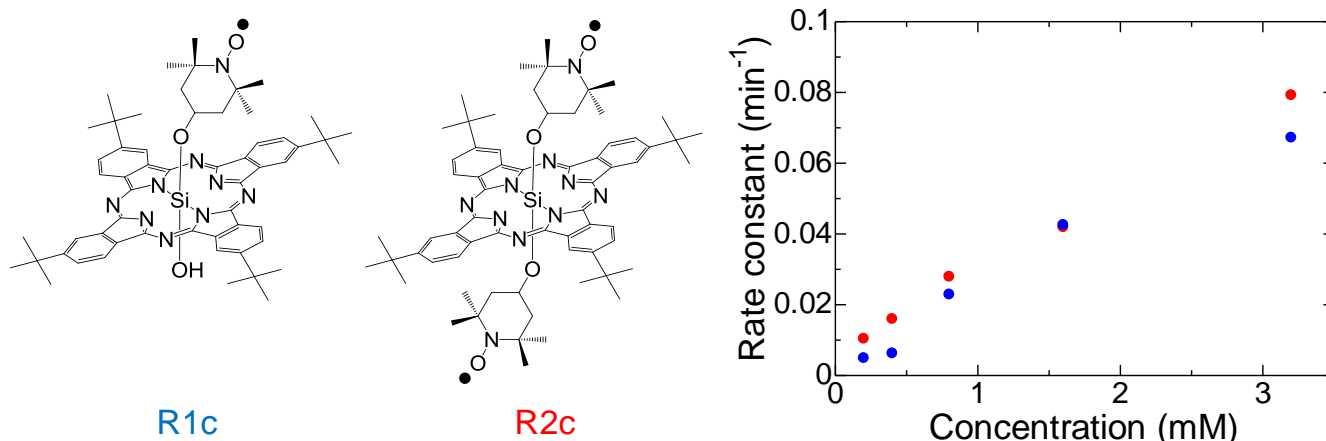


図 4-20、リポソーマル R1c (青) とリポソーマル R2c (赤) の反応速度定数

一方、R2c@(BSA)₂ の蛍光強度時間変化を観測すると、S 字のシグモイド曲線を示していた (図 4-19b)。S 字のシグモイド曲線では、変曲点を二箇所有するため、リポソーマル R2c と同様の擬一次反応の関数では、その実験値を再現することができなかった。そこで、R2c 自体の構造について注目してみると、R2c はビタミン C との反応部位となる TEMPO ラジカルを二つ持つ分子であることが分かる (図 4-20)。このため、二つの反応部位にビタミン C が順次反応していく逐次反応が生じていると考えた (図 4-21)。そこで、R2c@(BSA)₂ の蛍光強度時間変化を解析するため、逐次反応の微分方程式を解くことでその関数を得た。

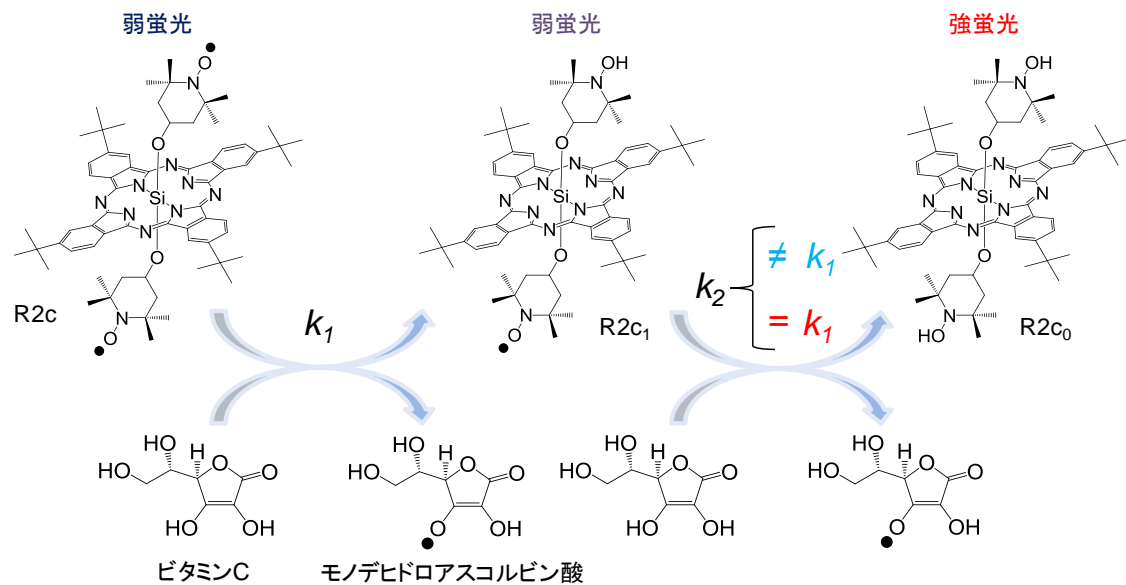
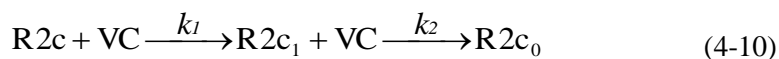


図 4-21、R2c とビタミン C の逐次反応

初めに、逐次反応の中でもそれぞれの速度定数が独立で $k_1 \neq k_2$ の場合について考え、続いて、 $k_1 = k_2$ となる場合を考える。



$$\frac{d[R2c]}{dt} = -k_1[R2c][VC] \quad (4-11)$$

$$\frac{d[R2c_1]}{dt} = k_1[R2c][VC] - k_2[R2c_1][VC] \quad (4-12)$$

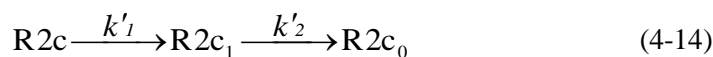
$$\frac{d[R2c_0]}{dt} = k_2[R2c_1][VC] \quad (4-13)$$

上記の連立微分方程式を解くことで逐次反応の関数を得ることができる

ここで、 $[R2c] \ll [VC]$ 、 $[R2c_1] \ll [VC]$ となるため、どちらも $[VC]$ を定数とみなす

この時 $\frac{d[VC]}{dt} = 0$ より、

$$k_1[VC] = k'_1, \quad k_2[VC] = k'_2 \text{ とおくと}$$



$$\frac{d[\text{R}2\text{c}]}{dt} = -k'_1[\text{R}2\text{c}] \quad (4-15)$$

$$\frac{d[\text{R}2\text{c}_1]}{dt} = k'_1[\text{R}2\text{c}] - k'_2[\text{R}2\text{c}_1] \quad (4-16)$$

$$\frac{d[\text{R}2\text{c}_0]}{dt} = k'_2[\text{R}2\text{c}_1] \quad (4-17)$$

[R2c]について

$$\frac{d[\text{R}2\text{c}]}{dt} = -k'_1[\text{R}2\text{c}]$$

$$\frac{d[\text{R}2\text{c}]}{[\text{R}2\text{c}]} = -k'_1 dt$$

ここで、初期値 $t=0$ において、R2c の濃度を $[\text{R}2\text{c}]_0$ とする

$$\int_{[\text{R}2\text{c}]_0}^{[\text{R}2\text{c}]} \frac{d[\text{R}2\text{c}]}{[\text{R}2\text{c}]} = -k'_1 \int_0^t dt \quad (4-18)$$

$$[\ln[\text{R}2\text{c}]]_{[\text{R}2\text{c}]_0}^{[\text{R}2\text{c}]} = -k'_1 [t]_0^t$$

$$\ln\left(\frac{[\text{R}2\text{c}]}{[\text{R}2\text{c}]_0}\right) = -k'_1 t$$

$$\frac{[\text{R}2\text{c}]}{[\text{R}2\text{c}]_0} = e^{-k'_1 t}$$

$$[\text{R}2\text{c}] = [\text{R}2\text{c}]_0 e^{-k'_1 t} \quad (4-19)$$

[R2c₁]について

$$\frac{d[\text{R}2\text{c}_1]}{dt} = k'_1[\text{R}2\text{c}] - k'_2[\text{R}2\text{c}_1]$$

[R2c]を代入する

$$\frac{d[\text{R}2\text{c}_1]}{dt} = k'_1[\text{R}2\text{c}]_0 e^{-k'_1 t} - k'_2[\text{R}2\text{c}_1]$$

$$\frac{d[\text{R}2\text{c}_1]}{dt} + k'_2[\text{R}2\text{c}_1] = k'_1[\text{R}2\text{c}]_0 e^{-k'_1 t} \quad (4-20)$$

ここで定数変化法を用いると、微分方程式を下記のように変形できる

$$\frac{dy}{dx} + yf(x) = g(x) \quad (4-21)$$

$$e^{\int f(x)dx} y = \int e^{\int f(x)dx} g(x)dx + C \quad (4-22)$$

これより、

$$e^{\int_0^t k_2' dt} [R2c_1] = \int_0^t e^{\int_0^t k_2' dt} k_1' [R2c]_0 e^{-k_1' t} dt \quad (4-23)$$

$$e^{k_2' t} [R2c_1] = \int_0^t e^{k_2' t} k_1' [R2c]_0 e^{-k_1' t} dt$$

$$e^{k_2' t} [R2c_1] = k_1' [R2c]_0 \int_0^t e^{(k_2' - k_1') t} dt \quad (4-24)$$

ここで、 $k_1' \neq k_2'$ という条件を考える

$$e^{k_2' t} [R2c_1] = k_1' [R2c]_0 \left[\frac{1}{k_2' - k_1'} e^{(k_2' - k_1') t} \right]_0 \quad (4-25)$$

$$e^{k_2' t} [R2c_1] = k_1' [R2c]_0 \left\{ \frac{1}{k_2' - k_1'} e^{(k_2' - k_1') t} - \frac{1}{k_2' - k_1'} \right\}$$

$$e^{k_2' t} [R2c_1] = \frac{k_1' [R2c]_0}{k_2' - k_1'} \left\{ e^{(k_2' - k_1') t} - 1 \right\}$$

$$[R2c_1] = \frac{k_1' [R2c]_0}{k_2' - k_1'} \left(e^{-k_1' t} - e^{-k_2' t} \right) \quad (4-26)$$

[R2c₀]について

$$[R2c]_0 = [R2c] + [R2c_1] + [R2c_0] \quad (4-27)$$

$$[R2c_0] = [R2c]_0 - [R2c] - [R2c_1]$$

[R2c]と[R2c₁]を代入する

$$[R2c_0] = [R2c]_0 - [R2c]_0 e^{-k_1' t} - \frac{k_1' [R2c]_0}{k_2' - k_1'} \left(e^{-k_1' t} - e^{-k_2' t} \right)$$

$$[R2c_0] = [R2c]_0 \left\{ 1 - e^{-k_1' t} - \frac{k_1' [R2c]_0}{k_2' - k_1'} \left(e^{-k_1' t} - e^{-k_2' t} \right) \right\}$$

$$[R2c_0] = [R2c]_0 \left\{ 1 + \frac{k_1'}{k_1' - k_2'} \left(-\frac{k_1' - k_2'}{k_1'} e^{-k_1' t} + e^{-k_1' t} - e^{-k_2' t} \right) \right\}$$

$$[\text{R2c}_0] = [\text{R2c}]_0 \left\{ 1 + \frac{1}{k'_1 - k'_2} (k'_2 e^{-k'_1 t} - k'_1 e^{-k'_2 t}) \right\} \quad (4-28)$$

得られた三つの関数の内、蛍光強度の増大の寄与が最も大きい R2c_0 の関数を用いて 蛍光強度時間変化の再現を行った (図 4-22)。

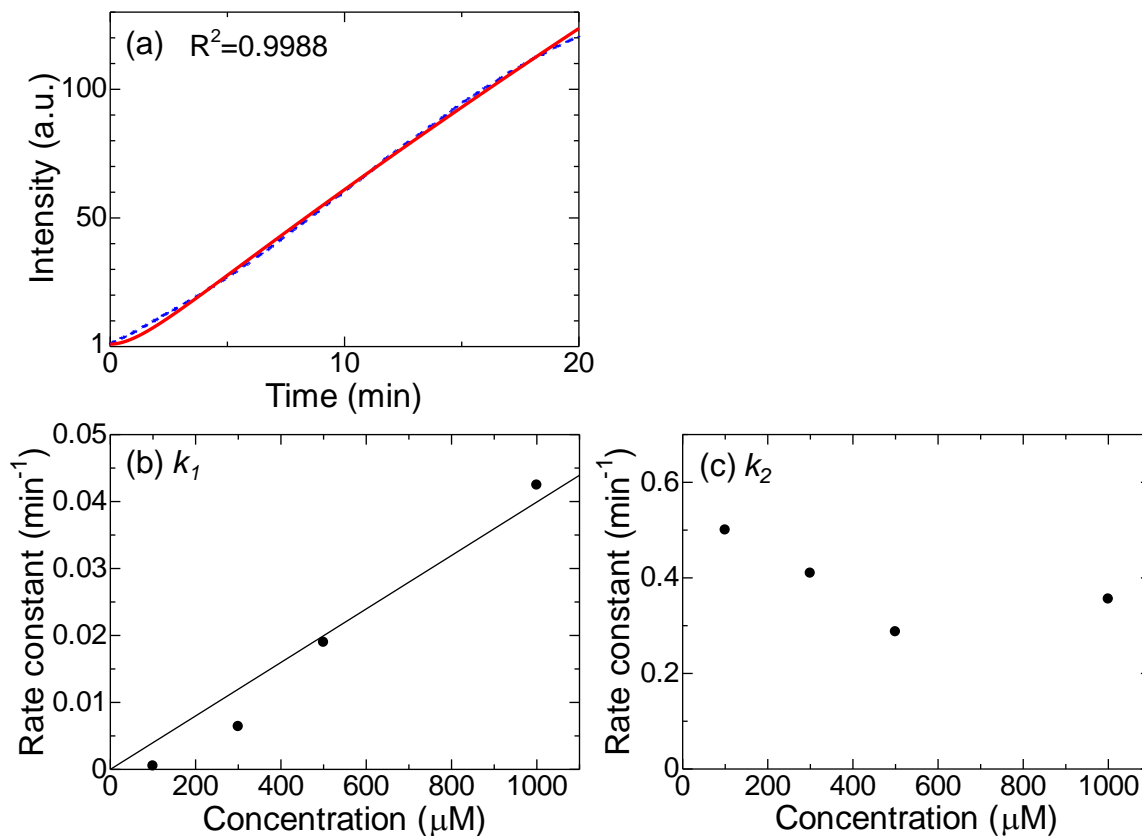


図 4-22、 R2c@BSA_2 のビタミン C 添加後の蛍光強度時間変化 (a) 及び $[\text{R2c}_0]$ の反応速度定数 k_1 (a)、 k_2 (b)

この結果、 R2c_0 の逐次反応を基にした関数は擬一次反応の関数より実験値をよく再現した。また、図 4-17a のビタミン C の濃度依存性の測定結果に関して解析を行った。各測定 (100、300、500、1000 mM) における蛍光強度時間変化の再現は付録 4-1 に示した。

反応速度定数 k_1 が $40 \text{ min}^{-1}\text{M}^{-1}$ と計算された (図 4-22)。しかし、反応速度定数 k_2 は求められなかった。反応速度定数 k_1 と k_2 は、 $k_1[\text{VC}] = k'_1$ 、 $k_2[\text{VC}] = k'_2$ であることから、本来濃度に比例するはずである。これに対し、 k_2 は濃度に関して比例関係が見られなかった。本解析に使用した R2c_0 の関数では、実験値を再現する精度や速度定数の解析に

関して不適當であることが確認された。

R2c₀だけでなく、R2c₁およびR2cもわずかではあるが、蛍光を発するためこれらの蛍光も考慮した関数を利用する必要があると考えた。そこで、逐次反応の微分方程式を解くことで得られる関数に蛍光量子収率を組み合わせた関数を誘導した。本解析では、蛍光量子収率はトルエン中のR2c、R1c、SiPcの値0.012、0.21、0.57を基に一次近似したもので、R2c、R2c₁、R2c₀の蛍光量子収率をそれぞれ $\Phi^{R2c}=0.012$ 、 $\Phi^{R2c1}=0.21$ 、 $\Phi^{R2c0}=0.57$ とした。時間に対する蛍光強度F(t)を以下のように表わす。

$$F(t) \propto \Phi_F^{R2c} [R2c] + \Phi_F^{R2c1} [R2c_1] + \Phi_F^{R2c0} [R2c_0] \quad (4-29)$$

$$F(t) \propto \Phi_F^{R2c} [R2c]_0 e^{-k_1' t} + \Phi_F^{R2c1} \frac{k_1' [R2c]_0}{k_2' - k_1'} (e^{-k_1' t} - e^{-k_2' t}) + \Phi_F^{R2c0} [R2c]_0 \left\{ 1 + \frac{1}{k_1' - k_2'} (k_2' e^{-k_1' t} - k_1' e^{-k_2' t}) \right\}$$

$$F(t) \propto [R2c]_0 \left[\Phi_F^{R2c} e^{-k_1' t} + \Phi_F^{R2c1} \frac{k_1'}{k_2' - k_1'} (e^{-k_1' t} - e^{-k_2' t}) + \Phi_F^{R2c0} \left\{ 1 + \frac{1}{k_1' - k_2'} (k_2' e^{-k_1' t} - k_1' e^{-k_2' t}) \right\} \right]$$

$$F(t) \propto [R2c]_0 \left[\Phi_F^{R2c0} + \frac{k_1' - k_2'}{k_1' - k_2'} \Phi_F^{R2c} e^{-k_1' t} + \Phi_F^{R2c1} \frac{k_1'}{k_1' - k_2'} (e^{-k_2' t} - e^{-k_1' t}) + \Phi_F^{R2c0} \frac{1}{k_1' - k_2'} (k_2' e^{-k_1' t} - k_1' e^{-k_2' t}) \right]$$

$$F(t) \propto [R2c]_0 \left[\Phi_F^{R2c0} + \frac{1}{k_1' - k_2'} \left\{ (\Phi_F^{R2c} - \Phi_F^{R2c1}) k_1' e^{-k_1' t} + (\Phi_F^{R2c1} - \Phi_F^{R2c0}) k_1' e^{-k_2' t} + (\Phi_F^{R2c0} - \Phi_F^{R2c}) k_2' e^{-k_1' t} \right\} \right]$$

$$F(t) \propto [R2c]_0 \left[\Phi_F^{R2c0} + \frac{1}{k_1' - k_2'} \left\{ (\Phi_F^{R2c} (k_1' - k_2') - \Phi_F^{R2c1} k_1' + \Phi_F^{R2c0} k_2') e^{-k_1' t} + (\Phi_F^{R2c1} - \Phi_F^{R2c0}) k_1' e^{-k_2' t} \right\} \right] \quad (4-30)$$

蛍光量子収率と逐次反応に由来する関数を組み合わせることで蛍光強度F(t)に対応する関数を得た。この関数も用いることで、F(t)を非常によく再現することに成功した(図4-23a)。また、図4-17aのビタミンCの濃度依存性の測定結果についても解析を行い、速度定数を求めた。各測定(100、300、500、1000 μM)における蛍光強度時間変化の再現は付録4-2に示した。

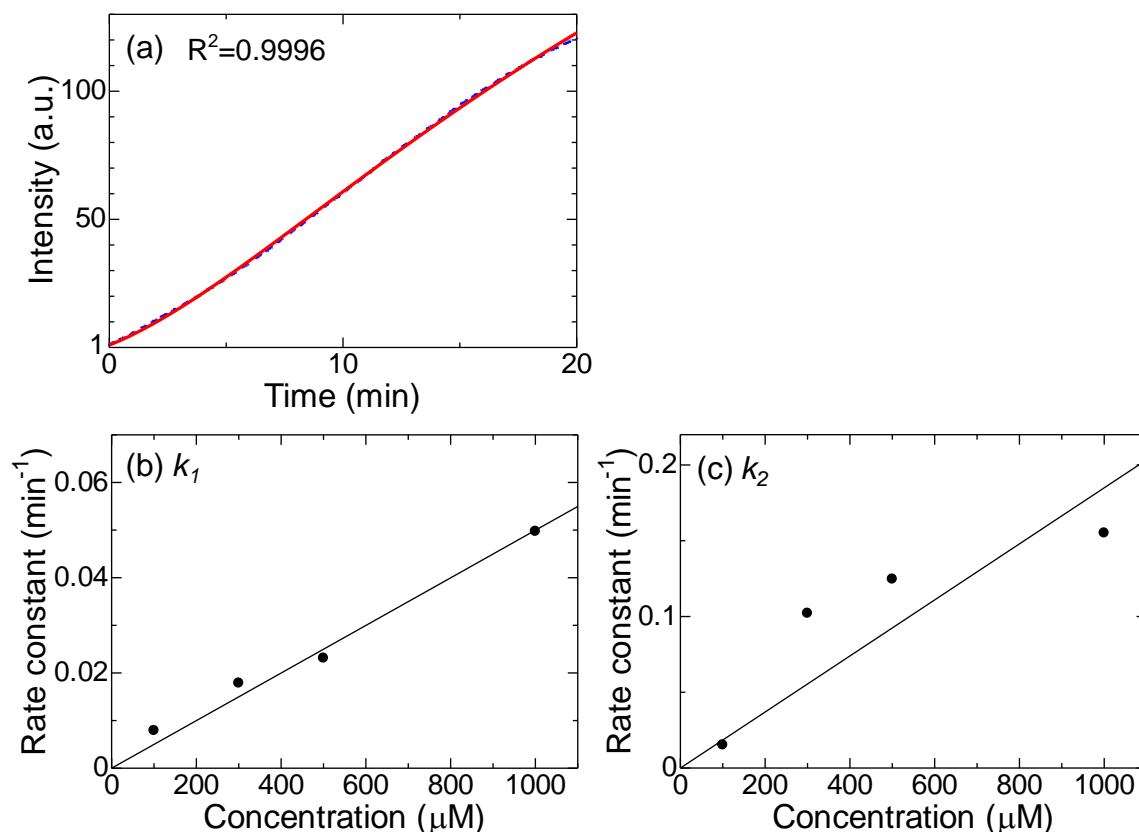
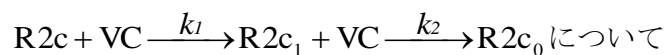


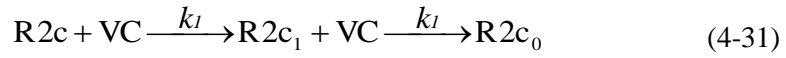
図 4-23、R2c@(BSA)₂ のビタミン C 添加後の蛍光強度時間変化 (a) 及び[R2c₀]の反応速度定数 k_1 (a)、 k_2 (b)

これより、反応速度定数 k_1 、 k_2 が $50 \text{ min}^{-1}\text{M}^{-1}$ 、 $185 \text{ min}^{-1}\text{M}^{-1}$ とそれぞれ計算された (図 4-23)。この関数による解析では、反応速度定数 k_1 、 k_2 どちらにもビタミン C の濃度に対して比例関係が見られた。リポソーマル R2c の反応速度定数が $24 \text{ min}^{-1}\text{M}^{-1}$ であることと比べると、反応速度定数 k_1 、 k_2 共に R2c@(BSA)₂ よりも反応速度定数大きいことが明らかとなった。特に、反応速度定数 k_2 の値が大きいことが確認された。

R2c へのビタミン C 添加による蛍光強度増大は、TEMPO ラジカルをビタミン C が還元することによって生じる。R2c の電子構造の解析より、SiPc と TEMPO ラジカルの電子構造は独立しており、TEMPO ラジカルとビタミン C 間の反応がそのまま蛍光強度の増大を反映する。このため、R2c の逐次反応における一段階目の反応と、二段階目の反応性が等しい $k_1=k_2$ の場合についても考察する必要があると考え、 $k_1=k_2$ での関数の導出を行った。



$k_1=k_2$ より



$$\frac{d[\text{R2c}]}{dt} = -k_1[\text{R2c}][\text{VC}] \quad (4-32)$$

$$\frac{d[\text{R2c}_1]}{dt} = k_1[\text{R2c}][\text{VC}] - k_2[\text{R2c}_1][\text{VC}] \quad (4-33)$$

$$\frac{d[\text{R2c}_0]}{dt} = k_2[\text{R2c}_1][\text{VC}] \quad (4-34)$$

上記の連立微分方程式を解くことで逐次反応の関数を得ることができる
ここで、 $[\text{R2c}] \ll [\text{VC}]$, $[\text{R2c}_1] \ll [\text{VC}]$ となるため、 $[\text{VC}]$ を定数とみなす

$$\text{この時 } \frac{d[\text{VC}]}{dt} = 0 \text{ より、}$$

$$k_1[\text{VC}] = k'_1 \text{ とおくと}$$



$$\frac{d[\text{R2c}]}{dt} = -k'_1[\text{R2c}] \quad (4-36)$$

$$\frac{d[\text{R2c}_1]}{dt} = k'_1[\text{R2c}] - k'_2[\text{R2c}_1] \quad (4-37)$$

$$\frac{d[\text{R2c}_0]}{dt} = k'_2[\text{R2c}_1] \quad (4-38)$$

$[\text{R2c}]$ について

$$\frac{d[\text{R2c}]}{dt} = -k'_1[\text{R2c}]$$

$$\frac{d[\text{R2c}]}{[\text{R2c}]} = -k'_1 dt$$

ここで、初期値 $t=0$ において、 R2c の濃度を $[\text{R2c}]_0$ とする

$$\int_{[\text{R2c}]_0}^{[\text{R2c}]} \frac{d[\text{R2c}]}{[\text{R2c}]} = -k'_1 \int_0^t dt \quad (4-39)$$

$$[\ln[\text{R2c}]]_{[\text{R2c}]_0}^{[\text{R2c}]} = -k'_1 [t]_0^t$$

$$\ln\left(\frac{[R2c]}{[R2c]_0}\right) = -k'_1 t$$

$$\frac{[R2c]}{[R2c]_0} = e^{-k'_1 t}$$

$$[R2c] = [R2c]_0 e^{-k'_1 t} \quad (4-40)$$

[R2c₁]について

$$\frac{d[R2c_1]}{dt} = k'_1[R2c] - k'_1[R2c_1]$$

[R2c]を代入する

$$\frac{d[R2c_1]}{dt} = k'_1[R2c]_0 e^{-k'_1 t} - k'_1[R2c_1]$$

$$\frac{d[R2c_1]}{dt} + k'_1[R2c_1] = k'_1[R2c]_0 e^{-k'_1 t} \quad (4-41)$$

ここで定数変化法を用いると、微分方程式を下記のように変形できる

$$\frac{dy}{dx} + yf(x) = g(x) \quad (4-42)$$

$$e^{\int f(x)dx} y = \int e^{\int f(x)dx} g(x)dx + C \quad (4-43)$$

これより、

$$e^{\int_0^t k'_1 dt} [R2c_1] = \int_0^t e^{\int_0^t k'_1 dt} k'_1 [R2c]_0 e^{-k'_1 t} dt \quad (4-44)$$

$$e^{k'_1 t} [R2c_1] = \int_0^t e^{k'_1 t} k'_1 [R2c]_0 e^{-k'_1 t} dt$$

$$e^{k'_1 t} [R2c_1] = k'_1 [R2c]_0 \int_0^t e^{(k'_1 - k'_1)t} dt$$

ここで、 $k'_1 = k'_2$ という条件により、R2c₁の指数関数がなくなる

$$e^{k'_1 t} [R2c_1] = k'_1 [R2c]_0 \int_0^t e^0 dt$$

$$e^{k'_1 t} [R2c_1] = k'_1 [R2c]_0 \int_0^t 1 dt$$

$$e^{k'_1 t} [R2c_1] = k'_1 [R2c]_0 [t]_0^t$$

$$e^{k_1 t} [\text{R}2\text{c}_1] = k_1' [\text{R}2\text{c}]_0 t$$

$$[\text{R}2\text{c}_1] = k_1' [\text{R}2\text{c}]_0 t e^{-k_1 t} \quad (4-45)$$

$[\text{R}2\text{c}_0]$ について

$$[\text{R}2\text{c}]_0 = [\text{R}2\text{c}] + [\text{R}2\text{c}_1] + [\text{R}2\text{c}_0]$$

$$[\text{R}2\text{c}_0] = [\text{R}2\text{c}]_0 - [\text{R}2\text{c}] - [\text{R}2\text{c}_1]$$

$[\text{R}2\text{c}]$ と $[\text{R}2\text{c}_1]$ を代入する

$$[\text{R}2\text{c}_0] = [\text{R}2\text{c}]_0 - [\text{R}2\text{c}]_0 e^{-k_1 t} - k_1' [\text{R}2\text{c}]_0 t e^{-k_1 t}$$

$$[\text{R}2\text{c}_0] = [\text{R}2\text{c}]_0 \left(1 - e^{-k_1 t} - k_1' t e^{-k_1 t} \right) \quad (4-46)$$

$k_1' \neq k_2'$ と同様に、 $\text{R}2\text{c}_0$ だけでなく、 $\text{R}2\text{c}_1$ および $\text{R}2\text{c}$ もわずかではあるが、蛍光を発生するためこれらの蛍光も考慮した関数を利用する必要がある。逐次反応の微分方程式を解くことで得られる関数に蛍光量子収率を組み合わせた関数を誘導し、時間に対する蛍光強度 $F(t)$ を以下のように表わす。

$$F(t) \propto \Phi_F^{\text{R}2\text{c}} [\text{R}2\text{c}] + \Phi_F^{\text{R}2\text{c}_1} [\text{R}2\text{c}_1] + \Phi_F^{\text{R}2\text{c}_0} [\text{R}2\text{c}_0] \quad (4-47)$$

$$F(t) \propto \Phi_F^{\text{R}2\text{c}} [\text{R}2\text{c}]_0 e^{-k_1 t} + \Phi_F^{\text{R}2\text{c}_1} k_1' [\text{R}2\text{c}]_0 t e^{-k_1 t} + \Phi_F^{\text{R}2\text{c}_0} [\text{R}2\text{c}]_0 \left(1 - e^{-k_1 t} - k_1' t e^{-k_1 t} \right)$$

$$F(t) \propto [\text{R}2\text{c}]_0 \left\{ \Phi_F^{\text{R}2\text{c}} e^{-k_1 t} + \Phi_F^{\text{R}2\text{c}_1} k_1' t e^{-k_1 t} + \Phi_F^{\text{R}2\text{c}_0} \left(1 - e^{-k_1 t} - k_1' t e^{-k_1 t} \right) \right\}$$

$$F(t) \propto [\text{R}2\text{c}]_0 \left\{ \Phi_F^{\text{R}2\text{c}_0} + \left(\Phi_F^{\text{R}2\text{c}} - \Phi_F^{\text{R}2\text{c}_0} \right) e^{-k_1 t} + \left(\Phi_F^{\text{R}2\text{c}_1} - \Phi_F^{\text{R}2\text{c}_0} \right) k_1' t e^{-k_1 t} \right\}$$

$$F(t) \propto [\text{R}2\text{c}]_0 \left[\Phi_F^{\text{R}2\text{c}_0} + \left\{ \Phi_F^{\text{R}2\text{c}} - \Phi_F^{\text{R}2\text{c}_0} + \left(\Phi_F^{\text{R}2\text{c}_1} - \Phi_F^{\text{R}2\text{c}_0} \right) k_1' t \right\} e^{-k_1 t} \right] \quad (4-48)$$

蛍光量子収率と逐次反応に由来する関数を組み合わせることで $k_1=k_2$ の場合での蛍光強度 $F(t)$ に対応する関数を得た。この関数も用いることで、 $F(t)$ をある程度再現した (図 4-24a)。また、図 4-21a のビタミン C の濃度依存性の測定結果についても解析を行い、速度定数を求めた。各測定 (100、300、500、1000 μM) における蛍光強度時間変化の再現は付録 4-3 に示した。

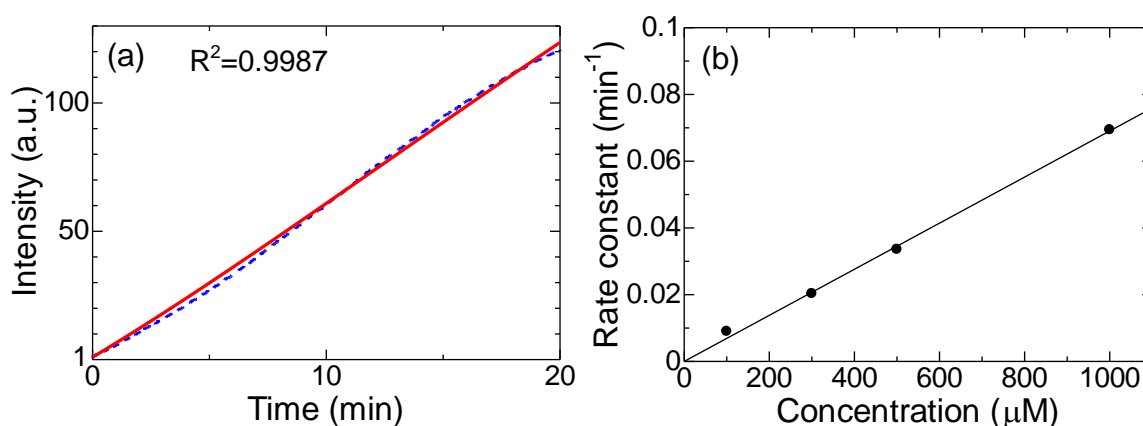


図 4-24、 $\text{R2c}@(\text{BSA})_2$ のビタミン C 添加後の蛍光強度時間変化 (a) 及び $[\text{R2c}_0]$ の反応速度定数 k_1 (b)

これより、反応速度定数が $69 \text{ min}^{-1}\text{M}^{-1}$ と計算された (図 4-24)。この関数による解析では、反応速度定数がビタミン C の濃度に対して比例関係が見られた。リポソーム R2c の反応速度定数が $24 \text{ min}^{-1}\text{M}^{-1}$ であることと比べると、 $k_1=k_2$ でも反応速度定数はリポソーム R2c よりも大きいことが確認された。

$\text{R2c}@(\text{BSA})_2$ の蛍光強度時間変化の再現の精度が高かったのは、逐次反応から得られる関数と蛍光量子収率を組み合わせた関数で、 $k'_1 \neq k'_2$ の場合であった (図 4-23)。この比較を行った図は付録 4-2、4-3、4-4 に記載する。この時、反応速度定数 k_1 、 k_2 がそれぞれ $50 \text{ min}^{-1}\text{M}^{-1}$ 、 $185 \text{ min}^{-1}\text{M}^{-1}$ となることが確認された。 k_1 に対して k_2 の値が大きくなるのは、ビタミン C の濃度は溶液中に豊富に存在するため反応の進行でビタミン C の濃度にはほとんど影響が出ない。しかし、R2c の TEMPO ラジカルとの反応により生じたモノデヒドロアスコルビン酸ラジカルが BSA 中の R2c_1 の近くに存在するため反応に関与しており、その反応性がビタミン C よりも高いため k_2 がより大きい値を持ったと説明できる。図 4-23a と b より、 k_1 に対して k_2 の精度が低いことも、この考察を支持している。

4-2-8. Runge-Kutta 法による蛍光強度時間変化の解析

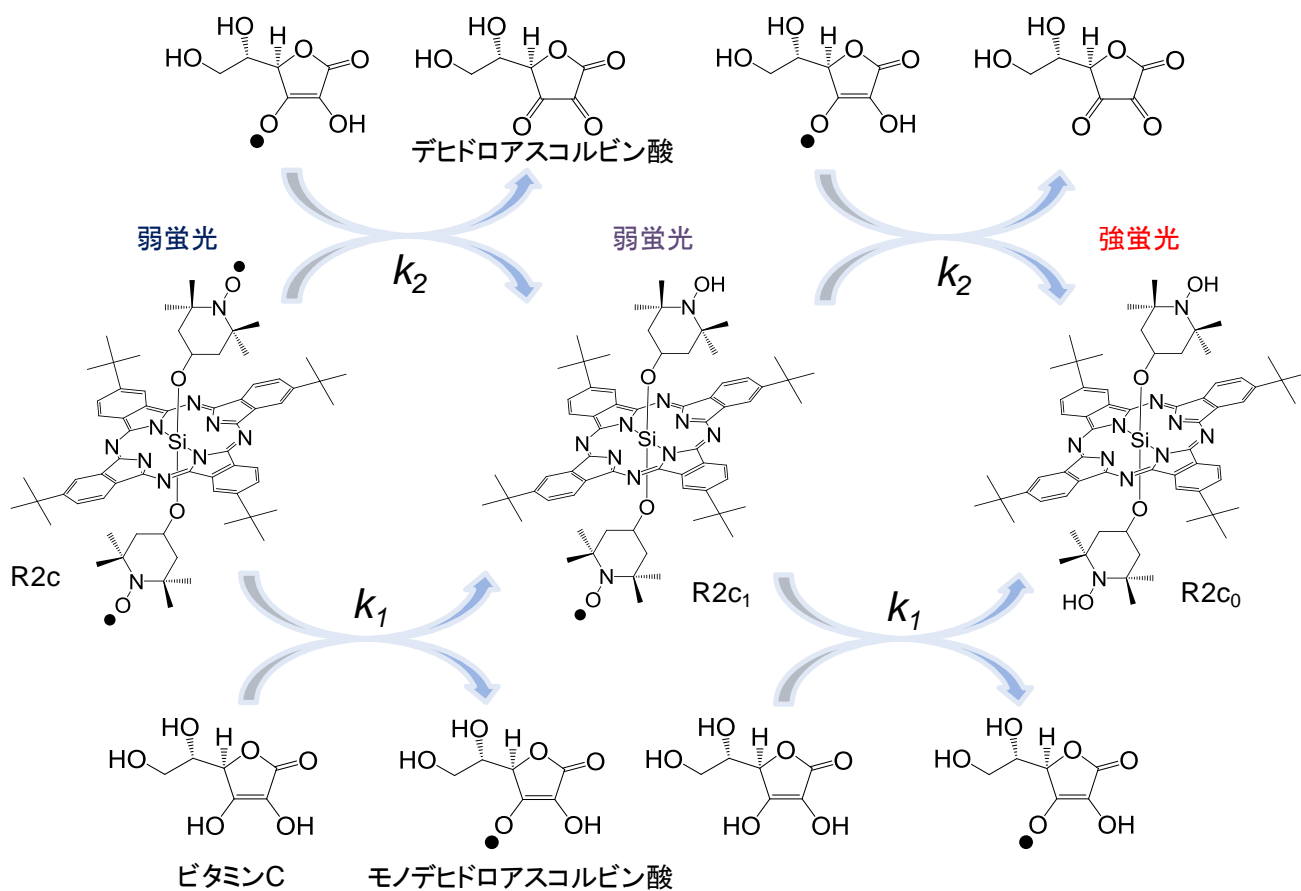
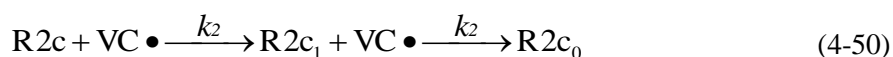
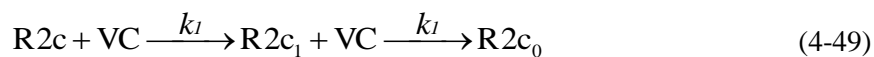


図 4-25、モノデヒドロアスコルビン酸を考慮した R2c との反応

R2c とビタミン C の反応で、ビタミン C が一電子酸化されたモノデヒドロアスコルビン酸 (VC•) も反応に関与すると想定し、図 4-25 のような反応モデルを考えた。このモデルではビタミン C と TEMPO ラジカル間の反応速度定数を k_1 、モノデヒドロアスコルビン酸と TEMPO ラジカルとの反応速度定数を k_2 おいて微分方程式を導いた。



$$\frac{d[R2c]}{dt} = -k_1[R2c][VC] - k_2[R2c][VC\bullet] \quad (4-51)$$

$$\frac{d[R2c_1]}{dt} = k_1[R2c][VC] - k_1[R2c_1][VC] + k_2[R2c][VC\bullet] - k_2[R2c_1][VC\bullet] \quad (4-52)$$

$$\frac{d[R2c_0]}{dt} = k_1[R2c_1][VC] + k_2[R2c_1][VC\bullet] \quad (4-53)$$

上記の微分方程式は複雑なため、一般解を得ることはできない。そこで微分方程式の初期値問題に対して数値解析により近似解を求める方法としてよく知られている Runge-Kutta 法を用いることとした。Runge-Kutta 法を蛍光量子収率を組み合わせ、時間に対する蛍光強度 $F(t)$ を式 4-47 として表わす。これを用いることで、本研究では $R2c@(BSA)_2$ のビタミン C 添加後の蛍光強度時間変化に対して、反応速度を同時フィッティングにより評価した (図 4-26)。

この結果、 k_1 の値が $31.3 \text{ min}^{-1}\text{M}^{-1}$ であるのに対し、 k_2 が $1.04 \times 10^5 \text{ min}^{-1}\text{M}^{-1}$ という大きな値を示した。 k_2 はラジカル同士の反応であるのに加え、 $R2c$ により一電子酸化されたモノデヒドロアスコルビン酸は、 $R2c$ 近傍に存在するため、より高い反応速度定数を示したと考えられる。ビタミン C の還元反応では、ビタミン C が酸化されて生じるモノデヒドロアスコルビン酸がビタミン C よりも酸性度が高く、反応速度定数が 1000 倍以上大きいことが知られている¹⁵⁻¹⁶。本研究結果でも、同様にビタミン C に比べ、モノデヒドロアスコルビン酸の反応速度定数が大きく、二段階目の $R2c_1$ との反応では、モノデヒドロアスコルビン酸との反応が優先的に生じている。

上記のように求めた反応速度定数 k_1 と k_2 を基に、 $R2c$ とビタミン C の反応で生じる活性化エネルギーの差を求めた。活性化エネルギー差は以下の式により計算した。

$$\Delta G_1^\ddagger - \Delta G_2^\ddagger = -RT \ln k_1 + RT \ln k_2 \quad (4-54)$$

$$\Delta G_1^\ddagger - \Delta G_2^\ddagger = -RT \ln \frac{k_1}{k_2} \quad (4-55)$$

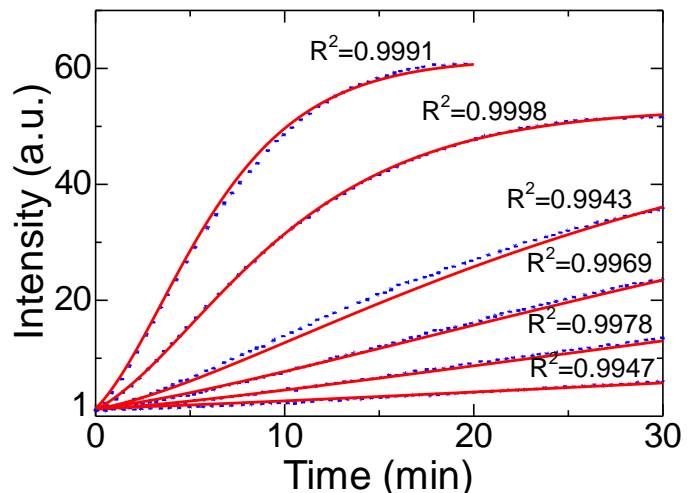


図 4-26、Runge-Kutta 法による $R2c@(BSA)_2$ のビタミン C 添加後 (5 mM、3 mM、1 mM、0.5 mM、0.3 mM、0.1 mM) の蛍光強度時間変化の解析

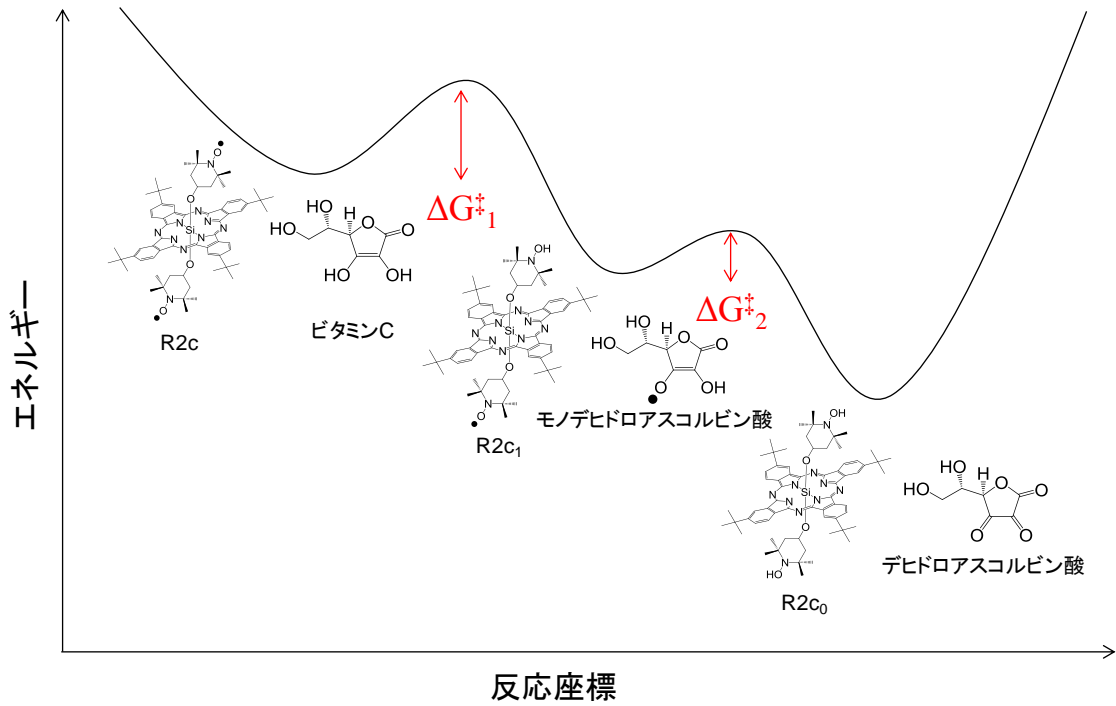


図 4-27、R2c とビタミン C の反応におけるポテンシャルエネルギー曲線

この結果、モノデヒドロアスコルビン酸との反応の活性化エネルギー (ΔG^\ddagger_2) は、ビタミン C との反応の活性化エネルギー (ΔG^\ddagger_1) より 20.1 kJ 小さく、反応がより進行しやすいことが分かった (図 4-27)。

4-2-9. 蛍光プローブの反応メカニズム解析

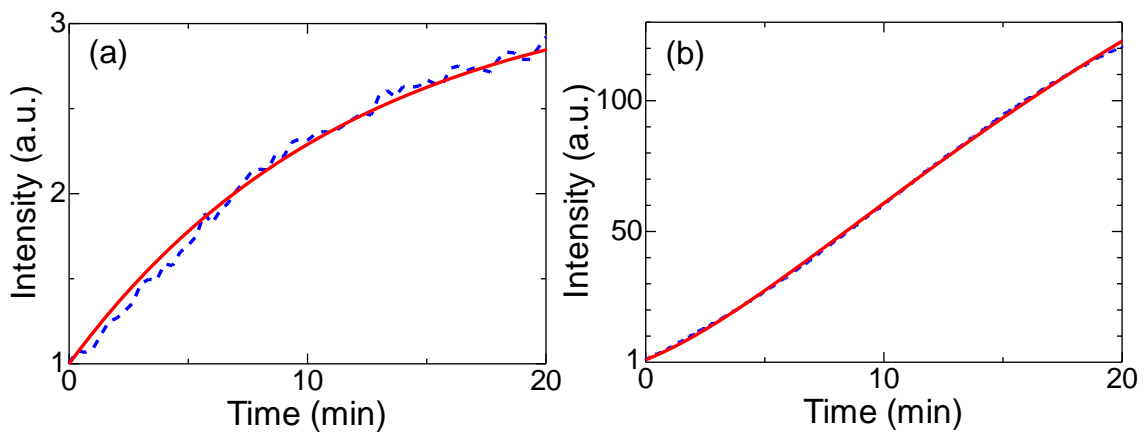


図 4-28、リポソーム R2c (a) と R2c@(BSA)₂ (b) のビタミン C 添加後の蛍光強度時間変化

ビタミン C 添加後の蛍光強度時間変化の解析を基に (図 4-28)、リポソーマル R2c と R2c@(BSA)₂ の反応メカニズムの違いを考察した (図 4-29)。

リポソーマル R2c の場合、蛍光強度時間変化は擬一次反応の関数でよく再現された。これは、ビタミン C のリポソームへの侵入が律速段階となるためである。このため、R2c とビタミン C の衝突頻度が小さくなるため、リポソーマル R2c は反応速度が遅く、感度が低いという課題を有していた。

一方、R2c@(BSA)₂ の場合、蛍光強度時間変化は逐次反応を基にした関数でよく再現された。これは、BSA ダイマーが R2c とビタミン C との反応を阻害していないことを反映している。このため、反応速度定数がリポソーマル R2c に比べて大きく、また、R2c とビタミン C の衝突頻度が大きくなるため、感度も高くなっている。

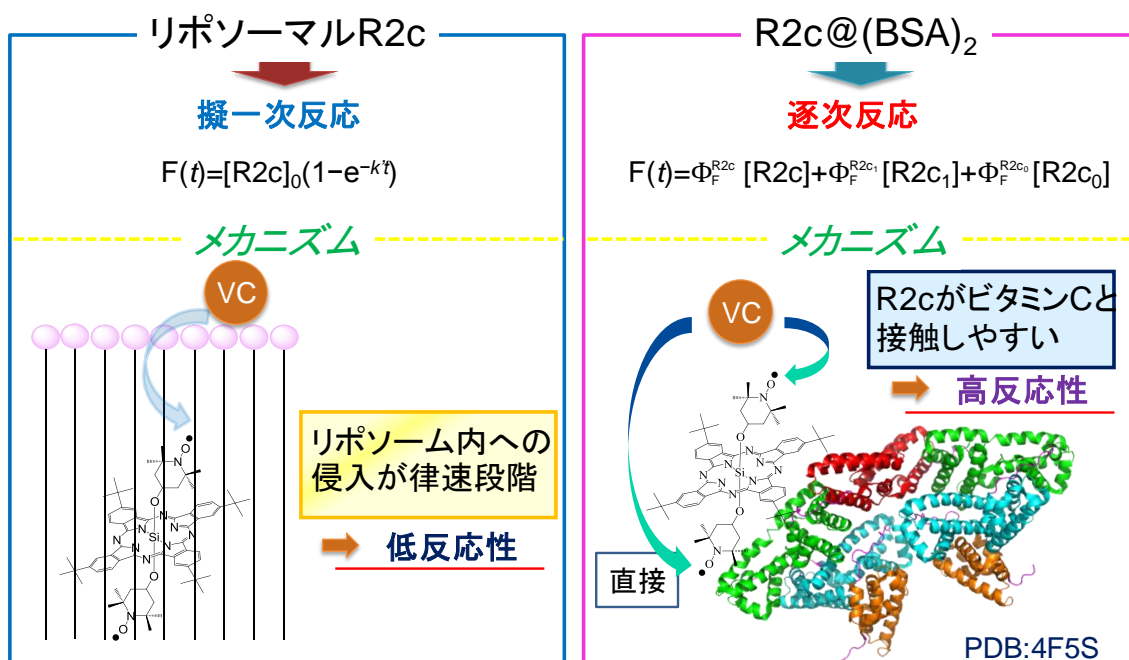


図 4-29、リポソーマル R2c と R2c@(BSA)₂ のビタミン C との反応メカニズム

4-2-10. BSA モノマーとダイマーの疎水性空間の計算

BSA は複数の疎水性空間を持ち、生体内で様々な物質の運搬などを行う機能を持つ。本研究では、R2c と BSA を複合化することで高感度な蛍光プローブの開発に成功した。Sephadex G-100 を用いたサイズ排除クロマトグラフィー等により、R2c が BSA モノマーではなく BSA ダイマーと選択的に複合化していることが確認された。そこで、複合化の選択性を解析するため、BSA モノマーと BSA ダイマーの疎水性空間をそれぞれ PyMOL を用いて計算した (図 4-30)。

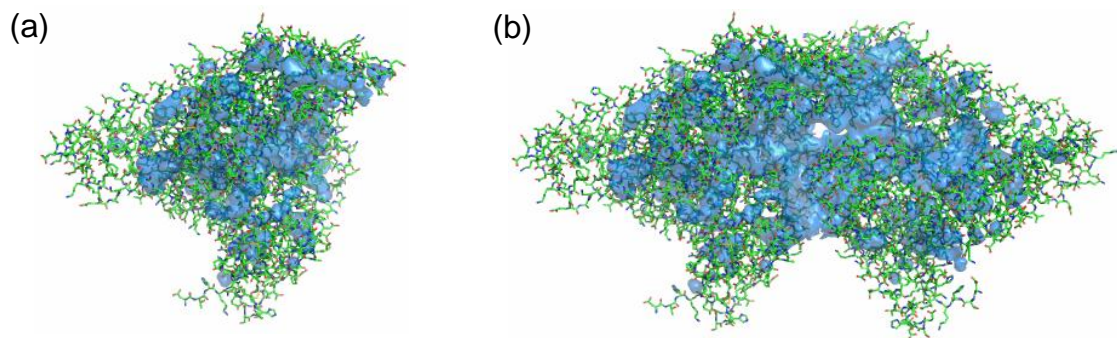


図 4-30、BSA モノマー (a) と BSA ダイマー (b) の全疎水性空間の計算

初めに、BSA モノマーと BSA ダイマーの全疎水性空間を計算した。疎水性空間は BSA モノマー、BSA ダイマーの広い領域に分布していることが確認された。この疎水性空間は小さな空間をすべて含めて表示しているため、BSA モノマー及びダイマーどちらも疎水性空間が広く分布しているように見える。

次に、BSA モノマーと BSA ダイマーの持つ複数の疎水性空間の中で最大の大きさを持つものを計算した (図 4-31)。

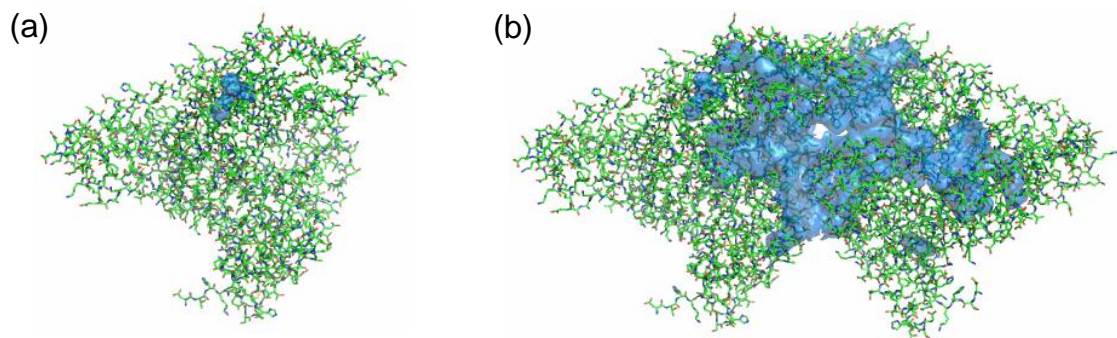


図 4-31、BSA モノマー (a) と BSA ダイマー (b) の最大の疎水性空間の計算

計算により、BSA ダイマーにおいて二つの BSA 間の界面付近に大きな疎水性空間が存在することが明らかとなった。この BSA ダイマーにおいて形成される疎水性空間が BSA との複合化に関与していると考えられる。続いて、疎水性空間と R2c のサイズの比較を行った (図 4-32)。

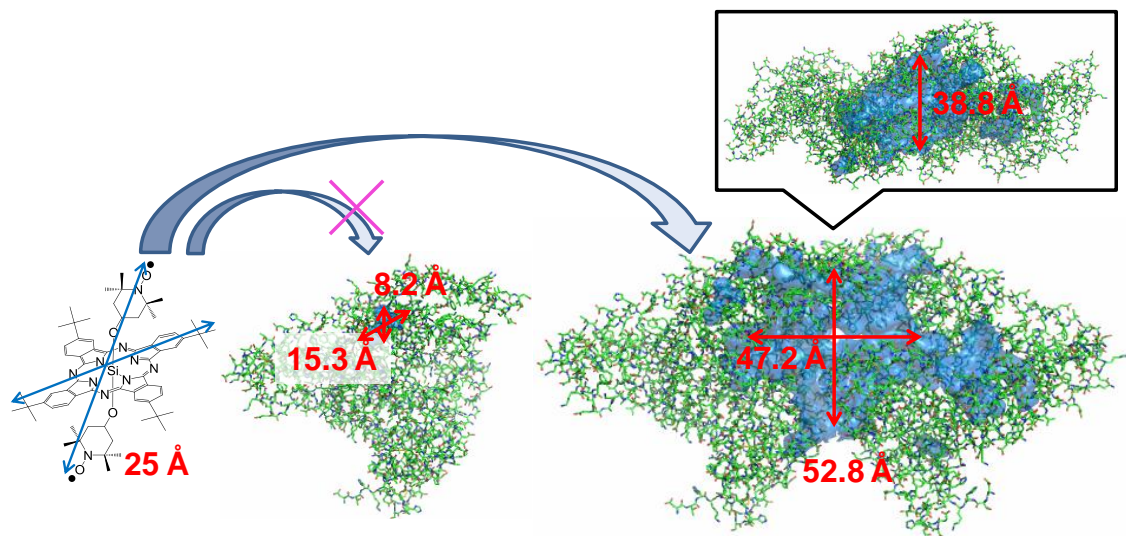


図 4-32、R2c の BSA への取り込み

疎水性空間のサイズを計算した結果、BSA モノマーの疎水性空間は、嵩高い *tert*-ブチル基と TEMPO 軸配位子を有する R2c を取り込むことができるほどの大きさではなかった。一方、BSA ダイマーでは、二つの BSA 間界面の大きな疎水性空間は R2c を取り込むのに十分な大きさであることが明らかとなった。これより、R2c が BSA ダイマーに選択的に取り込まれる原因が R2c を取り込む疎水性空間のサイズによることが確認された。

4-2-11. BSA ダイマーの R2c 取り込み量

本研究で開発したビタミン C 検出用蛍光プローブ R2c@(BSA)₂ は、R2c が BSA ダイマーの疎水性領域に取り込まれることで形成されている。この複合体の形成において、Sephadex G-100 を用いたサイズ排除クロマトグラフィーから、BSA がダイマーであることは明らかとなっているが、R2c がどれだけ取り込まれているのか明らかではない。そこで、電子吸収スペクトルと円偏光二色性 (Circular Dichroism; CD) スペクトルを測定することで、その複合体形成による R2c の取り込み量の解析を行った。

調整した R2c@(BSA)₂ は、複合化している BSA ダイマーだけでなく、BSA モノマーも含んだ状態にあるので、そのまま電子吸収スペクトルと CD スペクトルを測定しても R2c と BSA の分子量の比率を求めることができない。そこで、Sephadex G-100 を用いてサイズ排除クロマトグラフィーを行った後、R2c と BSA ダイマーを含む領域 (図 4-33a の楕円内の二点分: 1.5 mL × 2 = 3 mL) のみを取り出して電子吸収スペクトルと CD スペクトルを測定した。測定時に注目する波長は、R2c の Q 吸収帯由来の 680 nm 付近の波長と、BSA 由来の 220 nm 及び 280 nm の波長である。図 4-33a は、サイズ排除クロマト

グラフを 5 mm セルを用いての測定に対し、図 4-33b、c は 10 mm セルを用いての測定である。

初めに、サイズ排除クロマトグラフィーで溶出された R2c の濃度を求めた。R2c は CD スペクトルでは検出されないが、吸収スペクトルでは Q 吸収帯由来の 680 nm 付近に会合がほとんど生じていないことを示すシャープな吸収を観測できる。この吸光度から吸光係数を基にして濃度を求めることができる。ここでは、R2c は 3.23×10^{-6} M であった。

続いて、サイズ排除クロマトグラフィーで溶出された BSA の濃度を求めた。電子吸収スペクトルの測定を行った場合、R2c@(BSA)₂ の調整は界面活性剤 Triton X-100 を含む水溶液中で行っているため、溶出液にも Triton X-100 が含まれている。この Triton X-100 の吸収帯は BSA の 280 nm 付近の吸収帯と被るため、BSA の場合は吸収スペクトルだけでは溶出液中の BSA の濃度を決定できない。そこで CD スペクトルを測定することで BSA の濃度を求めた。CD スペクトルは、左円偏光と右円偏光の差を測定するもので、キラル分子（鏡像異性体）の場合、CD 信号が観測される。Triton X-100 は不斉炭素原子を持たないため、鏡像異性体が存在せず CD 信号が観測されない。一方、BSA はキラリティーを有するため、220 nm 付近に CD 信号が観測される。この 220 nm に対応する CD 信号から電子吸収スペクトルにおける 220 nm の吸光度を求めることができる。BSA の 220 nm の吸光度が得られれば、溶出液における 220 nm の吸光度を計算した BSA の吸光度で差を計算すると Triton X-100 由来の吸光度も計算することができる。BSA と Triton X-100 の吸光度を吸光係数を基にして濃度を求めるとそれぞれ、 5.65×10^{-7} M、 1.30×10^{-7} M と計算される。この BSA の濃度は BSA モノマーを基準に計算しているため、BSA ダイマーとして存在していることを考慮すると 2.83×10^{-7} M の BSA ダイマーが溶出液に含まれていることになる。

上記の計算から求めた R2c と BSA の濃度と BSA ダイマーの疎水性空間内の R2c の電子吸収スペクトルが、トルエン中の電子吸収スペクトル（図 4-2b）に比べてわずかにブロードであることを考慮すると、およそ 10 分子の R2c が BSA ダイマーに含まれることとなる。この取り込み量は、図 4-32 の R2c と BSA ダイマーの疎水性空間の大きさを考慮すると妥当な値といえる。また、溶出された R2c@(BSA)₂ を含む水溶液は、 8.07×10^{-3} % の Triton X-100 を含んでいることも確認された。

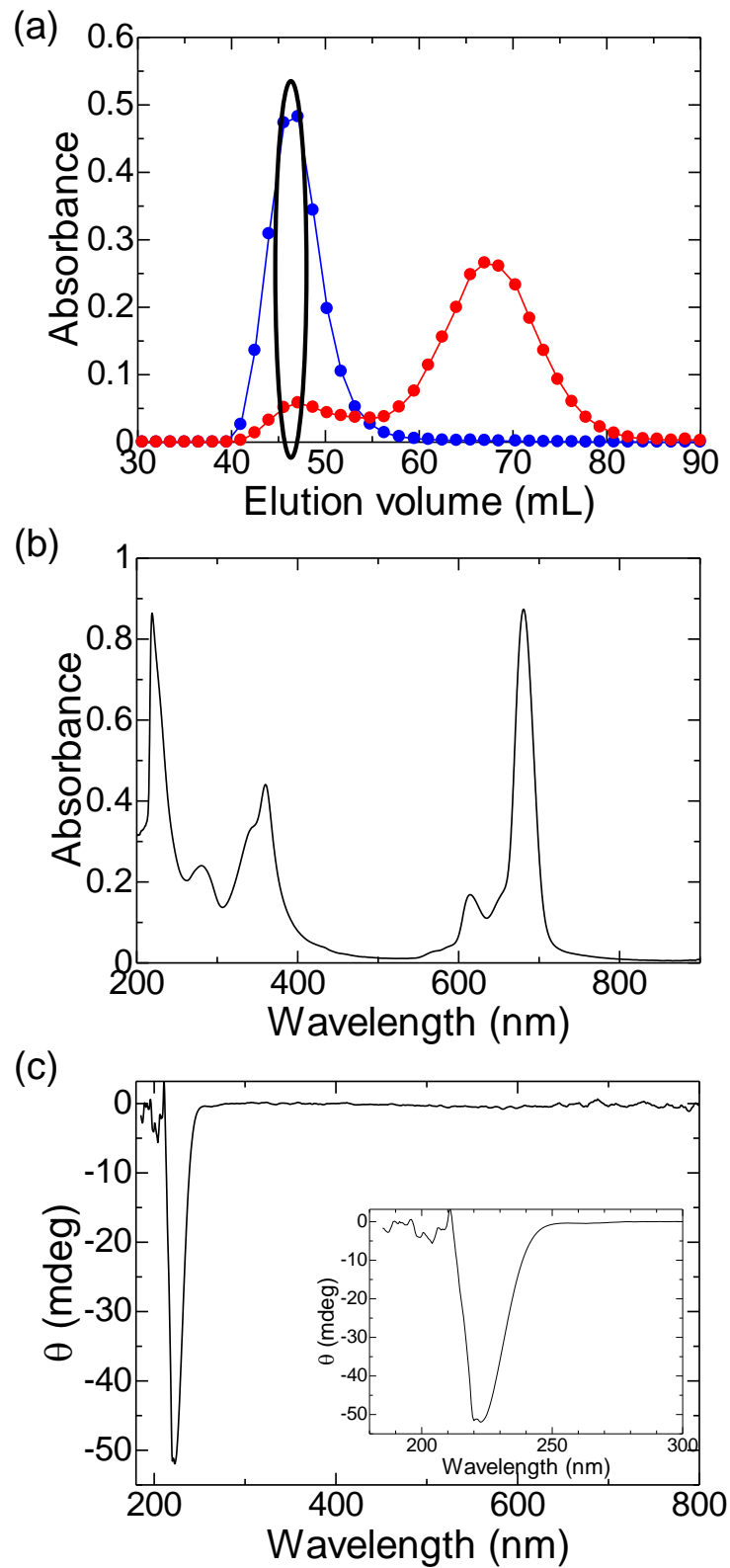


図 4-33、(a) R2c@(BSA)₂ のサイズ排除クロマトグラフ (赤：～280 nm、青：～680 nm)、
(b) 電子吸収スペクトル、(c) CD スペクトル

4-2-12. R2c@(BSA)₂の安定性

複合体 R2c@(BSA)₂ は、ビタミン C との反応による蛍光測定だけでなく、マウス中のビタミン C の蛍光イメージングでも使用する。このため、R2c@(BSA)₂ は安定した複合体を形成している必要がある。そこで、以下の実験と理論に基づき、R2c@(BSA)₂ の安定性を評価・考察した。

R2c@(BSA)₂ の安定性を評価するために、Sephadex G-100 を用いたサイズ排除クロマトグラフィーを用いた (図 4-34)。初めに、通常通り R2c@(BSA)₂ を調整した。その R2c@(BSA)₂ に対し、サイズ排除クロマトグラフィーを行い、第一フラクションのより精製された R2c@(BSA)₂ のみを回収した (図 4-34a)。その後、Sephadex G-100 を用いて、第一フラクションから回収した R2c@(BSA)₂ に再度サイズ排除クロマトグラフィーを行った (図 4-34b)。その結果、BSA (~ 280 nm)、R2c (~ 680 nm) をそれぞれモニターしたところ、BSA ダイマーに対応する溶出量 27 mL でのみピークが観測された。この結果は、BSA のモノマーとダイマー間が平衡関係にあるという既報とは異なっている¹⁷。これは、通常の BSA が形成する BSA ダイマーより、R2c と BSA ダイマーが複合化した R2c@(BSA)₂ の方が安定であることを示す。

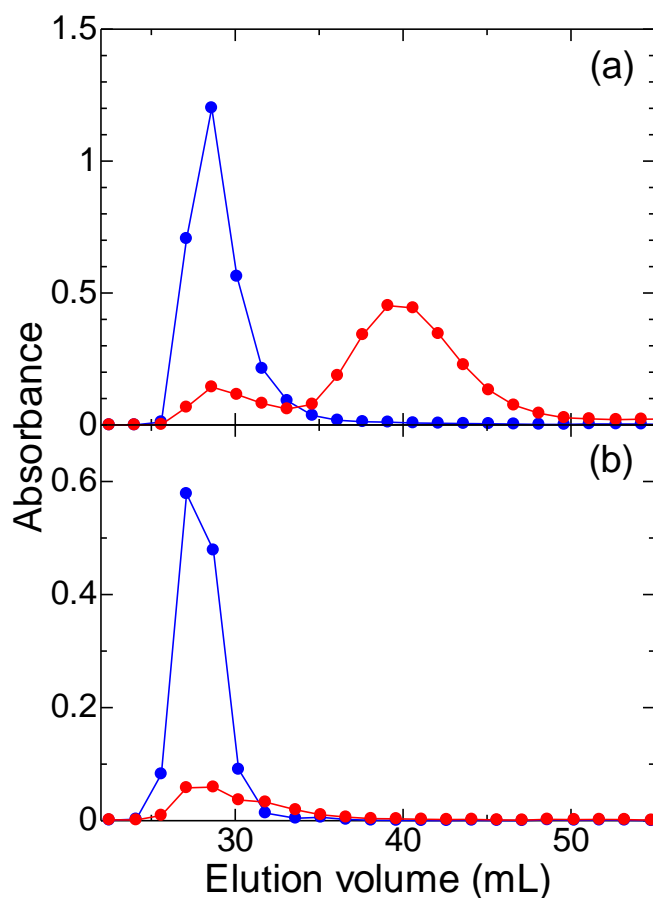


図 4-34、R2c@(BSA)₂ の Sephadex G-100 を用いたサイズ排除クロマトグラフ (a) と (a) の第一フラクションから回収された R2c@(BSA)₂ のサイズ排除クロマトグラフ (b)

図 4-34 の結果となる原因を以下のモデル図を用いて説明する (図 4-35)。通常の BSA の場合、BSA のモノマーとダイマーでは、モノマーの方がやや安定であるため、BSA モノマーの方へ平衡が偏っている。一方、 $R2c@(BSA)_2$ の場合、 $R2c$ のサイズは BSA モノマーの疎水性領域より大きいため、BSA ダイマーが仮に BSA モノマーへと分離した場合、疎水性の $R2c$ が水中に吐き出されてしまうことになる。疎水性の $R2c$ が水中にさらされることは熱力学的に非常に不安定な状況となるため、 $R2c@(BSA)_2$ の場合、広い疎水性空間を有する BSA ダイマーの中に $R2c$ が取り込まれた状態が維持されると説明できる。

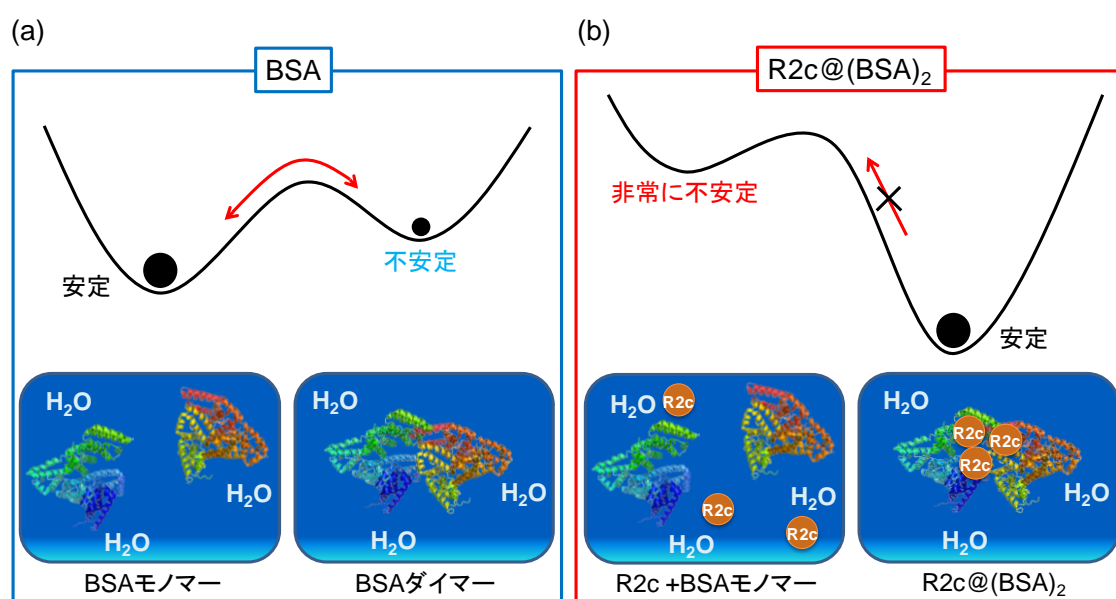


図 4-35、BSA (a) と $R2c@(BSA)_2$ (b) のポテンシャルエネルギー曲線

4-2-13. $R2c@(BSA)_2$ のビタミン C 選択性

ビタミン C 検出用蛍光プローブとして $R2c@(BSA)_2$ を用いてバイオイメージングを行う際、ビタミン C の選択性は非常に重要である。特に、本研究の目的である生体内でのイメージングを成功させるには、様々な酸化還

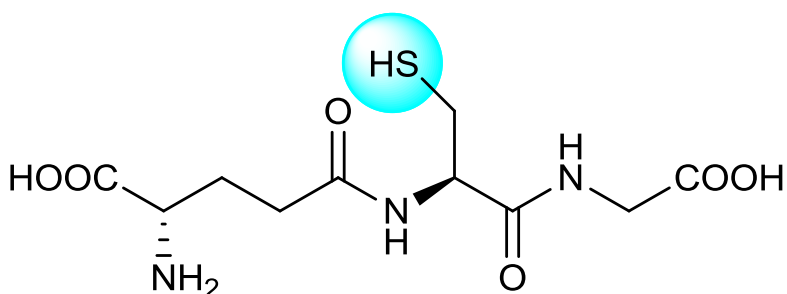


図 4-36、グルタチオンの構造

元物質が含まれている生体内の環境下で、ビタミン C に対する高い選択性を示せなければならない。そこで、本研究では、 $R2c@(BSA)_2$ のビタミン C 選択性を評価するため、典型的な酸化還元物質のグルタチオンと過酸化水素との反応性を測定した (図 4-36、4-37)。グルタチオンは SH 基を有する典型的な生体内還元物質としてよく知られている。

$R2c@(BSA)_2$ へビタミン C、グルタチオン、過酸化水素添加後の蛍光強度時間変化を測定すると、ビタミン C 添加時は、短時間で強い蛍光を発する様子が観測されるのに対し、グルタチオンと過酸化水素添加時には、顕著な蛍光強度の増大は観測されなかった。これより、 $R2c@(BSA)_2$ はグルタチオンや過酸化水素に比べ、ビタミン C に対して高い選択性を有していることが明らかとなった。

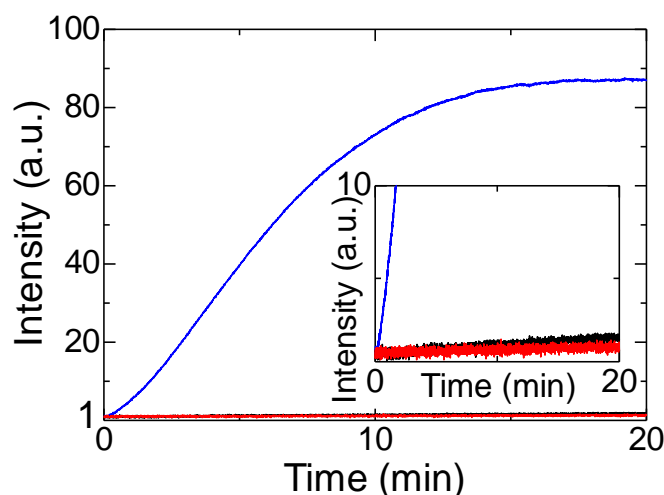


図 4-37、 $R2c@(BSA)_2$ のビタミン C (青)、グルタチオン (黒)、過酸化水素 (赤) 添加後の蛍光強度時間変化

4-2-14. 牛血清中ビタミン C 蛍光検出

高感度な蛍光プローブ $R2c@(BSA)_2$ を用いてマウス中のビタミン C バイオイメージングを行うことを考えた。その際、様々な酸化還元物質が含まれる血液中で $R2c@(BSA)_2$ がビタミン C を検出できる必要がある。実際の生体内環境では、グルタチオンや過酸化水素以外の多種多様な酸化還元物質にさらされることとなる。そこで、血液中のビタミン C 検出のモデルとして牛血清中のビタミン C 検出の実験を行った。血清は血液を遠心分離することで得られる上澄みで、血液中に含まれる様々な酸化還元物質を含んでいる。この血清と血清にビタミン C を 30、50、70 μM 加えた血清を調整し、牛血清中ビタミン C の蛍光検出を行った (図 4-38a)。この結果、ビタミン C 添加 20 分後の蛍光強度を観測すると、ビタミン C 濃度に依存して蛍光強度が増大する様子が確認された (図 4-38b)。これより、 $R2c@(BSA)_2$ が様々な酸化還元物質が含まれる血清中においてもビタミン C 濃度に依存して蛍光強度が増大する様子が観測された。

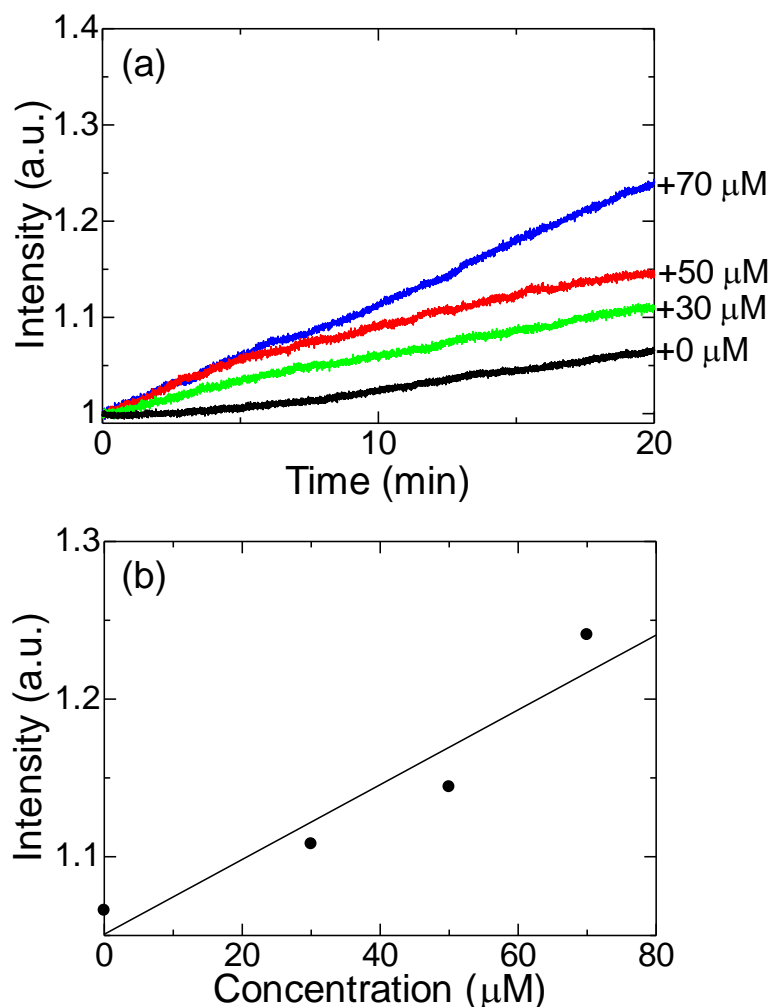


図 4-38、牛血清中ビタミン C 蛍光検出 (a)、及び牛血清中へのビタミン C 添加 20 分後の蛍光強度 (b)

4-2-15. マウス中ビタミン C 蛍光バイオイメージング

本研究では、リポソーマル R2c を改良したリポソーマル R2cS₁ と R2c@(BSA)₂ の開発に成功している。特に高感度な R2c@(BSA)₂ は従来の 100 倍以上の高感度化を達成した。また、R2c@(BSA)₂ は様々な酸化還元物質が含まれる血清中においてもビタミン C 濃度に依存して蛍光強度が増大する様子が確認された。これより、R2c@(BSA)₂ を用いたマウス中ビタミン C のバイオイメージングへの応用を試みた。

ここでは、初めに R2c@(BSA)₂ を用いたビタミン C のバイオイメージング及びその解析からビタミン C の生体内分布の解析を示す。その後の 4-4. 付録に比較しやすいように R2c@(BSA)₂ とリポソーマル R2c のビタミン C 投与及び非投与の蛍光バイオイメージングを腹側と背側の両方から撮影した全ての図を一覧として掲載している。

4-2-15-1. R2c@(BSA)₂のマウス中ビタミンC 蛍光バイオイメージング

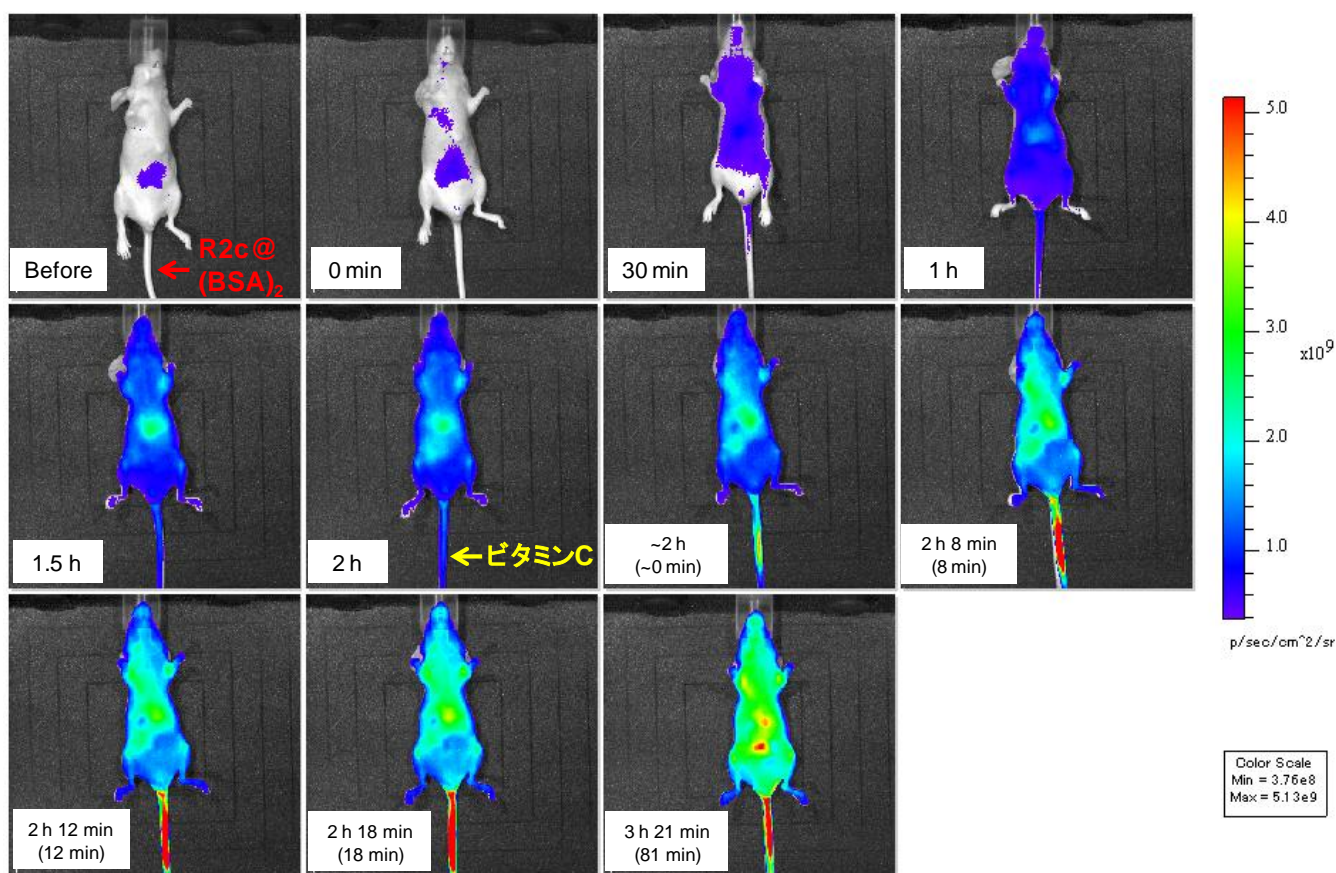


図 4-39、R2c@(BSA)₂のマウス中ビタミンC 蛍光バイオイメージング

マウス中に投与されたビタミン C の生体内分布を解明するため、高感度な蛍光プローブ R2c@(BSA)₂を用いたマウス中ビタミンCのバイオイメージングを行った(図4-39)。マウス中に投与されたビタミン C の分布を観測するためには、蛍光プローブを先に投与して、その後、ビタミン C を投与するという手順で行わなければならない。先にビタミン C を投与してしまうと、投与されたビタミン C により生体内のレドックス状態が変化し、その変化した生体内レドックス状態をイメージングすることになってしまう。このため、目的とする投与されたビタミン C の生体内分布を解明するため、投与する順番も重要である。また、使用するマウスは、植物中に含まれるクロロフィルの発光がイメージングに極力含まれないようにするため、無蛍光飼料で1週間程度飼育したヌードマウスを用いて研究を行った。

これらのことをふまえて、マウス中のビタミン C バイオイメージングを行った。初めに、マウス尾静脈から蛍光プローブ $R2c@(BSA)_2$ を投与した。二時間程度経過すると、マウス全身に蛍光プローブが分布する様子が観測された。その後、マウス尾静脈からビタミン C を投与した。この時、投与したビタミン C は高濃度ビタミン C 療法でも利用される薬理的濃度の約 10 mM となるように血液中のマウス中の血液の総量が約 2 mL であることを考慮してビタミン C を投与した。その後、短時間で顕著な蛍光強度の増大が観測された。特に、腹部の肝臓周辺で強い蛍光が観測されている。この蛍光強度の増大は、対照実験として行ったビタミン C 投与無しのイメージングでは観測されなかった。これより、マウス中に投与されたビタミン C のバイオイメージングに初めて成功した。この蛍光バイオイメージングでは、マウスの尾で強い蛍光が観測されている。この原因は、ビタミン C の投与を尾静脈から行っているためである。図 4-38a より、 $R2c@(BSA)_2$ は血清中でビタミン C の濃度に依存して蛍光強度の増大が大きくなっていくが、全身に分布していく前の最も濃い状態のビタミン C が初めに尾静脈を通過するため強い蛍光が観測されている。

マウス全身のビタミン C 投与後の蛍光強度の時間変化をモニターした (図 4-40)。これより、蛍光強度が指数関数的に増大していることが確認された。プロット数が少ないため、シグモイド曲線を示すことは確認できなかったが、実際には水溶液中の $R2c@(BSA)_2$ の蛍光強度時間変化と同様に蛍光強度の増大はシグモイド曲線に従うと予想される。

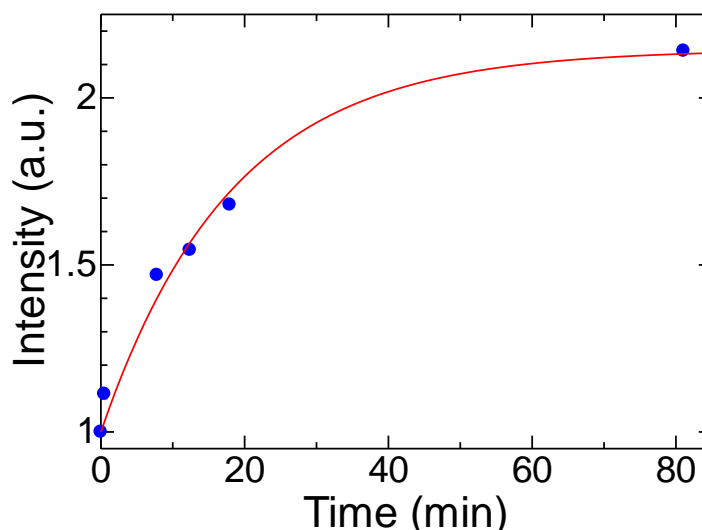


図 4-40、ビタミン C 投与後のマウス全身の蛍光強度の合計の時間変化

4-2-15-2. $R2c@(BSA)_2$ のマウス中ビタミン C 蛍光バイオイメージングの解析

より詳細にビタミン C の生体内分布を解析するため、マウスの全身を幾つかの領域に分けてそれぞれの蛍光強度の時間変化を求めた (図 4-41a、4-42)。ここで、主だった二つの蛍光強度時間変化について解析する (図 4-41b)。マウス中のバイオイメージングにおいて蛍光強度時間変化は、全身の蛍光強度の合計を観測すると指数関数的に蛍光強度が増大していくが、幾つかの領域に分けて観測すると、どの領域でも指数関数的な蛍光強度の増大が観測されるわけではなかった。これは単なる水溶液中でのビタミン C 検出とは異なり、生体内に投与したビタミン C を観測しているため、[1] 投与したビタミン C の分布を反映した蛍光強度の増大と、[2] ビタミン C と反応した $R2c@(BSA)_2$ の

生体内の拡散の影響を受けるためである。本研究での目的である生体内に投与されたビタミン C の分布を解明するには、可能な限り拡散による蛍光強度の変化の影響を抑えつつ、投与したビタミン C の分布に関する情報を抽出する必要がある。ここで、図 4-41b の二つの図に注目した。

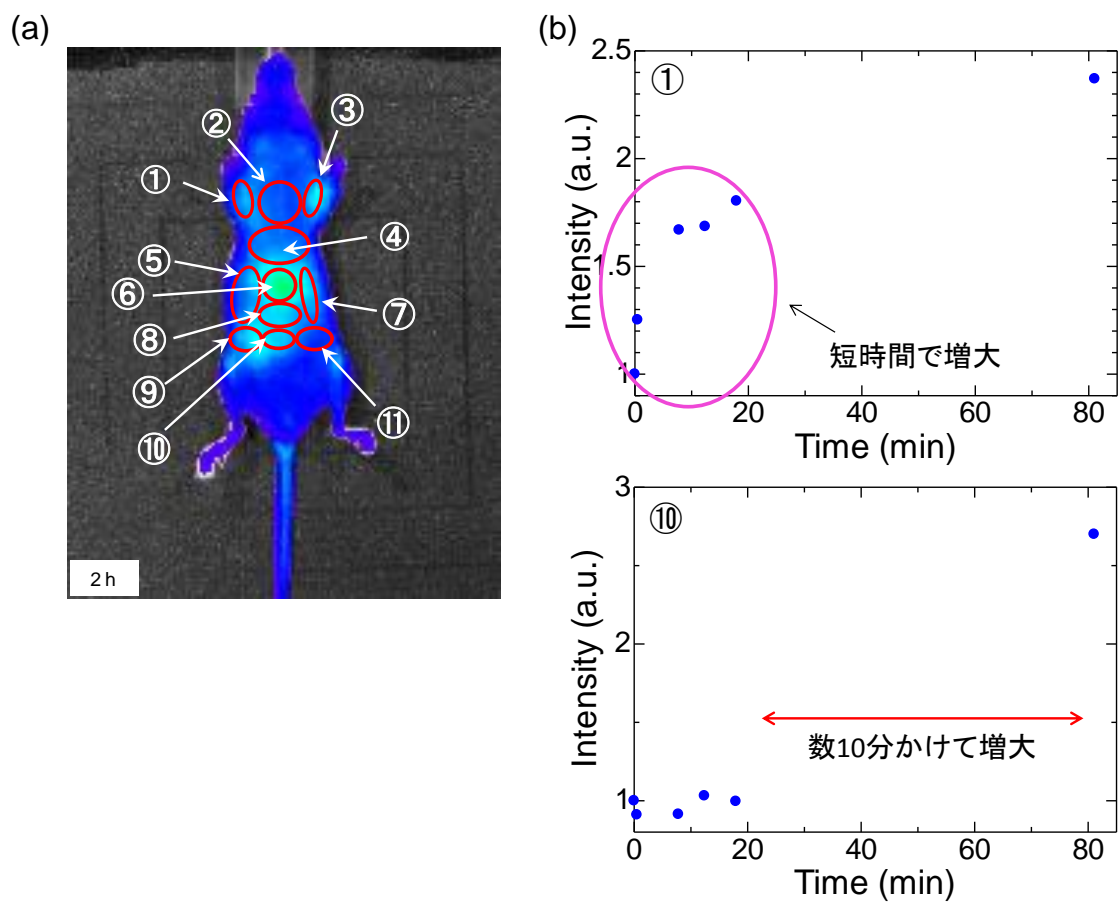
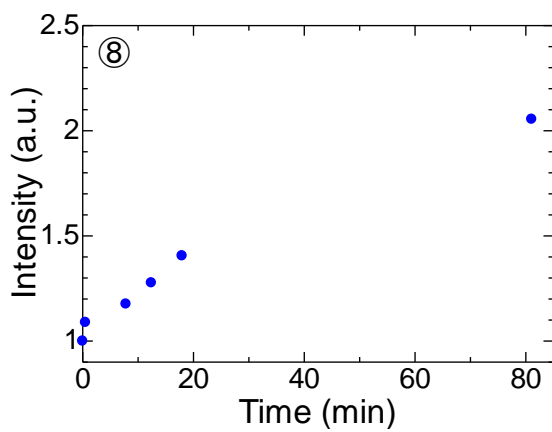
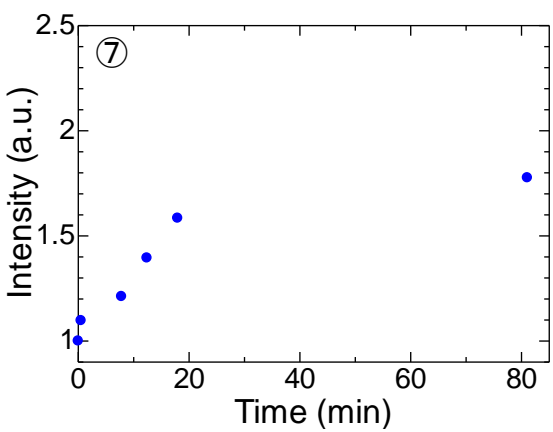
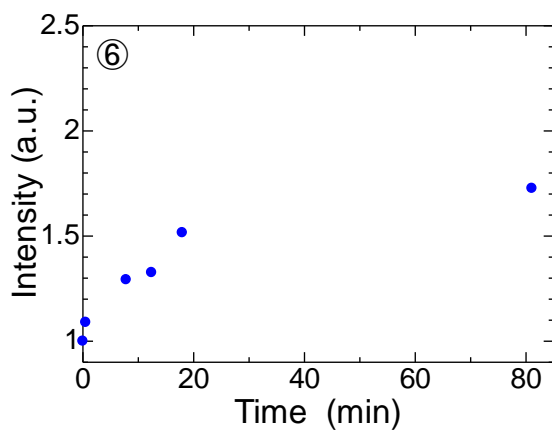
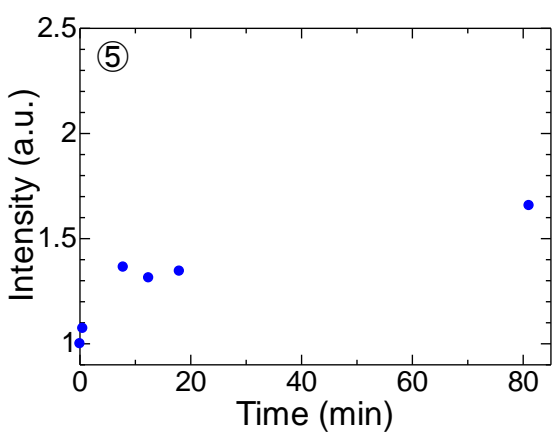
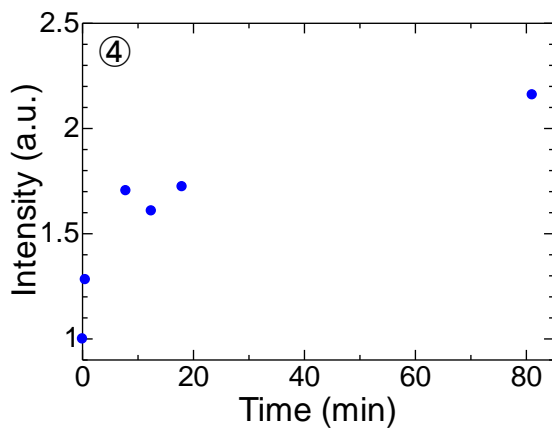
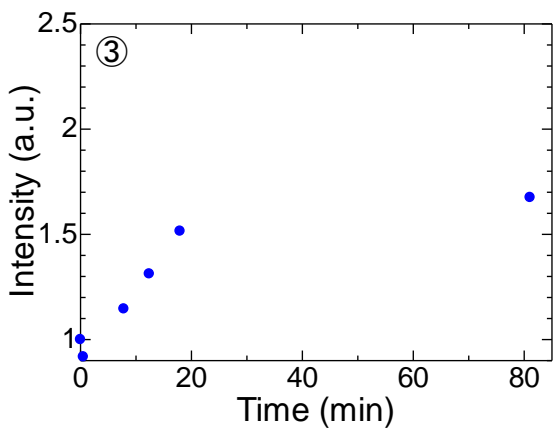
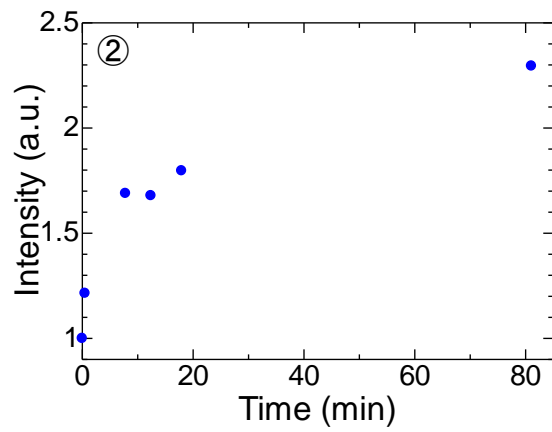
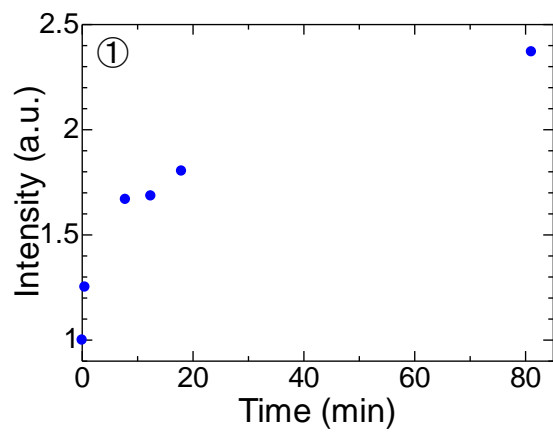


図 4-41、マウス中蛍光バイオイメーjingの分画 (a)、及び領域①と⑩の蛍光強度時間変化 (b)



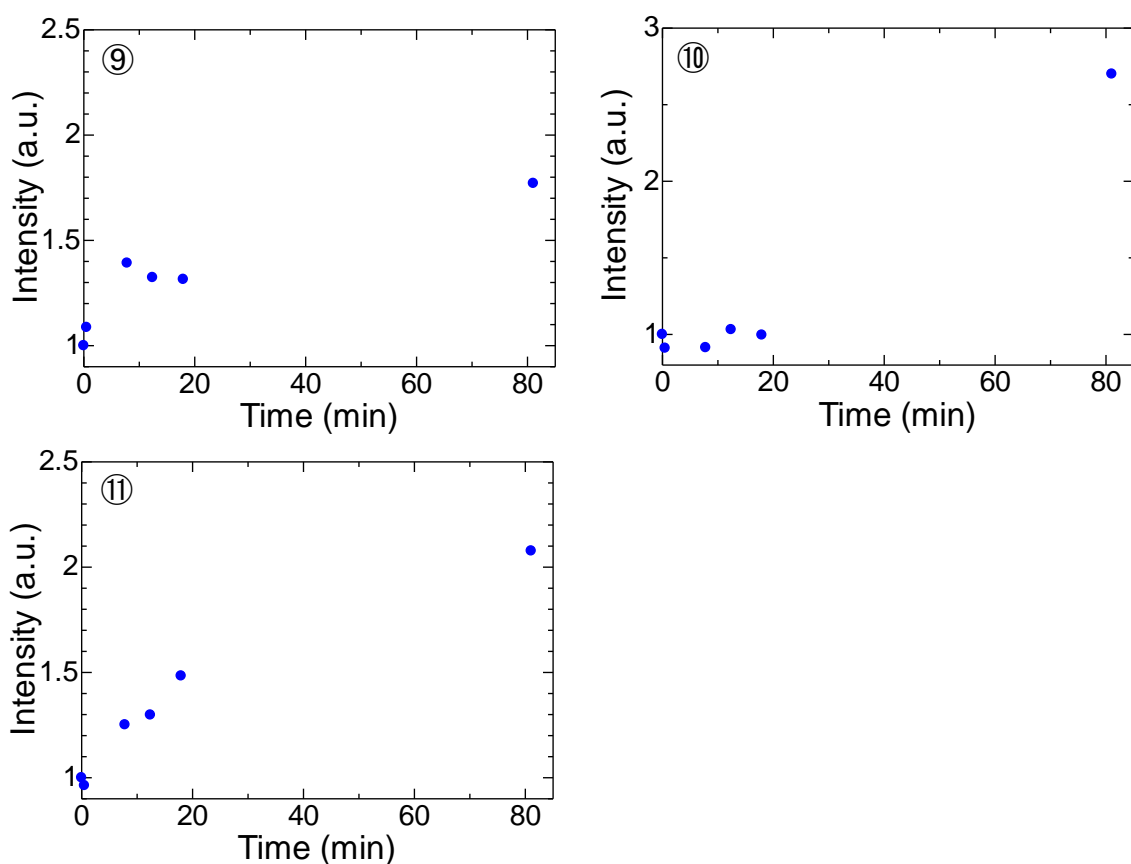


図 4-42、バイオイメージングにおける各領域での蛍光強度時間変化

多くのイメージング中の時間変化は①と同様の挙動を示し、ビタミン C 投与直後に短時間で蛍光強度が増大した後、それ以降はそれほど蛍光強度が増大していない。一方、⑩は、ビタミン C 投与直後はほとんど蛍光強度の増大が観測されないのに対し、しばらくすると強い蛍光強度が観測されるようになる。これは、ビタミン C 投与直後の短時間では、投与したビタミン C の分布を大きく反映した蛍光強度の増大が観測されるのに対し、投与後数 10 分経過した場合は、ビタミン C と反応した $R2c@(BSA)_2$ がゆっくり拡散した影響を反映した蛍光強度の増大が観測されたためと考えられる。そこで、投与したビタミン C の生体内分布を解明するためには、投与後短時間での蛍光強度の増大を各領域で比較することが重要と考え解析を行った。

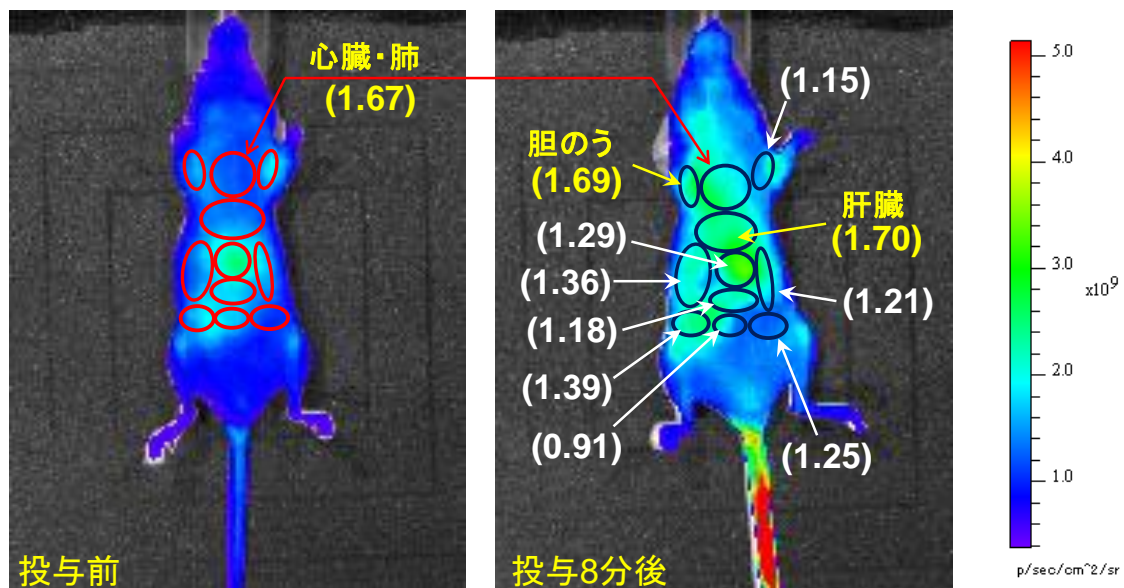
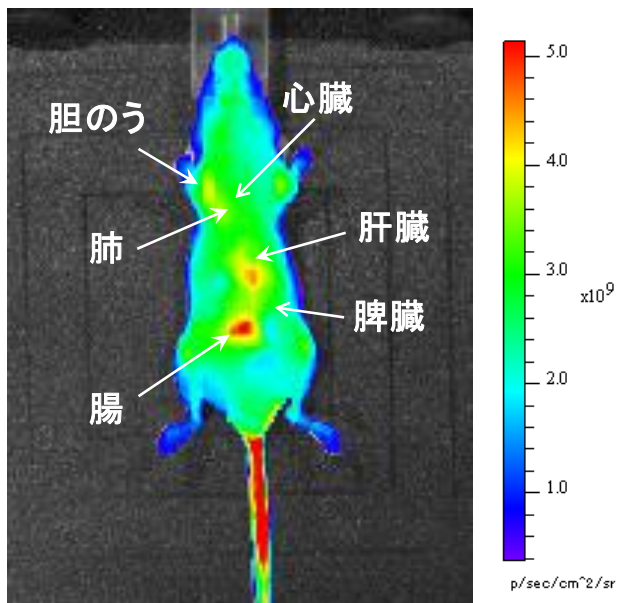


図 4-43、ビタミン C 投与前後の蛍光強度比

投与されたビタミン C の生体内分布を解析するためビタミン C 投与前と投与 8 分後の蛍光強度の比を求めた (図 4-43)。解析により、ほぼ全身で蛍光強度の増大が観測され、特に心臓、肺、胆のう、肝臓付近の蛍光強度の増大が大きいことが明らかとなった。この結果は、活性なビタミン C がこれらの臓器へ多く到達していることを示し、ビタミン C による高い抗ガン作用が得られることが期待される。ここで、投与されたビタミン C は、生体内本来のビタミン C に対して過剰量であるため、最終的には尿中に排出される^{18,19}。

続いて、上記の蛍光バイオイメージングの解析が、マウス表面の蛍光のみを観測しているのではなく、内部の臓器への活性なビタミン C の到達を反映していることを確認するため、マウスを解剖してイメージングを行った。

(a)



(b)

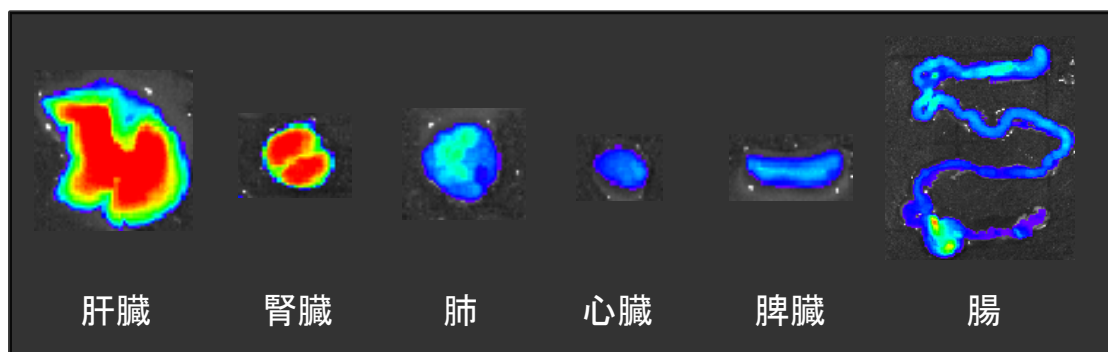


図 4-44、ビタミン C 投与 1 時間後のマウス (a) と切除した臓器 (b) のイメージング

ビタミン C 投与 1 時間後のマウスを解剖して、各臓器から検出されるビタミン C の蛍光強度と、解剖直前のマウス中の蛍光強度の比較を行った (図 4-44)。この結果、解剖しない状態で強い蛍光を示す領域と、取り出して強い蛍光を示す領域は一致していた。これより、 R2c@BSA_2 を用いた生体透過性が高い赤色光でイメージングを行っているため、体表面をイメージングしているだけでなく、臓器の蛍光イメージングに成功していることを意味している。

4-2-15-3. リポソーマル R2c のマウス中ビタミン C 蛍光バイオイメージング

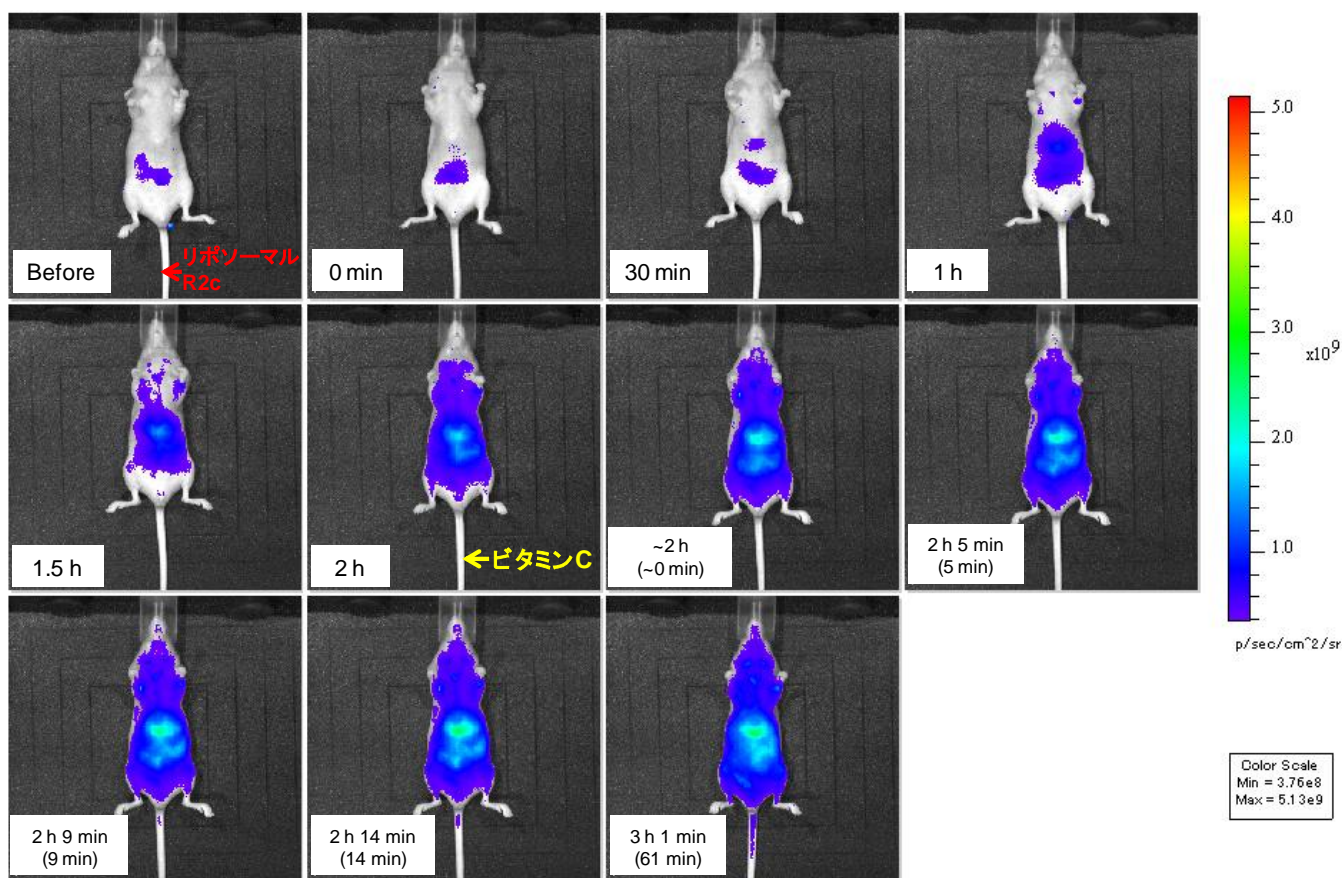


図 4-45、リポソーマル R2c のマウス中ビタミン C 蛍光バイオイメージング

リポソーマル R2c に関してもマウス中ビタミン C のバイオイメージングを行った(図 4-45)。この測定は R2c@(BSA)₂ と同様の手順で行っており、無蛍光飼料で 1 週間程度飼育したヌードマウスを用いて研究を行った。

初めに、マウス尾静脈から蛍光プローブリポソーマル R2c を投与した。2 時間程度経過すると、頭部や足の先端で検出される蛍光強度は低いながらも、ほぼマウス全身に蛍光プローブが分布する様子が観測された。その後、マウス尾静脈からビタミン C を投与した。この時、投与したビタミン C は高濃度ビタミン C 療法でも利用される薬理的濃度の約 10 mM となるようにマウス中の血液の総量が約 2 mL であることを考慮してビタミン C を投与した。その後、徐々に蛍光強度が増大していく様子が観測された。特に、腹部の肝臓周辺で強い蛍光が観測されている。しかし、この肝臓周辺の蛍光強度はビタミン C を投与する前から周囲と比べても強いことが観測されている。これより、リポソーマル R2c は R2c@(BSA)₂ に比べて、肝臓付近に偏って分布しやすいことが明らかとなった。また、ビタミン C 投与後の蛍光強度も小さく、R2c@(BSA)₂ の様なビタミ

ン C 投与による顕著な変化が観測できない。このため、高感度な蛍光プローブ R2c@(BSA)₂ がマウス中ビタミン C のバイオイメーキングにより有効であることが明らかとなった。

4-2-16 蛍光プローブの生体内での安定性

投与したビタミン C の分布を知るには、ビタミン C 投与直後の蛍光イメージングを解析しなければならない。これは、ビタミン C と反応した R2c@(BSA)₂ が拡散し、他の領域に移ってしまうためである。しかし、短時間の測定だけでは、R2c@(BSA)₂ の投与による生体への悪影響の有無や、生体内での発光の持続性などは評価できない。ここでは、R2c@(BSA)₂ 及びビタミン C を投与し、2 日程度経過した状態の蛍光強度の変化について記述する。

4-2-16-1. R2c@(BSA)₂ の生体内での安定性

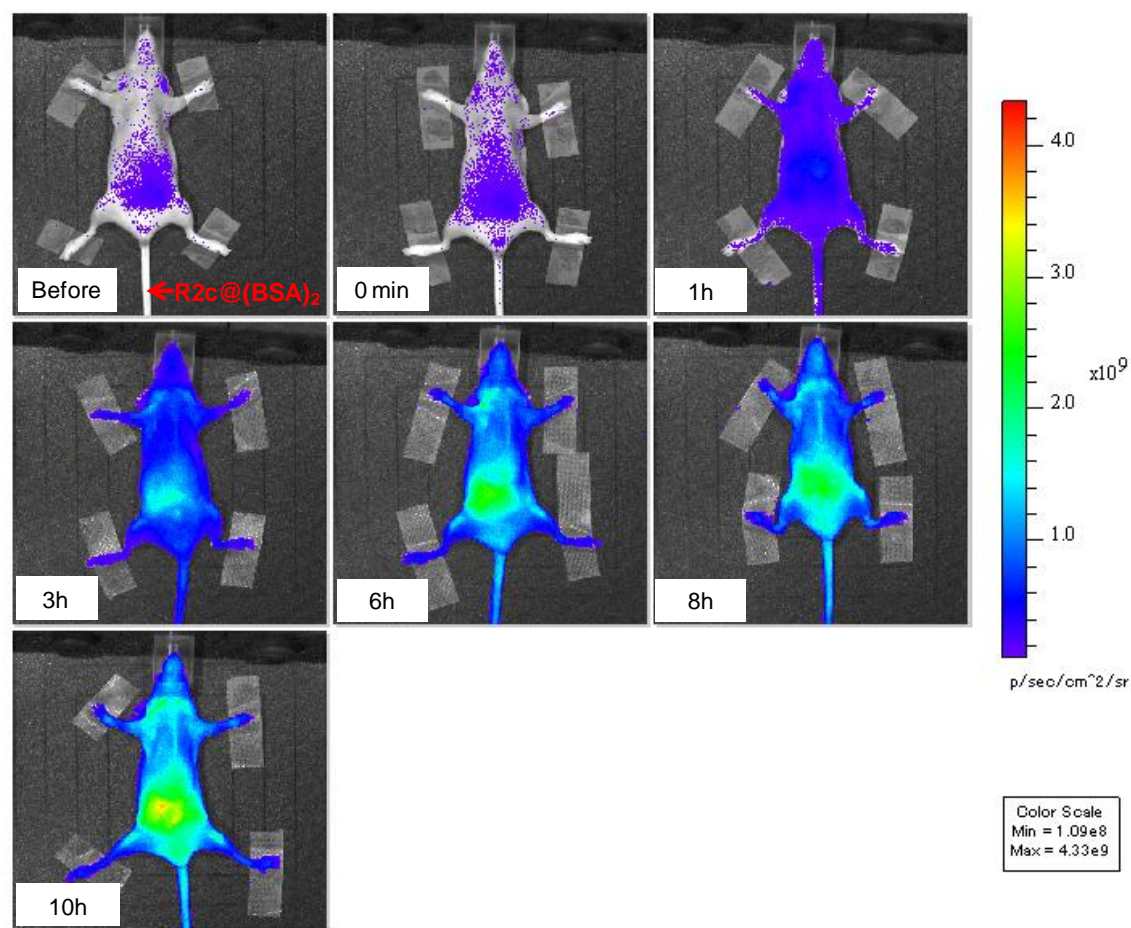


図 4-46、R2c@(BSA)₂ のマウス中蛍光バイオイメーキング

初めに、尾静脈から R2c@(BSA)₂のみ投与してマウス中蛍光バイオイメージングを行った (図 4-46)。血液中には 50 μM 程度のビタミン C が含まれており、また、マウスはヒトと異なり体内でビタミン C を合成する機能を有している。このため、マウス中に R2c@(BSA)₂ を投与すると徐々に蛍光強度が増大する様子が観測される。10 時間程度の観測では、R2c@(BSA)₂ が壊れたことによる蛍光強度の減少は観測されなかった。またこの実験範囲では、マウスの健康への害は観測されなかった。

4-2-16-2. R2c@(BSA)₂ へビタミン C 投与後の生体内での安定性 (1 日目)

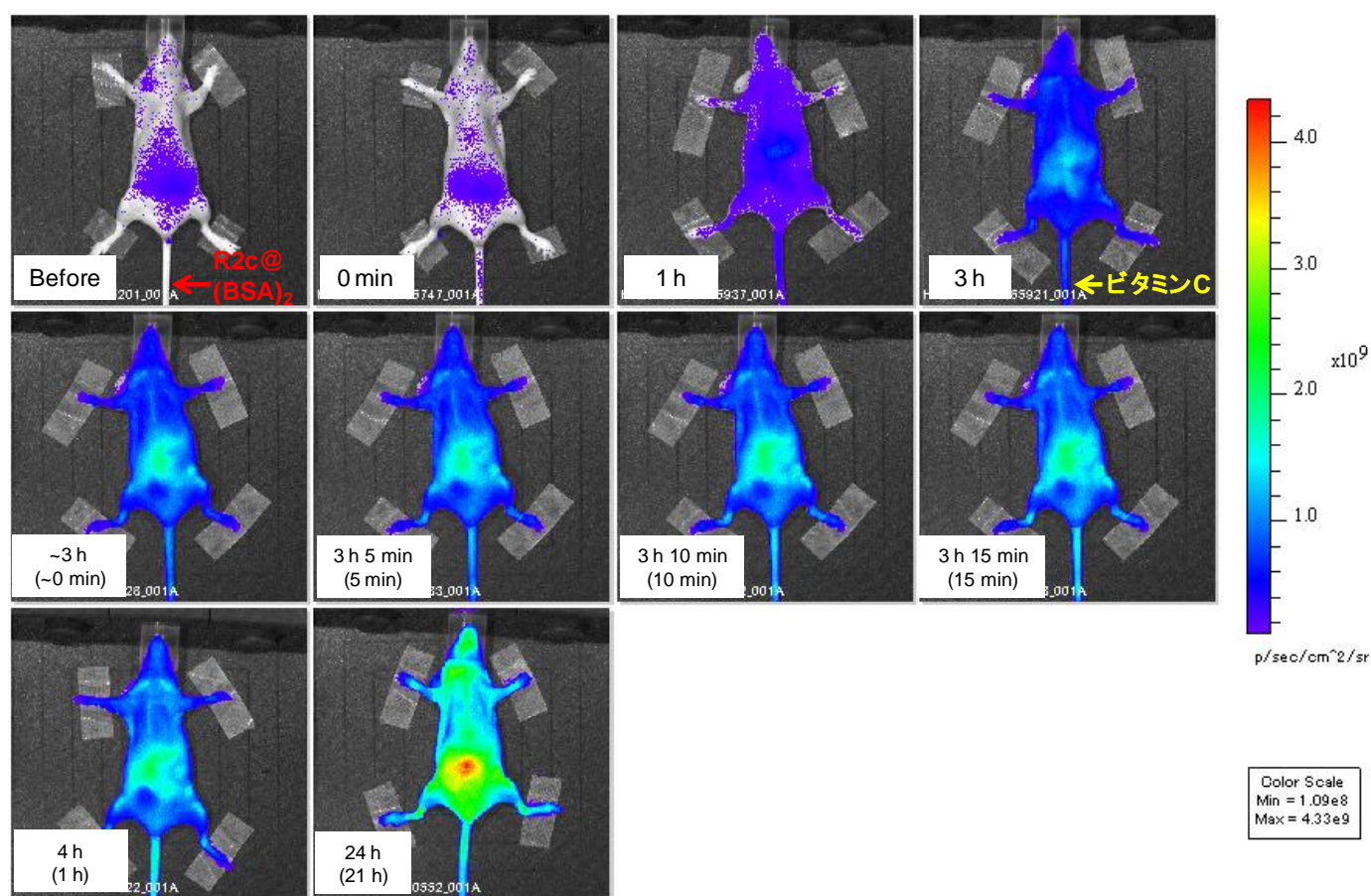


図 4-47、R2c@(BSA)₂ のマウス中ビタミン C 蛍光バイオイメージング

R2c@(BSA)₂ の投与だけでなく、ビタミン C も投与した状態での安定性を調べるため、長時間の蛍光バイオイメージングを行った (図 4-47)。尾静脈から R2c@(BSA)₂ 投与 3 時間後、全身に R2c@(BSA)₂ が十分に分布していることを確認し、ビタミン C も同様に尾静脈から投与した。これにより、全身の蛍光強度が増大する様子が観測された。R2c@(BSA)₂ を投与して 24 時間後 (ビタミン C 投与 21 時間後) では、より強い蛍光を

示しており、1日程度経過しても、蛍光プローブが壊れる様子や、排泄された様子は観測されず、体内に存在していることが確認された。

4-2-16-3. R2c@(BSA)₂へビタミンC投与後の生体内での安定性 (2日目)

24時間では、R2c@(BSA)₂の蛍光強度の減少は観測されていない。そこで、ビタミンCをさらに投与してマウス中の蛍光バイオイメージングを行った(図4-48)。この結果、わずかに肝臓付近の領域で蛍光強度が増大したように見えるが、全身の蛍光強度には、ほとんど増大が観測されなかった。これは、R2c@(BSA)₂が二度目のビタミンCを投与する前にほぼ全て反応した後であったためと考えられる。また、2日程度の観測では、蛍光強度の減少は観測されず、R2c@(BSA)₂がマウス中で安定に存在していることが示唆された。この測定終了後でもマウスの健康面には影響が観測されなかった。

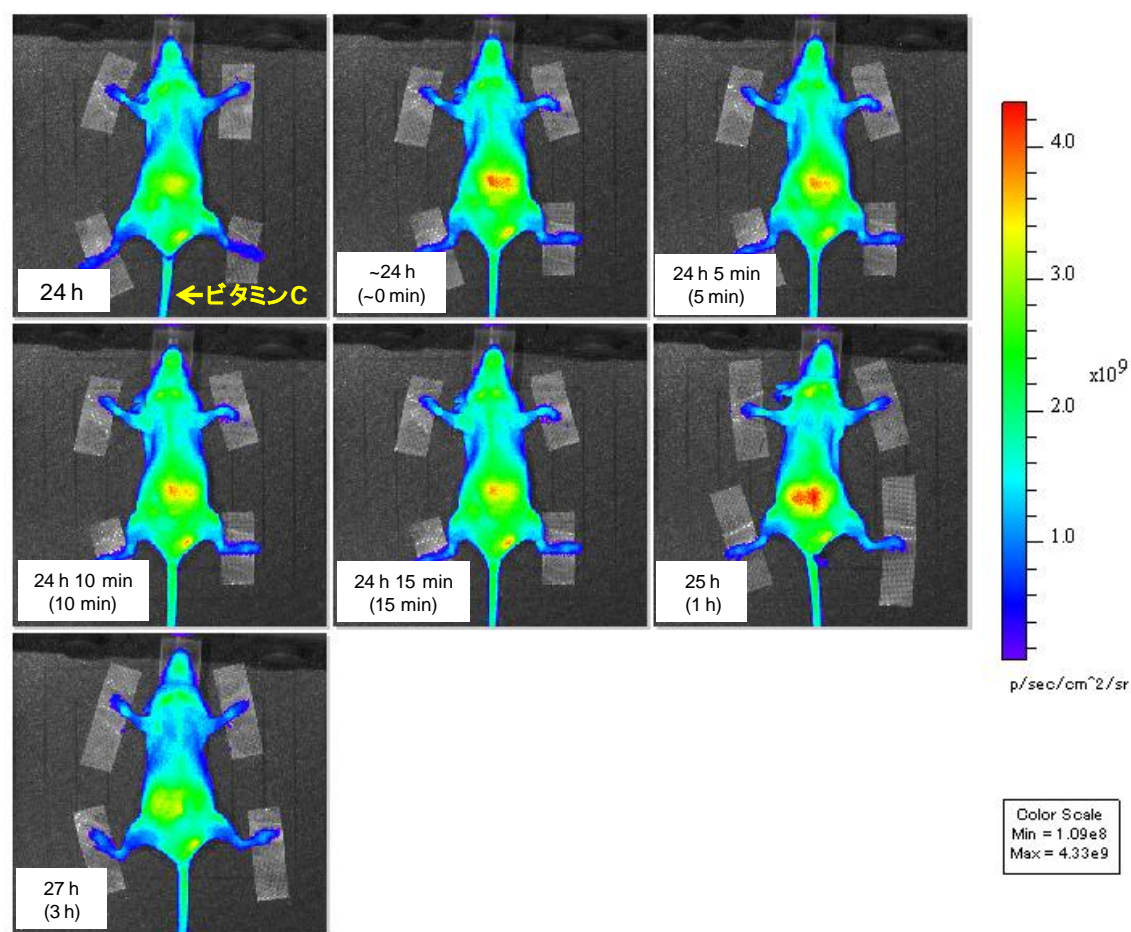


図 4-48、1日後の R2c@(BSA)₂のマウス中ビタミンC 蛍光バイオイメージング

4-2-16-4. リポソーマル R2c の生体内での安定性

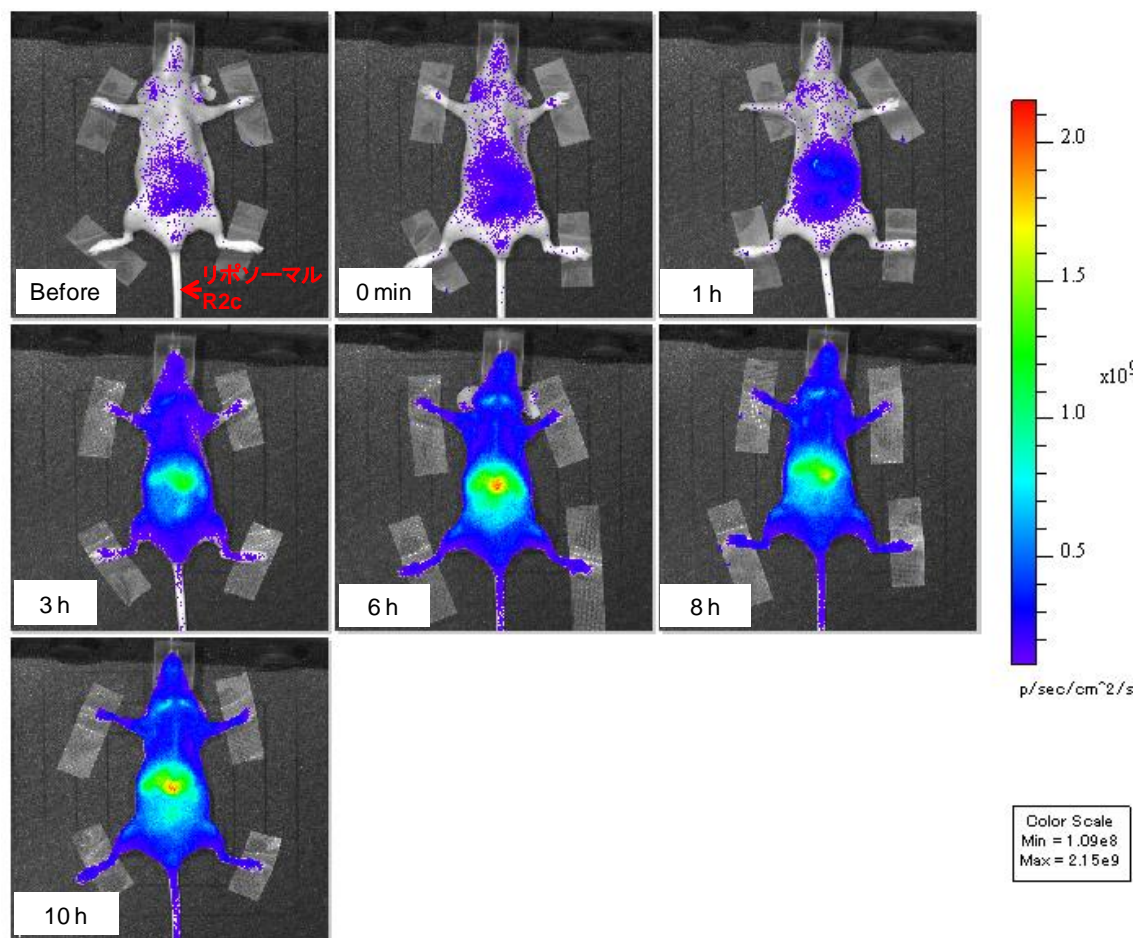


図 4-49、リポソーマル R2c のマウス中蛍光バイオイメージング

リポソーマル R2c においても同様に長時間でのイメージングを行った。初めに、蛍光プローブリポソーマル R2c のみの投与でのマウス中蛍光イメージングを行った（図 4-49）。尾静脈からリポソーマル R2c を投与すると少しずつ全身の蛍光強度が増大する様子が観測される。また、リポソーマル R2c は R2c@(BSA)₂ と比べて、肝臓付近に偏って分子やすい傾向が観測された。これは、BSA は牛由来の血清アルブミンの一種で、血清アルブミンは血液中に豊富に存在するタンパク質である。このため、元々血液中に存在しているタンパク質の一種である BSA は、生体内に投与した場合リポソームに比べて特定の臓器等に偏った分布をしにくく、一方、リポソーマル R2c は、異物として認識され、肝臓に多く蓄積してしまっことが示唆される。

4-2-16-5. リポソーマル R2c へビタミン C 投与後の生体内での安定性 (1 日目)

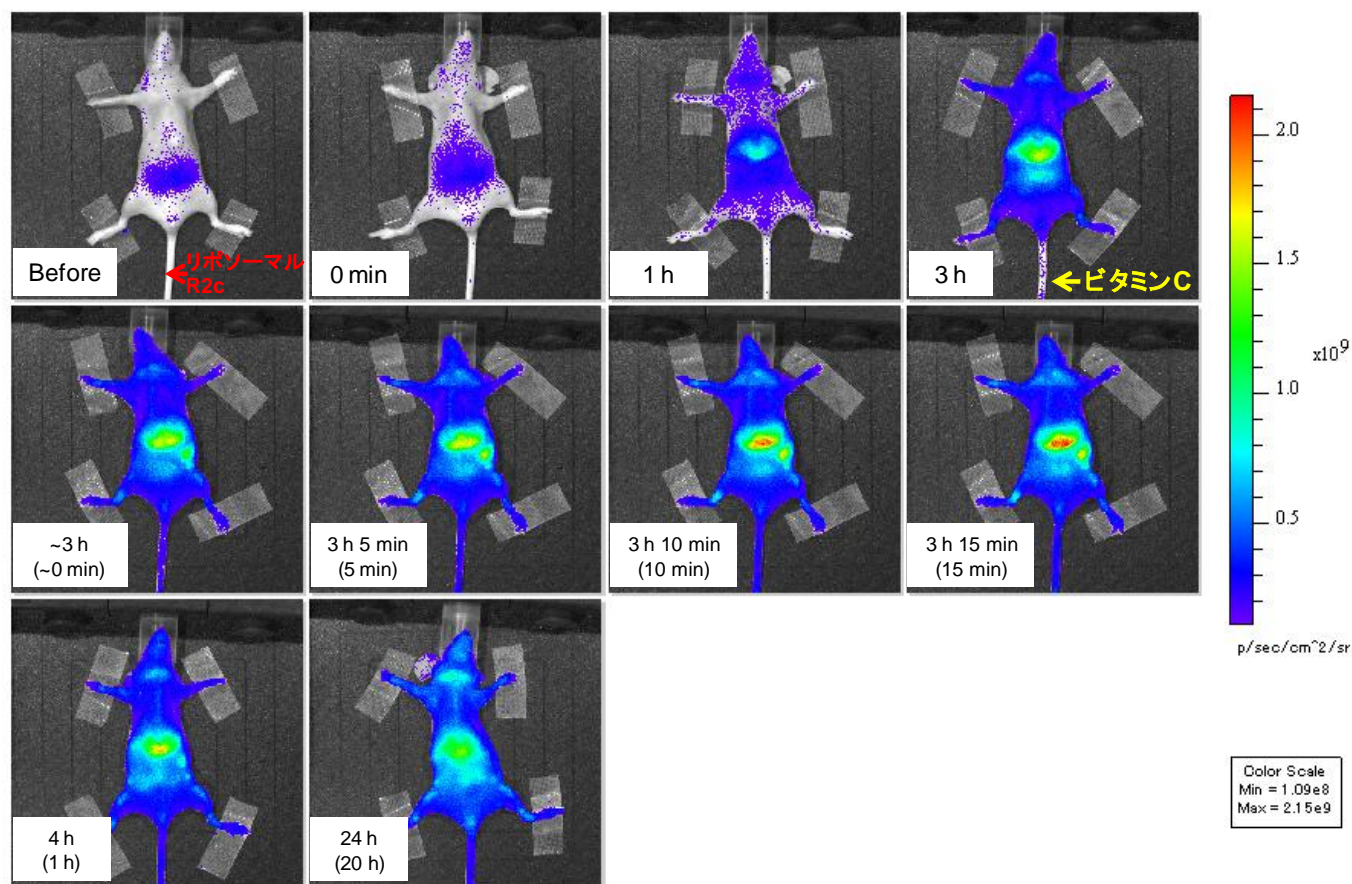


図 4-50、リポソーマル R2c のマウス中ビタミン C 蛍光バイオイメージング

リポソーマル R2c もビタミン C も投与した状態での安定性を調べるため、長時間の蛍光バイオイメージングを行った (図 4-50)。尾静脈からリポソーマル R2c 投与 3 時間後、肝臓付近への分布の偏りはあるものの全身にリポソーマル R2c が分布していることを確認し、ビタミン C を尾静脈から投与した。これにより、全身の蛍光強度が少し増大する様子が観測された。肝臓付近は、ビタミン C 投与後周囲に比べより強い蛍光を示していた。リポソーマル R2c を投与して 24 時間後 (ビタミン C 投与 21 時間後) では、肝臓付近の蛍光強度は少し低下した様子が観測されるが、それ以外の領域では全体的に蛍光強度の増大が観測されている。リポソーマル R2c の場合でも、投与後 1 日程度経過しても、蛍光プローブが壊れる様子や、排泄された様子はほとんど観測されず、体内に存在していることが示唆された。

4-2-16-6. リポソーマル R2c へビタミン C 投与後の生体内での安定性 (2 日目)

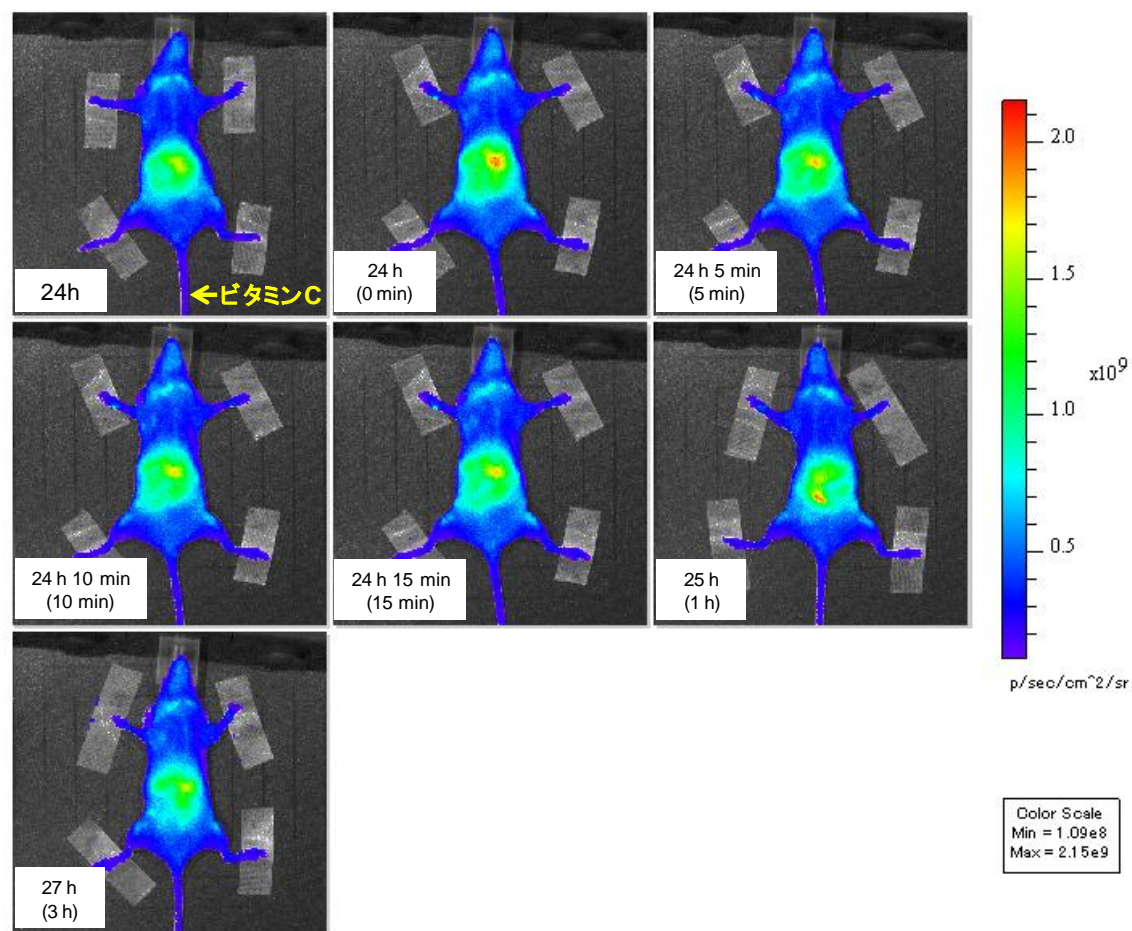


図 4-51、1 日後のリポソーマル R2c のマウス中ビタミン C 蛍光バイオイメージング

リポソーマル R2c の場合、マウスへ投与後 24 時間では、肝臓付近以外では蛍光強度の減少はほとんど観測されていない。そこで、ビタミン C をさらに投与してマウス中の蛍光バイオイメージングを行った (図 4-51)。この結果、わずかに肝臓付近の領域で蛍光強度が増大したように見えるが、全身の蛍光強度には、ほとんど増大が観測されなかった。これは、R2c@(BSA)₂ が二度目のビタミン C を投与する前にほぼ全て反応した後であったためと考えられる。また、2 日程度の観測では、蛍光強度の減少は観測されず、R2c@(BSA)₂ がマウス中で安定に存在していることが示唆された。この測定終了後でもマウスの健康面には影響が観測されなかった。

4-2-17. マウス中に静脈投与したビタミンCの定量

通常の蛍光イメージングでは、蛍光強度の変化からその現象を定量的に評価することは困難である。これは蛍光プローブから検出される蛍光が、生体内では流動的であり、また、投与された蛍光プローブの生体内分布の影響を受けるため、局在濃度のばらつきが生じるためである。加えて、蛍光プローブの退色も生じるため、単一波長の蛍光プローブを用いた蛍光イメージングでは定量的な評価を行うことは困難である。蛍光イメージングにおいて、定量を目的とする場合、レシオイメージングという方法がある²⁰⁻²⁴。この測定方法では、二波長の蛍光強度の比を相対的に評価することで、目的とする現象の蛍光強度の変化をより正確に得ることが出来る。

蛍光イメージングを基に、定量を行う場合は上記の様な方法を取る必要があるが、単一の蛍光プローブが二波長で発光出来るような分子設計を行う、または、複数の蛍光プローブを投与してそれぞれの蛍光強度を相対的に評価しなければならない。そこで、本研究ではより直接的にマウス中に投与されたビタミンCを評価するため、ビタミンC投与後のマウスの血漿、肝臓を摘出し、直接ビタミンCの定量を行った。

本測定では、麻酔を行ったマウス尾静脈からビタミンCを512 mMで50 µL投与した。その後、15~20分程度経過した後、開腹して下大静脈から0.62~0.70 mLの血液を採取した。また、肝臓も摘出してビタミンC濃度の評価を行っている。この結果、血漿中のビタミンC濃度は0.6 mMで、肝臓中のビタミンC濃度は0.9 mMであることが明らかとなった。肝臓中のビタミンC濃度が血漿中の濃度より有意に上昇していることから、投与15~20分程度で血液から臓器へビタミンCが取り込まれていることが明らかとなった。マウス中に512 mMで50 µLのビタミンC投与した場合、マウスの全血液量がおよそ2 mLであるとすると、血液中に均一にビタミンCが分布した場合、血液中のビタミンC濃度は12 mM程度となる。本結果が、マウス中で均一にビタミンCが分布した場合より低い濃度になった原因を考察する。マウス中の蛍光バイオイメージングの結果を見てみると、マウスの尾付近で特に強い発光が観測されている。この結果から、投与されたビタミンCの多くは、投与領域の尾静脈付近に多く存在していると考えられる。また、ビタミンCが毛細血管中に流れていき、下大静脈や肝臓中にはあまり多くのビタミンCが含まれていなかったことがもう一つの要因と考えられる。これらが原因となり、血液中、及び臓器中ではそれほど高いビタミンCが観測されなかったと考えられる。この結果は、既報のPK (Pharmacokinetics) 研究の結果と一致している²⁵⁻²⁹。

表 4-1、ビタミンCのマウスへの投与量とマウス中のビタミンC測定値

	ビタミンC投与	血漿	肝臓
投与量(µL)	50	—	—
摘出量(mg)	—	0.7	500
濃度(mM)	512	0.6	0.9

4-2-18. R2c@(BSA)₂ のヒトへの応用について

R2c@(BSA)₂ をヒトへ応用することを考えた場合、生体透過性が高い赤色光でも数 cm しか生体を透過できないため、人体での直接のバイオイメージングへの応用は困難である。そこで、ヒトの血中ビタミン C の定量について測定を試みた (図 4-52)。牛血清中ビタミン C の蛍光強度時間変化の測定と同様に、ヒト血清と血清にビタミン C を 30、50、70 μM 加えた血清を調整し、ヒト血清中ビタミン C の蛍光検出を行った。ヒトの血清中にも様々な酸化還元物質が存在するが、ビタミン C 添加 20 分後の蛍光強度を観測すると、ビタミン C 濃度に依存して蛍光強度が増大する様子が確認された。この結果は、R2c@(BSA)₂ がヒトの血液中でビタミン C を定量するツールとして応用できるポテンシャルを有することを示す。

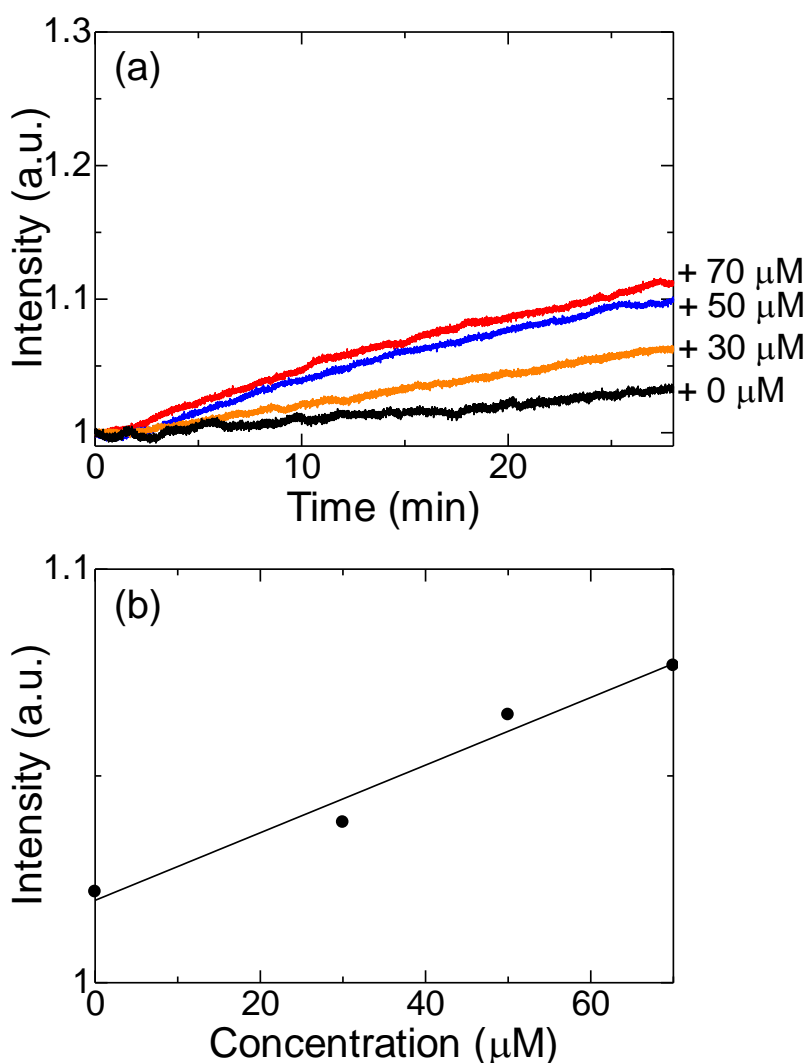


図 4-52、(a) ヒト血清中ビタミン C 蛍光検出、(b) ヒト血清中へのビタミン C 添加 20 分後の蛍光強度

このように、 $R2c@(BSA)_2$ をヒトへ適用する場合は、ビタミン C を静脈投与した後、各組織から血液を取り出し、その血液中ビタミン C の定量のために利用できる。

4-2-19. $R2c@(BSA)_2$ の毒性について

本研究で開発した蛍光プローブは、フタロシアニンと TEMPO ラジカルから構成されている。フタロシアニンは青色の顔料（新幹線や道路標識の青色部分）、染料（インクジェットプリンター）、記録媒体（Compact Disc; CD）や感光体としても用いられる。また、幼児用家具や玩具、及びコンタクトレンズで FDA（Food and Drug Administration; アメリカ食品医薬品局）の承認も得ている。加えて、 $R2c$ と類似の構造を有する SiPc 誘導体は光線力学的ガン治療用光増感剤として臨床実験が行われている³⁰。このように、フタロシアニンは毒性が低いことから、身の回りの多様な物に用いられている。

一方、TEMPO ラジカルの場合、ラットにおける 4-ヒドロキシ TEMPO の LD50 が 1053 mg/kg であるのに対し、本研究のマウス中バイオイメーキングで用いた $R2c$ の投与量は <1mg/kg である。このため、TEMPO ラジカルの使用量は生体へ毒性を示す量よりはるかに低濃度である。

本研究で使用した $R2c$ は既報において細胞毒性評価を行っている³¹。ここでは、実験で使用している数 μM 程度の $R2c$ では細胞毒性を示さないことが明らかとされている。また、 $R2c@(BSA)_2$ を用いてビタミン C のバイオイメーキングを行ったマウスは 2 日程度経過しても健康面に影響は見られなかった。これより、 $R2c@(BSA)_2$ は毒性が低く、バイオイメーキングを行うのに有用な蛍光プローブと言える。

4-2-20. $R2c@(BSA)_2$ のマウスによる排泄について

$R2c@(BSA)_2$ を投与されたマウスの排泄に $R2c$ が含まれるか観測を行った。 $R2c$ のモル吸光係数は、一般的な発色団のアントラセン ($\epsilon \sim 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) 等と比べても、とても大きな値 ($\epsilon \sim 3 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) を示す。このため、数 μM の $R2c$ を 0.1 mL 程度滴下するだけで図 4-53 のような青色を視認でき、排泄に $R2c$ が含まれていれば目視でその存在が確認できる。実際の排泄には図の様な青色は視認できなかったことから、 $R2c$ は排泄によりそのまま体外には出されていないことが確認された。



図 4-53. $R2c$ の視認について

4-3. 実験

4-3-1. R2c と BSA 複合体 R2c@(BSA)₂ の合成

R2c (0.7 mg、 6.32×10^{-7} mol) に純水で希釈した 2% Triton X-100 溶液 (2 ml) を加えた。続いて、ガラスビーズ (500 mg) を加え、30 分超音波をかけることで R2c を溶解させた。得られた溶液に Bovine serum albumin (BSA、100 mg、 1.51×10^{-6} mol) を加え 3 時間攪拌した。その後、限外濾過 (10,000 MWCO) を行い、濾過 (Φ 0.45 μ m) による精製後 R2c@(BSA)₂ 複合体を得た。

4-3-2. R2c と BSA 複合体 R2c@(BSA)₂ のサイズ排除クロマトグラフィー (Sephadex G-100)

R2c@(BSA)₂ を Sephadex G-100 (内径: 2.1、2.4 cm、高さ: 21、27 cm) に加え、NaCl (1 M) を含む Tris-HCl バッファー (0.75 M、pH 8) で流速 0.1-0.3 mL min⁻¹ で溶出し、電子吸収スペクトルを光路長 5 mm の石英セルを用いて、JASCO 社製 V-570 紫外可視分光光度計で測定した。

4-3-3. R2c@(BSA)₂、R2c@TX、リポソーマル R2c 水溶液中ビタミン C 蛍光検出の比較

R2c@(BSA)₂、R2c@TX、リポソーマル R2c の発光測定は、それぞれリン酸バッファーで希釈し (1.8 ml、pH 7.4、ビタミン C 水溶液を加えた後の R2c の最終濃度 3 μ M) を加えたものを使用した。これにリン酸バッファー (0.2 ml) 中に溶解させたビタミン C を加え (最終濃度: 10 mM) 発光測定を行った。測定は光路長 10 mm の蛍光セルを用い、セル中のサンプル溶液はマイクロ攪拌子 (4 mm) をスターラー (900 r.p.m) で攪拌し、モニター波長をそれぞれ ~ 690 nm で測定した。ダイオードレーザーは 600 V、スリット幅は励起・蛍光共に 2 mm に設定した。

4-3-4. R2c@(BSA)₂ の水溶液中ビタミン C 蛍光検出

R2c@(BSA)₂ の発光測定は、合成した R2c@(BSA)₂ 蛍光プローブ水溶液 (0.1 ml、最終濃度: 3 μ M) にリン酸バッファー (1.8 mL、pH 2-8) を加えたものを使用した。これにリン酸バッファー (0.2 ml) 中に溶解させたビタミン C を加え (最終濃度: 0、1、10、100、300、500、1000 μ M) 発光測定を行った。測定は光路長 10 mm の蛍光セルを用い、セル中のサンプル溶液はマイクロ攪拌子 (4 mm) をスターラー (900 r.p.m) で攪拌し、モニター波長をそれぞれ 692 nm で測定した。ダイオードレーザーは 600 V、スリット幅は励起・蛍光共に 2 mm に設定した。

4-3-5. R2c@(BSA)₂ の血清中ビタミン C 蛍光検出

R2c@(BSA)₂ の発光測定は、合成した R2c@(BSA)₂ 蛍光プローブ PBS 水溶液 (0.1 ml 最終濃度: 3 μ M) にリン酸バッファー (0.9 ml、pH 3) を加えたものを使用した。これに血清 (1.0 ml) 中に溶解させたビタミン C を加え (0、30、50、70 μ M) 発光測定を行

った。測定は光路長 10 mm の蛍光セルを用い、セル中のサンプル溶液はマイクロ攪拌子 (4 mm) をスターラー (900 r.p.m) で攪拌し、モニター波長をそれぞれ 692 nm で測定した。ダイオードレーザーは 600 V、スリット幅は励起・蛍光共に 2 mm に設定した。

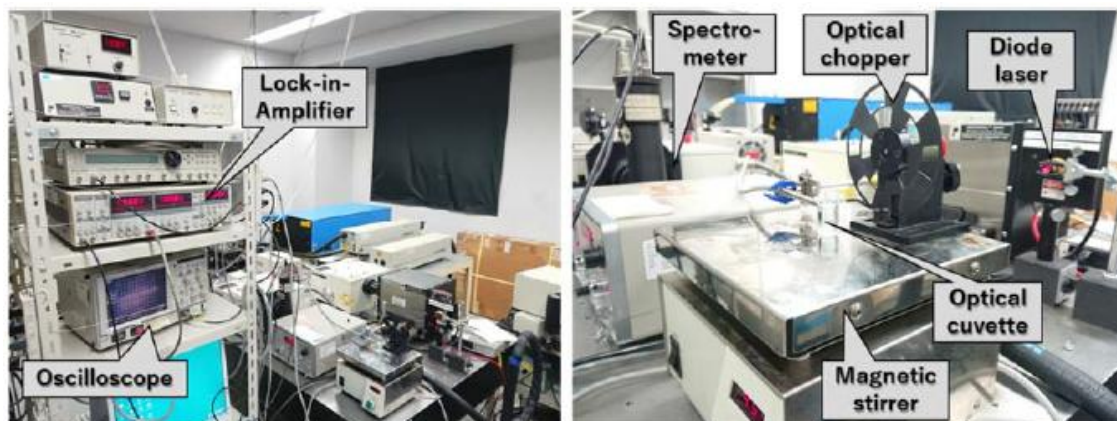


図 4-54、水溶液中ビタミン C の蛍光検出用測定システム

4-3-6. マウスについて

ヌードマウス (Balb/c-nu、雌、8 週齢、n=8) を利用して蛍光プローブ及びビタミン C 投与後のマウスの蛍光バイオイメージングを行った。通常のマウスの飼料にはクロロフィルなどが含まれており、腸付近で自家蛍光が生じてしまう。そのため蛍光イメージング用のクロロフィルなどを含まない無蛍光飼料を 1 週間程度与えたヌードマウスを使用した。

4-3-7. 蛍光バイオイメージング用 R2c@(BSA)₂ 水溶液の調整 *通常時の約半分の R2c を使用

R2c (0.431 mg、 3.89×10^{-7} mol) に純水で希釈した 2% Triton X-100 溶液 (2 ml) を加えた。続いて、ガラスビーズ (500 mg) を加え、30 分超音波をかけることで R2c を溶解させた。得られた溶液に Bovine serum albumin (BSA、100 mg、 1.51×10^{-6} mol) を加え 3 時間攪拌した。その後、限外濾過 (10,000 MWCO) を行い、濾過 (Φ 0.45 μ M) による精製後 R2c@(BSA)₂ 複合体 (1.18×10^{-4} M、2 mL) を得た。

4-3-8. R2c@(BSA)₂ を用いたマウス中蛍光バイオイメージング

マウスの尾静脈から蛍光プローブ R2c@(BSA)₂ (1.18×10^{-4} M、125 μ L) を投与した。2 時間経過した後、蛍光プローブがマウスの体全体に分布したことを確認した。その後、マウスの尾静脈からビタミン C (512 mM、50 μ L) を投与し、蛍光強度の変化をモニターした。

4-3-9. 蛍光バイオイメージング用リポソーマル R2c 水溶液の調整 *通常時の約 2 倍の R2c を使用

R2c (0.431 mg、 3.89×10^{-7} mol) を THF (180 μ L) に溶かし、これに DPPC (dipalmitoyl-phosphatidylcholine、21.0 mg、 2.86×10^{-5} mol) を溶かしたクロロホルム (3.6 mL) を加えた。この溶液を減圧留去により、溶媒を完全に除去することでナスフラスコの表面にフィルムを形成させた。ガラスビーズ (500 mg)、PBS (Phosphate-Buffered Saline、2 mL) を加えた後、ボルテックスミキサーで攪拌し、50°C で約 1 時間超音波処理を行った。自然冷却後、遠心分離 (3,500 r.p.m、10 min) を行い、目的物である上澄み溶液を得た。濾過 ($\Phi 0.45 \mu$ M) による精製後、リポソーマル R2c (1.52×10^{-4} M、2 mL) を得た。

4-3-10. リポソーマル R2c を用いたマウス中蛍光バイオイメージング

マウスの尾静脈から蛍光プローブリポソーマル R2c (1.52×10^{-4} M、125 μ L) を投与した。2 時間経過した後、蛍光プローブがマウスの体全体に分布したことを確認した。その後、マウスの尾静脈からビタミン C (512 mM、50 μ L) を投与し、蛍光強度の変化をモニターした。

4-3-11. マウス中に投与されたビタミン C の定量

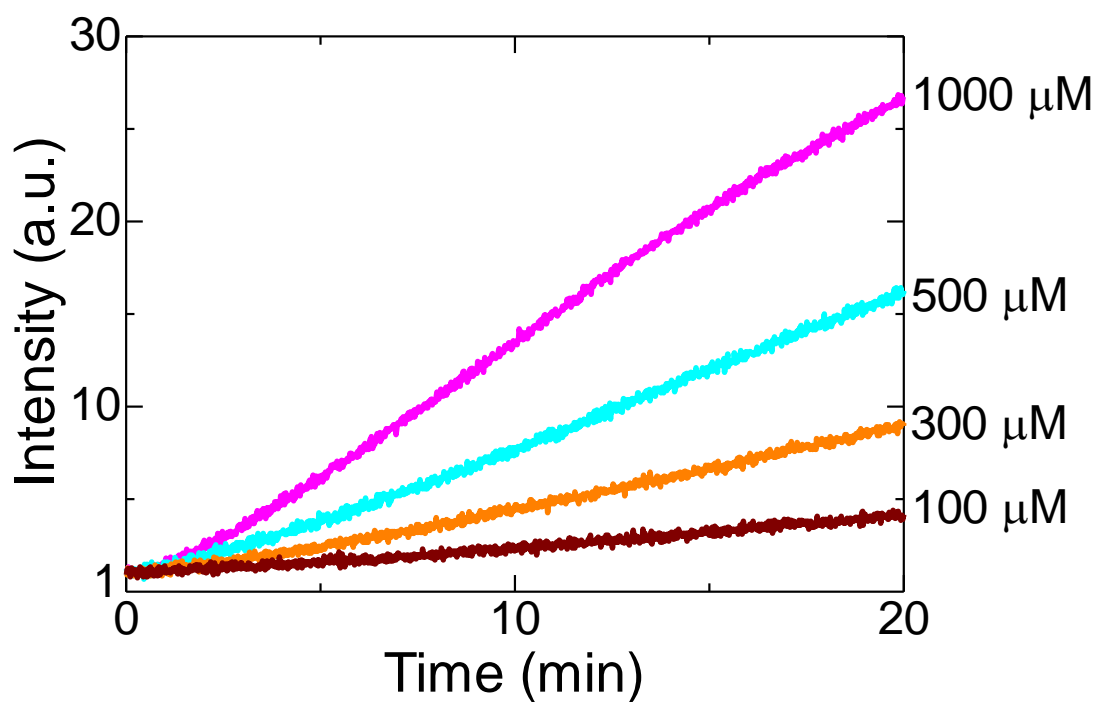
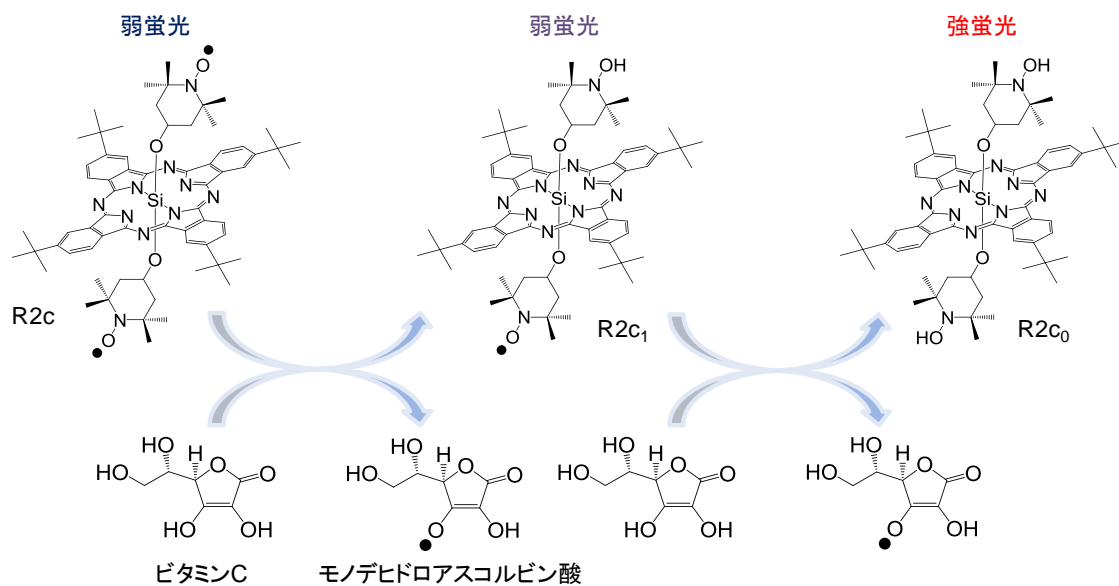
4 匹のマウスに麻酔を投与した後、マウスの尾静脈からビタミン C (512 mM、50 μ L) を投与した。投与から 15~20 分経過した後、下大静脈から 0.62~0.70 mL の血液を採取し、肝臓を摘出した。血液の抗凝固剤 (ヘパリン、EDTA) を加えた後、遠心分離 (4°C、3500rpm、15 分) を行った。得られたサンプルを 200 倍に薄めて Vitamin C Assay Kit (Cosmo Bio) を用いてマウス中に投与されたビタミン C を定量した。

4-3-12. ビタミン C の純度の確認

ビタミン C は HPLC による検査 (Kanto Chemical Co.) で、純度 98% 以上のものを購入している。さらに、ビタミン C は酸素で容易に酸化され得るため、ビタミン C を使用する前に NMR と ESR を用いてビタミン C の純度を確認している。NMR 測定からは、ビタミン C が二電子酸化されて生じるデヒドロアスコルビン酸が 0.5% 以下であることを確認している。また、X-バンド ESR 測定からは、ビタミン C が一電子酸化されたビタミン C ラジカルが検出されないことを確認している。加えて、実験に使用するために調整したビタミン C 溶液は、244 nm の電子吸収スペクトルの追跡で減衰量を確認している。実験の範囲内 (蛍光測定に用いるビタミン C 溶液が調整されてから測定終了までの時間) では、ビタミン C の吸収の減衰量が 5% 以下であることを確認している。このような確認を行うことで、本研究で使用しているビタミン C 及びビタミン C 溶液の純度は測定に十分と判断して使用した。

4-4. 付録

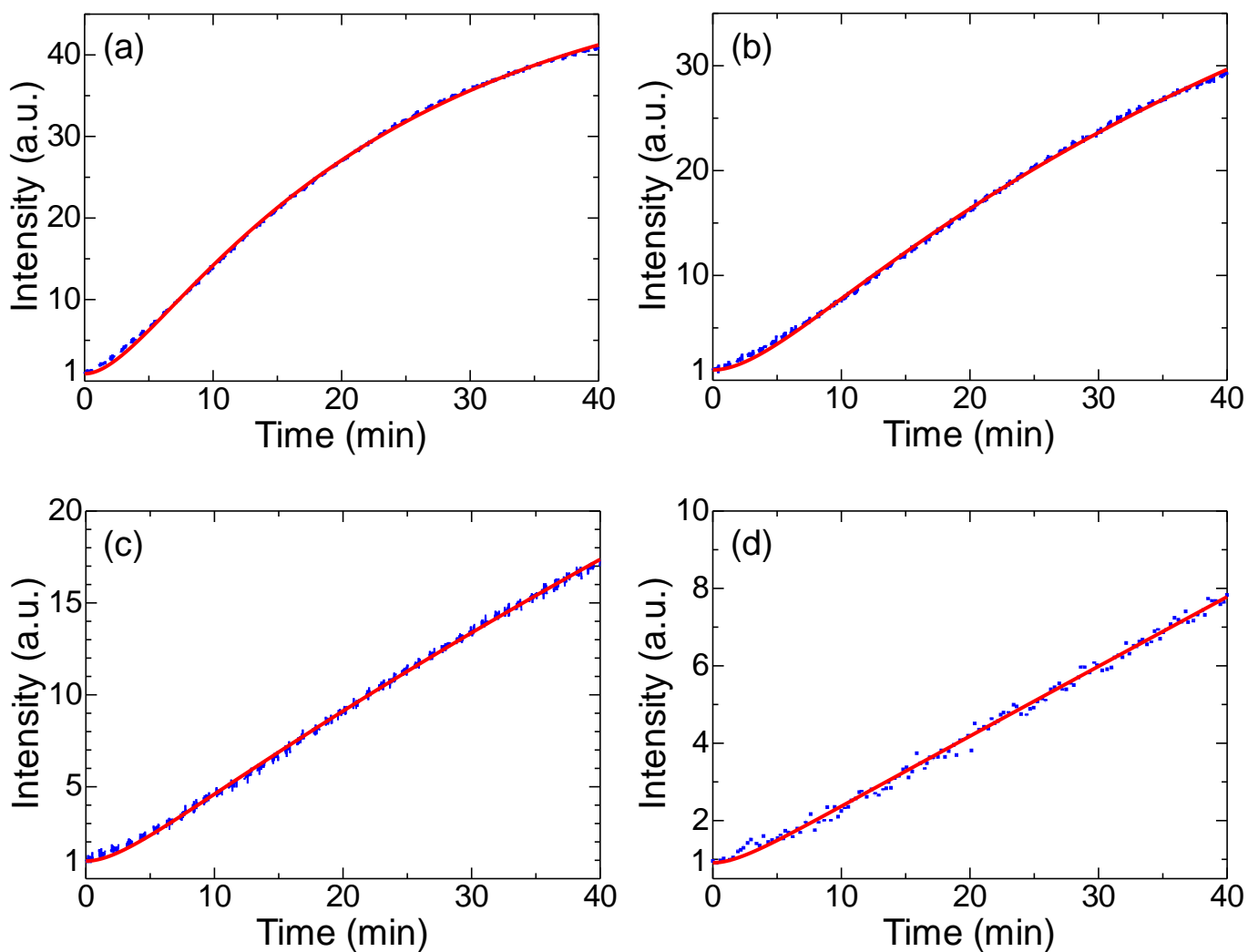
4-4-1. R2c@(BSA)₂ を用いた蛍光強度時間変化の解析



付録 4-1、R2c@(BSA)₂ とビタミンの反応及び蛍光強度時間変化の濃度依存性

次から、上記の蛍光強度時間変化のフィッティングを示す。

4-4-1-1. R2c@(BSA)₂を用いた蛍光強度時間変化のフィッティング(R2c₀の関数の場合)

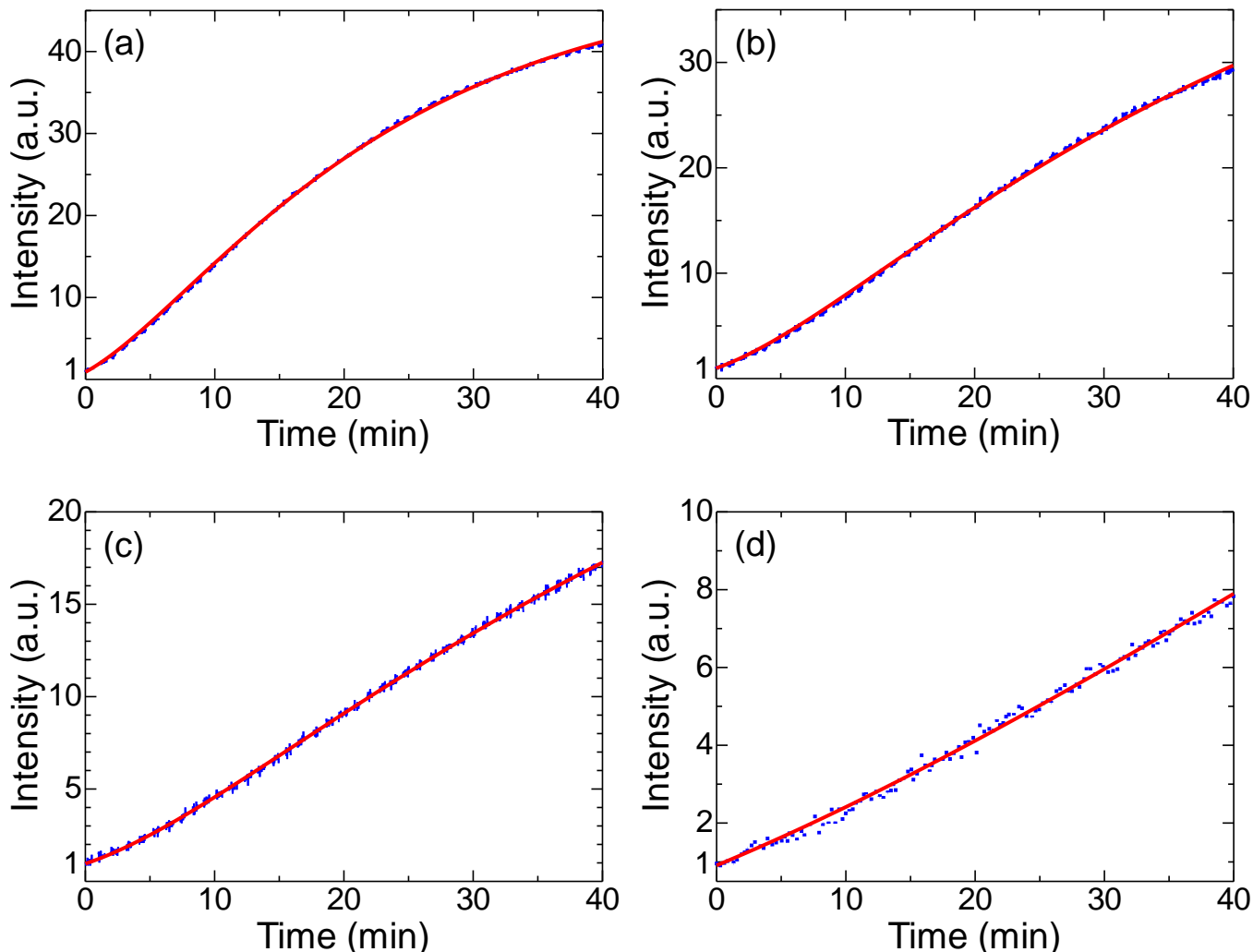


付録 4-2、R2c₀の関数を用いた蛍光強度時間変化の再現 ((a) 1000 μM、(b) 500 μM、(c) 300 μM、(d) 100 μM)

$$[R2c_0] = [R2c]_0 \left\{ 1 + \frac{1}{k'_1 - k'_2} (k'_2 e^{-k'_1 t} - k'_1 e^{-k'_2 t}) \right\}$$

R2c₀の関数での蛍光強度時間変化の再現では、ビタミン C 投与直後の蛍光強度とのずれが大きい。

4-4-1-2. R2c@(BSA)₂を用いた蛍光強度時間変化のフィッティング
 (逐次反応と蛍光量子収率を組み合わせた関数の $k_1 \neq k_2$ の場合)

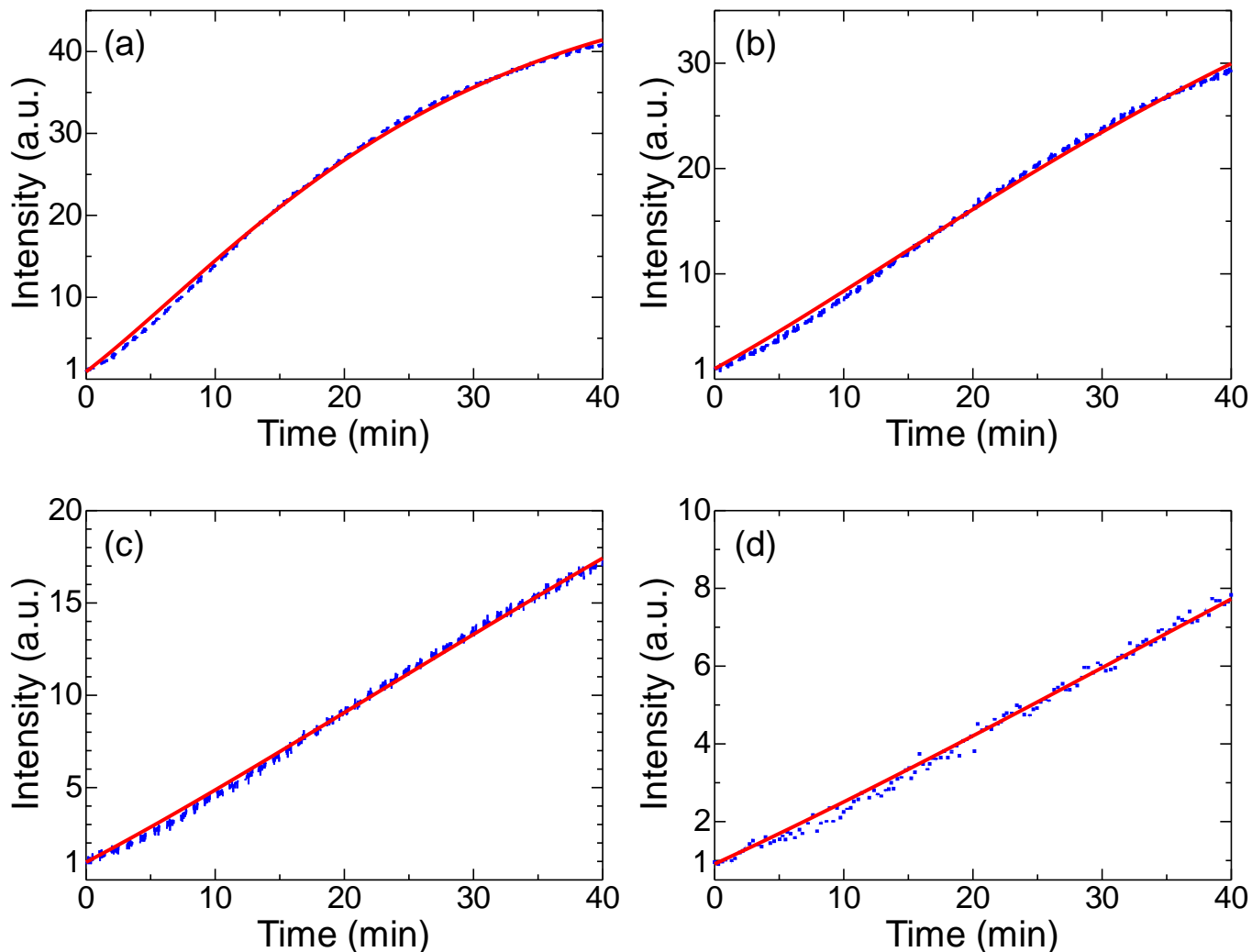


付録 4-3、逐次反応と蛍光量子収率を組み合わせた関数の $k_1=k_2$ の場合での蛍光強度時間変化の再現 ((a) 1000 μ M、(b) 500 μ M、(c) 300 μ M、(d) 100 μ M)

$$F(t) \propto [R2c]_0 \left[\Phi_F^{R2c_0} + \frac{1}{k'_1 - k'_2} \left\{ (\Phi_F^{R2c} (k'_1 - k'_2) - \Phi_F^{R2c_1} k'_1 + \Phi_F^{R2c_0} k'_2) e^{-k'_1 t} + (\Phi_F^{R2c_1} - \Phi_F^{R2c_0}) k'_1 e^{-k'_2 t} \right\} \right]$$

この関数を用いた蛍光強度の時間変化の再現性が最も高く、理論的に最も適していると考えられる。

4-4-1-3. R2c@(BSA)₂を用いた蛍光強度時間変化のフィッティング
 (逐次反応と蛍光量子収率を組み合わせた関数の $k_1=k_2$ の場合)



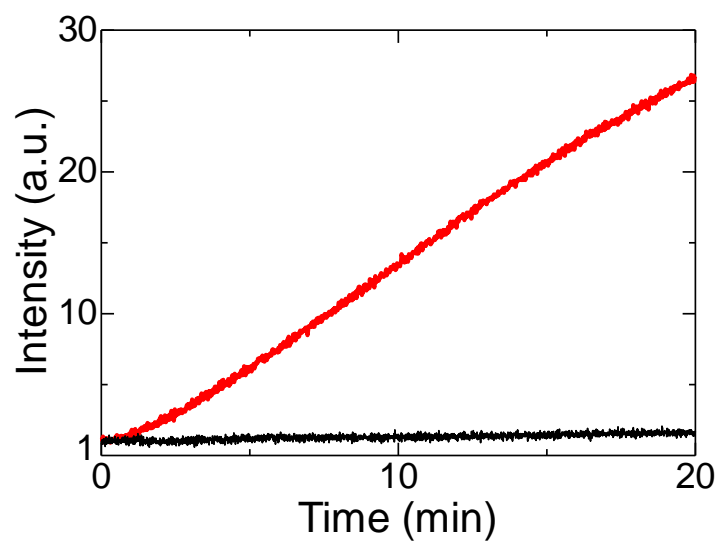
付録 4-4、逐次反応と蛍光量子収率を組み合わせた関数の $k'_1 \neq k'_2$ の場合での蛍光強度時間変化の再現 ((a) 1000 μ M、(b) 500 μ M、(c) 300 μ M、(d) 100 μ M)

$$F(t) \propto [R2c]_0 \left[\Phi_F^{R2c_0} + \left\{ \Phi_F^{R2c} - \Phi_F^{R2c_0} + \left(\Phi_F^{R2c_1} - \Phi_F^{R2c_0} \right) k'_1 t \right\} e^{-k'_1 t} \right]$$

$k'_1 \neq k'_2$ の場合、 $F(t)$ が実質二次の指数関数になるため、シグモイド曲線を示す実験値の再現性が高くない

4-4-2. 酸性条件下 (pH 3) での R2c@(BSA)₂ の安定性

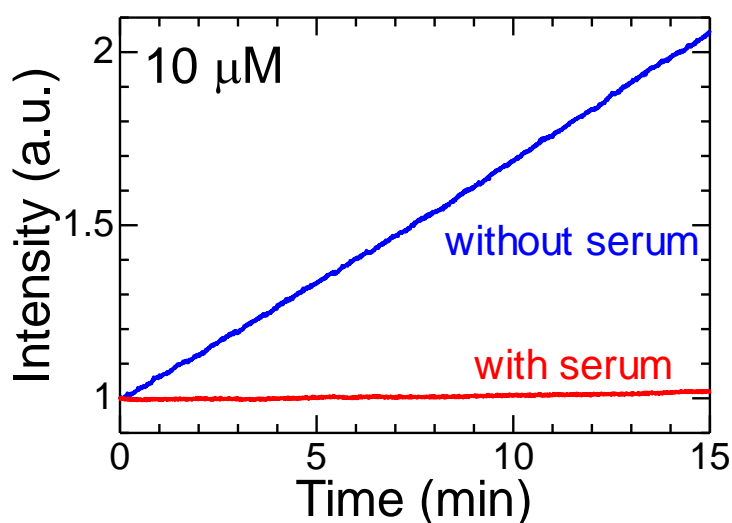
ビタミン C 添加後の蛍光強度は、およそ 50 倍程度は増大する。これは、R2c から R2c₀ への反応で蛍光量子収率が 0.012 から 0.57 へ変化することに起因する。一方、pH 3 の環境下で、20 分程度放置した場合、蛍光強度はビタミン C 添加時よりはるかに小さく 0.5 程度の増大しか観測されなかった。これより、pH 3 という酸性条件下でも R2c@(BSA)₂ は十分に安定していることが確認された。



付録 4-5、pH 3 でのビタミン C を 0 mM (黒) と 1 mM (赤) 添加後の蛍光強度時間変化の比較

4-4-3. 水溶液中と牛血清中でのビタミン C 蛍光検出の比較

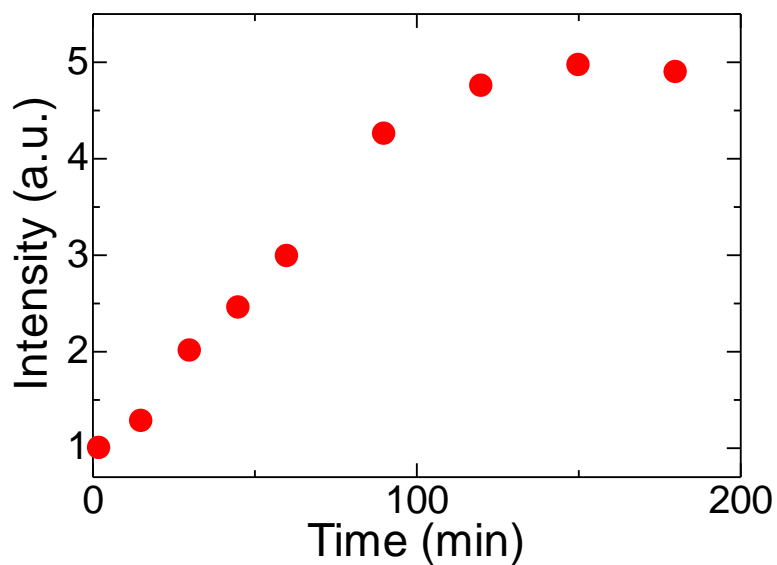
pH3 における水溶液中と牛血清中でのビタミン C 検出の比較を行った。R2c@(BSA)₂ へ 10 μM のビタミン C 添加後の蛍光強度時間変化を比較したところ、15 分後の蛍光強度が、水溶液中では 2 倍へ増大していたのに対し、血清中では 1.03 倍であった。これより、R2c@(BSA)₂ は水溶液中では 10⁻⁶ M 程度のビタミン C が検出可能であるのに対し、血清中でのビタミン C の検出では R2c@(BSA)₂ の反応性が低下して検出できるビタミン C 濃度は 10⁻⁵ M 程度であることが分かった。血清中で R2c@(BSA)₂ の蛍光強度の増大が低下したのは、血清中には様々な酸化還元物質が存在していることで、ビタミン C との反応性が低下したためと考えられる。



付録 4-6、水溶液中と牛血清中でのビタミン C 蛍光検出の比較

4-4-4. HeLa 細胞のビタミン C 取り込み

既報より、R2c によって細胞中へのビタミン C の取り込まれる様子を評価している¹⁴。初めにリポソーマル R2c を細胞に取り込ませた状態にする。その後、12 mM のビタミン C 添加後の蛍光強度の増大をモニターすると、ビタミン C の細胞への取り込みを蛍光強度の増大が反映する。この時、HeLa 細胞へのビタミン C の取り込み速度は $\sim 0.02 \text{ min}^{-1}$ となった。

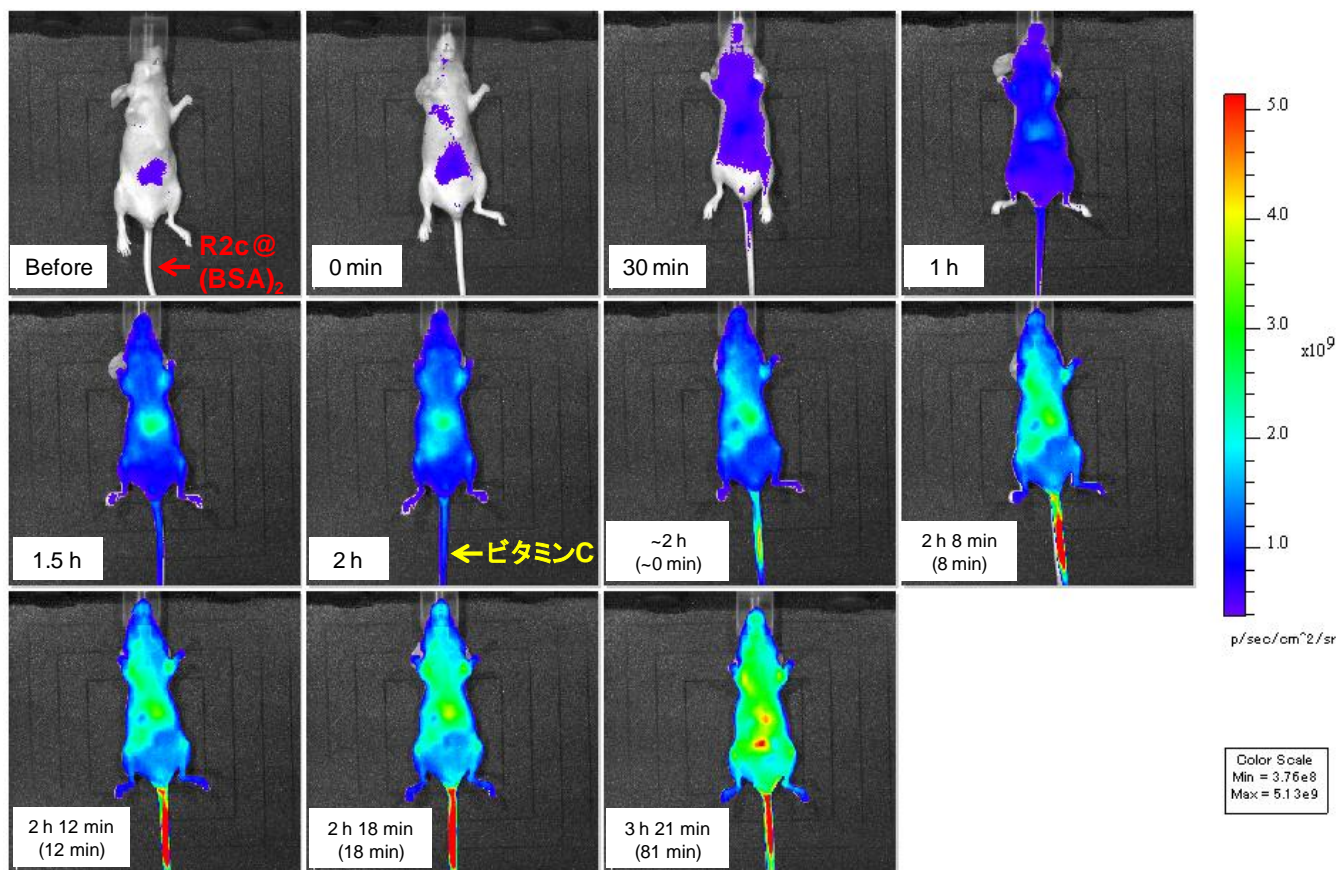


付録 4-7、HeLa 細胞へのビタミン C の取り込み

4-4-5. マウス中蛍光バイオイメージング

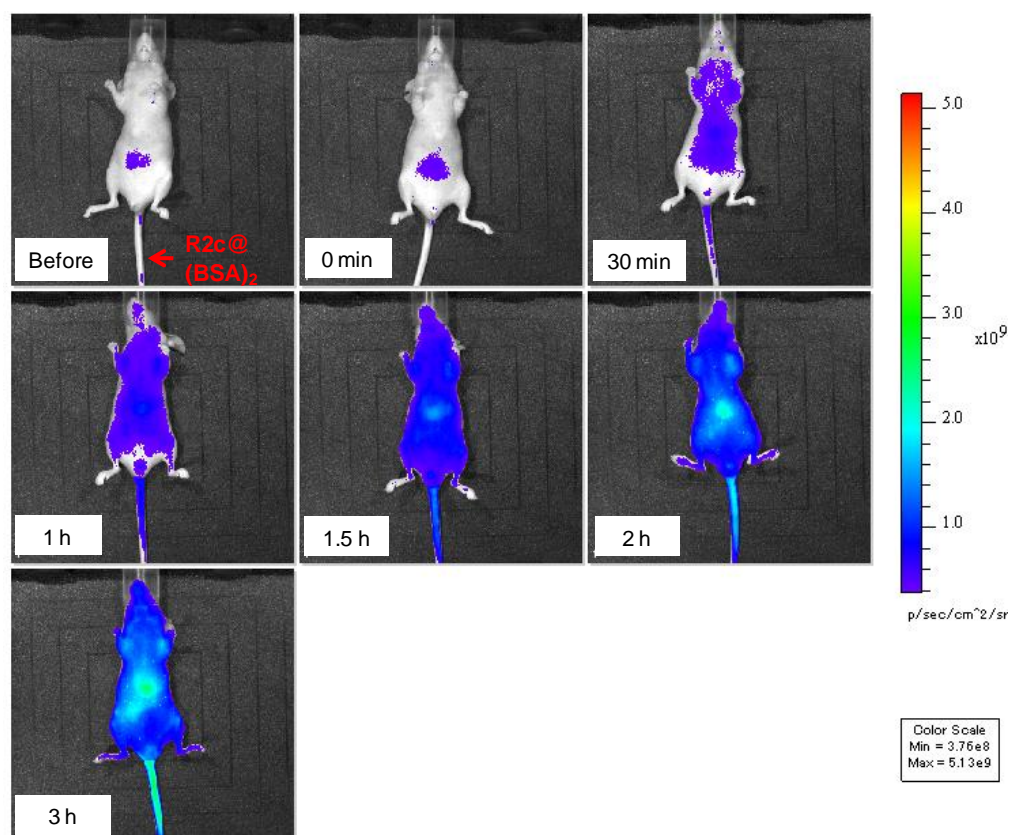
対照実験を含めて蛍光バイオイメージングの実験結果をまとめる。

4-4-5-1. R2c@(BSA)₂のマウス中蛍光バイオイメージング (ビタミンC投与)



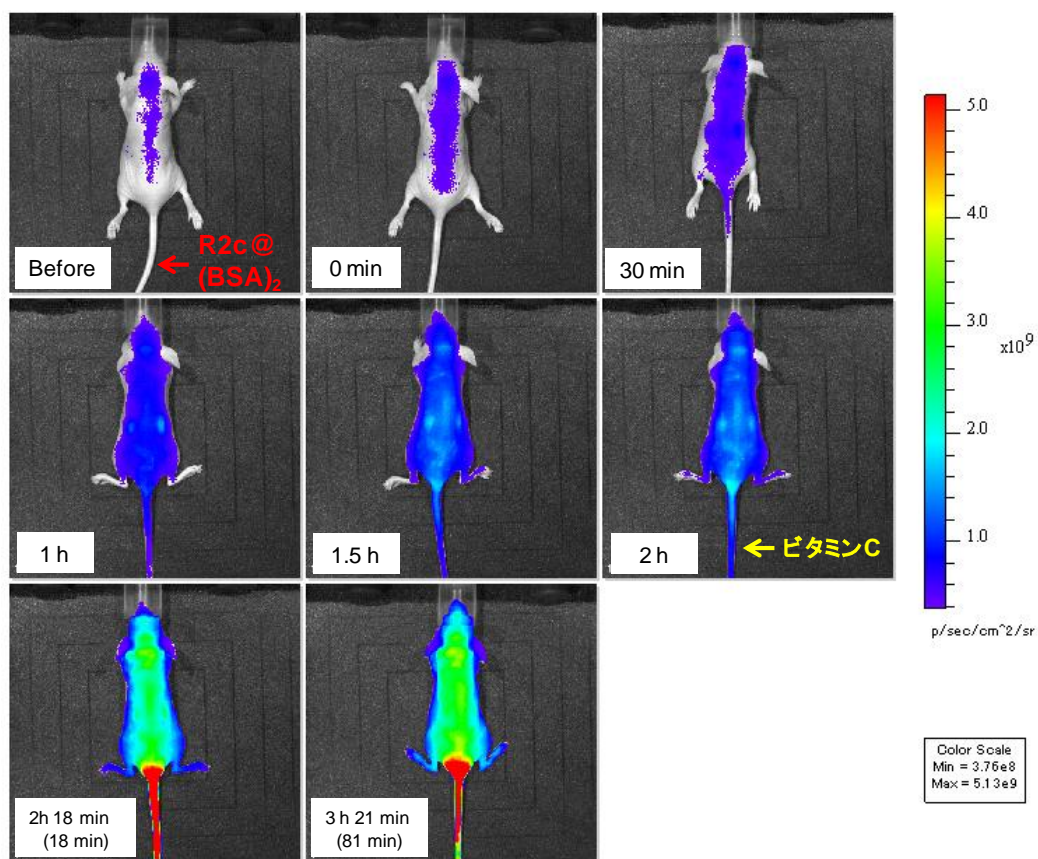
付録 4-8、R2c@(BSA)₂のマウス中蛍光バイオイメージング (ビタミンC投与)

4-4-5-2. R2c@(BSA)₂ のマウス中蛍光バイオイメージング (ビタミン C 投与なし)



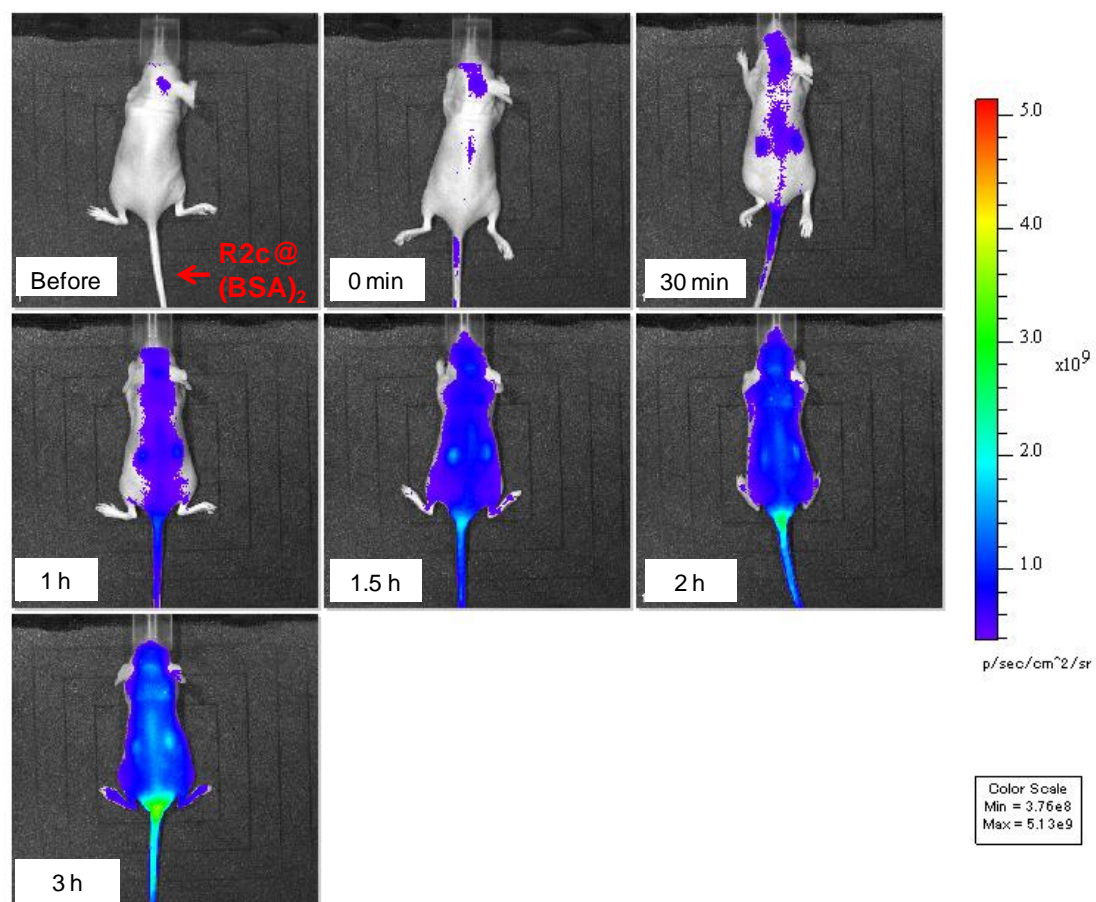
付録 4-9、R2c@(BSA)₂ のマウス中蛍光バイオイメージング (ビタミン C 投与なし)

4-4-5-3. R2c@(BSA)₂ のマウス中蛍光バイオイメージング (ビタミン C 投与、背面)



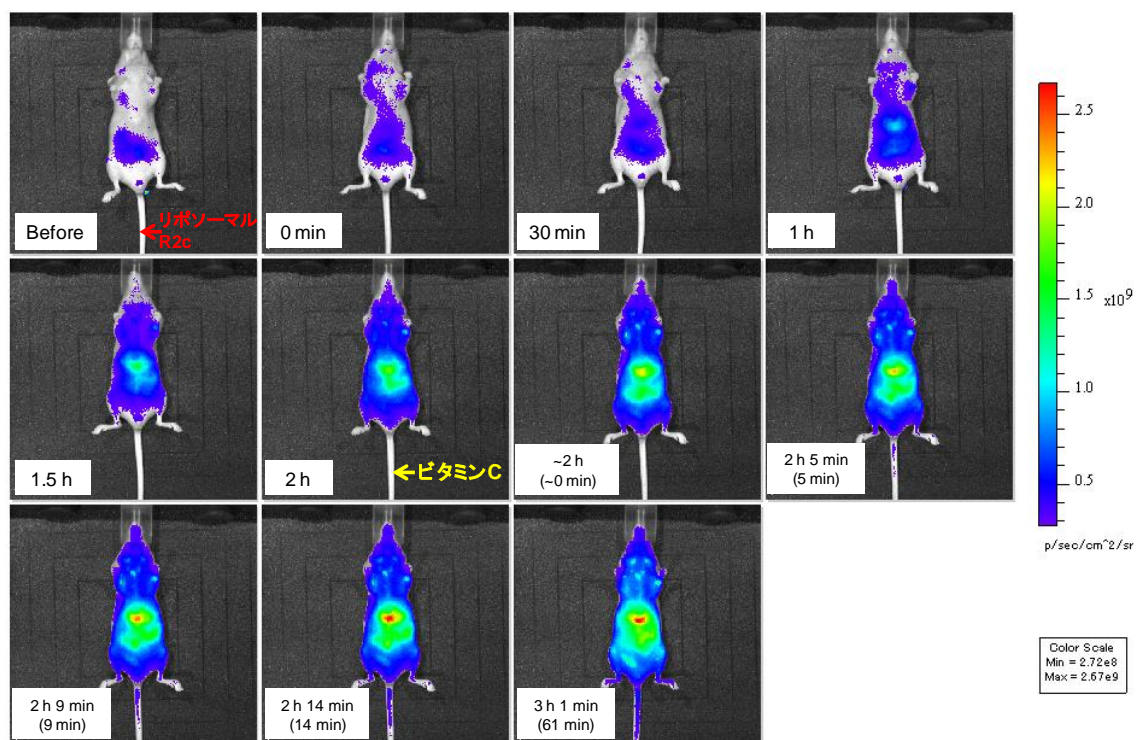
付録 4-10、R2c@(BSA)₂ のマウス中蛍光バイオイメージング (ビタミン C 投与、背面)

4-4-5-4. R2c@(BSA)₂のマウス中蛍光バイオイメージング (ビタミンC 投与なし、背面)



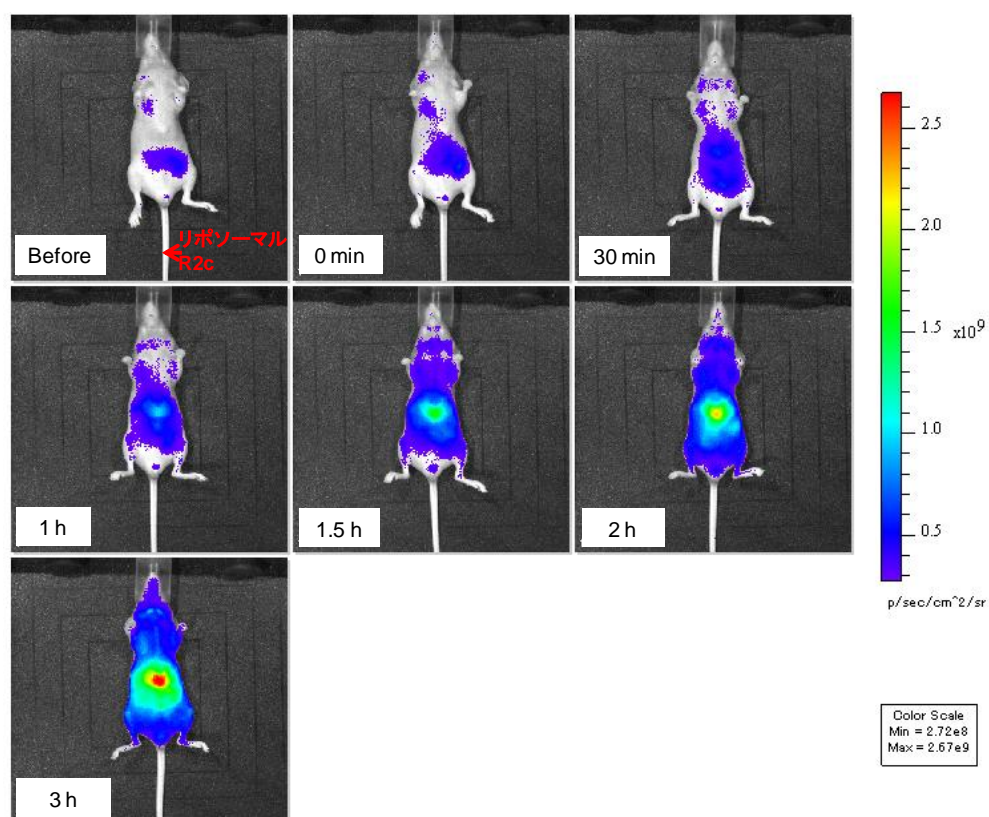
付録 4-11、R2c@(BSA)₂のマウス中蛍光バイオイメージング
(ビタミンC 投与なし、背面)

4-4-5-5. リポソーマル R2c のマウス中蛍光バイオイメージング (ビタミン C 投与)



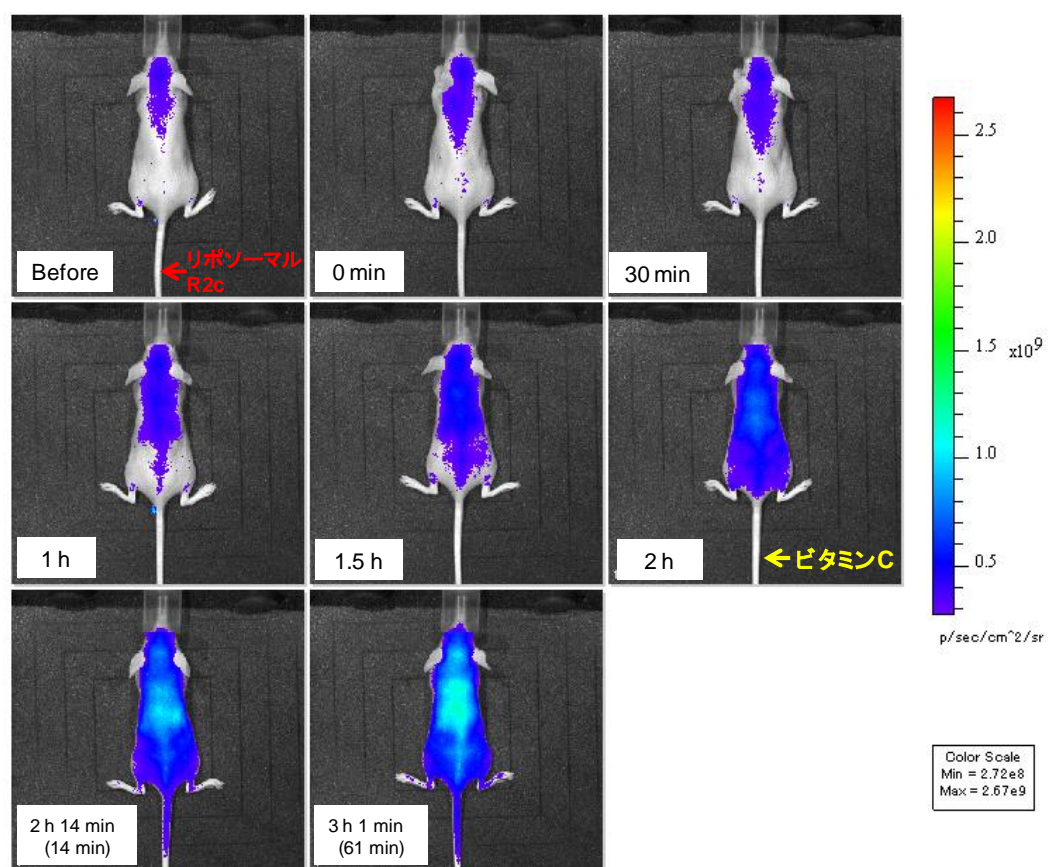
付録 4-12、リポソーマル R2c のマウス中ビタミン C 蛍光バイオイメージング (ビタミン C 投与)

4-4-5-6. リポソーマル R2c のマウス中蛍光バイオイメージング (ビタミン C 投与なし)



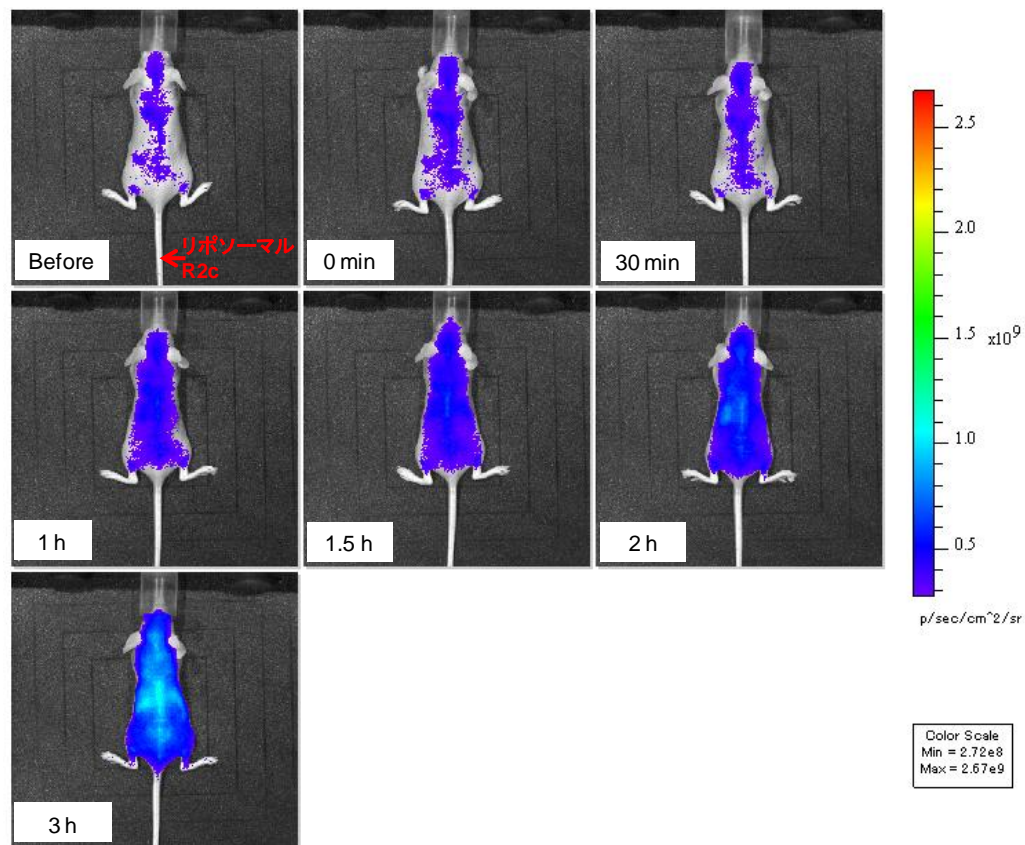
付録 4-13、リポソーマル R2c のマウス中蛍光バイオイメージング (ビタミン C 投与なし)

4-4-2-7. リポソーマルR2cのマウス中蛍光バイオイメージング(ビタミンC投与、背面)



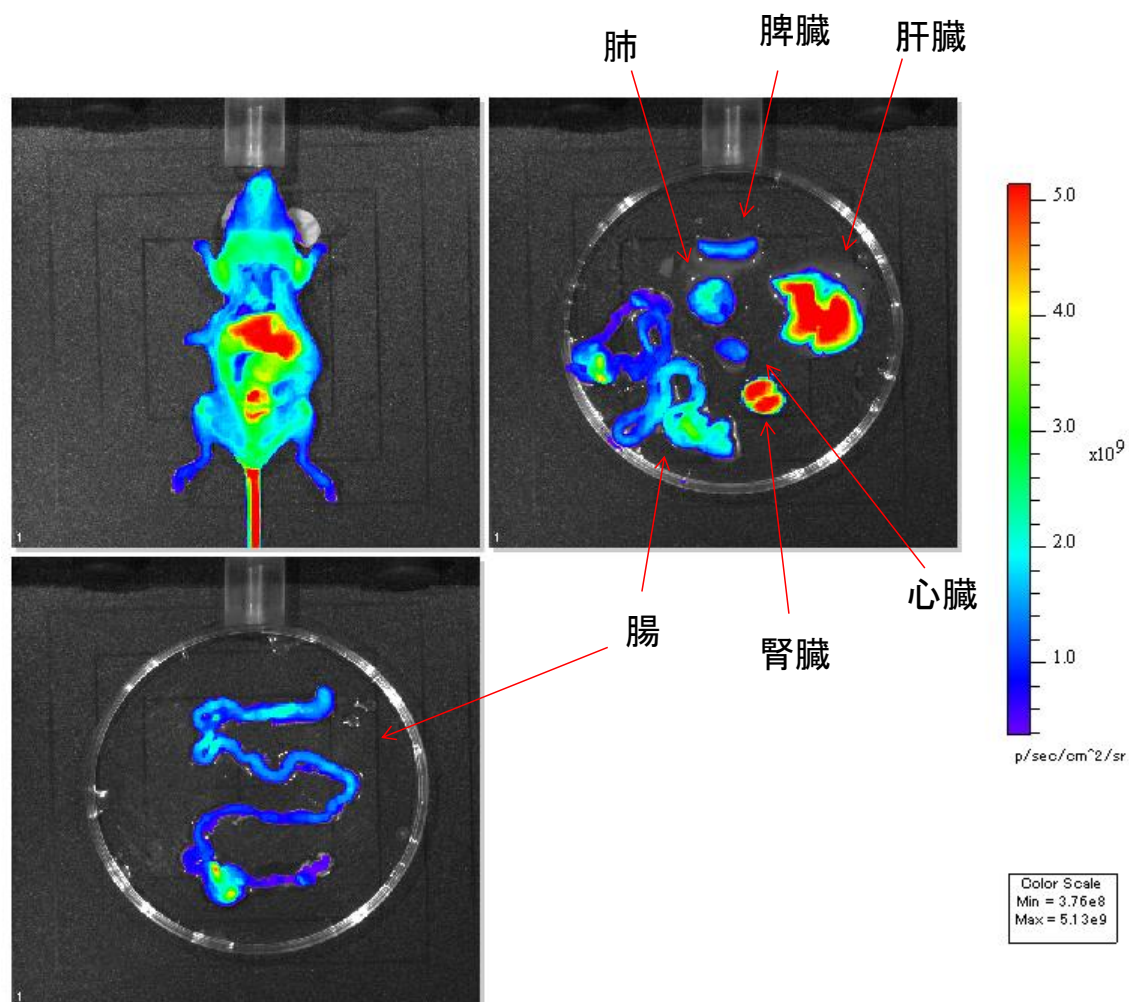
付録 4-14、リポソーマル R2c のマウス中蛍光バイオイメージング
(ビタミンC投与、背面)

4-4-2-8. リポソーマル R2c のマウス中蛍光バイオイメージング (ビタミン C 投与なし、背面)



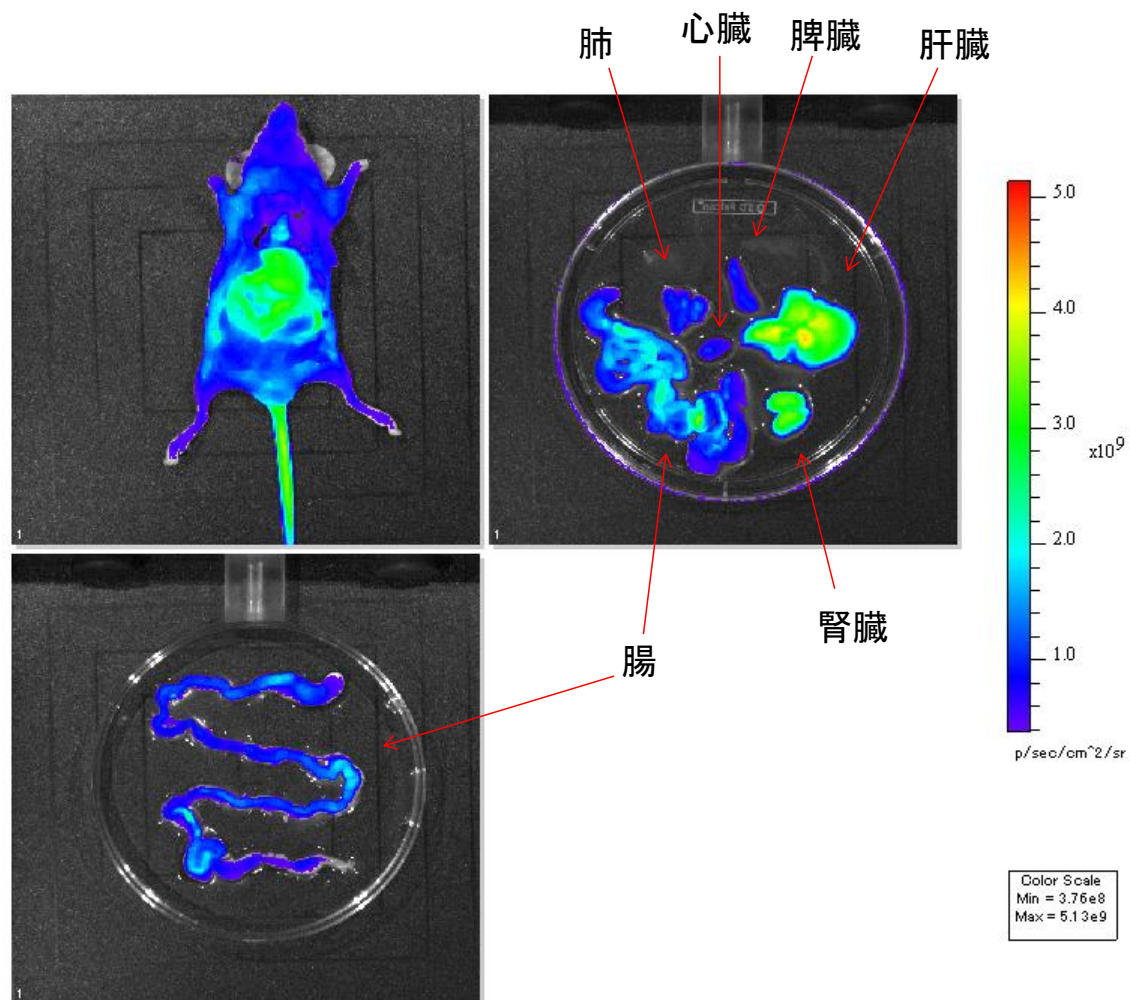
付録 4-15、リポソーマル R2c のマウス中蛍光バイオイメージング (ビタミン C 投与なし、背面)

4-4-2-9. R2c@(BSA)₂を用いた解剖したマウス臓器の蛍光バイオイメージング(ビタミンC投与)



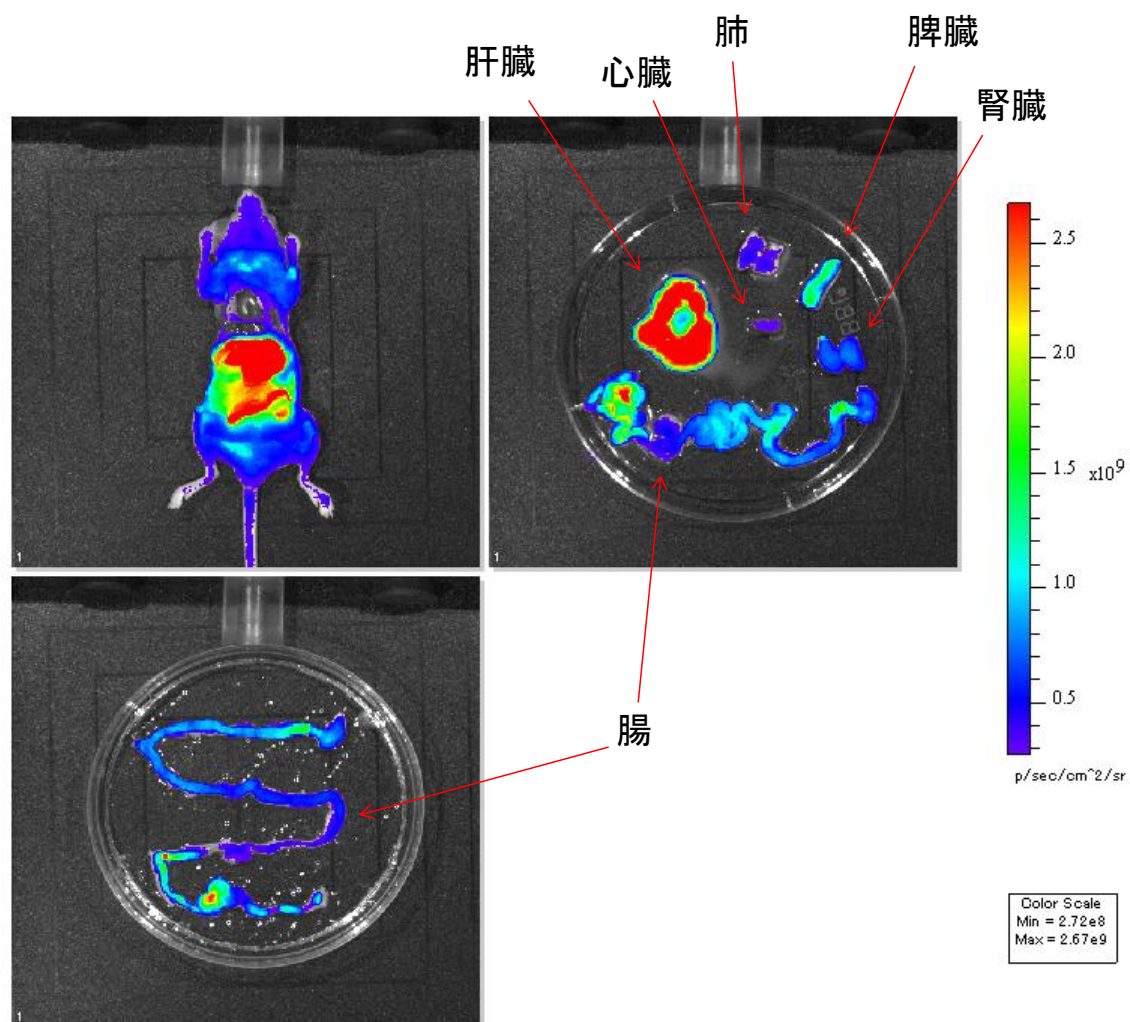
付録 4-16、R2c@(BSA)₂を用いた解剖したマウス臓器の蛍光バイオイメージング
(ビタミンC投与)

4-4-2-10. R2c@(BSA)₂を用いた解剖したマウス臓器の蛍光バイオイメージング（ビタミンC投与なし）



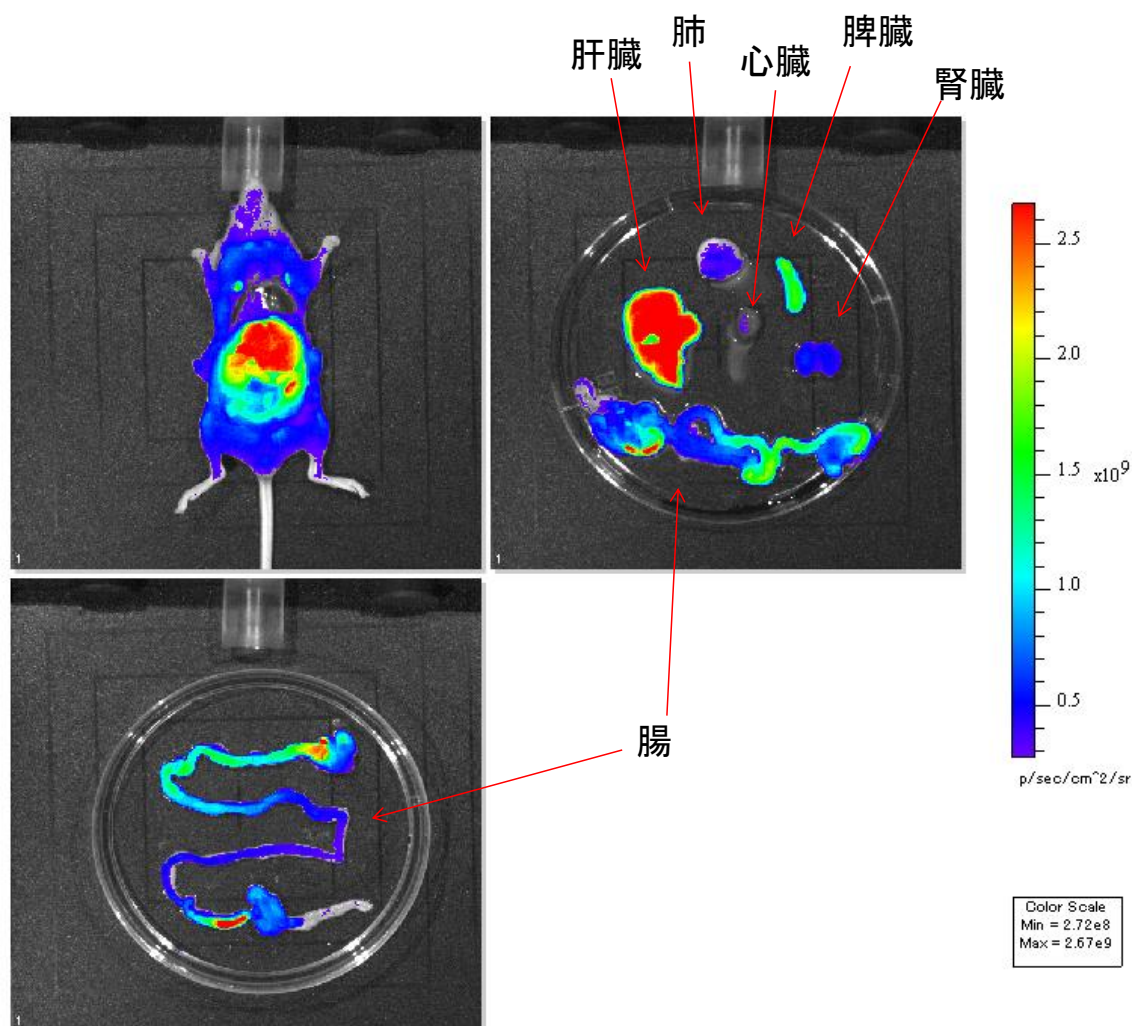
付録 4-17、R2c@(BSA)₂を用いた解剖したマウス臓器の蛍光バイオイメージング（ビタミンC投与なし）

4-4-2-11. リポソーマル R2c を用いた解剖したマウス臓器の蛍光バイオイメージング(ビタミン C 投与)



付録 4-18、リポソーマル R2c を用いた解剖したマウス臓器の蛍光バイオイメージング (ビタミン C 投与)

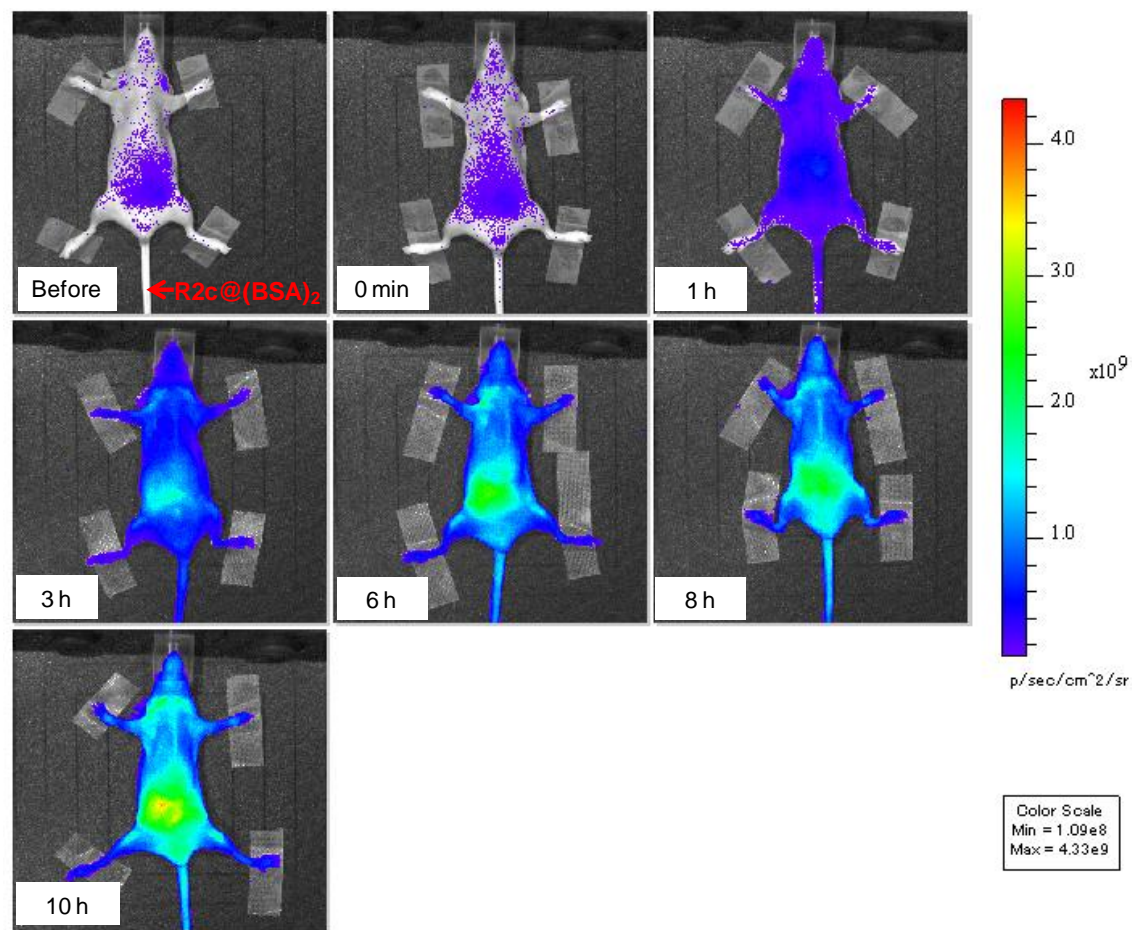
4-4-2-12. リポソーマル R2c を用いた解剖したマウス臓器の蛍光バイオイメージング(ビタミン C 投与なし)



付録 4-19、リポソーマル R2c を用いた解剖したマウス臓器の蛍光バイオイメージング (ビタミン C 投与なし)

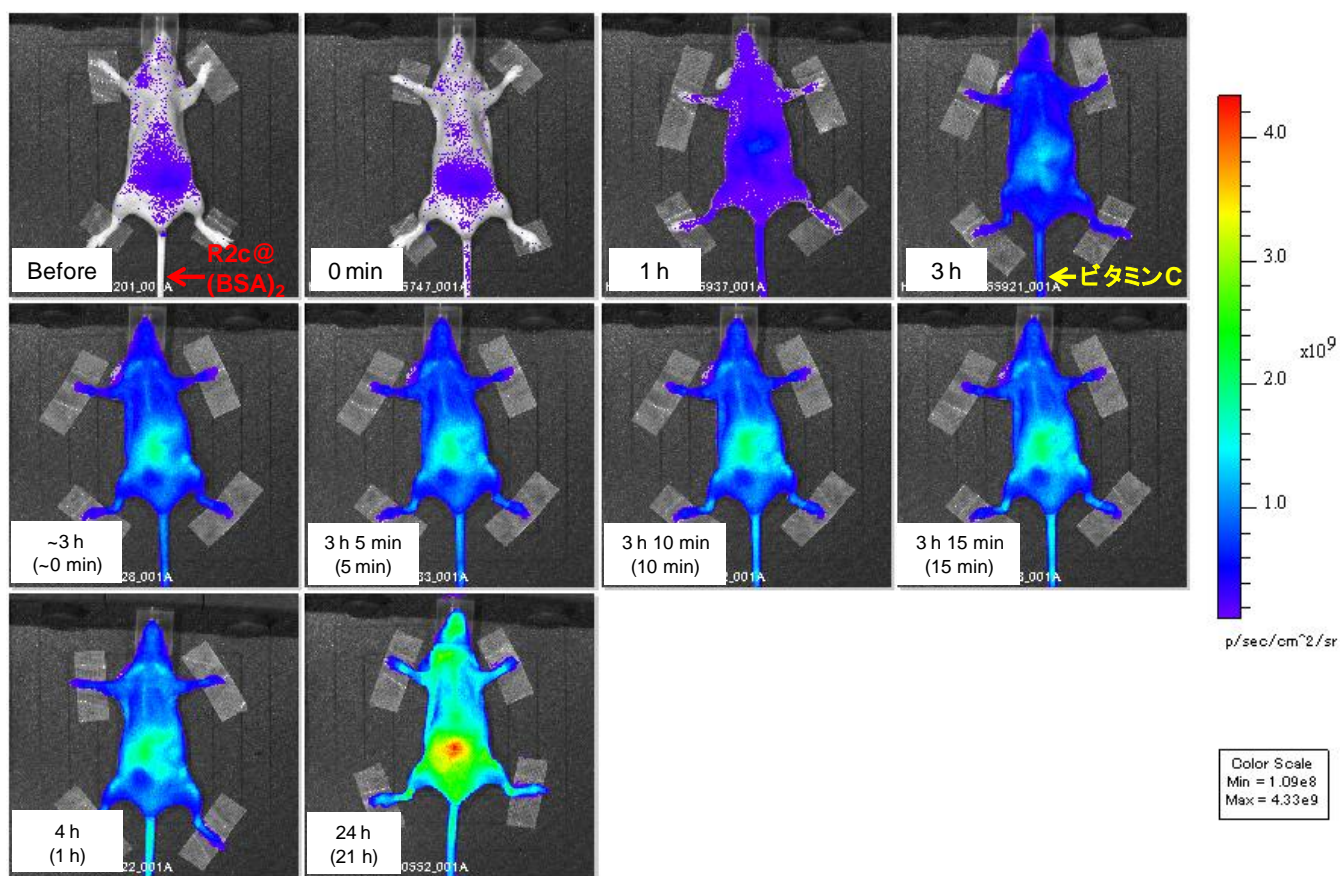
4-4-3. 蛍光プローブの生体内での安定性

4-4-3-1. R2c@(BSA)₂の生体内での安定性



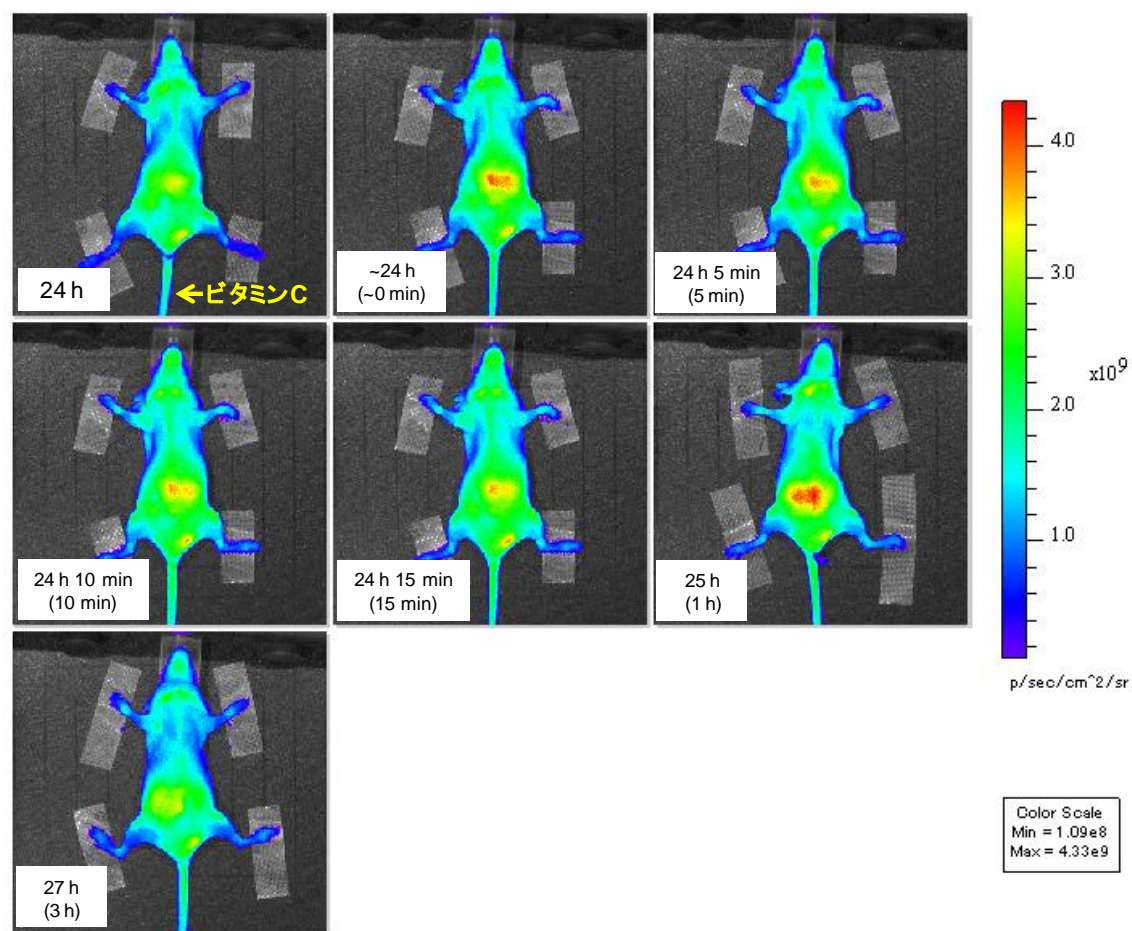
付録 4-20、R2c@(BSA)₂のマウス中蛍光バイオイメージング

4-4-3-2. R2c@(BSA)₂ へビタミン C 投与後の生体内での安定性 (1 日目)



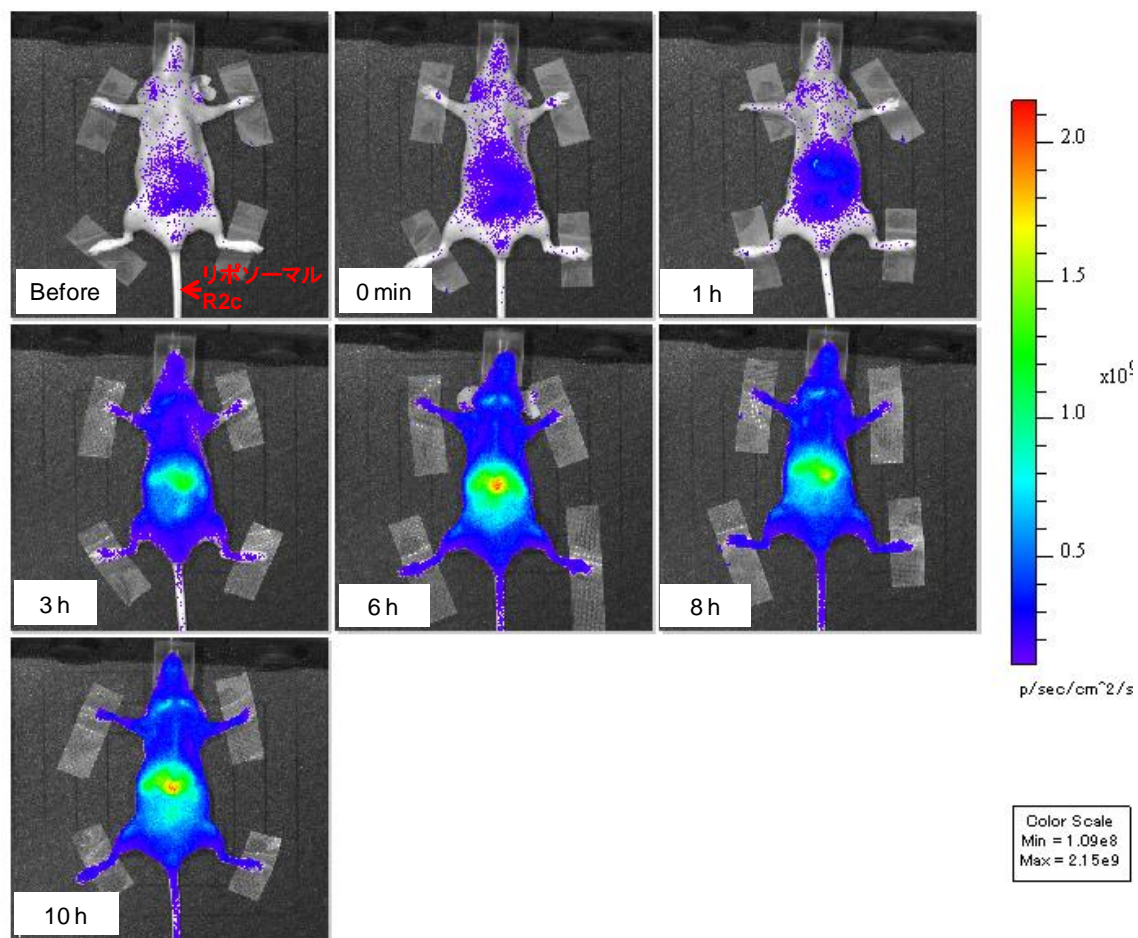
付録 4-21、R2c@(BSA)₂ のマウス中ビタミン C 蛍光バイオイメージング

4-4-3-3. R2c@(BSA)₂ へビタミン C 投与後の生体内での安定性 (2日目)



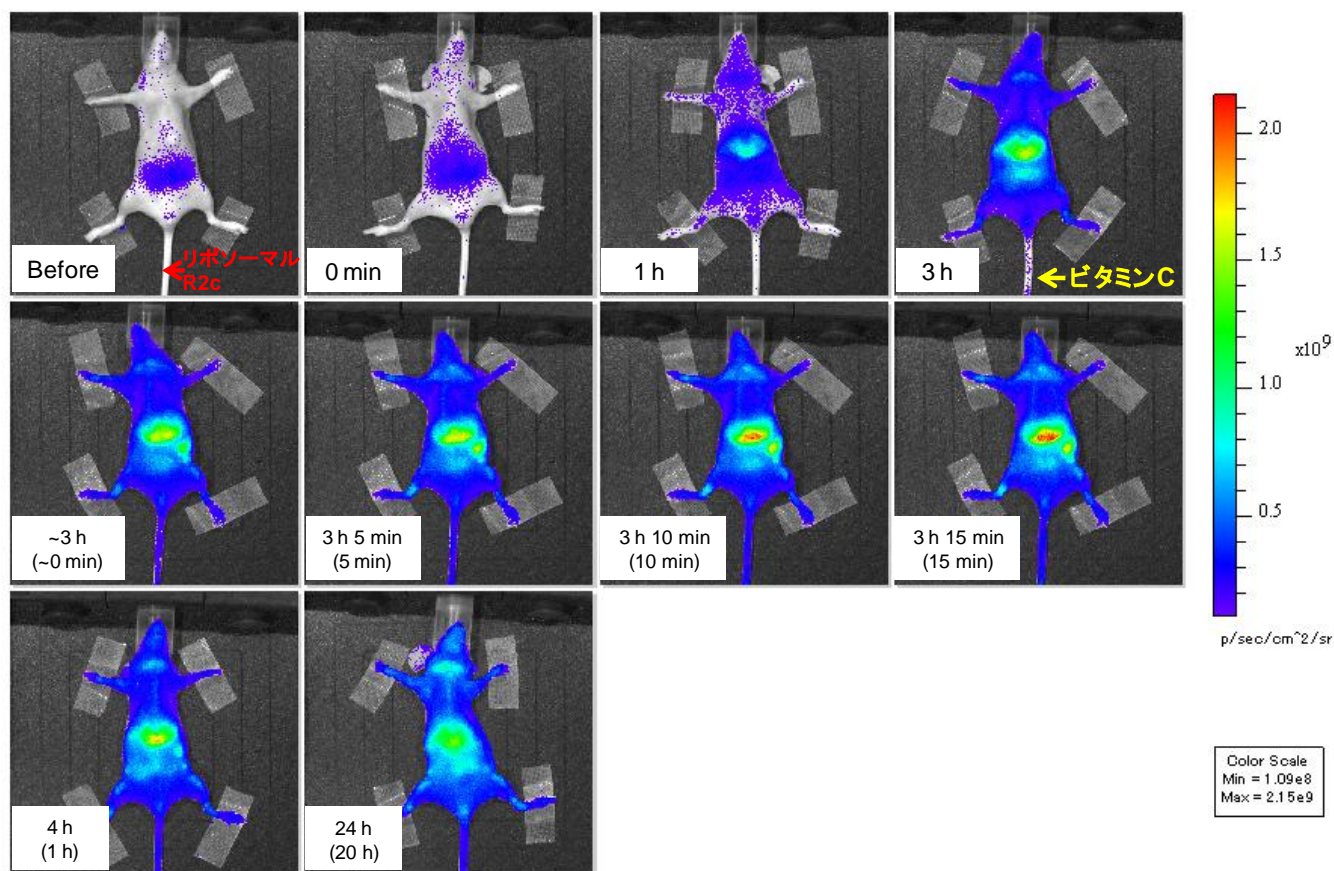
付録 4-22、1 日後のリポソーマル R2c のマウス中ビタミン C 蛍光バイオイメージング

4-4-3-4. リポソーマル R2c の生体内での安定性



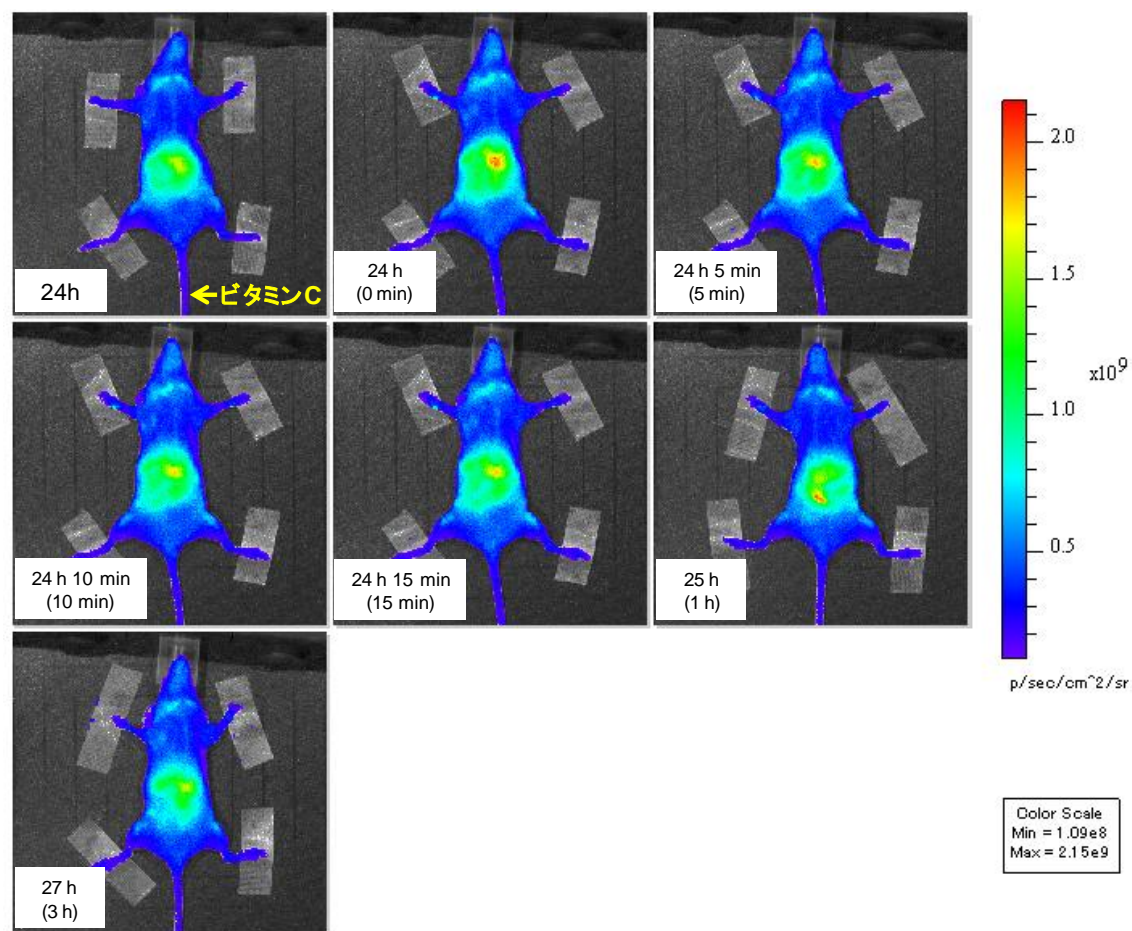
付録 4-23、リポソーマル R2c のマウス中蛍光バイオイメージング

4-4-3-5. リポソーマル R2c へビタミン C 投与後の生体内での安定性 (1 日目)



付録 4-24、1 日後のリポソーマル R2c のマウス中ビタミン C 蛍光バイオイメージング

4-4-3-6. リポソーマル R2c へビタミン C 投与後の生体内での安定性 (2日目)



付録 4-25、1 日後のリポソーマル R2c のマウス中ビタミン C 蛍光バイオイメージング

参考文献

1. Yokoi, T., Otani, T. & Ishii, K. *In vivo* fluorescence bioimaging of ascorbic acid in mice: Development of an efficient probe consisting of phthalocyanine, TEMPO, and albumin. *Scientific Reports*, **8**, 1560 (2018).
2. Yokoi, T. & Ishii, K. Dependence of phthalocyanine-based fluorescence on albumin structure: A fluorescent probe for ascorbic acid. *J. Photochem. Photobiol. A* **364** 1-5 (2018).
3. Uchiyama, T., Ishii, K., Nonomura, T., Kobayashi, N. & Isoda, S. A phthalocyanine dendrimer capable of forming spherical micelles. *Chem. Eur. J.* **9**, 5757-5761 (2003).
4. Andrews, P. Estimation of the molecular weights of proteins by Sephadex gel-filtration. *Biochem. J.* **91**, 222-233 (1964).
5. Li, Y., Yang, G. & Mei, Z. Spectroscopic and dynamic light scattering studies of the interaction between pterodonic acid and bovine serum albumin. *Acta Pharm Sin B* **2(1)**, 53-59 (2012).
6. Nakagawa, T., Monkawa, A., Kamiya, N., Tsunomori, F. & Kagi, H. Development of biosensing system using dynamic light scattering. *Bulletin of TIRI* **6**, 108-109 (2011).
7. Barbosa, L. R., Ortore, M. G., Spinozzi, F., Mariani, P., Bernstorff, S. & Itri, R. The importance of protein-protein interactions on the pH-induced conformational changes of bovine serum albumin: a small-angle X-ray scattering study. *Biophys J.* **98(1)**, 147-157 (2010).
8. Yeh, Y. Q., Liao, K. F., Shih, O., Shiu, Y. J., Wu, W. R., Su, C. J., Lin, P. C. & Jeng, U. S. Probing the acid-induced packing structure changes of the molten globule domains of a protein near equilibrium unfolding. *J. Phys. Chem. Lett.*, **8(2)**, 470-477 (2017).
9. El Kadi, N. *et al.* Unfolding and refolding of bovine serum albumin at acid pH: ultrasound and structural studies. *Biophys J.* **91(9)**, 3397-3404 (2006).
10. Imamura, K., Ohyama, K., Yokoyama, T., Maruyama, Y. & Kazuhiro, N. Temperature scanning FTIR analysis of secondary structures of proteins embedded in amorphous sugar matrix. *J Pharm Sci.* **98(9)**, 3088-3098 (2009).
11. Zhang, H., Zhu, Z., Wang, Y., Fei, Z. & Cao, J. Changing the activities and structures of bovine serum albumin bound to graphene oxide. *Appl. Surf. Sci.* **427**, 1019-1029 (2018).
12. Murayama, K. & Tomida, M. Heat-induced secondary structure and conformation change of bovine serum albumin investigated by Fourier transform infrared spectroscopy. *Biochemistry.* **43(36)**, 11526-11532 (2004).
13. Baker, E. N. & Hubbard, R. E. Hydrogen bonding in globular proteins. *Prog Biophys Mol Biol.* **44(2)**, 97-179 (1984).
14. Ishii, K., Kubo, K., Sakurada, T., Komori, K. & Sakai, Y. Pthalocyanine-based fluorescence probes for detecting ascorbic acid: phthalocyaninatosilicon covalently linked to TEMPO

- radicals. *Chem. Commun.* **47**, 4932-4934 (2011).
15. Cabelli, D. E. & Bielski, B. H. J. Kinetics and mechanism for the oxidation of ascorbic acid/ascorbate by HO₂/O₂⁻ (hydroperoxyl/superoxide) radicals. A pulse radiolysis and stopped-flow photolysis study. *J. Phys. Chem.* **87(10)**, 1809-1812 (1983).
 16. Warren, J. J. & Mayer, J. M. Tuning of the thermochemical and kinetic properties of ascorbate by its local environment: solution chemistry and biochemical implications. *J Am Chem Soc.* **132(22)**, 7784-7793 (2010).
 17. Levi V. & González Flecha F. L. Reversible fast-dimerization of bovine serum albumin detected by fluorescence resonance energy transfer. *Biochim Biophys Acta.* **1599(1-2)**, 141-148 (2002).
 18. 五十嵐脩、江指隆年 編、ビタミン・ミネラルの科学、朝倉書店 (2011).
 19. 石神昭人、ビタミンCの事典、東京堂出版 (2011).
 20. Bright, G. R., Fisher, G. W., Rogowska, J. & Taylor, D. L. Fluorescence ratio imaging microscopy: temporal and spatial measurements of cytoplasmic pH. *J Cell Biol.* **104(4)**, 1019-1033 (1987).
 21. Bright, G. R., Fisher, G. W., Rogowska, J. & Taylor, D. L. Fluorescence ratio imaging microscopy. *Methods Cell Biol.* **30**, 157-192 (1989).
 22. Hornbaek, T., Dynesen, J. & Jakobsen, M. Use of fluorescence ratio imaging microscopy and flow cytometry for estimation of cell vitality for *Bacillus licheniformis*. *FEMS Microbiol Lett.* **215(2)**, 261-265 (2002).
 23. Pereira, P. M., Filipe, S. R., Tomasz, A. & Pinho, M. G. Fluorescence ratio imaging microscopy shows decreased access of vancomycin to cell wall synthetic sites in vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother.* **51(10)**, 3627-3633 (2007).
 24. O'Connor, N. & Silver, R. B. Ratio imaging: practical considerations for measuring intracellular Ca²⁺ and pH in living cells. *Methods Cell Biol.* **114**, 387-406 (2013).
 25. Chen, Q. *et al.* Pharmacologic concentrations selectively generates ascorbate radical and hydrogen peroxide in extracellular fluid *in vivo*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **104**, 8749-8754 (2007).
 26. Chen, Q. *et al.* Pharmacologic doses of ascorbate act as a prooxidant and decrease growth of aggressive tumor xenografts in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **105**, 11105-11109 (2008).
 27. Baguley, B. C., Ding, Q. & Richardson, E. Preliminary evidence that high-dose vitamin C has a vascular disrupting action in mice. *Front Oncol.* **4**, 310 (2014).
 28. Duconge, J. *et al.* Pharmacokinetics of vitamin C: insights into the oral and intravenous administration of ascorbate. *P R Health Sci J.* **27(1)**, 7-19 (2008).
 29. Stephenson, C. M., Levin, R. D., Spector, T. & Lis, C. G. Phase I clinical trial to evaluate

- the safety, tolerability, and pharmacokinetics of high-dose intravenous ascorbic acid in patients with advanced cancer. *Cancer Chemother Pharmacol.* **72(1)**, 139-146 (2013).
30. Mitsunaga, M., Ogawa, M., Kosaka, N., Rosenblum, L. T., Choyke, P. L. & Kobayashi, H. Cancer cell-selective *in vivo* near infrared photoimmunotherapy targeting specific membrane molecules. *Nat Med.* **17**, 1685-1691 (2011).
 31. Ishii, K. *et al.* *In vitro* photodynamic effects of phthalocyaninatosilicon covalently linked to 2,2,6,6-tetramethyl-1-piperidinyloxy radicals on cancer cells. *Free radical Biol. Med.* **38**, 920-927 (2005).

第 5 章

フタロシアニン誘導体と BSA の 複合化の解析

第5章 フタロシアニン誘導体と BSA の複合化の解析

5-1. 緒言

R2c の BSA ダイマーによる取り込みが R2c 特有であるかについて調べるため、軸配位子を持たない一般的なフタロシアニンである亜鉛フタロシアニン(ZnPc)についても、BSA との複合化、及びその解析を行った¹。

5-2. 結果と考察

5-2-1. ZnPc と BSA の複合体合成

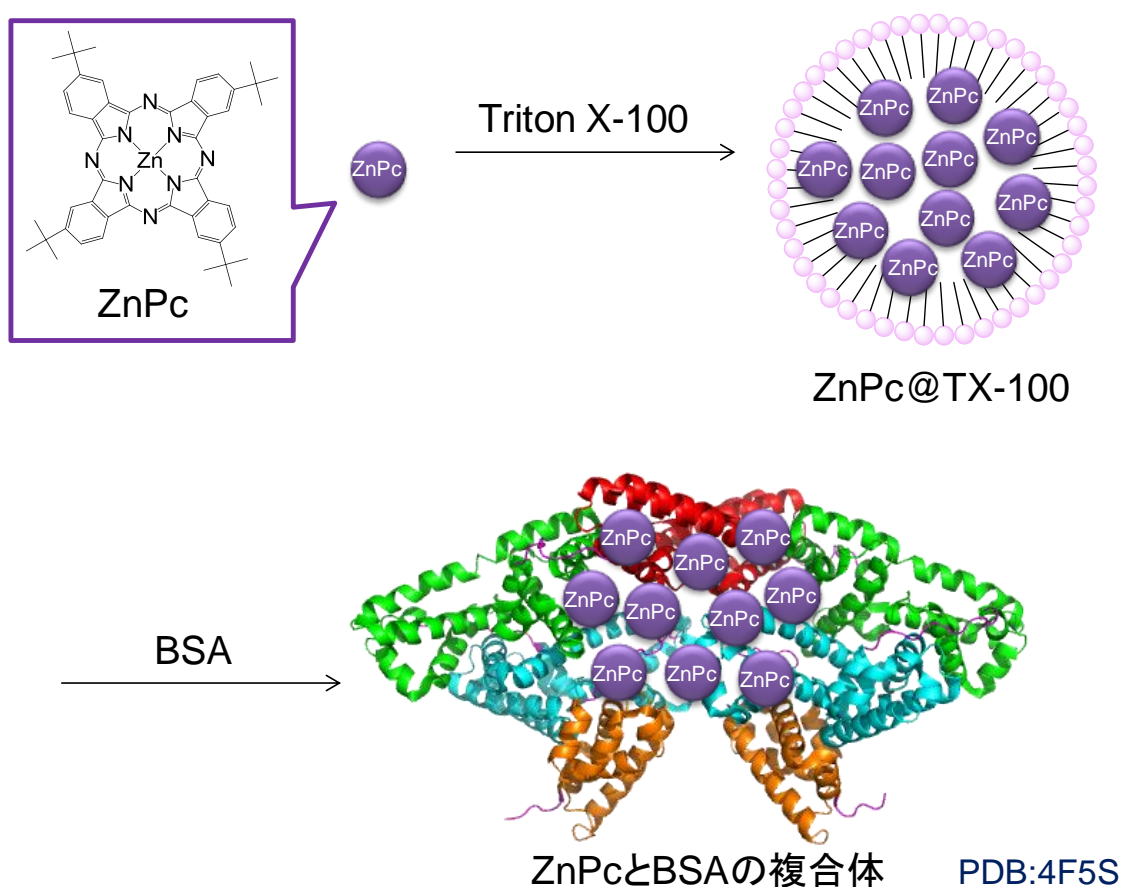


図 5-1、ZnPc と BSA の複合化

ZnPc を R2c と同様の方法で BSA との複合体を合成した。ZnPc は疎水性分子のため、水溶液に溶かすことはできない。そこで、界面活性剤 Triton X-100 を含む水溶液とガラスビーズを加えて超音波処理を行うことで ZnPc を溶解させた (ZnPc@TX-100)。その溶液へ BSA を加えて室温で 3 時間攪拌した。攪拌後、10,000 MWCO フィルターを用いた限外濾過を行い精製した。精製した溶液をメンブレンフィルターでろ過し、ZnPc と BSA の複合体を含む青色溶液を得た。

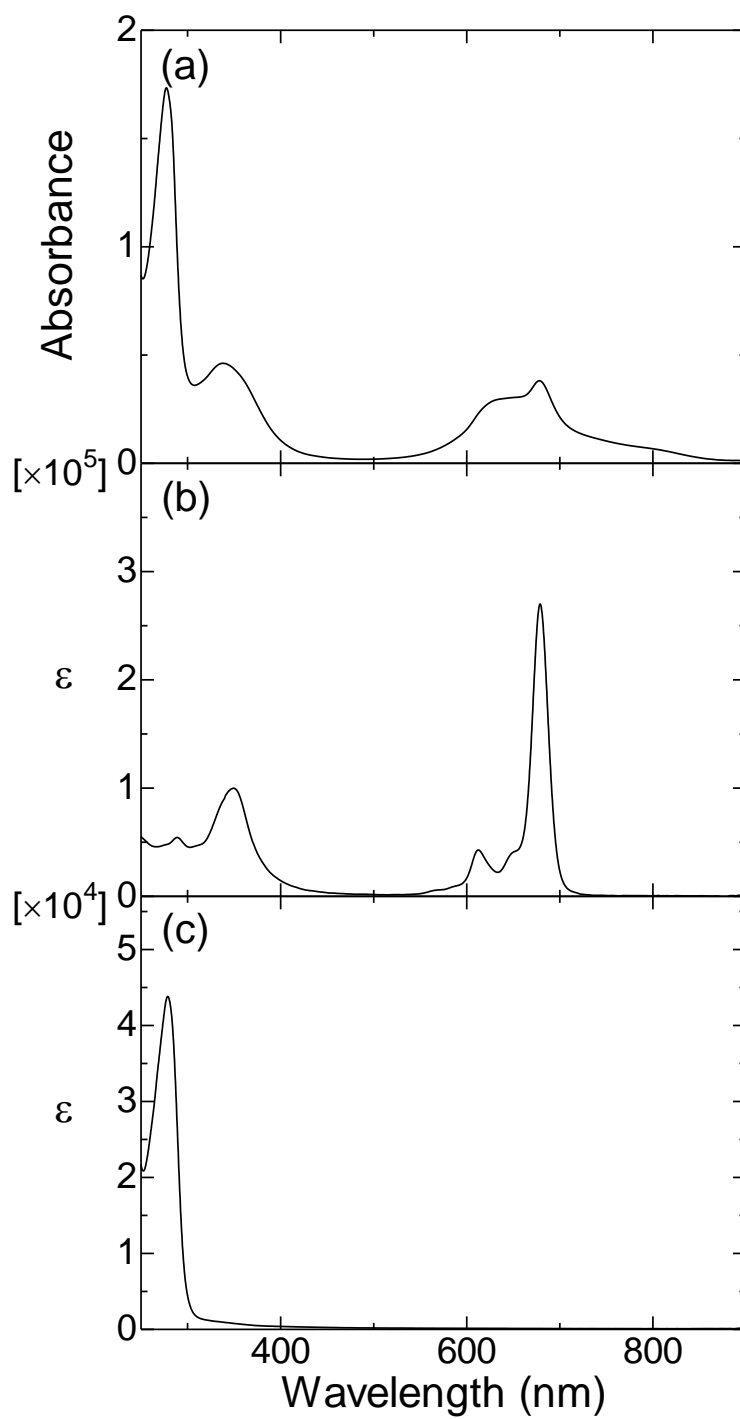


図 5-2、ZnPc と BSA の複合体 (a) の電子吸収スペクトルと ZnPc (b) と BSA (c) の吸光係数

合成した ZnPc と BSA の複合体の電子吸収スペクトルを測定した。その結果、ZnPc 由来の 680 nm 付近の吸収帯がブロードになっている様子が観測された。これは ZnPc が会合体を形成していることを反映している。本研究では、このような状態でも ZnPc が BSA と複合化しているか確認するため、Sephadex G-100 を用いたサイズ排除クロマトグラフィーを行った。

5-2-2. 複合体のサイズ排除クロマトグラフィー

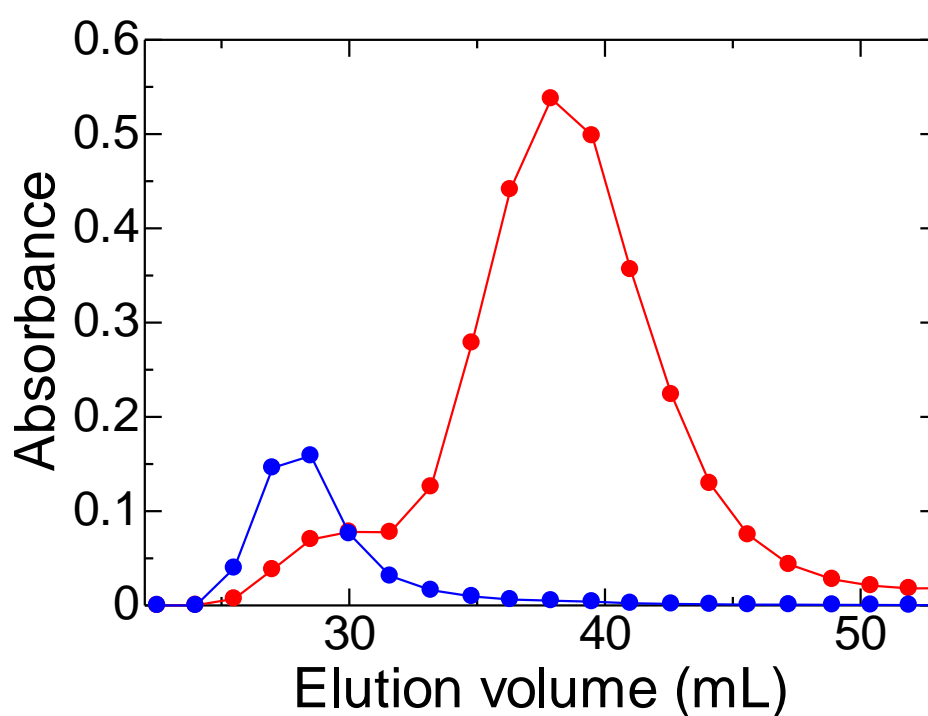


図 5-3、ZnPc と BSA の複合体のサイズ排除クロマトグラフ (赤:~ 280 nm、青:~ 680 nm)

複合化を確認するために、複数回 Sephadex G-100 を用いたサイズ排除クロマトグラフィーを行った。その中でも典型的なサイズ排除クロマトグラフを示す (図 5-3)。BSA 由来の吸収帯である約 280 nm で観測すると、溶出量 30 mL にピークを持つ第 1 フラクションと、38 mL にピークを持つ第 2 フラクションが観測された。この二つのピークは BSA のみでサイズ排除クロマトグラフィーを行った結果と相関があり (図 4-4a)、それぞれ BSA ダイマー、BSA モノマーに帰属される。BSA モノマーと BSA ダイマーの溶出量の比は既報の値と一致し、1.3 を示した^{2,3}。

一方、ZnPc に由来する約 680 nm の吸収帯を観測した場合、BSA ダイマーに対応する領域でのみピークが観測された。これより、ZnPc は BSA ダイマーと複合化していることが明らかとなった。

続いて、サイズ排除クロマトグラフィーにて溶出した BSA ダイマーを含む領域の電子吸収スペクトルの解析を行った (図 5-4b)。この時、ZnPc に由来する 680 nm 付近の吸収に注目するとブロードな吸収が観測された。この結果は、サイズ排除クロマトグラフィーを行う前の複合体の電子吸収スペクトルと一致しており、ZnPc が BSA 中で会合体を形成していることを反映する ((ZnPc)_n@(BSA)₂)。

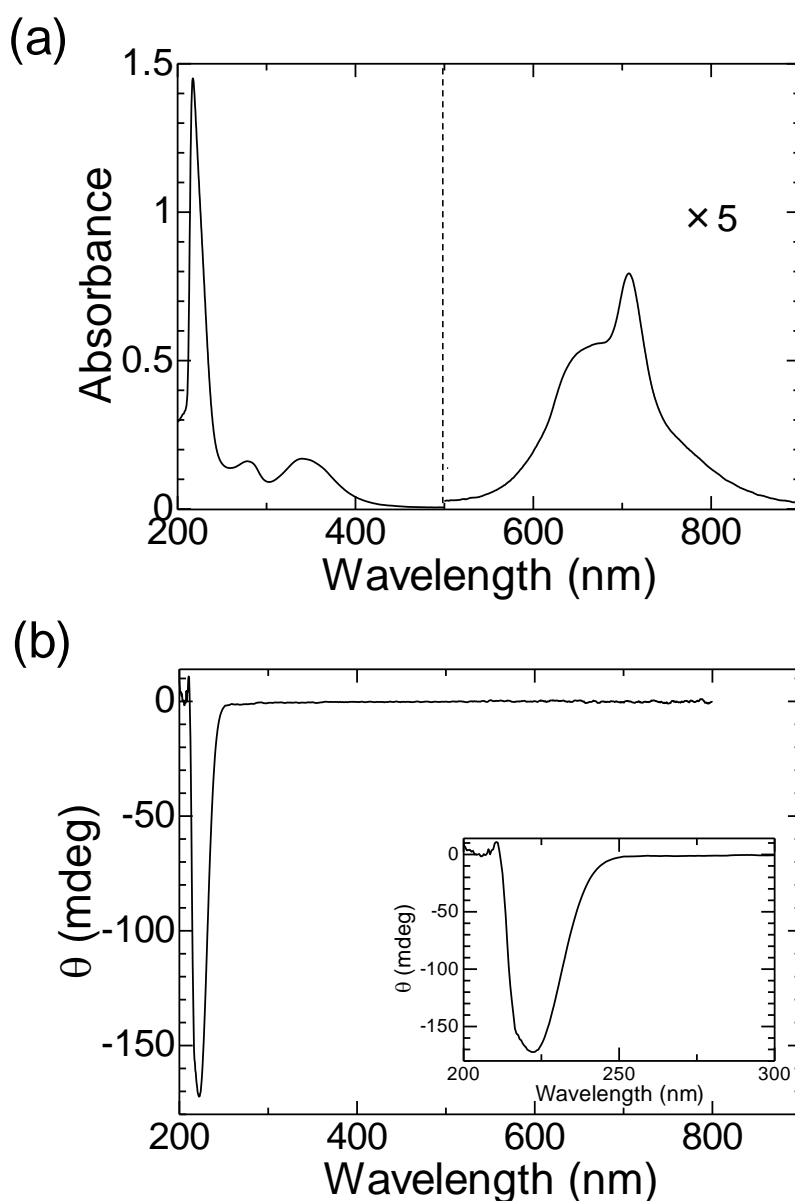


図 5-4、(ZnPc)_n@(BSA)₂ の電子吸収スペクトル (a)、CD スペクトル (b)

BSA と TX-100 は共に 280 nm 付近に吸収を持つ。このため、吸収スペクトルのみで BSA と TX-100 を区別するのは困難である。より直接的な根拠を得るために CD 信号の確認を行った (図 5-4b)。TX-100 にはキラルが存在しないため CD 信号が観測されないが、BSA からは 220 nm 付近に CD 信号を観測することが出来る。そこで、Sephadex G-100 を用いた $(\text{ZnPc})_n @ (\text{BSA})_2$ の溶出液の CD スペクトルを測定した。BSA モノマーと BSA ダイマーを含むフラクションに対し、それぞれ測定を行ったところ、どちらのフラクションでも、222 nm にピークを持つ BSA 特有の CD 信号が観測された。これより、溶出された二つのフラクションに BSA が含まれていることが確認された。これは、 $(\text{ZnPc})_n @ (\text{BSA})_2$ が形成していることを支持する。

また、 $(\text{ZnPc})_n @ (\text{BSA})_2$ で観測された ZnPc 会合体由来のブロードな吸収は、ZnPc が BSA と複合化する前の $\text{ZnPc} @ \text{TX-100}$ でも観測された (図 5-5)。これは、ZnPc が TX-100 中で会合体を形成し、その会合体が BSA に取り込まれることで $(\text{ZnPc})_n @ (\text{BSA})_2$ を形成することを示唆している。

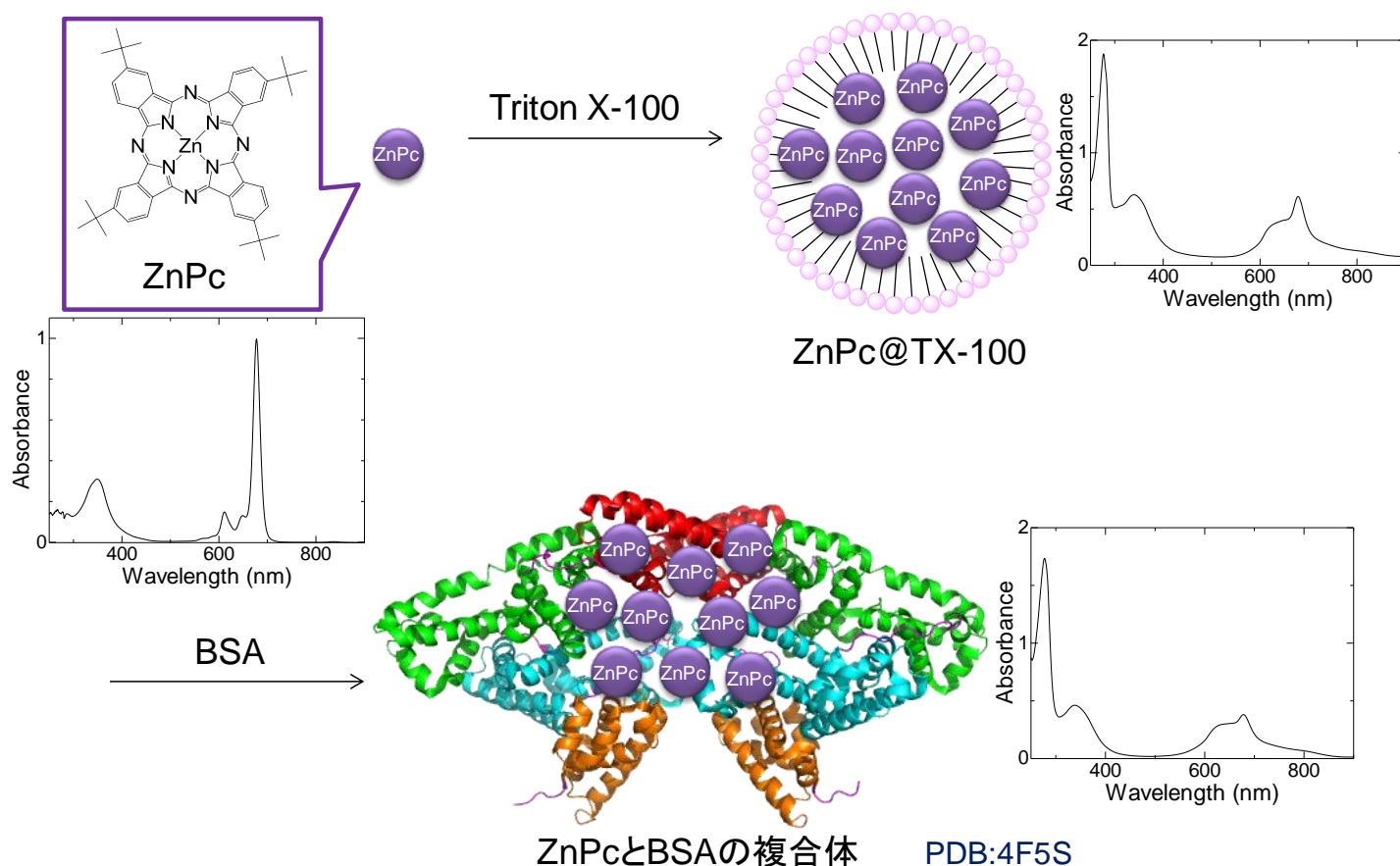


図 5-5、ZnPc と BSA 複合体の合成スキームと電子吸収スペクトル

本実験により、BSA との複合化が R2c 特有のものではないことが明らかとなった。また、R2c は ZnPc とは異なり、BSA 中でシャープな吸収を示している。これは、R2c が嵩高い軸配位子の TEMPO ラジカルを持つことで、BSA 中での会合体形成が抑えられたことに起因する。これより、嵩高い軸配位子を持つ様な分子設計が、BSA と複合化させた蛍光プローブに有用であることが明らかとなった。

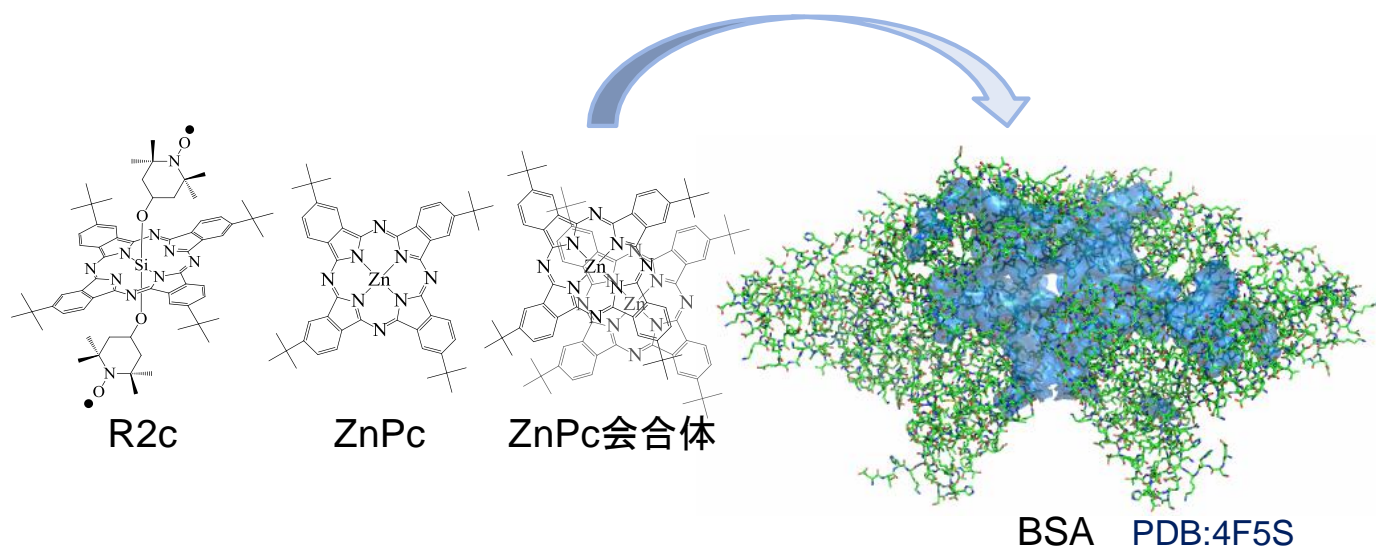


図 5-6、フタロシアニン誘導体と BSA の複合化

5-2-3. (ZnPc)_n@(BSA)₂ の光物性

本研究で、電子吸収スペクトルと蛍光スペクトルを基に (ZnPc)_n@(BSA)₂ の光物性について評価した。図 5-7 では、電子吸収スペクトルと蛍光スペクトルの Q 帯付近が示されている。トルエン中 ZnPc の電子吸収スペクトルでは 678 nm 付近にシャープな Q 吸収帯が観測される。このシャープな吸収帯は典型的な ZnPc モノマーの吸収を示すもので、a_{1u}e_g 電子配置によるものである(a_{1u} と e_g はそれぞれ HOMO (π) degenerate LUMOs (π*) に対応する)。この ZnPc モノマーは 684 nm にピークを持つ強い蛍光を示す。このストークスシフトが 150 cm⁻¹ と小さいのは基底状態から(π, π*)励起状態への遷移に際し、構造的な変化が小さいことを示す。一方、(ZnPc)_n@(BSA)₂ は 676 nm の Q 吸収帯に加えて、H 会合体形成によるブルーシフトしたブロードな Q 吸収帯が 640 nm 付近で観測される。これは、Face to face 型の会合体における高励起状態への遷移は、電気双極子許容であるため選択的に観測されるが、低励起状態への遷移は電気双極子禁制であることに起因する。

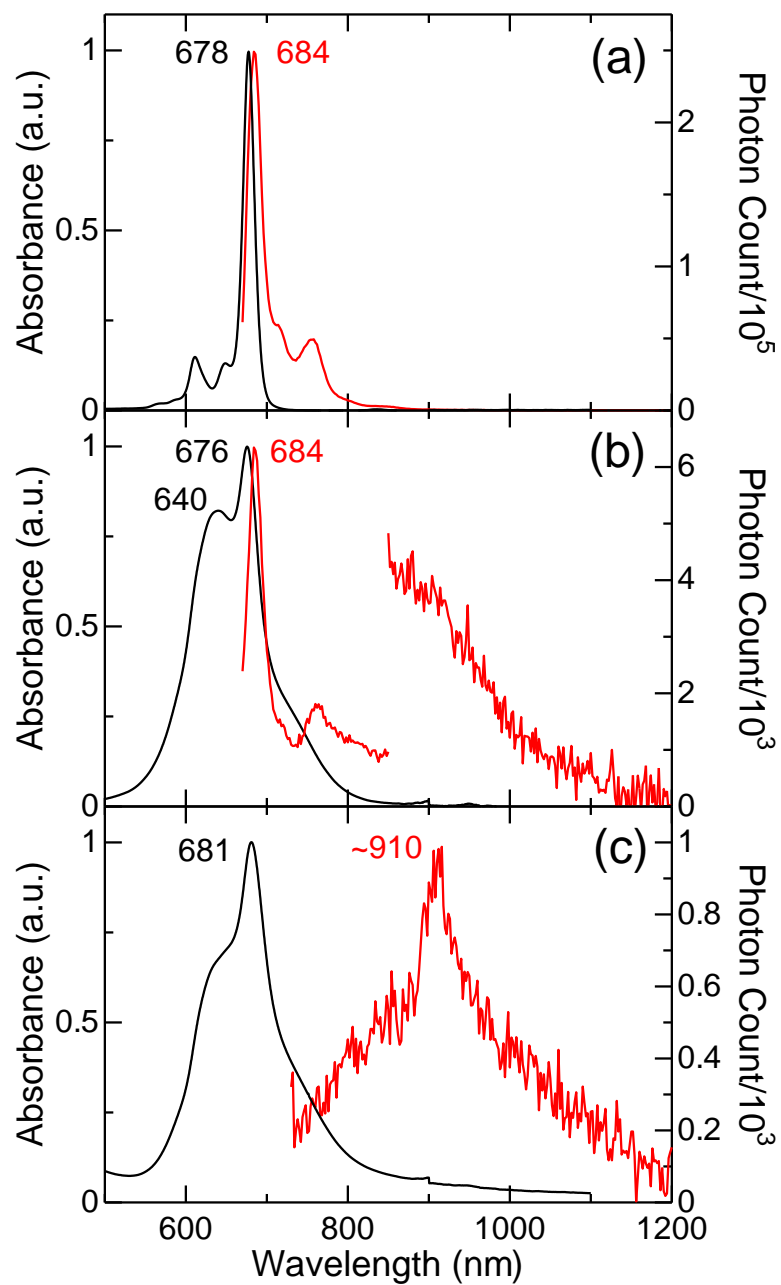


図 5-7、電子吸収スペクトル（黒）と蛍光スペクトル（赤）（トルエン中 ZnPc; a、 $(\text{ZnPc})_n@(\text{BSA})_2$; b、 $(\text{ZnPc-PPH}_3)_n@(\text{BSA})_2$; c)

(ZnPc)_n@(BSA)₂の蛍光スペクトルでは、わずかに存在する ZnPc モノマーによる弱い蛍光に加え、900 nm 付近にもブロードなバンドが観測された。そこで、本研究ではアキシャル位のリガンドとして知られるトリフェニルホスフィン (triphenylphosphine; PPh₃) 添加し、ZnPc の会合を抑制して光物性を評価した。PPh₃ 添加時の電子吸収スペクトルにおいて相対的にシャープな 681 nm の Q 吸収帯の強度はさらに大きくなり、H 会合帯形成による 640 nm 付近のブロードな吸収帯の強度は小さくなった。これは BSA ダイマー中で ZnPc に PPh₃ が配位して会合度を低下させていることを示す。(ZnPc-PPh₃)_n@(BSA)₂は 910 nm 付近でブロードではあるが、明確な蛍光帯が観測されている。これは(ZnPc)_n@(BSA)₂で観測されたブロードなバンドに類似している。

ZnPc モノマーの(π , π^*)励起状態はシャープな蛍光帯と小さなストークスシフトを示すため、このブロードな蛍光帯は ZnPc-PPh₃ モノマーから生じているものではない。このため、910 nm 付近のブロードな蛍光帯は ZnPc の H 会合帯の低励起状態から生じたものであると説明できる。ZnPc のアキシャル位に PPh₃ を配位させることで双極子モーメントが少しずれて、Face to face 型の会合ではなく、Gable 型に近い会合が形成されたことが示唆される。これにより、低励起状態への遷移が電気双極子許容となり、H 会合帯由来のブロードな蛍光が 910 nm 付近で生じたと考えられる。

本研究により、ZnPc の H 会合帯由来の蛍光が、我々が知る限り初めて観測された。これより、ZnPc の H 会合帯は BSA ダイマー中で蛍光を示すことが明らかとなった。また、ブルーシフトした 640 nm の Q 吸収帯と 910 nm 付近のブロードな蛍光帯から、励起子分裂を約 4600 cm⁻¹と見積もった。

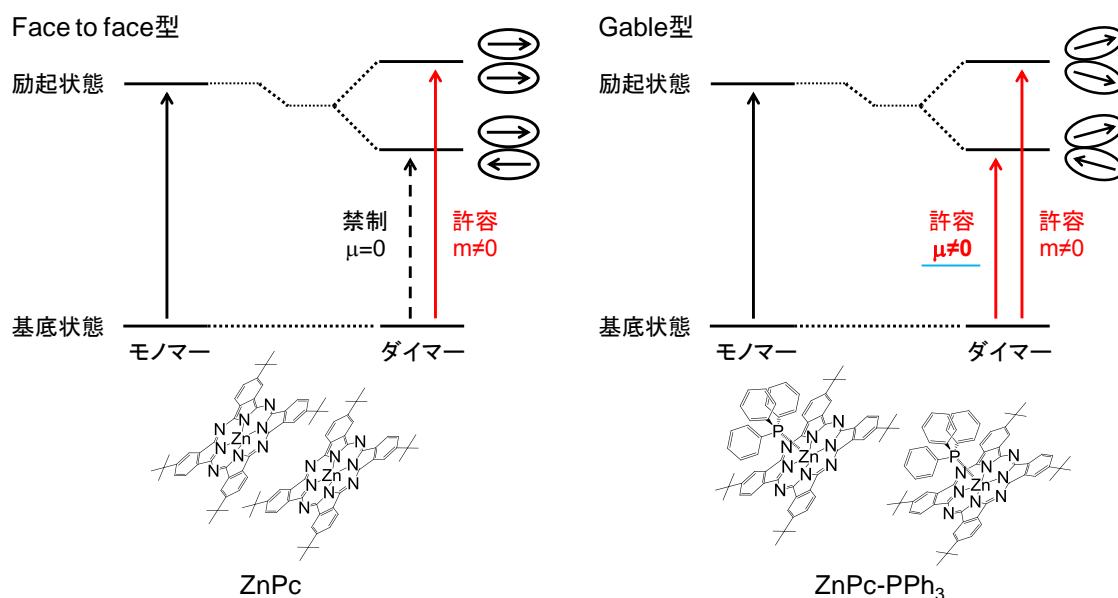


図 5-8、ZnPc と ZnPc-PPh₃ に基づく励起子相互作用

また、トルエン中 ZnPc、 $(\text{ZnPc})_n@(\text{BSA})_2$ 、 $(\text{ZnPc-PPh}_3)_n@(\text{BSA})_2$ の近赤外発光についても評価した。ここでは、一重項酸素発生を観測することを目的としていたが、本測定では、 $(\text{ZnPc})_n@(\text{BSA})_2$ と $(\text{ZnPc-PPh}_3)_n@(\text{BSA})_2$ の測定からは、ZnPc 由来のりん光が観測された (図 5-8)。トルエン中の ZnPc からは 1275 nm にピークを持ち、バンド幅が 20 nm の一重項酸素由来の発光が観測されている。一方、 $(\text{ZnPc})_n@(\text{BSA})_2$ では 1260 nm 付近にピークを持つ弱い発光が観測されている。検出された発光が弱いため、 $(\text{ZnPc})_n@(\text{BSA})_2$ のスペクトルでは、ZnPc 由来のりん光であるか判別が難しい。そこで、軸配位子となる PPh₃ を添加して、ZnPc の会合を抑制した $(\text{ZnPc-PPh}_3)_n@(\text{BSA})_2$ を形成して発光を測定した。 $(\text{ZnPc-PPh}_3)_n@(\text{BSA})_2$ からは 1258 nm にピークを持ち、バンド幅が 34 nm の ZnPc 由来のりん光より精度良く観測されている。一重項酸素の発光は特異的で、ピーク位置 (1275 nm) とバンド幅 (20 nm) が大きく変化したものは報告例がないため、本測定で観測された 1258 nm にピークを持つ近赤外の発光は ZnPc 由来のりん光と考えられる。

$(\text{ZnPc})_n@(\text{BSA})_2$ は蛍光、りん光、わずかではあるが一重項酸素と思われる発光を観測することができる光活性な複合体であるため、その応用例として光線力学的ガン治療法 (photodynamic therapy; PDT) としての利用が期待できる⁴。特に、ZnPc はガンを破壊する一重項酸素発生能が高く、これまで PDT の候補として盛んに研究されてきた^{5,6}。加えて、本研究で開発した $(\text{ZnPc})_n@(\text{BSA})_2$ を PDT として応用する場合、BSA ダイマーと複合体を形成していることも大きなメリットとなる。BSA ダイマーの様なある程度大きなタンパク質等は EPR 効果 (Enhanced Permeation and Retention Effect) と呼ばれる現象の影響でガン細胞集積性が高まる⁷。この EPR 効果のメカニズムは、正常な細胞の血管の場合では透過しないサイズの粒子が、腫瘍周辺の血管では血管内皮細胞の間に隙間が生じているため、血管壁を通過して組織へ透過できてしまうというものである。さらに、腫瘍組織ではリンパ組織も十分に機能していないため、組織に透過してしまった異物を組織外へ排出する機能が低く、結果的にガン細胞へ集積していく。

上記のように、 $(\text{ZnPc})_n@(\text{BSA})_2$ は一重項酸素を発生し得る光活性な複合体であり、ガン細胞へのドラッグデリバリーシステム (Drug Delivery System; DDS) としての機能も有している PDT の有力な候補として期待できる。

また、BSA ダイマーと複合化するということに焦点を当てれば、光活性でない複合体もガン温熱療法 (photothermal therapy; PTT) としての応用が期待できる⁸。PTT では、正常な細胞なら熱を血管の拡張で逃がすことが出来るのに対し、ガン組織では血管の拡張機能が不十分で熱を逃がせないため、放熱性能の差でガン組織を破壊するという方法である。光活性でない分子でも BSA と複合化が実現出来れば、前述のように EPR 効果によるガン細胞への集積が期待でき、近赤外光等の照射で色素を加熱してガン組織を局部的に破壊できる。このように、BSA ダイマーとの複合化技術は非常に有為なものであると考えられる。

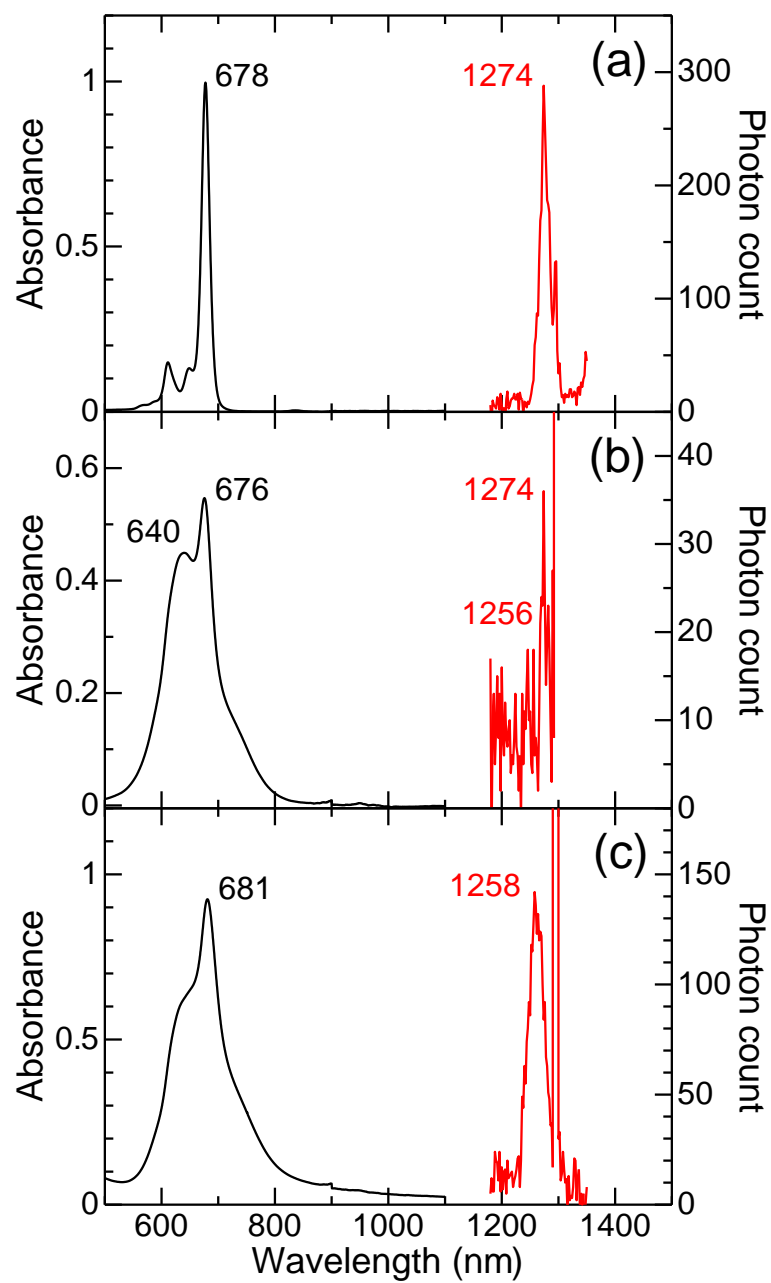


図 5-8、電子吸収スペクトル (黒)、蛍光スペクトル (青)、一重項酸素及びりん光スペクトル (赤) (トルエン中 ZnPc; a、 $(\text{ZnPc})_n@(\text{BSA})_2$; b、 $(\text{ZnPc-PPh}_3)_n@(\text{BSA})_2$; c)

5-2-4. $(\text{ZnPc})_n@(\text{BSA})_2$ と $(\text{ZnPc-PPh}_3)_n@(\text{BSA})_2$ の CD スペクトル

$(\text{ZnPc})_n@(\text{BSA})_2$ と $(\text{ZnPc-PPh}_3)_n@(\text{BSA})_2$ それぞれに対して CD スペクトルの測定を行った (図 5-9)。CD スペクトルを観測したところ、220 nm 付近でシャープな強い信号が検出されている。これは、BSA に対応する CD シグナルを示す。この CD シグナルは $(\text{ZnPc})_n@(\text{BSA})_2$ の方がよりシャープで強い信号を示し、 $(\text{ZnPc-PPh}_3)_n@(\text{BSA})_2$ の方がわずかにブロードな信号を示していた。

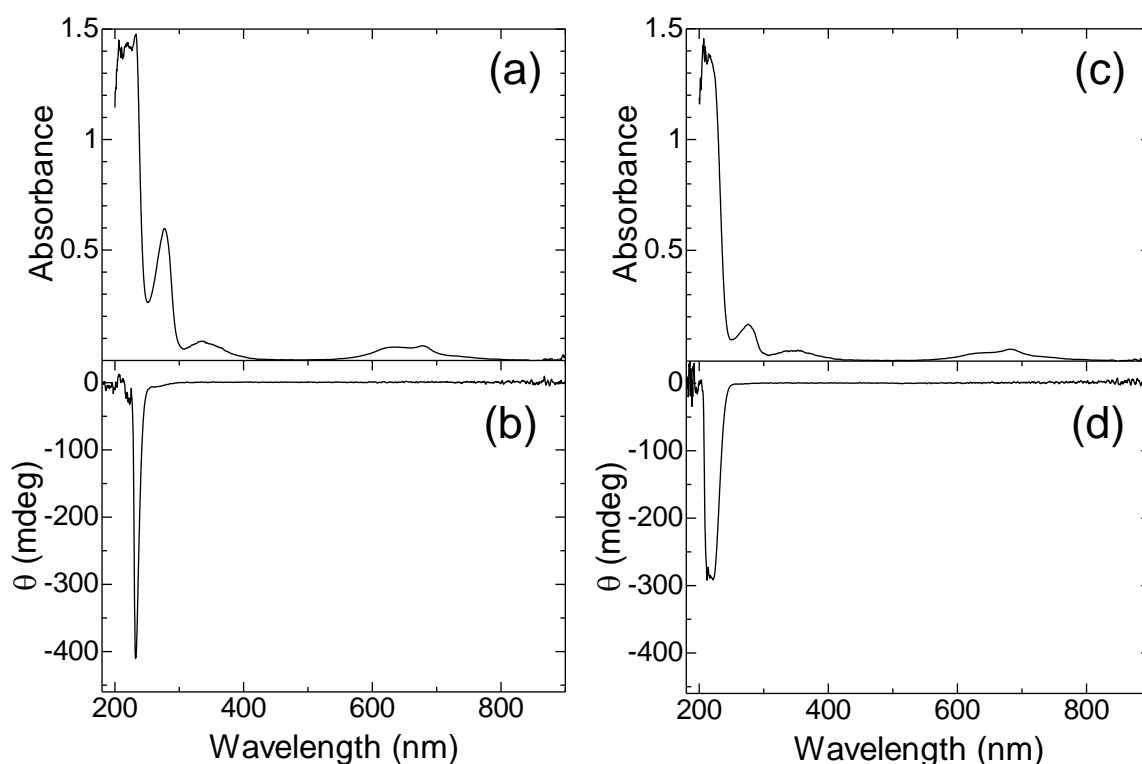


図 5-9、 $(\text{ZnPc})_n@(\text{BSA})_2$ (a, b) と $(\text{ZnPc-PPh}_3)_n@(\text{BSA})_2$ (c, d) の電子吸収スペクトルと CD スペクトル

5-2-5. BSA のプローブへの応用

分子生物学の分野において、様々なプローブに対して BSA ダイマーとの複合化が適応できる可能性がある。本研究では、その一例として、酸素センサーとしての機能を有する PtTPP に対して複合化を試みた。PtTPP は酸素がない環境では強いりん光を発するが、酸素が存在することでりん光が消光される⁹。このため、りん光強度は周囲の酸素濃度に依存することとなる。正常細胞に比べ、ガン細胞では酸素濃度が低くなるため、この種の酸素センサーはガン細胞の検出にも有用である¹⁰。しかし、PtTPP は疎水性分

子であるため、そのままでは水溶液中での使用ができない。また、疎水性の PtTPP を水溶液中での使用を可能とするために、親水性置換基を導入した化合物を合成する場合、時間と労力が必要となる。本研究で開発した BSA ダイマーとの複合化方法を PtTPP に適用したところ、PtTPP@(BSA)₂ を得ることに成功した。この複合体を用いて水溶液中での酸素検出の結果を以下に示す。酸素を含む空気雰囲気化ではりん光の強度が大きく低下する様子が観測された。PtTPP@(BSA)₂ は疎水性 PtTPP の置換基を変更する必要がなかったため、酸素への感度を低下させることなく水溶液中での適用を可能とした。これより、本研究で開発した BSA ダイマーと複合化する方法は様々な疎水性のプローブを水溶液中で適用できるようにするための有用な方法となり得る。

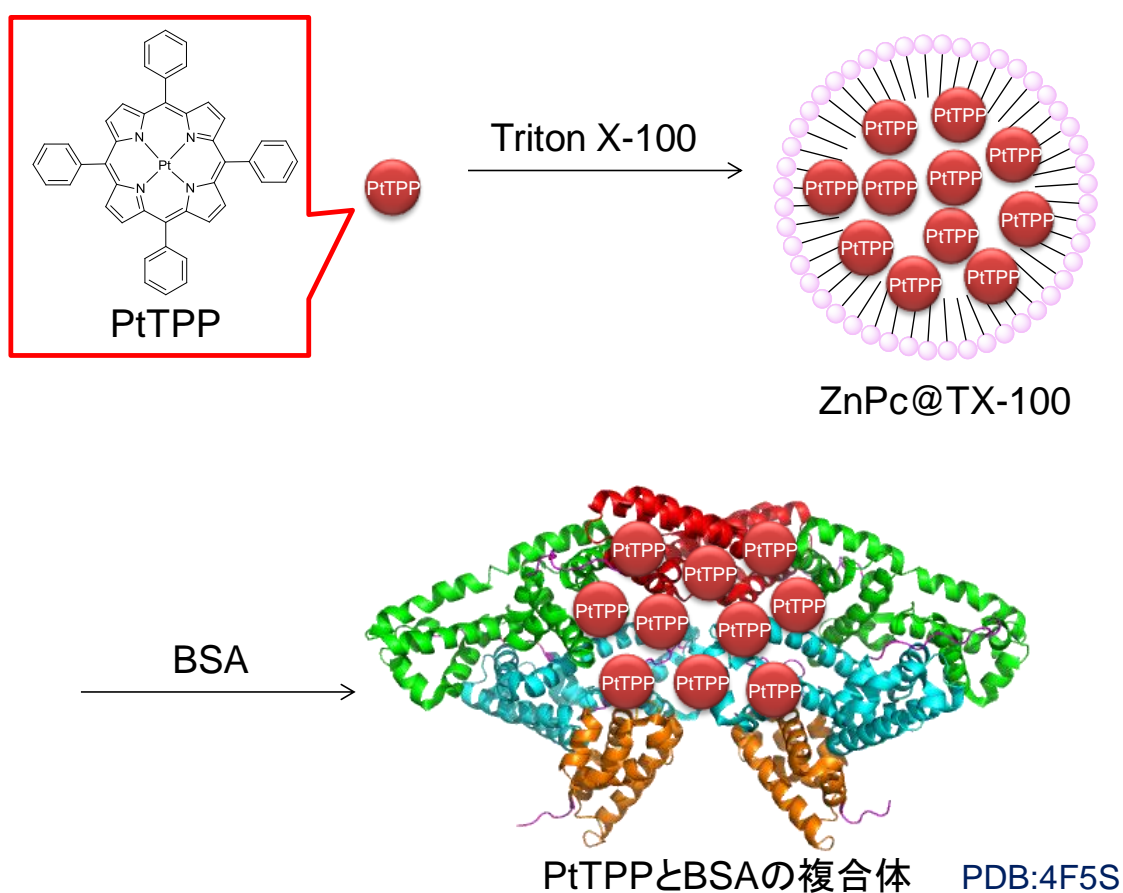


図 5-10、PtTPP と BSA 複合体の合成スキーム

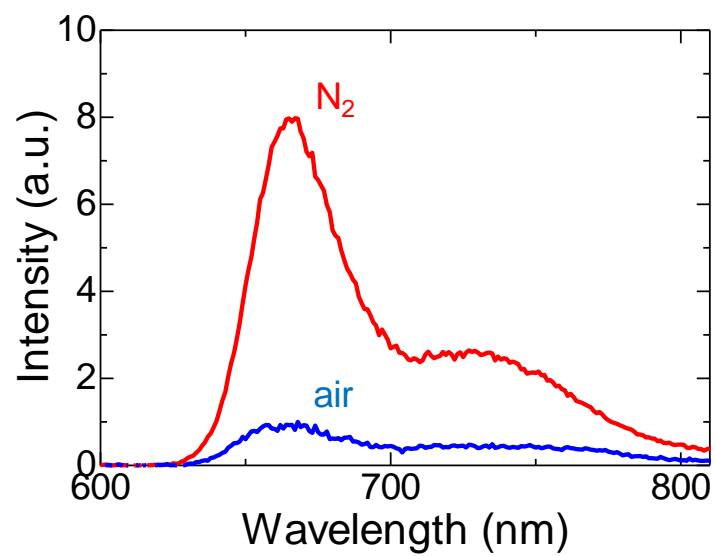


図 5-11、PtTPP@(BSA)₂ の水溶液中りん光スペクトル (赤：窒素雰囲気下、青：空気雰囲気下)

5-3. 実験

5-3-1. ZnPc と BSA 複合体 $(\text{ZnPc})_n@(\text{BSA})_2$ の合成

ZnPc (0.5 mg, 6.32×10^{-7} mol) に純水で希釈した 2% Triton X-100 溶液 (2 ml) を加えた。続いて、ガラスビーズ (500 mg) を加え、30 分超音波をかけることで ZnPc を溶解させた。得られた溶液に Bovine serum albumin (BSA, 100 mg, 1.51×10^{-6} mol) を加え 3 時間攪拌した。その後、限外濾過 (10,000 MWCO) を行い、濾過 (Φ 0.45 μM) による精製後 $(\text{ZnPc})_n@(\text{BSA})_2$ 複合体を得た。

5-3-2. ZnPc- PPh₃ と BSA 複合体 $(\text{ZnPc-PPh}_3)_n@(\text{BSA})_2$ の合成

ZnPc (0.5 mg, 6.32×10^{-7} mol) にクロロホルムに溶解させた PPh₃ (4.97 mg, 1.90×10^{-5} mol) を加え、溶媒を減圧留去した。そこへ純水で希釈した 2% Triton X-100 溶液 (2 ml) を加えた。続いて、ガラスビーズ (500 mg) を加え、30 分超音波をかけることで ZnPc と PPh₃ を溶解させた。得られた溶液に Bovine serum albumin (BSA, 100 mg, 1.51×10^{-6} mol) を加え 3 時間攪拌した。その後、限外濾過 (10,000 MWCO) を行い、濾過 (Φ 0.45 μM) による精製後 $(\text{ZnPc})_n@(\text{BSA})_2$ 複合体を得た。

5-3-3. PtTPP と BSA 複合体 $\text{PtTPP}@(\text{BSA})_2$ の合成

PtTPP (0.5 mg, 6.32×10^{-7} mol) に純水で希釈した 2% Triton X-100 溶液 (2 ml) を加えた。続いて、ガラスビーズ (500 mg) を加え、30 分超音波をかけることで PtTPP を溶解させた。得られた溶液に Bovine serum albumin (BSA, 100 mg, 1.51×10^{-6} mol) を加え 3 時間攪拌した。その後、限外濾過 (10,000 MWCO) を行い、濾過 (Φ 0.45 μM) による精製後 $\text{PtTPP}@(\text{BSA})_2$ 複合体を得た。

5-3-4. 電子吸収スペクトルの測定

電子吸収スペクトルを光路長 1 cm の石英セルを用いて、JASCO 社製 V-570 紫外可視分光光度計で測定した。

5-3-5. 蛍光スペクトル測定

蛍光測定は光路長 1 cm の蛍光セルを用いて測定した。試料からの蛍光は、光ファイバーを通して浜松ホトニクス社製 R5509-42 光電子増倍管を 193K にして検出、増幅した。これを JASCO 社製 CT-25CP により、蛍光スペクトルを得た。

5-3-6. CD スペクトルの測定

CD スペクトル測定は光路長 0.5 mm のセルを用いて測定した。CD 信号の検出には JASCO 社製 J-725 を用いて測定した。

5-3-7. ZnPc と BSA 複合体のサイズ排除クロマトグラフィー (Sephadex G-100)

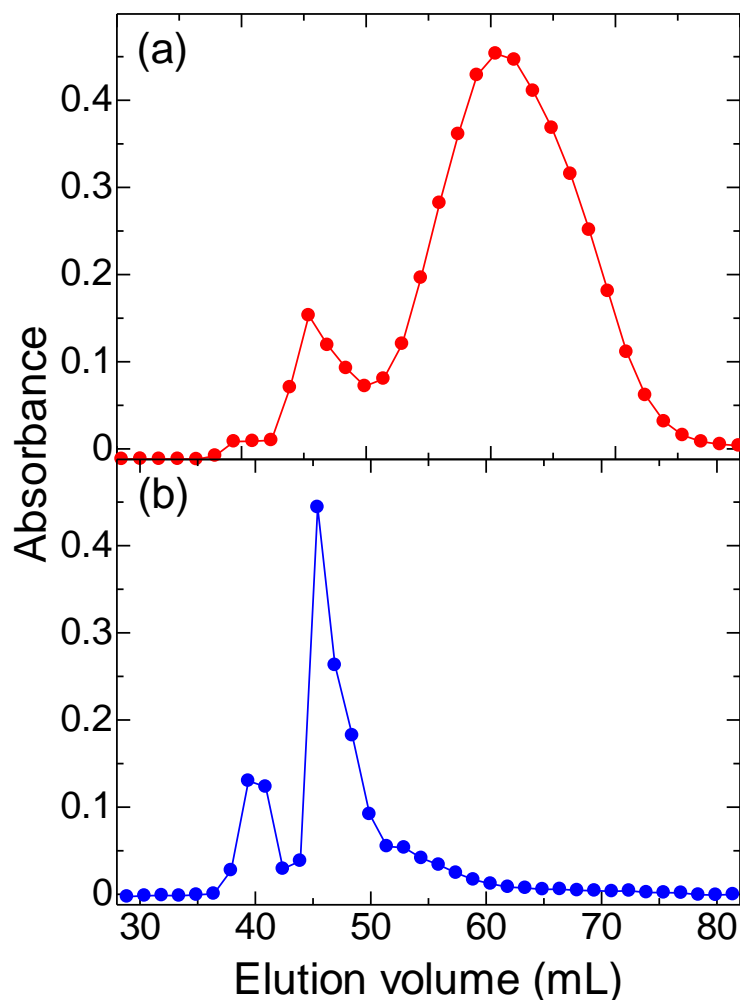
ZnPc と BSA 複合体を Sephadex G-100 (内径 : 2.1、2.4 cm、高さ : 21、27 cm) に加え、NaCl (1 M) を含む Tris-HCl バッファー (0.75 M、pH 8) で流速 $0.1-0.3 \text{ mL min}^{-1}$ で溶出し、電子吸収スペクトルを光路長 5 mm の石英セルを用いて、JASCO 社製 V-570 紫外可視分光光度計で測定した。

4-3-8. ZnPc と BSA 複合体のサイズ排除クロマトグラフィー (Superdex 200)

ZnPc と BSA 複合体を Superdex 200 (内径 : 2.4 cm、高さ : 42 cm) に加え、NaCl (1 M) を含む Tris-HCl バッファー (0.75 M、pH 8) で流速 $0.1-0.3 \text{ mL min}^{-1}$ で溶出し、電子吸収スペクトルを光路長 5 mm の石英セルを用いて、JASCO 社製 V-570 紫外可視分光光度計で測定した。

5-4. 付録

5-4-1. ZnPc と BSA オリゴマー複合体のサイズ排除クロマトグラフィー (Sephadex G-100)



付録 5-1、ZnPc と BSA の複合体の Sephadex G-100 を用いたサイズ排除クロマトグラフ ((a) ~ 280 nm、(b) ~ 680 nm)

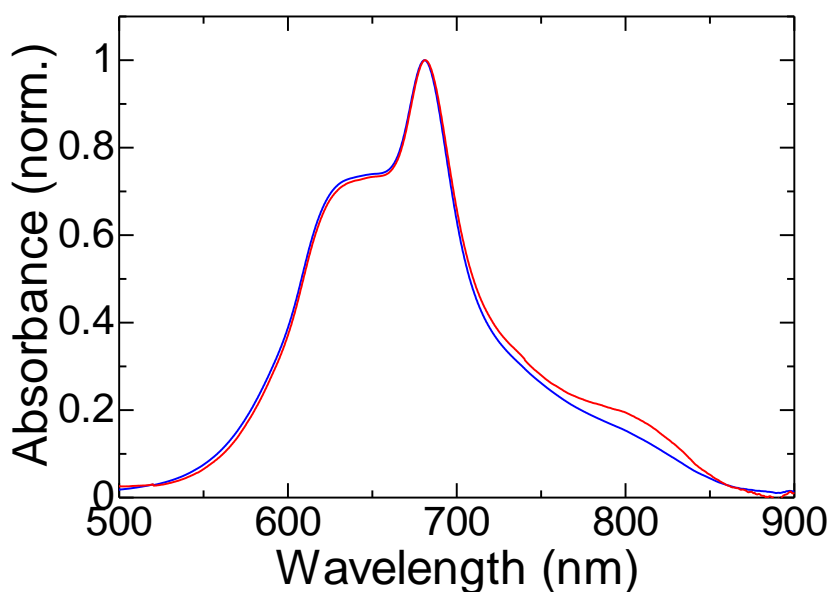
ZnPc と BSA の複合化における典型的なサイズ排除クロマトグラフを図 5-3 に示し、ZnPc 会合体と BSA ダイマーが複合体を形成していることを説明した。しかし、稀に BSA ダイマーよりも溶出量の小さい領域で ZnPc と BSA のピークが観測されることがあった (付録 5-1)。ここで、その結果についても説明する。

BSA 由来の吸収帯である約 280 nm で観測すると、溶出量 39、45、60 mL にピークが観測された。この第一から第三フラクションについて議論する。60 mL に対応する第三フラクションは BSA モノマーのピークであり、45 mL に対応する第二フラクションは

BSA ダイマーのピークに帰属される。BSA モノマーと BSA ダイマーの溶出量の比は既報の値と一致し、1.3 を示した^{2,3}。また、図 5-3 では見られなかった Sephadex G-100 の分画限界 150,000 を超える BSA オリゴマーに対応するピークが観測された。

一方、ZnPc に由来する約 680 nm の吸収帯を観測した場合、BSA ダイマーと BSA オリゴマーに対応する領域にピークが観測された。これより、ZnPc は BSA ダイマー、BSA オリゴマーと複合化していることが明らかとなった。特に、BSA ダイマーに対応する領域で ZnPc 由来の強い吸収が観測された。これは ZnPc が主に BSA ダイマーと複合化していることを示す。

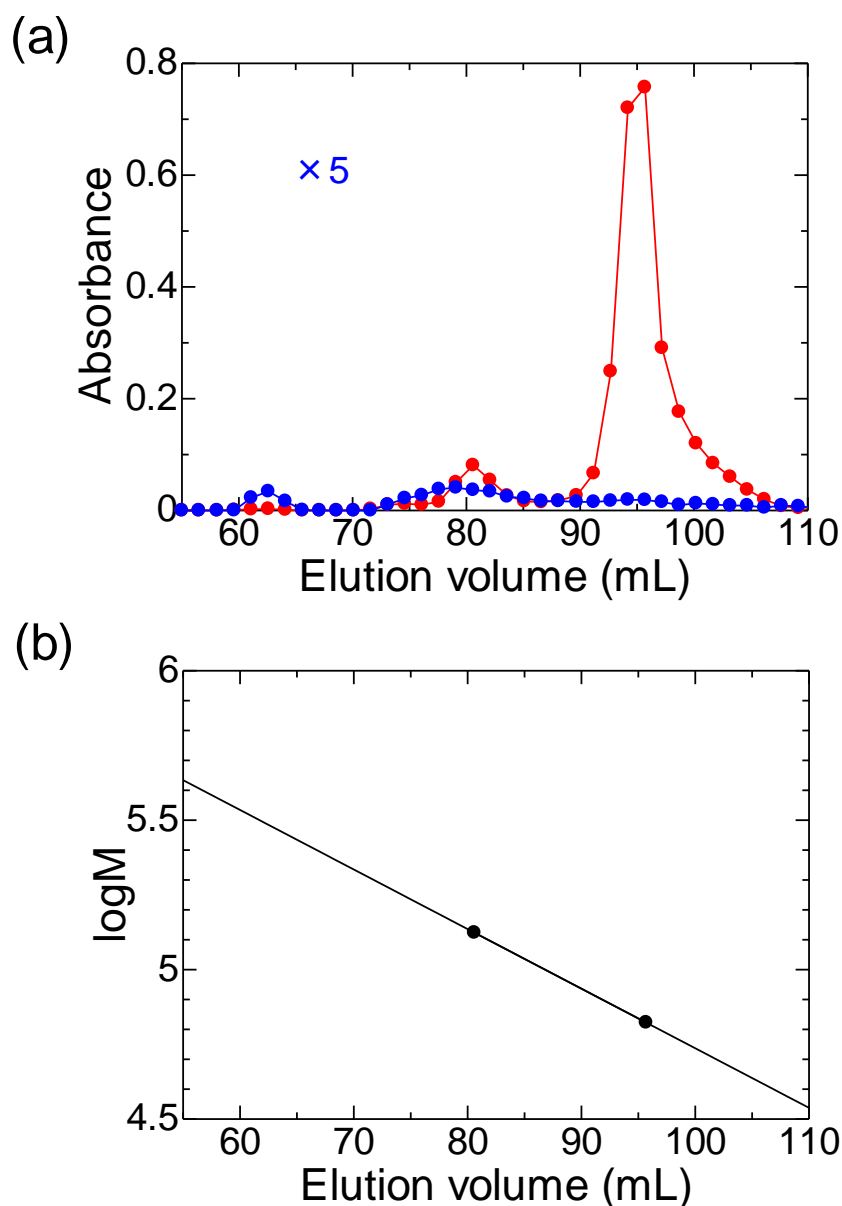
続いて BSA ダイマー、BSA オリゴマーの両方の領域の電子吸収スペクトルの観測を行った (付録 5-2)。この時、ZnPc は BSA ダイマー、BSA オリゴマーどちらと複合化したものでも 680 nm 付近でブロードな吸収が観測された。これは、ZnPc が BSA 中で会合体を形成していることを反映する。また、電子吸収スペクトルの解析より、BSA オリゴマーと複合化している ZnPcの方がわずかにブロードなスペクトルを示すことが確認された。これは、より会合度の大きい ZnPc 会合体が BSA オリゴマーと複合化していることを示す。



付録 5-2、BSA ダイマー (青色)、BSA オリゴマー (赤) と複合化した ZnPc の電子吸収スペクトル

5-4-2. ZnPc と BSA オリゴマー複合体のサイズ排除クロマトグラフィー (Superdex 200)

BSA との複合化を評価するために、これまで BSA に対してよく用いられてきた Sephadex G-100 でサイズ排除クロマトグラフィーを行ってきた^{2,3}。しかし、Sephadex G-100 では、分画限界 150,000 を超える三量体以上の BSA に対応するピークの分子量を評価することはできない。そこで、分画限界 600,000 の Superdex 200 を用いて、ZnPc と BSA オリゴマー複合体のサイズ排除クロマトグラフィーを行った (付録 5-3a)。

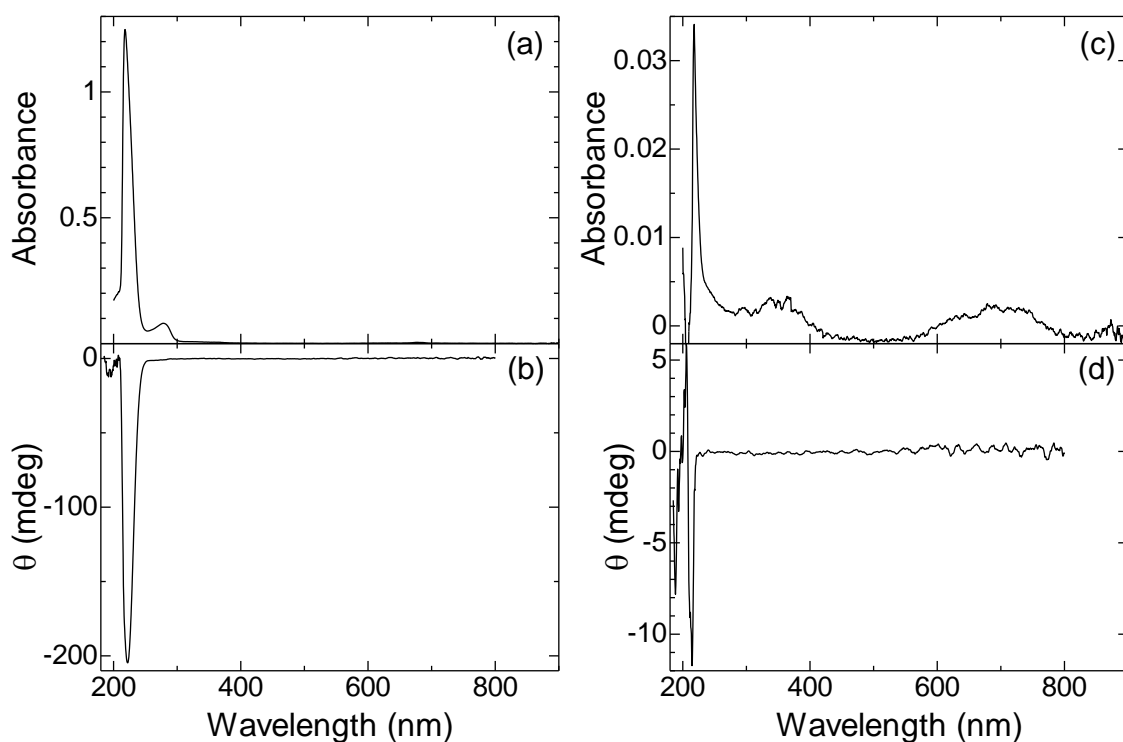


付録 5-3、(a) ZnPc と BSA の複合体の Sephadex G-100 を用いたサイズ排除クロマトグラフサイズ排除クロマトグラフ (赤：～280 nm、青：～680 nm)、(b) BSA に対する溶出量と分子量 (M) の対数の校正曲線

BSA 由来の吸収帯である約 280 nm で観測すると、溶出量 63、81、96 mL にピークが観測された。溶出量 96 mL に対応する第三フラクションは BSA モノマーのピークであり、81 mL に対応する第二フラクションは BSA ダイマーのピークに帰属される。さらに、63 mL に対応する第一フラクションに付録 5-1 で観測された BSA ダイマーの分子量を超える BSA オリゴマーに対応するピークが観測された。

一方、ZnPc に由来する約 680 nm の吸収帯を観測した場合、付録 5-1 と同様に、BSA ダイマーと BSA オリゴマーに対応する領域にピークが観測された。これより、ZnPc は BSA ダイマー、BSA オリゴマーと複合化していることが Superdex G-100 の測定でも確認された。

サイズ排除クロマトグラフィーによる溶出量と分子量 (M) の対数は、一般的に比例の関係にある。BSA モノマーと BSA ダイマーの溶出量と分子量を基に校正曲線を作成し、BSA オリゴマーの分子量を評価した (付録 5-3b)。この結果、BSA オリゴマーは五量体であることが明らかとなった。ZnPc と BSA ペンタマーの複合体を $(\text{ZnPc})_n@(\text{BSA})_5$ とする。



付録 5-4、 $(\text{ZnPc})_n@(\text{BSA})_2$ (a、b) と $(\text{ZnPc})_n@(\text{BSA})_5$ (c、d) の電子吸収スペクトルと CD スペクトル

さらに、溶出量 63 mL にピークを持つ領域が、BSA 由来であることを確認するため、溶出された $(\text{ZnPc})_n@(\text{BSA})_2$ と $(\text{ZnPc})_n@(\text{BSA})_5$ それぞれに対して CD スペクトルの測定を行った（付録 5-4）。CD スペクトルを観測したところ、 $(\text{ZnPc})_n@(\text{BSA})_5$ にも $(\text{ZnPc})_n@(\text{BSA})_2$ と同様に 220 nm 付近で BSA に由来するシャープな CD 信号が検出されている。これより、Sephadex G-100 では分画限界を超えているため評価できなかった領域が BSA ペンタマーと ZnPc の複合体 $(\text{ZnPc})_n@(\text{BSA})_5$ を形成していることが明らかとなった。

参考文献

1. Yokoi, T., Hattori, S. & Ishii, K. Encapsulation of zinc phthalocyanine into bovine serum albumin aggregates. *J. Coord. Chem.* (2019) DOI: 10.1080/00958972.2019.1566538
2. Uchiyama, T., Ishii, K., Nonomura, T., Kobayashi, N. & Isoda, S. A phthalocyanine dendrimer capable of forming spherical micelles. *Chem. Eur. J.* **9**, 5757-5761 (2003).
3. Andrewa, P. Estimation of the molecular weights of proteins by Sephadex gel-filtration. *Biochem. J.* **91**, 222-233 (1963).
4. Hu, D. *et al.* Activatable albumin-photosensitizer nanoassemblies for triple-modal imaging and thermal-modulated photodynamic therapy of cancer. *Biomaterials* **93**, 10-19 (2016).
5. Lan, W. L. *et al.* The effects of formulation and serum albumin on the in vitro photodynamic activity of zinc(II) phthalocyanines substituted with sulfonated quinolineoxy groups. *Dyes Pigm.* **128**, 215-225 (2016).
6. Wan, D. H. *et al.* C-Phycocyanin as a tumour-associated macrophage-targeted photosensitiser and a vehicle of phthalocyanine for enhanced photodynamic therapy. *Chem. Commun.* **53**, 4112-4115 (2017).
7. 浦野泰照 編、疾患克服をめざしたケミカルバイオロジー がん医療や創薬に貢献する in vivo イメージングと生体機能解析・制御の最前線、実験医学増刊 Vol.30 No.7 (2012).
8. Huang, P. *et al.* Dye-loaded ferritin nanocages for multimodal imaging and photothermal therapy. *Adv. Mater.*, **26**, 6401-6408 (2014).
9. Wu, W., Wu, W., Ji, S., Guo, H., Wang, X. & Zhao, J. The synthesis of 5,10,15,20-tetraarylporphyrins and their platinum(II) complexes as luminescent oxygen sensing materials. *Dyes Pigm.* **89**, 199-211 (2011).
10. Zhang, S., Hosaka, M., Yoshihara, T., Negishi, K., Iida, Y., Tobita, S. & Takeuchi, T. Phosphorescent light-emitting iridium complexes serve as a hypoxia-sensing probe for tumor imaging in living animals. *Cancer Res.* **70**, 4490-4498 (2010).

第 6 章

総括

第6章 総括

本研究は、R2c を基盤とする高感度な蛍光プローブの開発を行い、投与されたビタミン C の生体内分布の解明を目的とした。高感度化を達成するために、具体的には、① R2c への親水性置換基の導入 (第 3 章)、② R2c と牛血清アルブミン (Bovine serum albumin、BSA) の複合化 (第 4 章) により、高感度化を達成し、投与されたビタミン C の生体内分布を解明することに成功した。

第 3 章では、R2c への親水性置換基のスルホ基導入を行った高感度な新規蛍光プローブ R2cS₁ 開発について述べている。リポソームに疎水性 R2c を取り込んだ場合、R2c はリポソーム内側の疎水性領域に分布する。この場合、疎水性領域まで入り込んだビタミン C とのみ R2c は反応するため、感度と反応速度には改善が必要である。R2c に親水性置換基を導入することで、リポソーム外側の親水性領域付近に蛍光プローブを分布させることができれば、感度・反応速度が改善できると考えた。本研究では、① フタロシアニンへのスルホ基導入が光線力学的ガン治療法の研究において実績があること、② TEMPO の導入反応においてトルエン溶媒の利用が望ましいこと等の観点から 1 つのスルホ基を導入した R2cS₁ を合成し、ビタミン C との反応を評価した。

リポソームに取り込ませた R2c、R2cS₁ を用いた蛍光測定により、ビタミン C との反応性を調べた。リポソーマル R2c のビタミン C 検出限界は mM オーダーであり、100 μ M のビタミン C は検出できなかった。一方、リポソーマル R2cS₁ を用いた場合、50 μ M のビタミン C でも検出することができた。この高感度化は、R2cS₁ が、R2c よりリポソーム外側親水性領域付近に分布したことで説明できる。これより、親水性置換基を導入することで R2c を 10 倍以上の高感度化に成功した。

第 4 章では、R2c と BSA の複合化について述べている。リポソームは、R2c のラジカルを様々な酸化還元物質から過度に保護するため、R2c のビタミン C 検出の感度も低下させてしまう。そこで、本研究では適度な保護と高感度を両立させるため、血液中の物質運搬に関わるタンパク質 BSA と R2c を複合化させた新規蛍光プローブを開発し、ビタミン C との反応性を比較した。R2c を界面活性剤 Triton X-100 を含む水溶液に溶解し、BSA を加えて攪拌した後、限外濾過することで R2c と BSA の複合体を合成した。複合体は、サイズ排除クロマトグラフィー、円偏光二色性、電子スピン共鳴、蛍光測定で同定し、R2c が BSA ダイマーと複合化した R2c@(BSA)₂ を形成していることを明らかにした。

R2c@(BSA)₂ とビタミン C の反応を蛍光測定により調べた。リポソーマル R2c のビタミン C 検出限界は mM オーダーであるのに対し、R2c@(BSA)₂ は 1 μ M のビタミン C でも検出可能であった。これより、リポソーマル R2c に比べて 100 倍以上高感度化した蛍光プローブ R2c@(BSA)₂ の開発に成功した。

次に、R2c が BSA ダイマーと選択的に複合化する原因を調べるため、BSA の疎水性空間について計算を行った。BSA モノマーに比べ、BSA ダイマーでは、2 つの BSA が

接する界面に大きな疎水性空間を有することが明らかとなった。また、嵩高い *tert*-ブチル基と TEMPO 軸配位子を有する R2c は、BSA モノマーの疎水性空間には取り込まれず、ダイマーの BSA 間疎水性界面に取り込まれたと考えられる。この疎水性界面は、柔軟性が高くビタミン C が侵入しやすいため、高感度な検出が可能になったと考えられる。

R2cS₁ より高感度な蛍光プローブ R2c@(BSA)₂ を用いて、マウス中におけるビタミン C の蛍光バイオイメージングを行った。初めに、マウスの尾静脈から R2c@(BSA)₂ を投与し、マウス全身に分布したことを確認した。その後、尾静脈からビタミン C を投与したところ、短時間で全身の蛍光強度が増大する様子が観測された。一方、ビタミン C を投与しなかったマウスでは、顕著な蛍光増大は観測されなかった。これは、生体内でもラジカルが適度に保護されることを意味する。投与したビタミン C の分布を調べるため、ビタミン C 投与前後の蛍光強度比を計算した。この結果、活性なビタミン C は、心臓、肺、胆のう、肝臓付近に到達しやすいことが明らかとなった。また、低感度なリポソーム R2c は、肝臓付近に局在し、蛍光の増大も小さいためイメージングは困難であった。これより、ラジカル保護と高感度化を両立させた蛍光プローブ R2c@(BSA)₂ を開発することで、マウス中ビタミン C のイメージングに初めて成功し、ビタミン C の生体内分布を解明した。また、マウス中へ投与 15~20 分後の血漿と肝臓を摘出し、ビタミン C を定量したところ、血漿より肝臓のビタミン C 濃度が有意に増大しており、臓器へのビタミン C の取り込みを確認した。

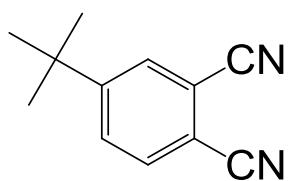
第 5 章では、R2c の BSA ダイマーによる取り込みが R2c 特有であるかについて調べるため、軸配位子を持たない一般的なフタロシアニンである亜鉛フタロシアニン (ZnPc) についても、BSA との複合化、及びそのサイズ排除クロマトグラムを調べた。その結果、ZnPc も BSA モノマーとは複合化せず、BSA ダイマーと複合化 (ZnPc@(BSA)₂) することが明らかとなった。ZnPc@(BSA)₂ の電子吸収スペクトルにおいて、ブロードな Q 吸収帯が観測された。これより、ZnPc は会合体を形成しながら BSA ダイマーに取り込まれることが明らかとなった。この ZnPc に軸配位子となる PPh₃ を加えて BSA との複合化を行ったところ、ZnPc の会合が抑制、ZnPc の H 会合体由来の蛍光が初めて観測された。

また、酸素濃度に依存してりん光を示す疎水性の PtTPP を BSA と複合化についても実験を試みた。水中で酸素を含む空気雰囲気化ではりん光の強度が大きく低下する様子が観測された。PtTPP@(BSA)₂ は疎水性 PtTPP の置換基を変更する必要がなかったため、酸素への感度を低下させることなく水溶液中での適用を可能とした。本研究で開発した BSA ダイマーと複合化する方法は様々な疎水性のプローブを水溶液中で適用できるようにするための有用な方法となり得る。

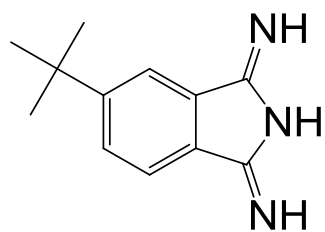
以上より、高感度なビタミン C 検出用蛍光プローブ R2cS₁、R2c@(BSA)₂ の開発に成功した。特に R2c@(BSA)₂ においては、BSA ダイマーと複合化することにより、ラジカ

ルを保護しつつ高感度な蛍光プローブの開発が可能となった。これを用いることで、マウス中に投与されたビタミン C のイメージングに初めて成功し、活性なビタミン C の生体内分布が明らかとなった。本研究は、高濃度ビタミン C 療法の発展や新規蛍光プローブの設計において有用な知見になり得る。また、BSA ダイマーを用いた複合化は様々なプローブへの応用に期待される。

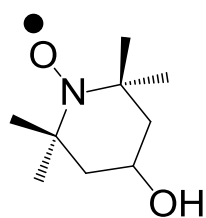
化合物一覧



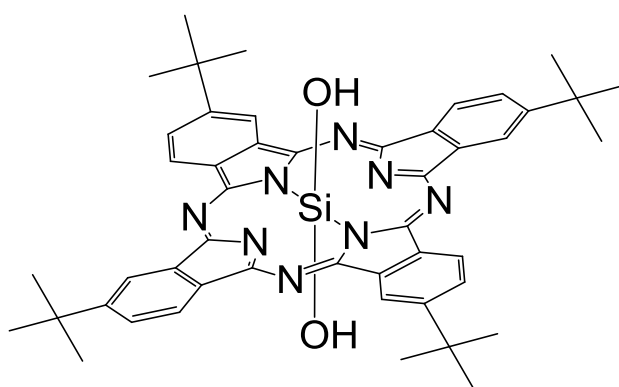
フタロニトリル



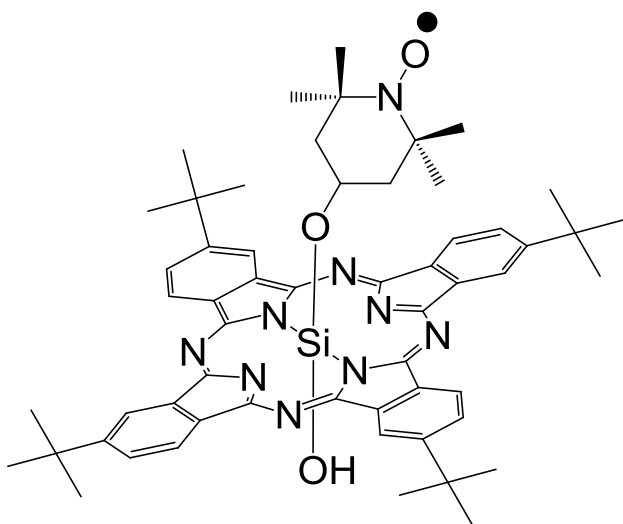
イソインドリン



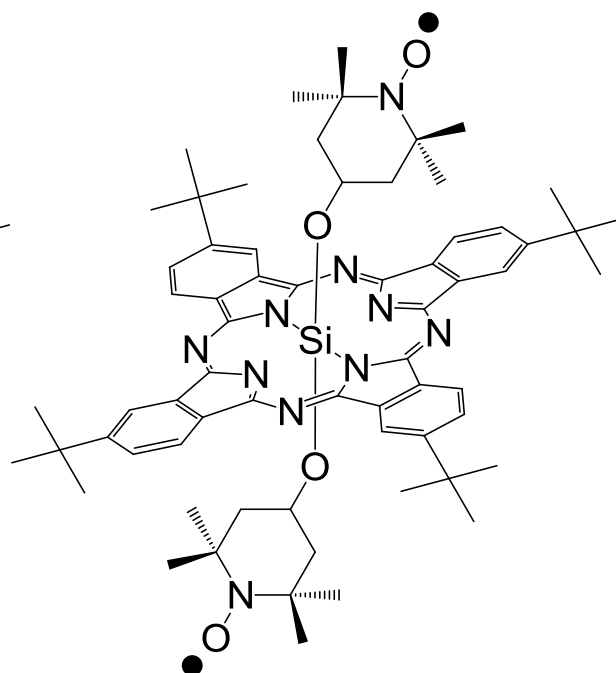
TEMPOL



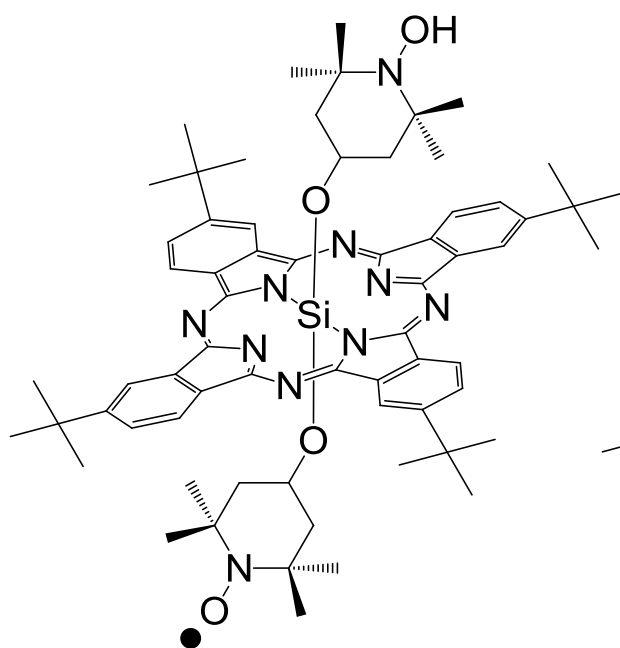
SiPc



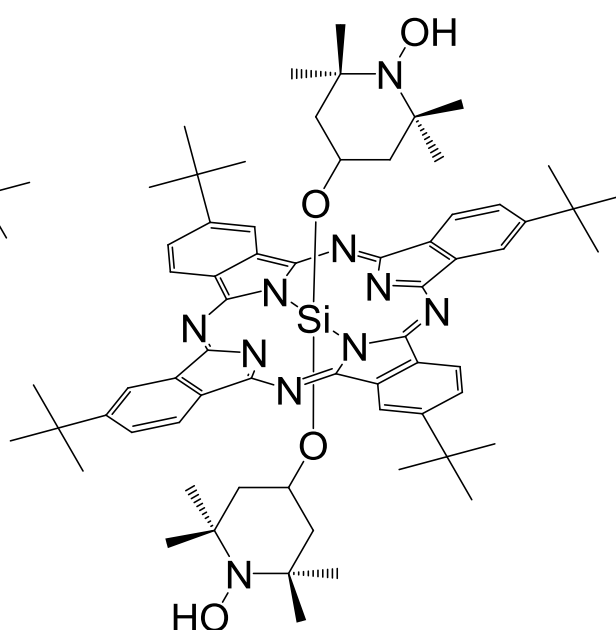
R1c



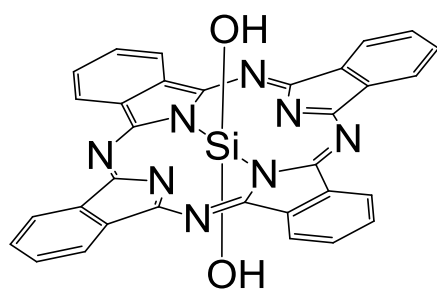
R2c



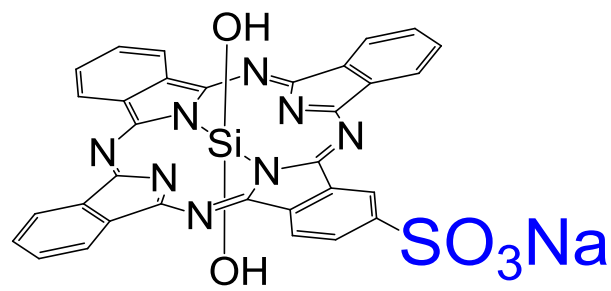
R2c₁



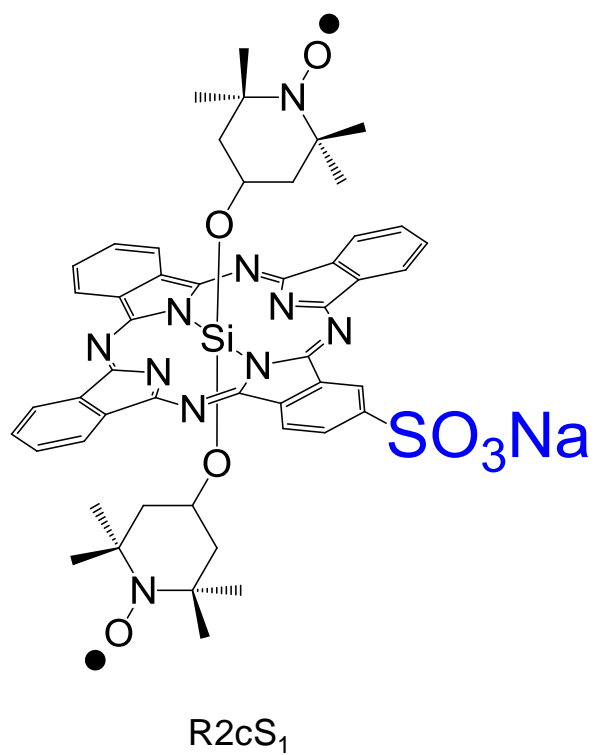
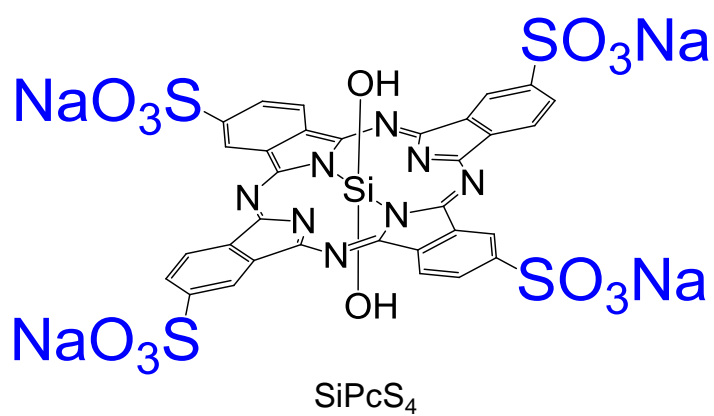
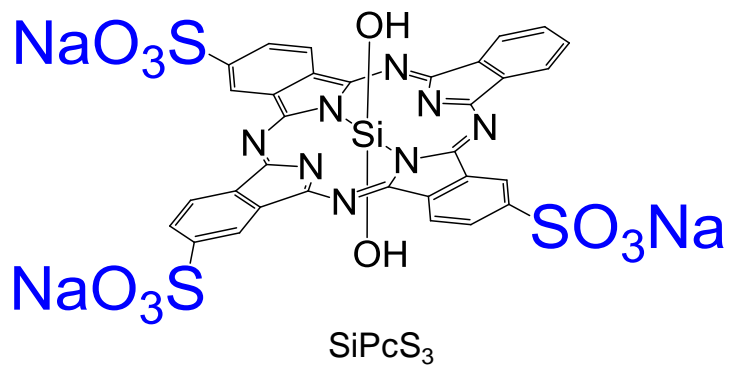
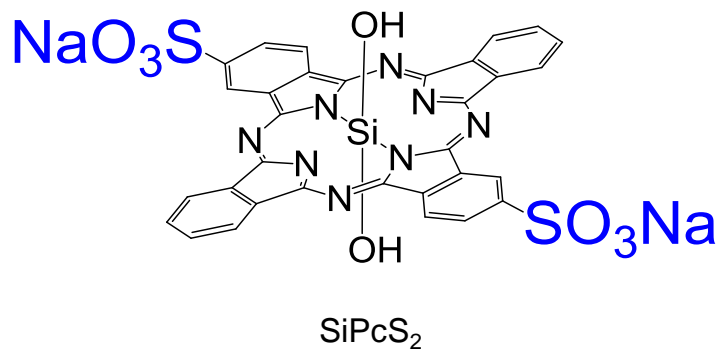
R2c₀

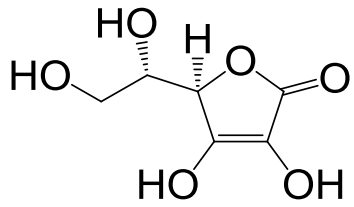


SiPc

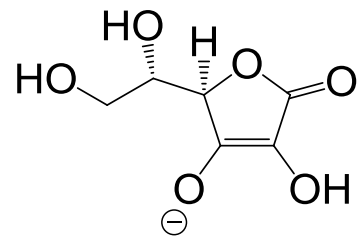


SiPcS₁

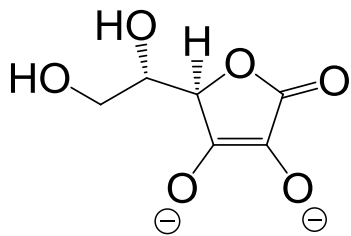




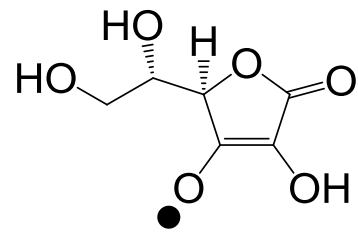
ビタミンC
(アスコルビン酸)



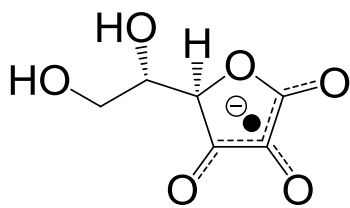
アスコルビン酸モノアニオン



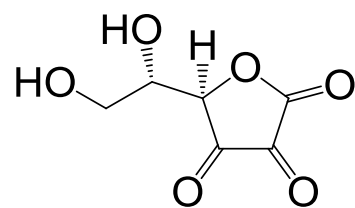
アスコルビン酸ジアニオン



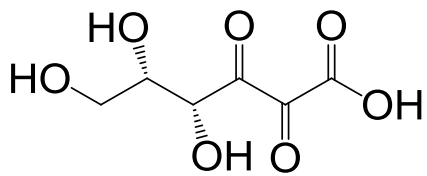
モノデヒドロアスコルビン酸
ラジカル



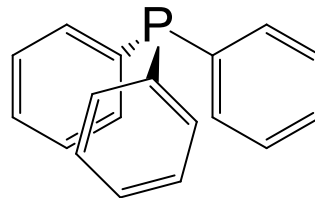
モノデヒドロアスコルビン酸



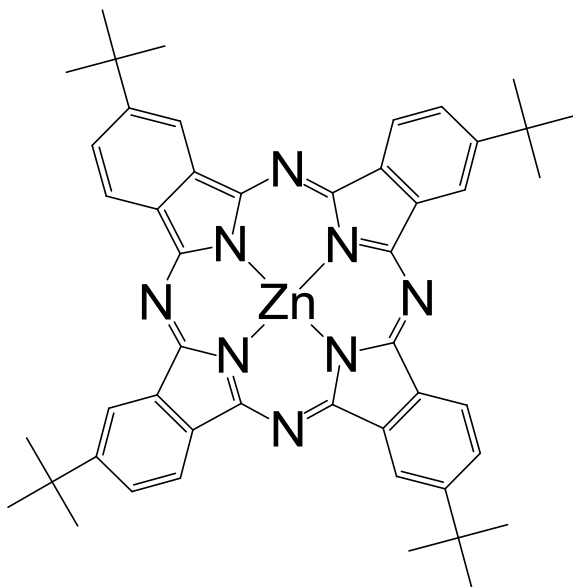
デヒドロアスコルビン酸



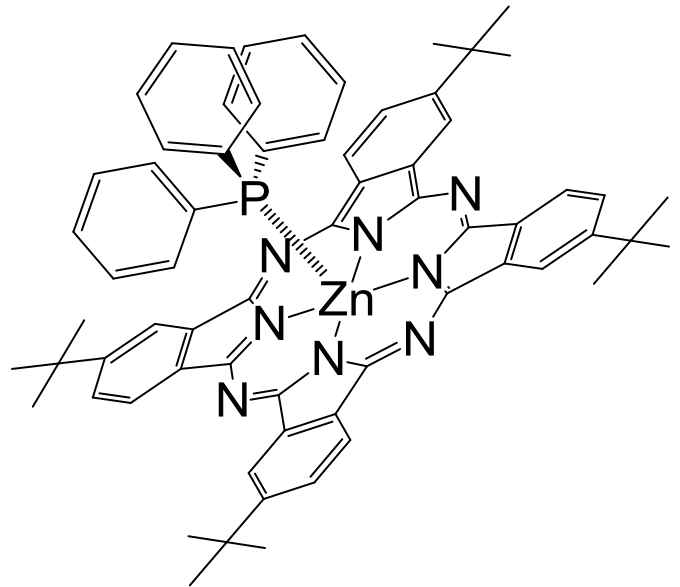
2,3-ジケート-L-グルロン酸



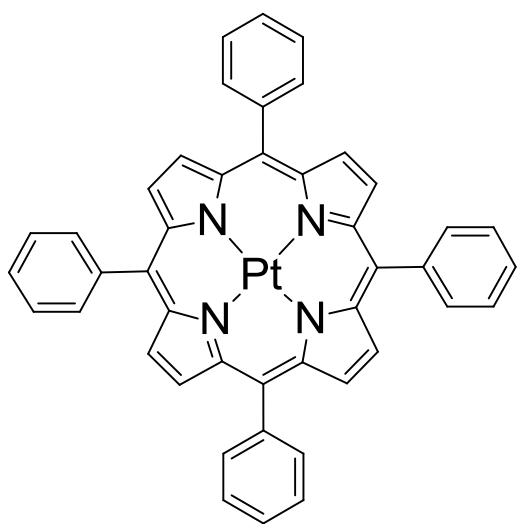
トリフェニルホスフィン



ZnPc



ZnPc-PPh₃



PtTPP

研究業績

本学位論文を構成する審査付き論文

[1] Takanori Yokoi, Takayuki Otani, Kazuyuki Ishii

“*In vivo* fluorescence bioimaging of ascorbic acid in mice: Development of an efficient probe consisting of phthalocyanine, TEMPO, and albumin”

Scientific Reports, **8**, 1560 (2018).

[2] Takanori Yokoi, Kazuyuki Ishii

“Dependence of phthalocyanine-based fluorescence on albumin structure: A fluorescent probe for ascorbic acid”

J. Photochem. Photobiol. A, **364**, 1-5 (2018).

[3] Takanori Yokoi, Shingo Hattori, Kazuyuki Ishii

“Encapsulation of zinc phthalocyanine into bovine serum albumin aggregates”

J. Coord. Chem. (2019) DOI: 10.1080/00958972.2019.1566538

総説・解説

[1] Takanori Yokoi

“フタロシアニン誘導体を用いたレドックス応答性蛍光プローブの開発”

Bull. Jpn. Soc. Coord. Chem. **63**, 23 (2014).

特許

石井和之、横井孝紀

“発光によるレドックス分子検出法及び定量法”

特願 2013-22231

国際会議発表

口頭

[1] Takanori Yokoi, Kazuyuki Ishii

“Highly Sensitive Phthalocyanine-based Fluorescence Probes for Detecting Ascorbic Acid: Preparation and Detection Mechanisms”

Third International Symposium on the Photofunctional Chemistry of Complex Systems (3rd ISPCCS), OL-03, Maui, USA (December 2015).

ポスター

[1] Takanori Yokoi, Kazuyuki Ishii

“Fluorescence probe for detecting ascorbic acid: Phthalocyanines linked to TEMPO radicals”
Eighth International Conference on Porphyrins and Phthalocyanines (ICPP-8), S46-016, Turkey,
(June 2014)

[2] Takanori Yokoi, Kazuyuki Ishii

“Development of phthalocyanine-based fluorescence probes for detecting ascorbic acid”
The International Chemical Congress of Pacific Basin Societies 2015 (Pacifichem 2015), 1101,
Honolulu, USA, (December 2015)

国内学会英語発表

口頭

[1] Takanori Yokoi, Kazuyuki Ishii

“Fluorescence bioimaging of ascorbic acid in mice: development of a phthalocyanine-based
fluorescence probe encapsulated into serum albumin”
Annual Meeting on Photochemistry 2016, 1C06, Tokyo, Japan (September 2016)

報道

[1] 日経産業新聞 6面, 2013年11月27日

“血液中ビタミンC光らせて測定 酸化ストレスを和らげる効果期待”

[2] アスキークラウド 2月号, 2013年12月24日

“ビタミンCで自宅がん検査”

[3] 日本経済新聞 2018年1月24日

“体内のビタミンCの挙動を追跡する蛍光バイオイメージング技術を開発
～がん治療法「高濃度ビタミンC療法」への有用な知見～”

謝辞

本研究を進めるにあたり、本論文主査で指導教官である石井和之教授には、研究者として大切な様々なことを温かくも、時には厳しく熱意を持って指導していただきまして、心より御礼申し上げます。この5年間で、今までの自分ではできなかったことや、足りなかった多くのことを学ぶきっかけをいただきました。この経験を胸に刻み、これからの生活に活かしていきたいと思えます。

研究の発展につながる知見や、マウスを用いたビタミン C のバイオイメーキングを行う機会を下さいました片山化学工業株式会社大谷敬亭氏、田中淳氏、北川寛之氏に心より御礼申し上げます。

ご多忙の中、本論文の副査として審査をしていただきました東京大学先端科学技術研究センターの瀬川浩司教授、東京大学の野地博行教授、東京大学生産技術研究所の砂田祐輔准教授、酒井康行教授に心より御礼申し上げます。

高濃度ビタミン C 療法の発展のため、研究を進めるにあたり多大なご支援を賜りました八十川紀夫氏に厚く御礼申し上げます。

フタロシアニン誘導体合成の最適化に関して毎日議論を交わして共に研究し、駅伝大会にも取り組んだウィーン工科大学からの交換留学生 Martin Priessner 氏に深く感謝致します。この半年間は、自分の考え方や姿勢を見直し、改めるための非常に大切な期間となりました。

同期として5年間共に過ごし、様々なことを共に学び、研究でも協力し合い、勉強会や研究への姿勢で良い刺激を与えてくれた服部伸吾氏に深く感謝致します。

約5年間、研究室を明るく活気づけ、研究生活における実験室の管理や測定等様々な面で大変お世話になりました榎本恭子氏に厚く御礼申し上げます。

博士からの研究室同期として共に学び、測定や勉強会等様々な場面で協力し合ってきた唐澤正信氏に深く感謝致します。

研究室に温かく迎えて下さり、様々なことを教えていただいた北川裕一氏、小尾匡司氏、Ngo Thi Hongtrang 氏、温広浩氏に厚く御礼申し上げます。

共に学び、研究室生活の様々な面で協力していただいた外村弦子氏、松本駿亮氏、南部翔平氏、松橋直樹氏、山崎順也氏、石田虎太郎氏、小池洋輔氏、山下雄己氏、黒羽みずき氏、田中隼人氏、村田康輔氏、Wang Mengfei 氏に深く感謝致します。

研究室での様々な面で支えて下さいました村田慧助教、市堰綾子氏、岩田裕子氏、吉野理香子氏に心より感謝致します。

勉強会で共に学び、良い刺激を与えて下さいました Yan Mulyana 氏、景朝俊氏、Stefaan Vandendriessche 氏に深く感謝致します。

最後になりましたが、これまで勉強や研究をする機会を与えてくれて、温かく見守り支えてくれた家族に深く感謝致します。

平成 30 年 12 月 横井 孝紀