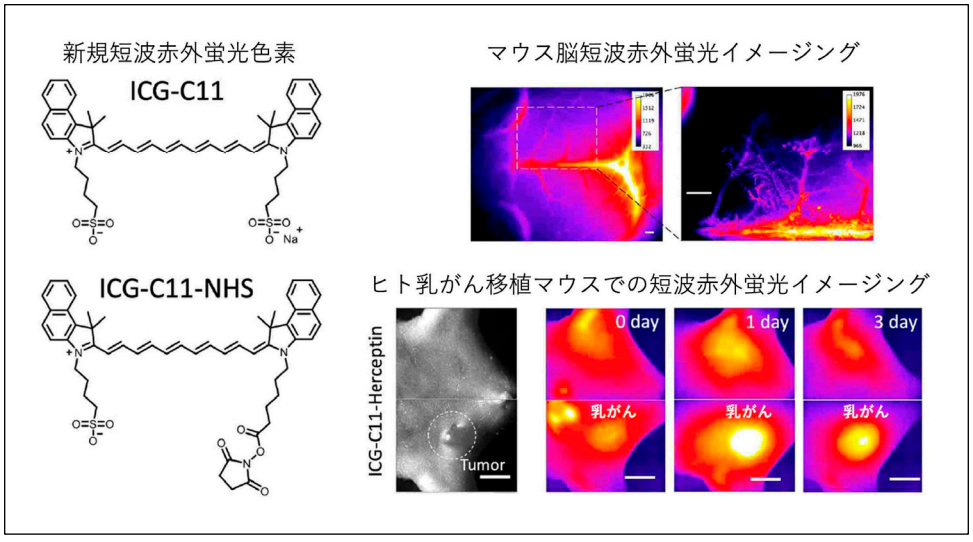
83　「生体の第2光学窓」短波赤外イメージング技術の開発	神　隆

【目的】短波赤外領域（波長 1.0～1.4 μm、生体の第 2 光学窓）の光は、細胞、組織、臓器、さらには個体レベルで細胞状態を非侵襲で可視化、操作するのに非常に適している。その第一の理由は、可視、近赤外の光に比べて数倍エネルギーが低いため光照射によるダメージが少なく、長時間でのイメージングが可能なことである。第二の理由は、生体組織による光吸収が少なく組織透過性に優れており、また組織中での光散乱が少なくなるため、従来法に比べ格段に鮮明な生体深部画像が得られることである。本研究では、ヒト乳がんの光診断を目指した「生体の第 2 光学窓（波長 1.0～1.4 μm）における個体中での、細胞、組織、臓器の非侵襲短波赤外メージング技術」の開発を行う。

【方法】本研究では、ヒトでの早期乳がんの光診断を目指した「生体の第 2 光学窓（波長 1.0～1.4 μm）における個体中での、細胞、組織、臓器の非侵襲短波赤外イメージング技術」を開発するため、以下の方法により研究を行った。1．生体親和性の高い短波赤外蛍光有機色素の合成。2．乳がん検出用短波赤外蛍光分子イメージング用プローブの合成。3．ヒト乳がんモデルマウスにおける短波赤外蛍光分子イメージング。

【結果】1．生体での蛍光イメージングで最も重要となるプローブ特性は、毒性がなく生体親和性が高いことである。本研究では、すでに安全性が高く臨床応用がおこなわれているシアニン系色素のインドシアニングリーン（ICG）を利用した短波赤外蛍光有機色素の合成を行った。ICG の共役二重結合を延長することにより、生体の第 2 光学窓（波長 1.0～1.4 μm）で蛍光発光する短波赤外蛍光有機色素（ICG-C11）の合成に成功した。2．乳がん検出用短波赤外蛍光分子イメージング用プローブを開発するために ICG-C11 を用いた短波赤外蛍光ラベル化剤（ICG-C11-NHS）を開発した。この蛍光ラベル化剤の開発により、モノクローナル抗体への短波赤外蛍光の修飾が可能となり、乳がん検出用短波赤外蛍光分子イメージング用プローブが作製できた。3．乳がん検出用短波赤外蛍光分子イメージング用プローブにより、ヒト乳がんモデルマウス（KPL-4 細胞移植マウス）において乳がん腫瘍の短波赤外蛍光検出に成功した。開発した分子イメージング用プローブが、HER1 および HER2 陽性乳がん腫瘍など様々なタイプのがんの光診断に応用可能であることを示した。

新規開発短波赤外蛍光色素による生体非侵襲蛍光イメージング



83. 「生体の第 2 光学窓」短波赤外イメージング技術の開発

神　隆

理化学研究所 生命機能科学研究センター ナノバイオプローブ研究チーム

Key words：生体の第 2 光学窓，短波赤外，蛍光イメージング，乳がん，光診断

緒　言

生体を個体レベルで非侵襲的にイメージングする方法として、MRI（核磁気共鳴画像法）、X 線 CT、PET 等は、悪性腫瘍の検出や血管造影など臨床画像診断法としてすでに実用化されているが、これらの非侵襲イメージング法では、動的な生命現象を細胞レベルで解析するには空間分解能および時間分解能の低さに問題がある。たとえば、MRI は比較的高い空間分解能（最高で約 50 μm）を有するが、時間分解能（秒から分のオーダー）が低いため細胞レベルのダイナミックな生命現象をとらえるのは困難である。また、X 線 CT、PET では放射性同位体を含む造影剤による被爆の問題が避けられず、長時間にわたる生体現象の研究には適用できない。

現在考えられる生体イメージング技術の中で、生きた個体中で細胞レベルでの生命現象を研究する方法として最も有力なのが蛍光による非侵襲イメージングである。生体深部での蛍光イメージングとして、多光子励起レーザー顕微鏡やライトシート顕微鏡が市販されているが、観察深度は最大でも 1 mm 程度である。ライトシート顕微鏡は比較的透明なゼブラフィッシュやメダカであれば個体全体を非侵襲イメージングできるが、生きたマウスの脳などの生体深部イメージングには使えない。一般に、可視光（波長 0.4〜0.7 μm）を使うイメージング法では、組織による吸収、散乱が強いため生体深部での非侵襲イメージングには限界がある。

一方、近赤外光（波長 0.7〜0.9 μm）は、可視光に比べ組織透過性に優れており、インドシアニングリーンをはじめとする近赤外蛍光プローブを用いた小動物用生体深部イメージング装置はすでに実用化されている。しかし、現在ある近赤外蛍光イメージング装置では、励起光によって生ずる組織からの自家蛍光やプローブ蛍光の多重散乱があるため、高い空間分解能での生体深部イメージングは困難である。近赤外領域における自家蛍光や多重散乱の問題を解決するには、用いる励起／蛍光波長の長波長化が必要である［1］。近赤外よりさらに波長の長い短波赤外（波長 1.0〜1.4 μm：生体の第 2 光学窓）領域では、近赤外領域に比べ生体組織からの自家蛍光、散乱が格段に小さくなり、高い空間分解能での生体深部蛍光イメージングが可能になる［1］。また、この波長の光は、従来の可視や近赤外の光にくらべ高い組織透過性と大幅な光毒性の低減が期待できる［2］。

本研究では、生体イメージングのモダリティーとしていまだ実用化されていない短波赤外蛍光イメージングのヒトへの応用を目指した技術開発を行う。そのため 1. 生体親和性の高い短波赤外蛍光有機色素の合成、2. 乳がん検出用短波赤外蛍光分子イメージング用プローブの合成、3. ヒト乳がんモデルマウスにおける短波赤外蛍光分子イメージングの研究を行う。短波赤外蛍光イメージングのヒトへの応用のための要素技術として最も重要なのは、生体で安全に使える短波赤外蛍光色素の開発である。世界的にも、生体毒性のない短波赤外蛍光色素の開発研究が盛んになっているが、ヒトでの応用が可能なプローブ開発は進んでいない。私たちは、2021 年、「生体の第 2 光学窓」における生体蛍光イメージングのための新規有機色素として、インドシアニン（ICG）系の生体親和性の高い短波赤外蛍光色素の合成に成功した［3］。また、この蛍光色素を用いた短波赤外蛍光分子イメージングプローブの開発にも成功した。本報告書では、世界に先駆けて合成に成功した短波赤外蛍光色素およびこれらを用いた短波赤外蛍光分子イメージングプローブによるヒト早期乳がんの高感度蛍光検出について報告する。

方　法

1.　合成試薬と実験動物

インドシアニングリーン（ICG）と IR-1061 は Sigma-Aldrich から購入した。IR-26 は Exciton から購入した。抗 HER2 モノクローナル抗体（ハーセプチン）および抗腫瘍剤（カドサイラ）は、中外製薬株式会社（東京、日本）から購入した。正常ヒト IgG は富士フィルム和光純薬から購入した。合成に使用した溶媒と化学薬品は、Sigma-Aldrich、東京化成工業、および富士フィルム和光純薬から購入した。すべての反応は、シリカゲルプレート（0.2 mm、Merck 60 F-254）での薄層クロマトグラフィー（TLC）によってモニターした。SiO_2ゲルカラムクロマトグラフィーはシリカゲル（Wakogel®N60、球状、38～100 μm）を使用して実施した。ヒト乳がん腫瘍細胞 KPL-4 は、川崎医科大学から提供された［4］。ヌードマウス（4 週齢のメスの BALB/c nu/nu マウス）とヘアレスマウス（4 週齢のオスの Hos：HR-1）は、日本 SLC Inc（日本）から購入した。マウスによる動物実験は、理研の実験動物の管理および使用に関するガイドラインに従って実施され、理研の動物倫理委員会によって承認された（QA2015-01-7）。

2.　短波赤外有機蛍光色素の合成

新規短波赤外有機蛍光色素である ICG-C11 および ICG-C11-NHS の合成経路は、図 1 に示した。ベンゾインドール誘導体 1 は、2 および 5 の合成の出発物質として使用した。130℃で 1 と 1,4-ブタンスルトンを反応させて化合物 2 を合成し、アセトニトリル中で 1 を 6-ブロモヘキサン酸と 2 日間還流することにより、化合物 5 を合成した。2,4-ヘキサジエンから開始して 3 段階で合成されたジアニリン中間体 3 を化合物 2 とカップリングさせ 4 を得た。さらに化合物 2 とカップリングさせて目的の短波赤外有機色素 ICG-C11 を得た。他方、化合物 5 とジアニリン中間体 3 をカップリングさせて 6 を得た。これをさらに 2 とカップリングさせ、遊離カルボン酸基を有する 7 を得た。このカルボン酸は、N-ヒドロキシスクシンイミドでエステル化され、目的の短波赤外蛍光標識剤である ICG-C11-NHS を得た。すべての化合物は、^{1}H-NMR、^{13}C-NMR、および高分解能質量分析により同定された。

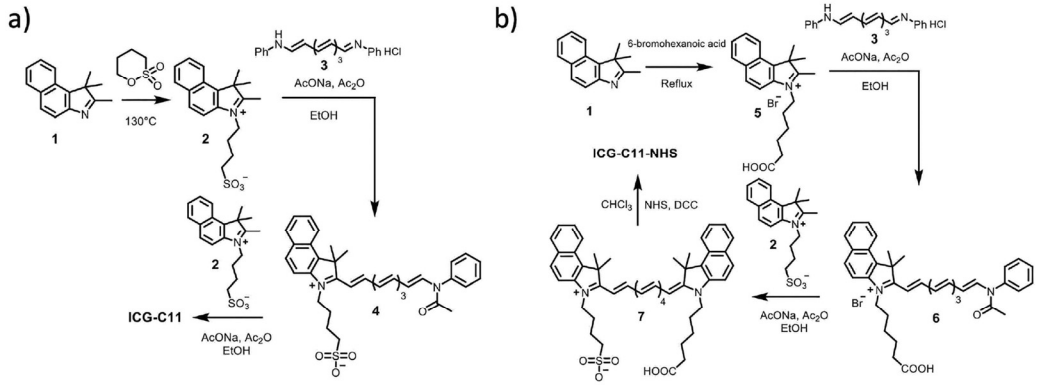


図 1．短波赤外有機蛍光色素 ICG-C11（a）および ICG-C11-NHS（b）の合成経路

3. 短波赤外蛍光イメージング

非侵襲的脳血管イメージングは、ヘアレスマウスで行った。200 μL の ICG-C11 または ICG（0.1 mg/mL、1%BSA）を、イソフルラン麻酔下でマウスの尾静脈に注射した。静注した ICG-C11 または ICG 溶液（1%BSA）は、100 μL の ICG-C11 または ICG DMSO 溶液（1 mg/mL）を 0.9 mL の BSA 水溶液（10 mg/mL）と混合して調製した。短波赤外蛍光画像は、励起波長を 785 nm、905 nm、あるいは 975 nm とし、バンドパスフィルター（900 nm および 1,100 nm）を介して取得した。レーザー出力は 20 mW/cm^{2}で、露光時間は 1～30 秒であった。乳がん腫瘍のイメージングでは、ICG-C11-抗体または ICG-抗体（抗体：2 mg/mL）の 100 μL 水溶液を、尾静脈を介して担癌ヌードマウスに注射した。乳がん腫瘍の短波赤外蛍光画像は、プローブの注入後 0、1、および 3 日後に取得した。

結果および考察

1. 短波赤外蛍光色素の光学特性

短波赤外蛍光色素 ICG-C11 の蛍光特性を、ICG および市販の短波蛍光色素である IR-1061 とともに図 2 に示した。ジメチルスルホキシド（DMSO）中での ICG、ICG-C11、および IR-1061 の最大吸収波長は、それぞれ 797 nm、1,021 nm、および 1,072 nm であった（図 2a）。ICG-C11 と IR-1061 のブロードな吸収スペクトルは、ポリエンの電子状態（非対称の電子状態）に起因しており、短波赤外領域での蛍光発光は、共役長鎖二重結合に依っている。ICG-C11 の最大吸収波長は、ポリメチン鎖（7 から 11 個の炭素原子）の延長によって ICG より 200 nm 長波長にシフトしている。また、ICG-C11 の最大蛍光波長も ICG と比較して約 200 nm 長波長にシフトしている。ICG と ICG-C11 の最大蛍光波長は、DMSO 中でそれぞれ 830 nm および 1,058 nm であった。ICG、ICG-C11、および IR-1061 の 3 つの DMSO 溶液を 785 nm で励起した場合、ICG でのみ 900 nm での蛍光発光が観察された（図 2b）。785 nm で励起した場合、ICG と ICG-C11 の 1,100 nm における短波赤外蛍光強度は同程度であった。対照的に、905 nm および 975 nm で励起した場合は、短波赤外蛍光発光は ICG-C11 および IR-1061 のみで観測された。ICG-C11 の 1,100 nm での蛍光強度は IR-1061 よりも 2 倍高かった。IR-1061（量子収率＝0.5%、ジクロロメタン中）を基準として、蛍光発光の量子収率を測定した結果、DMSO 中の ICG-C11 の量子収率は 2.1%であった（表 1）。

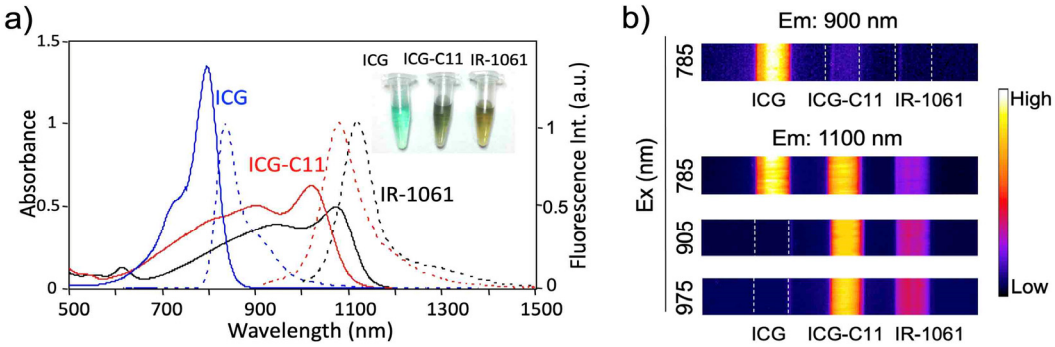


図 2. ICG および短波赤外蛍光色素 ICG-C11 および IR-1061 の光学特性

a）吸収スペクトルおよび蛍光スペクトル（DMSO 溶液）と溶液の明視野写真。

b）ICG および短波赤外蛍光色素 ICG-C11 および IR-1061 の DMSO 溶液の蛍光画像。励起波長は、785 nm、905 nm および 975 nm、蛍光の観測波長は、900 nm および 1,100 nm である。

表 1. ICG および短波赤外蛍光色素 ICG-C11、IR-1061 の吸収および蛍光特性

Fluorophore	abs (nm)	($cm^{-1}M^{-1}$)	em (nm)	SS (nm)[a]	QY(%)	Brightness (x QY)
ICG (Water)	780	17×10^4	805	25	2.4	4,080
ICG-C11 (DMSO)	1,021	7.9×10^4	1,058	37	2.1	1,659
ICG-C11 (Water)[b]	1,010	4.3×10^4	1,030	20	>0.04	>17
ICG-C11 (Water)[c]	990	3.2×10^4	1,010	20	0.13	42
IR-1061 (DCM)[d]	1,061	14×10^4	1,093	32	0.5	700

注: [a] SS：ストークスシフト [b] 1% DMSO、 [c] 1% BSA、[d] DCM：ジクロロメタン

2. 短波赤外蛍光修飾分子イメージング用プローブの作製

ICG-C11-NHS エステル（1 mg）を 1 mL の無水ジメチルスルホキシドに溶解し、その溶液の 50 μL をモノクローナル抗体の 1 mL 水溶液（10 mM Na_2CO_3 中の 2 mg の抗体、抗体：ハーセプチン［5］、カドサイラ［6］、正常ヒト IgG）と 30 分間室温で反応させることによって ICG-C11 - 抗体複合体は得られた（図 3）。ICG-C11 - 抗体複合体

の精製は、透析（透析膜 MWCO：50,000、SPECTRUM）あるいはゲル濾過（PD-10 カラム、GE Healthcare）によって行った。

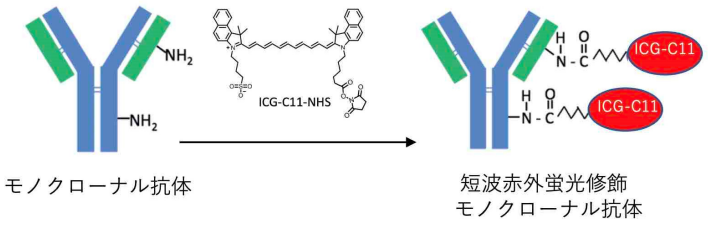


図 3. 短波赤外蛍光修飾分子イメージング用プローブの作製法

3. ヒト乳がん担持マウスにおける短波赤外蛍光イメージング

ICG-C11 結合抗体の乳がん腫瘍イメージング能を確認するために、HER2 陽性乳がん腫瘍の短波赤外蛍光イメージングを行った。まず初めに、ICG-C11 - ハーセプチンおよび ICG-C11 - カドサイラの HER2 陽性ヒト乳がん腫瘍細胞（KPL-4 細胞株）に対する特異的結合活性を確認した。図 4a には、KPL- 4 および HeLa 細胞ペレットの短波赤外蛍光画像を示している。ICG-C11 - ハーセプチンおよび ICG-C11 - カドサイラとインキュベートした KPL-4 細胞ペレットの短波赤外蛍光発光は、ICG-C11-IgG を使用したネガティブコントロール画像と比較して約 2 倍高かった。また、HeLa 細胞（HER2 陰性）については、ICG-C11 - ハーセプチン添加により短波赤外蛍光は観測されなかった。これらの結果は、ICG-C11 - ハーセプチンおよび ICG-C11 - カドサイラの KPL-4 細胞への特異的結合を示している。次に、HER2 陽性乳がん腫瘍を有するマウスの短波赤外蛍光イメージングを行った。ここでは、100 μL の ICG-C11 結合抗体を乳がん担持マウスに注入した。マウスの短波赤外蛍光画像は、プローブの注射後 0、1、および 3 日目に取得した。ICG-C11 - ハーセプチンと ICG-C11 - カドサイラ注射 1 日後には、乳がん腫瘍が明瞭にイメージングできた（図 4b）。安楽死させた後の乳がん腫瘍の短波赤外蛍光画像は、HER2 陽性乳がん腫瘍での ICG-C11 - ハーセプチンおよび ICG-C11 - カドサイラの特異的蓄積を示している（図 4c）。ICG-C11-IgG 注入マウス腫瘍からの弱い短波赤外蛍光発光は、KPL-4 細胞へのヒト IgG の非特異的結合に起因していると考えられる。これらの短波赤外蛍光イメージング結果は、乳がん腫瘍の短波赤外蛍光分子イメージングにおける ICG-C11 - 抗体複合体の分子イメージング用プローブとしての有効性を示している。

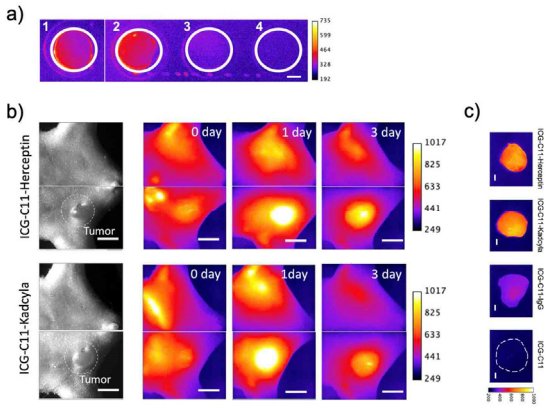


図 4. 乳がん腫瘍の短波赤外蛍光分子イメージング

a) ヒト乳がん細胞ペレット画像。
1. ICG-C11 - ハーセプチン（KPL-4）、2. ICG-C11 - カドサイラ（KPL-4）、
3. ICG-C11-IgG（KPL-4）、4. ICG-C11 - ハーセプチン（HeLa）。Scale bar：1 mm。

b) 乳がん担持ヌードマウスの短波赤外蛍光分子イメージング。Scale bar：5 mm。

c) 乳がん腫瘍の短波赤外蛍光分子イメージング。

短波赤外蛍光色素 ICG-C11 は、生体での短波赤外蛍光イメージングを行うのに十分な蛍光輝度を有している。また、短波赤外蛍光ラベル化剤 ICG-C11-NHS は、抗体ベースの短波赤外蛍光分子イメージングプローブの作製に非常に有用であり、ICG-C11 結合ハーセプチンおよびカドサイラは、HER2 陽性乳がん腫瘍の短波蛍光分子イメージングプローブとして機能することをマウス実験で実証した。本研究結果は、π共役拡張型 ICG を短波赤外蛍光プローブとした短波赤外蛍光イメージングシステムが、ヒト乳がんの光診断などに医療応用可能であることを示している。

共同研究者

本研究の共同研究者は、理化学研究所生命機能科学研究センターのマハデヴァ・スワミー研究員、坪井節子技術職員および北海道大学大学院理学研究科化学生物学研究室の門出健次教授、村井勇太助教である。

文　献

1) Tsukasaki Y, Morimatsu M, Nishimura G, Sakata T, Yasuda H, Komatsuzaki A, Watanabe T. M, Jin T. Synthesis and Optical Properties of Emission-Tunable PbS/CdS Core−Shell Quantum Dots for In Vivo Fluorescence Imaging in the Second Near-infrared Window. RSC Adv. 2014, 4, 41164−41171. DOI:10.1039/C4RA06098A.
2) Smith A. M, Mancini M. C, Nie S. Second Window for In Vivo Imaging. Nat. Nanotechnol. 2009, Nov; 4(11): 710-1. PMID: 19898521 nPMCID: PMC2862008 DOI: 10.1038/nnano.2009.326.
3) Swamy Mahadeva M M , Murai Y, Monde K, Tsuboi S, Jin T, Shortwave-Infrared Fluorescent Molecular Imaging Probes Based on π-Conjugation Extended Indocyanine Green. Bioconjugate Chem. 2021, Aug 18; 32(8): 1541-1547. Epub 2021 Jul 26. PMID: 34309379 DOI: 10.1021/acs. bioconjchem.1c00253.
4) Kurebayashi J, Otsuki T, Tang C. K, Kurosumi M, Yamamoto S, Tanaka K, Mochizuki M, Nakamura H, Soono H. Isolation and Characterization of a New Human Breast Cancer Cell Line, KPL-4, Expressing the Erb B Family Receptors and Interleukin-6. Br J Cancer, 1999 Feb; 79(5-6): 707-17. PMID: 10070858 PMCID: PMC2362677 DOI: 10.1038/sj.bjc.6690114.
5) Baselga J, Norton L, Albanell J, Kim Y. M, Mendelsohn J. Recombinant Humanized Anti-HER2 Antibody (Herceptin) Enhances the Antitumor Activity of Paclitaxel and Doxorubicin against HER2/neu Overexpressing Human Breast Cancer Xenografts. Cancer Res. 1998, Jul 1; 58(13): 2825-31. PMID: 9661897.
6) Baron J. M, Boster B. L, Barnett C. M. Ado-Trastuzumab Emtansine (T-DM1): A Novel Antibody-Drug Conjugate for the Treatment of HER2-Positive Metastatic Breast Cancer. J Oncol Pharm Pract. 2015, Apr; 21(2): 132-42. PMID: 24682654 DOI: 10.1177/1078155214527144.