

技術報告

重水素化りん光プローブの開発

Development of Deuterated Phosphorescence Probe

杉山陽子*

SUGIYAMA Yoko

イリジウム錯体を用いた光イメージングは、低酸素環境でりん光を示す特性を利用し、生体中で他の細胞よりも低酸素環境であるがんを選択的に検出することのできる新しい技術である。用いる錯体をりん光プローブと呼ぶ。配位子の構造を変えるとイリジウム錯体は、生体透過性のよい近赤外領域にりん光を示すことができる。

以前より有機 EL の発光材料開発の分野でイリジウム錯体の重水素化（水素を重水素に置き換えること）によるりん光量子収率(Φ_p)の向上やりん光寿命(τ_p)の長寿命化は報告されてきた^{1), 2)}。本報ではりん光プローブの性能を向上させることを目的としてイリジウム錯体中の重水素化に着目した。

今回赤色発光を呈する $\text{Ir}(\text{btp})_2\text{acac}$; $(\text{Bis}[2-(2'\text{-benzothienyl})\text{-pyridinato-}N, C3'](\text{acetylacetonato})\text{iridium})$ をターゲット化合物とし、重水素化イリジウム錯体の合成法開発と基礎的な発光特性評価を実施した。重水素化部位の違いによる発光特性への影響を検証するため、重水素化パターンを変えた錯体 3 種を合成し比較検証を行った結果、重水素化錯体の発光性能の向上だけでなく、重水素化部位の違いにより発光性能に差異が生じることが明らかとなった。

We have been studying a novel optical imaging technique using iridium complex as phosphorescent probe. Phosphorescence is quenched by oxygen then hypoxia region such as cancers exhibit phosphorescent. With specific structure of the ligand, the iridium complex can show phosphorescence in the near-infrared region. However molecular design to improve emitting performance is difficult without keeping basic structure of the ligand.

In the field of OLED, increase of luminous efficiency by substituting hydrogen in ligand to deuterium are reported^{1), 2)}. We examined the improvement of emission performance by deuteration on an iridium complex.

In this study, we focused $\text{Ir}(\text{btp})_2\text{acac}$; $(\text{Bis}[2-(2'\text{-benzothienyl})\text{-pyridinato-}N, C3'](\text{acetylacetonato})\text{iridium})$. We prepared three patterns of deuterated complexes and compared to non-deuterated complexes.

1. はじめに

分子イメージング技術は、生体内の種々の生理現象や病態細胞を可視化する技術である。中でも光によるイメージングは、発光分子を用いて生体外から光を照射し、分子から得られる発光をもとに様々な情報を可視化する³⁾。MRI などと比べると比較的感度がよく装置が簡便であり、生きた細胞や組織の様子を非侵襲的にリアルタイムに観測できるという特徴を有する^{3), 4)}。

本報告では、酸素により消光するりん光を用いて、がん細胞や組織をイメージングするりん光プローブの

重水素化の開発について報告する。

がん組織は正常組織に比べ低酸素環境であることが知られている。飛田ら⁴⁾は、低酸素環境で強く発光する金属錯体であるイリジウム錯体を細胞や生体内に投与し、その発光を利用してがんを検出するイメージング法を考案し、イリジウム錯体をりん光プローブとした応用研究を進めている。

発光には、励起一重項状態からの放射遷移によって起こる蛍光と、励起三重項状態からの放射遷移によって起こるりん光がある。りん光は蛍光に比べ、励起状態の寿命が長いので、励起寿命の間に周囲の酸素と衝突

* 開発本部 つくば研究所 化学合成技術部 合成技術課

突し消光が起こる。つまり、酸素が存在すると発光が弱くなる。この現象を利用し、低酸素領域であるがん細胞や組織をりん光により選択的に光イメージングすることが可能となる。

本研究では、りん光プローブの性能を向上させるためにイリジウム錯体の重水素化に着目した。水素原子を置換した重水素は水素の2倍の質量数を有するため種々の物性に变化をもたらすことが知られており、有機 EL 発光材料の開発分野ではイリジウム錯体の重水素化によるりん光量子収率(Φ_p)の向上やりん光寿命(τ_p)の長寿命化等の発光性能の向上はすでに報告されている¹²⁾。りん光プローブも重水素化を行うことで Φ_p や τ_p の向上が期待でき、高感度の光イメージングや添加する試薬量の低減につながると考えた。

2. 実験

2.1 ターゲット化合物

ターゲットのイリジウム錯体の構造式を Fig.1 に示す。生体透過性の比較的良好な赤色発光を示す Ir(btp)₂acac; Bis[2-(2'-benzothiophenyl)pyridinato-N,C3'](acetylacetonato)iridium で、その発光特性をつかさどる部位は Fig.1 中 [] 内に示す btp; (2-(2-Pyridyl)benzo[b]thiophene)配位子である。acac (acetylacetonate)配位子は補助配位子で発光特性にほとんど影響しない。群馬大学で基礎評価が十分に行われ、また発光特性に影響を与えない acac 配位子を変化させることで生体親和性をコントロールできる応用性が高い化合物であり、りん光量子収率やりん光寿命が比較的小さいため、重水素化により発光性能が向上する見込みが高いことから今回のターゲットとした。

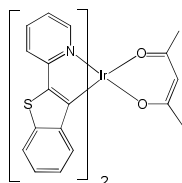
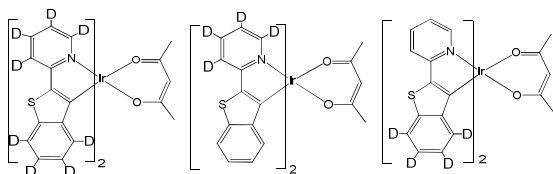


Fig.1 Chemical structure of Ir(btp)₂acac.

重水素化合物の構造式を Fig.2 に示す。重水素化部位の違いによる発光特性への影響を検証をするため、重水素化パターンを変えた3種類の配位子(btp-d₈, btp-d₄py, btp-d₅bt)を合成した。



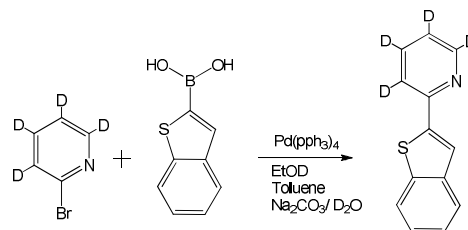
Ir(btp-d₈)₂acac Ir(btp-d₄py)₂acac Ir(btp-d₅bt)₂acac

Fig.2 Chemical structures of Ir(btp-d_x)₂acac (x=8, 4py, 4bt).

2.2 重水素化物の合成

Ir(btp-d₄py)₂acac は配位子である btp-d₄py を合成した後、錯体化した。それぞれ Scheme 1, Scheme 2 に示す。

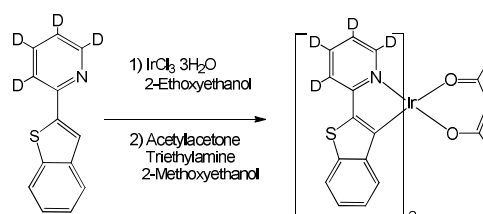
【btp-d₄py の合成】



Scheme 1 Synthesis of btp-d₄py.

2-Bromopyridine-d₄ と Benzo[b]thiophene-2-boronic acid に、Ethanol-OD, Toluene, Tetrakis(triphenyl phosphine) palladium(0), Sodium carbonate を重水に溶解した水溶液を加え攪拌した。Ar 雰囲気下で一晩加熱還流した。室温に冷却後、重水を加えた。Chloroform を入れ混合液を洗浄し濃縮乾固した。シリカカラムクロマトグラフィー[展開溶媒; Chloroform (100)]で精製し白色粉末を得た。(反応収率 94.1%, 重水素化率>99 atom%D) ¹H-NMR (400 MHz δCDCl₃)による同定結果: 8.64, 7.88-7.79(m), 7.73, 7.38-7.32(m), 7.20

【Ir(btp-d₄py)₂acac の合成】



Scheme 2 Synthesis of Ir(btp-d₄py)₂acac.

btp-d₄py と Iridium(III) chloride trihydrate を 2-Ethoxyethanol 水溶液に懸濁させ、一晩還流を行った。室温に冷却後、溶媒を留去し Chloroform と Hexane を加え固体を析出させた。固体をろ過し、塩素架橋二核錯体を得た。Acetylacetonate, Triethylamine, 2-Methoxyethanol に溶解させ N₂ 雰囲気下で 2 時間還流した。室温に冷却後、溶媒を減圧留去した。得られた粗生成物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー[展開溶媒; Chloroform (100)]で精製した後、リサイクル分取 HPLC にて精製を行った。

(反応収率 23.1 %, 重水素化率>99 atom%D)
¹H-NMR (400 MHz δCDCl₃)による同定結果：
 8.45, 7.86–7.80(m), 7.67–7.65(m), 7.10–7.06(m),
 6.84–6.80(m), 6.18–6.16(m), 5.35, 5.30, 1.81

Ir(btp-*d*₈)₂acac は、2-Bromopyridine-*d*₄ と Benzo[b]thiophene-2-boronic acid-*d*₅ を用いて同様に合成した。

Ir(btp-*d*₄bt)₂acac は、2-Bromopyridine と Benzo[b]thiophene-2-boronic acid-*d*₅ を用いて同様に合成した。

核磁気共鳴 (NMR) 分析にて構造の確認と重水素化率の算出を実施した。すべての錯体で>97.0 atom%D の重水素化率で合成できたことを確認した。

3. 結果および考察

3.1 発光特性評価

Ir(btp)₂acac, Ir(btp-*d*₈)₂acac, Ir(btp-*d*₄py)₂acac, Ir(btp-*d*₄bt)₂acac の基本的な発光特性として、THF(tetrahydrofuran)中、脱気下での吸収スペクトル, りん光スペクトル, りん光量子収率(Φ_p), りん光寿命(τ_p)の測定をした。

Fig.3 に Ir(btp)₂acac, Ir(btp-*d*₄py)₂acac の吸収スペクトル, りん光スペクトルを示す。吸収スペクトルでは 486 nm, りん光スペクトルでは 616 nm にそれぞれ極大波長を示した。いずれの重水素化パターンでも同様のスペクトル形状を示すことが分かった。

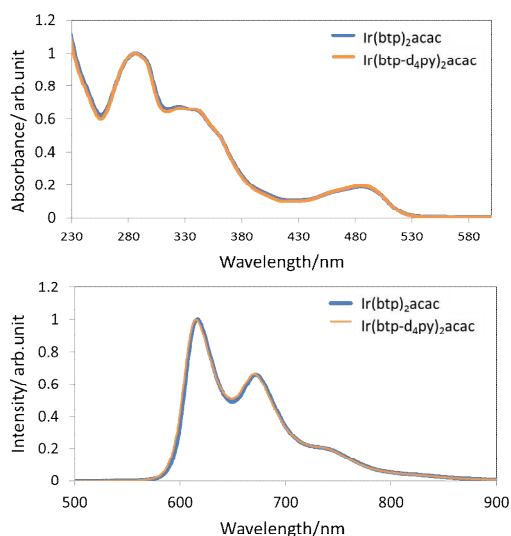


Fig.3 Absorption and phosphorescence spectra of Ir(btp-*dx*)₂acac (*x*=0, 4py).

Φ_pおよびτ_pをそれぞれ絶対発光量子収率測定およびりん光減衰曲線から決定した。結果を Table 1 に示す。

Table 1 Photophysical parameters of Ir(btp-*dx*)₂acac in THF at room temperature under degassed condition (*x*=0, 8, 4py, 4bt).

Compound	λ _{max(abs.)} /nm	λ _{max(phos.)} /nm	Φ _p	τ _p /μs	Increase rate of Φ _p /%	Increase rate of τ _p /%
Ir(btp) ₂ acac	486	616	0.32	5.71	-	-
Ir(btp- <i>d</i> ₈) ₂ acac	486	616	0.47	8.21	47	44
Ir(btp- <i>d</i> ₄ py) ₂ acac	486	616	0.43	7.48	34	31
Ir(btp- <i>d</i> ₄ bt) ₂ acac	486	616	0.35	6.11	9.3	7.0

Φ_p, τ_p は Ir(btp)₂acac を基準に比較すると, 最も効果のあった化合物はすべて重水素化した Ir(btp-*d*₈)₂acac で, 最大 40 %以上の性能向上となった。ピリジル基のみを選択的に重水素化した Ir(btp-*d*₄py)₂acac でも最大 30 %以上の性能向上が観測された。重水素化部位による発光性能の差異が生じることが明らかとなった。

上述のΦ_p, τ_pから, 式(1), 式(2)を用いてりん光放射失活速度定数(k_p), 無放射失活速度定数(k_{isc}')を算出した。結果を Table 2 に示す。

$$k_p = \frac{\Phi_p}{\tau_p} \dots(1) \quad k_{isc}' = \frac{1-\Phi_p}{\tau_p} (\Phi_{isc} \approx 1) \dots(2)$$

k_p では重水素化による差異はほぼ生じなかった。無放射失活速度定数である k_{isc}'では, Ir(btp)₂acac と比較するとすべて重水素化した Ir(btp-*d*₈)₂acac で最大 45 %, Ir(btp-*d*₄py)₂acac では 36 %減少した。重水素化することで無放射失活過程を抑制することができたといえる。

Table 2 Kinetic parameters of Ir(btp-*dx*)₂acac in THF at room temperature under degassed condition (*x*=0, 8, 4py, 4bt).

Compound	k _p /10 ⁵ s ⁻¹	k _{isc} ' /10 ⁵ s ⁻¹	Decrease rate of k _{isc} ' /%
Ir(btp) ₂ acac	0.56	1.19	-
Ir(btp- <i>d</i> ₈) ₂ acac	0.57	0.65	45
Ir(btp- <i>d</i> ₄ py) ₂ acac	0.58	0.76	36
Ir(btp- <i>d</i> ₄ bt) ₂ acac	0.57	1.06	11

重水素の数が同じ錯体 Ir(btp-*d*₄py)₂acac と Ir(btp-*d*₄bt)₂acac を比較すると, Φ_pとτ_pの値に差が出た。ピリジル基を重水素化した btp-*d*₄py の方が, ベンゾチエニル基を重水素化した btp-*d*₅bt を配位子として用いるより, 発光性能の向上に効果的であった。

一般にイリジウム錯体のりん光は中心金属から配位子への電子遷移 ³MLCT(metal to ligand

charge transfer)および配位子間の電子遷移である $\pi-\pi^*$ と帰属されているが, $\text{Ir}(\text{btp})_2\text{acac}$ のりん光は btp 配位子間の $\pi-\pi^*$ の寄与が高いと帰属されている⁵⁾。よって, 配位子の電子状態が発光特性に大きく影響するといえる。結果からベンズチエニル基より, ピリジル基の方が発光特性に対する寄与率が高いことが分かった。発光特性への寄与が高い部位が予測できれば効率的な合成法開発, コスト削減が可能となる。

4. 今後

重水素化により無放射失活の抑制が起きた理由としては, 川西らの報告では C-H, C-D 振動波数の差によるものと推察されている¹⁾。C-H 結合は振動波数が $2900-3000\text{ cm}^{-1}$ に対し, H の 2 倍の質量をもつ D との C-D 結合では $2000-2100\text{ cm}^{-1}$ と波数が小さくなり, 波動関数の重なりも小さくなる。励起三重項状態から基底状態への失活は波動関数の重なりに依存するため, 無放射失活が遅くなり発光性能の向上に寄与したと考えられる。今後は, C-D 振動波数と無放射失活速度定数の相関性について分子シミュレーションを実施して検証する予定である。

5. おわりに

イリジウム錯体の骨格の一部のみを重水素化することで発光性能の向上が観測され, 効果的な重水素部位を特定できた。これにより, 重水素化イリジウム錯体をりん光プローブに展開していく上で, 高感度の光イメージングや添加する試薬量を低減できる可能性だけでなく, 重水素化材料の使用量削減にも繋がる有効なデータとなった。

重水素化りん光プローブとして実用に近づけるためには, 発光性能の向上と並行して補助配位子を細胞親和性のよい骨格に改良し, がん細胞や組織中での評価をしていく必要がある。

6. 謝辞

重水素化りん光プローブのターゲット化合物の選定と発光特性評価にご協力いただいた, 群馬大学 飛田成史教授, 吉原利忠准教授をはじめとする研究室の皆様へ感謝の意を表します。

参考文献

- 1) 川西祐司, 宮沢 哲, 安倍太一. 電子デバイス用重水素化合物. *Organic Square* 36, 2-3, 2011.
- 2) T. Abe, A. Miyazawa, H. Konno and Y. Kawanishi. *Chem Phys Lett.*, 91, 199-202, 2010.
- 3) 梅田 泉, 藤井博史. 臨床応用をも目指した分子イメージング研究の現状と今後の展望. *目耳鼻*, 116, 933-940, 2013.
- 4) 飛田成史, 吉原利忠, 穂坂正博, 竹内利行. りん光プローブの設計・開発に基づく *in vivo* 低酸素環境イメージング. *実験医学*, 30, 82-88, 2012.
- 5) 徳丸克己. 光エレクトロニクスのための「光化学の基礎」(7). *現代化学*, 65, 2006.