

にがり成分の生体内代謝吸収過程の簡便イメージング法の開発： ナノ粒子型蛍光プローブによるにがり成分のイメージング

榎本 秀一，神野 伸一郎

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科

概要 【緒言】従来の蛍光プローブは、ターゲット分子に集積することで、蛍光強度が著しく減弱する濃度消光の性質を有しているため、測定濃度範囲を狭めることや、光透過性を低下させるなどの理由から、生体内蛍光イメージングでの利用は殆どなされていない。特に、にがりのような高濃度試料に由来する微量元素の生体内蛍光イメージングは、上記の面から、非常に困難なことが予想されるため、これら問題点を抜本的に解決可能な新たな蛍光団の創製が必要となる。今回、集積に応じて蛍光シグナルが定量的に増加するよう蛍光団の創製を目指し、凝集に伴い蛍光強度が増加する凝集誘起発光特性 (Aggregation-Induced Emission Enhancement; AIEE) 分子を有する新たな有機系蛍光色素の創製と、金属イオン検出用蛍光イメージングプローブの開発を行った。

【分子設計】まず蛍光団の基本骨格をローダミン類とした。ローダミン系色素は、凝集による消光が顕著なカチオン性色素である一方、高度な π 電子系を有し、発光時の量子収率が高く、蛍光域も長波長であるため、AIEE を有することができれば非常に魅力的な蛍光団となる。続いて AIEE 分子の設計にあたり、(1) 蛍光団部位の伸長、(2) 凝集時の蛍光団の構造的剛直化の2点に注目し、単量体時の発光団の構造的歪みが、凝集に伴い部分的に解消され、構造的な剛直性が高まることで発光するといった作業仮説をたてた。これらを証明するにあたり、筆者はベンゾフェノン誘導体とレゾルシノールの溶融加熱反応において、新たなタイプのローダミン系色素であるアミノベンゾピロキサンテン系色素 (ABPX) が生成することを見出し、これまで 6 種の誘導体の合成に成功した。

【結果と考察】今回得られた ABPX の蛍光スペクトルを各種溶媒中で測定することで AIEE 評価を行った。その結果、ABPX は高濃度になるに従い蛍光強度が上昇し、既存のローダミン系色素とは反対の蛍光特性を示したことから、AIEE を有することが示唆され、ABPX の蛍光性のオンとオフを、凝集という物理現象で制御できることを示した。また溶液中の ABPX は、ナノメートルサイズの粒子体が発光していることが分かり、その蛍光の波長域は、赤色から近赤外域 (600 nm ~ 850 nm) であった。凝集に応じて発光性が増大する新しい有機系蛍光色素のアミノベンゾピロキサンテン系色素 (ABPX) の開発と、金属イオン配位能を有する 3 種の新規 ABPX 誘導体の開発に成功した。発光型ナノ粒子の ABPX は、生体透過性の高い蛍光波長域を有し、蛍光強度と濃度の検量線範囲が広いといった特徴を有するため、にがりのような高濃度試料に由来する微量元素の分析に適した *in vivo* 用蛍光イメージングプローブとなる可能性がある。

1. 研究の背景と目的

近年、生体内の微量元素が、生命の維持に大きく関与していることが明らかにされる中、製塩の副産物であるにがりには、マグネシウム、カルシウム、鉄やマンガンなどの微量元素の重要性が注目されている。これら金属イオンの分析法は、比色法や原子吸光光度法などが主であり、生

体内挙動などをリアルタイムに解析できる分析法は、極めて少ないのが現状である。昨今、分子イメージングの技術革新は目覚ましく、疾患の診断や治療のモニタリング等に威力を発揮するツールであることが明らかにされ、有用な分子イメージングプローブの創製とイメージング機器の開発は急務となっている。その中で、蛍光イメージング法は、

高い空間解像度を有したリアルタイム解析であり、簡便で迅速性や経済性も優れているため、近年注目されている分子イメージング技術で、多くの有機系蛍光色素分子が蛍光プローブとして開発されている。しかしながら、従来の蛍光プローブは、ターゲット分子に集積することで、蛍光強度が著しく減弱する濃度消光の性質を有しているため、ターゲット分子の分析の際、測定濃度範囲を狭めることや、光透過性を低下させるなどの理由から、生体内蛍光イメージングでの利用は殆どなされていない。殊の外、にがりのような高濃度試料から由来する微量元素の生体内蛍光イメージングは、上記の面より、非常に困難なことが予想されるため、これら問題点を抜本的に解決できる新たな蛍光団の創製が切望されている。

本来、分子イメージング技術は“ターゲット部位に集積する分子プローブを可視化する”ことが基本的な概念であるため、集積に応じて蛍光シグナルが定量的に増加するよう蛍光団を創製することが理想である。そこで筆者らは、色素分子の凝集が蛍光制御のキーファクターになると考えた。即ち、色素分子の凝集に伴い蛍光強度が増加する凝集誘起発光特性 (Aggregation-Induced Emission Enhancement; AIEE) を有する有機系蛍光色素分子を新たに創製し、AIEE を蛍光のオンとオフを制御する光スイッチング原理とすることができれば、ターゲット分子への集積の度合いをイメージングできる新たな蛍光プローブとなると考えた。これらの背景を踏まえ、今回 AIEE を有する新たな蛍光団の創製と、にがり中に含まれる金属イオン検出用蛍光イメージングプローブの開発を目指し、本研究に着手した。

2. 研究方法

使用試薬及び使用溶媒はいずれも試薬特級品を精製せずにそのまま用いた。融点は微量融点測定器 (柳本製作所) で測定し、未補正值である。UV スペクトルは島津 UV-1700 型分光光度計、蛍光スペクトルは日立 F-4500 型分光光度計を用いて測定し、ローダミン B 及び副標準光源によりスペクトル補正を行った。また表面測光方式には透過穴付試料ホルダを利用し、多次光を除く目的でカットフィルターを利用した。MS は JEOL JMX-700 を用いて測定した。また、 ^1H 及び ^{13}C -NMR スペクトルは Varian XL-300 spectrometer (300 MHz, 75.4 MHz) 及び Varian UNITY INOVA 500 spectrometer (500 MHz, 125.7 MHz) を用いて、TMS を内部標準として測定した。カラムクロマトグラフィーには、シリカゲル 60 (Merck) を使用した。薄層クロマトグラフィー (TLC) は、シリカゲル 60 (Merck) を用い、検出には UV、ヨウ素及びリンモリブデン酸を検出試薬として使用した。

3. 研究結果と考察

3.1 分子設計

蛍光団の基本骨格をローダミン系色素とした。ローダミン系色素は、凝集による消光が顕著なカチオン性色素である一方、高度な π 電子系を有し、蛍光量子収率が高く、発光域も長波長であるため、AIEE を有することができれば非常に魅力的な発光団となる。続いて AIEE 分子の設計にあたり、(1) 発光団部位の伸長、(2) 凝集時の発光団の構造的剛直化の2点に注目し、Fig. 1 に示すように、単量体時の発光団の構造的歪みが、凝集に伴い部分的に解消され、構造的平面性と剛直性が高まることで発光するといった作業仮説をたてた。これらを証明するにあたり、筆者らはベンゾフェノン誘導体とレゾルシノールのルイス酸

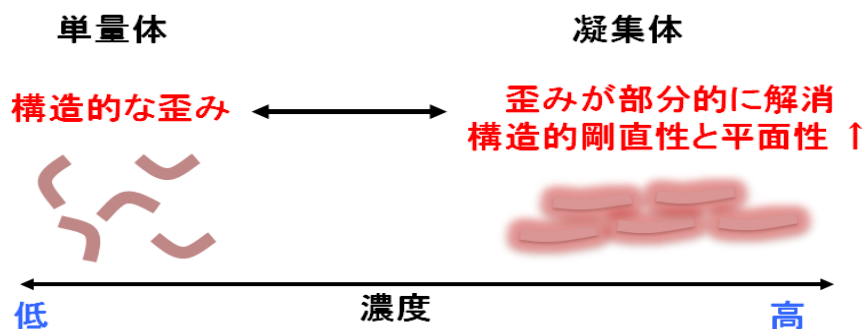


Fig. 1. Design concept of luminophore with aggregation -induced emission enhancement

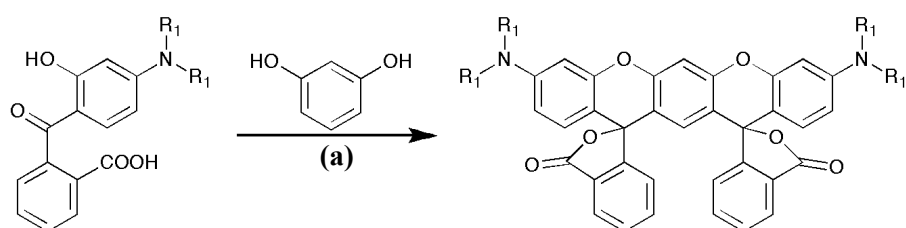
存在下での溶融加熱反応において、新たなタイプのローダミン系色素であるアミノベンゾピロキサテン系色素 (ABPX) が生成することを世界で初めて見だし、その化学構造を明らかにした。

3. 2 ABPX の合成

ABPX01 の合成法の構築にあたり、ベンゾフェノン誘導体 (BPs) を *N,N*-ジエチル 3-メキシアニリンと無水フタル酸による Friedel-Crafts Acyl 化反応より合成した。続いて **Scheme 1** に示すように、BPs とレソルシノールとの 95°C での加熱縮合反応を、触媒としてメタンスルホン酸を用い検討した。その結果、BPs とレソルシノールの化学両論比が 2 : 1 のとき、ABPX01 を 86%、非対称型の Rhodol 化合物

が 14% の割合で生成し、ABPX01 の収率は 72.4% であった。

ローダミン系色素は、容易に凝集体を形成し、かつ電荷共鳴構造を有するため分離精製が困難で、逆相クロマトグラフィーによる分離が一般的である。一方、ABPX01 は **Fig. 2** に示すように溶液の pH 変化に伴いラクトン環の開閉が起こり、共役型で水溶性のカチオン構造と非共役型で非水溶性のラクトノイド構造の 2 つの解離種を形成することが予想される。そこで今回、抽出操作に工夫を加えることで精製分離が容易となった。即ち、強塩基性条件下 (pH 11~12) で反応後の粗化合物を攪拌し、ラクトノイド構造として ABPX01 を有機相へ分配抽出した後、シリカゲル



Scheme 1. Synthetic route of ABPX. ABPX01: $R^1 = -C_2H_5$, ABPX02: $R^1 = -C_3H_7$, ABPX03: $R^1 = -C_4H_9$, ABPX04: $R^1 = -C_6H_{13}$. (a) CH_3SO_3H , 95°C, 2hrs.

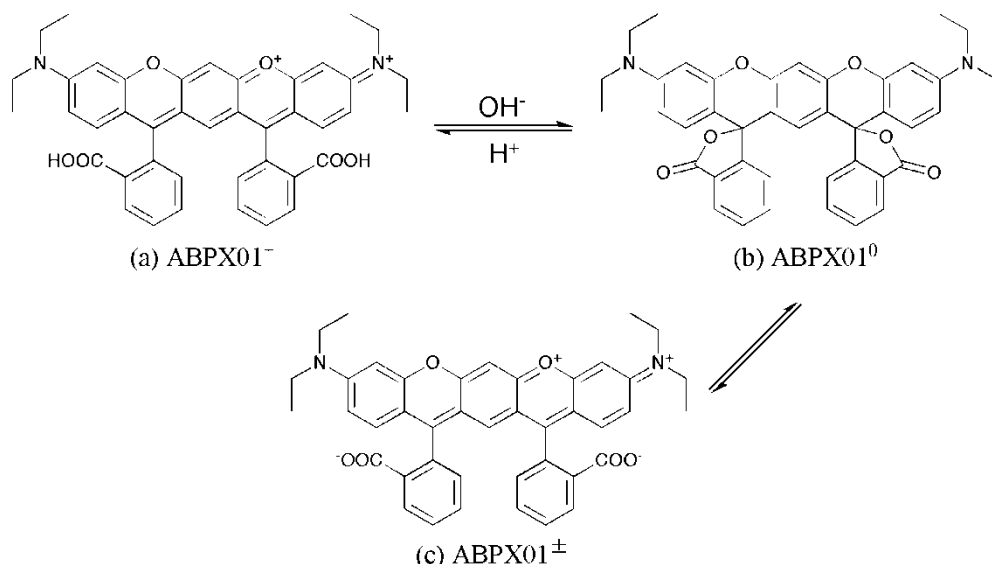


Fig. 2. Structure of ABPX01. ABPX01 is expected to exist in solution in an ionic form, namely, (a) cationic (colored) form $ABPX01^+$, (b) a neutral lactonoid (colorless) form $ABPX01^0$, and (c) zwitterionic (colored) form $ABPX01^\pm$. The cationic form $ABPX01^+$ as the resonance formation is appropriate for the evaluation of AIEE. Therefore, trifluoroacetic acid (TFA) was added to ensure protonation and prevent pseudobase formation.

クロマトグラフィーで展開液にジクロロメタン/メタノールを用いることで、容易に分離精製することができた。また副生成物の Rhodol 誘導体は弱酸性条件下で溶媒抽出することで ABPX01 と分離が可能であった。

3.3 ABPX01 のハロクロミズム

Fig. 3 に示したように、ABPX01 は、カルボン酸の解離に伴うラクトン環の開閉が起こり、発色(カチオン型)と無色(ラクトノイド型)の可逆的な色変化を示すハロクロミズム現象が予想される。そこで、ABPX01 を 1.0、5.0、10% トリフルオロ酢酸/テトラヒドロフラン混合溶液に溶解した場合、THF 単独溶液及び 1.0 % トリエチルアミン/テトラヒドロフラン混合溶液に溶解した場合の吸収スペクトル及び発光スペクトルを測定し比較検討した。その結果、Fig. 3 に示すようにテトラヒドロフラン単独及び 1.0% トリエチルアミン/テトラヒドロフラン混合溶液では、吸収及び発光スペクトル共に観察されず無色無蛍光であった。一方、トリフルオロ酢酸/テトラヒドロフラン混合溶液では蛍光は得られなかったのに対し、橙色に呈し 490 nm 及び 540 nm 付近に極大吸収が得られ、トリフルオロ酢酸の濃度依存性はほとんどみられなかった。これらの現象は可逆的であったため、ABPX01 の酸塩基平衡に伴うハロクロミズムを起こすことが確認できた。以上の結果より、発光及び発色性の検討

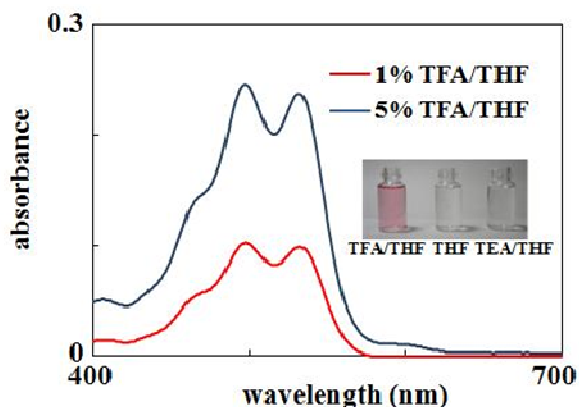


Fig. 3. Effect of protolytic reaction on absorption spectra of ABPX01 in TFA/THF solutions. TFA: trifluoroacetic acid, TEA: triethylamine. Inset: photograph of the solutions under room light. In strong acid solution, the absorbance spectra having two peaks at 490 nm and 540 nm should be attributable to the cationic species ABPX01⁺. In THF and alkaline solutions, the spectra had no peaks that were attributable to the neutral lactonoid species ABPX01⁰.

は共役型のカチオン型構造で行う必要性が示唆されたため、以後の AIEE の評価は、トリフルオロ酢酸 (TFA) を含有した強酸性中で行った。

3.4 ABPX01 の凝集誘起発光特性

ABPX01 濃度に対する蛍光強度の変化を蛍光光度法により検討し、従来のローダミン系色素と比較検討した。

Fig. 4(a) に示すように ABPX01 は 630 nm 付近に単量体、670 nm 付近に凝集体と推察される蛍光波長ピークが観察された。また凝集体のピークは濃度の上昇に伴い、蛍光強度が増加したことから、ABPX01 は、凝集誘起発光特性 (Aggregation-Induced Emission Enhancement: AIEE) を示すことが示唆され、これら蛍光波長は 590~850 nm 付近まで非常に広範囲であった。続いて、濃度の増加に伴う ABPX01 の凝集体と単量体の蛍光強度比を算出したところ、凝集体の蛍光強度比が濃度依存的に増加する傾向を示した。上記結果より、濃度の上昇に伴い ABPX01 のモルフォロジーが変化し、それらが蛍光波長に影響することが推察された。一方、Fig. 4(c) と (d) に示すように、ローダミン B とローダミン 6G は、低濃度域で単量体の蛍光波長ピークが観察され、いずれも 628 nm と 605 nm 付近に凝集体とみられる蛍光波長ピークが観察されるとともに消光現象が観察された。また ABPX は、ローダミン系色素と比較し、低濃度域においても凝集体を形成しやすいことが分かった。

3.5 AIEE による ABPX01 の光スイッチング

ABPX01 は有機溶媒に容易に溶解するのに対し、水には溶解しにくい性質を有する。そこで ABPX01 を易溶媒であるテトラヒドロフラン (THF) 溶液に溶解し、その THF 溶液に水を段階的に加えていくことで凝集体を生成させ、水/THF 混合溶液中での蛍光スペクトルを測定した。その結果、Fig. 5(a) に示すように、THF 単独、10%、20% では無蛍光であったが、30% 以上より水の割合に依存して蛍光が増加し、凝集による蛍光の “on-off 制御” が可能であることが示された。また 50 μM での ABPX01 の水/THF 混合溶液中での吸収スペクトルを測定したところ、Fig. 5(c) に示すように、水の割合が 20% までは 495 nm 及び 535 nm 付近の短波長側に、双峰性の吸収極大を示したのに対し、30% 以上のとき 600 nm 付近の吸光度の上昇がみられた。また 650 nm 以上にミー散乱効果による level-off tails が確認されたことから、凝集体の生成が示唆された。

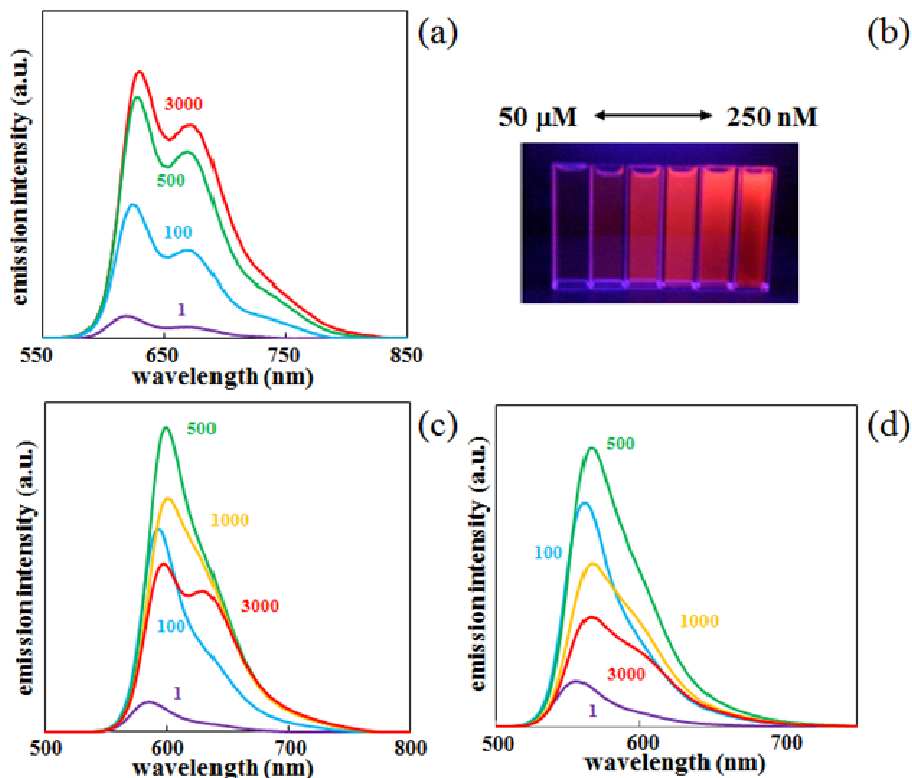


Fig. 4. (a) Emission spectra at various concentration of ABPX01, (b) photographs of ABPX solution under 365 nm irradiation. Emission spectra at various concentration of (c) Rhodamine B and (d) Rhodamine 6G. ABPX01⁺ enhanced the emission intensity while rhodamine B and rhodamine 6G were quenched as the concentration was increased. TFA: trifluoroacetic acid.

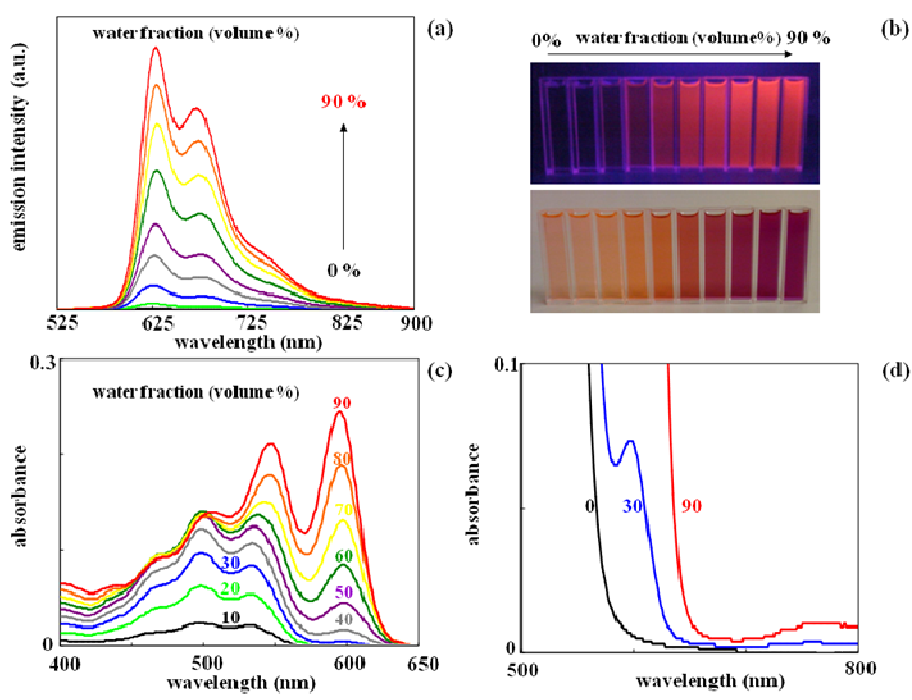


Fig. 5. (a) Emission spectra of 500 μM of ABPX01⁺ in water/THF mixtures by surface photometric method. (b) Photograph of the solutions, top: under 365 nm irradiation, bottom: under room light. (c) Absorption spectra of 5 μM of ABPX01⁺ in water-THF mixtures. (d) Level-off tails in 0%, 30%, and 90% water/THF mixtures owing to the Mie scattering effect. Emission and absorption spectra of ABPX01⁺ were measured immediately after preparation, respectively.

3. 6 ABPX01 のクロミズム

先の AIEE の評価に際し ABPX01 の単量体時の構造的な歪みや分子内運動が、凝集時に解消され、RIR や構造的な剛直性が高まることで発光性が増すと仮定した。そ

こで本作業仮説を立証するために以下のクロミズム実験を行った。

まず、溶媒の粘性の違いによるビスクロミズム実験を行った。即ち、粘性を高くするにつれ、ABPX01 の分子内

回転はより緩やかになるため構造的な剛直性が増し、蛍光強度の増大が予想される。グリセロールの 25°C における粘性は、メタノールと比較し約 1720 倍もあり、非常に高い粘性を持つ溶媒であるため、500 μM の ABPX01 をメタノールに溶解し、グリセロールを加えていった際の蛍光スペクトルを測定した。Fig. 6(a) に示すようにグリセロールの割合が 70% までは蛍光強度は緩やかに増大したが、80% 以上で急激な蛍光強度の増大がみられた。

次に、温度を下げることで ABPX01 の RIR と蛍光強度の変化を検討した。今回、単独で AIEE を示し、さらに低温で溶液状態が保てるメタノールを測定溶媒として用いた。500 μM の ABPX01 をメタノール溶液に溶解し、20、10、0、-10、-20、-30、-45、-78°C における蛍光スペクトルを測定したところ、Fig. 6(b) に示すように温度が降下するに従い、蛍光強度の増大がみられ、ABPX01 はサーモクロミズムを示すことが確認された。

これらの結果より、ABPX01 は凝集状態において、RIR により発光性が増すことが示唆された。今後、AIEE を示す ABPX01 の X 線結晶構造解析やベンゼン環部位のカルボン酸の蛍光団へ与える影響について検討を行い、化学構造と蛍光の関連性を解明していく必要がある。

3. 7 発光強度の向上を目指した新規 ABPX 誘導体の合成

色素分子の蛍光発光の有無は、分子の自然発光速度

と、色素の回転や振動などの分子内運動に伴う熱放射速度との競合であると説明できるため、高い発光効率の実現には、RIR を考慮した分子設計が必要と考えられる。先のクロミズム実験により、リード化合物の ABPX01 の AIEE には、RIR が関与していることが推察された。ABPX01 は、蛍光団のエーテル架橋により分子の振動緩和は抑えられている一方、窒素周辺部位のジアルキル側鎖の自由回転運動に伴う熱放射失活が顕著で、これらが蛍光量子収率の低下に関わることが予想される。従って、蛍光団の窒素部位の構造的剛直化に伴う RIR を目的とした新規 ABPX 誘導体の分子設計を行った。具体的には、ジュロリジン環構造の導入を行った ABPX 誘導体の合成を行い、Scheme 2 に示すように、ABPX05 並びに ABPX06 の合成に成功した。

続いて、合成した ABPX05 並びに 06 の濃度に対する蛍光強度の変化を 1% の TFA を含有したクロロホルム中で検討したところ、いずれの化合物も AIEE を示した。

また ABPX01 と比べ、ABPX05 は 4 倍以上、ABPX06 は 3 倍以上の発光強度の向上に成功した。また ABPX06 は、ABPX01 と比べ、単量体並びに凝集体の蛍光波長ピークとも、長波長側へのシフトが観察された (Fig. 7)。上記の結果より、ABPX の凝集状態での蛍光強度の増加には、RIR が関与していることが示唆された。

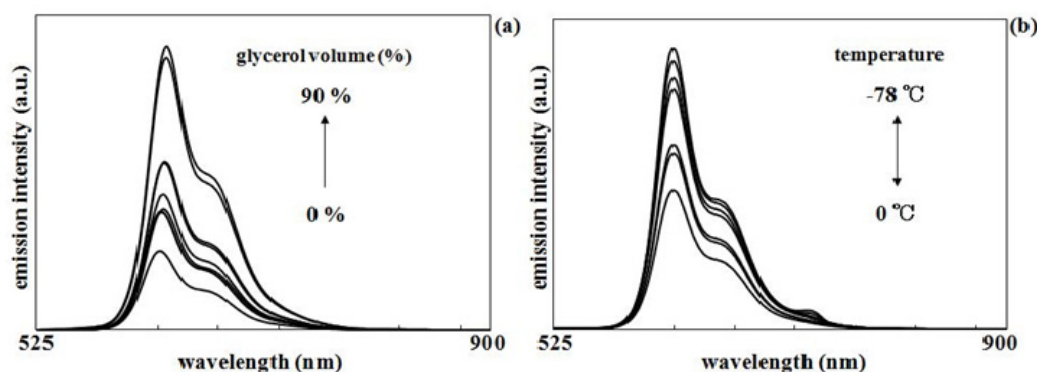
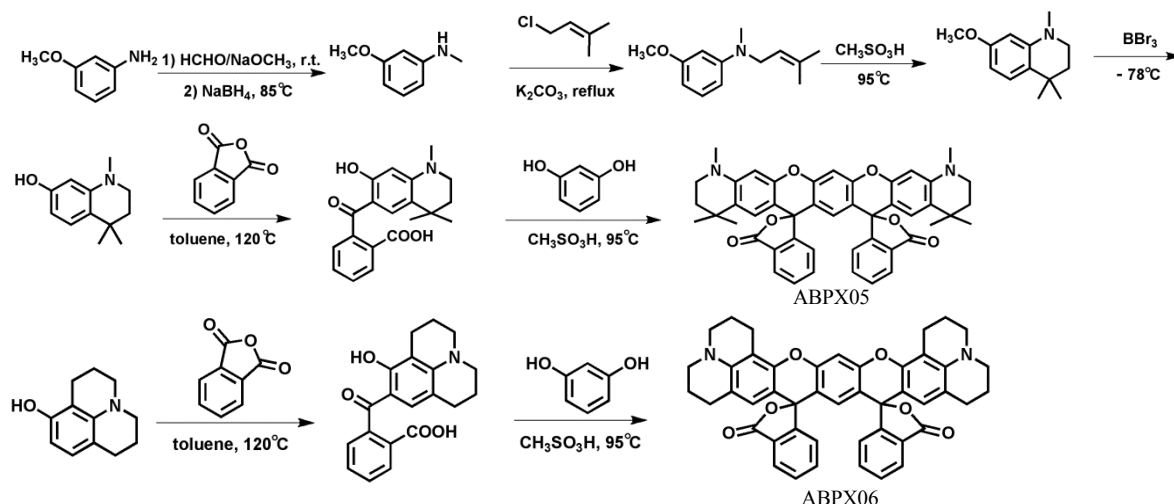


Fig 6. (a) Effects of composition of glycerol-methanol mixture on emission intensity of ABPX01. In the mixtures with glycerol fractions > 80%, the emission intensity rapidly increased due to the viscosity effect (viscoseochromism). (b) Effects of temperature on emission intensity of ABPX01 in methanol. When a methanol solution of ABPX01 was cooled, its emission intensity was increased due to thermochromism. The above results suggested that RIR caused AIEE. 1.0% TFA was added to ensure protonation and prevent pseudobase formation during measurement.



Scheme 2. Syntheses of ABPX05 and ABPX06

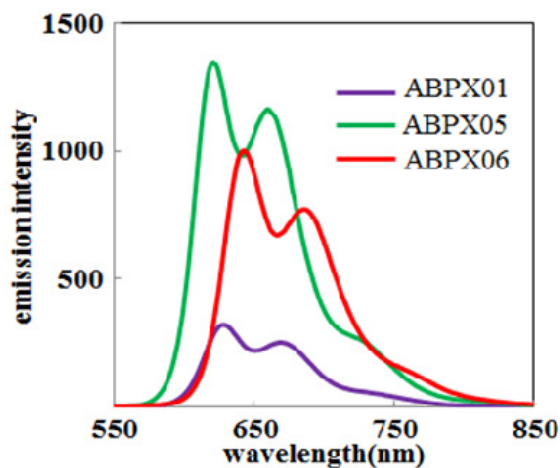


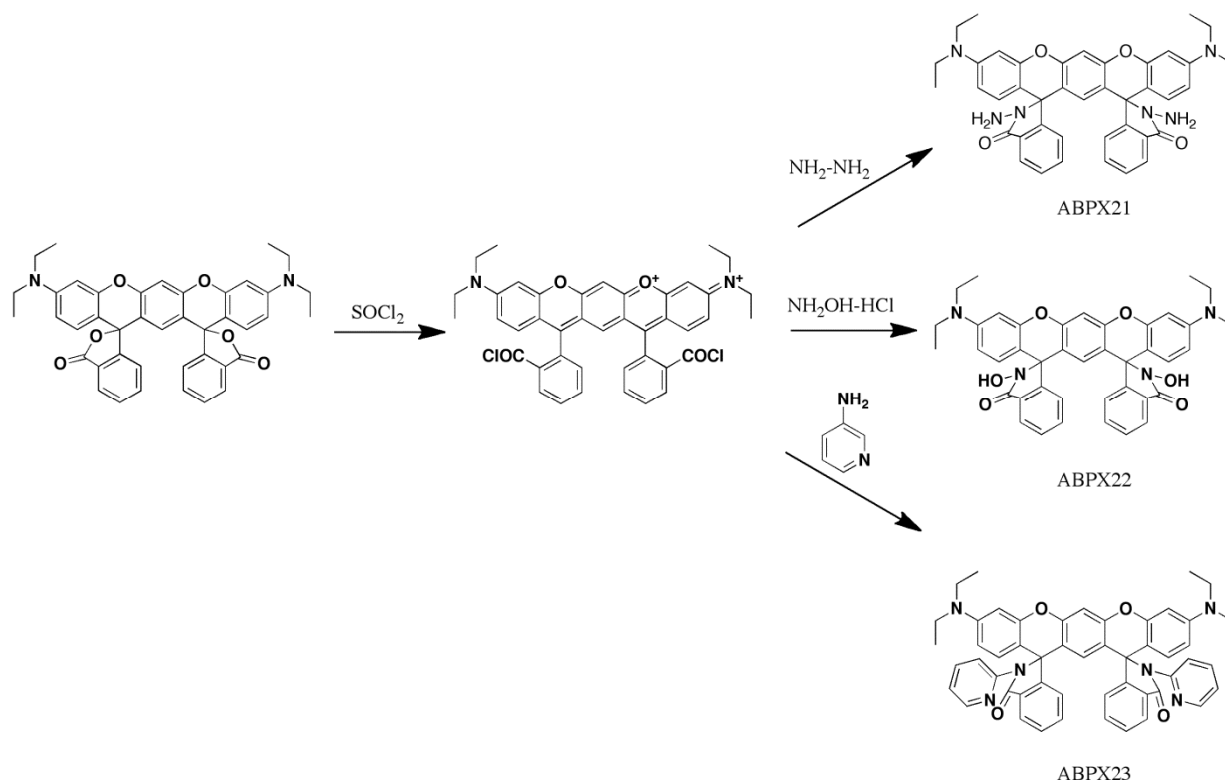
Fig. 7. Emission spectra of ABPX01, ABPX05 and ABPX06 in 1% TFA/CHCl₃ mixtures

3. 8 金属配位能を有する ABPX 誘導体の合成

ABPX が酸性溶液中で AIEE を示すのは、ベンゼン環部位のカルボニル基酸素にプロトン原子が配位することが発端となり、発光団部位が共鳴構造を形成した後、自己集合化することで、定量的に発光が増大すると推察される。そこで、同様のカチオン性を有した金属イオンを選択的に分子認識できるよう、ABPX01 のカルボン酸部位を構造改変した新規 ABPX 誘導体の合成が達成できれば、金属イオンの集積に応じて蛍光シグナルが定量的に増大するといった発光原理に基づく蛍光プローブとなることが予想される。

これらを踏まえ、金属イオン検出用 ABPX 蛍光プロー

ブの開発を目指し、各種金属イオンと安定な錯生成能を有する官能基であることが知られているヒドラジド化合物、ヒドロキサム酸化合物並びに、アミノピリジン化合物の合成を行った。まず **Scheme 3** に示すように、ABPX01 を塩化チオニルにてカルボン酸クロライド化した後、ヒドラジン、塩酸ヒドロキシルアミン並びに 2-アミノピリジン ABPX01 酸クロライド誘導体へ滴下し、攪拌反応させることで、ABPX21-23 の合成に成功した。現在、それぞれの ABPX 誘導体の AIEE 特性について評価するとともに、にがり中に含まれる各種金属イオンとの蛍光反応及び呈色反応について検討している段階である。



Scheme 3. Syntheses of ABPX 21, ABPX22, and ABPX23

3. 9 高濃度溶液中での蛍光検出

一般的な有機系色素は高濃度になるに従い、濃度消光や自己吸収がみられるため、蛍光物質の濃度と蛍光強度の検量性に乏しく、低濃度での利用が常識となっている。これに相まって蛍光光度計やその検出方法も低濃度域での評価を行うための装置構成となっており、高濃度域 (10^{-5} mol/l 以上) での蛍光物性評価を行える装置開発は殆ど行われていないのが現状である。

今回 ABPX01 の蛍光検出において、**Fig. 8(a)** に示すように蛍光スペクトルのピークトップがランダムにシフトする問題を生じた。これは $500 \mu\text{M}$ と高濃度の ABPX01 の吸光度が高いため、内部遮蔽効果が起こり、通常測光方式では溶液の内部まで励起光が到達しにくく、検出器が受光できないためと考えられる。そこで、表面測光方式による蛍光検出を検討した。

表面測光方式とは **Fig. 8(b)** に示すように試料と励起光の入射角を 30° にし、セルの表面を測光すれば、全ての蛍光を受光できる検出方法で、正反射光は検出器に入れないように表面を傾斜させることで、対面に逃がすような装置構成となっている。今回、表面測光方式を利用するこ

とで、**Fig. 8(b)** に示すように内部遮蔽効果や自己吸収を回避した ABPX01 の蛍光スペクトルの測定を行うことができた。このように蛍光物質の濃度と蛍光強度の検量性に注視し、真の蛍光スペクトルの評価を行うことは非常に重要な問題であることを提起したい。

また ABPX01 の発光効率の評価にあたり、蛍光量子収率が既知の標準蛍光物質がないために、相対蛍光量子収率の評価を行うことはできなかった。しかしながら、蛍光量子収率の測定は、創製した発光性材料の発光性の評価や高効率化において避けては通れないため、現在、高濃度溶液中での絶対蛍光量子収率のシステム及び測定法の構築を並行して行っている。これらの装置開発が成功すれば、既存の AIEE 分子の蛍光性の再評価に加え、新たな知見の創出により、これまで未開であった濃度域での発光性材料の利用が注目される可能性がある。

4. 結論と今後の展望

本研究では、ターゲット分子への集積に応じて蛍光シグナルが定量的に増加する蛍光団の創製を目指し、凝集に応じて発光性が増大する新しい有機系蛍光色素である

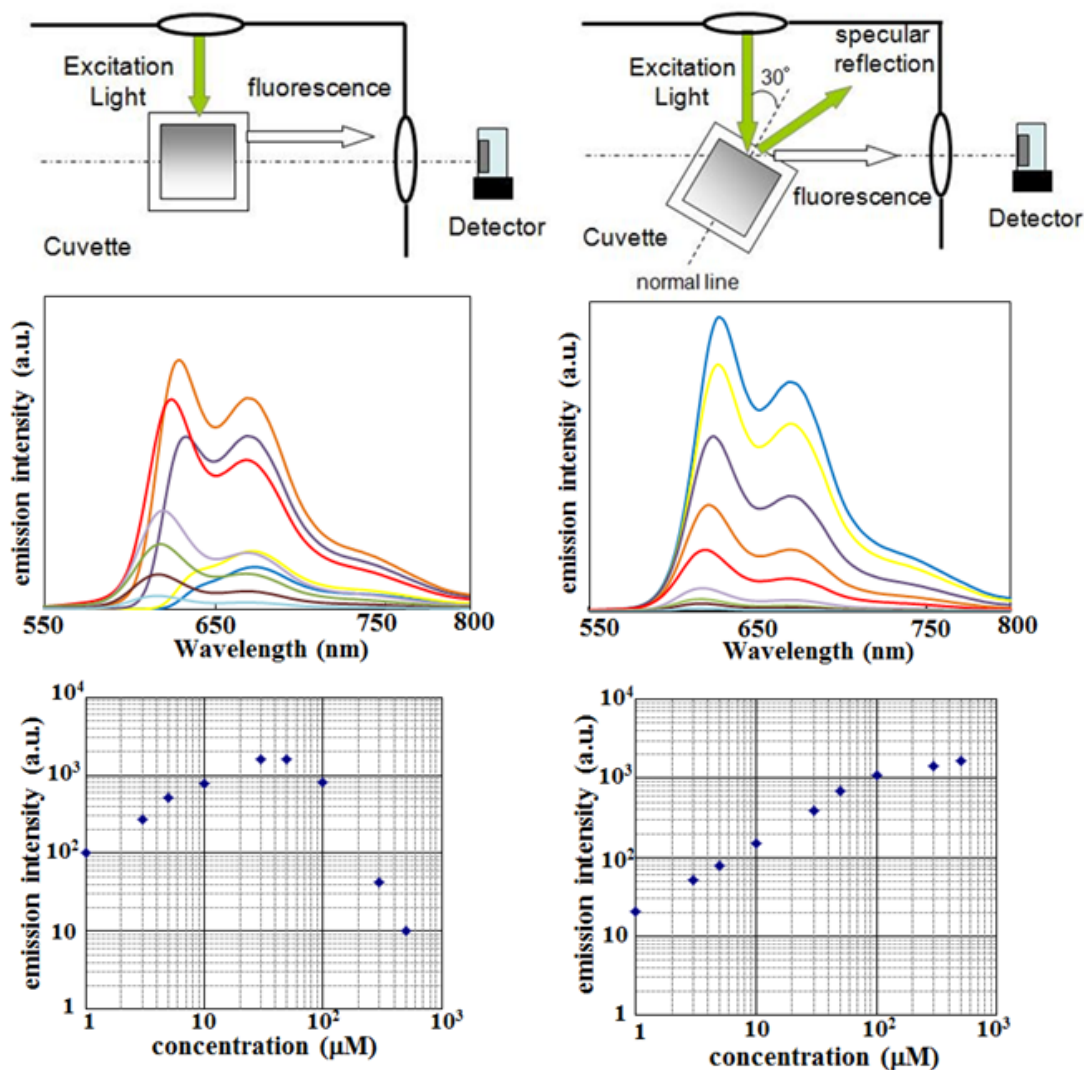


Fig. 8. Emission spectra of ABPX01 by (a) conventional photometric method and (b) surface photometric method. Shown below are the respective equipment configurations. The emission spectra by the conventional photometric method showed random shifts of the maximum wavelengths, which were caused by the internal filter effect when measurement of ABPX01⁺ was conducted at a high concentration. The problem was solved by using the surface photometric method. The sample holder was set at an angle of 30° with respect to the excitation light. However, attention should be paid to the linearity of the emission intensity against the concentration for the accurate evaluation of high-concentration sample solutions, such as AIEE molecules. In addition, the relative quantum yields of ABPX in solution could not be determined because of the lack of a standard compound. We are now developing an apparatus for the measurement of the absolute fluorescence quantum yields of high-concentration solutions.

アミノベンゾピロキサンテン系色素 (ABPX) の開発と、金属配位能を有する新規 ABPX 誘導体の開発に成功した。凝集誘起発光型ナノ粒子である ABPX は、蛍光の波長領域が生体透過性の高い赤色から近赤外域に有するため、有用な蛍光イメージングプローブとなり、蛍光強度と濃度

の検量線範囲が広い特徴を有することから、にがりのような高濃度試料に含有する微量元素の分析に適した蛍光プローブとなる可能性がある。今後は、開発した金属配位能を有する ABPX 誘導体を蛍光ナノプローブとし、にがり中に含まれる各種金属イオンとの蛍光反応について精査

し、*in vivo* 蛍光イメージングプローブとして応用していく予定である。

論文発表状況・特許出願

- [1] Shinichiro Kamino, Yuka Horio, Seiji Komeda, Katsuhiko Minoura, Hayato Ichikawa, Jun Horigome, Asana Tatsumi, Shinya Kaji, Takako Yamaguchi, Yoshihide Usami, Shun Hirota, Shuichi Enomoto and Yoshikazu Fujita, *Chem. Commun.*, **46**, 9013 (2010).
- [2] 神野伸一郎, 榎本秀一, 新規化合物及びその利用 (凝集誘起発光特性を有したアミノベンゾピロキサンテン系色素の製造方法), US12/958504.

プレスリリース及び記事

1. 榎本秀一ほか, 記事, 蛍光色素の光、数百倍に, 日経産業新聞, 2011.2.18
2. 榎本秀一ほか, 記事, 凝集で発光する色素—医療分野の標識に応用へ, 化学工業日報, 2011.2.17
3. 榎本秀一ほか, 記事, 凝集すると発光が増大, 科学新聞, 2011.2.25
4. 榎本秀一ほか, 記事, 新しい蛍光色素開発, 山陽新聞, 2011.5.24
5. 榎本秀一ほか, 安価に大量生産できる凝集すると発光する蛍光色素, コンバーテック 3月号(2011)
6. 榎本秀一ほか, 凝集すると発光する有機系蛍光色素分子 (ABPX) を開発—アルツハイマー病などの新しい治療法開発に期待, 理研 NEWS 4月号(2011)

Dye-Concentrated Organically Modified Silica Nanoparticles as Fluorescent Magnesium Probe and Its Application of Fluorescent Imaging for Bittern

Shuichi Enomoto, Shinichiro Kamino

Graduate School of Medicine, Dentistry and Pharmaceutical Sciences, Okayama University

Summary

While metal ions in nigari (bittern) have caught our attention as health has become an important issue to many peoples' lives, there are little analytical methods to grasp time-dependently the metabolism of metal ions *in vivo*. Organic fluorescent dyes have recently employed as fluorescent probes for molecular imaging. However, organic dyes-based fluorescent probes exhibit a strong tendency to form aggregates when accumulated on a target molecule, which cause emission quenching. The phenomenon causes serious disadvantages such as narrowing the measurement range and lowering the light permeability to body for their fluorescent imaging. In particular, it is very difficult to detect accurately metal ions derived from nigari *in vivo* because great amounts of metal ions are contained in nigari. Therefore, the development of new fluorescent dyes is required to improve the drawback of these problems. While the recent study entirely devotes to prevent aggregation-caused quenching (ACQ), we focus on the development of a fluorescent dye with aggregation-induced emission enhancement (AIEE) which enables to solve these problems. Here, we report for the first time the design, syntheses, and characteristics of new class of AIEE-active rhodamine dyes. As for the design of AIEE-active rhodamine dyes, the π -conjugation of luminophore moiety is further extended compared with that of conventional rhodamine dyes. The elongated luminophore moiety in the monomeric state is greatly distorted resulting in no emission. In the aggregated states, the luminophore moiety is partial-planarized and intra-rigidified resulting in emission enhancement. To challenge this concept, we have found a synthetic route for new class of rhodamine dyes: aminobenzopyro-xanthene derivatives (ABPX). ABPX was synthesized from the condensation of benzophenone derivative with resorcinol. Then the emission spectra of ABPX dissolved in various solvents were measured. The emission intensity increased as ABPX concentration increased, and the behavior was directly opposite to the ACQ of common rhodamine dyes. These results showed that ABPX exhibited AIEE behavior, and the aggregation functional photoswitching character was useful to control an on/off emission system. ABPX have wide range linearity of emission intensity against the concentration. ABPX showed the long-fluorescent wavelength region from far-red to near-infrared. These photocharacterics benefit for the *in vivo* monitoring of target molecules. In addition, three ABPX derivatives possessing the metal coordination ability were newly prepared. The photocharacteristics of coordination between ABPX derivatives and metal ions are examined. We expect that ABPX series might be serve as a fluorescent imaging probe for elucidation of biological metabolism of metals ion in nigari.