

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 9 日現在

機関番号：82626

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2014

課題番号：26600034

研究課題名(和文)酸化カーボンナノチューブ近赤外蛍光プローブ

研究課題名(英文)oxygen-doped carbon nanotube near-infrared fluorescent probes

研究代表者

岡崎 俊也 (Okazaki, Toshiya)

独立行政法人産業技術総合研究所・ナノチューブ応用研究センター・研究チーム長

研究者番号：90314054

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：カーボンナノチューブは生体透過性の良い近赤外領域で発光することから、次世代蛍光プローブとして非常に期待されている。本研究課題では、発光量子収率のより大きな酸化カーボンナノチューブを近赤外蛍光プローブとして用いた免疫沈降反応に成功した。さらに生体透過性のより高い波長領域で発光する新しい酸化カーボンナノチューブの合成法を開発し、イメージングプローブとして非常に優れていることを見出した。

研究成果の概要(英文)：The intrinsic photoluminescence of single-walled carbon nanotubes (CNTs) in the near-infrared above 1000 nm makes them promising candidates for biological probes owing to low interference by bioorganic molecules and deep tissue penetration. We here demonstrated an immunoassay by using oxygen-doped CNT with higher quantum yield conjugated to immunoglobulin G antibodies. Further, we have developed a synthesis method for new oxygen-doped CNTs and showed their intrinsic potential as fluorescent imaging probes.

研究分野：ナノ材料科学

キーワード：カーボンナノチューブ 近赤外 蛍光プローブ

1. 研究開始当初の背景

単層カーボンナノチューブ(CNT)は生体透過性が特に良い、いわゆる「第2近赤外領域(1000-1400nm)」で発光することから、近赤外蛍光プローブとして大変有望視されている。実際、CNTを近赤外蛍光プローブとして用いることにより、マウスの血管がこれまでよりも鮮明に目視観測できることなど、その有用性が多数報告されていた。申請者らの研究グループもCNTを近赤外プローブとしてもちいたイムノアッセイ(免疫学的測定)に世界に先駆けて成功し、臨床検査に応用可能であることを示していた。しかしながら、CNTの発光量子収率の低さ(約0.1%)が実用化のボトルネックであり、基礎研究段階にとどまっていた。

ところが、CNT壁を適度に酸化することによって、その発光効率が実効的に100倍以上増加できることが2010年に報告され、応用段階へと進展する条件が整っていった。それは、光励起によって発生するCNT上の励起子が、酸素導入部位に効率的にトラップされ、0次元励起子となって発光するため、発光収率が高まるという理由に依る。さらに申請者らは、有機化学的手法によって、この酸化CNTを高純度で多量に合成することに初めて成功し、2013年に報告していた。

2. 研究の目的

上述のような研究状況の下、本研究では、高発光効率という今までにない特長を最大限に生かした研究開発として、酸化CNT近赤外プローブ開発を目的とした。具体的には、臨検査(イムノアッセイ)時に蛍光プローブとして使用することを想定し、抗体と結合させたのちに、免疫沈降反応をおこない、実用上の目標値である1pMのタンパク質検出の可能性を短期間で明らかにすることを目指した。

3. 研究の方法

本研究では、まず、申請者らが開発した新規合成法によって酸化CNTをミリグラム~グラムスケールで作製し、その近赤外プローブ開発研究をおこなった。具体的には、合成した酸化CNTをポリエチレングリコール(PEG)によって水溶液中に分散し、PEGの先端にIgG(イムノグロブリン)抗体をペプチド結合させた。

次に、作製した酸化CNTプローブをもちいた免疫沈降反応をおこなった。ここでは、IgGがGタンパクと特異的に結合することを利用した。そして、その検出限界が従来のCNTと比較して、どの程度向上しているかを見極め、実用上要求される1pMを達成することを目指した。

4. 研究成果

有機合成の手法を用いて酸化CNTを合

成した[1] 具体的には、(6,5)のカイラル指数を有する半導体CNTがエンリッチされた試料を約1mg、10mlの0.1MジフェニルジスルフィドTHF溶液に入れ、酸素バブリングした後、500Wのタングステンランプを照射した。その際ガラスフィルタを使用し、波長500nm以下の光をカットした。合成された酸化CNT分散液をろ過し、有機溶媒で洗浄することにより、精製された薄膜状試料を得た。

合成した酸化CNTを用いて、臨検査に用いる水分散液の調製を試みた。まず、CNTの水分散液調製において実績のある超音波破砕機を用いた方法を適用したが、従来の分散法では合成された酸化CNTの分散効率が低いことが明らかとなった。そこで、酸化CNT水溶液作製方法の最適化条件の探索を行なったところ、出力がよりマイルドなバス型超音波洗浄器による分散処理により、抗体分子との結合反応に適した高濃度の酸化CNT水溶液を得ることに成功した。

一方、大気中でCNTの薄膜に紫外光を照射することにより、従来得られているものとは別種の酸化CNTを合成できることを発見した。この酸化CNTは従来法で得られる酸化CNTよりも長波長で発光した。カイラル指数(6,5)のCNTに対して適用した場合、1300nm付近で発光し、生体中の蛍光プローブとしては最適であることが分かった(図1)。

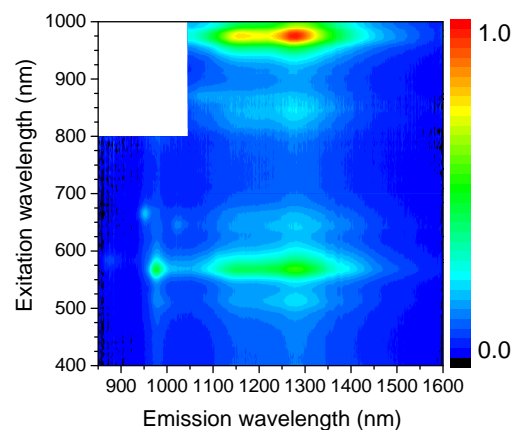


図1 大気中で光酸化して合成した酸化CNTの2次元発光マップ

紫外線照射は数分程度が最適であり、それ以上の照射をおこなうとCNTが破壊され、蛍光強度が劇的に減少した。また、ラマン散乱測定によるキャラクタリゼーションをおこなった。反応に伴い、欠陥に由来するとされているDバンドの強度が増加していた(図2)。さらに、光吸収スペクトルを測定した。発光が顕著に変化するのに対し、吸収スペクトルの形状は変化がなかった(図3)。これらの特徴はこれまでに報告されている酸化

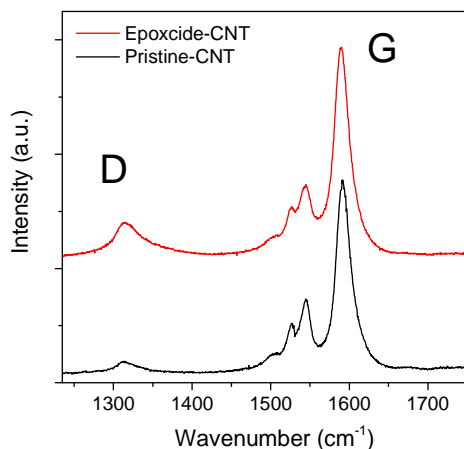


図2．反応前後のCNTから得られたラマン散乱スペクトル．励起波長 = 532 nm

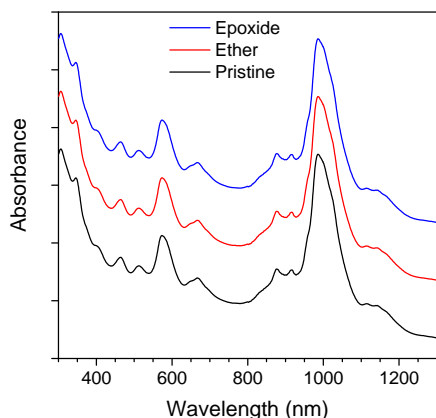


図3．反応前後のCNTから得られた光吸収スペクトル．下から、元のCNT，既存の方法で合成したエーテル型酸化CNT、今回合成したエポキシド型酸化CNT．

CNTのそれと類似しており、本合成法で得られるCNTも酸化CNTであると考えた。

さらに、酸素導入に伴う、発光エネルギーシフトの値から、この酸化CNTにおいて、酸素はエポキシドとして付加していると結論付けた。本合成方法については、特許出願をおこなった。

この酸化CNTをPEGをもちいて水溶化し、抗体分子であるIgGを化学結合させた[2]。さらに、Gタンパクとの免疫沈降反応をおこなったところ、未酸化CNTと同様に非常に効率よく反応することが確認できた。さらに観測された蛍光強度から、本酸化CNTプローブは1 pMの検出が可能であることがわかった。

さらに、本酸化CNTを近赤外蛍光プローブとして、マウスをもちいた動物実験をおこなったところ、従来もちいられていた量子ドットなどと比較し、安全性が高く、輝度も少なくとも100倍以上高いことが明らかとなった。この結果は、近赤外蛍光イメージングプローブとして、酸化CNTのポテンシャルが極めて高いことを示唆している。

以上のことから、酸化CNTは元のCNTと同様に効率よく免疫沈降反応をおこなうことができ、実用上要求される1 pMのタンパク質検出が可能であることがわかった。

<引用文献>

Y. Maeda et al., J. Am. Chem. Soc., 135, 6356 (2013).

Y. Iizumi et al., ACS Appl. Mater. Interfaces, 5, 7665 (2013).

5．主な発表論文等

〔学会発表〕(計 4 件)

曾根絵理香・前田優・山田道夫・鈴木光明、光酸化した単層カーボンナノチューブの評価、日本化学会第95回春季年会、船橋・日本大学、2015年3月28日

岡崎俊也、Simple synthesis of oxygen-doped single-walled carbon nanotubes and their application as fluorescent probes、9th International Workshop on Metrology, Standardization and Industrial Quality of Nanotubes (MSIN15)、名古屋、2015年6月28日(予定)

飯泉陽子、湯田坂雅子、竹内司、岡崎俊也、Application of oxygen-doped carbon nanotubes as imaging probes and fluorescent labels、Sixth Symposium on Carbon Nanomaterials Biology, Medicine & Toxicology、名古屋、2015年6月28日(予定)

岡崎俊也、カーボンナノチューブ近赤外蛍光プローブ(仮)、第24回日本バイオイメージング学会学術集会、東京、2015年9月(予定)

〔産業財産権〕

出願状況(計 1 件)

名称：近赤外発光する半導体単層カーボンナノチューブ

発明者：飯泉陽子・岡崎俊也・榊田創・金載浩

権利者：独立行政法人産業技術総合研究所

種類：特許

番号：特願 2015-011582

出願年月日：2015/01/23

国内外の別：国内

6 . 研究組織

(1)研究代表者

岡崎 俊也 (OKAZAKI, Toshiya)
独立行政法人産業技術総合研究所・ナノテ
ューブ応用研究センター・研究チーム長
研究者番号：90314054

(2)研究分担者

前田 優 (MAEDA, Yutaka)
東京学芸大学・教育学部・准教授
研究者番号：10345324