

令和元年6月27日現在

機関番号：32660

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H04499

研究課題名(和文) セラミックスナノ粒子を用いたSBWにおけるナノ温度イメージング基盤の確立

研究課題名(英文) Development of SBW Fluorescence Nanothermometry Platform by Using Ceramic Nanoparticles

研究代表者

曽我 公平 (SOGA, Kohei)

東京理科大学・基礎工学部材料工学科・教授

研究者番号：50272399

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,900,000円

研究成果の概要(和文)：cmオーダーに及び生体深部のイメージングが可能なSBW近赤外波長域において、近赤外蛍光を用いて、レシオメトリック法およびタイムゲート法により、蛍光測定の情報から温度イメージングを実証した。さらには観察深度のメリットを最大限に引き出し、CT原理による三次元蛍光温度イメージングが可能であることを示した。一方で実際に動物の経皮イメージングを実施する過程で、レシオメトリック法では絶対温度の推定に限界がある一方、タイムゲート法を用いることで生体深部、三次元の蛍光温度イメージングが可能であることを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

生体深部の温度はこれまで不可視であった。本研究は生体深部の温度を蛍光によって三次元でイメージングが可能であることを明らかにした。本成果を応用することにより、これまでにない生体内部の情報に基づく、新たな生命現象の解明が期待されるばかりでなく、これに基づき診断や治療などの医療への展開も大きく期待される。この研究は世界的に見ても新規性が高く、実施した研究チームが世界の研究をリードする状態にある。

研究成果の概要(英文)：In the SBW near infrared wavelength region, cm-order deep tissue fluorescence imaging is known to be possible. In this project, temperature imaging was demonstrated from the information of fluorescence measurement by ratiometric method and time gated method using the SBW near infrared fluorescence. Furthermore, for utilizing the advantage of the deep tissue imaging, it was shown that three-dimensional fluorescence temperature imaging by CT method is possible. On the other hand, in the actual animal imaging, ratiometric methods have limitations in absolute temperature estimation. However, by using time gated method, it was shown to be possible to perform fluorescence temperature imaging with absolute temperatures in the deep part of the living body as three dimensional imaging.

研究分野：材料工学

キーワード：SBW 蛍光 動物 温度 イメージング 近赤外

## 1. 研究開始当初の背景

希土類含有セラミックスナノ粒子(RED-CNPs)は、近赤外光を励起光として近赤外蛍光を効率よく発するのみならず、多段階励起による可視発光(アップコンバージョン発光)を示すことから、20世紀末より広くバイオイメージングへも応用展開がなされてきた。2010年にはこのアップコンバージョン発光の赤と緑の蛍光強度比を用いたナノ温度イメージングが報告され[F. Votrone et al., *ACS Nano*, 4, (2010) 3254. など]、近年にわかにその研究例が増えつつある。申請者のチームはこのRED-CNPsを用いて、はるかに高い蛍光効率で、はるかに深い観察深度が実現可能な「セラミックスナノ粒子を用いたOTN-NIR ナノ温度イメージング」技術の開発に平成27年度挑戦的萌芽研究の採択を受けて取り組み、その成果としてYb/Er/Ho共ドープ $\beta$ NaYF<sub>4</sub>ナノ粒子を用いて、SBW蛍光を用いて生体深部に室温付近の観察が可能なRED-CNPs蛍光プローブの作製に成功しており、現在このプローブを用いたイメージングシステムを作製してイメージングに取り組んでいる。単分散で粒径制御性に優れた $\beta$ NaYF<sub>4</sub>ナノ粒子は熱分解法より得られるが、単分散粒子を合成した段階ではナノ粒子はオレイン酸で修飾され、疎水溶媒中に単分散している。申請者らはこれを生体環境に相当する高いイオン性の水溶液中で単分散するために、生体毒性がなく立体反発によりナノ粒子単分散に広く用いられているポリエチレングリコール(PEG)とイオン性によりナノ粒子に多点でクーロン相互作用するポリアクリル酸(PAAc)のブロック共重合体であるPEG-*b*-PAAcによってリガンド置換し、HEPES緩衝水溶液中で単分散可能なYb/Er/Ho共ドープ $\beta$ NaYF<sub>4</sub>ナノ粒子の作製に成功した。

しかし、この研究によって新たな課題が浮上した。トルエン中に分散したナノ粒子と、水溶液中で分散したナノ粒子ではいずれもその蛍光強度比が室温付近で温度依存性を示すものの、蛍光強度比の温度依存性が異なることが明らかになったのである。一般に電子-フォノン相互作用として知られる希土類イオンに対する振動する電場の相互作用長はおおむね10nm程度と考えられ、粒径が数10nmのナノ粒子では溶液中の振動する分極やイオンの影響で溶媒に依存した相互作用が起き、その結果温度依存性に違いが生じてしまうと考えらえる。

可視光域近傍における生体における光損失は、主に短波長ほど強い光散乱と、長波長ほど強い赤外吸収の裾によって形成される。1000nm以下の近赤外波長域は従来のCCDで観察可能であり、散乱損失の少ない波長域として1990年代より精力的にその蛍光バイオイメージングへの応用が図られ、「第1の生体の窓」と呼ばれている。一方、1000nmを超える(OTN: over 1000 nm)波長域は、第一の窓に対しさらに一桁低い光損失が1980年代より予言されながら、従来のCCDでの撮像が困難なことから、申請者らが蛍光イメージングに取り組むまでバイオイメージングに応用されることはなかった。申請者らはInGaAs CCDカメラを用いたOTN近赤外蛍光バイオイメージングの有用性に世界に先駆けて注目し、2005年よりその蛍光体とイメージングシステムの開発に着手し、2014年の暮れには蛍光プローブとともにOTNにおける小動物の蛍光イメージングシステムを世界で初めて市場化することに成功した。現在この波長域は「第2の生体の窓(SBW: second biological window)」と呼ばれるようになり、従来の蛍光イメージングの深度である数mmをはるかに凌駕する数cmの観察深度を有する次世代蛍光バイオイメージングツールとしてにわかに脚光を浴び、米国企業が独占してきた小動物イメージングの市場において我が国発の技術を普及させるべき一石をバイオイメージング研究分野に投じた。

一方、蛍光から得られる情報に基づく温度イメージングでは、2014年のノーベル化学賞に報告されている超解像顕微鏡の原理を応用し、波長解像限界よりもはるかに高分解能のナノ温度イメージングが可能になると考えられ、その方法には多くの提案がなされており、特に温度によって変化する有機色素の蛍光強度の時間変化から温度を推定する方法は蛍光体濃度に依存しない計測方法として報告がされている。しかし、この方法では画素ごとに蛍光の時間変化を計測するシステムが複雑で大掛かりであり、解析も単純ではない。これに対し、波長の異なる蛍光バンドの強度比をもとに温度を推定する方法では、画像化する際に対応するバンドごとにフィルター分光撮像するのみの簡単な画像取り込みと、蛍光強度の比をとるだけの簡便な解析によって温度分布の画像化が可能であることが大きなメリットである。

## 2. 研究の目的

「第2の生体の窓(SBW)」と呼ばれる1000~1700nmの波長域は、蛍光バイオイメージングにおいて従来の波長域に比べ約10倍の数cmにおよぶ観察深度を達成可能なことから近年にわかに注目を浴びている。また、蛍光強度比を用いたナノ温度イメージングは、プローブ濃度の影響を受けず、高解像度で三次元の温度の可視化方法として注目を集める温度の可視化手法である。本研究では萌芽研究で確かな感触を得たセラミックスナノ粒子を用いたSBWにおけるナノ温度イメージングについて、実用的かつ革新的な科学技術研究手法として材料とシステムの双方からその基盤を確立することを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) 近赤外蛍光レシオメトリーによる生体深部温度イメージング

有機蛍光色素 (IR-1061)、熱分解法 6) により作製した平均粒径 37 nm の NaYF<sub>4</sub>: Yb<sup>3+</sup>, Er<sup>3+</sup> NPs (NaYF<sub>4</sub> NPs)、ポリ乳酸とポリグリコール酸とのランダム共重合体である PLGA (poly(D,L-lactide-co-glycolide)) をテトラヒドロフラン (THF) とアセトニトリル (ACN) との混合溶液中に溶解した。これらの粒子/色素含有溶液を両親媒性の poly(ethylene glycol) (PEG) の片末端に疎水性セグメント (PLGA) を有するポリマー (PEG-PLGA) を溶解した水中に滴下した後、開放系で混合・攪拌 (室温、24 h) することで有機溶媒を除去し、OTN-HNPs を作製した。OTN-HNPs に対して、動的光散乱 (DLS) による各溶媒中 (純水 (D.W.)、生理食塩水 (saline)、培地 (MEM)、リン酸緩衝液 (PBS)) における粒径分布、D.W. 中での吸収・蛍光スペクトル (励起波長: 980 nm) を測定した。OTN-HNPs の蛍光強度比 LIR ( $I_{Er}/I_{dye}$ ) の温度依存性を評価するために、温度を 25–55°C の範囲で変化させながら、各温度における蛍光スペクトルを測定した (励起波長: 980 nm)。

#### (2) OTN-NIR 蛍光寿命の三次元取得システムの構築

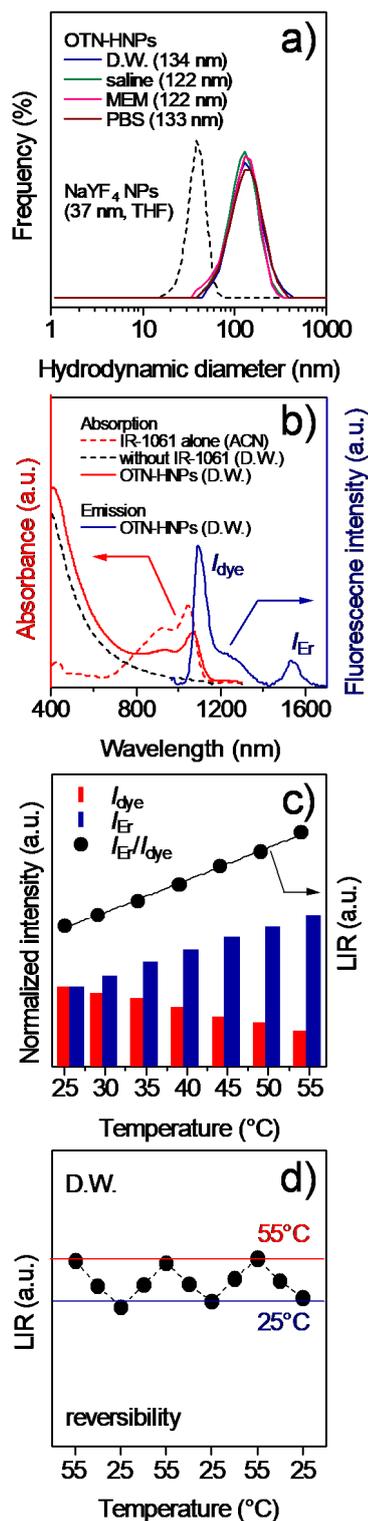
セラミックス蛍光体 NaYF<sub>4</sub>: Nd<sup>3+</sup>, Yb<sup>3+</sup> 及び YPO<sub>4</sub>: Nd<sup>3+</sup>, Yb<sup>3+</sup> を寒天ゲル内に注入し、パルス励起光を照射した後の蛍光画像の経時変化を取得した。試料からの蛍光の投影像の経時変化を、0.5 度ずつ異なる角度から撮像し、断層画像上に再構成した。続いて、断層画像の各画素について、蛍光強度の減衰率から蛍光寿命を算出した。得られた蛍光寿命画像を積層することで、蛍光寿命の三次元分布を作成した。

### 4. 研究成果

#### (1) 近赤外蛍光レシオメトリーによる生体深部温度イメージング

PLGA コア部に有機蛍光色素である IR-1061 と RED-CNPs である NaYF<sub>4</sub> NPs を内包し、さらに親水性高分子シェル部として PEG-PLGA を用いたコアシェル構造をとることで、各分散媒中において平均粒径 122–134 nm の OTN-HNPs を作製した (Fig. 1a)。D.W. 中での OTN-HNPs の吸収スペクトルにおいて、波長 800–1100 nm にかけて IR-1061 由来の吸収ピークが見られることから (Fig. 1b)、コアシェル構造中に IR-1061 が内包されていることが示唆された。さらに励起光 980 nm 照射により、IR-1061 ( $I_{dye}$ , 1100 nm) と NaYF<sub>4</sub> NPs 由来 ( $I_{Er}$ , 1550 nm) の蛍光ピークがそれぞれ検出されたことから (Fig. 1b)、コアシェル構造中に IR-1061 と NaYF<sub>4</sub> NPs が内包されていることが示唆された。IR-1061 のコアシェル構造中での安定性を評価するために、各分散媒中での吸収スペクトルを経時的に測定したところ、1 週間後においても 90% 程度の吸光度が維持された。このことから、IR-1061 が安定的にコアシェル構造中に内包されることで OH<sup>-</sup> の振動から遮蔽され、生理環境下においても構造中に安定的に存在していることが示唆された。

OTN-HNPs (D.W.) の温度計としての性能を評価するため、温度変化に対する  $I_{dye}$ 、 $I_{Er}$ 、LIR ( $I_{Er}/I_{dye}$ ) をプロットした (Fig. 1c)。温度上昇に伴い  $I_{dye}$  は減衰した一方で、 $I_{Er}$  は増大した。これらの蛍光強度比を表す LIR ( $I_{Er}/I_{dye}$ )



**Figure 1.** a) Particle size distribution of the OTN-HNPs. b) Absorption and emission spectra of the OTN-HNPs (in D.W.). c) Temperature dependence of the  $I_{dye}$ ,  $I_{Er}$ , and LIR ( $I_{Er}/I_{dye}$ ). d) LIR ( $I_{Er}/I_{dye}$ ) values under multiple heating-cooling cycles (in D.W.).

は、温度に対して正の傾きを示した。温度感受性を示す値である  $Sr = (1/LIR)(dLIR/dT)$  ( $\%^\circ\text{C}^{-1}$ ) は  $25\text{--}54^\circ\text{C}$  の範囲で  $1.80 \pm 0.012\%^\circ\text{C}^{-1}$   $-1.18 \pm 0.0090\%^\circ\text{C}^{-1}$  となった。

LIR ( $I_{Er}/I_{dye}$ ) が示す温度依存的な変化は、複数回の温度サイクルに対しても 94%以上の精度で再現可能であった (Fig. 1d)。さらに、測定前後で平均粒径に有意差が見られなかったことに加えて、IR-1061 の内包率も変化していなかったことから、OTN-HNPs の堅牢性と分散安定性が示唆され、ナノ温度測定への応用が期待される。

## (2) OTN-NIR 蛍光寿命の三次元取得システムの構築

NaYF<sub>4</sub> 及び YPO<sub>4</sub> の蛍光寿命は、それぞれ 470  $\mu\text{s}$ 、240  $\mu\text{s}$  であった (Fig. 2)。得られた投影像から蛍光強度の経時変化が断層画像上に再構成され、各画素について算出される蛍光寿命の分布を断層画像上に取得できた (Fig.3)。この断層画像を積層することで、蛍光寿命分布の三次元像が得られ (Fig.4)。異なる蛍光体の蛍光寿命の違いが見られたことから蛍光寿命の三次元取得システムを構築することができたと考えられる。蛍光寿命と発光体周辺の温度との相関関係を用いることで、構築した TGI-CT システムの三次元温度イメージングへの応用が期待される。

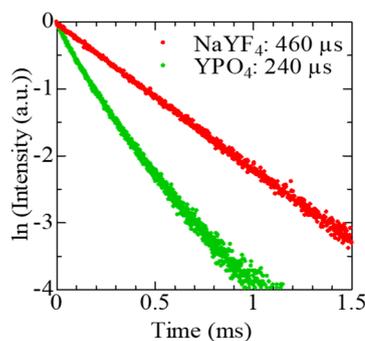


Fig.2 蛍光減衰曲

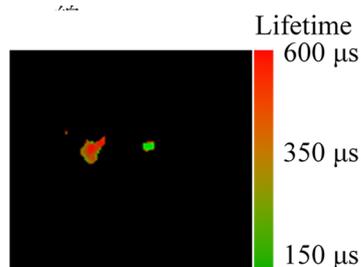


Fig.3 蛍光寿命分布の断層画像

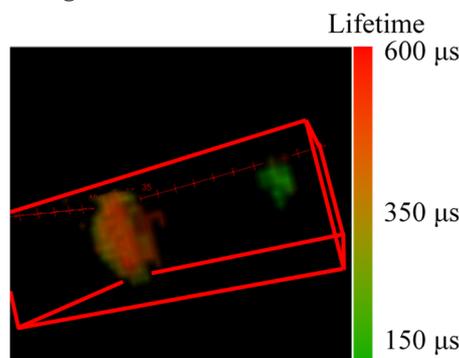


Fig.4 三次元蛍光寿命分

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 5 件)

1) Shota Sekiyama, Masakazu Umezawa, Shuhei Kuraoka, Takuji Ube, Masao Kamimura, Kohei Soga, "Temperature Sensing of Deep Abdominal Region in Mice by Using Over-1000 nm Near-Infrared Luminescence of Rare-Earth-Doped NaYF<sub>4</sub> Nanothermometer," *Scientific Reports*, **8** (2018) 16979-. DOI:10.1038/s41598-018-35354-y(査読有)

2) Masao Kamimura, Yuto Yano, Shuhei Kuraoka, Satoru Suyari, Takuji Ube, Laura Wortmann, Kohei Soga, "Near-Infrared to Visible Upconversion Emission Induced Photopolymerization: Polystyrene Shell Coated NaYF<sub>4</sub> Nanoparticles for Fluorescence Bioimaging and Nanothermometry," *JOURNAL OF PHOTOPOLYMER SCIENCE AND TECHNOLOGY*, **30** (2017) 265-270.(査読有)

3) Masao KAMIMURA, Taiki MATSUMOTO, Satoru SUYARI, Masakazu UMEZAWA, Kohei SOGA, "Ratiometric near-infrared fluorescence nanothermometry in the OTN-NIR (NIR II/III) biological window based on rare-earth doped b-NaYF<sub>4</sub> nanoparticles," *Journal of Materials Chemistry B*, **5** (2017) 1917-1925. DOI:10.1039/C7TB00070G(査読有)

4) 曾我 公平、上村 真生, "OTN 近赤外蛍光バイオイメージングシステムの開発," *生物物理*, **57** (2017) 81-84.

DOI:10.2142/biophys.57.081(査読有)

5) 岸本 英博、福田 啓介、竹下 寛之、曾我 公平, "希土類ナノ粒子 OTN 近赤外蛍光プローブによるマウス in vivo イメージングの応用," *バイオイメージング*, **25** (2016) 16-18.(査読有)

[学会発表] (計 9 件)

1) 【口頭発表(基調)】Kohei SOGA, "Materials and System Development for Near Infrared Biophotonics with Transparency [Plenary]," ADVANCED CERAMICS AND APPLICATION VII (Belgrade, Serbia, 2018 年 9 月 17 日~9 月 19 日).

2) 【口頭発表(招待・特別)】Shota Sekiyama, Masakazu Umezawa, Shuhei Kuraoka, Takuji Ube, Masao Kamimura, Kohei Soga, "Temperature Sensing of Deep Abdominal Region in Mice by Using Over-1000 nm Near-Infrared Luminescence of Rare-Earth-Doped NaYF<sub>4</sub> Nanothermometer," QBI 2019 - Quantitative Bioimaging Conference (Rennes, France, 2019 年 1 月 9 日~1 月 11 日).

- 3) 【口頭発表(招待・特別)】Kohei SOGA, Gil YEROSLAVSKY, Karina NIGOGHOSSIAN, Masakazu UMEZAWA, Kyohei OKUBO and Masao KAMIMURA, "OTN(over-1000-nm) NIR PHOSPHORS FOR BIOMEDICAL APPLICATIONS," Phosphor safari 2018 (International Symposium for Phosphor Materials) (Koreana Hotel, Seoul, Republic of Korea, 2018年11月4日～11月7日).
- 3) 【口頭発表(招待・特別)】Kohei SOGA, "Application of Rare-Earth Doped Ceramic Nanomaterials for OTN-NIR Biomedical Photonics," International Conference on Semiconductors, Optoelectronics and Nanostructures (ICSON 2018) (Paris, France, 2018年8月20日～8月21日).
- 4) 【口頭発表(招待・特別)】Kohei SOGA, "Biophotonics in Infrared Therapeutic Windows [Keynote]," Spectral Shaping for Biomedical and Energy Applications (SHIFT 2017) (Tenerife, Canary Islands, Spain, 2017年11月13日～11月17日).
- 5) 【口頭発表(招待・特別)】Masao Kamimura, Kohei Soga, "Over-1000 nm Near-Infrared (OTN-NIR) (NIR-II/III) Fluorescence in vivo Imaging," 18th International Union of Materials Research Societies International Conference in Asia (IUMRS-ICA) (Taipei Nangang Exhibition Hall, Taipei, Taiwan, 2017年11月5日～11月9日).
- 6) 【口頭発表(招待・特別)】Kohei Soga, "Over-1000 nm Near-Infrared (OTN-NIR) (NIR-II/III) Fluorescence in vivo Imaging," Fluorescent Nanomaterials Design for Over 1000 nm Near Infrared (OTN-NIR) Biophotonics [Keynote] (Taipei Nangang Exhibition Hall, Taipei, Taiwan, 2017年11月5日～11月9日).
- 7) 【口頭発表(招待・特別)】Kohei SOGA, Masao KAMIMURA, "Luminescent Probe Design for Biophotonics in the OTN-NIR (NIR II/III) Biological Window," International Symposium on Luminescence, Spectroscopy and Applications (Phosphor Safari 2016) (Hong Kong Baptist University, Hong Kong, 2016年11月28日～12月1日).
- 8) 【口頭発表(招待・特別)】Masao Kamimura, Kohei Soga, "Over-1000 nm Near-Infrared Fluorescent Nanoprobes for in vivo Bioimaging," 8th International Workshop on Advanced Materials Science and Nanotechnology (IWAMSN 2016) (Ha Long City, Vietnam, 2016年11月8日～11月12日).
- 9) 【口頭発表(招待・特別)】Kohei SOGA and Masao KAMIMURA, "Luminescent Materials for Biophotonics in OTN-NIR Biological Window [Keynote]," MS&T (Materials Science and Technology) 2016 (Salt Lake City, Utah, USA, 2016年10月23日～10月27日).

[図書](計0件)

[産業財産権]

○出願状況(計0件)

○取得状況(計0件)

[その他]

ホームページ等

<http://www.ksoga.com>

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

曾我 公平 (SOGA KOHEI)

東京理科大学基礎工学部・教授

研究者番号:50272399

### (2)研究分担者

上村 真生 (KAMIMURA MASAO)

東京理科大学基礎工学部・講師

研究者番号:80706888

### (3)研究分担者

岸本 英博 (KISHIMOTO HIDEHIRO)

琉球大学大学院医学研究科・教授

研究者番号:80251213

### (4)研究分担者

横田 秀夫 (YOKOTA HIDEO)

理化学研究所光量子・チームリーダー

研究者番号:00261206