

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 16 日現在

機関番号：13801

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K14938

研究課題名(和文)近赤外光一可視光波長変換によるバイオイメージング技術の開発

研究課題名(英文)Development of bioimaging by near-infrared to visible up-conversion

研究代表者

川井 秀記(KAWAI, Hideki)

静岡大学・工学部・准教授

研究者番号：80324341

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：バイオイメージングのための三重項-三重項消滅によるアップコンバージョンを、ポリエチレン-ポリエチレングリコール共重合体からなる高分子ミセル中に評価を行った。界面活性剤を添加することによって、アップコンバージョン発光が2桁以上増大した。また、レーザー光強度依存性を評価したところ、アップコンバージョン発光強度を励起光強度に対して両対数軸プロットすると、傾きが2から1への遷移が観測され、そのしきい値は低下した。

研究成果の概要(英文)：The photophysical properties of up-conversion based on triplet-triplet annihilation using Pd-octaethylporphyrin and diphenylanthracene were investigated in polyethylene-block-poly(ethylene glycol) micelles. The process of up-conversion was occurred in the polymeric micelles containing sensitizer and emitter through the triplet-triplet energy transfer and triplet-triplet annihilation. Upon excitation at 532 nm in deaerated aqueous solutions they showed weak up-conversion fluorescence, the efficiency of which increased dramatically in the presence of surfactant. The threshold power density between the second order and the first order power dependence of up-conversion fluorescence decreased upon addition of surfactant.

研究分野：光化学

キーワード：バイオイメージング アップコンバージョン 高分子ミセル 界面活性剤

1. 研究開始当初の背景

近年、生体中の特定の細胞や組織を、顕微鏡下または目視において高感度に検出するバイオイメージング技術が望まれている。これは、蛍光性色素や緑色蛍光タンパク質 (GFP) といったものを用いて、紫外光や青色といった波長の短い光で励起を行い、緑色などの蛍光を生じるものである。しかしながら、このような励起光は、蛍光プローブ分子だけでなく、生体内に多く存在するコラーゲンやアデノシン三リン酸 (ATP) といったものも励起してしまい、蛍光 (自家蛍光) を生じて背景信号となり、区別しにくいという欠点がある。また、生体中には血液成分のヘモグロビンやその他の物質によって、励起光を吸収、散乱させてしまうため、深部においての観測は困難である。

それに対して、700~900 nm の波長域は、水の吸収もほとんどなく、「生体の窓」といわれ注目されている。この波長域に適したものととして、現在、インドシアニンググリーン色素 (ICG) を用いた乳がんセンチメンタルリンパ節の生検が行われている。これは、785 nm の光で ICG を励起し、845 nm の近赤外蛍光を生じるものであるが、肉眼では検出できず、特殊なカメラを持ちなければならないという問題点がある。そのため、生体透過性の高い近赤外光を用い、可視光で検出する波長変換によるバイオイメージングが求められている。

2. 研究の目的

三重項-三重項消滅 (TTA) を利用したアップコンバージョンは、高出力のレーザーを用いることなく励起光よりもエネルギーの高い光を得ることができることから、様々な分野で応用が期待されている。この機構を、図 1 に示す。

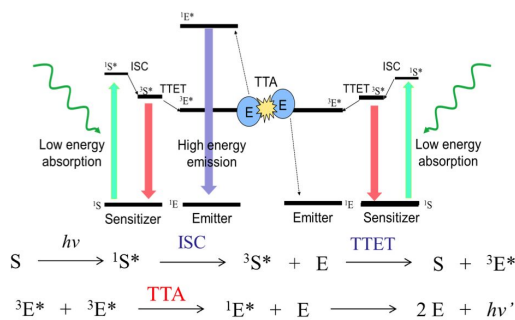


図 1. 三重項-三重項消滅によるアップコンバージョンのエネルギー図

増感剤(S)に励起光を当てると励起一重項状態ができ、項間交差(ISC)により励起三重項状態をとる。その後、発光剤(E)へと三重項-三重項エネルギー移動(TTET)が起き、励起三重項状態をとった発光剤二分子が衝突することにより TTA を起こし、発光剤の一方は基底状態に失活し、もう一方は励起一重項に遷移する。これにより、励起一重項状態の発光

剤からは、励起光よりも短波長の蛍光が得られる。

このアップコンバージョンが高分子ミセルのようなナノ粒子で発現できれば、EPR 効果を利用したがん細胞のバイオイメージングへの応用ができる。

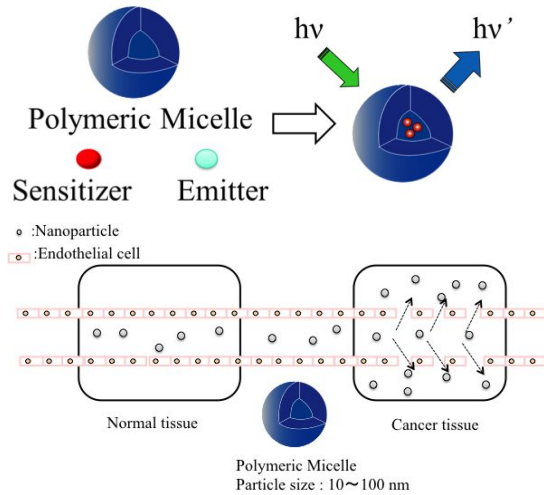


図 2. 増感剤と発光剤を内包した高分子ミセル (上) 高分子ミセルを用いた EPR 効果

本研究では、親水部と疎水部からなる高分子共重合体から形成される高分子ミセル中において、三重項-三重項消滅に基づくアップコンバージョンを水溶液中で検討を行った。

3. 研究の方法

増感剤に白金を配位したオクタエチルポルフィリン (PtOEP)、発光剤に 9,10-ジフェニルアントラセン (DPA) を用いた。高分子ミセルにはポリエチレン-ポリエチレングリコール共重合体 (PE-PEG)、界面活性剤は TritonX-100 を使用した。増感剤、発光剤、ポリエチレン-ポリエチレングリコール共重合体をクロロホルムで溶解し、そこに TritonX-100 を含む精製水を加える。この溶液を超音波処理し、クロロホルムの微小ミセルを水中に懸濁させた後、加熱と攪拌を行うことで有機溶媒を留去し、色素内包型高分子ミセルを作製した。

発光スペクトルは、Nd:YAG レーザーの第二高調波 532 nm で励起を行い、マルチチャンネル分光器を用いて測定を行った。

4. 研究成果

PtOEP と DPA を含んだ PE-PEG ミセルの粒径分布測定の結果を図 3 に示す。PE-PEG 及び TritonX-100 を加えた系の粒径ピークは 120 nm 程度であった。また、TritonX-100 のみの系では、濃度によって粒径が大きく変化したのに対して、PE-PEG を含む高分子ミセル系では、粒径の変化は殆どなかった。この結果から、高分子ミセルは EPR 効果の発現に適しているものといえる。

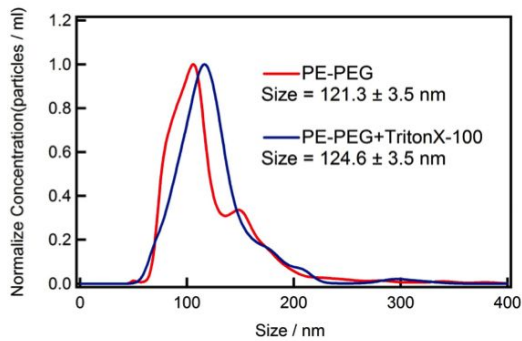


図3. 高分子ミセルの粒径分布

図4に、PtOEPとDPAを含んだPE-PEGミセル中での発光スペクトルを示す。532 nmで励起すると、660 nm付近にPtOEPのリン光が生じ、432 nm付近にDPA由来のUC発光が観測された。このUC発光は、TritonX-100を加えない系では非常に弱いものであったが、TritonX-100を加えることによって2桁以上に発光強度が増大した。これらの吸収スペクトルを比較すると、TritonX-100を含む系ではPtOEPとDPAともに、吸光度が2倍以上となった。これはマトリックスとして使用したPE-PEGの周りを界面活性剤であるTritonX-100が覆うことで、水中で高い分散安定性を保つことができたため、色素がミセル中に保持されたと考えられる。また、吸光度以上にUC発光強度が増大したのは、TritonX-100の系では、同一ミセル中にPtOEPとDPAが十分に取り込まれていて、TTET及びTTAが生じやすくなったためと思われる。

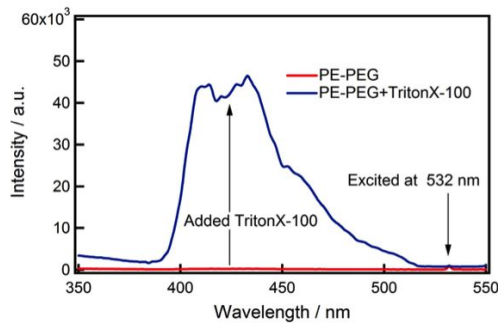


図4. PtOEP及びDPAを内包した高分子ミセルの発光スペクトル(532 nm励起)

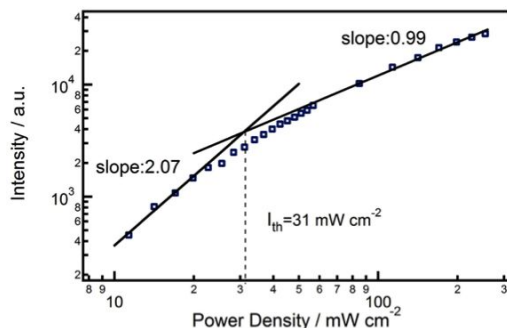


図5. PtOEP及びDPAを内包した高分子ミセルのアップコンバージョンが発光励起光強度依存性

図5に、TritonX-100を含むミセル中でのUC発光のレーザー光強度依存性を示す。UC発光強度を励起光強度に対して両対数軸プロットすると、傾きが2から1への遷移が観測された。この挙動はTTAに基づくUC発光特有のものであり、しきい値は、31 mW/cm²となり比較的低い値であるといえる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 0件)

[学会発表](計 15件)

1) 川井秀記, 原田伸治, 早川泰弘:
「高分子ミセルを用いたアップコンバージョンによるバイオイメージングの開発」
生体医歯工学共同研究拠点成果報告会, 東京医科歯科大学, 東京都文京区 (2017. 3. 24)

2) 宇田進之輔, 西山桂, 川井秀記:
「低分子オルガノゲルマトリックス中での三重項 三重項消滅に基づくアップコンバージョンの光物性評価」
日本化学会春季年会, 慶應義塾大学・日吉キャンパス, 横浜市, 神奈川県 (2017. 3. 18)

3) 原田伸治, 川井秀記:
「高分子ミセルでの三重項-三重項消滅に基づくアップコンバージョンの光物性評価」
日本化学会春季年会, 慶應義塾大学・日吉キャンパス, 横浜市, 神奈川県 (2017. 3. 17)

4) 永田雅樹, 川井秀記:
「疎水化DNA中におけるテトラベンゾポルフィリンのアップコンバージョンの光物性評価」
日本化学会春季年会, 慶應義塾大学・日吉キャンパス, 横浜市, 神奈川県 (2017. 3. 17)

5) 原田伸治, 川井秀記:
「高分子ミセルでの三重項-三重項消滅に基づくアップコンバージョンの評価」
高分子討論会, 神奈川大学・横浜キャンパス, 横浜市, 神奈川県 (2016. 9. 14)

6) 宇田進之輔, 西山桂, 川井秀記:
「低分子ゲル中での三重項 三重項消滅に基づくアップコンバージョンの評価」
高分子討論会, 神奈川大学・横浜キャンパス, 横浜市, 神奈川県 (2016. 9. 14)

7) 渥美貴弘, 川井秀記:
「DNAマトリックスにおけるイオン性色素のアップコンバージョン評価」
光化学討論会, 東京大学・駒場キャンパス, 東京目黒区 (2016. 9. 7)

8) 永田雅樹, 川井秀記:
「疎水化 DNA 中におけるテトラベンゾポルフィリンのアップコンバージョンの評価」
光化学討論会, 東京大学・駒場キャンパス、
東京目黒区 (2016. 9. 7)

9) 川井秀記:
「疎水化 DNA を用いた三重項 - 三重項消滅によるアップコンバージョン」
研究会「分子を使った寄せ木細工」, 島根大学・松江キャンパス、松江市・島根県 (2016. 5. 27)(招待講演)

10) HARADA, Shinji, KAWAI, Hideki
"Evaluation of up-conversion based on triplet-triplet annihilation in polymeric micelles"
The 96th CSJ Annual Meeting, Doshisha University, Kyotanabe, Kyoto (2016. 3. 26)

11) UDA, Shinnosuke, KAWAI, Hideki
"Evaluation of up-conversion based on triplet-triplet annihilation in polymer thin films"
The 96th CSJ Annual Meeting, Doshisha University, Kyotanabe, Kyoto (2016. 3. 26)

12) NAGATA, Masaki, KAWAI, Hideki
"Evaluation of up-conversion based on triplet-triplet annihilation of tetraphenyltetrazobenzoporphyrin"
The 96th CSJ Annual Meeting, Doshisha University, Kyotanabe, Kyoto (2016. 3. 26)

13) 渥美貴弘, 川井秀記:
「疎水化 DNA におけるイオン性色素のアップコンバージョン評価」
中部化学関係学協会支部連合秋季大会, 三重大学、津市、三重県 (2015. 11. 8)

14) 馬西洋徳, 川井秀記:
「三重項 - 三重項消滅に基づくアップコンバージョンの疎水化 DNA 内での高効率発現」
光化学討論会, 大阪市立大学・杉本キャンパス、大阪市住吉区 (2015. 9. 9)

15) 馬西洋徳, 川井秀記:
「疎水化 DNA 環境での効率的アップコンバージョンの動力学的考察」
高分子年次大会, 札幌コンベンションセンター、札幌市白石区、北海道 (2015. 5. 27)

〔その他〕
無し

6. 研究組織

(1) 研究代表者

川井 秀記 (KAWAI, Hideki)
静岡大学・工学部・准教授
研究者番号: 80324341