

平成 30 年 6 月 15 日現在

機関番号：34509

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2016～2017

課題番号：16H07368

研究課題名(和文)多色多形半導体ナノ結晶を用いた多階層イメージング画像の共通空間座標決定に向けて

研究課題名(英文) Determining common coordinates for multimodal imaging using multicolor polymorphic semiconductor nanocrystals

研究代表者

藤井 文彦 (FUJII, Fumihiko)

神戸学院大学・薬学部・准教授

研究者番号：40374657

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：半導体ナノ結晶は、光学および電子顕微鏡で観察することが可能である。そこで本研究では、多型半導体ナノ結晶を用いて、互いに異なる画像間での共通座標を決定するために、以下の3つのステップで研究を進めた。1) 第1ステップでは、3種の多型半導体ナノ結晶のサイズと形状をコントロールする条件を見出した。2) 第2ステップでは、多型半導体ナノ結晶が細胞内に取り込まれる度合いを定量的に把握する方法を検討した。3) 第3ステップでは、多数の多型半導体ナノ結晶のサイズと形状を自動解析する方法を確立した。

研究成果の概要(英文)：Semiconductor nanocrystals can be observed by optical and electron microscopies. Therefore, in this research, in order to determine common coordinates between different images of the microscopies using polymorphic semiconductor nanocrystals, we carried out the research with the following three steps. 1) In the first step, we found the conditions for controlling the size and shape of three polymorphic semiconductor nanocrystals. 2) In the second step, we investigated a method to quantify the degree of incorporation of polymorphic semiconductor nanocrystals into cells. 3) In the third step, we established a method for automatically analyzing the size and shape of many polymorphic semiconductor nanocrystals in the electron microscopy images.

研究分野：ナノバイオサイエンス

キーワード：半導体ナノ結晶 バイオイメージング

### 1. 研究開始当初の背景

生化学および分子生物学的な解析手法と異なり、共焦点レーザー走査型顕微鏡 (LSM) を始めとしたバイオイメージング技術の使用は、生きたままの状態が生体を観察できる強力な手法である。生体試料を磨り潰して均質化しないため、生体にとって極めて重要な空間情報が失われないメリットがある。

LSM は培養細胞を始めとしたマイクロメートル・オーダーの空間情報を得られるが、透過型と走査型電子顕微鏡 (TEM と SEM) ではナノメートル・オーダーの、*in vivo* イメージング装置や 2 光子顕微鏡では個体を対象としてミリメートル・オーダーの情報が得られる。理想的には、Google Earth などに見られるように空間スケールを超えてデータを可視化することが望ましいが、現時点では、上記の異なる観察技術で得られたそれぞれのバイオイメージングのデータを共通の空間座標で整理し、スケールを超えて容易に可視化するには至っていない。

### 2. 研究の目的

本研究では、様々な形状 (多形) と蛍光スペクトル (多色) を合わせもつ半導体ナノ結晶を用いて、異なる空間スケール間でサンプルの共通空間座標を決定する手法を開発することを目的とした。それによって、各々のバイオイメージング技術で得られた空間情報を関連付けることができ、薬剤を始めとした外来物質さらに生体内分子の局在と動態を、異なる空間スケールで容易に把握することが可能になると考えた。

### 3. 研究の方法

半導体ナノ結晶は量子ドットとも呼ばれるナノメートルサイズの結晶であり、1990 年代から生体標識用の蛍光プローブとしても応用されてきた。カドミウムやセレンを始めとした半導体元素からなるため、TEM での観察が可能であり、量子効果によって蛍光を発するため、LSM を始めとした光学顕微鏡での観察が可能である。さらに、半導体元素の種類を換えることによって発光波長を近赤外領域まで拡張できるため、*in vivo* イメージング装置用の蛍光プローブとしても用いることが可能である。したがって、TEM、LSM、*in vivo* イメージング装置のいずれでも検出でき、サンプルにおいて、共通の空間座標を与える目印として半導体ナノ結晶を利用できるのではないかと考えた。

#### (1) 多型半導体ナノ結晶の合成

座標を決定する指標とするために、以下の 3 種の半導体ナノ結晶を以下の方法に従って合成した。

##### 球状の半導体ナノ結晶 (QD)

QD はコア (CdSe) とシェル (CdZnS) から成り、以下の方法に従って合成した<sup>1)</sup>。コアの合成は、tri-n-octylphosphine oxide (TOPO)、stearic acid、cadmium 2,4-pentanedionate

および hexadecylamine (HDA) の混合溶液を、アルゴンガス雰囲気下で 200 まで加熱し、Tri-n-butylphosphine に溶解した Se を加えて行った。結晶成長を促進するために、240 まで温度を上げた。得られた CdSe のナノ結晶と、TOPO、HAD が入った溶液の温度を 220 に保ち、Tri-n-octylphosphine (TOP) に溶解した dimethylcadmium、dimethylzinc および Bis(trimethylsilyl)sulfide の混合溶液を加えてコアの周りにシェル構造を成長させた。この溶液の温度を 100 まで下げて 2 時間アニーリングし、温度を 60 まで下げてメタノールを加えて遠心し、沈殿物を回収した。この操作を 3 回繰り返し、得られた沈殿物を最後は Cyclohexane に溶解し、遮光した状態で室温保存した。

##### 棒状の半導体ナノ結晶 (QR)

QR はコア (CdSe) とシェル (CdS) から成り、以下の方法に従って合成した<sup>2)</sup>。コアの合成は、TOPO、octadecylphosphonic acid (ODPA)、cadmium oxide (CdO) および TOP の混合溶液を、アルゴンガス雰囲気下で 370 まで加熱し、TOP に溶解した Se を加えて行った。得られた CdSe のナノ結晶と、TOPO、ODPA、hexylphosphonic acid (HPA)、CdO が入った溶液の温度を 350 に保ち、TOP に溶解した S を加えてコアの周りにシェル構造を成長させた。この溶液の温度を 100 まで下げて一晩アニーリングし、翌日、温度を 60 まで下げてメタノールを加えて遠心し、沈殿物を回収した。この操作を 3 回繰り返し、得られた沈殿物を最後は Cyclohexane に溶解し、遮光した状態で室温保存した。

##### 放射状の半導体ナノ結晶 (QP)

QP はコア (CdSe) とシェル (CdS) から成り、以下の方法に従って合成した<sup>3)</sup>。コアの合成は、CdO、Myristic acid および 1-octadecene (ODE) の混合溶液を、アルゴンガス雰囲気下で 50 まで加熱して Se を加えた後、240 まで加熱し、その後 oleic acid (OA)、oleylamine (OL) および 1-octadecene (1-ODE) の混合溶液を加えて CdSe 結晶を成長させた。得られた CdSe のナノ結晶と、TOPO、CdO、ODPA、OL および TOP に溶解した S を加えてコアの周りにシェル構造を成長させた。数度試みたが、約 4 分以降は無色の溶液となった。

#### (2) 相関解析法の測定条件の検討

多型半導体ナノ結晶が適切な濃度で細胞内に導入できたことを確認するために、LSM (FV1000-D、オリンパス社製) に導入した以下の 2 種の相関解析法 (拡散パッケージ、オリンパス社製) の感度と解析結果の妥当性を評価した。

##### 蛍光相関分光法 (FCS)

FCS では、観測領域を固定して蛍光強度の時間変化を計測し、それを相関関数を使って解析する方法である。相関関数に理論式でフィッティングすることにより、観察領域内の平均粒子数と粒子サイズを決定できる。

### ラスタースキャン分光法 (RICS)

RICS では、観測領域を固定せずにラスタースキャンを行いながら蛍光強度の時間変化を計測し、それを相関関数を使って解析する方法である。相関関数に理論式でフィッティングすることにより、FCS と同様に、観察領域内の平均粒子数と粒子サイズを決定することができる。FCS よりも拡散速度が遅い対象物を計測することに長け、ラスタースキャンを行うことから、平均粒子数と粒子サイズの2次元マップを得ることができ、細胞の局所的情報を広範囲で比較することができる。

### (3) 半導体ナノ結晶の形状解析

多数の半導体ナノ結晶の形状解析を行うにあたり、数値解析ソフトウェア MATLAB を試した。

## 4. 研究成果

### (1) 多型半導体ナノ結晶の合成

座標を決定する指標とするために、以下の3種の半導体ナノ結晶を以下の方法に従って合成した。

#### 球状の半導体ナノ結晶 (QD)

カドミウムが含まれる混合溶液にセレンを加えた後、時間を経るにしたがって、蛍光スペクトルのピーク波長が長波長側へシフトした(図1)。その速度は、約4.5 nm/minであった。今回の実験条件下では、約15分後に蛍光スペクトルのピーク波長が約610 nm になった時点でシフトは停止した。

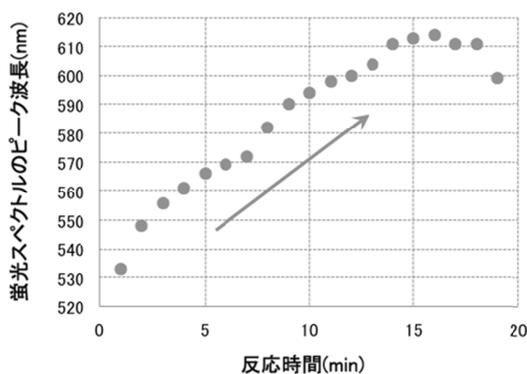


図1. QD 合成時における蛍光スペクトルの変化

反応開始2分後(図2a)、10分後(図2b)、そしてシェル構造を形成させた時(図2c)の粒子を透過型電子顕微鏡(TEM)で観察すると、粒子径はそれぞれ約2 nm、5 nm、10 nmであり、形状はいずれの時点でもほぼ球状であった。

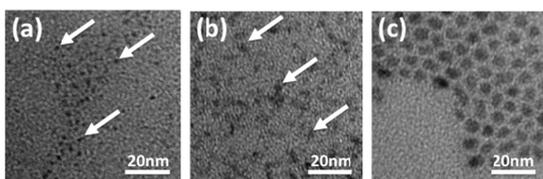


図2. QD 合成時における形状の変化

### 棒状の半導体ナノ結晶 (QR)

QRのコアが含まれる混合溶液に、シェル構造を形成させるためのカドミウムとSの混合溶液を加えた後、時間を経るにしたがって、蛍光スペクトルのピーク波長が、長波長側へ素早くシフトした(図3)。その速度はQDのコアを形成する時よりも早く、約10 nm/minであった。今回の実験条件下では、約5分後に蛍光スペクトルのピーク波長が約620 nm になった時点でシフトは停止した。

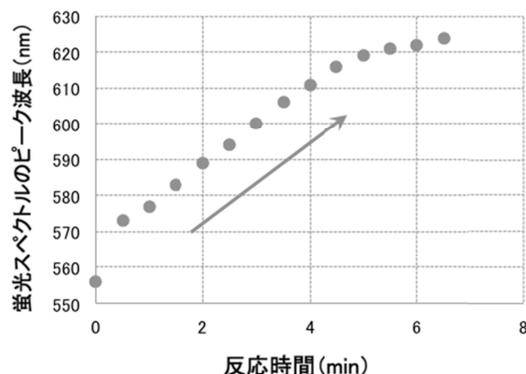


図3. QR 合成時における蛍光スペクトルの変化

コア(図4a)、反応開始2分後(図4b)、そして6分後(図4c)の粒子を透過型電子顕微鏡(TEM)で観察した。コアのみの場合は球状であり粒子径は約5 nm、シェル構造形成開始2分後には棒状になり、長軸長は約50 nm だった。反応速度が低下した6分後では、予想に反して、長軸長が約40 nm と短くなり、その一方で、短軸長が増加し約10 nm になっていた。

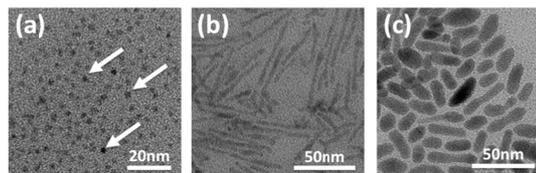


図4. QR 合成時における形状の変化

### 放射状の半導体ナノ結晶 (QP)

QPのコアが含まれる混合溶液に、シェル構造を形成させるためのカドミウムとSの混合溶液を加えた後、時間を経るにしたがって、蛍光スペクトルのピーク波長が、長波長側へ僅かにシフトした(図5)。その速度はQDやQRと比較して極めて低く、約2.5 nm/min であった。今回の実験条件下では、予想に反して、約4分以降に蛍光スペクトルのピーク波長が大きく短波長側へシフトした(データは示さず)。

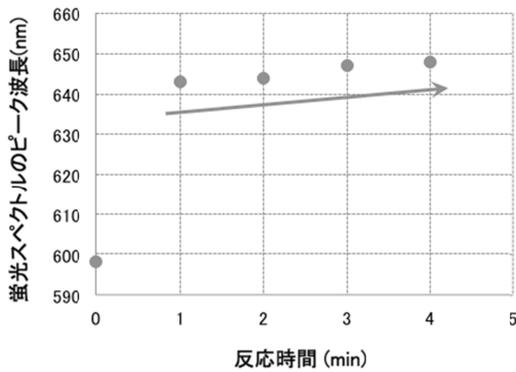


図 5. QD 合成時における蛍光スペクトルの変化

コア (図 6a)、反応開始 2 分後 (図 6b)、そして 4 分後 (図 6c) の粒子を透過型電子顕微鏡 (TEM) で観察した。コアのみの場合は球状であり粒子径は約 5 nm、シェル構造形成開始 2 分後は僅かに放射状の枝部が形成され、その長さは約 5 nm だった。シェル構造形成開始 4 分後には、枝部大きく成長し、その長さが約 20 nm に達していた。予想に反して、蛍光スペクトルのピーク波長が大きく短波長側へシフトした際の形状を確認したところ、枝部は観察できず、球状の結晶のみであった (データは示さず)。

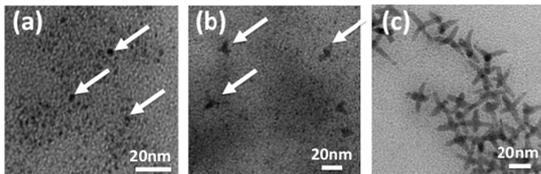


図 6. QP 合成時における蛍光スペクトルの変化

以上の結果から、反応過程で消費される物質と反応温度、さらに今回検討した反応時間をコントロールすることによって、形状だけでなく、各種半導体ナノ結晶のサイズも制御しうることが分かった。

### (2) 相関解析法の測定条件の検討

ラスタ走査を用いた空間相関解析法 (RICS) の基本原理は、共焦点を固定して行われる蛍光相関分光法 (FCS) と同じである。そこで最初に、導入したシステムの感度と解析結果の妥当性を評価するために、FCS を用いて蛍光色素 Rhodamine6G (Rho6G) と先で合成した QR を測定した。図 7a で示したように、定性的には分子サイズが数 nm の Rho6G よりも分子サイズが数十 nm に及ぶ QR の方が、共焦点領域を通過する時間が長くなることが確認できた。得られたデータを相関関数で解析することによって、それぞれの濃度と 1 粒子あたりの輝度が妥当な結果として求められた。ただし、S/N 比が高い状態で測定できる Rho6G の濃度は 0.1  $\mu\text{M}$  付近にあり、これまで使用してきたシステムよりも感度が劣ることが分かった。

次に、RICS を用いて同様のサンプルについて測定を行った (図 7b)。FCS での結果と同様、定性的には Rho6G と QR の間に明確な差が認められた。しかしながら、拡散定数など FCS と RICS 間で一致するはずのパラメータ間に不一致が見られた。これは、RICS でのキャリブレーションが正確に行われていないことが原因と予想され、今後改善を試みたい。

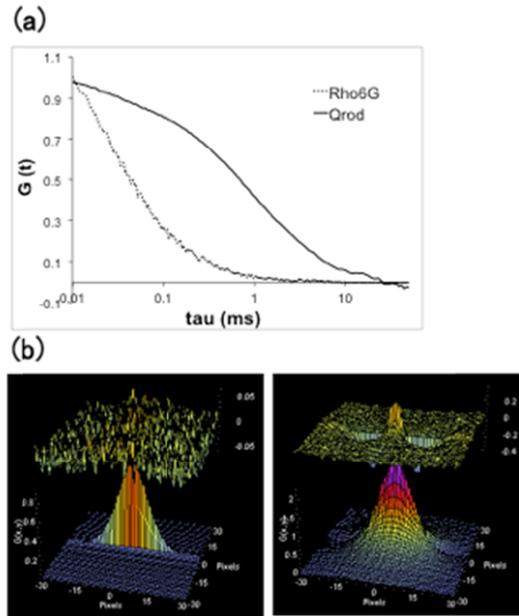


図 7. (a) Rho6G と QR の FCS 解析  
(b) 左: Rho6G の RICS 解析, 右: QR の RICS 解析

### (3) 半導体ナノ結晶の形状解析

多数の半導体ナノ結晶の形状解析を行うにあたり、数値解析ソフトウェア MATLAB を試した。MATLAB は使用者自らコード記述が可能であり、大量画像解析へのシームレスな移行が簡便であるなど拡張性が高い。生体試料中での複雑な画像解析を進めるにあたって、MATLAB 本体に加えて Computer vision system toolbox と Image processing toolbox の使用も合わせて検討した。

図 8a は TEM で撮影した QR を示している。左図は tif フォーマットの TEM 画像そのままを示し、右図は MATLAB での解析前処理した画像を示している。右図で示したとおり、約 5nm 以下の距離で近接した QR を分離・解析することが可能であった。個数のカウントはもとより、個別の QR の長軸・短軸長も含めた形状解析が可能であった (図 8b)。ただし、図 8a 右を詳細に眺めると 1 個の QR を複数個として解析している箇所があるため、画像データごとにコントラストに対する閾値をより厳密に設定する必要があることが分かった。

現在、より複雑な形状を持つ QP についても、数本の枝部の形状パラメータを抽出するためのアルゴリズムを検討している。また、生体内での半導体ナノ結晶の分布や個数を

解析することを目指している。現段階でも、MATLAB を用いて QR の相対的な位置関係や角度を把握することが可能であったため、生体内での多数の半導体ナノ結晶の形状と位置関係を把握することによって興味深い結果が得られることが予想される。一方で、TEM 画像中の半導体ナノ結晶とコントラストが高い生体内分子を区別できるか、さらに約 100 nm の厚さに切片化した生体試料中での半導体ナノ結晶の Z 軸方向の傾きをどう考慮するかなど現時点で予想される問題点がある。前者に対しては、オスミウム酸などを使用しないサンプル調整法を確立しているため、それをさらに洗練化し問題に対処したい。

< 結論 >

本研究機関内では、当初の目的とした多型半導体ナノ結晶を指標として、光学顕微鏡と電子顕微鏡で得られた画像データについての共通空間座標を決定するには至らなかったが、3 種の多型半導体ナノ結晶のサイズと形状をコントロールする条件を見出した。合成条件を注意深く検討した結果、蛍光スペクトルと形状の間に強い関係性が保たれていたことから、これらの多型半導体ナノ結晶を使用することによって、将来的に共通空間座標を決定できると考える。また、FCS あるいは RICS を使用することによって、細胞内の各種半導体ナノ結晶の濃度を決定できるため、どの程度の多型半導体ナノ結晶を細胞内に導入すれば、共通空間座標の決定に至るのかを判断することが可能である。

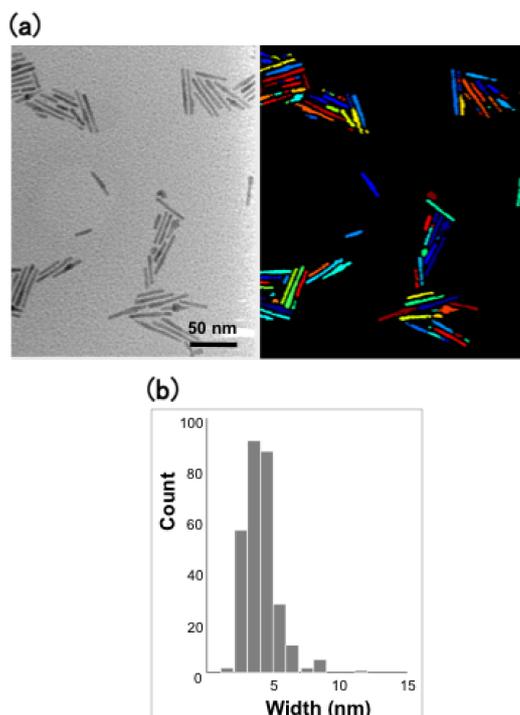


図 8. (a)左: QR の TEM 画像, 右: MATLAB での解析画像  
(b) QR の短軸長の分布

< 参考文献 >

- 1) Tiwari D.K., Tanaka S., Inouye Y., Yoshizawa K., Watanabe T.M., Jin T., Sensors (Basel), 9(11), 9332-9364, 2009.
- 2) Deka S., Quarta A., Lupo M.G., Falqui A., Boninelli S., et al., J. Am. Chem. Soc., 131(8), 2948-2958, 2009.
- 3) Mishra N., Wu W.Y., Srinivasan B.M., Hariharaputran R., Zhang Y.W., Chan Y., Chem. Mater., 28, 1187-1199, 2016.

#### 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 0 件)

[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

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

藤井 文彦 (FUJII Fumihiko)  
神戸学院大学・薬学部・准教授  
研究者番号: 40374657

##### (2) 研究分担者

なし ( )  
研究者番号:

##### (3) 連携研究者

なし ( )  
研究者番号:

##### (4) 研究協力者

Chan-Gi Pack (Chan-Gi Pack)  
Asan institute for Life Sciences, Asan  
Medical Center, University of Ulsan  
College of Medicine